



HAL
open science

Conception, synthèse et évaluation de ligands multivalents de glycosidases d'intérêt thérapeutique : maladies de Pompe, de Gaucher et diabète de type 2

Marc Borie-Guichot Froger

► To cite this version:

Marc Borie-Guichot Froger. Conception, synthèse et évaluation de ligands multivalents de glycosidases d'intérêt thérapeutique : maladies de Pompe, de Gaucher et diabète de type 2. Sciences agricoles. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30263 . tel-04552855

HAL Id: tel-04552855

<https://theses.hal.science/tel-04552855v1>

Submitted on 19 Apr 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.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
MARC BORIE-GUICHOT FROGER

Le 17 octobre 2023

Conception, synthèse et évaluation de ligands multivalents de glycosidases d'intérêt thérapeutique : maladies de Pompe, de Gaucher et diabète de type 2

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

SPCMIB - Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique

Thèse dirigée par

Cécile DEHOUX et Stéphanie BALLEREAU

Jury

M. Sebastien VIDAL, Rapporteur

Mme Estelle GALLIENNE, Rapporteur

M. Alberto MARRA, Examineur

Mme Vania BERNARDES-GENISSON, Examineur

Mme Cécile DEHOUX, Directrice de thèse

Mme Stéphanie BALLEREAU, Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu le Dr. Estelle Gallienne, Maître de conférences à l'Université d'Orléans, le Dr. Sébastien Vidal, Directeur à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, le Pr. Alberto Marra, Professeur à l'Université de Montpellier 2 et le Pr. Vania Bernardes-Génisson, Professeure à l'Université de Toulouse 3, d'avoir accepté d'examiner et de juger mes travaux de thèse.

Ces travaux ayant été réalisés au sein du laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB), établissement dirigé par le Dr. Yves Génisson, je tenais à le remercier pour m'y avoir accueilli, pour son « humour » et plus particulièrement pour m'avoir cédé son bureau. Je remercie par ailleurs l'ensemble des membres de l'équipe Sysmic et Magenta que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces trois dernières années, et en particulier Nadine pour être toujours parfaitement coiffée. Je lui souhaite bien du courage dans son nouveau poste de grand-mère. Je remercie également toute l'équipe MonaLisa du SPCMIB qui m'a chaleureusement accueilli. Ne changez pas, excepté JME.

Je remercie bien entendu chaleureusement et avec une profonde gratitude mes directrices de thèse, le Dr. Cécile Dehoux et le Dr. Stéphanie Ballereau, pour m'avoir transmis le goût de la chimie et du travail bien fait, pour le soutien émotionnel qu'elles m'ont apporté, mais également pour s'être toujours montrées disponibles, prévenantes et encourageantes. Si je peux me permettre, je n'aurai qu'un conseil commun à leur divulguer, c'est que les seules barrières qui existent sont celles que nous mettons.

Je remercie aussi nos différents collaborateurs qui ont participé à ces travaux : le Dr. Laure Gibot, le Pr. Thierry Levade, Virginie Garcia, le Dr. Catherine Caillaud, le Dr. Gerlind Sulzenbacher, le Dr. Virginie Nahoum et Fernanda Goncalves.

Je remercie également la jeune Pr. Céline Deraeve qui a été à la fois mon enseignante, mon encadrante de thèse et ma « patronne ».

J'adresse aussi mes remerciements à tous les analystes qui m'ont aidé dans l'exécution de ce travail.

J'ai également une pensée à l'ensemble des jeunes et moins jeunes (Emeline) pour les fous rires et les nombreux repas du midi animés. Cette pensée se porte plus particulièrement sur les anciens, Crystalle, Sandra et Emeline, piliers importants de la cohésion de groupe possédant toutes les trois une profonde empathie, Rasoul pour ta bienveillance, Mylan pour tous ces fous rires et nos dialogues de sourd qui n'auront jamais d'explication (mis à part une très mauvaise audition commune). N'oublions pas les petits nouveaux, Valoche, Stephen, Maelle et Yonne, certes très bruyants mais terriblement attachants. Valentine, je n'ai aucun doute sur l'avenir radieux qui te sera réservé (rempli de pots, chapeau et autres trucs en macramé) autant sur un point de vue professionnel que personnel ; et toi, Yonne, malgré de nombreux défauts indéniables, tu es un excellent chimiste et j'espère que ma fille te ressemblera. Et enfin, Margaux et Mélina, pour le soutien durant ces trois dernières années et particulièrement pour ces 6 derniers mois intenses et forts en émotion, j'espère que mon déni vous aura plus rassuré qu'angoissé. A vous tous, je ne doute pas que nous nous reverrons dans un proche avenir avec toujours autant d'enthousiasme.

A tous mes anciens stagiaires, Valoche, JB, Chloé et Mélissa, merci pour votre temps, votre énergie, nos conversations et vos chocolats.

Je tenais également à remercier l'ensemble du personnel du SPCMIB que je n'aurai pas cité et notamment Nathalie pour ces gâteaux à la citrouille, Muriel pour sa gentillesse et son ménage excessif, Isa pour ses succulents petits-déjeuners et son expérience dans la dure épreuve de la vie qui est d'élever des enfants, et également Anne-Marie pour ton « efficacité » et avoir subi toutes mes moqueries avec le sourire.

Pour finir, je remercie l'intégralité de mes amis et ma famille pour m'avoir épaulé pendant ces trois ans. Je souhaite en particulier envoyer mes remerciements à mes parents sans qui rien de tout cela n'aurait été possible et qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici en me permettant de me consacrer pleinement à mes études sans jamais manquer de rien, à Mamie et Jojo et également mes sœurs indispensables à mes yeux, à Etienne, qui fait partie de la famille qu'on choisit, pour tous ces fous rires et ces pauses café, à Amélie pour ces grands moments de décompression et de rire, à Yri pour avoir fait briller les cours d'anglais par ta simple présence, et à CC et Elo, piliers de longue date, fraîchement diplômés désormais, et à qui je souhaite un avenir radieux. Et enfin, à ma femme, petite en taille mais grande en caractère, qui est mon rocher depuis plus de 4 ans maintenant, qui me permet d'être pleinement épanoui et d'avoir cet équilibre entre passion et vie personnelle, qui m'apporte de la joie, des rires et de l'amour au quotidien et qui m'a apporté le plus beau et épuisant des cadeaux. Merci infiniment.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	4
Table des figures, schémas, tableaux	7
Introduction générale.....	11
I. Les glycosidases comme cible thérapeutique	12
I.1. Généralités sur les glycosidases	12
I.2. Glycosidases lysosomales d'intérêt thérapeutique : maladies de surcharge lysosomale	14
I.2.1. Les maladies de surcharge lysosomale.....	14
I.2.1.1. Généralités.....	14
I.2.1.2. Traitements.....	16
I.2.2. Maladie de Pompe.....	21
I.2.2.1. Généralités.....	21
I.2.2.2. Traitements actuels	22
I.2.3. Maladie de Gaucher	23
I.2.3.1. Généralités.....	23
I.2.3.2. Traitements actuels	24
I.2.4. Traitement par chaperon pharmacologique pour la MP et la MG	25
I.2.4.1. Chaperon pharmacologique de la GAA	26
I.2.4.2. Chaperon pharmacologique de la GCase	31
I.3. Glycosidases intestinales d'intérêt thérapeutique : diabète de type 2.....	34
I.3.1. Généralités sur le diabète de type 2.....	34
I.3.2. Traitements du diabète de type 2	36
I.3.2.1. Inhibiteurs de la MGAM	37
I.3.2.2. Inhibiteurs d'α-amylase.....	38
I.4. Conclusion	40
II. Glycosidases & multivalence	41
II.1. Principes de la multivalence.....	42
II.1.1. Généralités.....	42
II.1.1.1. Détermination de l'effet multivalent	42
II.1.1.2. Exemple de l'application de la multivalence et de l'effet multivalent sur des anhydrases carboniques humaines	43
II.1.1.3. Les mécanismes de la multivalence.....	44
II.2. Inhibiteurs et chaperons multivalents de glycosidases	47
II.2.1. Inhibiteurs multivalents de glycosidases	47

II.2.1.1.	Inhibiteurs multivalents de l'α-mannosidase de Jack Bean.....	47
II.2.1.2.	Inhibiteurs multivalents de la MGAM.....	52
II.2.1.3.	Inhibiteurs multivalents de la GAA	53
II.2.1.4.	Effet multivalent sur l'inhibition de la GCCase	54
II.2.2.	Multivalence et effet chaperon sur la GCCase.....	58
II.3.	Conclusion	61
	Notre approche	63
I.	Problématique	64
II.	Objectifs de la thèse	64
III.	Stratégie envisagée.....	65
	Synthèses de ligands multivalents d'intérêt thérapeutique	69
I.	Synthèses des ligands	70
I.1.	Dérivés de la L et D-DNJ	70
I.2.	Dérivés de l'AR88 et <i>enant</i> -AR88	73
I.2.1.	Stratégie de synthèse	73
I.2.1.1.	Allénylation de Crabbé-Ma	74
I.2.1.2.	Cyclisation intramoléculaire	78
I.2.2.	Analogue d' <i>enant</i> -AR88.....	79
I.2.2.1.	Allénylation.....	79
I.2.2.2.	Cyclisation intramoléculaire	85
I.2.3.	Synthèse des dérivés « clickables »	89
II.	Synthèses des plateformes « clickables ».....	90
II.1.	Plateformes issues de pentaérythritol	90
II.2.	Plateformes à cœur cyclotriphosphazène	91
III.	Synthèses des objets multivalents	95
III.1.	Synthèses des objets multivalents dérivés de la L et D-DNJ	95
III.1.1.	Synthèses par réaction de type CuAAC	95
III.1.2.	Synthèses par réaction de type SPAAC	99
III.2.	Synthèses des objets multivalents dérivés d'AR88 et <i>enant</i> -AR88.....	103
III.3.	Synthèses des objets multivalents de la NAC.....	106
IV.	Conclusion	108
	Evaluations biologiques sur les glycosidases d'intérêt	111
I.	Evaluations biologiques des composés contre le diabète de type 2	112
I.1.	Evaluations de l'activité inhibitrice des composés pour la GAA	112
I.2.	Evaluations de l'activité inhibitrice des composés pour l'α-amylase	114

II.	Evaluations biologiques des composés contre la maladie de Pompe	116
II.1.	Evaluations de l'activité inhibitrice des composés vis-à-vis de la GAA.....	117
II.1.1.	Pharmacophore D-DNJ	117
II.1.2.	Pharmacophore L-DNJ	118
II.1.3.	Pharmacophore AR88 et <i>enant</i> -AR88	119
II.1.4.	Pharmacophore NAC	120
II.2.	Evaluation de la capacité stabilisatrice des composés pour la GAA.....	121
II.2.1.	Présentation de la DSF et validation du protocole	121
II.2.2.	Pharmacophore D-DNJ	122
II.2.3.	Pharmacophore L-DNJ	125
II.2.4.	Pharmacophore AR88 et <i>enant</i> -AR88	125
II.2.5.	Pharmacophore de la NAC	126
II.3.	Evaluation de l'activité chaperon des composés 143 et 144 vis-à-vis de la GAA	128
II.3.1.	Evaluation de l'activité chaperon pour la GAA par dénaturation thermique <i>in vitro</i> ..	129
II.3.2.	Evaluation de l'activité chaperon vis-à-vis de la GAA <i>in cellulo</i>	130
III.	Evaluation de l'activité inhibitrice des composés pour la GCase.....	133
IV.	Conclusion	135
	Conclusion et perspectives	137
	Partie expérimentale.....	141
I.	Experimental part for biological evaluation	142
II.	Experimental part for chemical synthesis	145
	Bibliographie.....	210
	Annexes	226

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN : acétonitrile
AR : activité résiduelle
BARAC : biaryl-cyclooctyne
BHE : barrière hémato-encéphalique
Boc : *tert*-butoxycarbonyle
CP : chaperon pharmacologique
CuAAC : copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
DAB : 1,4-désoxy-1,4-imino-D-arabinitol
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DIBA : dibenzocyclooctyne
DIBAC : aza-dibenzocyclooctyne
DIFO : difluorinated cyclooctyne
DIX : 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-xylitol
DCM : dichlorométhane
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNJ : deoxynojirimycine
DNS : acide 3,5-dinitrosalicylique
DSF : differential scanning fluorimetry
DT2 : diabète de type 2
E.A. : acétate d'éthyle
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
ee : excès énantiomérique
G0 : génération 0
G1 : génération 1
GAA : α -1,4-glucosidase acide
GCase : β -glucocérébrosidase
GCS : glucosylcéramidase
GLA : α -galactosidase
hCA : anhydrase carbonique humaine
HPLC : high performance liquid chromatography
IBX : acide 2-iodobenzoïque
IC₅₀ : inhibitory concentration 50%
JB α -man : α -mannosidase de Jack Bean
K_i : constante d'inhibition
KO : knock-out
K_d : constante de dissociation
LAB : 1,4-désoxy-1,4-imino-L-arabinitol
LAH : aluminohydrure de lithium
MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionization - time of flight
m-CPBA : acide 3-chloroperoxybenzoïque
MG : maladie de Gaucher
MGAM : maltase-glucoamylase
MOFO : monofluorinated cyclooctyne

MP : maladie de Pompe
MSL : maladie de surcharge lysosomale
MW : molecular weight
N-Bu-DNJ : *N*-Butyl-1-deoxynojirimycin
N-NN-DNJ : *N*-Nonyl-1-deoxynojirimycin
NAC : L-*N*-acétylcystéine
NAG : *N*-Acétylglycine
NAS : L-*N*-Acétylsérine
OMS : organisation mondiale de la santé
PAMAM : poly(amidoamine)
P.E. : petroleum ether
PEG : polyéthylèneglycol
p-TsCl : chlorure de 4-toluènesulfonyle
RE : réticulum endoplasmique
RMN : résonance magnétique nucléaire
rpm : rotation par minute
rp/n : relative potency by inhitope
SPAAC : strain promoted azide-alkyne cycloaddition
TA : température ambiante
TBAF : fluorure de tétra-*n*-butylammonium
TBDPSCI : *tert*-butyl(chloro)diphénylsilane
TCP : thérapie par chaperon pharmacologique
THF : tétrahydrofurane
TRE : thérapie par remplacement enzymatique
TRS : thérapie par réduction de substrat

TABLE DES FIGURES, SCHEMAS, TABLEAUX

Figure 1 : Clivage de liaison glycosidique par une glycoside hydrolase

Figure 2 : Mécanismes catalytiques des glycosides hydrolases avec inversion (A) et rétention (B) de la configuration du carbone anomère

Figure 3 : Mécanisme simplifié d'une maladie de surcharge lysosomale

Figure 4 : Les différentes catégories de MSL

Figure 5 : Les différentes voies de ciblage aux lysosomes pour les enzymes natives et recombinantes

Figure 6 : Les différents mécanismes d'actions du chaperon pharmacologique

Figure 7 : Les mécanismes d'actions du chaperon pharmacologique et de l'enzyme recombinante

Figure 8 : Structure chimique de l'isofagomine, de la D-DNJ et de la D-NB-DNJ

Figure 9 : Structure chimique des ligands de la GAA de type glucide

Figure 10 : Structure chimique des chaperons de la GAA de type iminosucre

Figure 11 : Structure chimique de l'ambroxol (**1**) et ses dérivés

Figure 12 : Structure chimique du LAB, du DAB et de leurs dérivés

Figure 13 : Structure chimique du NAC, NAG, NAS et de la L-carnitine

Figure 14 : Structure cristallographique de la GAA

Figure 15 : Structure cristallographique de la GAA co-cristallisé avec la NAC

Figure 16 : Structure chimique des différents chaperons pharmacologiques de la GCase

Figure 17 : Structure chimique du DAB, LAB et un analogue de DAB

Figure 18 : Structure chimique de l'AR88 et de son énantiomère

Figure 19 : Structure chimique de chaperon pharmacologique de 2nd génération pour la GCase

Figure 20 : Les chiffres clés des personnes atteintes de DT2 dans le monde

Figure 21 : Structure chimique de différents traitements contre le DT2

Figure 22 : Structure chimique et valeurs d'IC₅₀ sur la MGAM des trois IAG commerciaux

Figure 23 : Illustration simplifiée de l'hydrolyse et l'absorption du sucre dans le système sanguin

Figure 24 : Structure chimique de différents inhibiteurs d' α -amylases

Figure 25 : Structure chimique des inhibiteurs **16** à **18** d'hCA

Figure 26 : Mécanisme de l'effet chélate (B) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

Figure 27 : Mécanisme de la liaison à un site secondaire (C) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

Figure 28 : Mécanisme de l'effet de glissement (D) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

Figure 29 : Mécanisme de l'effet de stabilisation stérique (D) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

Figure 30 : Structure chimique du composé **21**

Figure 31 : Structure chimique des composés **22**, **23**, **24**

Figure 32 : Structure chimique du composé **25** et **26**

Figure 33 : Structure du composé **27** et de sa forme auto-assemblée

Figure 34 : Structure chimique du composé **28** et de sa forme auto-assemblée micellaire

Figure 35 : Structure chimique du composé **22** et **23** et valeurs d'IC₅₀ (évaluées sur l' α -mannosidase lysosomale) ¹

Figure 36 : Structure chimique des composés miglitol, **29** et **30**

Figure 37 : Structure chimique des composés **31**, **32** et **33**

Figure 38 : Structure chimique des composés **34-37**

Figure 39 : Structure des objets **31-36**

Figure 40 : Structure chimique des composés monovalents et multivalents de dérivé pipéridine

Figure 41 : Structure chimique des composés multivalents **42** à **49**

Figure 42 : Structure chimique des composés multivalents **50** à **53**

Figure 43 : Structure chimique des composés multivalents **31** à **36**

Figure 44 : Structure chimique des composés **37** à **39**

Figure 45 : Structure chimique des composés **57** à **59**

Figure 46 : Structure chimique des trois pharmacophores sélectionnés

Figure 47 : Structure chimique de l'AR88 et enant-AR88

Figure 48 : Structure chimique du penta et dipentaérythritol

Figure 49 : Réaction de type CuAAC, SPAAC et thiol-ène (addition de Michael)

Figure 50 : Structure de l'intermédiaire iminium

Figure 51 : Plateformes dendrimériques à cœur cyclotriphosphazène hexavalente et dodécavalente porteuses de groupement MOFO

Figure 52 : Plateformes dendrimériques à cœur cyclotriphosphazène hexavalente et dodécavalente porteuses de groupement DIBAC

Figure 53 : Exemple de dérivés de cyclooctyne pour la SPAAC

Figure 54 : Structure cristallographique de la GAA (PDB : 5NN3) à gauche et de la MGAM à droite (PDB : 2QLY)

Figure 55 : Schéma général d'une courbe de fluorescence obtenu par DSF

Figure 56 : Détermination de K_D de NAC, **143** et **144** (1) résultats ; (2) exemple avec la NAC

Figure 57 : Activité chaperon des composés **143**, **144** et NAC, sur P1 et P2

Figure 58 : Activité chaperon des composés **143**, **144** et NAC, sur P3

Schéma 1 : Hydrolyse de liaison α -1,4 ou α -1,6-glycosidique par l' α -glucosidase acide (GAA)

Schéma 2 : Hydrolyse du glycosylcéramide par la β -glucocérébrosidase (GCase)

Schéma 3 : Synthèse de glycosylcéramide par la glycosylcéramide synthase (GCS)

Schéma 4 : Synthèse des intermédiaires tétrabenzylés **65** et **enant-65**

Schéma 5 : Synthèse des espaceurs **71**, **72** et **73**

Schéma 6 : Synthèse des analogues « clickables » de DNJ **80**, **81**, **82** et **enant-82**

Schéma 7 : Structure chimique et voie de synthèse de l'AR88 et **enant-AR88**

Schéma 8 : Réaction de Crabbé

Schéma 9 : Synthèse de N-allénylamides selon Ma.

Schéma 10 : Synthèse de différents allènes disubstitué à partir d'aldéhydes selon Ma.

Schéma 11 : Synthèse de différents allènes trisubstitué à partir de cétones selon Ma.

Schéma 12 : Synthèse de différents allènes asymétriques obtenus par synthèse asymétrique selon Ma.

Schéma 13 : Mécanisme réactionnel de l'allénylation adapté de Ma.

Schéma 14 : Fragmentation de type Grob

Schéma 15 : Mécanisme de la cyclisation intramoléculaire à partir d'aminoallènes

Schéma 16 : Rétrosynthèse des analogues de l'AR88

Schéma 17 : Rétrosynthèse de dérivés pyrrolidines à partir d'aldéhydes commerciaux

Schéma 18 : Rétrosynthèse de cycle de type pipéridine, azépane ou oxazinane

Schéma 19 : Synthèse du précurseur **92**

Schéma 20 : Synthèse de l'allène **enant-93**

Schéma 21 : Rétrosynthèse de composé spiro

Schéma 22 : Synthèse de l'allène **94** et son énantiomère

Schéma 23 : Rétrosynthèse de l'**enant-AR88**

Schéma 24 : Synthèse des composés **103** à **enant-106**

Schéma 25 : Rétrosynthèse de dérivés de type 1,2-oxazinane

Schéma 26 : Cyclisation d'hydroxyaminoallène décrite par Lalonde et al.

Schéma 27 : Rétrosynthèse du composé spiro **enant-107**

Schéma 28 : Voie de synthèse des analogues « clickables » de l'AR88 et **enant-AR88**

Schéma 29 : Synthèse des plateformes **117** à **119**

Schéma 30 : Sous-produits d'oxydations **130**, **131**, **132** et **enant-133** (seul l'énantiomère de forme D est représenté)

Schéma 31 : Synthèse des composés monovalents **138** et **enant-138**

Schéma 32 : Réaction de type thiol-ène

Schéma 33 : Différentes réactivités des réactions de type thiol-ène

Schéma 34 : Différentes réactions de type thiol-ène sur un même composé

Schéma 35 : Synthèses des composés **143** et **144**

Tableau 1 : Facteurs d'augmentation de l'activité de la GAA sur lignée cellulaire atteints de la maladie de Pompe

Tableau 2 : Constantes d'inhibitions (K_i) et des effets multivalents (rp/n)

Tableau 3 : Constantes d'inhibitions (K_i) et leurs sélectivités par couple d'isoformes hCA

Tableau 4 : Activité inhibitrice sur la GCase des composés **42-R/S** à **49-R/S**

Tableau 5 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés **enant-84** à **enant-86** dans les conditions de Ma, réalisé par nos soins (condition A) et dans les conditions optimisées (condition B)

Tableau 6 : Rendements et excès énantiomériques obtenus pour la synthèse des allènes **83** à **89** et leur énantiomère

Tableau 7 : Rendements obtenus pour la synthèse des allènes **88** à **91** et leur énantiomère

Tableau 8 : Rendements obtenus pour la synthèse des pyrrolines **enant-95** à **enant-98**

Tableau 9 : Conditions des réactions de cyclisation intramoléculaire afin de former un oxazinane

Tableau 10 : Conditions et rendements pour la synthèse du composé spiro **enant-107**

Tableau 11 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés multivalents **121** à **enant-123**

Tableau 12 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés **130** à **enant-132**
Tableau 13 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés **127** à **enant-129**
Tableau 14 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés multivalents **136** et **137** et leur énantiomère
Tableau 15 : Rendement des composés multivalents **139** et **140** et leurs énantiomères
Tableau 16 : Synthèse des composés **141** et **enant-141** et des sous-produits associés **142** et **enant-142**
Tableau 17 : IC_{50} et effet multivalent des composés **121** à **138** vis-à-vis de la rhGAA
Tableau 18 : IC_{50} et effet multivalent des composés **121** à **138** vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique
Tableau 19 : IC_{50} et effet multivalent des composés **139** à **141** vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique
Tableau 20 : IC_{50} et effet multivalent des composés **enant-129** à **enant-137** sur la rhGAA
Tableau 21 : IC_{50} et effet multivalent des composés **103** à **141** et des énantiomères sur la rhGAA
Tableau 22 : IC_{50} et effet multivalent des composés NAC, **143** et **144** sur la rhGAA
Tableau 23 : Valeurs de T_m et ΔT_m de la rhGAA avec l'acarbose et le D-NN-DNJ
Tableau 24 : Valeurs de T_m et ΔT_m de la rhGAA avec les composés **121** à **137**
Tableau 25 : Comparatif IC_{50} et ΔT_m des composés **121** à **126** (1) courbe de corrélation $f(\log(IC_{50})) = \Delta T_m$; (2) valeurs IC_{50} et ΔT_m
Tableau 26 : Valeurs de T_m et ΔT_m des composés **enant-123** à **enant-137**
Tableau 27 : Valeurs de T_m et ΔT_m pour la rhGAA avec les composés **139** à **141**
Tableau 28 : Valeurs de T_m et ΔT_m des composés NAC, **143** et **144**
Tableau 29 : %AR de rhGAA après deux temps de dénaturation en présence des composés NAC et **143**
Tableau 30 : %AR de rhGAA après deux temps de dénaturation en présence de **144**
Tableau 31 : Mutations et AR des cellules primaires P1, P2 et P3
Tableau 32 : IC_{50} et effet multivalent des composés **enant-103** à **141**
Tableau 33 : IC_{50} des composés **enant-103** à **141**, et indice de sélectivité rhGAA/rhGcase des composés **enant-103** à **141**

INTRODUCTION GENERALE

I. LES GLYCOSIDASES COMME CIBLE THERAPEUTIQUE

I.1. GENERALITES SUR LES GLYCOSIDASES

Les glycosidases ou glycosides hydrolases (EC.3.2.1) sont une grande famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques des sucres par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, libérant ainsi un composé osidique (Figure 1).

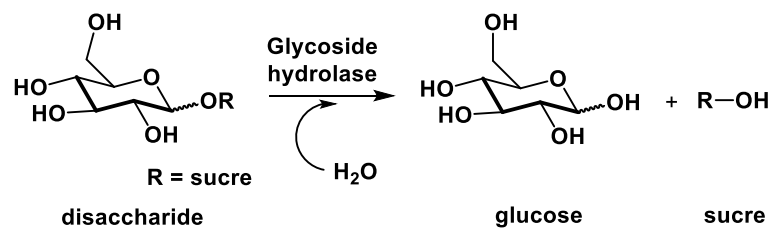


Figure 1 : Clivage de liaison glycosidique par une glycoside hydrolase (exemple avec le glucose)

Deux mécanismes catalytiques, initialement décrits par Koshland en 1953, sont distingués pour ces enzymes selon l'inversion ou la rétention de la configuration du carbone anomère au cours de l'hydrolyse.² Par la suite, ces mécanismes sont revisités par Vernon qui fait intervenir un intermédiaire réactionnel oxocarbenium (figure 2).³ Les glycosidases sont classées en fonction de la réaction catalysée (EC.3.2.1.X) ou en fonction de leur séquences d'acides aminés (GHX « Glycoside Hydrolase X »). Actuellement, plus de 180 familles sont dénombrées dans la base de données CAZy, montrant ainsi leur grande diversité enzymatique.⁴

Chez les mammifères, ces enzymes sont présentes dans tout l'organisme et dans tous les compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, membrane cellulaire, lysosomes...) et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, comme la digestion, le catabolisme lysosomal, les processus post-traductionnels. Leur dysfonctionnement est impliqué dans de multiples pathologies.^{5,6} Depuis des décennies, les chercheurs ciblent ces enzymes à des fins thérapeutiques. Par exemple, des inhibiteurs de sialidases, de maltase-glucoamylase ou encore d' α -fucosidases ont été développés respectivement comme antiviraux/antibactériens/antiépileptiques, antidiabétiques, et anticancéreux/anti-inflammatoires.^{5,7-9}

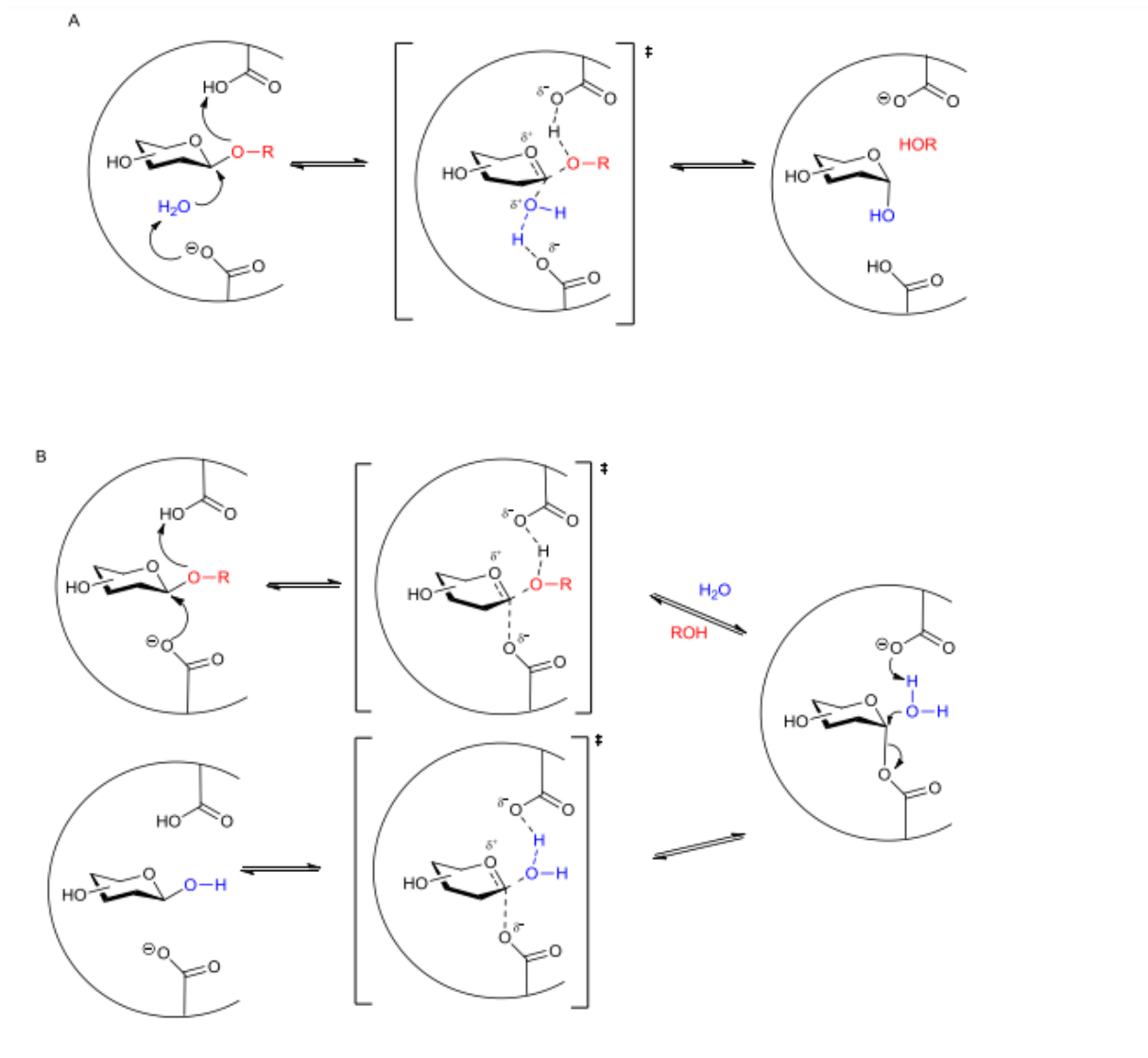


Figure 2 : Mécanismes catalytiques des glycosides hydrolases avec inversion (A) et rétention (B) de la configuration du carbone anomère (extrait de la thèse de C. Decroocq)¹⁰

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons à deux types de pathologies dans lesquelles des glycosidases sont impliquées : les maladies de surcharge lysosomale, en particulier la maladie de Pompe (MP) et la maladie de Gaucher (MG) impliquant respectivement l' α -glucosidase acide (GAA) et la β -glucosylceramidase (GCase), ainsi que le diabète de type 2 (DT2) où la maltase-glucoamylase (MGAM) et des α -amylases interviennent. La GAA et la MGAM appartiennent toutes deux à la famille des α -glucosidases, classifiées EC.3.2.1.20 (GH31), mais sont localisées différemment dans l'organisme : la GAA est une enzyme lysosomale, alors que la MGAM, est localisée au niveau de l'intestin.¹¹

I.2. GLYCOSIDASES LYSOSOMALES D'INTERET THERAPEUTIQUE : MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE

Les maladies de surcharges lysosomales (MSL) sont des maladies dues à des dysfonctionnements d'enzymes lysosomales. Après avoir défini les MSL et les traitements actuels disponibles, nous nous intéresserons plus particulièrement aux maladies de Pompe (MP) et de Gaucher (MG) et à leur spécificité. Enfin, nous nous intéresserons, à une nouvelle thérapie prometteuse, la thérapie par chaperon pharmacologique (TCP).

I.2.1. LES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE

I.2.1.1. GENERALITES

Que la protéine joue un rôle structurel, catalytique ou encore signalétique, sa structure tridimensionnelle est essentielle à son activité. Une modification de sa structure due à une mutation génétique peut induire d'innombrables pathologies pouvant avoir des effets aussi bien bénins que sévères sur l'organisme. De nombreuses maladies dues à des défauts protéiques sont répertoriées. Certaines sont communes comme la drépanocytose due à une modification structurelle de l'hémoglobine et considérée comme la maladie génétique la plus fréquente avec 310 000 nouveaux cas en 2010 et une prévalence en constante augmentation; d'autres sont plus rares comme les maladies de surcharge lysosomale (MSL).^{12,13}

Les MSL sont des pathologies dues à une ou plusieurs mutations génétiques, qui conduisent à la traduction d'une enzyme tronquée et/ou mal-repliée en fonction du type de mutations (non-sens, faux-sens, délétion, insertion, ...). Ces mutations conduisent à la perte partielle ou totale de l'activité enzymatique. Ces enzymes, reconnues pour certaines par le système de dégradation associé au réticulum endoplasmique (RE), sont dégradées par le protéasome. Ne pouvant plus exercer leur activité catalytique au sein des lysosomes, une accumulation de leur substrat se produit, conduisant à une surcharge du lysosome d'où le nom de MSL (*Figure 3*).

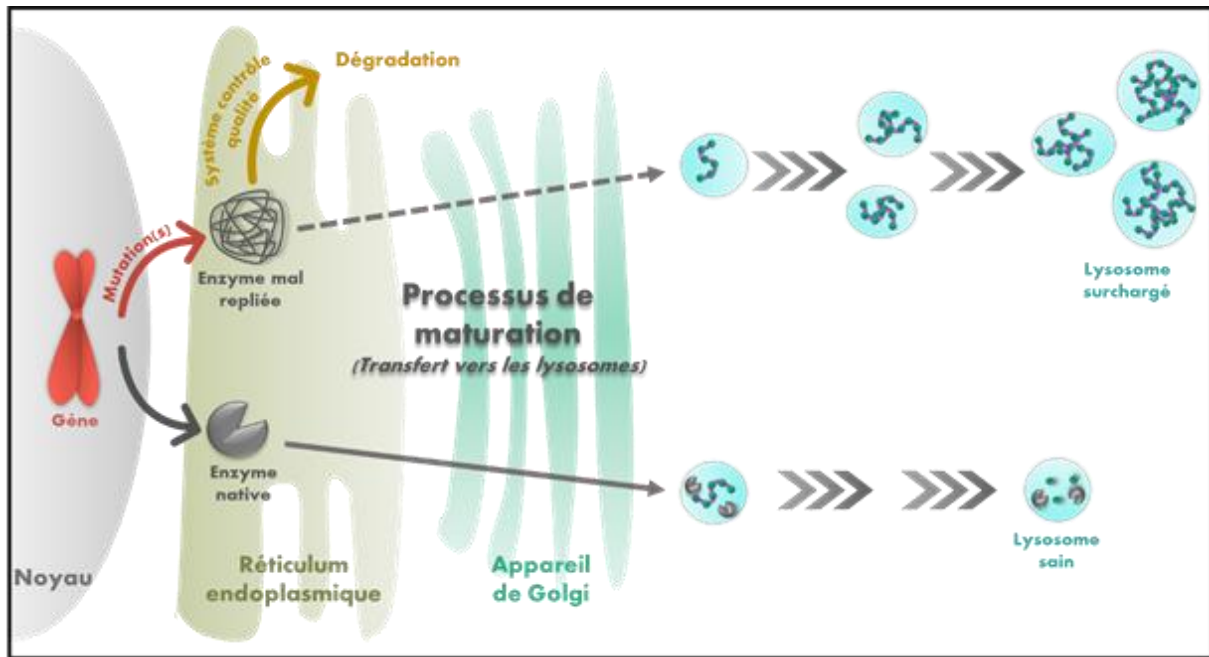


Figure 3 : Mécanisme simplifié d'une maladie de surcharge lysosomale (modifié à partir de la référence ¹⁴)

A ce jour, plus de 50 MSL différentes sont dénombrées, classées en fonction de la nature du substrat qui est accumulé (Figure 4).¹⁵ On retrouve notamment les sphingolipidoses et lipidoses qui impliquent une surcharge de sphingolipides et lipides respectivement, mais également les mucopolysaccharidoses, oligosaccharidoses, glycoprotéinoses et glycogénoses qui impliquent, comme leurs noms l'indiquent, l'accumulation de sucres, et d'autres pathologies non classables comme la maladie de Danon.

Ce sont généralement des pathologies autosomiques récessives affectant collectivement environ 1 naissance sur 5000.¹³ Parmi elles, la maladie de Gaucher (MG) est la plus commune avec une prévalence de 1/57 000 ou plus rare la sialidose avec une prévalence de 1/4 200 000.¹⁶ On distingue plusieurs formes d'une même maladie en fonction des symptômes et de leur sévérité, et de l'âge lors de leur apparition. Quelle que soit la forme contractée, elles conduisent généralement à un décès prématuré du patient en absence de traitement.



Figure 4 : Les différentes catégories de MSL

1.2.1.2. TRAITEMENTS

Il existe trois principales stratégies thérapeutiques pour le traitement des MSL. La thérapie par remplacement enzymatique (TRE), la thérapie par chaperon pharmacologique (CP), et la thérapie par réduction de substrat. Par ailleurs, récemment la combinaison de la TRE et de la thérapie par CP a été également développée.

1.2.1.2.1. THERAPIE PAR REMPLACEMENT ENZYMATIQUE TRE

La thérapie par remplacement enzymatique (TRE) ou enzymothérapie substitutive consiste en l'administration périodique par perfusion intraveineuse d'enzymes recombinantes qui une fois diffusées dans le corps sont internalisées dans la cellule et dirigées vers le lysosome grâce aux récepteurs du mannose-6-phosphate (M6P) afin de récupérer l'activité catalytique de l'enzyme déficiente. Il est intéressant de noter que la TRE ne s'est développée qu'après la compréhension fine des mécanismes biologiques permettant le ciblage des protéines du RE vers le lysosome. En général, l'acquisition post-traductionnelle du M6P sur la partie oligosaccharidique de la protéine lors du processus de maturation, permet la reconnaissance de celle-ci, par les récepteurs du M6P présents à la surface du lysosome (Figure 5, voie 1).¹⁷⁻¹⁹ Cependant, certaines protéines qui ne se sont pas liées aux récepteurs, ont été secrétées à l'extérieur de la cellule. Elles peuvent être ensuite recapturées et internalisées par endocytose, grâce aux récepteurs M6P présents également au niveau de la membrane plasmique (Figure 5, voie 2) (Il existe ainsi deux processus de transfert du RE vers le lysosome pour les enzymes).¹⁹

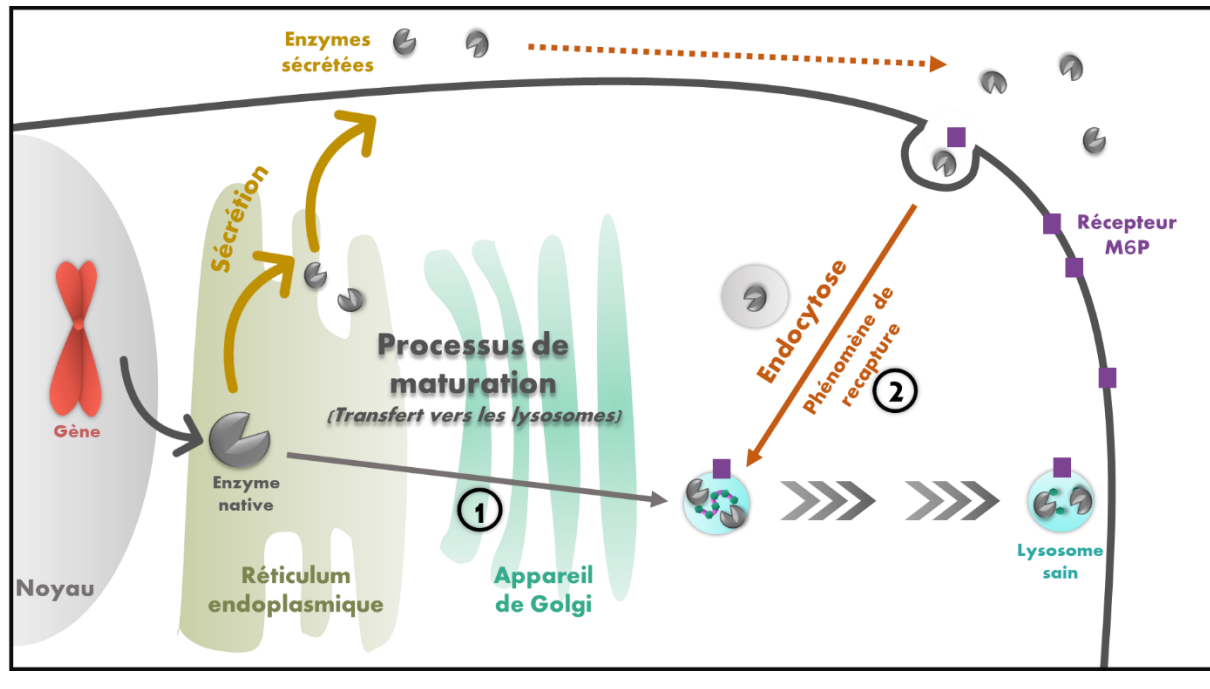


Figure 5 : Les différentes voies de ciblage aux lysosomes pour les enzymes natives et recombinantes

À la suite de ces découvertes, de nombreuses enzymes recombinantes pour l'enzymothérapie substitutive adressant des MSL ont été développées, notamment contre la maladie de Gaucher, de Fabry, de Pompe, de Hunter ou encore de Hurler-Scheie pour ne citer qu'elles.¹³

Cependant, en plus des contraintes pour le patient (injection périodique par intraveineuse en milieu hospitalier), de nombreux inconvénients sont associés à ce type de thérapie. Premièrement, chez les individus possédant une activité résiduelle (AR) de l'enzyme déficiente faible voire nulle, une réaction immunitaire induite par l'enzyme recombinante et la présence d'anticorps IgG et IgE a été démontrée. Cette réaction auto-immune présente un risque pour le patient, et provoque une diminution de l'efficacité du traitement.²⁰⁻²² En plus de leur immunogénicité, l'efficacité de ce type de traitement varie en fonction des pathologies et de la forme contractée. Deuxièmement, le coût du traitement est très élevé et estimé à plusieurs centaines de milliers d'euros par patients et par an.²³ Ceci s'explique par le coût de production et la biodisponibilité de ces macromolécules dans l'organisme. En effet, pour les patients atteints de la maladie de Pompe traités par MYOZYME® (alpha alglucosidase), la dose par injection est de 20 mg/kg/2 semaines. Enfin, ce type de traitement est inefficace pour traiter les symptômes neurologiques du fait de l'incapacité de l'enzyme recombinante à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). De nombreuses études cliniques sont en cours visant à améliorer le passage des protéines recombinantes à travers la BHE en modifiant leur structure.^{24,25}

1.2.1.2.2. THÉRAPIE PAR CHAPERON PHARMACOLOGIQUE (CP)

Depuis les années 2000, un nouveau type de thérapie innovante se développe pour les maladies dues à un mauvais repliement protéique comme Parkinson²⁶, Alzheimer^{27,28} ou notamment les maladies de surcharges lysosomales : la thérapie par chaperon pharmacologique (CP). Ce type de thérapie consiste en l'utilisation de petites molécules appelées chaperons pharmacologiques, ligands

de la protéine, qui vont permettre le bon repliement, la stabilisation et de prévenir l'agrégation de la protéine déficiente afin de récupérer la totalité ou une partie de l'activité protéique perdue.²⁹⁻³²

A ce jour, trois mécanismes d'action des CP ont été décrits. Le premier est la liaison du CP à la protéine déficiente au niveau du RE, permettant le bon repliement partiel ou total et la stabilisation de la protéine, empêchant ainsi sa reconnaissance et sa dégradation par le système contrôle qualité. Dans le deuxième mécanisme décrit, durant le processus de maturation de la protéine au niveau de l'appareil de Golgi, le CP stabilise la protéine pendant le transport et améliore sa glycosylation. Le dernier mécanisme, concerne la stabilisation de la protéine par le CP dans le lysosome à pH acide, sauvant ainsi son activité. Une combinaison de deux ou trois mécanismes peut également être envisagée (Figure 6).^{14,33,34}

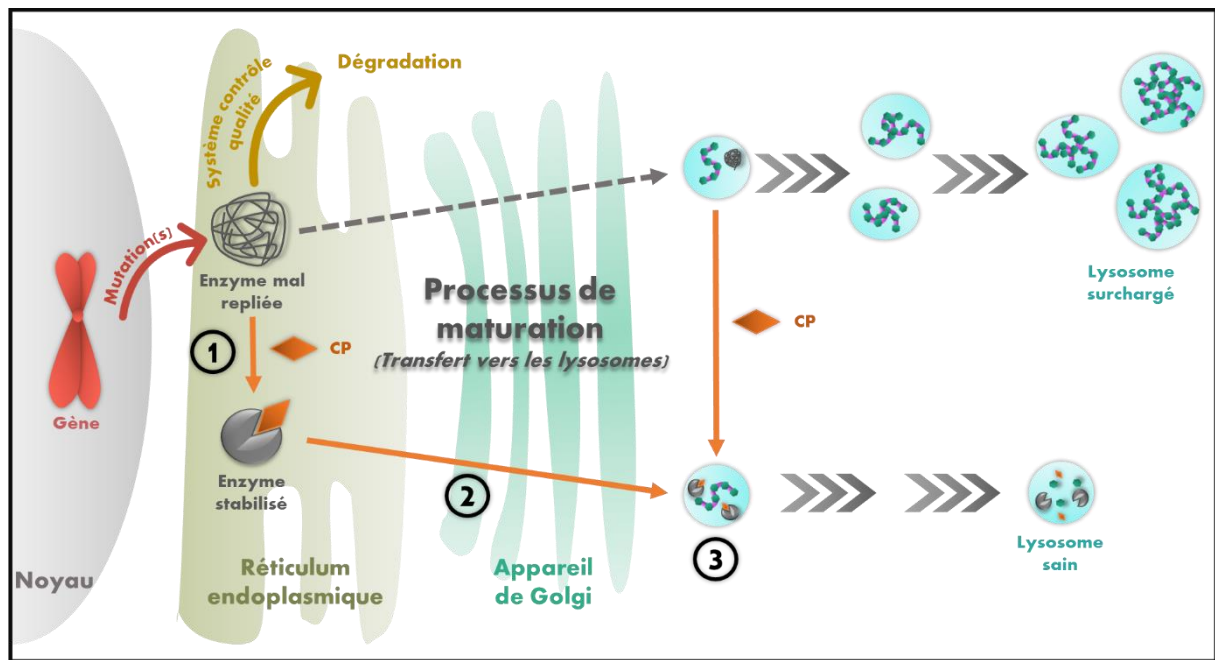


Figure 6 : Les différents mécanismes d'actions du chaperon pharmacologique

Il est distingué deux classes de CP, les CP inhibiteurs, généralement ligand du site actif et ceux non-inhibiteurs, qui sont des ligands allostériques. En l'absence de données dans la littérature et de tests de criblage basés non pas sur l'inhibition mais sur l'affinité, la majorité des CP répertoriés sont des ligands inhibiteurs. Il est paradoxal de développer des CP capables d'inhiber l'enzyme dont on souhaite, au contraire, restaurer l'activité catalytique. Un équilibre doit donc être trouvé pour la concentration en CP à utiliser, qui doit être suffisamment élevée pour observer un effet chaperon, sans pour autant inhiber la protéine.³⁵ Plus récemment, une nouvelle génération de CP non-inhibiteurs, nommés CP de 2nd génération a fait son apparition. Ces CP ne ciblent pas le site actif de la protéine mais un ou des sites allostériques et sont non ou faiblement inhibiteurs.^{36,37} Cette nouvelle génération est intéressante, car contrairement aux CP inhibiteurs, la plage de concentrations utilisables est plus large étant donné qu'il n'y a pas de compétition entre inhibition et activité chaperon.³⁸ Néanmoins, les CP qu'ils soient inhibiteurs ou non, ne peuvent restaurer l'activité biologique que des protéines dites « chaperonnables ». ³⁹ Une protéine est dite « chaperonnable » si les mutations génétiques qui lui sont associées n'empêchent pas la stabilisation et la restauration de l'activité par un CP. Les mutations non-

INTRODUCTION GENERALE

sens (mutation responsable du remplacement d'un codon codant pour un acide aminé par un codon stop) conduisent principalement à des protéines tronquées dites « non chaperonnables ».³⁹

Jugés comme une voie thérapeutique prometteuse pour les MSL, la recherche et le développement de nouveaux chaperons pharmacologiques s'accroissent. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours pour la MG, la maladie de Tay–Sachs (phase 1/2), et la maladie de Sandhoff (phase 1/2), et ont conduit à la commercialisation d'une molécule, le GALAFOLD® (Migalastat), développée par Amicus Therapeutics contre la maladie de Fabry.^{13,40} Les trois principaux avantages de cette voie thérapeutique par rapport à la TRE proviennent de l'utilisation de petites molécules (1) pouvant être administrées par voie orale (et non en intraveineuse), (2) potentiellement capables de traverser la BHE permettant ainsi de traiter les symptômes neurologiques et (3) le faible coût de production comparé à l'enzyme recombinante. Ces avantages ont pu être constatés avec le GALAFOLD® pour la maladie de Fabry. Le médicament est administré par voie orale, son coût de production est faible et il permet de traiter les symptômes neurologiques des patients.³⁹ Cependant, comme mentionné plus haut, le traitement ne fonctionne que sur des patients dont les protéines sont dites « chaperonnables » soit environ 35-50% des cas pour la maladie de Fabry.⁴¹

I.2.1.2.3. THERAPIE COMBINEE : CHAPERON PHARMACOLOGIQUE ET ENZYME RECOMBINANTE

Un autre type de thérapie pour ces chaperons pharmacologiques a été exploré ces dernières années : l'utilisation combinée d'un traitement par TRE avec un CP. L'objectif final étant toujours de diminuer la surcharge du lysosome en coadministrant l'enzyme recombinante avec un CP. Ce gain d'activité s'explique par l'amélioration de la stabilité et des propriétés pharmacocinétiques de l'enzyme recombinante liée au CP, en plus des propriétés pharmacologiques individuelles de l'enzyme recombinante et du CP (Figure 7 ; voie 4).³¹

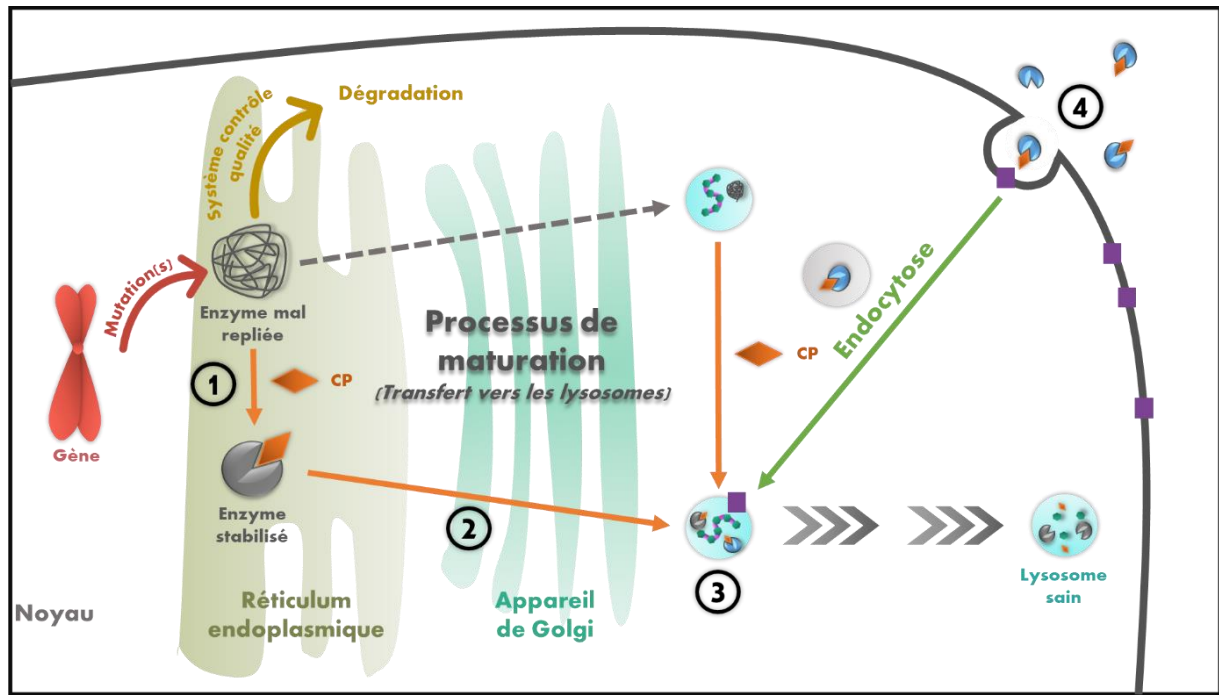


Figure 7 : Les mécanismes d'actions du chaperon pharmacologique et de l'enzyme recombinante

Ainsi, des essais *in vitro* réalisés sur une α -galactosidase recombinante humaine (*rhGLA*), impliquée dans la maladie de Fabry, en présence d'isofagomine, un CP de cette protéine, ont montré une augmentation significative de la stabilité de la *rhGLA* vis-à-vis de la chaleur, du pH, ou d'agents dénaturants (Figure 8). De plus, la préincubation d'isofagomine avec la *rhGLA*, a permis de montrer que l'isofagomine réduisait la dégradation intracellulaire de la protéine.⁴²

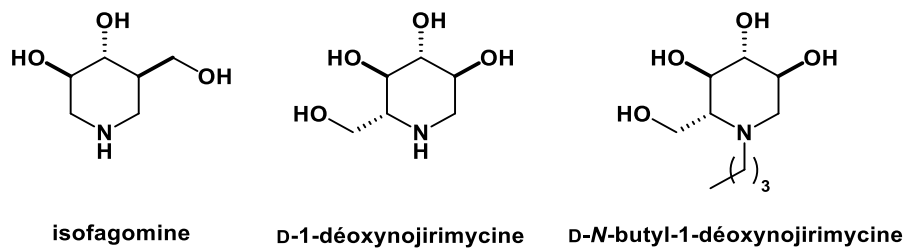


Figure 8 : Structure chimique de l'isofagomine, de la D-DNJ et de la D-NB-DNJ

Des essais *in vivo*, sur des souris Knock-Out (KO) (souris génétiquement modifiées où un ou plusieurs gènes ont été inactivés) atteints de la MP ont permis de montrer que l'administration préalable d'un CP, la D-DNJ (D-1-déoxynojirimycine), augmente le temps de demi-vie de l'enzyme *rhGAA* et entraîne une augmentation significative de l'activité dans les tissus concernés par la maladie (Figure 8). Cette étude montre ainsi un effet synergique de l'utilisation combinée CP/enzyme recombinante sur l'activité de *rhGAA* par rapport au traitement par enzyme recombinante seule.⁴³ Avec un dérivé alkylé de D-DNJ, le D-NB-DNJ (D-N-butyl-1-déoxynojirimycine), des essais sur 11 patients atteints de la MP ont été réalisés et ont montré des taux d'AR de GAA 1.85 fois supérieures par rapport au traitement par enzyme recombinante seul (Figure 8).⁴⁴ Pour l'heure, ce traitement n'est pas commercialisé.

I.2.1.2.4. THERAPIE PAR REDUCTION DE SUBSTRAT

Apparu il y a une vingtaine d'année, la thérapie par réduction de substrat (TRS), contrairement à la thérapie par CP, ne consiste pas à restaurer l'activité de l'enzyme déficiente pour diminuer l'accumulation de métabolite, mais à inhiber une enzyme saine responsable de la biosynthèse du métabolite.⁴⁵ Théoriquement, les avantages des traitements développés avec cette stratégie thérapeutique sont similaires aux traitements par CP puisqu'il consiste également à l'utilisation de petites molécules. Le traitement par voie orale est possible, non-immunogène, peut traverser la BHE, et la production est moins coûteuse que celui d'une enzyme recombinante.⁴⁵

De plus, tout comme pour les CP, ce type de traitement peut être envisagé en monothérapie ou en complément d'un traitement par TRE pour obtenir des effets synergiques. Cela a notamment été observé sur modèle murin de la MG. L'utilisation combinée d'une enzyme recombinante avec l'Eliglustat, un traitement par réduction de substrat commercial contre la MG (détaillé partie I.2.3.2) a permis d'observer une diminution plus importante de glucosylcéramide qu'avec l'enzyme recombinante seule dans l'ensemble des organes viscéraux.⁴⁶

Pour l'heure, deux traitements basés sur la TRS ont été approuvés pour les MSL, le Miglustat pour la MG et la maladie de Niemann-Pick, et l'Eliglustat pour la MG.¹³ Actuellement un autre composé, le MZE001 (détaillé I.2.2.2) est en cours d'essai clinique pour la MP.^{47,48}

I.2.2. MALADIE DE POMPE

I.2.2.1. GENERALITES

La maladie de Pompe (MP), ou glycogénose de type II, est une MSL décrite pour la première fois en 1932 par le Dr. Joannes Cassianus Pompe. Ce n'est qu'en 1963 que la cause de la pathologie, une déficience en α -glucosidase acide (GAA), a été démontrée.⁴⁹ Cette maladie génétique autosomique récessive est rare avec une prévalence allant de 1/146 000 à 1/40 000 en fonction de la forme de la maladie, du type de population et des études.⁵⁰

La MP a pour origine une ou plusieurs mutations du gène *GAA*, situé sur le chromosome 17 en position q25.2-q25.3. Plus de 450 mutations sur ce gène responsable de cette maladie sont répertoriées.⁵¹ Ces mutations conduisent à une déficience de la GAA (EC. 3.2.1.20) (aussi appelée α -1,4-glucosidase acide ou maltase acide), une enzyme lysosomale, qui catalyse l'hydrolyse des liaisons α -1,4- et α -1,6-glucosidiques de glucanes complexes en unités glucoses (*Schéma 1*). La GAA appartient à la famille GH31 et suit le mécanisme classique de double déplacement de Koshland avec rétention de la configuration du carbone anomère. Elle est composée de 952 acides aminés avec 7 sites de glycosylations (Gene ID : 2548) .⁵²⁻⁵⁴ Synthétisée sous forme d'un précurseur de 105 kDa, elle subit plusieurs étapes de *N*-glycosylation afin d'obtenir un intermédiaire glycosylé de 110 kDa qui subira une série de réactions protéolytiques conduisant à deux formes matures majoritaires de 70 et 76 kDa.^{53,55} Les peptides ainsi libérés forment pour certains des complexes protéiques avec les formes matures de l'enzyme.⁵³ Ces étapes de protéolyses sont nécessaires à la pleine activité biologique de la GAA.

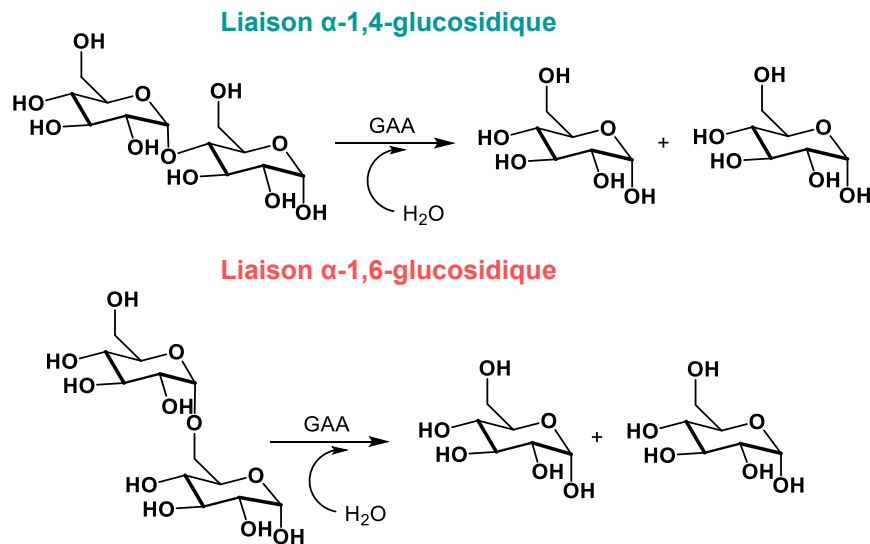


Schéma 1 : Hydrolyse de liaison α -1,4 ou α -1,6-glycosidique par l' α -glucosidase acide (GAA)

Dans le cadre de la MP, l'absence ou la faible activité de la GAA entraîne une accumulation de glycogène dans le lysosome, qui se retrouve alors en surcharge.

Les symptômes de la MP varient selon les différentes formes de la maladie, classées selon l'âge du patient à l'apparition des premiers symptômes. Pour la forme infantile (forme sévère), les symptômes apparaissent dès la première année de vie et sont généralement des atteintes cardiaques (cardiomyopathie congénitale) et des faiblesses musculaires qui conduisent à un décès prématuré avant l'âge de 18 mois.⁵⁶ Pour la forme tardive juvénile et la forme adulte, les symptômes sont une cardiomyopathie, un retard des capacités motrices et des faiblesses musculaires conduisant à des difficultés respiratoires et un décès prématuré.⁵⁶ L'activité résiduelle (AR) de la GAA est directement corrélée aux différentes formes de la maladie et à leur sévérité. En effet, les AR de la GAA sont respectivement inférieures à 1%, 10% et 30% pour les formes infantiles, tardives juvéniles et adultes.^{50,52}

Récemment, en raison de l'allongement de la durée de vie des patients avec les traitements par enzyme recombinante, de nouveaux symptômes ont pu être observés. En effet, l'accumulation progressive de glycogène dans le cerveau, normalement absent dans les neurones, provoque des lésions du système nerveux et une grande variété de symptômes (neuropathie, perte auditive neurosensorielle, faiblesse bulbaire, ...).⁵⁷⁻⁶⁰ Même si de nombreuses zones d'ombre subsistent, il ne fait plus aucun doute que la MP a également des effets sur le système nerveux central.⁵⁹⁻⁶¹

1.2.2.2. TRAITEMENTS ACTUELS

Pour les patients atteints de la MP, aucun traitement curatif n'a été développé, les seuls traitements mis sur le marché à l'heure actuelle sont des enzymes recombinantes. Deux spécialités pharmaceutiques sont disponibles, le MYOZYME® (alpha alglucosidase), mis sur le marché en 2006, et le NEXVIAZYME® (avalglucosidase alpha) récemment mis sur le marché en 2022, tous deux commercialisés par SANOFI et constitués de l'enzyme recombinante rhGAA. Le NEXVIAZYME® comporte 15 fois plus de M6P que le MYOZYME® afin d'améliorer la biodisponibilité du médicament.^{62,63} L'introduction du MYOZYME® en 2006 a permis l'amélioration de la qualité de vie des

patients ainsi qu'un allongement de leur durée de vie, particulièrement pour les patients atteints de la forme infantile sévère grâce à l'amélioration des fonctions cardiaques dès les premiers mois de vie. Cependant, pour ces mêmes patients, de nombreux nouveaux symptômes ont été observés à plus long terme : faiblesse musculaire, scoliose, difficulté respiratoire, troubles moteurs, perte auditive, problème de déglutition, entre autres.^{56,64} De plus, comme décrit plus haut, avec l'allongement de leur durée de vie, l'apparition de déficiences neurocognitives et de lésions du système nerveux central ont été constatées chez les patients traités.⁵⁷ Ces symptômes neurologiques ne peuvent pas être diminués avec le MYOZYME® du fait de son incapacité à traverser la BHE. Une réaction immunitaire de l'organisme a aussi été montrée par la présence d'anticorps IgG et IgE.

Un nouveau traitement, basé sur la thérapie par réduction de substrat, développé par MAZE THERAPEUTICS est en cours d'essai clinique.⁴⁸ La molécule appelé MZE001 est un inhibiteur de la glycogène synthase, une glycosyltransférase.⁴⁷ Cette enzyme qui catalyse la production de glycogène à partir de glucose dans notre organisme, est une cible pour le développement de traitement par réduction de substrat contre la MP.⁶⁵ Les premiers résultats d'essai clinique de phase 1 du composé MZE001, ont montré des baisses du taux de glycogène sur les 112 participants sains. Des essais de phase 2 devraient avoir lieu en 2024.^{47,48}

I.2.3. MALADIE DE GAUCHER

I.2.3.1. GENERALITES

La maladie de Gaucher (MG) est la MSL la plus commune, décrite pour la première fois en 1882 par le Dr. Philippe Charles Ernest Gaucher. La prévalence moyenne de cette maladie génétique autosomique récessive rare est de 1/60 000 en fonction de la forme de la maladie, de la population et des études, et peut atteindre 1/855 chez les Ashkénazes.^{66,67}

La MG a pour origine une ou plusieurs mutations du gène GBA1, situé sur le chromosome 1 en position q21.⁶⁸ Plus de 460 mutations sur ce gène pour cette maladie sont répertoriées. Néanmoins, deux mutations principales, Asn409Ser et Leu483Pro sont retrouvées chez de nombreux patients avec une occurrence d'environ 50-70% pour chacune de ces mutations.^{69,70} Ces mutations conduisent à une déficience de la β -glucocérébrosidase (GCase). La GCase (EC. 3.2.1.45), est une enzyme principalement située dans le lysosome au niveau de sa membrane. Elle catalyse l'hydrolyse des liaisons β -glucosidiques de glucosylcéramide en β -glucose et céramide (*Schéma 2*). La GCase appartient à la famille des enzymes GH30 et suit le mécanisme classique de double déplacement de Koshland avec rétention de la configuration du carbone anomère.⁷¹ Cette enzyme est composée de 497 acides aminés et possède cinq sites de glycosylation (Gene ID : 2629). Synthétisée sous forme d'un précurseur, elle subit plusieurs étapes de N-glycosylation afin d'obtenir un intermédiaire glycosylé. Celui-ci est transporté jusqu'au lysosome sous forme d'un complexe avec la protéine membranaire intégrale lysosomale de type 2 (LIMP-2), puis clivé pour donner des formes matures comprises entre 55 et 69 kDa en fonction du taux de glycosylation.^{68,72,73}

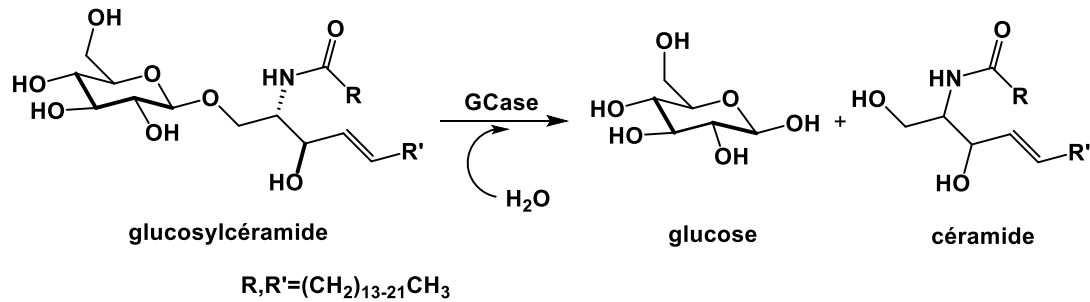


Schéma 2 : Hydrolyse du glycosylcéramide par la β -glucocérébrosidase (GCCase)

Tout comme pour la MP, l'absence ou la faible activité de GCCase entraîne une accumulation de métabolites dans le lysosome, qui se retrouvent alors en surcharge.

Les symptômes de la maladie diffèrent en fonction du type de la maladie contractée. La forme la plus souvent rencontrée est la MG de type 1 (94-99% des cas), une forme adulte caractérisée par une grande différence dans l'intensité des symptômes, allant d'une forme asymptomatique à des atteintes d'organes sévères, en fonction de plusieurs paramètres concernant le patient (âge, taux de surcharge, ...).^{66,70,74} Néanmoins, des symptômes caractéristiques sont communément retrouvés tel qu'une thrombopénie, une anémie, une hépatosplénomégalie et des troubles squelettiques, pouvant causer un décès prématuré.^{66,74} Aucun symptôme neurologique, excepté des symptômes de type parkinsonien, n'est constaté pour cette forme contrairement aux MG de type 2 et 3. La MG de type 2, est la forme la plus rare (1-5% des cas) et la plus sévère. Les symptômes, tels que des troubles systémiques, une hypertrophie du foie et de la rate, et des troubles neurologiques sévères, se manifestent dès les premiers mois de vie, entraînant une mort prématurée durant les 2 premières années de vie.^{66,75} La MG de type 3 est également une forme infantile rare (1-5% des cas), qui se manifeste par des symptômes neurologiques moins intenses que pour la MG de type 2 comme une ophtalmoplégie supranucléaire horizontale, une épilepsie myoclonique ou encore une ataxie cérébelleuse. Des troubles squelettiques sont également retrouvés chez les personnes atteintes de MG de type 3.^{66,75}

1.2.3.2. TRAITEMENTS ACTUELS

Tout comme pour la MP, aucun traitement curatif pour la MG n'a été développé pour le moment. De plus, les traitements disponibles pour la MG ne permettent pas de soigner les symptômes neurologiques. Il n'existe donc aucun traitement pour soigner la MG de type 2 ni les symptômes neurologiques de la MG de type 3.^{75,76} Cependant pour la MG de type 1, deux types de traitements basés sur des modèles thérapeutiques différents sont disponibles sur le marché.

Le Zavesca® (miglustat) et le Cerdelga® (éliglustat), sont basés sur la thérapie par réduction de substrat visant la glucosylcéramide synthase (GCS) qui catalyse la synthèse du glycosylcéramide à partir d'uridine diphosphate-glucose (UDP-Glucose) et de céramide (Schéma 3).^{77,78}

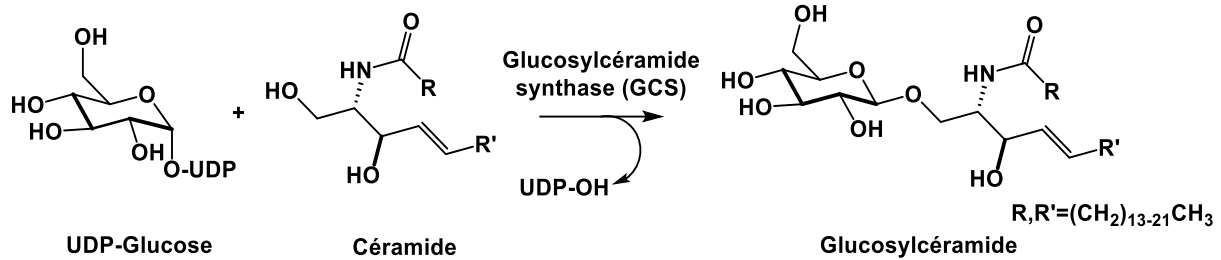


Schéma 3 : Synthèse de glucosylcéramide par la glucosylcéramide synthase (GCS)

Les avantages de ces deux molécules par rapport aux traitements par TRE sont leur administration par voie orale et leur faible coût. Cependant, l'éliglustat a des effets secondaires comparables à un traitement par TRE comme l'imiglucérase.⁷⁹ En revanche, le miglustat, un iminosucre, provoque quant à lui douleurs abdominales, diarrhée, tremblement ou encore perte de poids.⁷⁷ Ces effets sont dus à son manque de sélectivité envers les α -glucosidases intestinales.⁸⁰ De plus, ces deux spécialités pharmaceutiques sont seulement prescrites pour la MG de type 1 car elles n'ont aucun effet sur les symptômes neurologiques, bien que le miglustat puisse traverser la barrière hémato-encéphalique.^{81,82}

Les autres traitements disponibles, basés sur la TRE, sont le CEREZYME® (imiglucérase) commercialisé par SANOFI, le VPRIV® (velaglucérase alpha) commercialisé par SHIRE PLC et le ELELYSO® (taliglucérase alpha) commercialisé par PROTALIX et PFIZER. Parmi eux, seul le CEREZYME® et le VPRIV® sont commercialisés en France. Ces trois spécialités pharmaceutiques, bien qu'ayant un mode de production différent, sont toutes constituées de l'enzyme recombinante *rhGcase* et montrent des activités cliniques similaires. Cependant, seul le CEREZYME® est autorisé à la fois pour la MG de type 1 et 3, les autres protéines étant seulement autorisées pour la MG de type 1. Tout comme pour le MYOZYME® dans le traitement de la MP, l'introduction du traitement par TRE a permis l'amélioration de la qualité de vie des patients ainsi qu'un allongement de leur durée de vie grâce notamment à une régression de l'infiltration osseuse, une amélioration de la thrombocytopénie et de l'ostéopénie, une diminution de douleur osseuse, etc.^{77,83,84} Comme pour quasiment tous les traitements issus de la TRE, la présence d'anticorps IgG a été démontrée et d'autres effets secondaires sont apparus comme de la fièvre, la diarrhée ou une hypotension.⁷⁷

1.2.4. TRAITEMENT PAR CHAPERON PHARMACOLOGIQUE POUR LA MP ET LA MG

Ces différents constats nous amènent à la conclusion qu'il est nécessaire de développer de nouveaux traitements pour la MP et la MG, autres que les enzymes recombinantes. La thérapie par CP semble donc être prometteuse pour soigner ce type de maladies au vu des avantages qu'elle propose. De nombreuses revues démontrant l'intérêt de développer des CP de la GAA et de la GCase comme traitement pour la MP et la MG ont été publiées.^{36,37,85-88} En effet, la thérapie par CP permet d'envisager un traitement oral, potentiellement efficace pour les troubles neurologiques, et à faible coût. De plus, les CP peuvent être pris en association avec un traitement par enzyme recombinante afin d'avoir un effet synergique. On peut distinguer deux catégories de CP : les CP de 1^{ère} génération, généralement inhibiteurs compétitifs, et les CP de 2nd génération, non-inhibiteurs.

I.2.4.1. CHAPERON PHARMACOLOGIQUE DE LA GAA

Dans cette partie ne seront décrits que les CP de la GAA testés sur enzymes mutées ou cellules de patients. A la différence de la MG, peu de CP ont été mis en évidence pour la MP. Ceci est probablement dû à la prévalence plus faible de la MP par rapport à la MG. Les seules familles de composés ayant montré une activité comme CP sont des sucres, l'ambroxol et ses dérivés, les iminosucres et certains acides aminés.

Concernant la famille des sucres (Figure 9), des travaux menés par Kakavanos *et al.* ont montré que le D-glucose et le D-galactose, à concentration élevée (6,0 g.L⁻¹), permettent l'augmentation de la production de la GAA à l'intérieur de la cellule. Une conservation de son activité pendant plus de 4 jours, révélant ainsi un effet stabilisateur, est également observée.⁸⁹ De plus, à cette même concentration, sur des cellules de patients atteints de la MP, l'augmentation de l'AR de la GAA par le D-glucose a été montrée.⁸⁹ Dans une autre étude, Okumiya *et al.* ont évalué l'impact de l'acarbose et du voglibose, tous deux inhibiteurs avec des IC₅₀ respectifs de 59 et 3,4 µM, sur l'activité de la GAA. Il a été démontré que l'acarbose (50 µM) multiplie par 1,4 et 1,9 l'AR de la GAA sur deux lignées cellulaires de patients atteints de la MP, contrairement au voglibose qui n'a montré aucune activité chaperon.⁹⁰

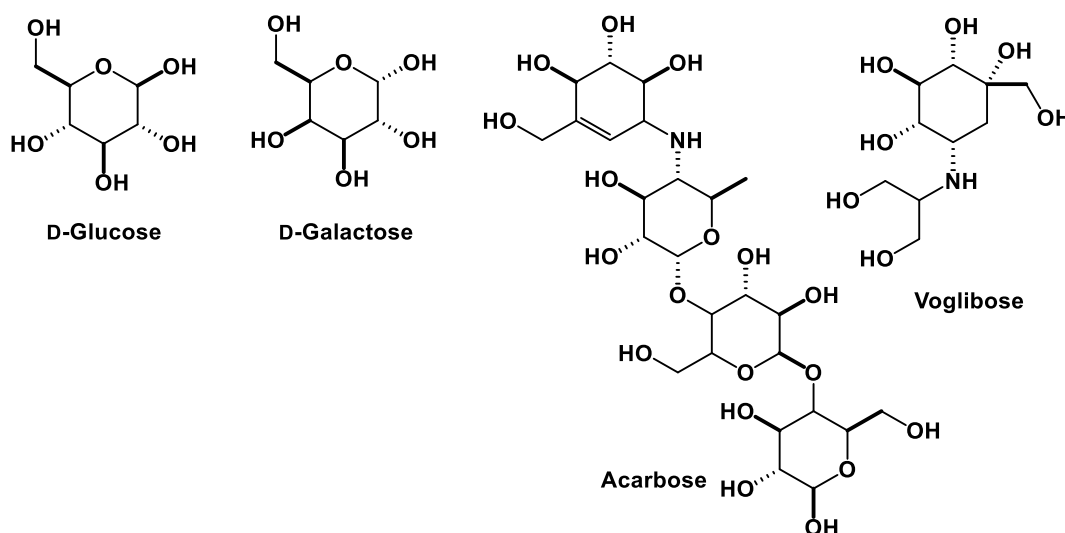


Figure 9 : Structure chimique des ligands de la GAA de type glucide

La famille des iminosucres (Figure 10) est la plus étudiée et compte plusieurs CP de la GAA. La plupart des iminosucres sont des inhibiteurs compétitifs des glycosidases.^{37,91} Leur manque de sélectivité envers les glycosidases et leur capacité inhibitrice sont les principaux obstacles pour le développement de ces molécules en tant que CP. Parmi eux, la D-DNJ et ses dérivés alkylés sont les plus étudiés pour leur activité inhibitrice envers la GAA. Plusieurs présentent des activités inhibitrices de la GAA de l'ordre du µM, comme le miglitol, la D-NB-DNJ, ou encore la D-N-nonyl-déoxynojirimycine (D-NN-DNJ). Cependant, ce n'est qu'en 2006 qu'Asano *et al.* ont démontré leur activité de CP vis-à-vis de la GAA. En étudiant de nouveaux CP de la GCase pour la MG, l'équipe d'Asano a montré l'activité chaperon de dérivés D-DNJ C-alkylés, vis-à-vis de la GAA, sur des fibroblastes de patients atteints de la MG.⁹² Après ces premiers résultats encourageants, plusieurs études ont rapporté des composés dérivés de la D-DNJ comme CP sur des cellules de patients atteints de la MP (Tableau 1).^{38,90,93,94} Parenti *et al.* ont montré que la D-DNJ (20 µM) et la D-NB-DNJ (20 µM) augmentent l'activité de GAA d'un facteur allant

INTRODUCTION GENERALE

respectivement de 1,3 à 7,5 et de 1,8 à 5,6, sur quatre des huit lignées cellulaires de patients atteints de la MP, après 9 jours de traitement. Il est à noter que trois lignées sur quatre étaient porteuses de la mutation L552P.⁹³

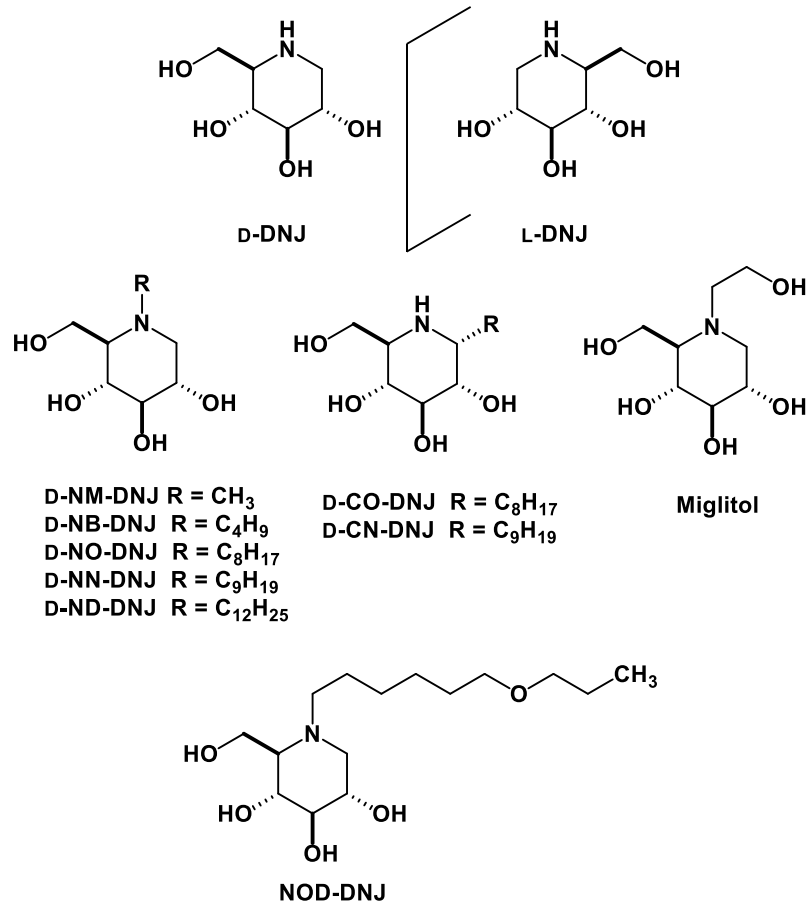


Figure 10 : Structure chimique des chaperons de la GAA de type iminosucre

Composé	Facteur d'augmentation	Lignée cellulaire (fibroblaste)	Référence
D-DNJ	1,3-7,5 à 20 µM	L552P	93
	2,5 à 20 µM	G549R	93
	5 à 100 µM	Y455F	90
	7 à 100 µM	P545L	90
	9,5 à 50 µM	M519V	94
D-NB-DNJ	1,3 à 20 µM	L552P	38
	1,8-5,6 à 20 µM	L552P	93
	3 à 20 µM	G549R	93
	14 à 10 µM	Y455F	90
D-NOD-DNJ	7,9 à 10 µM	P545L	90

Tableau 1 : Facteurs d'augmentation de l'activité de la GAA sur lignées cellulaires atteints de la maladie de Pompe

Pour l'ambroxol et ses dérivés **2** à **4** (Figure 11), une étude et un brevet de Lukas *et al.* ont montré que l'utilisation seule d'ambroxol **1** n'améliore pas l'activité des formes mutantes de la GAA testées. En revanche, l'utilisation combinée de l'ambroxol avec la D-DNJ (40 et 20 μ M respectivement) augmente significativement l'activité des mutants de 1,6 à 5,5 fois, par rapport à la D-DNJ seule (20 μ M).^{95,96}

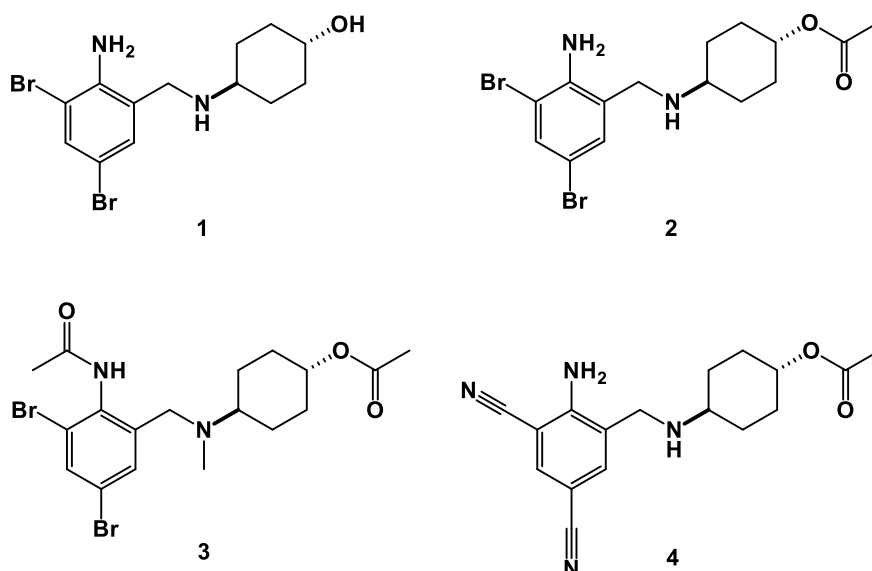


Figure 11 : Structure chimique de l'ambroxol (**1**) et ses dérivés

Une autre étape importante a été franchie par Parenti *et al.* qui ont démontré que l'utilisation combinée de CP et de la TRE provoque un effet synergique sur l'augmentation de l'AR de la GAA, sur des fibroblastes de patients atteints de la MP et des souris KO, par rapport à l'utilisation de la TRE seule.³⁸ En effet, les CP permettent une augmentation de la stabilisation de l'enzyme recombinante et de sa pénétration cellulaire. L'utilisation combinée de D-NB-DNJ (20 μ M) avec la TRE a permis une amélioration de l'activité de GAA de 1,3 à 2,2 fois par rapport à la TRE seule.³⁸

De plus, Parenti *et al.* ont démontré pour la première fois l'efficacité de la L-NB-DNJ comme CP pour la MP.³⁸ Il s'agit du premier iminosucre de stéréochimie L, non inhibiteur, ayant une activité comme CP de la GAA. Dans cette étude, la L-NB-DNJ (20 μ M) a montré une efficacité similaire à son énantiomère de configuration D comme CP en monothérapie ou en présence d'enzymes recombinantes. Ce CP, non inhibiteur, ouvre la voie à l'utilisation d'iminosucres non-inhibiteurs, de configuration L.

Des iminosucres de la famille des pyrrolidines, ont également montré des effets CP envers la GAA dans le cadre d'une thérapie combinée CP/TRE. Kato *et al.* ont tout d'abord observé *in vitro* des activités stabilisatrices contre la dénaturation thermique de la rhGAA pour toute une série de 1,4-dideoxy-1,4-imino-L-arabinitol (LAB) modifiés, initialement connus comme inhibiteurs de l' α -glucosidase du RE (Figure 12).⁹⁷

INTRODUCTION GENERALE

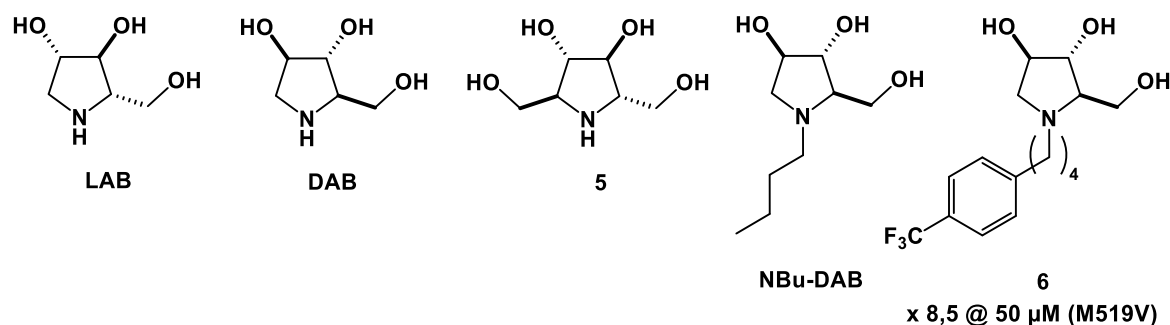


Figure 12 : Structure chimique du LAB, du DAB et de leurs dérivés

Cette étude montre également que ces composés ont une sélectivité vis-à-vis de l'activité inhibitrice envers la GAA comparé à l' α -glucosidase du RE. Cependant, l'activité chaperon de ces composés n'a pas été évaluée sur des cellules de patients atteints de la MP. Plus récemment, Huang-Yi *et al.* ont évalué l'activité chaperon du LAB et d'un de ces dérivés, le composé **5**, co-incubé avec la *rhGAA* sur une lignée cellulaire de patients atteints de la MP. Le LAB augmente l'AR de la GAA d'un facteur 4,5 à 50 nM après 24h par rapport aux cellules traitées avec l'enzyme recombinante seule, et son dérivé **5** d'un facteur 2 à 500 nM.⁹⁸ Cependant, aucune activité chaperon du LAB ou d'un de ces dérivés dans le cadre d'un traitement en monothérapie n'a été évaluée à ce jour. Ces résultats encourageants avec cette nouvelle famille de composés ouvrent la voie à de nouveaux CP plus sélectifs envers la GAA. Très récemment, Kato *et al.* ont développé un dérivé du DAB *N*-alkylé, le composé **6** et ont évalué son activité comme CP, ainsi que la D-DNJ, le DAB et *N*-Bu-DAB sur des fibroblastes de patients atteints de la MP mutées M519V (Figure 12).⁹⁴ Le composé **6**, contrairement aux deux composés de références DAB et son dérivé NBu-DAB, a montré un effet chaperon comparable à celui de la D-DNJ aux deux concentrations testées (10 et 50 µM) avec un facteur d'augmentation allant jusqu'à 8,5.

Enfin quatre acides aminés non inhibiteurs, ont montré une activité stabilisatrice sur la *rhGAA* : la *N*-acétyl-L-cystéine (NAC), la *N*-acétylglycine (NAG), la *N*-acétyl-L-sérine (NAS) et la L-carnitine (Figure 13).^{96,99,100} Parmi eux, la NAC, un ligand allostérique, a montré une augmentation de l'AR de GAA mutées dans des cellules COS7 (mutations : L552P, A445P et Y455F). De plus, dans les fibroblastes de patients atteints de la MP, la co-incubation de la NAC avec la *rhGAA* a entraîné une augmentation de l'activité de la GAA allant de 3,7 à 8,7 fois par rapport à l'administration d'enzyme recombinante seule. Par la suite, des essais *in vivo* sur souris KO ont montré, dans tous les tissus des sujets traités avec NAC et TRE, une augmentation de l'activité de la GAA par rapport aux souris traitées avec l'enzyme recombinante seule.^{96,99}

INTRODUCTION GENERALE

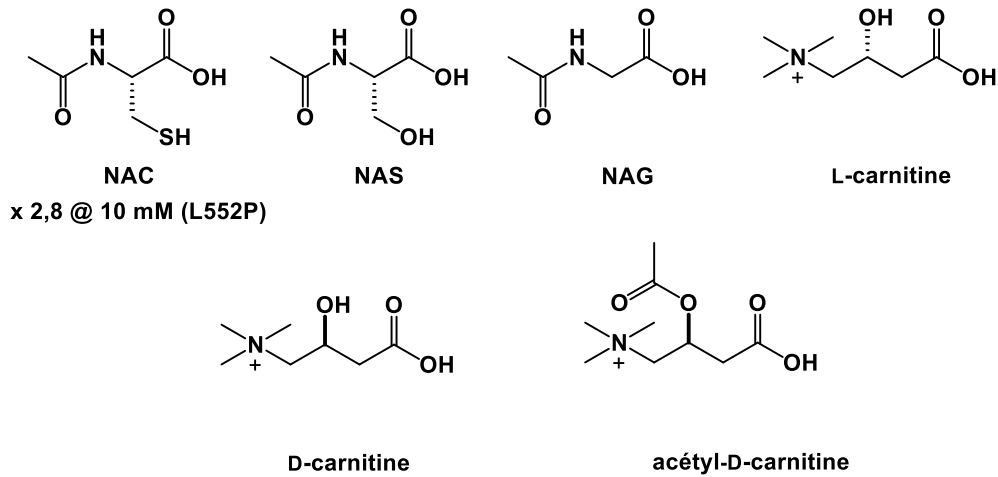


Figure 13 : Structure chimique du NAC, NAG, NAS et de la L-carnitine

Une étude cristallographique menée en 2017 par le Dr. Sulzenbacher a mis en évidence les sites de liaison allostériques de la NAC.¹⁴ Cette étude est la première rapportant la structure cristallographique de l'enzyme recombinante humaine GAA (*rhGAA*) (code PDB : 5NN3, 5NN4, 5NN5, 5NN6, 5NN8).¹⁴ La *rhGAA* a subi une protéolyse en présence d' α -chymotrypsine, afin d'obtenir un cristal d'une résolution de 1,9 Å (Figure 14).¹⁴

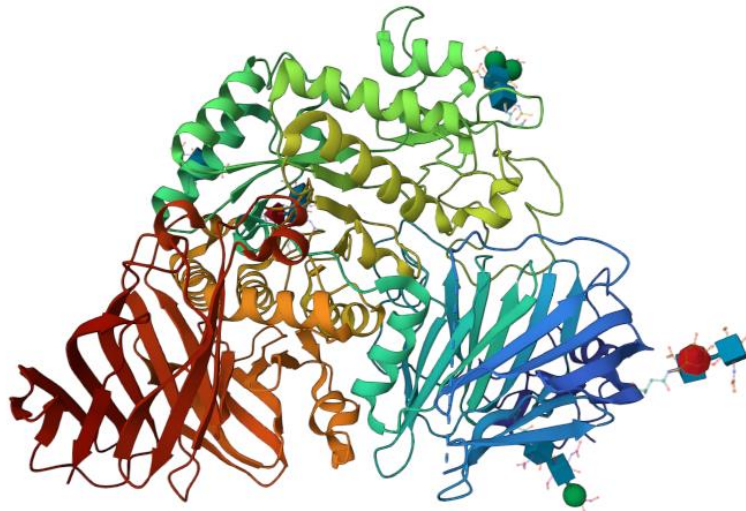


Figure 14 : Structure cristallographique de la GAA (code PDB : 5NN3) ¹⁴

A partir de ces structures, il a été démontré la présence de deux sites allostériques à la surface de la protéine où deux molécules de NAC ont été observées (Figure 15). Un site, situé à 30 Å du site actif et un second à 25 Å. Il semblerait que la présence de la fonction thiol n'intervienne pas pour la fixation de la NAC à ces sites allostériques (Figure 15).

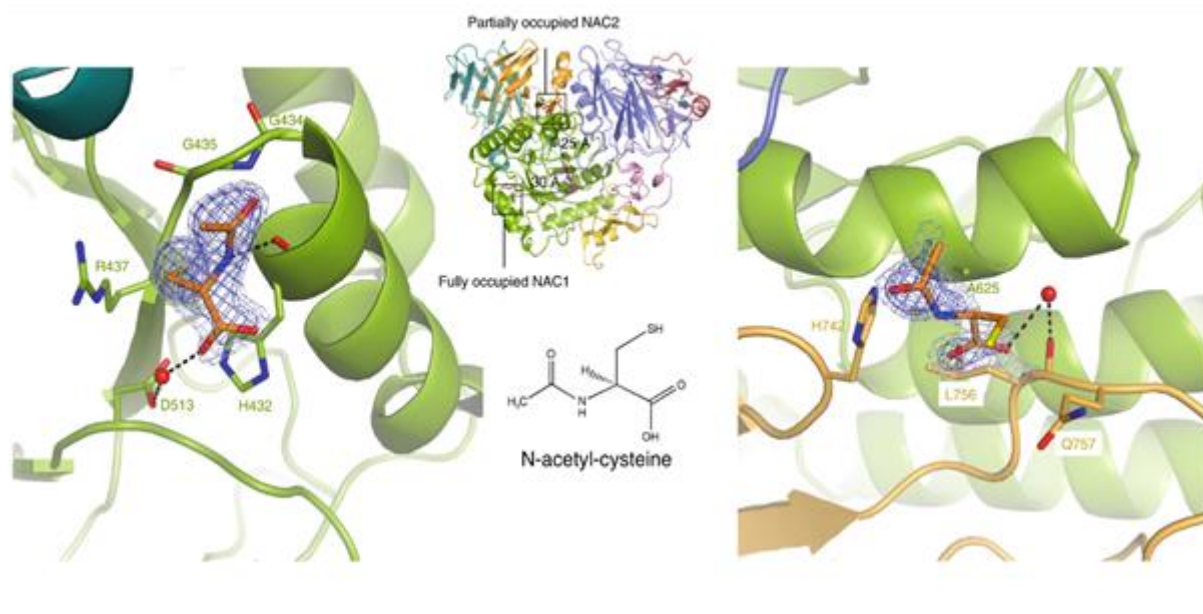


Figure 15 : Structure cristallographique de la GAA co-cristallisé avec la NAC ¹⁴

Récemment, Iacono *et al.* ont montré que la L et la D-carnitine ainsi que l'acétyl-D-carnitine sont des ligands allostériques de la GAA (Figure 13). La L-carnitine (2 mM) augmente trois fois l'AR de la GAA, mutée L552P, issue de fibroblastes de patients atteints de la MP. De plus, sur trois lignées de fibroblastes de patients atteints de la MP, la co-incubation de la L-carnitine (1 à 20 mM) avec la rhGAA a montré une augmentation de l'activité de la GAA sur toutes les lignées cellulaires avec un effet dose-dépendant.¹⁰⁰ Ces études *in vitro* et *in vivo* ont mis en lumière que l'utilisation d'acides aminés, acétylés ou non, dont la NAC et la L-carnitine, en monothérapie ou en thérapie combinée augmente l'AR de la GAA. Cette nouvelle famille de CP semble prometteuse pour le traitement de la MP. Cependant il est à noter que les concentrations utilisées de CP dans le cadre de ces études sont élevées (de l'ordre du mM), par rapport notamment aux concentrations utilisées avec les CP de type iminosucre (de l'ordre du μM).

1.2.4.2. CHAPERON PHARMACOLOGIQUE DE LA GCASE

Beaucoup d'études concernant les CP de la GCCase ont été publiées. Parmi les nombreux CP de 1^{ère} génération (inhibiteurs) de la GCCase décrits dans la littérature, on retrouve des iminosucres,^{92,101-106} l'ambroxol et ses analogues,^{107,108} des lactames,¹⁰⁹ des quinazolines,^{110,111} des aminocyclitols.^{87,112,113} La plupart de ces composés souffrent d'un manque de sélectivité vis-à-vis d'autres glucosidases comme la GAA. Cependant, quelques-uns de ces composés ont montré des activités chaperons remarquables sur cellules de patients (Figure 16). Des dérivés pipéridines, comme le composé **7** synthétisé au sein de notre laboratoire, ont montré une activité chaperon sur des fibroblastes de patients porteurs de la mutation N370S à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, avec des gains d'AR d'un facteur 3.¹¹⁴ Les dérivés de l'isofagomine **8** et **9** ont tous deux multiplié l'AR de la GCCase par 5 sur des fibroblastes porteurs de la mutation G202R à des concentrations respectives de 50 μM et 75 μM .¹⁰⁶ Le lactame **10** a montré une activité chaperon sur des fibroblastes mutés N370S, avec une augmentation de l'AR de 6,2 à 50 μM .¹⁰⁹ Le composé **11**, une quinazoline, a permis une augmentation de l'AR de 2,5 à 12,5 μM sur des fibroblastes mutés N370S.¹¹⁰

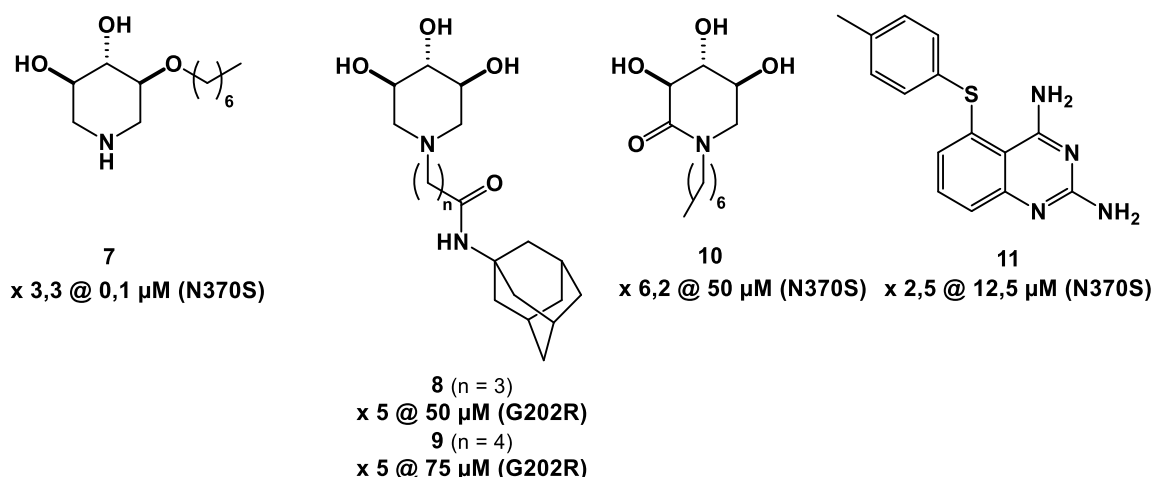


Figure 16 : Structure chimique des différents chaperons pharmacologiques de la GCase

Plus récemment, d'autres iminosucres de type pyrrolidines, qui sont aussi des CP de 1^{ère} génération, ont montré des activités chaperon intéressantes sur la GCase.^{115,116} En 2016, Kato *et al.* ont synthétisé des dérivés LAB et DAB C-alkylés, et ont évalué leur activité inhibitrice et chaperon sur la GCase (Figure 17). Seuls les composés dérivés DAB alkylés avec au moins une chaîne de 5 carbones ont montré une activité inhibitrice, avec un maximum d'inhibition pour le composé **12** possédant une chaîne alkyle de 13 carbones ($IC_{50} = 0,77 \mu$ M) (Figure 17). L'activité CP de ce composé a été évaluée sur des fibroblastes portant la mutation N370S, et une activité chaperon similaire à l'isofagomine a été observée à une concentration 5 fois inférieure à celle-ci (multiplication de l'AR par 1,5 à 1 μ M).¹¹⁶

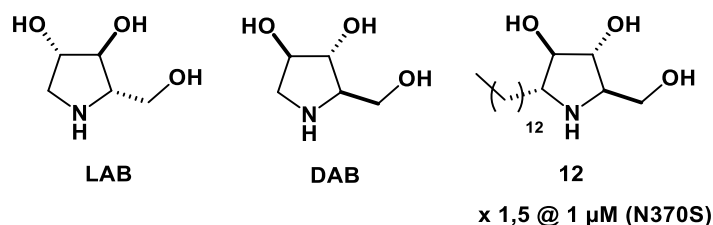
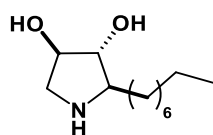


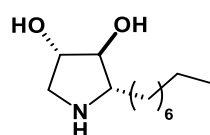
Figure 17 : Structure chimique du DAB, LAB et un analogue de DAB

Des études antérieures menées au sein même de notre laboratoire sur des analogues C1-alkylés de DAB et LAB ont montré pour ces composés des activités inhibitrices et chaperon vis-à-vis de la GCase. Les composés AR88 et *enant*-AR88 sont inhibiteurs de la GCase avec des modes d'inhibition différents (Figure 18). Le composé AR88 est un inhibiteur non-compétitif avec une IC_{50} de 780 nM alors que son énantiomère est un inhibiteur compétitif avec une IC_{50} de 59,6 μ M.¹¹⁵ Leurs activités comme CP de la GCase sont comparables, avec une augmentation de l'AR d'un facteur 2, sur deux lignées cellulaires de patients avec la mutation N370S à des concentrations de 3 et 30 μ M respectivement.¹¹⁵

INTRODUCTION GENERALE



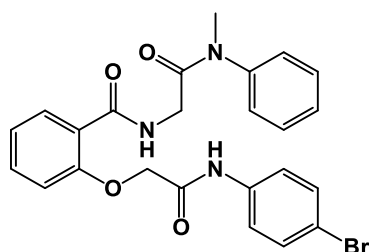
AR88
inhibiteur non-compétitif
 IC_{50} = 780 nM
x 2 @ 3 μ M (N370S)



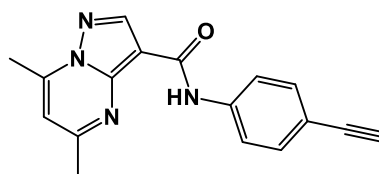
enant-AR88
inhibiteur compétitif
 IC_{50} = 59600 nM
x 2 @ 30 μ M (N370S)

Figure 18 : Structure chimique de l'AR88 et enant-AR88

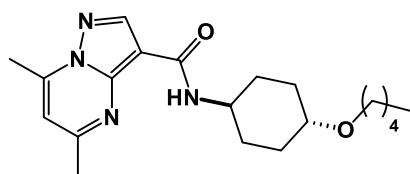
D'autres composés non-inhibiteurs c'est-à-dire des CP de 2nd génération, ont également été répertoriés ces dernières années (Figure 19).



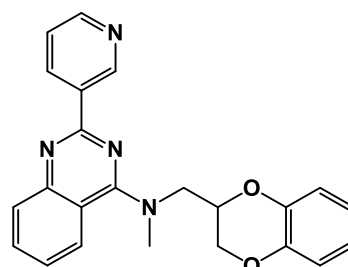
ML266



ML198



LTI-291



S-181

Figure 19 : Structure chimique de chaperon pharmacologique de 2nd génération pour la GCase

Certains de ces composés, comme les composés ML266, ML198 et S-181, en plus d'avoir montré une activité chaperon sur des fibroblastes de patients mutés N370S et L444P, ont montré une certaine sélectivité vis-à-vis de la GCase par rapport à d'autres glucosidases comme la GAA ou l' α -galactosidase.^{117,118} Dans une autre étude, des tests *in vitro* et *in vivo* plus approfondis ont été réalisés avec le composé ML198, montrant que ce composé possède une bonne stabilité, une absorption orale et aussi une capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE).¹¹⁹

Un autre composé, le LT-291, actuellement en phase clinique¹²⁰, a montré une capacité à traverser la BHE et à s'accumuler dans le cerveau des patients à une dose de 1 μ M (1% de la dose administrée), une dose suffisante pour doubler l'AR de la GCase.³⁶

Ces quelques CP de 2nd génération prometteurs ouvrent la voie au développement de nouveaux CP contre la MG. Cependant, pour ce type de chaperons, des études mécanistiques et

cristallographiques sont nécessaires afin d'identifier les sites de liaisons allostériques de la GCase susceptibles d'être impliqués et de mieux comprendre leur mécanisme d'action

Récemment, une autre catégorie de CP, les composés multivalents, a été développée contre la MG. Plusieurs composés multivalents ont été synthétisés. Leur activité comme CP a été évaluée et sera abordée dans le chapitre suivant.

I.3. GLYCOSIDASES INTESTINALES D'INTERET THERAPEUTIQUE : DIABETE DE TYPE 2

Les glycosidases intestinale sont des cibles d'intérêts thérapeutiques contre le diabète de type 2 (DT2). Après avoir présenté le DT2, nous nous intéresserons à deux types d'hypoglycémiant : les inhibiteurs de maltase-glucoamylase (MGAM) dont trois sont des traitements commerciaux, et les inhibiteurs d' α -amylases pancréatiques et salivaires qui sont prometteurs pour le développement de nouveaux hypoglycémiant.

I.3.1. GENERALITES SUR LE DIABETE DE TYPE 2

D'après l'OMS, en 2014, 422 millions de personnes dans le monde souffrent de diabète, et environ 2 millions de personnes seraient décédées des suites de cette maladie en 2019. Ces chiffres élevés s'expliquent par l'augmentation de la prévalence dans le monde ces dernières décennies, particulièrement dans les pays aux revenus faibles ou intermédiaires (*Figure 20*). En effet, d'après une étude épidémiologique publiée en 2004, la prévalence du diabète, en 2000, était estimée à 2,8% de la population soit 171 millions d'individus et devait atteindre 4,4% en 2030 soit 366 millions d'individus.¹²¹ Or ces prévisions ont déjà été largement dépassées en 2014 avec une prévalence estimée à 8,5%. En France aussi cette prévalence ne cesse d'augmenter depuis 2010, atteignant 5,3% de la population française en 2020, avec une disparité entre les hommes (6,1%) et les femmes (4,6%).

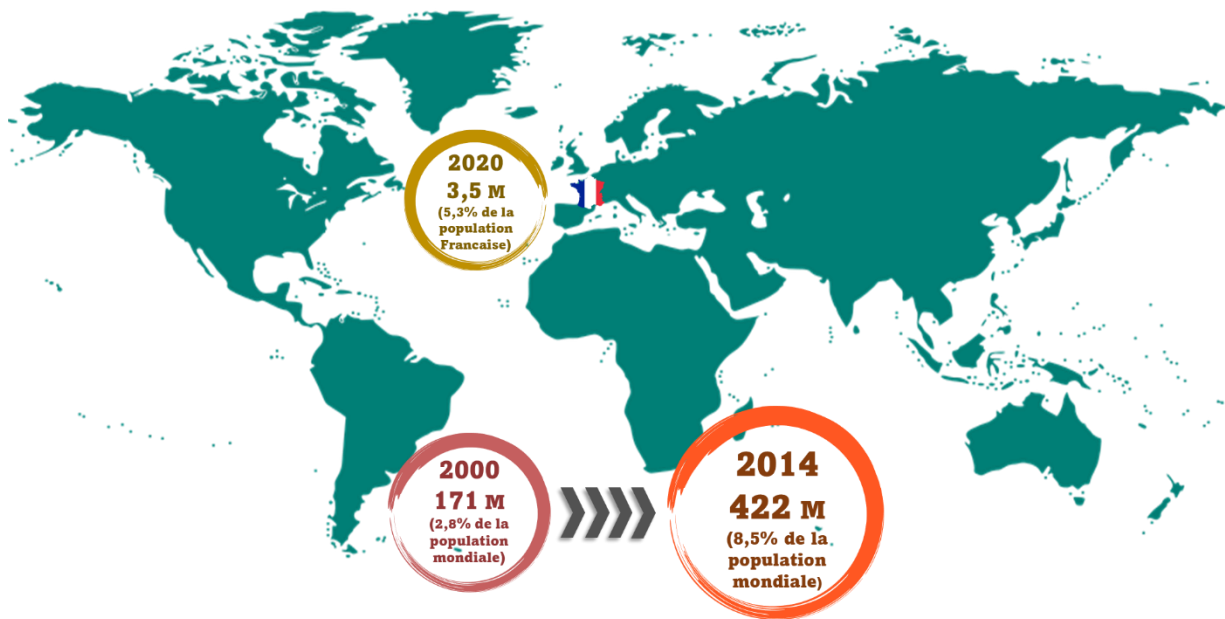


Figure 20 : Les chiffres clés des personnes atteintes de DT2 dans le monde (OMS)

Le diabète, ou syndrome polyuro-polydipsique, se divise en deux grandes familles. Le plus fréquent, le diabète sucré, appelé également diabète mellitus, se différencie du diabète insipide (dont nous ne parlerons pas ici) par la présence de glucose dans les urines et donc d'une hyperglycémie chronique. Cette hyperglycémie chronique conduit à une variété de symptômes comme une polyurie, une polydipsie, une insuffisance rénale, une perte de poids, une polyphagie, une vision floue, une altération de la croissance, une susceptibilité accrue à certaines infections, des troubles intestinaux, une mort prématurée.^{122,123} De plus, il a récemment été démontré que l'élévation du taux de glucose dans le sang est responsable de lésions vasculaires provoquant des maladies coronariennes, des infarctus du myocarde et des apoplexies cérébrales.^{124,125} Le diabète sucré se divise en différents types dont trois principaux :

- Le diabète de type 1 (DT1) marqué par l'absence d'une hormone, appelée insuline, due à la disparition des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas qui la sécrètent. L'insuline est une hormone qui régule la glycémie, jouant un rôle essentiel dans le métabolisme du glucose en favorisant l'absorption du glucose dans le sang par les cellules adipeuses, le foie et les muscles.
- Le diabète de type 2 (DT2) représentant 90% des malades, s'identifie par la résistance à l'action d'insuline, des organes cibles comme les tissus adipeux, les muscles et le foie, et à des défauts de sécrétion d'insuline.
- Le diabète gestationnel qui, comme son nom l'indique apparaît chez la femme lors de la grossesse, est caractérisé par une intolérance au glucose due à la fabrication, lors de la grossesse, d'hormones placentaires.

A ce jour, les causes exactes de l'apparition du DT2 sont encore non élucidées. Cependant, des facteurs de risques comportementaux (obésité, sédentarité, tabagisme, alimentation peu équilibrée, ...), métaboliques (hormones, syndrome métabolique, ...) et génétiques ont été démontrés.¹²⁶ Dans le cas du DT2, le pancréas sécrète une dose d'insuline suffisante afin de réguler la glycémie, mais au fil de

l'évolution de la maladie, une insulinopénie progressive s'installe.^{127,128} De plus, une insulino-résistance due à des antagonistes de l'insuline ou une réponse altérée de l'action de l'insuline dans les tissus cibles se produit.^{128,129} En effet, afin d'initier le métabolisme du glucose, l'insuline se lie à des récepteurs membranaires à activité tyrosine-kinase présents à la surface cellulaire de toutes les cellules mais exprimés surtout dans les trois tissus cible que sont les tissus adipeux, les muscles, le foie.^{128,130} Des défauts liés à ces récepteurs contribuent donc à la résistance à l'insuline chez les patients atteints de DT2.¹³¹ C'est l'addition de ces deux anomalies physiologiques (insulinopénie et insulino-résistance) qui est responsable du développement du DT2 et qui complexifie son traitement. Les traitements utilisés à l'heure actuelle visent donc soit à limiter l'hyperglycémie par des hypoglycémiant, soit à diminuer l'insulino-résistance ou intensifier la production d'insuline.¹³²

I.3.2. TRAITEMENTS DU DIABETE DE TYPE 2

Généralement, un médicament hypoglycémiant pour contrôler la glycémie suffit comme traitement médicamenteux pour le DT2. Cependant, en fonction de l'avancement de la maladie, un second médicament avec un mécanisme d'action différent est souvent nécessaire.¹³³ Ces traitements ne peuvent être utilisés que si la quantité de cellules bêta-pancréatiques est suffisante.¹³³ Selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé, le GLUCOPHAGE® (metformine hydrochlorée) ayant à la fois un effet hypoglycémiant et diminuant la résistance des tissus cibles à l'insuline est utilisé en première intention pour traiter le DT2 (Figure 21). D'autres traitements sont couramment utilisés en bi ou trithérapie comme le FORXIGA® (dapagliflozin), un inhibiteur de SGLT2 (sodium-glucose cotransporteur 2), un transporteur responsable de la réabsorption du glucose dans la circulation sanguine, des sulfamides comme le DIAMICRON® (gliclazide) qui stimulent la sécrétion d'insuline, ou encore des inhibiteurs de MGAM comme le GLUCOR® (acarbose) ou le DIASTABOL® (miglitol) (Figure 22). Nous nous intéresserons par la suite aux inhibiteurs de la MGAM. Puis nous aborderons les inhibiteurs d' α -amylase, qui est une cible intéressante dans le traitement du DT2.

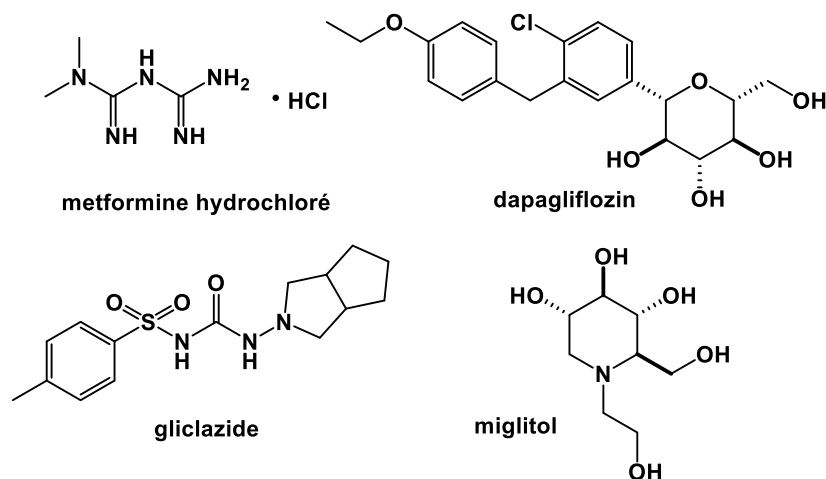


Figure 21 : Structure chimique de différents traitements contre le DT2

I.3.2.1. INHIBITEURS DE LA MGAM

La MGAM est une α -glucosidase (EC.3.2.1.20) (GH31), localisée au niveau de l'intestin. Les inhibiteurs de la MGAM, plus connus sous le nom d'inhibiteur de l' α -glucosidase (IAG), permettent de limiter l'hyperglycémie postprandiale (2h après le repas), ce qui est essentiel dans le contrôle de la maladie. De plus, cette hyperglycémie est associée à des complications cardiovasculaires.^{134,135} Inhiber la MGAM, située au niveau de la surface externe des cellules épithéliales de l'intestin grêle, permet de diminuer le taux d'absorption du glycogène dans le sang en ralentissant ou interrompant la digestion de di/oligo/polysaccharides, notamment l'amidon, qui sont sources de glucose.¹³⁶

A l'heure actuelle, trois IAG sont disponibles sur le marché : le GLUCOR® (acarbose), le VOGLIB® (voglibose) et le DIASTABOL® (miglitol) (Figure 22) avec des IC_{50} respectifs pour la MGAM de 15,2, 1,3 et 3,7 μ M évalués par Morikawa *et al.*¹³⁷

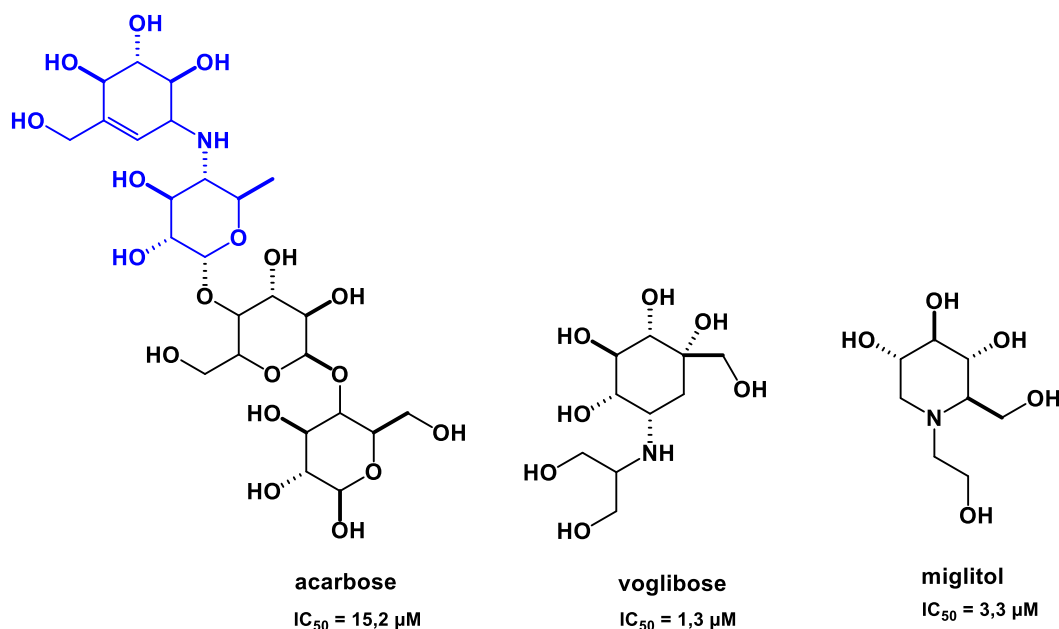


Figure 22 : Structure chimique et valeurs d' IC_{50} sur la MGAM des trois IAG commerciaux

L'acarbose, premier IAG développé et commercialisé dans les années 1990, est aujourd'hui encore l'IAG le plus couramment utilisé. Ce pseudotétrasaccharide d'origine microbienne diminue l'hyperglycémie postprandiale et améliore la sensibilité à l'insuline.^{136,138} Il est constitué d'une unité acarviosine liée à une unité maltose. L'unité acarviosine (en bleu) possède une liaison C-N responsable de l'affinité de la molécule pour l' α -glucosidase et de l'inhibition de l'activité catalytique hydrolytique de l'enzyme.¹³⁶ Il a la particularité d'être faiblement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal (1-2%), ce qui lui permet de se déployer dans tout l'intestin grêle et de retarder l'absorption des sucres dans cette zone de l'organisme régulant ainsi la glycémie.¹³⁹

Le voglibose est un dérivé N-substitué de valioline, commercialisé comme traitement pour le DT2 depuis 1994. Il possède une forte affinité pour l' α -glucosidase qui est 10 à 20 fois plus forte que l'acarbose.¹⁴⁰ Tout comme l'acarbose, le voglibose est faiblement absorbé (<6%) au niveau du tractus gastro-intestinal.

INTRODUCTION GENERALE

Le miglitol, un iminosucre, est le dernier composé commercialisé, en 1996, comme traitement pour le DT2. Ce composé a une forte affinité pour l' α -glucosidase, qui est 10 à 20 fois plus forte que le GLUCOR®, lui permettant d'être plus efficace que celui-ci pour la même dose administrée.¹⁴¹ Contrairement à l'acarbose et au voglibose, le miglitol est fortement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal avec des taux d'absorption dose dépendant, allant de 70 à 100%, ce qui lui permet d'avoir un effet systémique contrairement à l'acarbose ou au voglibose. Le mécanisme d'absorption du miglitol est similaire à celui du glucose.^{141,142}

Une étude clinique comparative menée par Sugihara *et al.* entre ces trois IAG commerciaux, sur 81 japonais atteints de DT2, a été réalisée. Le miglitol a montré des effets thérapeutiques sur l'hyperglycémie postprandiale des patients, plus importants que les groupes de patients traités à l'acarbose ou au voglibose. Il semblerait donc que cette forte absorption du miglitol au début de l'intestin grêle ait un effet bénéfique sur le traitement de la maladie.¹³⁵ De plus, pour les patients de ce groupe, une perte de poids significative a été constatée après 12 semaines de traitement, ce qui permet de diminuer les risques de problèmes cardiovasculaires souvent rencontrés chez les patients atteints de DT2.¹³⁵

Ces trois spécialités pharmaceutiques ne sont cependant pas dépourvues d'effets secondaires, comme des crampes, des flatulences, des distensions abdominales, diarrhées, ... retrouvés chez un nombre variable de patients.^{136,140} Ces symptômes s'atténuent avec le temps et si un dosage progressif du traitement est prescrit.¹⁴²

1.3.2.2. INHIBITEURS D' α -AMYLASE

Contrairement à la MGAM qui catalyse essentiellement l'hydrolyse de disaccharides, les α -amylases salivaire et pancréatique (EC.3.2.1.1) hydrolysent des liaisons glycosidiques α -(1,4) des sucres plus complexes comme l'amidon.¹⁴³ L' α -amylase salivaire, principale enzyme digestive buccale, et l' α -amylase pancréatique qui agit au niveau du tractus gastro-intestinal sont sécrétées respectivement par les glandes salivaires et le pancréas. Toutes deux sont des cibles prometteuses pour contrôler l'hyperglycémie postprandiale.¹⁴⁴ En effet, inhiber ces α -amylases permet de limiter l'absorption de glucose au niveau de l'intestin (Figure 23).

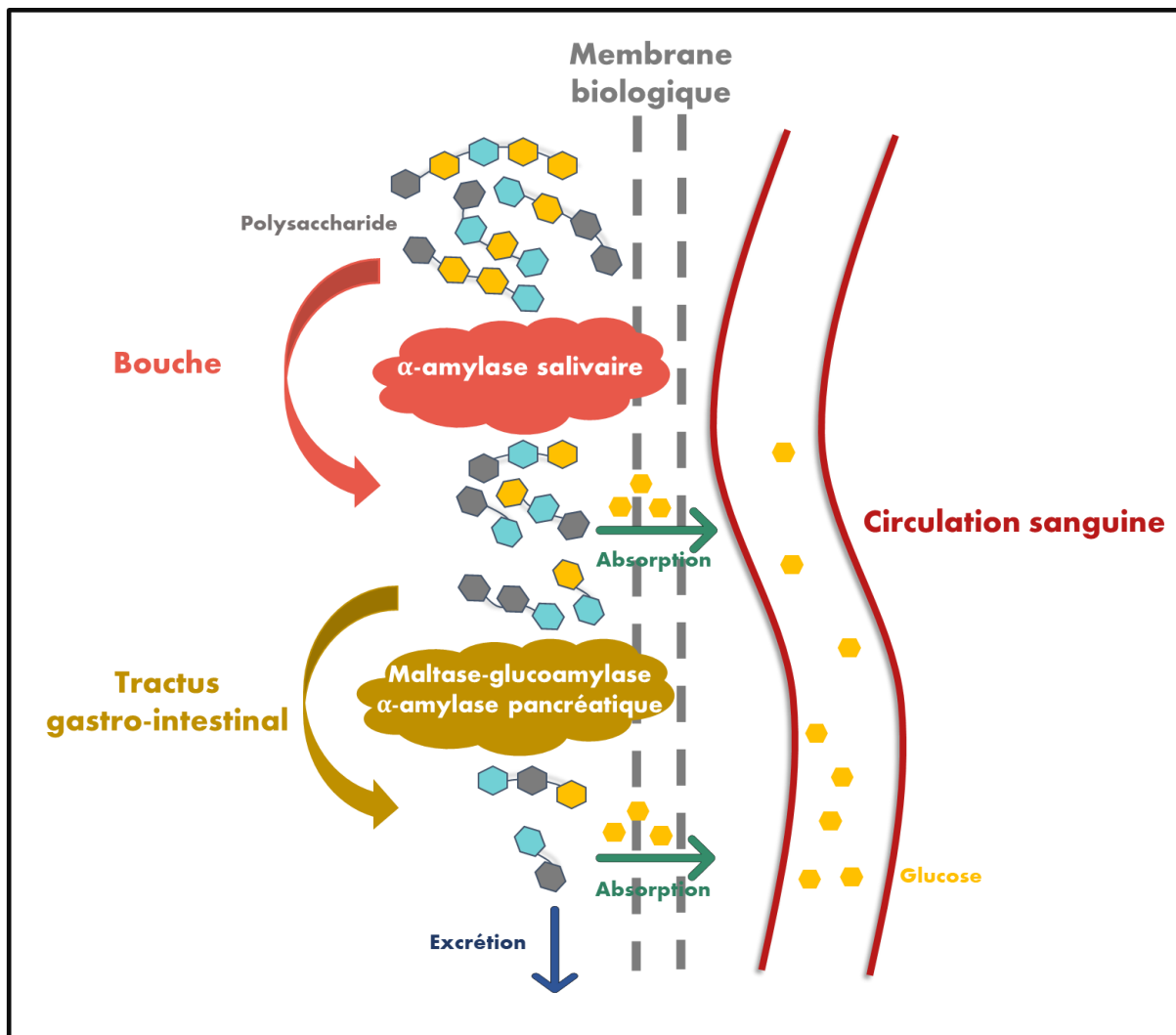


Figure 23 : Illustration simplifiée de l'absorption du sucre dans le système sanguin

De nombreux inhibiteurs des α -amylases sont répertoriés dans la littérature comme des flavonoïdes, des dérivés oxadiazoles comme le composé **13**, des dérivés pyrroles et pyrrolidines, des arylimines et arylamines, des benzotriazoles, des dérivés indoles, des benzofuranes, des dérivés de salacinol comme le composé **14**, ... (Figure 24).¹⁴⁵

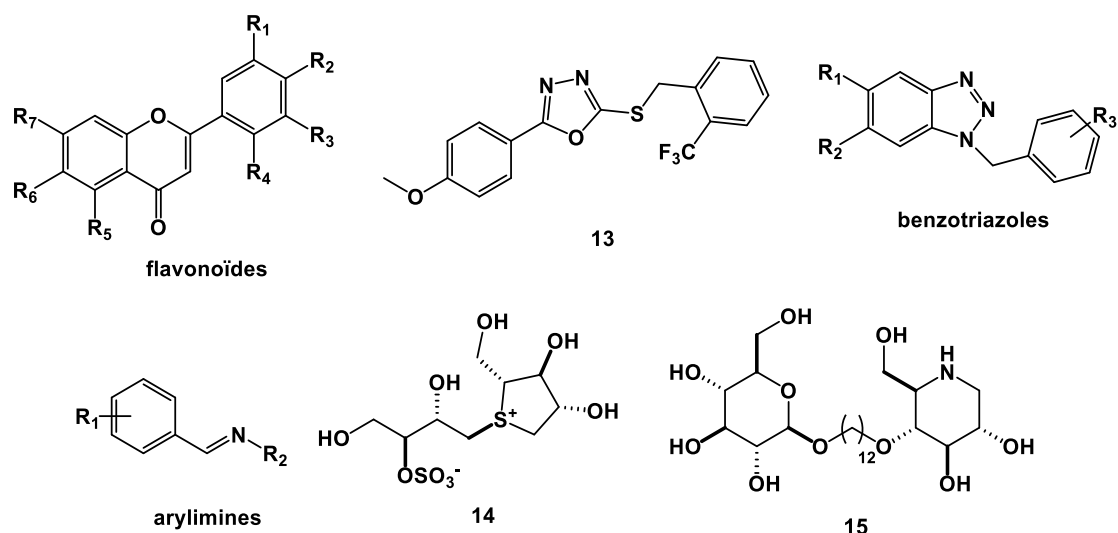


Figure 24 : Structure chimique de différents inhibiteurs d' α -amylases

Cependant, parmi les traitements hypoglycémisants sur le marché pour le traitement du DT2, seul l'acarbose induit une inhibition de l'activité de l' α -amylase. Cela est principalement dû à la structure de l'enzyme, qui présente de nombreux sous-sites de liaisons, permettant l'hydrolyse de polysaccharides complexes.^{146,147} En effet, une unité sucre possède une faible affinité avec l'enzyme contrairement aux polysaccharides dont l'affinité augmente au fur et à mesure que ces unités se lient avec les différents sous-sites enzymatiques. L'acarbose, étant un pseudo tétra-saccharide (Figure 22), est donc un ligand plus afin de cette enzyme. La fixation de l'unité insaturée au site actif permet l'inhibition, tandis que les interactions de ses autres unités sucres avec les sous-sites de liaisons de l'enzyme permettent d'augmenter l'affinité de la molécule.¹⁴⁸

A partir de ces connaissances, Kato *et al.* ont développé des inhibiteurs bivalents (D-glucose/D-DNJ) de l' α -amylase pancréatique. Les composés synthétisés ont, certes, montré de faibles capacités inhibitrices, néanmoins l'augmentation de la taille de l'espaceur entre les différentes unités a permis une amélioration de l'inhibition. Le composé **15**, le plus inhibiteur, inhibe environ 90% de l'activité enzymatique à 3 mM mais reste 150 fois moins puissant que l'acarbose (90% d'inhibition à 20 μ M) (Figure 24).¹⁴⁶

1.4. CONCLUSION

Pour conclure, l'administration d'enzymes recombinantes, *rhGAA* et *rhGCase*, permet certes d'améliorer la qualité de vie de certains patients, mais non sans contraintes. En effet, leur faible disponibilité, leur immunogénicité, leur absence d'efficacité sur certaines formes de la maladie, notamment les formes neurologiques, leur coût élevé, et les effets secondaires qu'elles engendrent sont autant de désavantages liés à ce type de traitements. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux traitements contre la MP et la MG.

L'émergence de la thérapie par chaperon avec l'utilisation de CP semble être une voie prometteuse pour le traitement de ces maladies.

INTRODUCTION GENERALE

Pour la MP, deux familles de molécules ont montré des activités en tant que CP qui pourraient être optimisées. Des CP inhibiteurs comme des iminosucres avec notamment des dérivés D-DNJ ou des dérivés pyrrolidines, mais aussi des CP non-inhibiteurs comme des dérivés L-DNJ et deux acides aminés la L-carnitine et la NAC. Pour ce dernier composé, un problème supplémentaire est rencontré : les concentrations élevées utilisées pour observer un effet pharmacologique.

Pour la MG, de nombreux CP inhibiteurs (iminosucres, lactames, quinazolines, ...), et quelques composés non-inhibiteurs sont décrits dans la littérature avec des effets chaperons remarquables. Parmi eux, des dérivés C1-alkylés du LAB et du DAB synthétisés au sein de notre laboratoire ont montré des résultats préliminaires intéressants comme CP de la GCase.

Pour ce qui est du DT2, l'utilisation d'hypoglycémisants inhibiteurs de la MGAM a déjà montré son efficacité et trois composés sont déjà commercialisés. Cependant, aucun nouveau médicament avec ce mécanisme d'action n'a été développé ces 30 dernières années malgré leur activité hypoglycémisante avérée sur la glycémie postprandiale, essentielle dans le contrôle de la glycémie. De plus, ce type de pathologie nécessite généralement l'utilisation combinée de plusieurs médicaments en fonction de l'évolution de la maladie. Le dernier médicament développé, le DIASTABOL, un iminosucre, présente une capacité d'absorption élevée qui, paradoxalement, lui permettrait d'être plus efficace, ce qui le rend particulièrement intéressant.

Une autre famille d'enzyme, les α -amylases (pancréatiques et salivaires), sont impliquées dans la digestion de sucres complexes comme l'amidon, principale source de glucose dans notre corps. Inhiber ces enzymes permettrait de développer de nouveaux traitements hypoglycémisants contre le DT2. Pour l'heure, un médicament, le GLUCOR[®], développé initialement comme IAG contre le DT2, a montré une activité inhibitrice sur cette famille d'enzymes. Cette activité est liée à la structure pseudo-tétrасacharidique de cette molécule car les α -amylases catalysent préférentiellement l'hydrolyse des sucres complexes grâce aux nombreux sous-sites de liaisons qu'elles possèdent.

Ces différentes données montrent l'intérêt de cibler ces différentes glycosidases pour lutter contre les pathologies associées. Un concept de plus en plus utilisé, appelé effet multivalent, permet d'améliorer l'affinité et la sélectivité de composés connus pour leur cible en les synthétisant sous forme d'objets multivalents. Ces gains permettent d'améliorer les propriétés pharmacologiques. Ce concept appliqué aux glycosidases sera abordé dans le chapitre suivant.

II. GLYCOSIDASES & MULTIVALENCE

Dans ce second chapitre, nous nous intéresserons à l'utilisation de la multivalence pour augmenter l'affinité et les activités inhibitrices de ligands pour leurs cibles biologiques, qui sont des glycosidases. Ce chapitre sera divisé en deux parties. Une première partie détaillera les principes et les mécanismes de la multivalence et une seconde partie donnera des exemples d'utilisation d'objets multivalents avec des glycosidases.

II.1. PRINCIPES DE LA MULTIVALENCE

Les interactions multivalentes sont retrouvées dans d'innombrables systèmes biologiques. De nombreuses biomolécules comme des anticorps, des sucres, ou encore des acides nucléiques adoptent des interactions multivalentes pour compenser la faiblesse des interactions moléculaires monovalentes.^{147,149}

A partir de cette observation, les chimistes ont créé des objets multivalents porteurs de multiples copies d'un ligand afin d'augmenter son affinité, sa spécificité ou son activité pour sa cible biologique. Le gain d'affinité potentiellement obtenu, mesurable et quantifiable par diverses techniques expérimentales, porte le nom d'effet multivalent.

II.1.1. GENERALITES

II.1.1.1. DETERMINATION DE L'EFFET MULTIVALENT

La notion d'effet multivalent a été introduite pour la première fois en 1995, sous le nom d'effet cluster glycosidique, par Y. Lee et R. Lee lors d'une étude s'intéressant aux interactions entre ligands glycosidiques et leurs récepteurs (lectines).¹⁵⁰ Cet effet, renommé depuis « effet cluster » ou « effet multivalent » est défini comme une amélioration de l'activité biologique pour l'objet multivalent par rapport à l'objet monovalent correspondant en tenant compte de la valence.^{151,152}

L'effet multivalent peut se calculer *via* différentes constantes d'équilibre, comme les K_D ou les K_I , mais également par le biais de valeurs d'activités biologiques comme les EC_{50} , IC_{50} , La méthode de calcul diffère selon les données à disposition.^{153,154}

A partir des constantes d'affinité K_a , le résultat de ce rapport se nomme β et s'écrit¹⁵³ :

$$\beta = \frac{K_a^{multivalent}}{K_a^{monovalent}}$$

A partir des IC_{50} ou des K_I , le rapport rp (relative potency), défini par l'équipe de Compain en 2010,¹⁵⁴ correspond à la puissance relative et est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$rp = \frac{IC_{50monovalent}}{IC_{50multivalent}}$$

Dans ce manuscrit, nous parlerons d'effet multivalent si le rapport rp ou β divisé par la valence (n) de l'objet multivalent est supérieur à 1.

$$\frac{\beta}{n} \text{ ou } \frac{rp}{n} > 1 : \text{ effet multivalent}$$

II.1.1.2. EXEMPLE DE L'APPLICATION DE LA MULTIVALENCE ET DE L'EFFET MULTIVALENT SUR DES ANHYDRASES CARBONIQUES HUMAINES

Depuis sa mise en évidence en 1995, la multivalence a trouvé des applications dans de nombreux domaines comme l'imagerie médicale, la chimie supramoléculaire, ou encore la chimie médicinale.^{155,156} En particulier, la conception d'objets multivalents présentant un effet multivalent suscite l'intérêt des chercheurs dans le but de développer des outils thérapeutiques innovants.

En effet, il a été montré que la multivalence peut permettre non seulement d'augmenter l'affinité du composé pour sa cible mais également sa sélectivité. Cela a été notamment démontré par les travaux de Carta *et al.* sur les isoformes d'anhydrases carboniques humaines (*hCA*). Ces isoformes se distinguent en fonction de leur activité catalytique et de leur localisation dans la cellule et les tissus.¹⁵⁷ Ces protéines appartenant à la famille des lyases sont d'intérêt pharmacologique dans le développement d'anticonvulsifs, d'antidiurétiques ou encore d'anticancéreux.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Carta *et al.* ont synthétisé des objets multivalents, constitués d'inhibiteurs de *hCA* greffés sur des dendrimères PAMAM (polyamidoamine) de générations différentes (Figure 25 et Annexe 1).¹⁶⁰

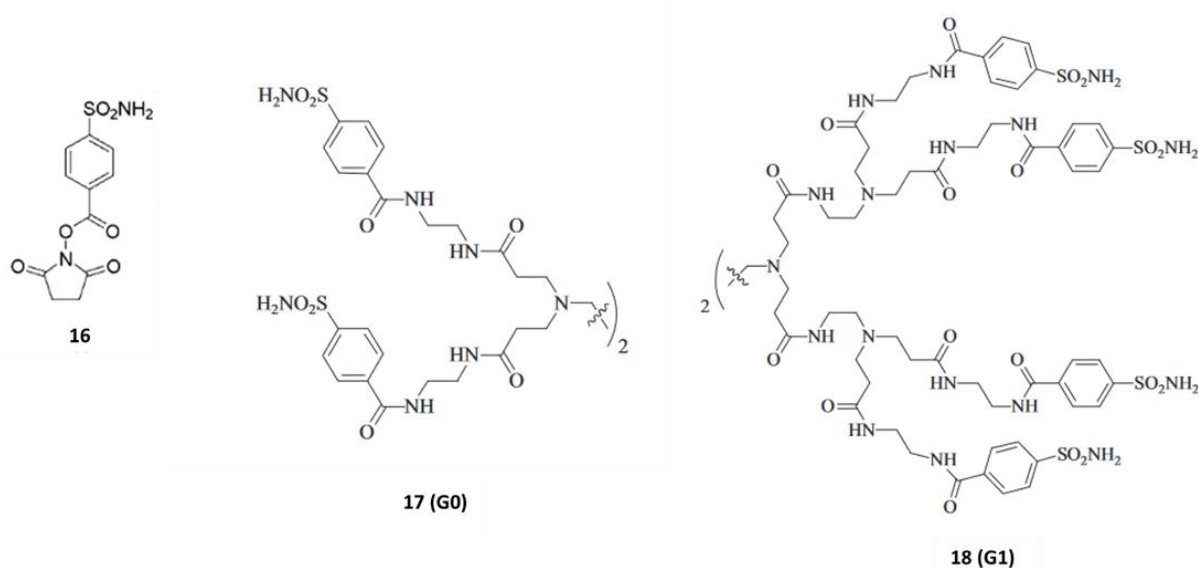


Figure 25 : Structure chimique des inhibiteurs **16** à **18** d'*hCA* ¹⁶⁰

L'évaluation des constantes d'inhibition (K_i) de ces composés a mis en évidence des gains d'affinité élevés pour les objets multivalents **17**, **18**, **19** et **20** par rapport à la référence monovalente **16**, passant ainsi d'une capacité inhibitrice de l'ordre du μM à nM voire pM. Des effets multivalents (rp/n) allant jusqu'à 285,7 ont pu être observés (Tableau 2). Par ailleurs, l'effet multivalent augmente de manière valence dépendante pour les isoformes *hCA* II et *hCA* XII, passant respectivement de 10,4 et 9,3 pour le composé **17** à 285,7 et 197,9 pour le composé **20**.

Composé	Valence	K_i hCA I (nM)	K_i hCA II (nM)	K_i hCA XII (nM)
16	1	7800	640	380
17 (G0)	4	24,1	10,4	9,3
<i>rp/n*</i>		80,9	15,3	10,2
18 (G1)	8	12	3,1	1,1
<i>rp/n*</i>		81,2	25,8	43,1
19 (G2)	16	10,8	0,93	0,94
<i>rp/n*</i>		45,1	43	25,3
20 (G3)	32	10,5	0,07	0,06
<i>rp/n*</i>		23,2	285,7	197,9

*méthode détaillée partie II.1.1.1.

Tableau 2 : Constantes d'inhibitions (K_i) et des effets multivalents (rp/n)¹⁶⁰

Il est intéressant d'observer que pour l'isoforme hCA I, l'effet multivalent n'est pas valence dépendant et diminue pour les composé **19** et **20** de forte valence par rapport au maximum observé avec le composé **18**. Ainsi, la sélectivité pour les isoformes hCA II et XII vis-à-vis d'hCA I a été améliorée. En effet, pour le composé **20**, de plus haute valence, l'indice de sélectivité a été augmenté passant de 12 à 150 pour le couple hCA I / hCA II et de 21 à 175 pour le couple hCA I / hCA XII par rapport à la référence monovalente **16** (Tableau 3).¹⁶⁰

Composé	hCA I / hCA II	hCA I / hCA XII
16	7800-640	7800-380
indice de sélectivité	12	21
20 (G3)	10,5-0,07	10,5-0,06
indice de sélectivité	150	175

Tableau 3 : Constantes d'inhibitions (K_i) et leurs sélectivités (rapport des K_i) par couple d'isoformes hCA¹⁶⁰

Cependant, il ne suffit pas de greffer plusieurs unités d'un même ligand sur une plateforme unique pour en améliorer les propriétés biologiques. Les paramètres structuraux de la plateforme (valence, structure, ...), de l'espaceur (longueur, fonction chimique de greffage, ...) et de l'objet multivalent dans son ensemble (rigidité, poids moléculaire, ...) sont susceptibles de modifier ces propriétés. En effet, en fonction de l'objet multivalent, différents mécanismes de multivalence entrèrent en jeu, certains seront favorisés ou inversement.

II.1.1.3. LES MECANISMES DE LA MULTIVALENCE

Actuellement, plusieurs mécanismes ont été avancés pour rationaliser les effets multivalents observés. Ces mécanismes divergent selon la nature de l'objet et de sa cible. Pour un même ligand multivalent, l'utilisation combinée de plusieurs mécanismes est possible. Par la suite, seuls les mécanismes les plus étayés ou susceptibles d'entrer en jeu dans le cadre de nos travaux seront décrits.

II.1.1.3.1. EFFET CHELATE

L'effet chélate est souvent avancé afin d'expliquer les gains d'affinité remarquables observés (Figure 26). Cet effet est observé lorsque plusieurs entités d'un ligand multivalent se lient à plusieurs sites d'une protéine multimérique. Le gain entropique engendré par la liaison de la première entité permet de faciliter la chélation des autres.¹⁶¹ Lorsque celle-ci est liée, la concentration locale en entité non liée augmente au niveau des autres sites disponibles, permettant ainsi de favoriser la fixation intramoléculaire d'une autre entité.¹⁵⁶

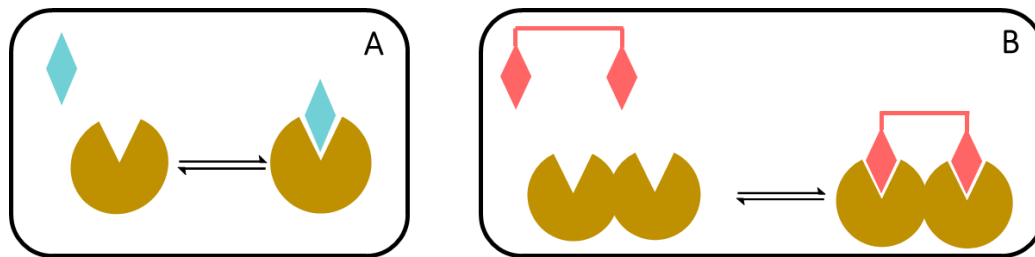


Figure 26 : Mécanisme de l'effet chélate (B) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

II.1.1.3.2. LIAISON A UN SITE SECONDAIRE

Tout comme l'effet chélate, le gain entropique généré par la fixation de la première entité du ligand multivalent va favoriser la fixation de la deuxième sur un site secondaire.¹⁶² Cela conduit à l'amélioration de l'affinité du ligand multivalent pour sa cible (Figure 27). De plus, comme pour l'effet chélate, la concentration locale en entité non liée augmente au niveau des autres sites disponibles après la fixation de celle-ci.¹⁵⁶

Les α -amylases qui catalysent préférentiellement l'hydrolyse de sucres complexes pourraient notamment utiliser ce type de mécanisme. Sa structure tridimensionnelle comprenant de nombreux sous-sites de liaison favorisent cette sélectivité pour les polysaccharides.^{146,147} En effet, une unité sucre possède une faible affinité pour l'enzyme, mais les interactions d'autres unités sucres intramoléculaires avec les sous-sites enzymatiques améliorent grandement l'affinité du polysaccharide.

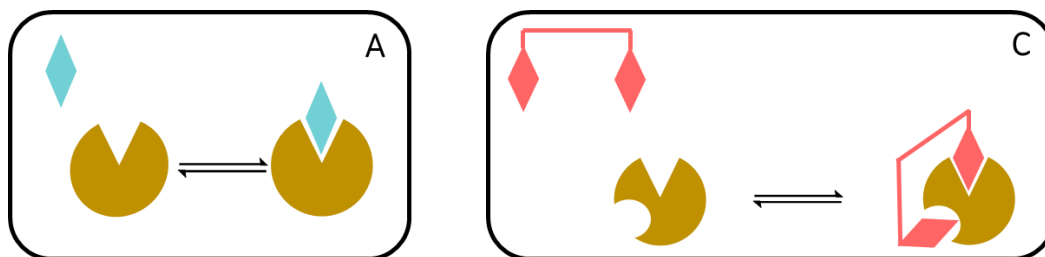


Figure 27 : Mécanisme de la liaison à un site secondaire (C) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

II.1.1.3.3. EFFET DE GLISSEMENT

Lorsque la cible ne possède qu'un seul site de liaison ou lorsque les entités du ligand multivalent n'interagissent qu'avec un seul site de liaison, l'effet de glissement permet d'expliquer l'augmentation de l'affinité du ligand pour sa cible (Figure 28). Si une entité de l'objet multivalent est liée de manière non covalente, alors une autre entité intramoléculaire pourra se lier plus rapidement dès lors que la première entité n'interagira plus. Ce changement de liaison rapide permet d'augmenter le temps d'occupation du site de liaison, expliquant ainsi le gain d'affinité.¹⁶¹ Cet effet est accentué lorsque les entités d'un même ligand multivalent sont proches les unes des autres, car cela augmente la concentration locale en entité non liée autour du site de liaison.¹⁶²

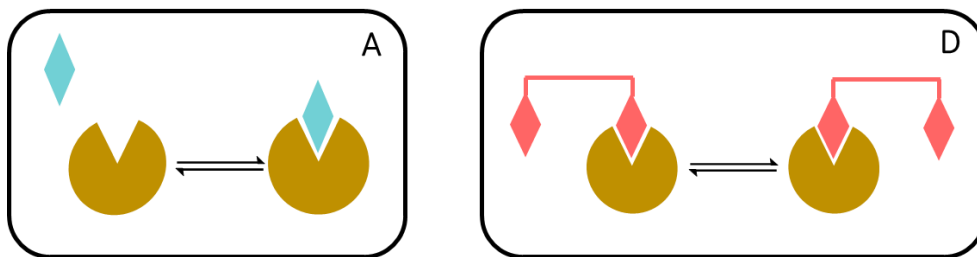


Figure 28 : Mécanisme de l'effet de glissement (D) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

II.1.1.3.4. EFFET DE STABILISATION STERIQUE

Un autre mécanisme peut être rencontré pour les objets multivalents de plus grosse taille, c'est l'effet de stabilisation stérique (Figure 29). Cet effet est causé par la fixation d'une entité encombrée qui gêne stériquement la fixation d'un autre ligand.¹⁶³

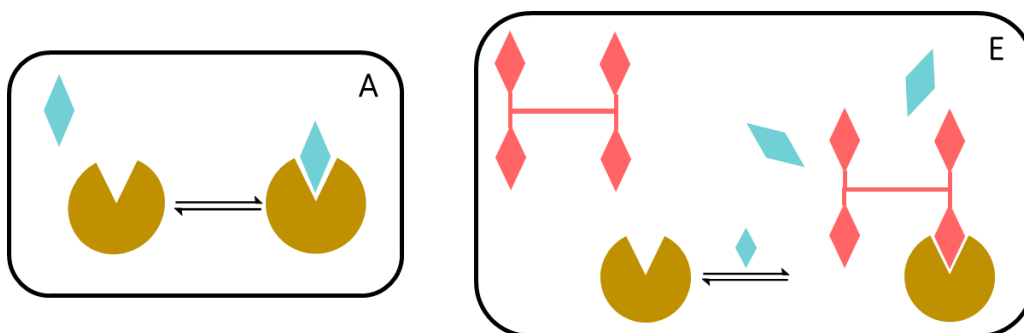


Figure 29 : Mécanisme de l'effet de stabilisation stérique (D) comparé à la liaison simple d'un ligand monovalent (A)

II.2. INHIBITEURS ET CHAPERONS MULTIVALENTS DE GLYCOSIDASES

En 2009, l'équipe de Gouin a montré que l'effet de multivalence peut également s'appliquer à l'inhibition des glycosidases.¹⁶⁴ Depuis, de nombreuses études ont montré que la multivalence peut moduler l'activité inhibitrice de glycosidases d'intérêt. Par ailleurs, nous verrons que certains de ces composés multivalents possèdent aussi une activité chaperon.

II.2.1. INHIBITEURS MULTIVALENTS DE GLYCOSIDASES

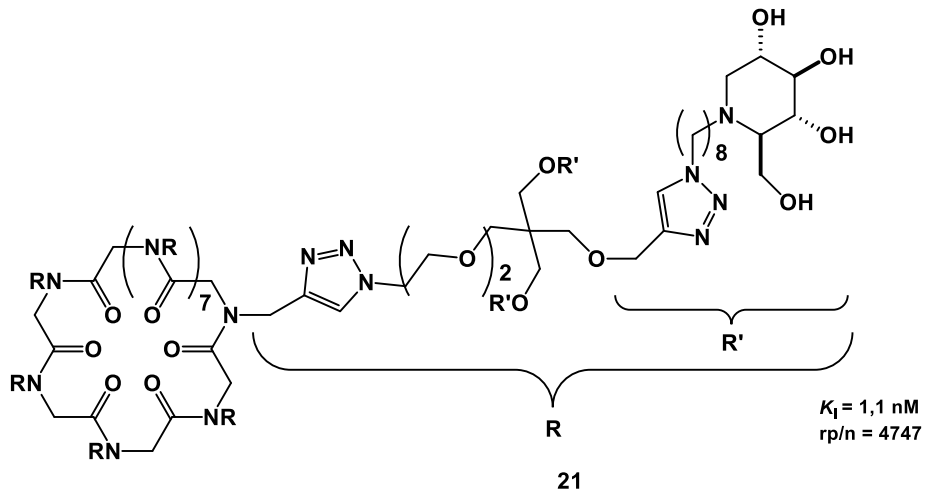
De nombreux composés multivalents inhibiteurs de glycosidases sont répertoriés dans la littérature et certains, avec des effets multivalents élevés. Par la suite, nous énumérerons seulement les effets multivalents sur l'inhibition de quatre types de glycosidases : l' α -mannosidase de Jack-Bean, qui est historiquement l'une des premières enzymes étudiées pour ses effets multivalents, puis la MGAM, la GAA et la GCase impliquées respectivement dans le DT2, la MP et la MG. Pour l'heure aucun composé multivalent ou effet multivalent n'a été répertorié sur l'inhibition d' α -amylases (pancréatique ou salivaire).

II.2.1.1. INHIBITEURS MULTIVALENTS DE L' α -MANNOSIDASE DE JACK BEAN

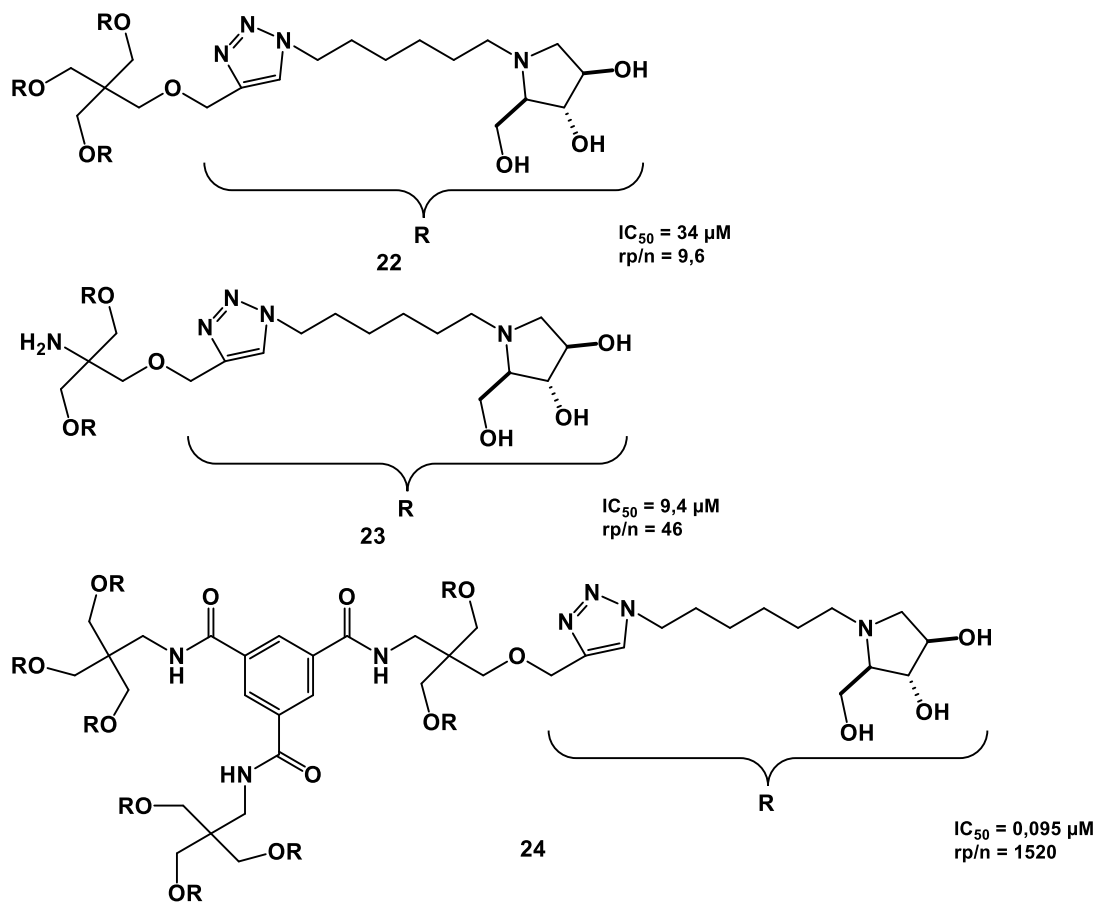
L'activité inhibitrice de ligands multivalents de l' α -mannosidase de Jack Bean (JB α -man) a été largement étudiée. Cette enzyme commerciale et peu coûteuse, est la première enzyme avec laquelle un effet multivalent a été observé en 2009 par Diot *et al.* avec un dérivé de la D-DNJ trivalent et un effet multivalent avec un rp/n égale à 2,6.¹⁶⁴

La majorité des objets multivalents sont composés du pharmacophore de la D-DNJ greffé sur des plateformes multivalentes variées comme des dérivés du pentaérythritol,¹⁶⁵ des porphyrines,¹⁶⁶ des cyclodextrines,^{166,167} des fullerènes,¹⁶⁸ des sucres,¹⁶⁶ bambusurils,¹⁶⁹ des pérylènes bisimides,^{170,171} des calixarènes,¹⁷² ou encore des cyclopeptides.¹⁷³

Cette glycosidase est, à ce jour, la plus sensible à la multivalence, et des effets multivalents remarquables, avec des rp/n allant jusqu'à 4747, ont été rapportés avec le composé **21**, un cyclopeptide 36-valent (Figure 30).¹⁷³

Figure 30 : Structure chimique du composé 21 ¹⁷³

D'autres pharmacophores que celui de la D-DNJ ont également été utilisés. Par exemple, en 2017, Mirabella *et al.* ont mis en évidence des effets multivalents pouvant atteindre 1520 pour des objets de valence 4, 3 et 9 (composé **22-24**), avec le pharmacophore du DAB, qui a été greffé sur des plateformes multivalentes de type pentaérythritol ou benzamides (Figure 31).¹

Figure 31 : Structure chimique des composés 22, 23, 24 ¹

D'autres travaux menés par Della Sala *et al.* avec des DAB greffés sur des plateformes resorcinarene de valence 8 (**25**) et 12 (**26**), ont montré des effets multivalents plus modestes sur $J\beta\alpha$ -man, allant jusqu'à 90 (Figure 32).¹⁷⁴

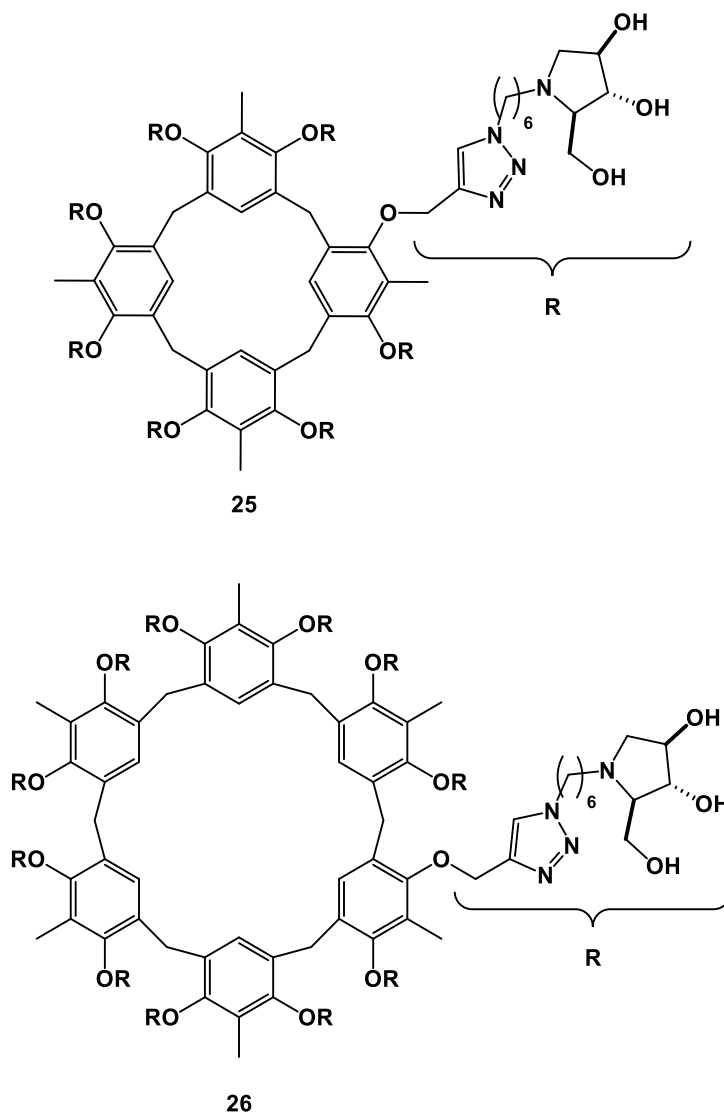


Figure 32 : Structure chimique du composé **25** et **26**¹⁷⁴

Récemment, des objets multivalents originaux développés par Li *et al.* ont été obtenus par auto-assemblage.¹⁷⁰ Ces objets multivalents, comme le composé **27**, s'auto-assemblent par des interactions π - π entre leurs plateformes de type pérylène bisimide (Figure 33). A l'extrémité de chaque plateforme ont été greffés des dérivés D-DNJ par CuAAC « Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition » (Figure 33).¹⁷⁰

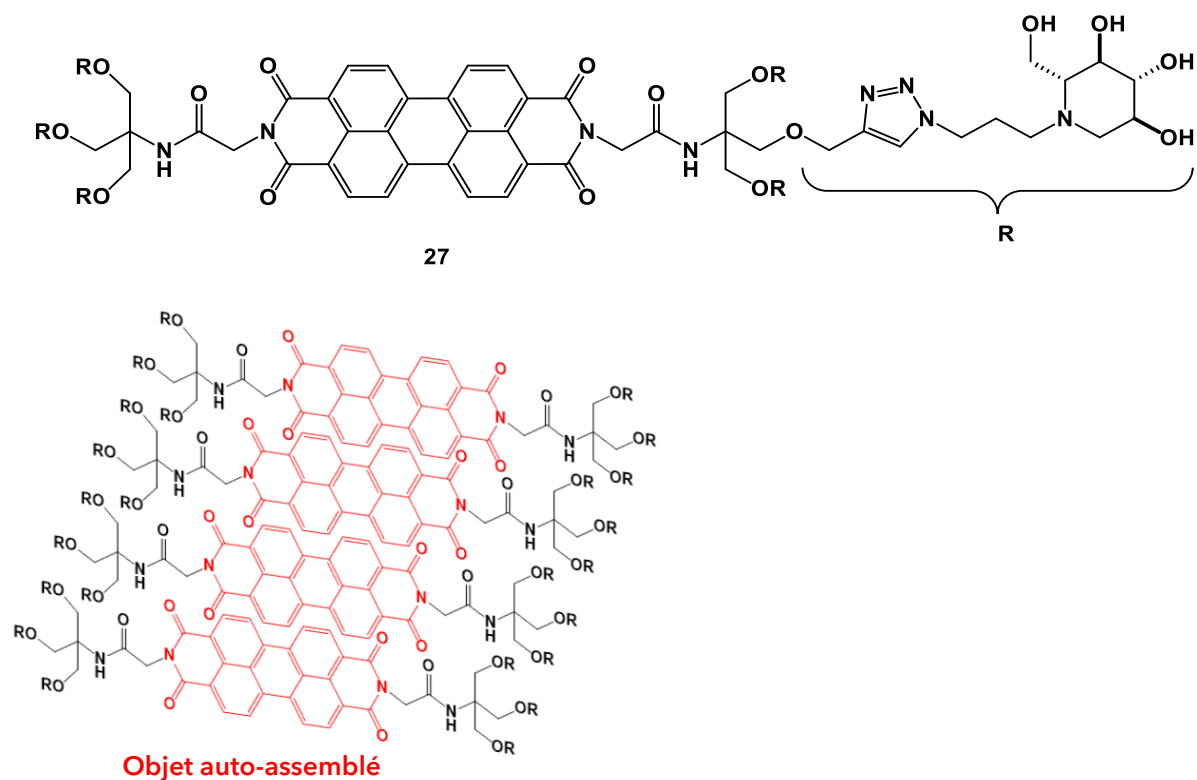


Figure 33 : Structure du composé **27** et de sa forme auto-assemblée ¹⁷⁰

Une autre étude menée par la même équipe a rapporté pour la première fois une structure multivalente entièrement constitué d'objet monovalent **28** lié non covalamment présentant un effet multivalent sur la JBa-man (Figure 34). Le ligand, un dérivé D-DNJ greffé à une chaîne grasse modifiée, adopte une forme micellaire de taille variable en fonction du pH. Cet objet a montré une forte activité inhibitrice, avec un effet multivalent de 684.¹⁷⁵ A notre connaissance, c'est l'unique structure multivalente non covalente présentant un effet multivalent sur cette enzyme.

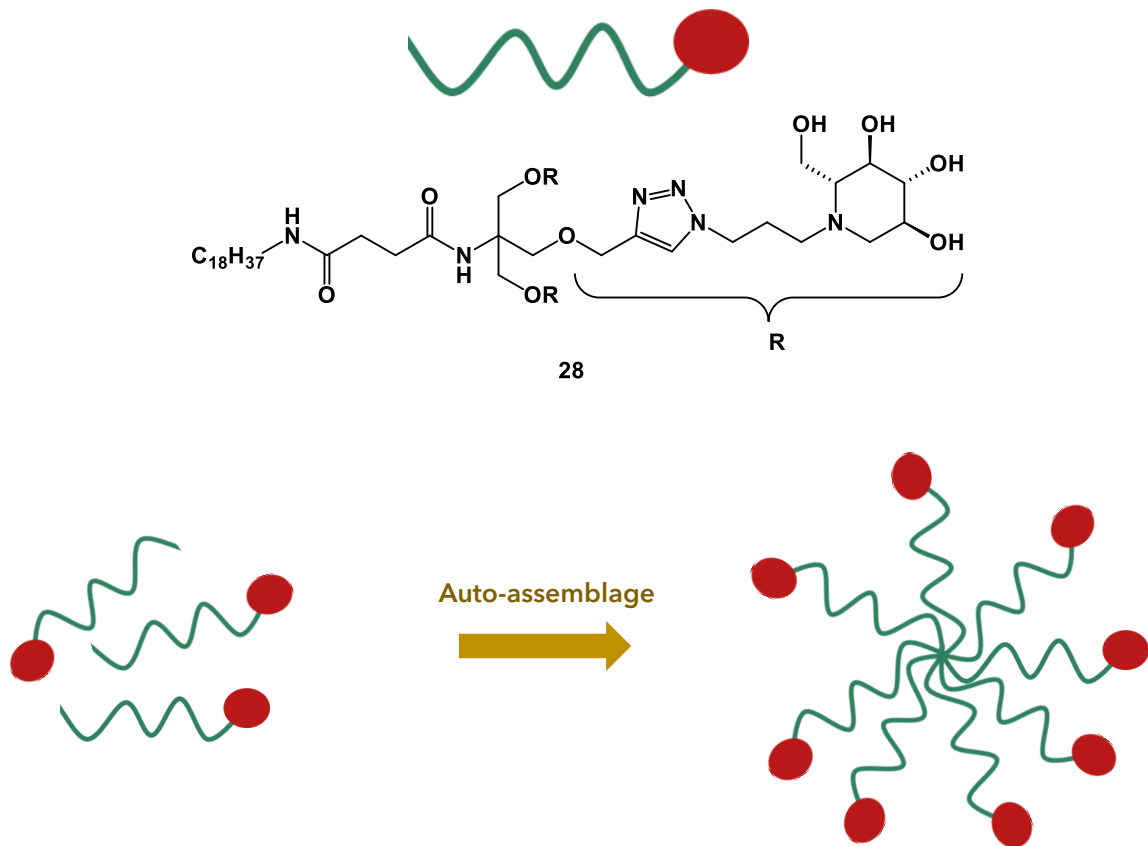


Figure 34 : Structure chimique du composé **28** et de sa forme auto-assemblée micellaire ¹⁷⁵

A noter que de nombreux composés testés sur la J β -man conduisent à des effets multivalents élevés. Cependant, il peut être observé que lorsque certains de ces composés sont testés sur l' α -mannosidase lysosomale, une α -mannosidase d'intérêt thérapeutique, ces effets multivalents diminuent fortement passant de 9,6-46 à 1,6-3,5 pour les composés **22** et **23** (Figure 35).¹ Cette enzyme est peut-être moins sensible à la multivalence.

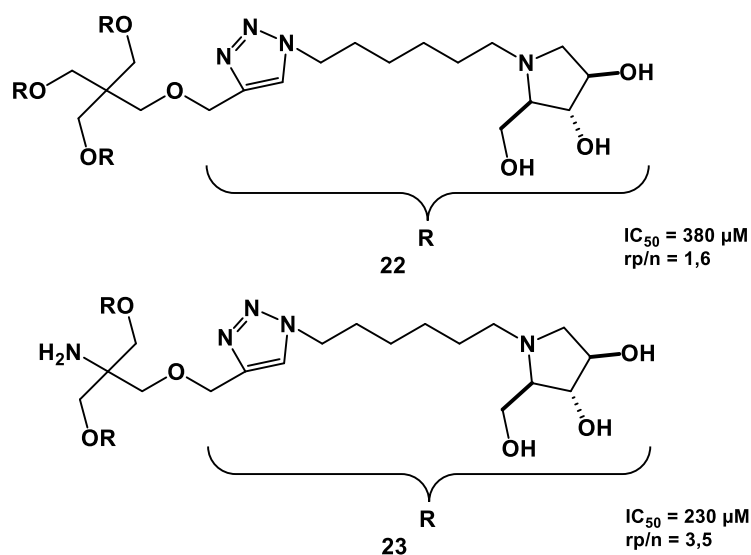


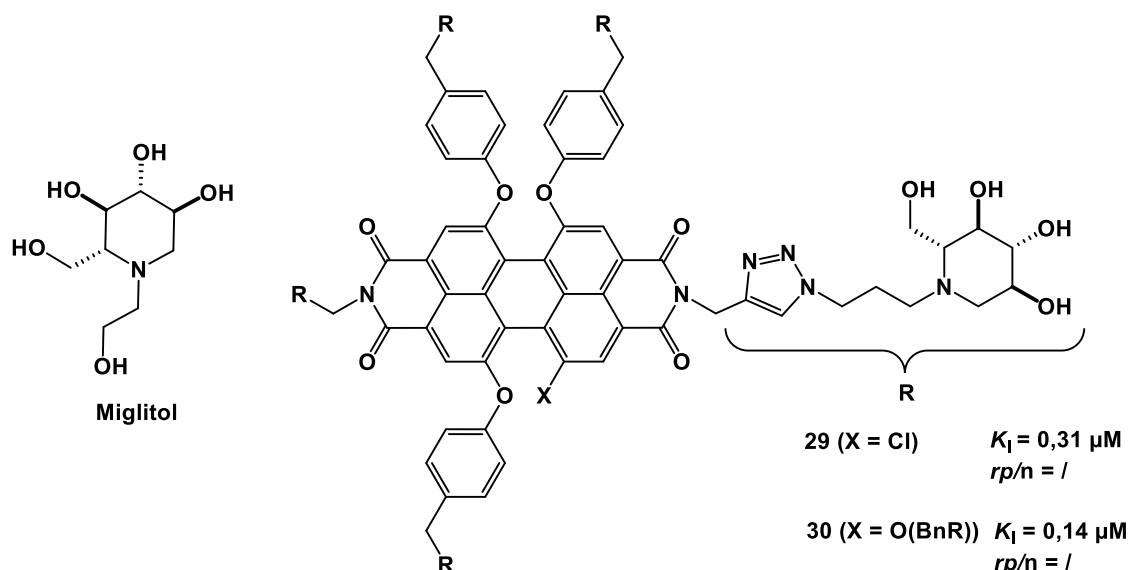
Figure 35 : Structure chimique du composé **22** et **23** et valeurs d' IC_{50} (évaluées sur l' α -mannosidase lysosomale)¹

II.2.1.2. INHIBITEURS MULTIVALENTS DE LA MGAM

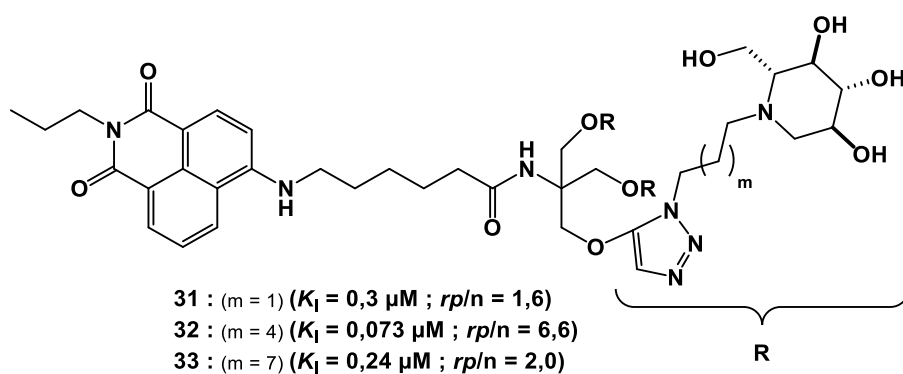
Un grand nombre de composés multivalents a été testé sur diverses α -glucosidases de végétaux ou de microorganisme comme l' α -glucosidase de riz (*EC.3.2.1.20*) ou l' α -glucosidase de *S.cerevisiae* (*EC.3.2.1.20*).^{165,176-179} Cependant, très peu de ces composés ont été testés sur les α -glucosidases d'intérêt thérapeutique que sont la GAA humaine ou la MGAM de mammifère. Ceci s'explique par la difficulté d'accessibilité de ces enzymes, peu voire non commercialisées, et de leurs coûts élevés. Cependant quelques exemples d'objets multivalents sont retrouvés évalués sur la MGAM de mammifère que nous détaillerons ici, et la GAA humaine (détaillé partie II.2.1.3.).

Deux études réalisées par la même équipe, ont évalué la capacité inhibitrice de composés multivalents, avec le pharmacophore D-DNJ, sur la MGAM de souris, dans le but de développer des hypoglycémiantes contre le DT2.^{165,171}

Une première étude présentait deux objets multivalents de valence 5 (**29**) et 6 (**30**) sur une plateforme de type pérylène bisimide capable d'autoassemblage grâce à des interactions π - π entre les groupements aromatiques de chaque plateforme (Figure 36).¹⁷¹ L' IC_{50} de ces deux objets a été évaluée et estimée à 310 et 140 nM pour le composé **29** et **30** respectivement. Aucun effet multivalent n'a pu être déterminé car le miglitol, choisi comme référence, n'est pas inhibiteur de cette enzyme même à 1 mM. En revanche l'effet hypoglycémiant, sur la glycémie postprandiale de ces trois composés a été évalué *in vivo* (souris). Le composé **30** a présenté un effet hypoglycémiant plus important pour toutes les doses et à tous les temps de mesure par rapport au composé **29**. Le composé **30** s'est révélé être 2,1 fois plus puissant que la référence miglitol aux 2 temps de mesures analysés.¹⁷¹ Ceci ne permet cependant pas de mettre en évidence un effet multivalent

Figure 36 : Structure chimique des composés miglitol, 29 et 30¹⁷¹

La seconde étude présente des objets trivalents de dérivés D-DNJ greffés via un espaceur à un coeur naphthalimide, qui s'auto-assemble sous forme de nanoparticule sphérique (Figure 37).¹⁶⁵ La capacité inhibitrice de ces composés a été évaluée vis-à-vis de la MGAM de souris et des IC_{50} de 300, 73 et 240 nM ont été déterminées pour les composés **31**, **32** et **33** respectivement. Les composés **31**, **32** et **33** présentent tous un effet multivalent de 1,6, 6 et 2 respectivement par rapport à la référence miglitol. L'effet hypoglycémiant, sur la glycémie postprandiale du composé **32** a été évalué *in vivo* (souris). Le composé **32** a présenté un effet hypoglycémiant significativement plus important que la référence miglitol aux 3 concentrations analysées.¹⁶⁵

Figure 37 : Structure chimique des composés 31, 32 et 33¹⁶⁵

II.2.1.3. INHIBITEURS MULTIVALENTS DE LA GAA

A ce jour, le seul objet multivalent ayant montré un effet multivalent sur l'inhibition de la GAA a été décrit par Decroocq *et al.*¹⁸⁰ Des dérivés D-DNJ greffés sur des cyclodextrines de valence 7 et 14 se sont révélés être des inhibiteurs remarquables de la GAA avec des IC_{50} de l'ordre de la dizaine de nM

(Figure 38). Parmi eux, seul le composé **35** a montré un effet multivalent modéré de 1,7 avec un IC_{50} de 10 nM. Cet effet multivalent a été déterminé à partir du composé monovalent de référence **39** qui possède une IC_{50} de 120 nM (Figure 38). Parallèlement, les auteurs ont décrit l'impact du bras espaceur, entre le ligand et la plateforme, sur l'activité inhibitrice des objets multivalents. En effet, le passage d'une chaîne alkyle de 5 à 8 chaînons pour les composés **35** et **37** respectivement a fait chuter la valeur d' IC_{50} d'un facteur 11 à 20.¹⁸⁰

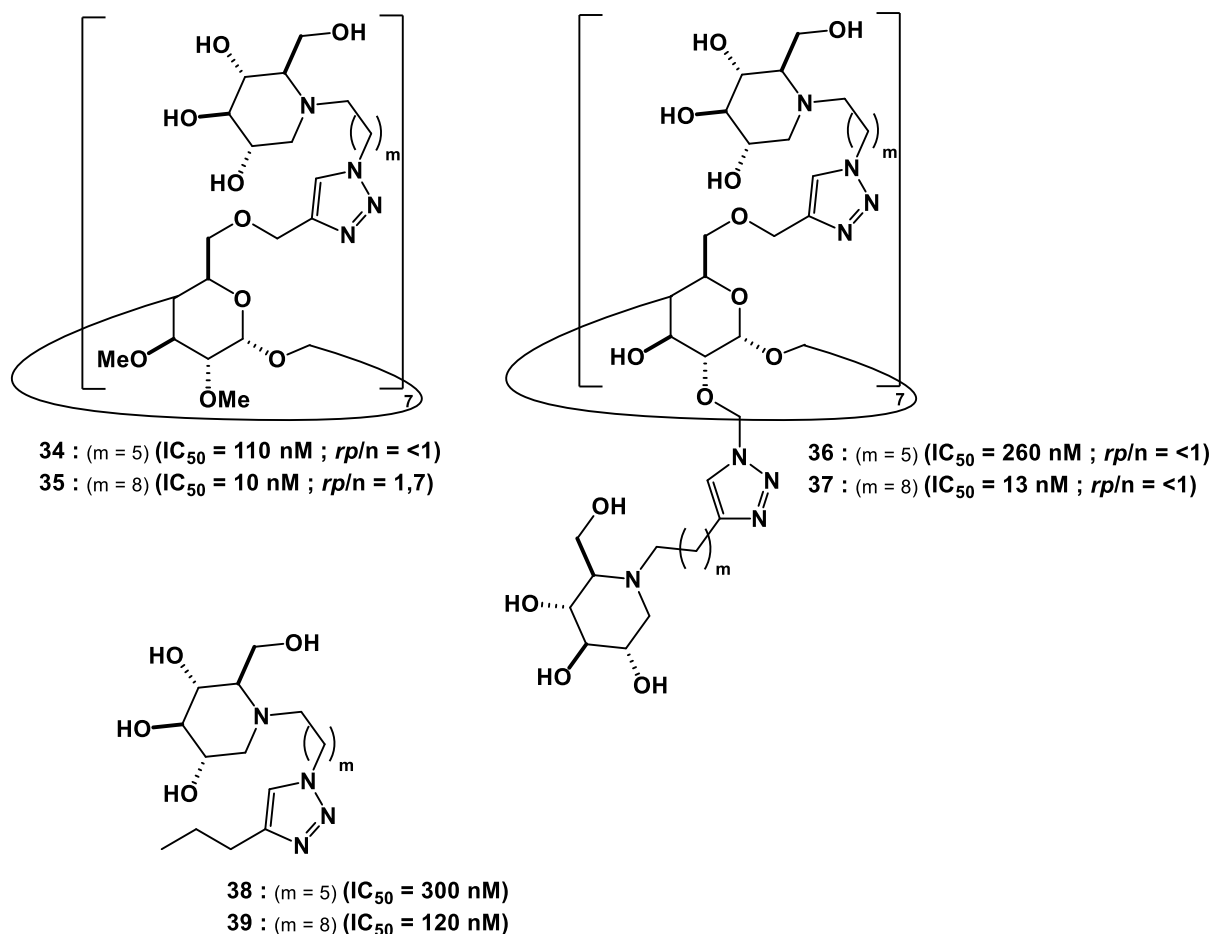


Figure 38 : Structure chimique des composés **34** à **39** et résultats sur la GAA¹⁸⁰

II.2.1.4. EFFET MULTIVALENT SUR L'INHIBITION DE LA GCASE

Peu de composés multivalents inhibiteurs ont été testés sur la GCCase. Parmi eux, certains ont permis l'observation d'un effet multivalent sur l'inhibition de la GCCase. Nous nous limiterons à la description de ces composés qui sont tous des iminosucres ou des analogues d'iminosucre. Deux catégories sont distinguées : les pipéridines (en particulier les dérivés de la D-DNJ) et les pyrrolidines.

Les composés **34** à **37** décrits comme inhibiteurs multivalents de la GAA ont également été évalués sur la GCCase dans la même étude par Decroocq *et al.* (Figure 39).¹⁸⁰ Seuls les objets heptavalents ont montré, sur une GCCase recombinante, des effets multivalents significatifs sur l'inhibition, respectivement de 7 et 29 pour les composés **34** et **35**. Les IC_{50} associées à ces composés sont de 120

INTRODUCTION GENERALE

et 8 nM respectivement. Par la suite, ces résultats ont été confirmés pour le composé **35** où un effet multivalent moindre, de 2, a été observé sur des GCases humaines placentaires.¹⁸⁰ Ces effets multivalents ont été déterminés à partir de composés monovalents de référence **38** et **39** ayant des IC_{50} respectifs de 5900 et 1600 nM (Figure 39). Cependant et comme décrit plus haut, ces mêmes composés sont également de très bons inhibiteurs de la GAA, avec des IC_{50} similaires de 110 et 10 nM respectivement pour les composés **34** et **35** et sont donc peu sélectifs.

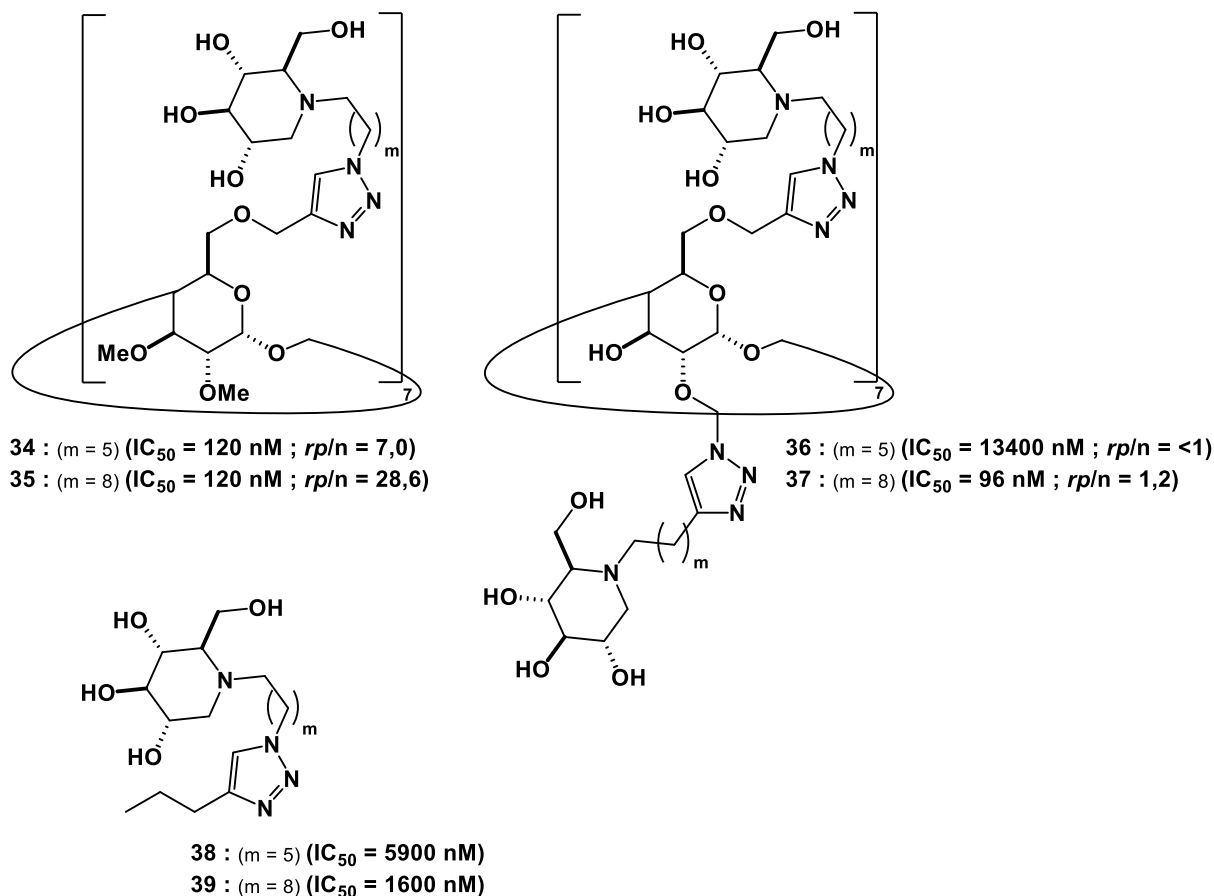


Figure 39 : Structure des objets **34** à **39** et résultats sur la GCase¹⁸⁰

Plus récemment, d'autres pipéridines, cette fois trihydroxylées, ont été greffées sur des diverses plateformes de valence 3, 4 et 6 par Vanni *et al.* (Figure 40). Tous les composés synthétisés se sont révélés inhibiteurs, avec des IC_{50} allant de 6 à 27 μ M et des effets multivalents allant de 6 à 24 ont été observés. Par ailleurs, pour deux objets multivalents, portant le même ligand et de valence identique, les IC_{50} fluctuent modérément en fonction de la plateforme.¹⁸¹

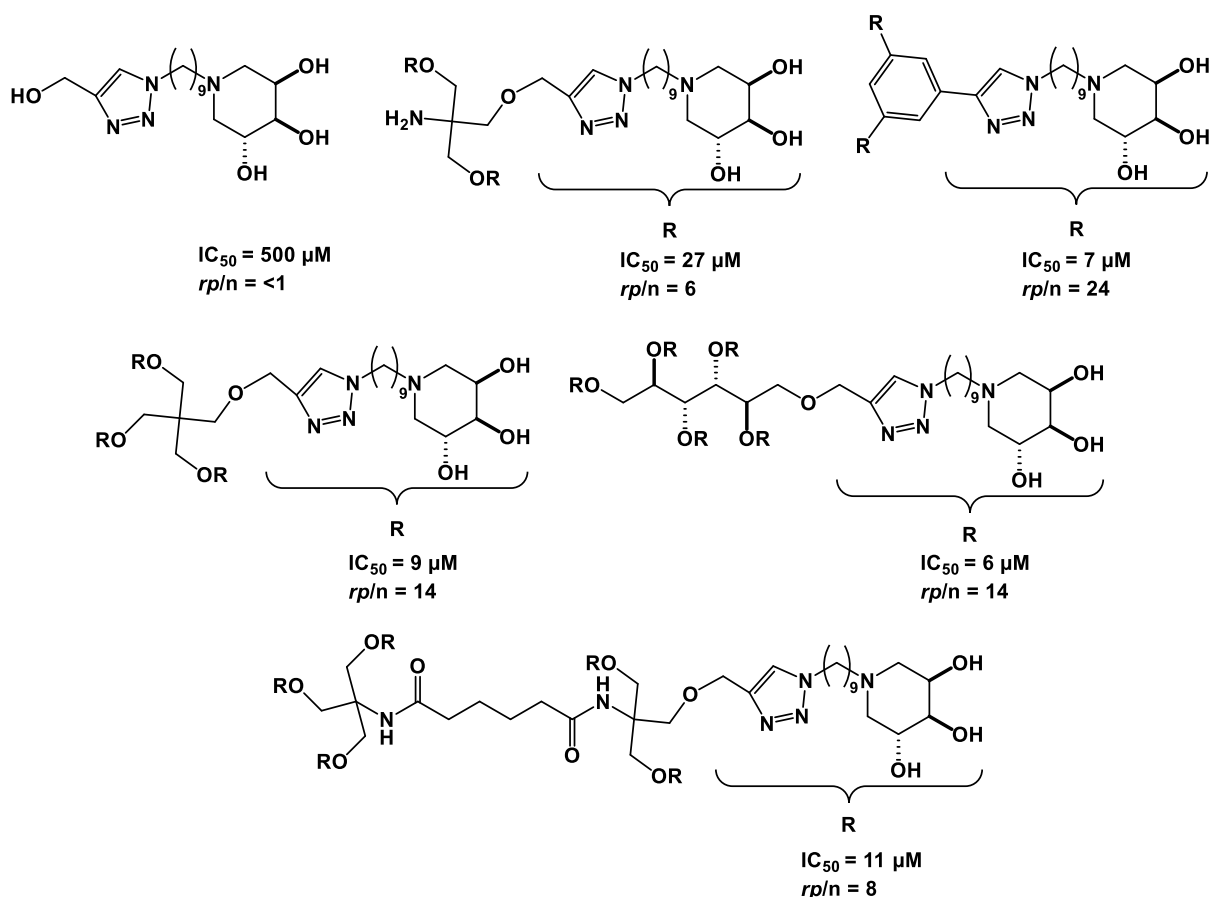


Figure 40 : Structure chimique des composés monovalents et multivalents de dérivé pipéridine ¹⁸⁰

En ce qui concerne les pyrrolidines, deux séries d'objets multivalents ont été développées par Martínez-Bailén *et al.* à partir de pyrrolidines dihydroxylées, greffées sur diverses plateformes de valence allant de 3 à 9 (Figure 41).¹⁸² Ces deux séries diffèrent par la configuration du carbone en alpha de l'azote, 2R ou 2S, et par leurs espaceurs. Les composés issus des deux séries avec les espaceurs de plus petite taille n'ont montré ni inhibition ni effet multivalent. En revanche, des effets multivalents ont été constatés pour les composés possédant l'espaceur le plus long. Pour la série 2S, des K_i allant de 1,1 à 2,7 μM et des effets multivalents allant de 3,4 à 8,6 ont été observés, alors que, pour la série 2R, les K_i s'étendent de 0,77 à 5,4 μM avec des effets multivalents allant de 1,2 à 2,7 (Tableau 4).¹⁸² A noter que, dans ce cas, la configuration du carbone en alpha de l'azote influe peu sur l'activité inhibitrice.

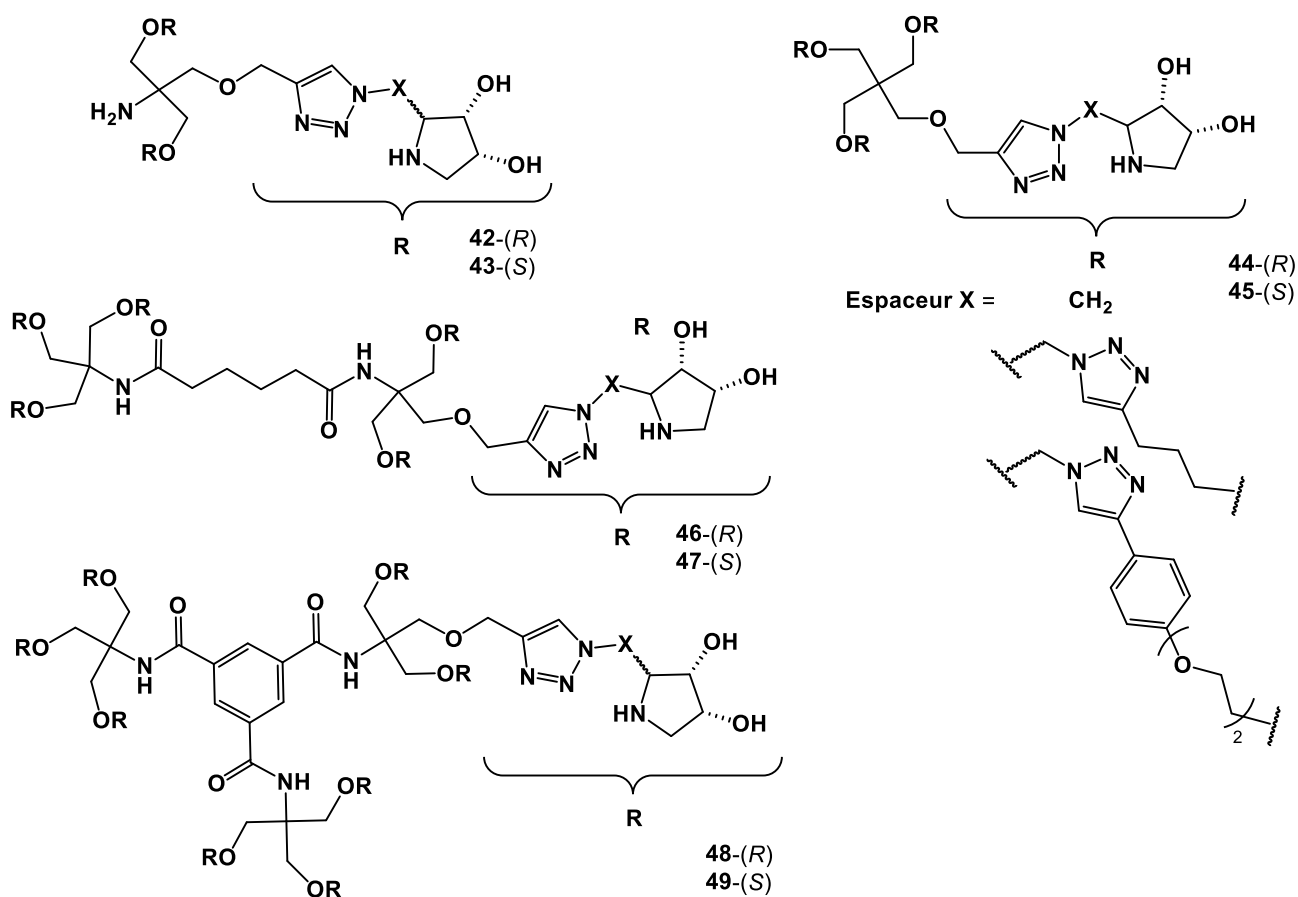


Figure 41 : Structure chimique des composés multivalents 42 à 49 ¹⁸²

Composé 2R	Valence	IC ₅₀ (μM)	rp/n*
ref	1	19	-
42	3	5,4	1,2
44	4	2,6	1,8
46	6	1,2	2,6
48	9	0,77	2,7

Composé 2S	Valence	IC ₅₀ (μM)	rp/n*
ref	1	55	-
43	3	55	<1
45	4	1,6	8,6
47	6	2,7	3,4
49	9	1,1	5,6

*méthode de calcul détaillée partie II.1.1.1.

Tableau 4 : Activité inhibitrice sur la GCase des composés 42-R/S à 49-R/S ¹⁸²

II.2.2. MULTIVALENCE ET EFFET CHAPERON SUR LA GCASE

La conception d'objets multivalents dans le but d'augmenter l'affinité du ligand pour sa cible et améliorer son activité inhibitrice a été largement explorée sur les glycosidases. Cependant, dans le cadre du développement d'un traitement pour la MP ou la MG, on ne souhaite pas inhiber la glycosidase mais au contraire augmenter l'activité enzymatique d'une protéine mutée. Certaines équipes se sont alors demandé si ces inhibiteurs multivalents de glycosidases lysosomales pouvaient également avoir une activité chaperon. Actuellement, aucun CP multivalent n'a été répertorié pour la MP. Par conséquent, seuls les CP multivalents de la GCCase, contre la MG seront présentés ici.

Des objets multivalents avec le pharmacophore D-DNJ greffés sur des plateformes dérivées du pentaérythritol de valence 4 ont été synthétisés par Laigre *et al.*¹⁸³ L'activité chaperon de ces composés a été évaluée sur des fibroblastes de patient atteints de la MG possédant la mutation N370S (Figure 42). Un effet chaperon, dose-dépendant avec un maximum à 1 μ M, a été observé pour tous les composés. Au-delà de cette concentration, l'AR de la GCCase diminue.¹⁸³ Il est intéressant de noter que les composés acétylés **52** et **53** n'ont montré aucune inhibition à 100 μ M contrairement aux composés non acétylés **50** et **51** qui ont des IC_{50} de 500 et 109 nM respectivement. Pour autant, aucune différence significative d'activité chaperon n'est observée entre les composés acétylés ou non acétylés (Figure 42).

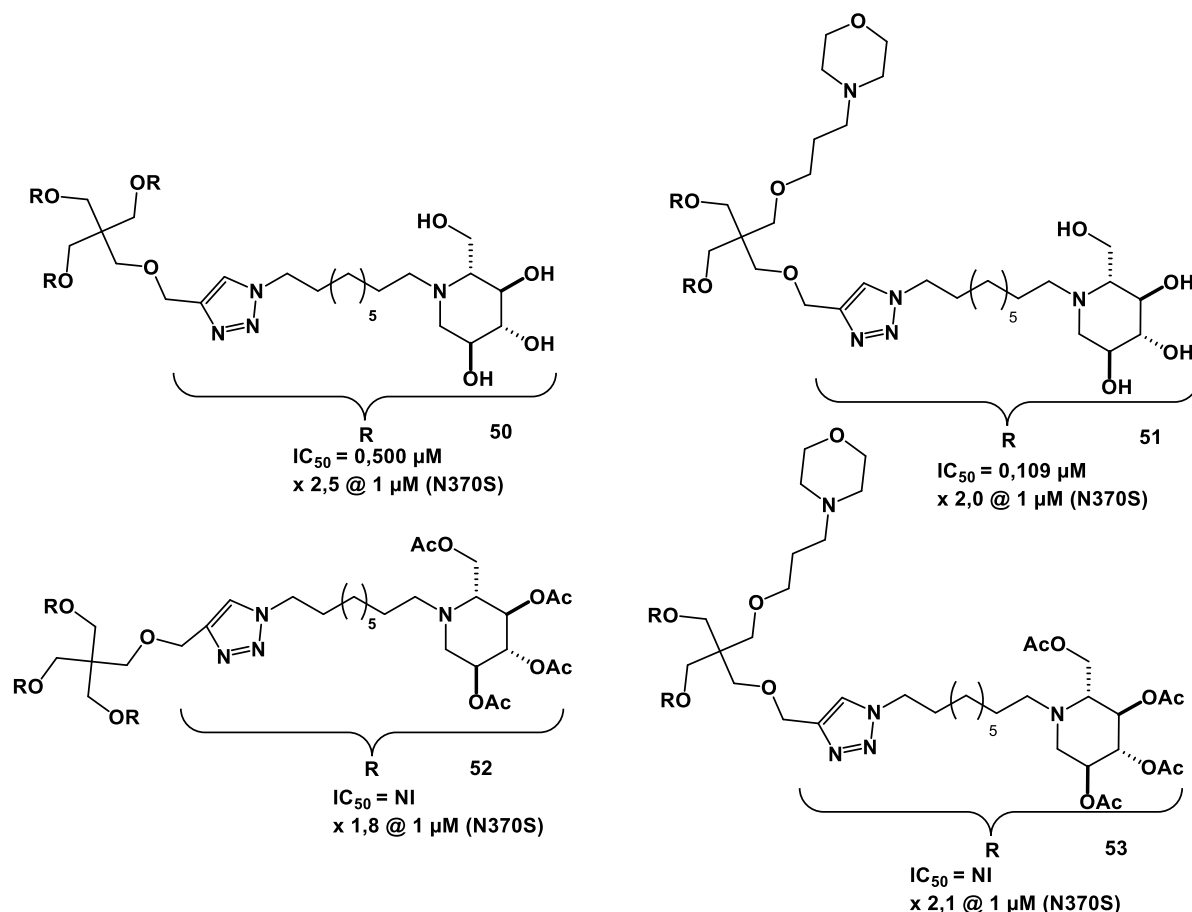


Figure 42 : Structure chimique des composés multivalents **50** à **53**¹⁸³

INTRODUCTION GENERALE

Les composés **34** à **39** qui ont vu leurs activités inhibitrices évaluées envers la GAA et la GCase ont également vu leurs activités chaperons évaluées sur des fibroblastes de patients atteints de la MG portant la mutation N370S. Ces composés ont permis l'augmentation de l'AR de la GCase jusqu'à 2,4 fois l'activité initiale pour le composé heptavalent **35** à 10 μM et 1,6 fois pour le composé tétradécavalent **37** mais à 100 nM (Figure 43). Ses augmentations d'AR sont bien supérieures à celle observée avec le composé **39**, la référence monovalente, qui a montré une augmentation d'un facteur 1,2 à 1 μM .¹⁸⁴ Le composé **35**, a également été étudié sur une lignée de fibroblaste atteints de la MG portant un autre type de mutation, la mutation L444P, une mutation connue pour être non réceptive à la thérapie par CP et associée à la forme neuropathique de la MG.¹¹³ Avec ce composé, aucun gain d'activité sur la GCase n'a été observé.¹⁸⁰

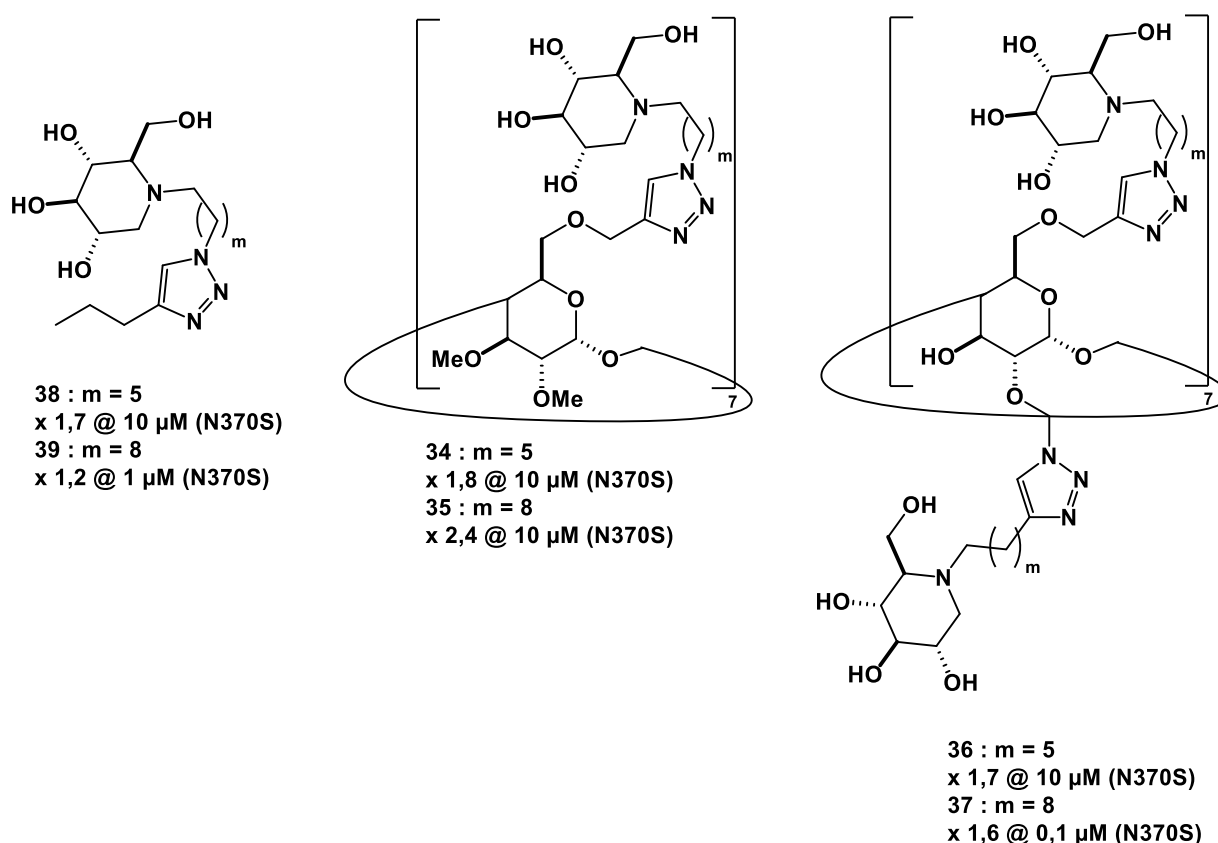


Figure 43 : Structure chimique des composés multivalents **34** à **39**¹⁸⁴

D'autres objets, issus de pipéridines différentes avec les mêmes plateformes que précédemment, ont été synthétisés et testés sur une lignée de fibroblastes de Gaucher (N370S) par Joosten *et al.* (Figure 44). Seul le composé heptavalent **55** a montré une activité chaperon avec un maximum à 2,1 à 1 μM , similaire à son ligand monovalent **54** (2,4) mais à une concentration 10 fois inférieure.¹⁸⁴

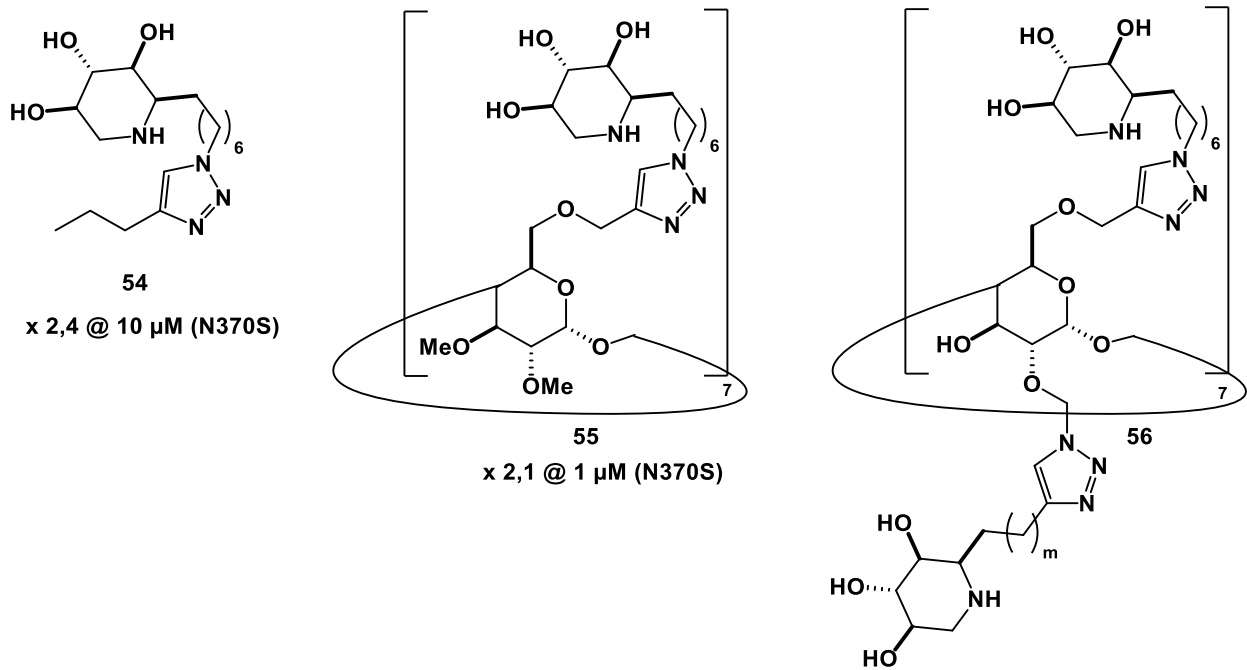


Figure 44 : Structure chimique des composés 54 à 56¹⁸⁴

Vanni *et al.* ont synthétisé des objets multivalents portant des noyaux pipéridines de stéréochimies différentes, greffés sur diverses plateformes de valence 3, 4 et 6 (Figure 45).¹⁸¹ Des essais *in vitro* sur des fibroblastes atteints de la maladie de Gaucher mutés N370S/RecNcil ont été réalisés et des augmentations de l'AR de la GCase d'environ 1,2 ont été observées pour les composés **57**, **58** et **59** à 10, 10 et 50 μ M respectivement. Des essais plus approfondis avec le composé **57** (de 10 nM à 10 μ M) sur des fibroblastes atteints de la maladie de Gaucher portant la mutation L444P/L444P ont été effectués. Les résultats montrent une augmentation de l'AR de la GCase jusqu'à 2,07 à 10 μ M avec un effet dose-dépendant.¹⁸¹

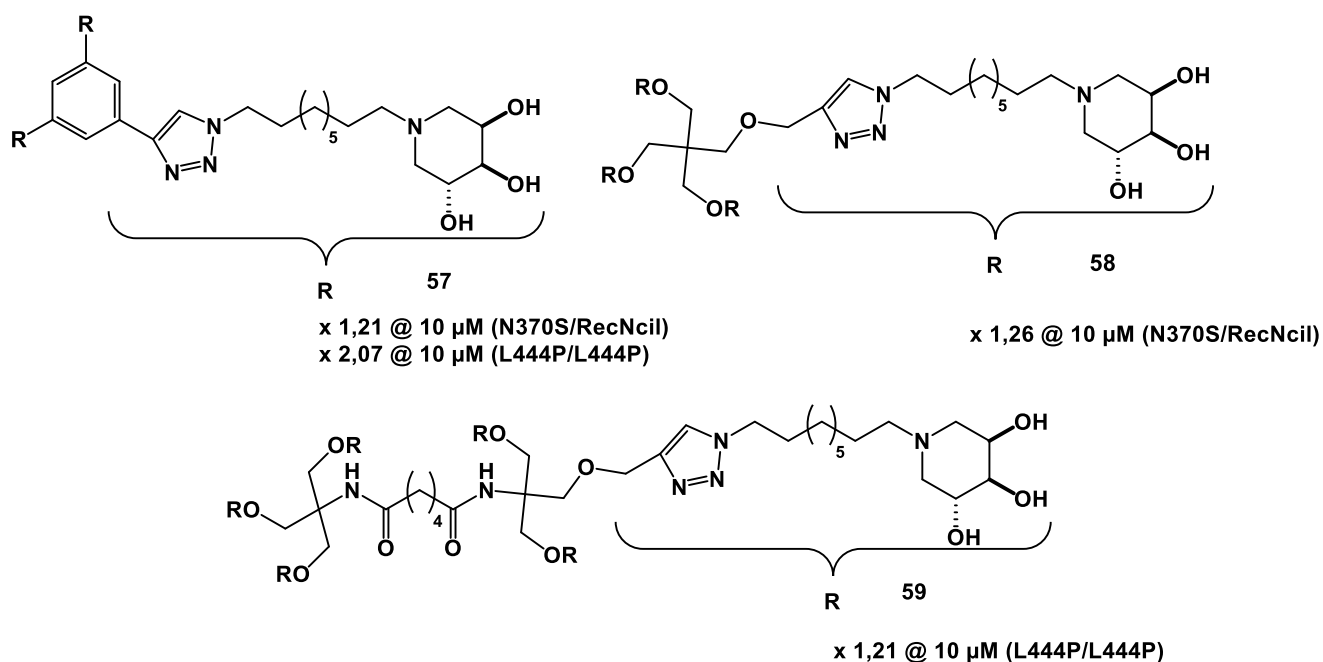


Figure 45 : Structure chimique des composés 57 à 59 ¹⁸¹

II.3. CONCLUSION

Depuis la mise en évidence de la multivalence en 1995, de nombreux inhibiteurs multivalents de glycosidases ont été rapportés afin d'améliorer l'activité inhibitrice et la sélectivité de ces composés. Des effets multivalents élevés ont été observés pour l'inhibition de certaines glycosidases comme la JB α -man. En revanche, des effets multivalents plus modestes sur l'inhibition sont observés avec les glycosidases lysosomales GAA et GCCase, ainsi que la MGAM de mammifère d'intérêt thérapeutique. De plus, peu d'études ont été réalisées avec ces cibles biologiques.

Néanmoins, l'activité chaperon n'étant pas forcément corrélable avec l'activité inhibitrice, l'utilisation de la multivalence dans ce cadre reste à explorer. En ce qui concerne la MG, quelques chaperons multivalents ont été publiés et ont montré des gains d'AR parfois bien supérieures à leur référence monovalente. De plus, la concentration nécessaire afin d'observer cet effet chaperon est parfois plus faible comparativement à leur référence monovalente. En revanche pour la MP aucun chaperon multivalent n'a été rapporté à ce jour.

Ces résultats préliminaires nous encouragent à développer de nouveaux composés multivalents afin d'obtenir de nouveaux CP. Notamment pour la MP où la preuve de concept de l'efficacité de chaperons multivalents afin de restaurer l'activité catalytique de la GAA reste à faire.

NOTRE APPROCHE

I. PROBLEMATIQUE

Actuellement, il n'existe aucun traitement disponible sur le marché pour la MP autre que la TRE. Ce type de thérapie présente de nombreux inconvénients comme son immunogénicité, son efficacité qui varie en fonction des patients, son absence d'efficacité sur les symptômes neurologiques, son coût élevé, etc. En ce qui concerne la MG, en plus de la TRE, deux traitements par réduction de substrat, Le Zavesca® (miglustat) et le Cerdelga® (éliglustat), sont disponibles. Ils entraînent, eux-aussi, des effets secondaires, sont phénotypiques, et ne permettent pas le traitement des symptômes neurologiques. Il est donc essentiel de développer de nouvelles voies thérapeutiques pour ces maladies. La thérapie par CP semble être une voie prometteuse pour les MSL, comme le montre l'exemple du Galafold® (migalastat) pour la maladie de Fabry. A ce jour, et malgré des études cliniques en cours, aucun traitement utilisant un CP n'est commercialisé pour la MP et la MG, et aucun CP multivalent n'a été décrit dans la littérature pour la MP. Les seules molécules chaperon décrites pour la MG ou la MP souffrent soit d'un manque de sélectivité soit d'un manque d'efficacité.

Concernant le DT2, l'augmentation de son incidence et du nombre de décès liés à cette maladie rend le développement de traitements d'enjeu public majeur. L'utilisation d'hypoglycémiant pour gérer le taux de glucose dans le sang est pour l'heure le traitement de 1^{ère} intention en mono, bi ou trithérapie. De plus, à terme, la gestion du taux de sucre permettrait de diminuer les maladies cardiovasculaires. Néanmoins, la plupart des hypoglycémiant développés engendre de nombreux effets secondaires limitant leurs exploitations. Parmi ces traitements, les IAG sont une classe de traitement intéressant pour leur efficacité, notamment sur l'hyperglycémie postprandiale. Cependant, ces médicaments sont à ce jour sous utilisés à cause notamment des effets secondaires faibles à modérés sur le tractus gastro-intestinal. Bien que la découverte de nouveaux médicaments antidiabétiques reste un domaine de recherche très actif, aucun nouveau IAG n'a été commercialisé ces 30 dernières années. L'utilisation de la multivalence afin de développer de nouveaux hypoglycémiant multivalents, de type IAG s'avère prometteur. De plus d'autres enzymes telles que les α -amylases (pancréatique et salivaire), sont des cibles thérapeutiques intéressantes dans le développement de nouveaux antidiabétiques. A ce jour, seul le Glucor® (acarbose), utilisé comme IAG, inhibe ces enzymes mais avec une efficacité modérée. Il serait donc intéressant de développer de nouveaux inhibiteurs multivalents de ces enzymes afin de lutter contre le DT2.

II. OBJECTIFS DE LA THESE

Afin de répondre aux différentes problématiques, trois principaux objectifs ont été définis.

Premièrement, nous souhaitons établir la preuve de concept que la multivalence peut être un outil intéressant dans le développement de CP pour la MP. Pour cela, nous développerons des inhibiteurs multivalents de la GAA et quantifierons l'effet multivalent sur l'inhibition de cette enzyme. Pour rappel, un seul inhibiteur montrant un effet multivalent a été décrit sur la GAA par l'équipe du Pr. Compain. L'activité de ces chaperons sera ensuite évaluée sur des fibroblastes de patients atteints de la MP. Parallèlement, nous concevrons des objets multivalents greffés avec le pharmacophore NAC qui

NOTRE APPROCHE

est un chaperon non-inhibiteur de la GAA. Ce CP non inhibiteur est efficace seulement à forte concentration (10 mM). Nous évaluerons si ces objets multivalents induisent un gain d'affinité vis-à-vis de la protéine et nous évaluerons leur activité chaperon sur des fibroblastes de malades. A ce jour, aucun chaperon multivalent inhibiteur ou non pour la GAA n'a été décrit dans la littérature. De même, des objets multivalents issus de L-DNJ, un autre CP non inhibiteur de la GAA, seront synthétisés puis évalués.

Deuxièmement, à la suite de nombreux travaux exploratoires préalablement menés au sein de notre laboratoire, des résultats préliminaires encourageants ont été obtenus avec des dérivés pyrrolidines, analogues d'minosucres, nommés AR88 et *enant*-AR88 sur des cellules de patients atteints de la MG. Ces pyrrolidines sont synthétisées de manière rapide et énantiosélective par une voie originale utilisant des aminoallènes. Des objets multivalents seront donc synthétisés puis évalués en tant qu'inhibiteur et CP sur la GCCase.

Troisièmement, étant donné que les composés synthétisés sont des inhibiteurs potentiels de glycosidases, l'étude de ces composés comme hypoglycémiant pour le DT2 est intéressante. Pour le moment, aucun composé multivalent n'est ni commercialisé ni en phase clinique pour le traitement du DT2. Le but sera alors de déterminer si la multivalence permet de développer de nouveaux objets intéressants pour le développement d'hypoglycémiant contre le DT2. L'évaluation de la capacité inhibitrice et d'éventuels effets multivalents de ces composés vis-à-vis de l' α -amylase et de MGAM sera réalisée.

III. STRATEGIE ENVISAGEE

Afin de parvenir à nos objectifs, des objets multivalents porteurs de ligands connus des enzymes étudiées seront synthétisés. Notre choix c'est porté sur 3 pharmacophores connus issus de la littérature, ainsi que sur l'AR88 et son énantiomère développés au sein de notre laboratoire (*Figure 46 et 47*).

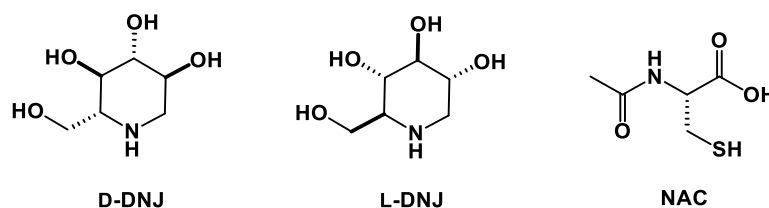


Figure 46 : Structure chimique des trois pharmacophores sélectionnés

Le premier pharmacophore est le D-DNJ, ligand connu des glycosidases qui est couramment utilisé pour développer des inhibiteurs ou des CP pour les enzymes ciblées (*Figure 46*). Il sera donc utilisé à la fois pour synthétiser des objets multivalents inhibiteur et/ou chaperon en fonction de la cible étudiée.

NOTRE APPROCHE

Le second pharmacophore choisi est l'énantiomère de la D-DNJ, la L-DNJ (Figure 46). Ce pharmacophore s'est avéré être un ligand non inhibiteur de la GAA, il sera donc utilisé afin de développer des CP multivalents non-inhibiteurs contre la MP.

Le troisième pharmacophore est la NAC (Figure 46). Cette molécule est un CP allostérique de la GAA à forte concentration. Elle sera utilisée afin de développer des CP multivalents non-inhibiteurs contre la MP.

Les deux derniers pharmacophores choisis sont l'AR88 et son énantiomère (Figure 47). Ces pyrrolidines, dérivés d'iminosucre, synthétisés au sein de notre laboratoire ont montré des activités intéressantes comme inhibiteurs de glycosidases et CP pour la MG. Ces pharmacophores seront modifiés afin premièrement de synthétiser des CP multivalents pour la MG et deuxièmement pour obtenir de nouveaux pharmacophores originaux inhibiteurs de glycosidases et CP monovalent pour la MG.

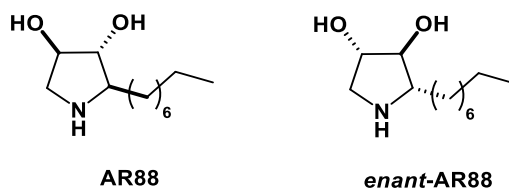


Figure 47 : Structure chimique de l'AR88 et enant-AR88

Afin de pouvoir synthétiser ces objets multivalents, la chimie « click » sera utilisée. Ce type de chimie, décrit pour la première fois en 2001 par Sharpless, qui a été récompensé d'un prix Nobel en 2022, avec C. Bertozzi et M. Meldal, regroupe diverses réactions de synthèse répondant à des caractéristiques précises.¹⁸⁵ Ces caractéristiques sont de hauts rendements avec une économie d'atomes (pas de sous-produit), dans des conditions réactionnelles simples et de manière stéréospécifique. De plus, ces réactions doivent posséder une certaine orthogonalité avec d'autres réactions usuelles de chimie organique. A partir des pharmacophores sélectionnés, des ligands modifiés « clickables » seront synthétisés et liés covalamment par chimie « click » à la plateforme multivalente. La dérivation de ces ligands, si elle est nécessaire, se fera par le biais d'espaces porteurs d'une fonction permettant la réaction de chimie « click ».

Afin de parvenir rapidement à de nombreux objets multivalents, de valences variables, des plateformes issues de pentaérythritol se sont avérées de premier choix en raison de leur facilité d'accès (commerciales et peu coûteuses) ainsi que de leur utilisation récurrente dans la littérature (Figure 48). Un autre type de plateforme à cœur cyclotriphosphazène de valence 6 et 12 sera utilisé. Ces plateformes nous ont été fournies grâce à une collaboration avec le Dr. C.O Turrin (Laboratoire de chimie de coordination, TOULOUSE).

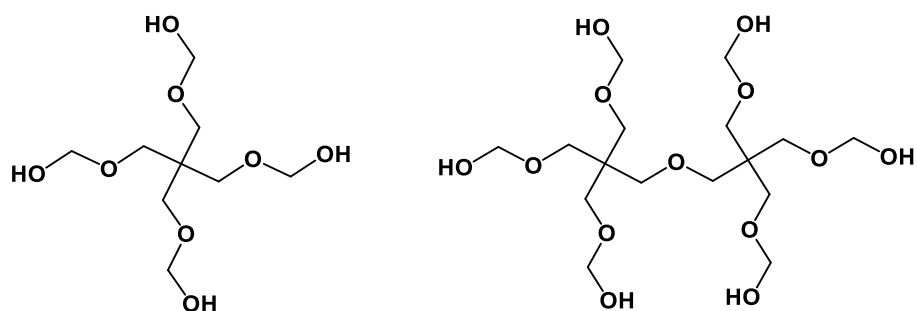


Figure 48 : Structure chimique du penta et dipentaérythritol

Plusieurs réactions de chimie « click » seront donc utilisées dans le cadre de ce travail (CuAAC, SPAAC, thiol-ène (addition de Michael)) (détaillées dans la partie « synthèse de composés multivalents d'intérêt thérapeutique »), en fonction de la nature des fonctions « clickables » engagées (alcyne, cyclooctyne, azoture, thiol, ester acrylique) (Figure 49). Une fonction azoture sera greffée via un bras espaceur sur les dérivés DNJ et dérivés pyrrolidines et des réactions de types CuAAC ou SPAAC seront réalisées via des plateformes portant une fonction alcyne. Des réactions de type thiol-ène (addition de Michael) seront réalisées afin d'obtenir les objets multivalents avec le pharmacophore NAC. Ces réactions pourront être réalisées grâce à la fonction thiol portée par la NAC et l'ester acrylique de la plateforme.

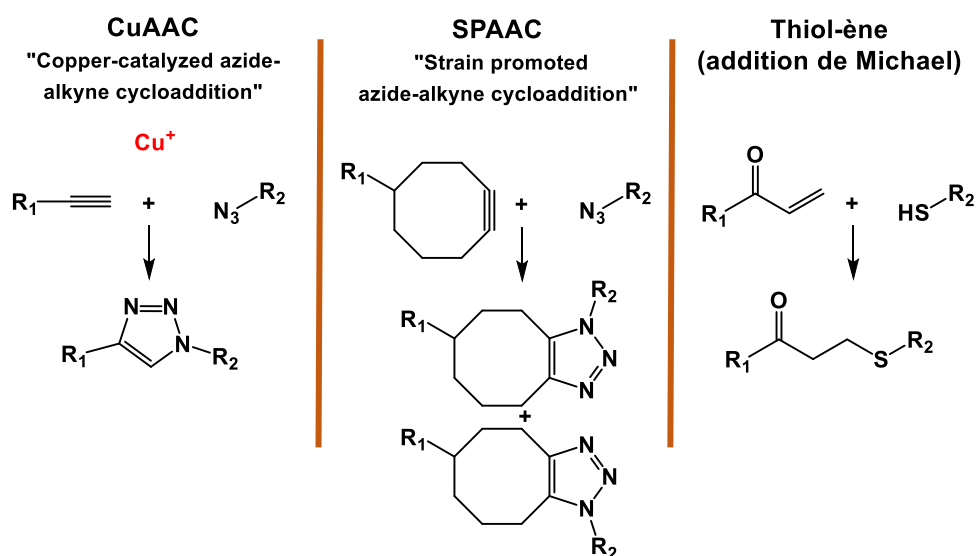


Figure 49 : Réaction de type CuAAC, SPAAC et thiol-ène (addition de Michael)

Une fois les composés synthétisés, l'évaluation de leur capacité inhibitrice sur diverses glycosidases (GCCase pour la MG, GAA pour la MP, MGAM et α -amylase pour le DT2) sera réalisée *via* des tests enzymologiques *in vitro*. Ensuite, l'activité stabilisatrice des composés vis-à-vis de la GAA sera évaluée *in vitro* *via* des tests de dénaturation thermique par DSF (differential scanning fluorimetry) en collaboration avec Dr. Nahoum (Institut de pharmacologie et de biologie structurale, TOULOUSE) au

NOTRE APPROCHE

sein de la plateforme PICT (TOULOUSE). Ces deux études enzymologiques préliminaires nous permettront de déterminer les effets multivalents potentiels. Pour finir, l'évaluation de l'activité CP des composés vis-à-vis de la GAA sera effectuée sur fibroblastes de patients atteint de la MP, en collaboration avec le Pr. T. Levade (Institut fédératif de biologie, TOULOUSE) et le Dr. L. Gibot (Laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique, TOULOUSE).

Les différents résultats expérimentaux obtenus lors de cette thèse seront divisés en deux chapitre. Un premier chapitre portera sur la synthèse des objets monovalents et multivalents ; puis un second sur les évaluations biologiques de ces composés sur les diverses glycosidases cibles.

SYNTHESES DE LIGANDS MULTIVALENTS
D'INTERET THERAPEUTIQUE

Dans cette partie nous décrivons les voies de synthèse qui ont permis d'obtenir les différents composés monovalents et multivalents. Tout d'abord, la synthèse des ligands d'intérêt, porteurs ou non d'un espaceur, sera exposée. Dans un deuxième temps, la préparation des différentes plateformes multivalentes sera décrite. Pour finir, nous détaillerons la synthèse des objets monovalents et multivalents *via* les trois types de chimie « click » (CuAAC, SPAAC, thiol-ène (addition de Michael)) que nous avons utilisés.

I. SYNTHESSES DES LIGANDS

Dans un premier temps, la synthèse de dérivés de la D-DNJ et de son énantiomère, L-DNJ, sera explicitée. Ces dérivés seront porteurs de trois espaceurs différents, qui seront fonctionnalisés en bout de chaîne par un azoture. Puis la synthèse des dérivés de l'AR88 et de son énantiomère sera décrite. Ces composés seront également porteurs d'une fonction azoture à l'extrémité de la chaîne alkyle. Le ligand NAC ne sera pas abordé dans cette partie puisqu'aucune modification chimique ne sera réalisée sur ce composé commercial.

I.1. DERIVES DE LA L ET D-DNJ

Pour commencer, la synthèse de ces iminosucres a été réalisée selon la voie de synthèse décrite initialement par Fernandez-Herrera *et al.*,¹⁸⁶ Hoos *et al.*¹⁸⁷ et Overkleeft *et al.*¹⁸⁸ puis optimisée par Compain *et al.* (Schéma 4).¹⁵⁴

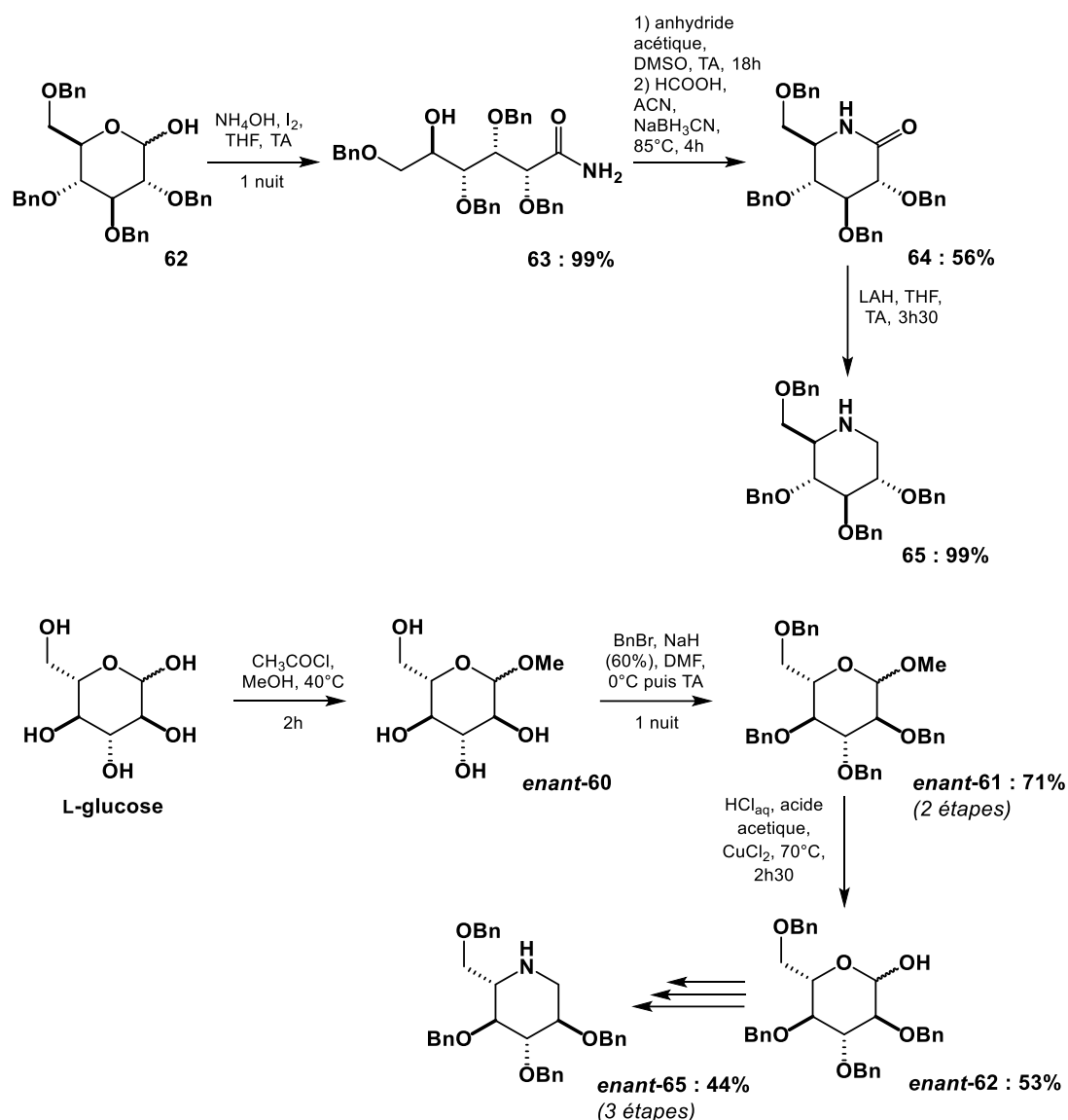


Schéma 4 : Synthèse des intermédiaires tétrabenzylés 65 et enant-65

Premièrement, l'intermédiaire tétrabenzylé de conformation D **65** est obtenu à partir du composé commercial **62**. Une amination oxydante est réalisée sur l'aldéhyde de la forme ouverte du sucre grâce à de l'ammoniaque et du diiode. Puis, une cyclisation du composé **63** est ensuite réalisée *via* deux réactions. La première consiste en une oxydation d'Albright-Goldman de l'alcool secondaire en cétone à l'aide d'anhydride acétique et de DMSO. Cette réaction est suivie d'une amination réductrice en présence d'acide formique et de cyanoborohydrure de sodium conduisant au δ -lactame **64** de façon diastéréosélective. Celui-ci est réduit en présence d'aluminohydrure de lithium afin de former l'intermédiaire **65**. En suivant cette voie de synthèse de 3 étapes, le composé **65** est obtenu avec un rendement global de 55%. Pour la synthèse de l'intermédiaire tétrabenzylé *enant-65* de forme L, il a été réalisé à partir du L-glucose car le composé *enant-62* n'est pas commercial. Une glycosidation de Fischer est réalisée en présence de chlorure d'acétyle et de méthanol afin d'obtenir le produit *enant-60* sélectivement protégé. Puis, une benzylation des 4 fonctions alcools libres, avec le bromure de benzyle et l'hydrure de sodium, permet l'obtention d'un sucre totalement protégé *enant-61*. Le groupement methoxy est ensuite clivé par de l'acide chlorhydrique en présence d'acide acétique et de

chlorure de cuivre (II) afin d'obtenir l'intermédiaire **enant-62**. Le composé **enant-65** est ensuite obtenu en 3 étapes à partir du composé **enant-62** en suivant la même voie de synthèse que le composé **65**. Le composé **enant-65** est obtenu avec un rendement global de **17%** (6 étapes).

Les iminosucres tetrabenzylés obtenus sont ensuite *N*-alkylés avec différents espaceurs selon une méthode décrite par Compain *et al.*¹⁵⁴ Pour cela, 3 espaceurs, **71**, **72** et **73**, tous porteurs d'une fonction azoture, ont été synthétisés (Schéma 5). Les deux espaceurs issus de chaînes alkyles, **72** et **73** de 6 et 11 carbones respectivement, ont été synthétisés en 2 étapes à partir des bromo alcools correspondants (**66** et **67**) avec des rendements respectifs de **80** et **76%**. Lors de la première étape, une substitution nucléophile du brome par l'azoture, en présence d'azoture de sodium, est réalisée. La seconde étape est une tosylation de l'alcool primaire à l'aide de triéthylamine et de chlorure de tosyloyle. Le 3^{ème} espaceur, l'espaceur **71** de type PEG, est obtenu *via* la mono substitution d'une chaîne PEG ditosylée en présence d'azoture de sodium avec un rendement de **53%**.

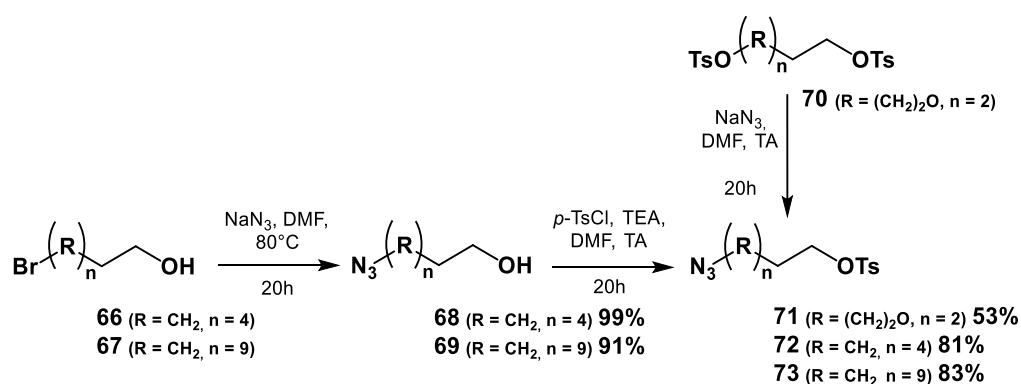
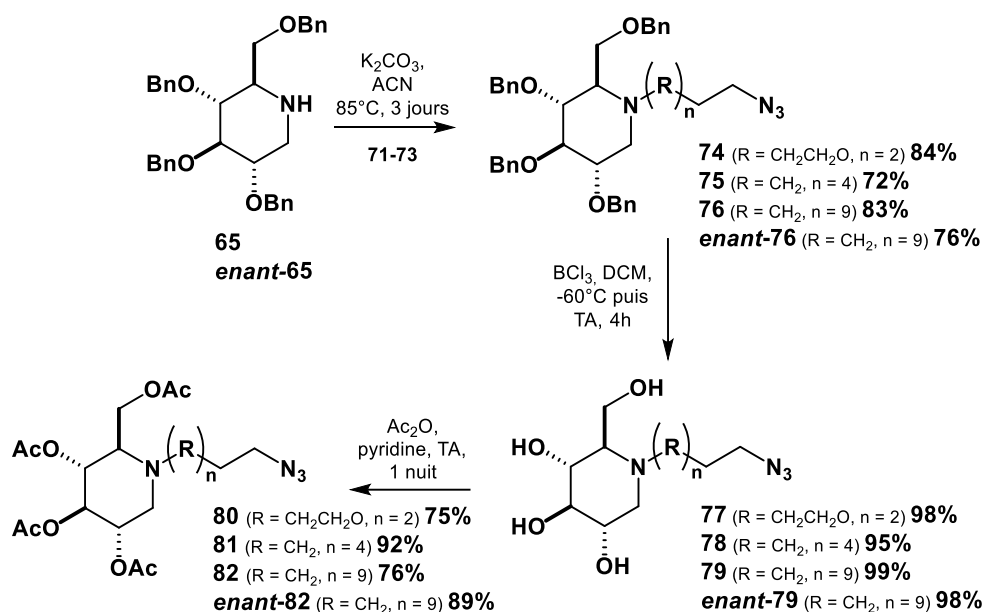


Schéma 5 : Synthèse des espaceurs **71**, **72** et **73**

L'alkylation des dérivés DNJ est ensuite réalisée en présence de carbonate de potassium, suivie d'une déprotection des groupements benzyles avec du trichlorure de bore (Schéma 6). Enfin, une protection des groupements alcools sous la forme d'acétate est réalisée afin de faciliter la purification des produits obtenus après la réaction de « click ». Cette voie de synthèse a permis d'obtenir 3 dérivés D-DNJ, (**80**, **81** et **82**) ainsi qu'un dérivé L-DNJ (**enant-82**), « clickables », avec des rendements respectifs de **62%**, **63%**, **62%** et **66%** (3 étapes) (Schéma 6).

Schéma 6 : Synthèse des analogues « clickables » de DNJ **80**, **81**, **82** et *enant-82* (seul l'énantiomère de forme D est représenté)

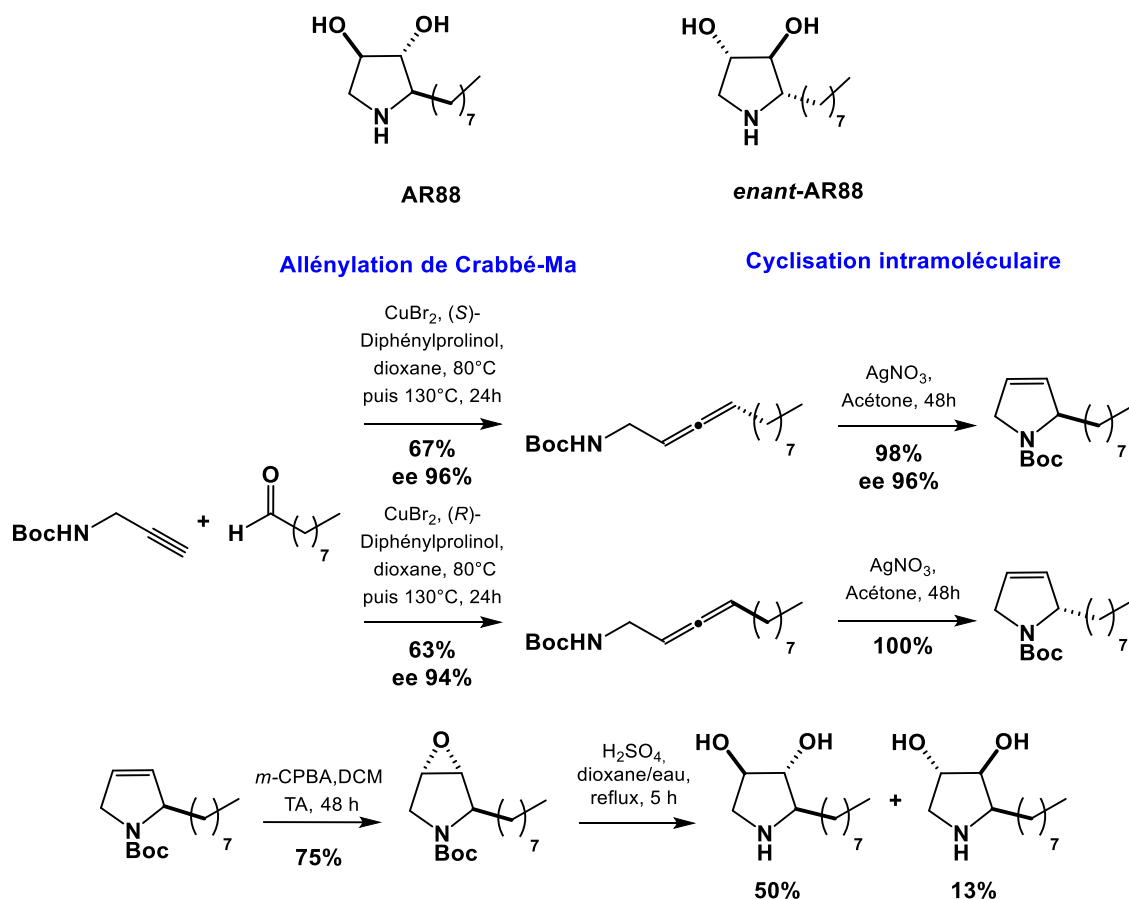
1.2. DERIVES DE L'AR88 ET ENANT-AR88

1.2.1. STRATEGIE DE SYNTHESE

Les composés AR88 et *enant-AR88* sont obtenus à partir de nonanal grâce à une synthèse asymétrique en quatre étapes, décrite et publiée par notre équipe, avec des rendements respectifs de **24** et **28%** (Schéma 7).¹¹⁵

L'originalité de cette voie de synthèse repose sur les deux premières étapes. Premièrement, une allénylation de Crabbé-Ma (détaillé paragraphe 1.2.1.1.) énantiosélective entre un aldéhyde et la propargyle amine protégée par un groupement Boc, en présence de bromure de cuivre (II) comme catalyseur et d'une base chirale qui induit l'énantiosélectivité (excès énantiomérique de 96 et 94%), est réalisée. Cette réaction repose sur les travaux de l'équipe de Ma qui seront détaillés ci-dessous. Elle est suivie d'une cyclisation intramoléculaire avec un transfert total de la chiralité axiale vers la chiralité centrée en présence de nitrate d'argent (I).

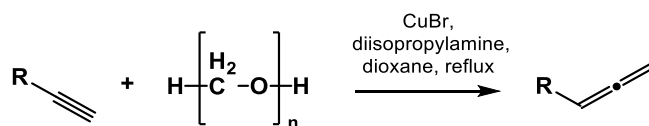
Ensuite, l'intermédiaire pyrrolidine obtenu est époxydé, puis l'ouverture de cet époxyde en milieu acide est réalisée afin d'obtenir le composé AR88 ou *enant-AR88*. Cette dernière étape conduit à la formation d'un diastéréoisomère minoritaire. Par souci de simplification, seule la totalité de la synthèse de l'AR88 est représentée (Schéma 7). La synthèse de *enant-AR88* à partir de la pyrrolidine énantiomère étant identique.


 Schéma 7 : Structure chimique et voie de synthèse de l'AR88 et enant-AR88 ¹¹⁵

Par la suite, nous détaillerons les deux premières étapes de cette synthèse, puis nous expliquerons comment nous avons fait varier les réactifs afin d'obtenir des analogues originaux d'AR88 et *enant-AR88*.

1.2.1.1. ALLENYLATION DE CRABBE-MA

La réaction d'allénylation de Crabbé est décrite pour la première fois en 1979.¹⁸⁹ Elle fait intervenir du paraformaldéhyde et un alcyne terminal afin d'obtenir des allènes terminaux en présence de diisopropylamine et de bromure de cuivre (I) comme acide de Lewis (Schéma 8).


 Schéma 8 : Réaction de Crabbé ¹⁸⁹

Durant ces 15 dernières années, Ma et son équipe ont développé cette réaction et étendu son champ d'application. Ils ont amélioré les rendements de la réaction de Crabbé décrits avec différents alcynes terminaux en modifiant les conditions initialement décrites. Le bromure de cuivre (I) a été remplacé par d'iodure de cuivre (I) et la diisopropylamine par de la dicyclohexylamine et les proportions de chaque acteur de la réaction ont été modifiées.¹⁹⁰ Ils ont ensuite appliqué cette méthode pour former des *N*-allénylamides à partir de propargyle amide avec de bons rendements (Schéma 9).¹⁹¹

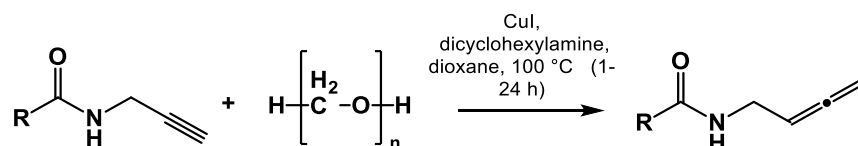


Schéma 9 : Synthèse de *N*-allénylamides selon Ma.¹⁹¹

Ils ont ensuite généré des allènes disubstitués en remplaçant le bromure de cuivre (I) par d'autres catalyseurs métalliques comme l'iodure de zinc (II) ou l'iodure de cuivre (I) (Schéma 10).^{192,193} Les alcynes utilisés étaient généralement alkylés ou hydroxy alkylés alors que les aldéhydes étaient porteurs de phényles, substitués ou non, ou de chaînes alkyles.

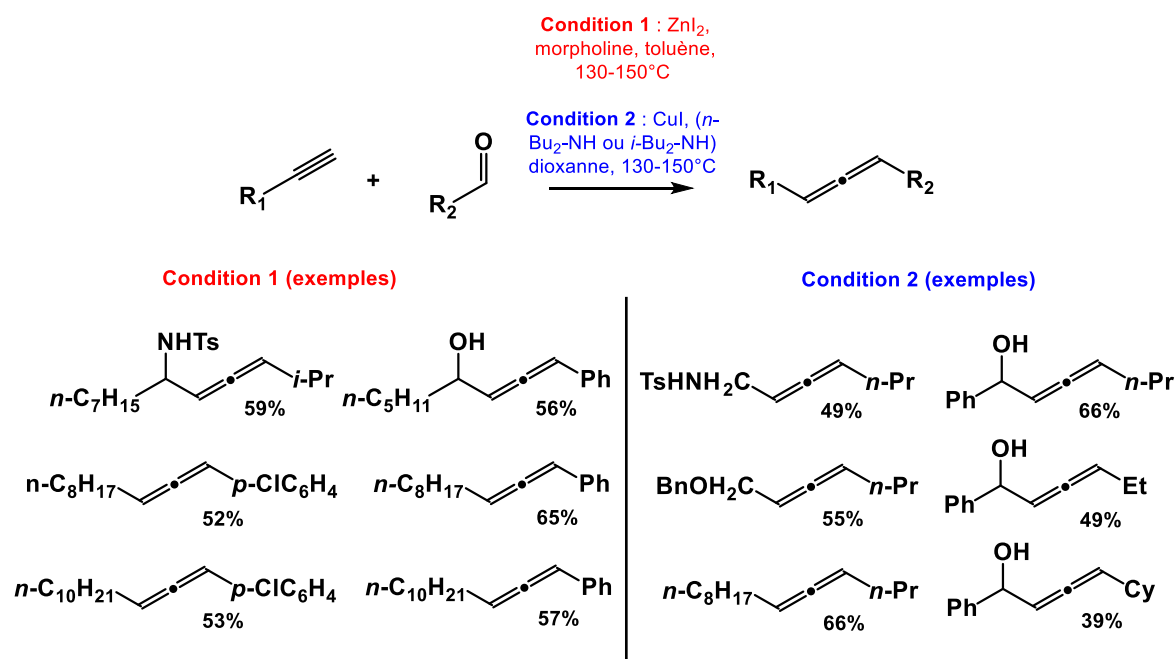


Schéma 10 : Synthèse de différents allènes disubstitués à partir d'aldéhydes selon Ma.^{192,193}

Après cela, ils ont remplacé les aldéhydes par des cétones afin de former des allènes trisubstitués en présence de pyrrolidine et l'iodure de cadmium (II) mais également de mélanges de catalyseurs métalliques comme du bromure de cuivre (I) avec l'iodure de zinc (II) (Schéma 11).^{194,195}

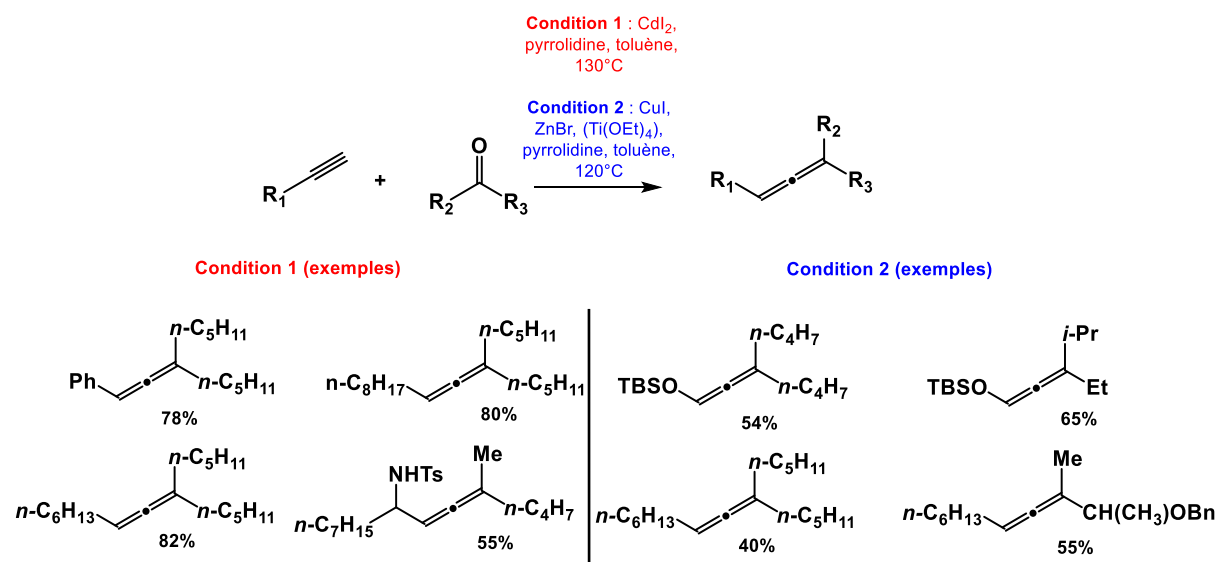


Schéma 11 : Synthèse de différents allènes trisubstitués à partir de cétones selon Ma.^{192,193}

Puis, en 2015, l'équipe de Ma a montré que l'utilisation combinée du dibromure de cuivre (II) comme catalyseur et du diphenylprolinol comme base chirale permettait de générer énantiosélectivement une variété d'allènes et d'aminoallènes protégés (Schéma 12).^{193,196,197}

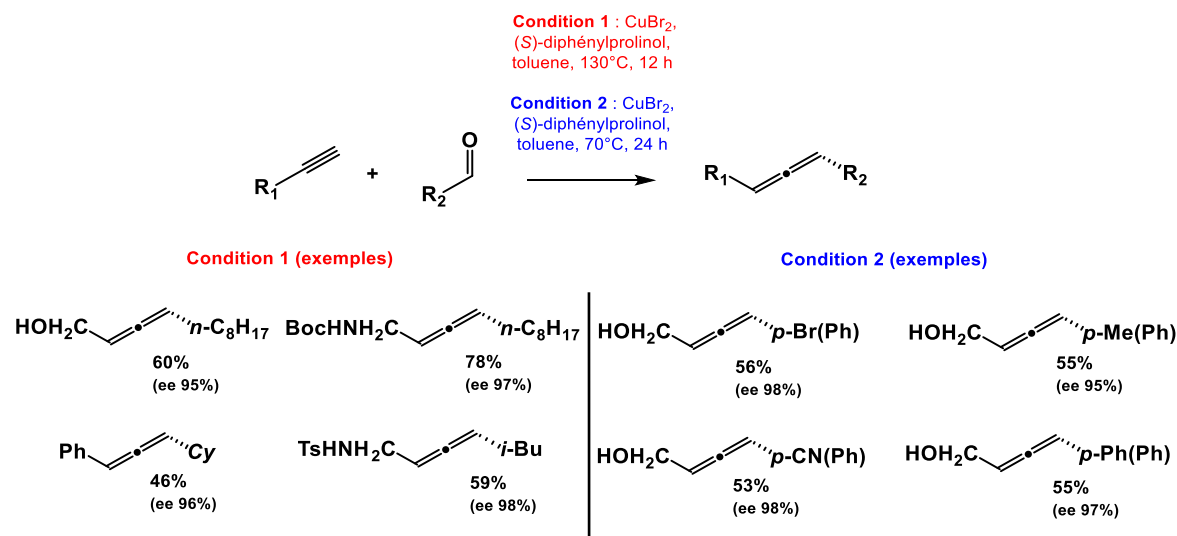


Schéma 12 : Synthèse de différents allènes asymétriques obtenus par synthèse asymétrique selon Ma.^{193,196,197}

Ils ont également montré qu'il était préférable, avec les aldéhydes de type aryles, d'abaisser la température de la réaction de 130°C à 70°C et d'allonger le temps de réaction.^{193,196}

Dans le cadre de cette thèse, seuls le bromure de cuivre (II) (0.3 eq), le diphenylprolinol (1 eq) et le dioxanne seront respectivement utilisés comme catalyseur, base chirale et solvant selon les conditions décrites par Ma.¹⁹⁶ Dans ces conditions expérimentales, un mécanisme réactionnel a été proposé par l'équipe de Ma (Schéma 13).¹⁹⁶ Premièrement, un alcynure métallique (I) est formé à partir de propargyle amine et du dibromure de cuivre (II). L'imine (II) nouvellement formée par la condensation du

diphénylprolinol avec l'aldéhyde se complexe avec le cuivre du complexe métallique alcynyle ce qui conduit à une amine propargylique (III). Cette nouvelle espèce va subir un transfert intramoléculaire médié de nouveau par le dibromure de cuivre (II), formant ainsi une imine (IV) qui, après β -élimination, forme l'allène d'intérêt.

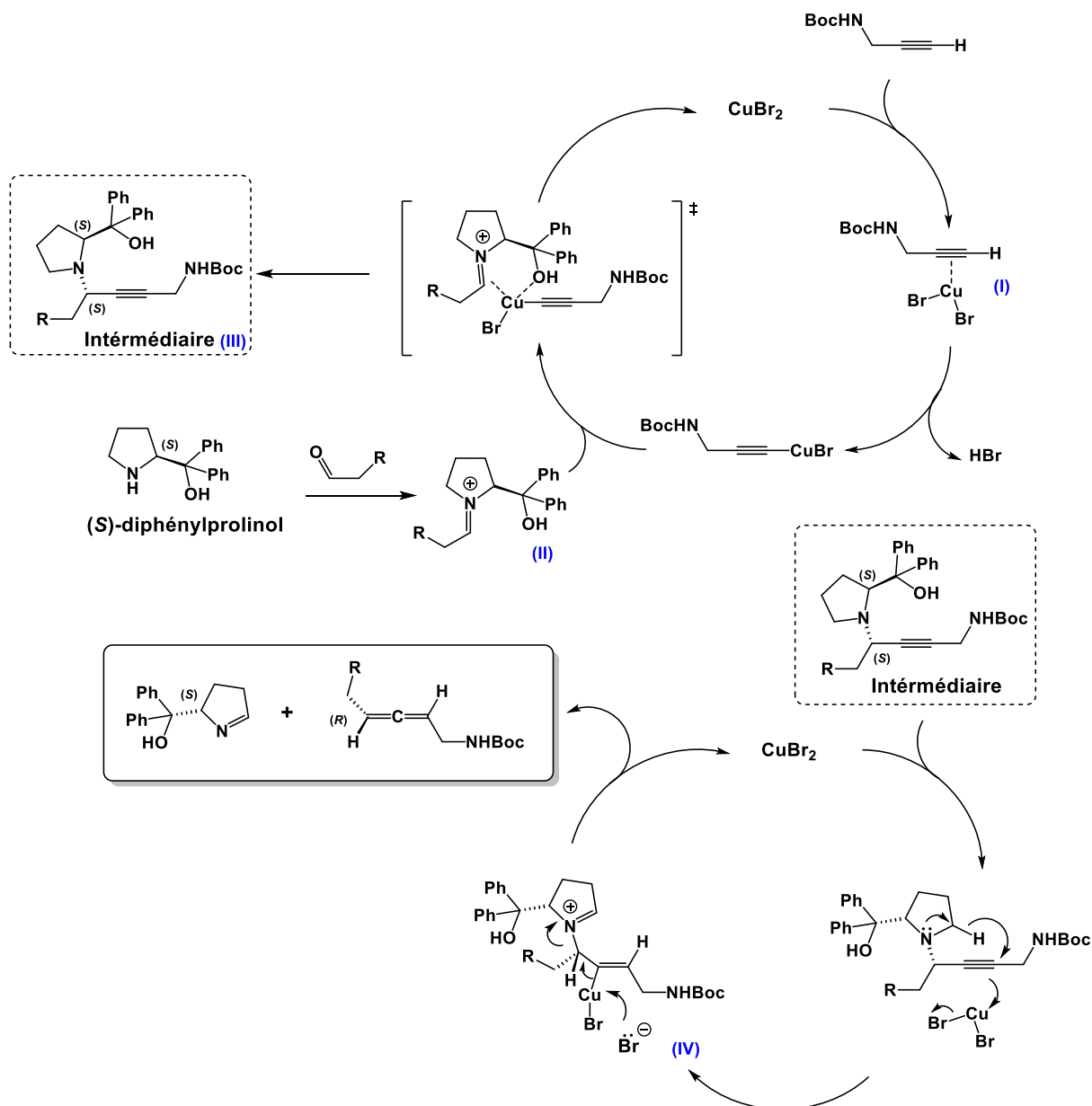


Schéma 13 : Mécanisme réactionnel de l'allénylation adaptée de Ma¹⁹⁶

Cependant, ce mécanisme proposé n'explique pas la formation d'un sous-produit, la benzophénone provenant de la dégradation du diphénylprolinol, observé et décrit dans la synthèse de l'AR88 et son énantiomère.¹¹⁵ Ce type de dégradation a déjà été observé dans la littérature et a été

expliqué par la fragmentation de Grob (Schéma 14).^{198,199} Le diphenylprolinol étant le réactif limitant, sa dégradation en benzophénone diminue le rendement de la réaction.

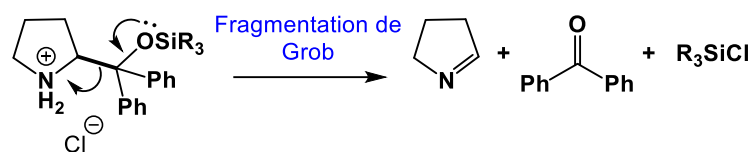


Schéma 14 : Fragmentation de type Grob¹⁹⁹

I.2.1.2. CYCLISATION INTRAMOLECULAIRE

Une fois l'aminoallène synthétisé, la seconde étape dans la synthèse de l'AR88 et son énantiomère est la cyclisation intramoléculaire. La cyclisation d'aminoallènes est généralement catalysée par des sels métalliques comme des sels d'or, d'argent ou de palladium.²⁰⁰⁻²⁰³ Pour la synthèse de l'AR88 et *enant*-AR88, c'est l'ion Ag^+ , sous la forme de nitrate d'argent, qui permet la réaction. Les différents cations métalliques jouent un rôle similaire dans le mécanisme synthétique (Schéma 15). L'ion Ag^+ joue le rôle d'acide de Lewis et catalyse l'attaque nucléophile intramoléculaire de l'amine sur le carbone en position 3 de l'allène. Cette étape permet le transfert d'une chiralité axiale vers une chiralité centrale. La pyrroline ainsi formée est engagée rapidement dans la réaction suivante car elle peut s'aromatiser (Schéma 15).

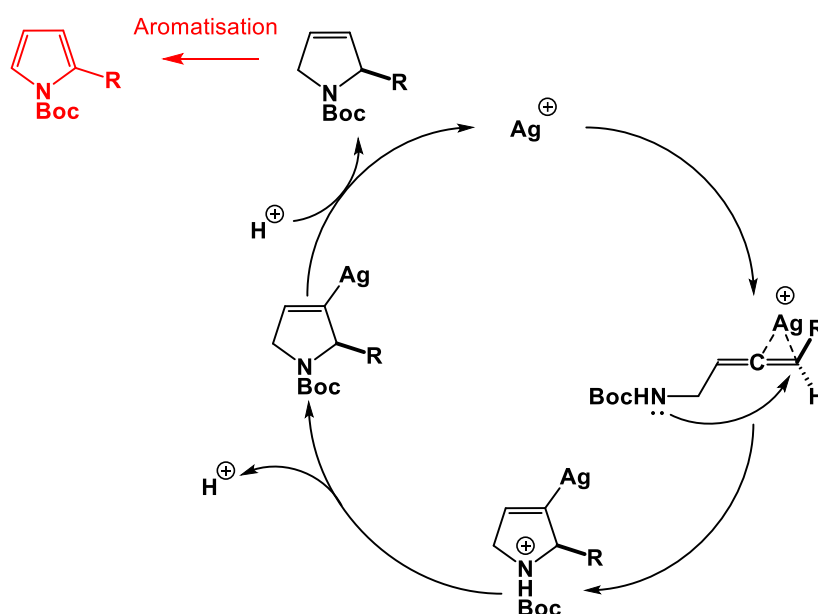


Schéma 15 : Mécanisme de la cyclisation intramoléculaire à partir d'aminoallènes

1.2.2. ANALOGUE D'ENANT-AR88

Notre objectif a été de synthétiser des analogues de l'AR88 et *enant*-AR88 en exploitant la simplicité de mise en œuvre de cette stratégie de synthèse, en particulier l'étape d'allénylation et de cyclisation intramoléculaire (Schéma 16). Dans un premier temps, seuls des analogues de *enant*-AR88 ont été synthétisés. Lors de l'étape d'allénylation, différents aldéhydes et alcynes ont été utilisés puis différentes conditions de cyclisations ont été testées. Pour chacun des analogues synthétisés, leur activité inhibitrice et chaperon seront ensuite évaluées.

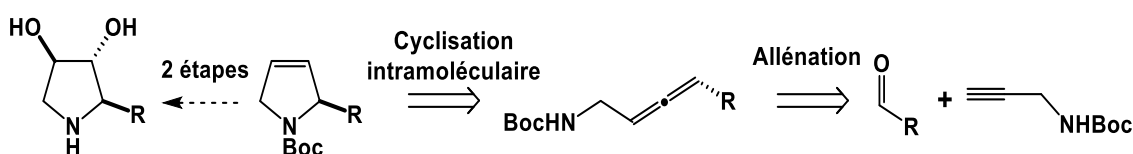


Schéma 16 : Rétrosynthèse des analogues de l'AR88

1.2.2.1. ALLENYLATION

En faisant varier l'aldéhyde ou l'alcyne, la voie de synthèse offre un accès simple à des pyrrolidines ou autres cycles azotés variés. Des aldéhydes et des alcynes commerciaux ont été sélectionnés afin de générer des allènes originaux permettant, par cyclisation intramoléculaire, l'obtention d'analogues pyrrolidines variés qui seront décrits ci-dessous.

Au préalable, nous avons optimisé les conditions de réactions décrites par Ma en prenant en compte les différents résultats obtenus pour la synthèse d'aminoallènes catalysée par du dibromure de cuivre (II) en présence de diphénylprolinol (schéma 12).^{196,197} Nous avons tout d'abord abaissé la température de réaction de 30°C pour deux raisons :

- De nombreux aryl-aldéhydes ont été sélectionnés comme réactif de départ et Ma a montré que l'abaissement de la température et un allongement du temps de réactions avec ce type d'aldéhydes permet une augmentation du rendement ;¹⁹³
- Essayer de diminuer la formation de benzophénone dû à la dégradation du diphénylprolinol qui est le réactif limitant de la réaction.

Cependant, il a été constaté expérimentalement que l'abaissement de la température de 130°C à 100°C, avec le benzaldéhyde comme aldéhyde modèle, ne conduit pas à la formation de l'allène souhaité, mais à l'intermédiaire iminium après 8h de réaction (confirmé par analyse de masse (ESI) $m/z = 342.2$) (Figure 50). De plus, nous observons également la formation de benzophénone par chromatographie sur couche mince. Afin de savoir si la formation de cette benzophénone est causée par le catalyseur ou d'autres réactifs issus de la réaction, nous avons testé la stabilité du diphénylprolinol à 100 °C dans du dioxane. La dégradation de diphénylprolinol en benzophénone est observable dès 100 °C sans nécessiter la présence du cuivre ou d'autres réactifs.

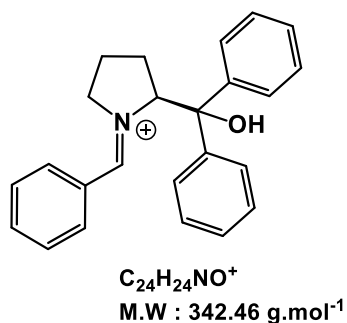


Figure 50 : Structure de l'intermédiaire iminium

Nous avons donc décidé de moduler la température au cours de la réaction. Tout d'abord, nous réalisons la réaction à 80 °C pendant 12 h, pour limiter la dégradation du diphenylprolinol tout en permettant la formation de l'intermédiaire iminium, puis nous augmentons la température à 130 °C pendant 4 h afin de faire réagir l'intermédiaire iminium et former l'allène souhaité. Il a été observé que, après 12 h à 80 °C et 4 h à 130 °C (condition B), l'iminium n'est plus observée par chromatographie sur couche mince et que l'allène est formé avec un rendement plus élevé que dans les conditions décrites par Ma (condition A) (Tableau 5). Une amélioration du rendement a également été observée avec d'autres aldéhydes commerciaux (Tableau 5).

Composé	(R)	(R/S) diphénylprolinol	Rendement (%) Condition A	Rendement (%) Condition B
<i>enant-84</i>		(R)	33	64
<i>enant-85</i>		(R)	17	44
<i>enant-86</i>		(R)	25	50

Tableau 5 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés *enant-84* à *enant-86* dans les conditions de Ma, réalisé par nos soins (condition A) et dans les conditions optimisées (condition B)

Par la suite, l'ensemble des allènes décrits seront synthétisés en suivant ces conditions expérimentales excepté les composés **88**, **89** et leurs énantiomères. Les deux énantiomères de chaque allènes ont été synthétisés afin de pouvoir déterminer leurs excès énantiomériques.

1.2.2.1.1. ALLENYLATION AVEC DIVERS ALDEHYDES

Dans cette partie, des aldéhydes commerciaux porteurs de fonctions aryles, cycliques ou fluorées, ont été sélectionnés afin d'explorer le potentiel de la réaction d'allénylation (Schéma 17).

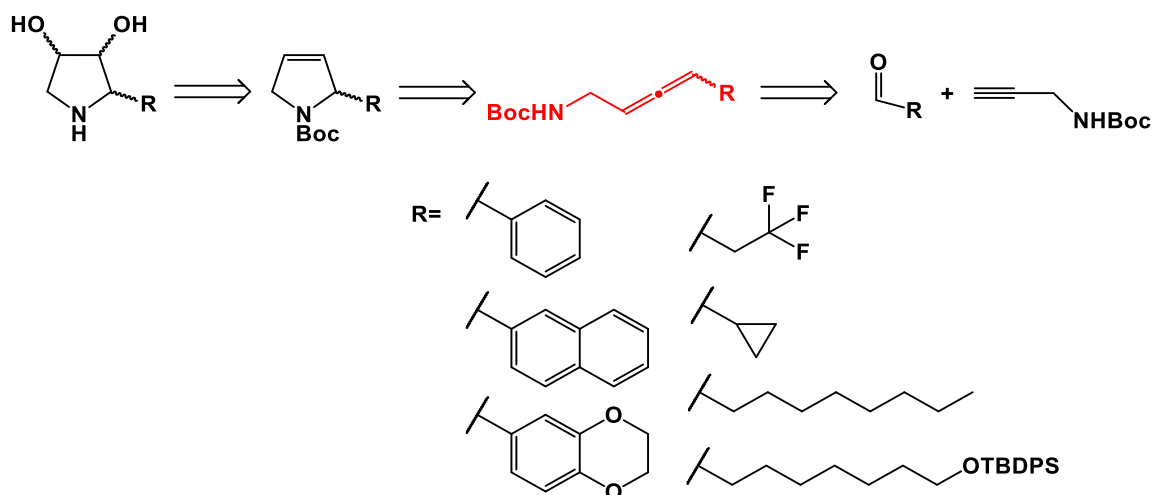
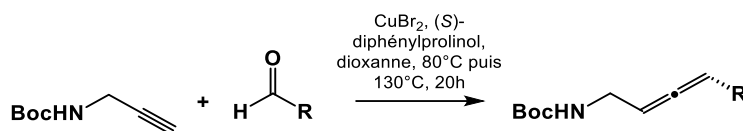


Schéma 17 : Rétrosynthèse de dérivés pyrrolidines à partir d'aldéhydes commerciaux

Les allènes **83** à **89** et leurs énantiomères ont été synthétisés et des rendements compris entre **22** et **64%** ont été observés (Tableau 6). Les rendements modestes sont principalement dus à la difficulté de séparer les allènes obtenus de la benzophénone. Ces résultats mettent en évidence l'infinité de variations envisageables sur le carbone en alpha de l'azote avec cette réaction.



Composé	(R)	(R/S) diphénylprolinol	Rendement (%)	ee*(%)
83		(S)	36	nd**
enant-83		(R)	40	nd
84		(S)	62	>99
enant-84		(R)	64	>99
85		(S)	24	92
enant-85		(R)	44	88
86		(S)	16	98
enant-86		(R)	50	82
enant-87		(R)	22	nd
88		(S)	67 ¹¹⁵	96
enant-88		(R)	63 ¹¹⁵	94
89		(S)	60	98
enant-89		(R)	53	93

*excès énantiomérique, ** non déterminés

Tableau 6 : Rendements et excès énantiomériques obtenus pour la synthèse des allènes **83** à **89** et leurs énantiomères

1.2.2.1.2. ALLENYLATION AVEC DIVERS ALCYNES

Différents alcyne ont également été sélectionnés et testés afin d'apporter de la diversité structurale.

Premièrement, un allongement de la chaîne carbonée entre la fonction alcyne et l'amine protégée pourrait permettre, après cyclisation, d'obtenir des cycles pipéridine ou azépane (Schéma 18). Deuxièmement, l'utilisation de la propargyloxyamine protégée au lieu de la propargylamine protégée a été envisagée afin de former, après cyclisation, un composé cyclique de type oxazinane (Schéma 18).

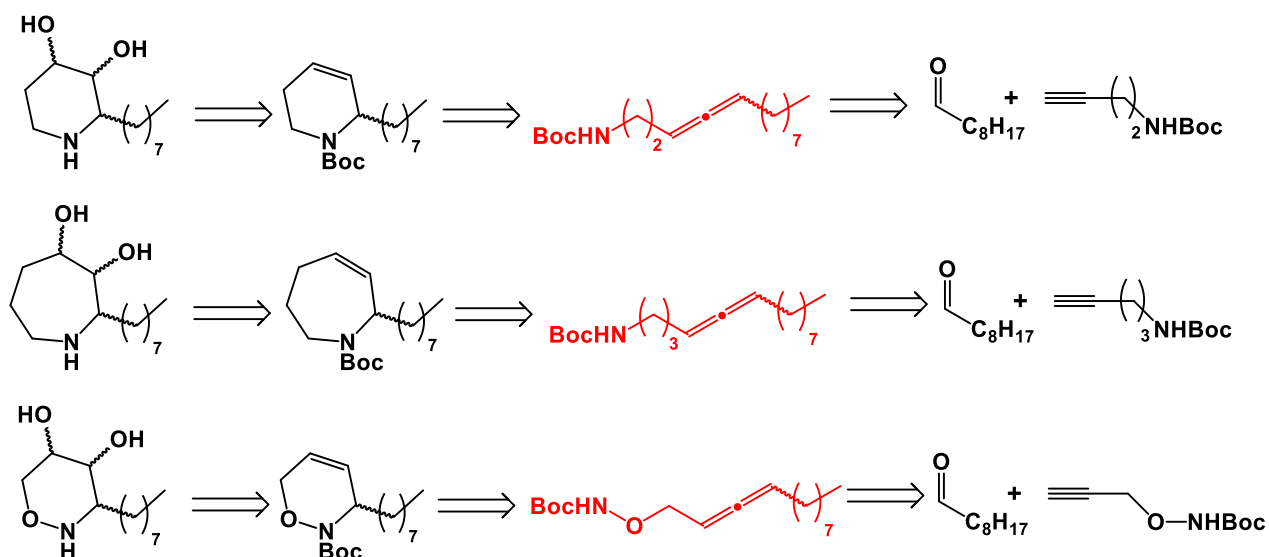
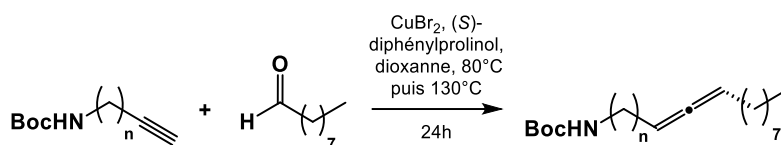


Schéma 18 : Rétrosynthèse de cycle de type pipéridine, azépane ou oxazinane

Des allénylations avec de la butynamine ou pentynamine protégée par un groupement Boc ont été réalisées en présence de nonanal afin de former les composés **90** et **91** et leurs énantiomères. Les rendements observés sont rapportés dans le *Tableau 7* ci-dessous.

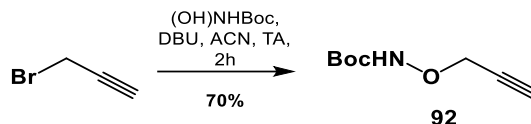


Composé	n	(R/S) diphénylprolinol	Rendement (%)
88	1	(S)	67
<i>enant-88</i>	1	(R)	63
90	2	(S)	52
<i>enant-90</i>	2	(R)	63
91	3	(S)	11
<i>enant-91</i>	3	(R)	25

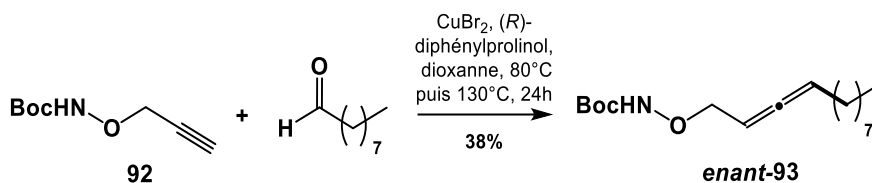
 Tableau 7 : Rendements obtenus pour la synthèse des allènes **88** à **91** et leurs énantiomères

L'homologation par rapport aux allènes de références **88** et *enant-88* influe peu sur les rendements observés. En revanche, l'allongement de 2 carbones supplémentaires a diminué significativement les rendements. Ces résultats peuvent éventuellement être expliqués par le choix du solvant. En effet, le dioxane est un solvant polaire, miscible avec l'eau, et pourrait ne pas être adéquat pour solubiliser la pentynamine protégée qui est relativement apolaire. Des essais avec d'autres solvants n'ont pour l'heure pas encore été réalisés. Les excès énantiomériques de ces composés sont en cours de détermination.

Afin d'obtenir le composé **enant-93**, issu de la réaction avec la propargyloxyamine, il a fallu synthétiser la propargyloxyamine protégée par un groupement Boc **92** (Schéma 19). Cette dernière a été obtenue à partir de bromure de propargyle et d'hydroxylamine protégée, en présence d'une base azotée non nucléophile, le DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène) avec un rendement de **70%** selon la méthode de Frost *et al.*²⁰⁴

Schéma 19 : Synthèse du précurseur **92**

A partir du composé **92**, seul le composé **enant-93** avec le (*R*)-diphénylprolinol a été synthétisé avec un rendement de **38%** (Schéma 20).

Schéma 20 : Synthèse de l'allène **enant-93**

1.2.2.1.3. VERS DES SPIROCYCLES

Afin d'obtenir des spirocycles, nous avons utilisé une propargylamine portant un groupement cyclohexyle sur sa chaîne carbonée. L'allène nouvellement formé devrait permettre après cyclisation d'obtenir un composé spiro (Schéma 21). Ces bicycles originaux, délicats à synthétiser, font l'objet de nombreuses recherches. C'est notamment le cas des bicycles azotés qui ont montré des activités antifongiques, antibactériennes, antivirales ou encore insecticides.²⁰⁵⁻²⁰⁷

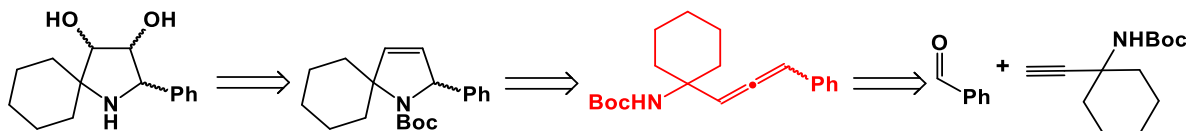


Schéma 21 : Rétrosynthèse de composé spiro

L'obtention de ces bicycles est à la fois un défi synthétique, afin de développer une nouvelle approche synthétique de cette famille de composés, mais possède aussi un intérêt pharmacologique

car nous envisageons d'évaluer, pour les composés synthétisés, leur activité comme inhibiteur et CP de la GCase.

Les allènes **94** et *enant-94* ont été obtenus à partir du benzaldéhyde commercial et de l'éthynylcyclohexan-1-amine avec des rendements de **36%** et **46%** respectivement (Schéma 22).

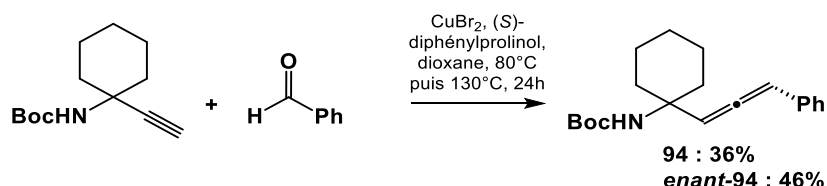


Schéma 22 : Synthèse de l'allène **94** et son énantiomère

Cette fois-ci, le benzaldéhyde a été préféré au nonanal afin d'obtenir un composé aromatique UV-visible afin de faciliter le suivi réactionnel et la purification.

1.2.2.2. CYCLISATION INTRAMOLECULAIRE

Nous détaillerons ici les produits de cyclisations issus des différents allènes obtenus précédemment.

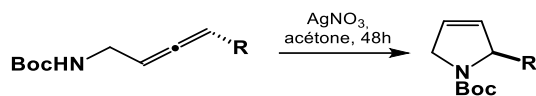
1.2.2.2.1. CYCLISATION DES COMPOSES *ENANT-83* A *ENANT-86*

La cyclisation des différents allènes *enant-83* à *enant-86* permet d'obtenir l'intermédiaire insaturé nécessaire à l'obtention des analogues de l'*enant-AR88* selon le schéma suivant.



Schéma 23 : Rétrosynthèse de l'*enant-AR88*

Les différents produits cyclisés *enant-95* à *enant-98* ont été obtenus à partir des allènes *enant-83* à *enant-86* en présence de nitrate d'argent en quantité catalytique pendant 48h à l'abri de la lumière, suivi d'une filtration sur célite, comme indiqué dans la publication de Castellan *et al.*¹¹⁵ avec des rendements supérieurs à **98%** (Tableau 8).



Composé	(R)	Rendement (%)
95		99
enant-95		98
enant-96		100
enant-97		100
enant-98		100

Tableau 8 : Rendements obtenus pour la synthèse des pyrrolines 95 à enant-98

Ces intermédiaires de synthèse ont par la suite été époxydés en présence de *m*-CPBA puis traités avec de l'acide sulfurique, suivant la même voie de synthèse que les composés **AR88** et **enant-AR88**, afin d'obtenir les pyrrolidines correspondantes (Schéma 24).¹¹⁵ Cette voie de synthèse permet donc de synthétiser une variété de pyrrolidines fonctionnalisées en position alpha de l'azote avec des rendements de 7%, 10%, 12%, 9% et 2% pour les composé **103**, **enant-103**, **enant-104**, **enant-105** et **enant-106** respectivement (Schéma 24).

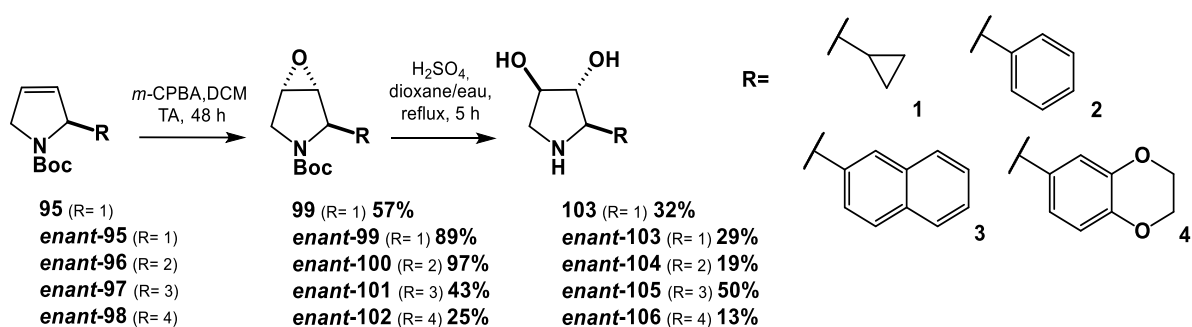


Schéma 24 : Synthèse des composés 103 à enant-106

1.2.2.2.2. CYCLISATION INTRAMOLECULAIRE DE ENANT-93

Dans l'objectif de synthétiser des analogues de type 1,2-oxazinane (Schéma 25), la cyclisation de l'hydroxyaminoallène **enant-93** précédemment obtenu a été explorée.

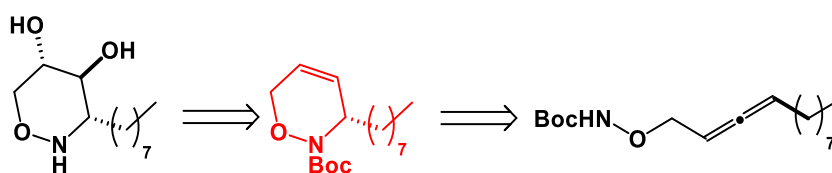
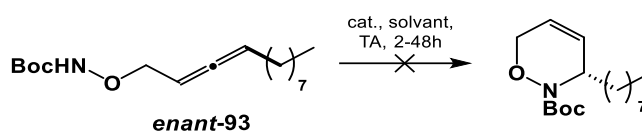


Schéma 25 : Rétrosynthèse de dérivés de type 1,2-oxazinanone

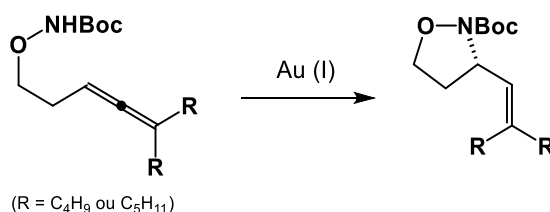
Cependant, aucun des catalyseurs utilisés (nitrate d'argent (I), chlorure d'or (I) et (III)) n'a permis d'obtenir le composé désiré (Tableau 9). Le catalyseur AgNO_3 n'a conduit à la formation d'aucun produit synthétique, alors que les catalyseurs d'or ont conduit à la formation de nombreux sous-produits non caractérisés. Cette étape s'est avérée plus délicate que prévu et ne nous a pas permis d'obtenir des composés de types 1,2-oxazinanone.



Réactif	Catalyseur	Conditions	Rendement (%)
<i>enant-93</i>	AgNO_3	Acétone, 48h, TA	/
<i>enant-93</i>	AuCl (I)	DCM, 2h, TA	/
<i>enant-93</i>	AuCl (III)	DCM, 2h, TA	/

Tableau 9 : Conditions des réactions de cyclisation intramoléculaire afin de former un oxazinanone

L'utilisation de catalyseur à base d'or aurait pu permettre la cyclisation selon la publication de Lalonde *et al.*²⁰⁸ En effet, en 2010, les auteurs ont développé une voie de synthèse utilisant des hydroxyaminoallènes afin de former des composés cycliques de type oxazinanone ou isoxazolidine en présence de catalyseur d'or (I) avec des rendements élevés et de manière énantiosélective (Schéma 26).²⁰⁸ Cependant, la réactivité de leurs allènes est différente puisque les hydroxyaminoallènes utilisés sont disubstitués empêchant ainsi l'attaque de l'azote sur le carbone 3 de l'allène, comme nous souhaitons le faire.

Schéma 26 : Cyclisation d'hydroxyaminoallène décrite par Lalonde *et al.*²⁰⁸

I.2.2.2.3. CYCLISATION INTRAMOLECULAIRE D'ENANT-94

L'allène, **enant-94**, précédemment obtenu a été engagé dans une réaction de cyclisation afin d'obtenir le composé spiro **enant-107** (Schéma 27).

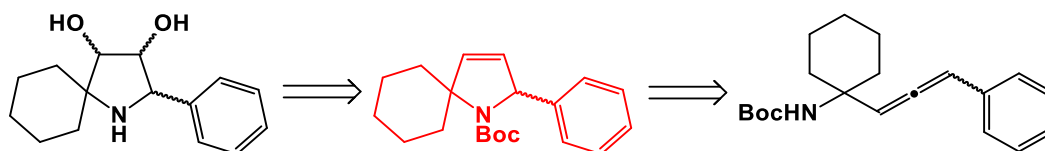
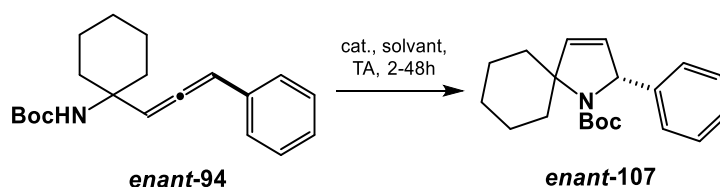


Schéma 27 : Rétrosynthèse du composé spiro **enant-107**

Trois essais de cyclisation ont été réalisés avec deux types de catalyseurs différents et les rendements associés sont rapportés Tableau 10.

Un premier essai a été réalisé avec du nitrate d'argent, mais n'a pas conduit à la formation du composé spiro **enant-107** souhaité même après 48h de réaction.

En revanche, les deux essais suivants en présence de chlorure d'or (I) ont conduit à la formation du composé **enant-107**. Le premier essai a permis d'obtenir rapidement (2h) le produit avec un rendement de **24%** avec consommation totale du réactif de départ. Afin de ralentir la réactivité du réactif de départ et d'éviter la formation de sous-produits, les conditions ont été optimisées lors du second essai. Une dilution par 5 du réactif de départ, pour favoriser la réaction intramoléculaire, ainsi qu'un abaissement de la température à 0°C ont permis l'obtention du produit avec un rendement plus de deux fois supérieur, de **45%**, après 2h de réaction et consommation totale du réactif de départ.



Composé	Catalyseur	Conditions	Rendement (%)
enant-107	AgNO ₃	Acétone, 48h, TA	/
enant-107	AuCl (I)	DCM, (0,070 mM) 2h, TA	24
enant-107	AuCl (I)	DCM (0,015 mM), 2h, 0°C	45

Tableau 10 : Conditions et rendements pour la synthèse du composé spiro **enant-107**

La synthèse de l'analogue de **enant-AR88** à partir de **enant-107** est en cours de réalisation. L'obtention de ce type de composé a permis une nouvelle fois de valoriser cette voie de synthèse et de montrer la variété de composés originaux qui peuvent être synthétisés.

I.2.3. SYNTHÈSE DES DERIVES « CLICKABLES »

Notre objectif a été de synthétiser des analogues ω -fonctionnalisés de l'AR88 et son énantiomère afin de pouvoir les lier par chimie « click » à des plateformes multivalentes. Des modifications de la voie de synthèse initiale de 4 étapes ont donc été entreprises pour conduire à la voie de synthèse ci-dessous (Schéma 28).

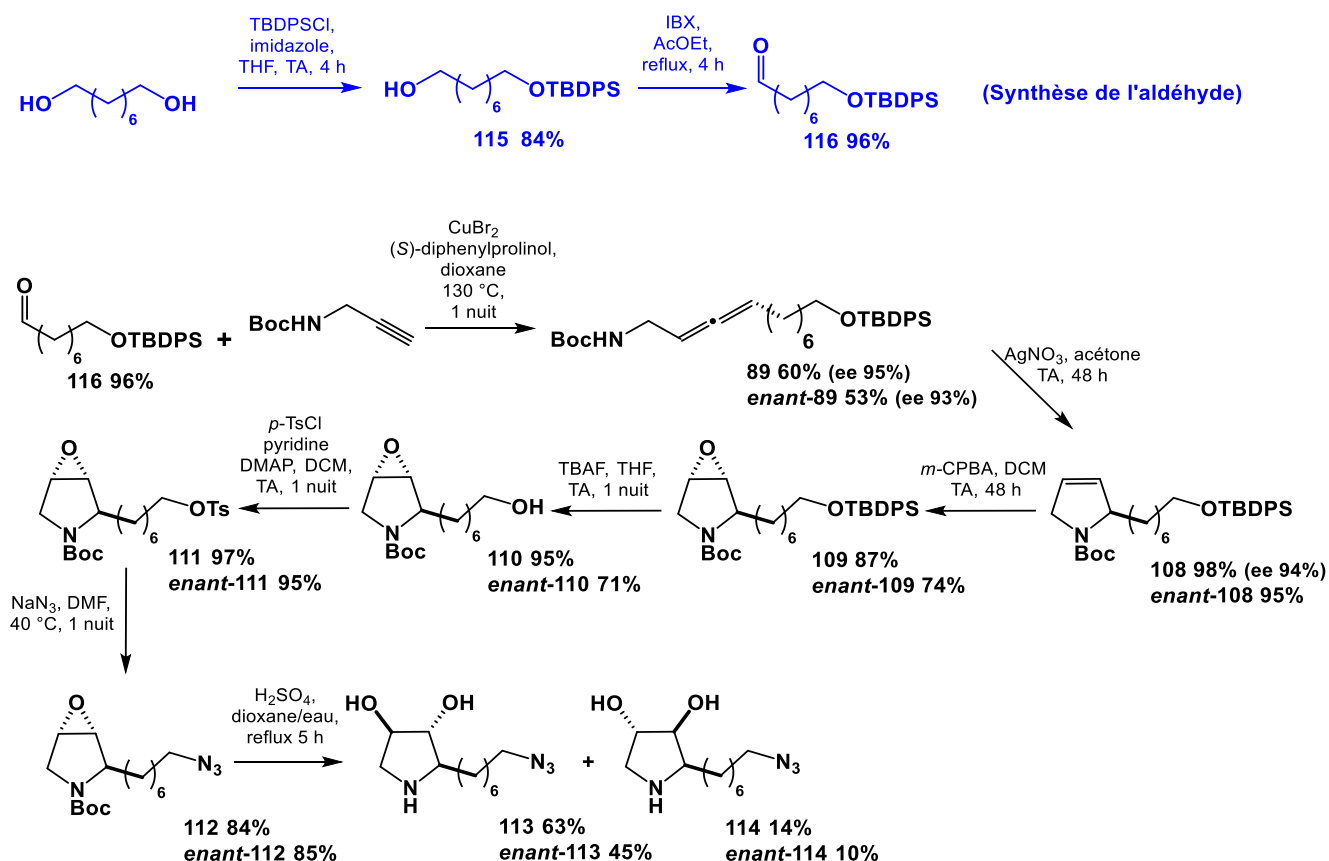


Schéma 28 : Voie de synthèse des analogues « clickables » de l'AR88 et enant-AR88 (seul la synthèse de l'AR88 est représentée)

L'aldéhyde **116** nécessaire à l'étape d'allénylation est obtenu à partir d'octanediol avec un rendement de **81%** sur 2 étapes : une monoprotection par un groupement protecteur silylé en présence d'imidazole, suivie de l'oxydation en aldéhyde de l'alcool résiduel à l'aide d'IBX (acide 2-iodoxybenzoïque).

Ensuite, l'allénylation, la cyclisation intramoléculaire et l'époxydation sont réalisés comme décrit précédemment afin d'obtenir l'intermédiaire époxydé **109** et son énantiomère. Par la suite, l'alcool a été déprotégé en présence de TBAF, puis tosylé à l'aide de chlorure de tosylo afin de favoriser la substitution du groupement alcool par un azoture en présence d'azoture de sodium. Pour finir, un traitement en milieu acide à reflux a permis à la fois l'ouverture de l'époxyde et la déprotection de l'atome d'azote cyclique obtenant ainsi le composé désiré **113** ou *enant*-**113**. Cette dernière étape est régiosélective et les diastéréoisomères **114** et *enant*-**114** sont observés et séparés par

chromatographie avec un excès diastéréoisomérique de 82 : 18. Cet excès est déterminé par RMN du proton par intégration du signal correspondant au proton porté par le carbone tertiaire en α de l'azote.

En suivant cette voie de synthèse, les dérivés pyrrolidines **113** et *enant-113* (analogues « clickables » de l'AR88 et *enant-AR88*) sont synthétisés en 7 étapes avec un rendement global de **20%**, et **8%** respectivement à partir de l'octanediol.

II. SYNTHESES DES PLATEFORMES « CLICKABLES »

Afin de pouvoir synthétiser des objets multivalents par chimie « click », différentes plateformes ont été synthétisées. Nous présenterons d'abord la synthèse des plateformes de valence 4 et 6 dérivées de pentaérythritol utilisées pour les réactions de « click » de type CuAAC et thiol-ène (addition de Michael). Puis, dans un second temps, seront présentées les plateformes dendrimériques, hexamériques et dodécamériques, à cœur triphosphazène, synthétisées par notre collaborateur, le Dr. C.O. Turrin (LCC, TOULOUSE) et utilisées pour les réactions de type SPAAC.

II.1. Plateformes issues de pentaérythritol

Deux types de plateformes issues de pentaérythritol de valence 4 et 6 ont été synthétisés en fonction du type de chimie « click » utilisé pour greffer les ligands. Ces types de plateformes ont souvent été décrits dans la littérature pour la synthèse d'objets multivalents, du fait de leur facilité d'accès synthétique et leur faible coût.^{181,183,184}

Les plateformes **117** et **119** ont été obtenues à partir de pentaérythritol par substitution nucléophile de l'alcool par une fonction propargyle, en présence de bromure de propargyle et d'hydrure de sodium, avec des rendements de **73%** et **70%** respectivement (*Schéma 29*).

La plateforme **118** est obtenue par acrylation du pentaérythritol en présence de triéthylamine et de chlorure d'acryloyle avec un rendement de **22%** selon le protocole de Moraes *et al.*²⁰⁹ (*Schéma 29*). Ce rendement est inférieur à celui rapporté par Ma *et al.* (**97%**) mais la réaction n'a pas été optimisée.²¹⁰ Le composé **120**, commercial, n'a pas été synthétisé.

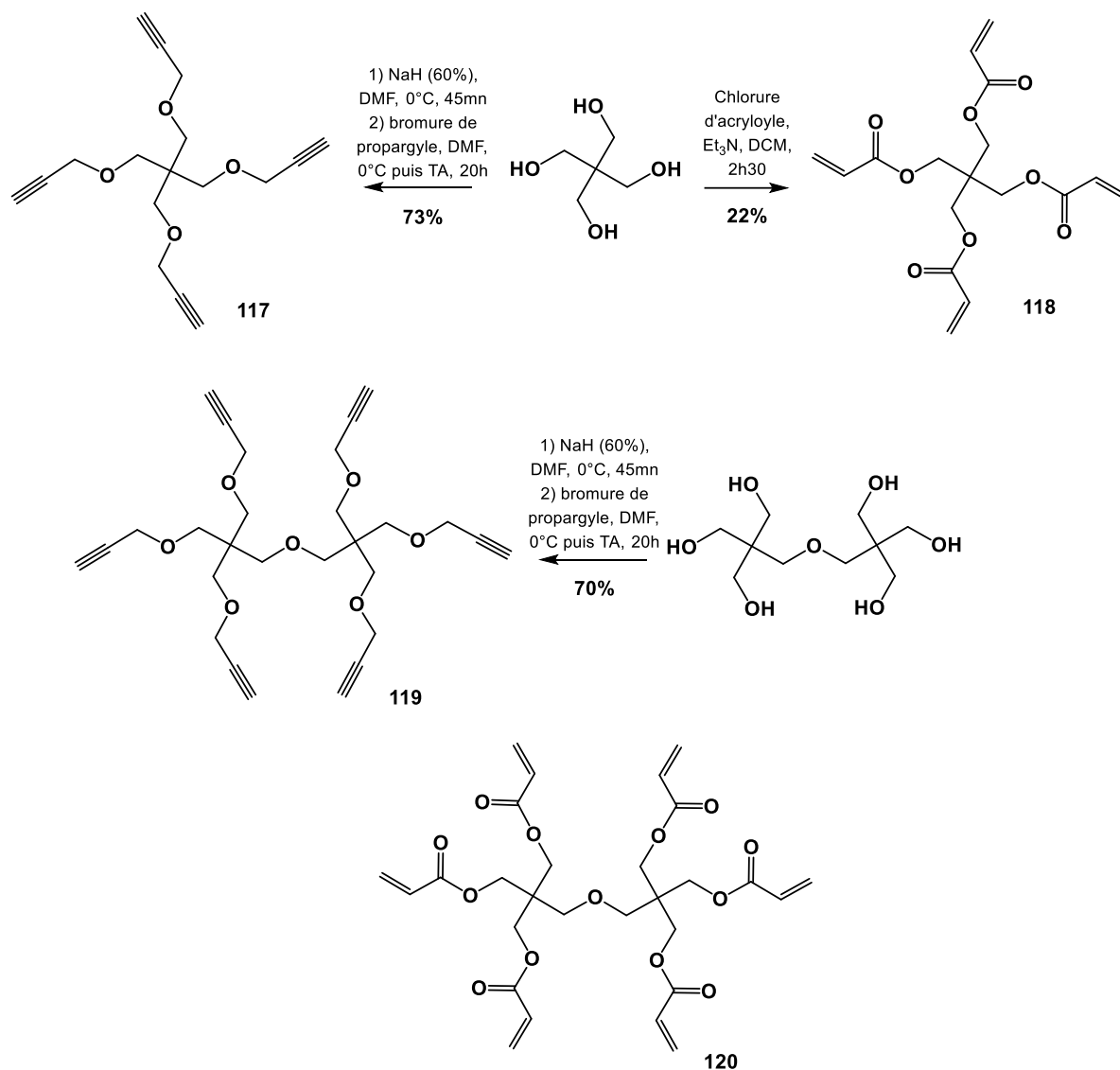


Schéma 29 : Synthèse des plateformes 117 à 119

II.2. PLATEFORMES A CŒUR CYCLOTRIPHOSPHAZENE

Les plateformes à cœur cyclotriphosphazène ont fait l'objet de nombreuses études menées par l'équipe du Pr. A.M. Caminade (LCC, TOULOUSE).²¹¹⁻²¹⁵ Récemment, une collaboration entre nos deux équipes a conduit, à partir de plateformes dendrimériques, à la synthèse et l'évaluation biologique comme CP de composés multivalents contre la MG. Ce travail a récemment fait l'objet d'une publication.²¹⁶ Les dendrimères à cœur cyclotriphosphazène hexavalents de génération 0 (G0) et dodécavalents de génération 1 (G1) étaient porteurs de fonctions MOFO (monofluorinated cyclcooctyne) (Figure 51). Ces dendrimères ont permis, par chimie « click » de type SPAAC avec un azoture, de synthétiser deux objets multivalents porteurs de ligands dérivés de la D-DNJ. L'évaluation biologique de ces objets multivalents a mis en évidence leur capacité à traverser la membrane cellulaire et augmenter l'activité de la GCCase. Ces résultats s'inscrivent dans le cadre du travail de thèse du Dr. Tran.²¹⁷

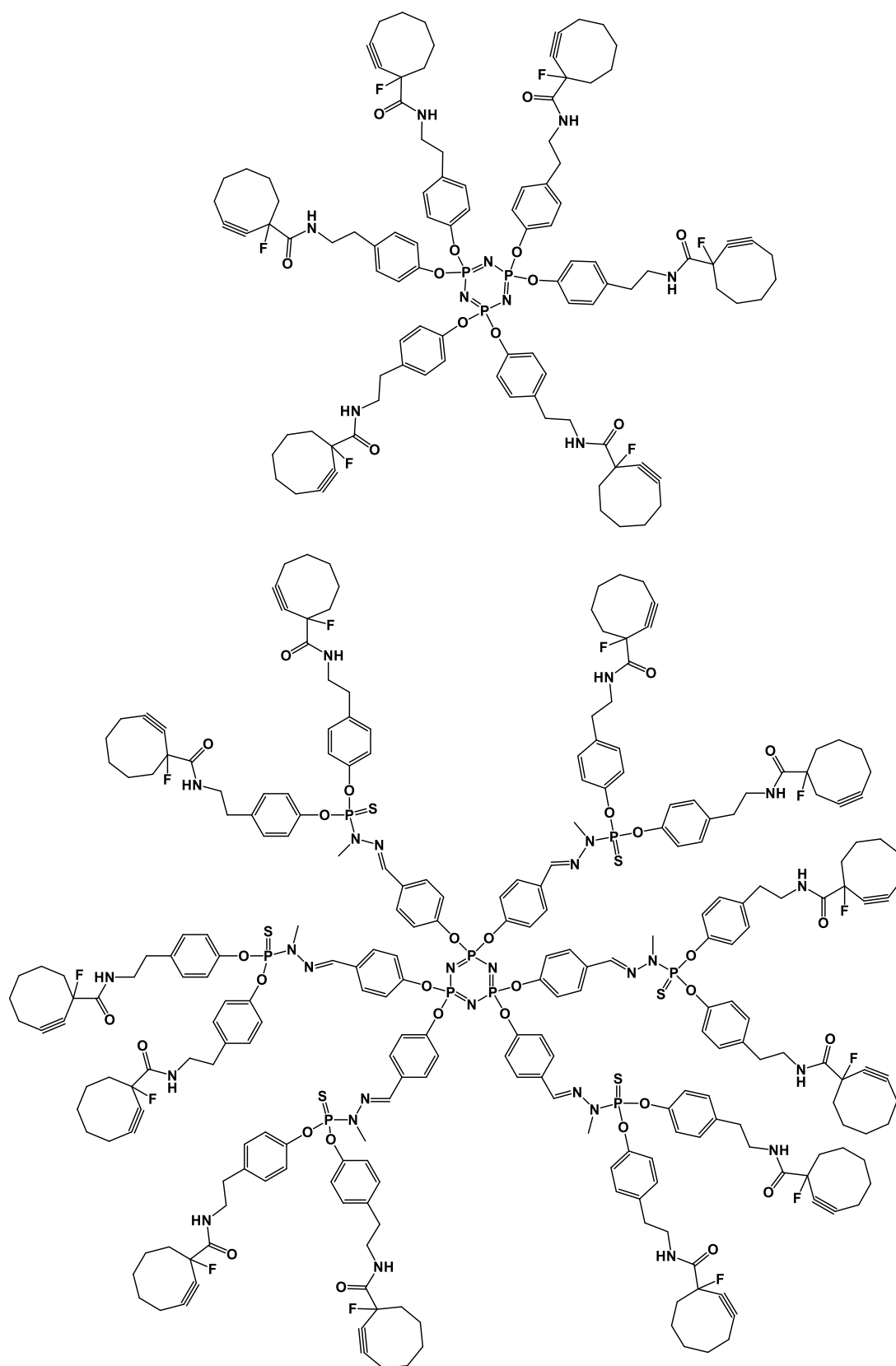
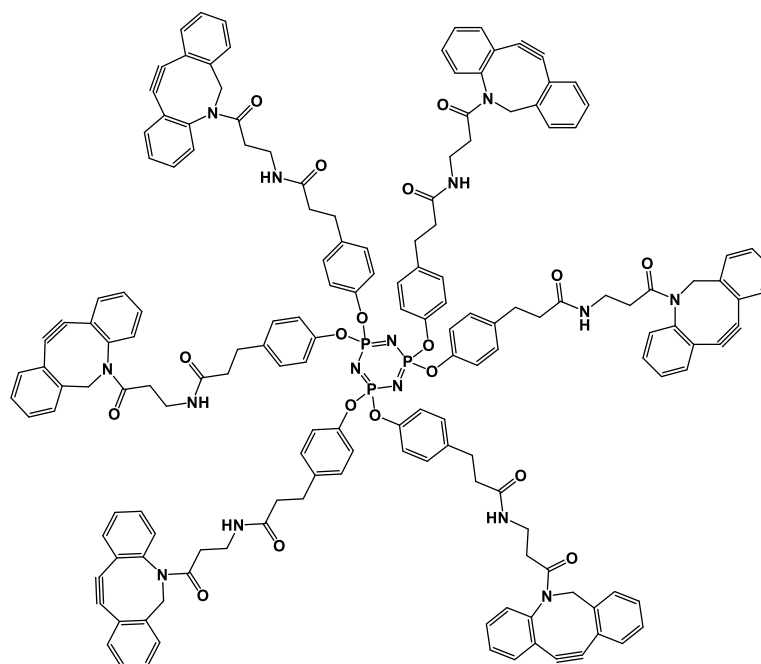
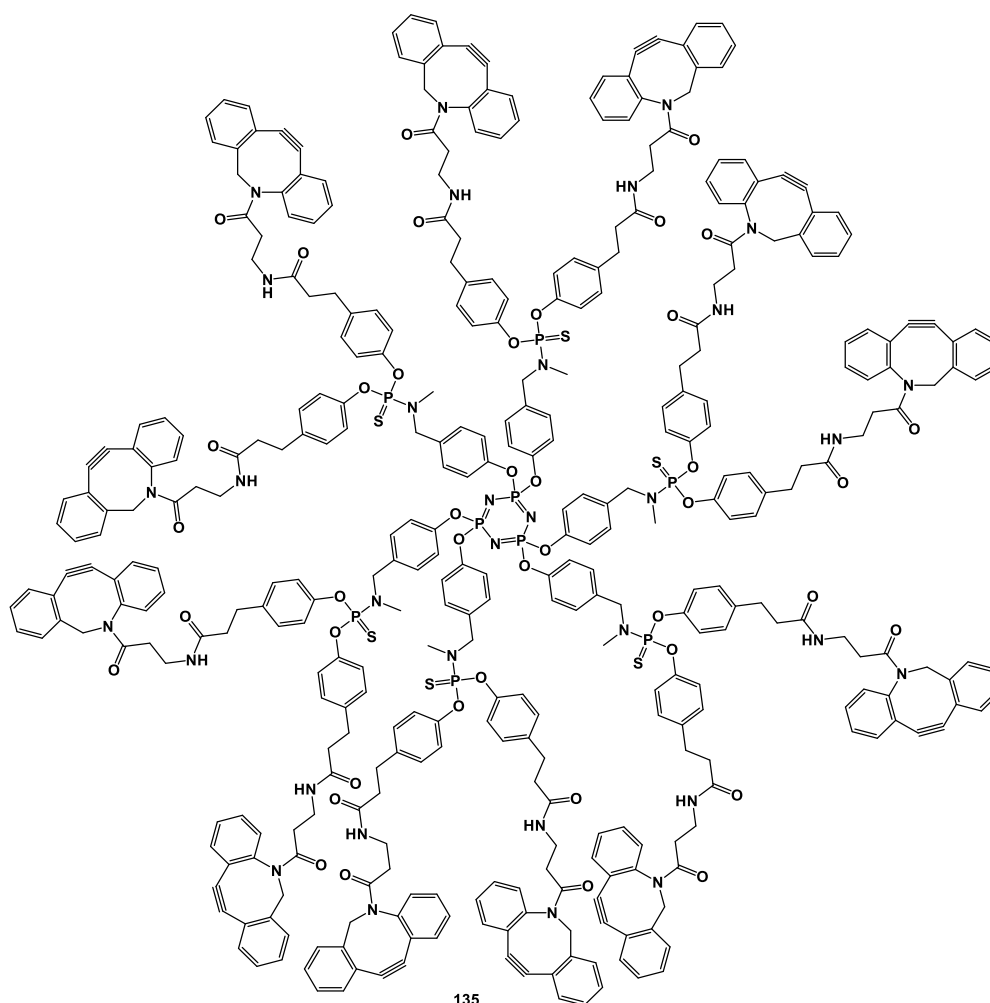


Figure 51 : Plateformes dendrimériques à cœur cyclotriphosphazène hexavalente et dodécavalente porteuses de groupement MOFO ²¹⁶

Dans le cadre de cette thèse, deux nouvelles plateformes dendrimériques, hexavalente (G0) et dodécavalente (G1), ont été préparées par le Dr. C.O. Turrin (résultats non publiés) (*Figure 52*). Cette fois-ci, les dendrimères sont porteurs de fonctions de type DIBAC (aza-dibenzocyclooctyne), plus réactive que la fonction MOFO, (cf. partie III.1.2.) et permettent également de réaliser des réactions de type SPAAC en présence d'un azoture.



134



135

Figure 52 : Plateformes dendrimériques à cœur cyclotriphosphazène hexavalente et dodécavalente porteuses de groupement DIBAC

III. SYNTHESSES DES OBJETS MULTIVALENTS

Dans cette partie, les différentes réactions de chimie « click » conduisant à la synthèse des objets multivalents seront décrites (CuAAC, SPAAC, thiol-ène (addition de Michael)). Nous décrivons les objets multivalents dérivés de L/D-DNJ, puis les dérivés de l'AR88 et son énantiomère avant de terminer par les objets multivalents de la NAC.

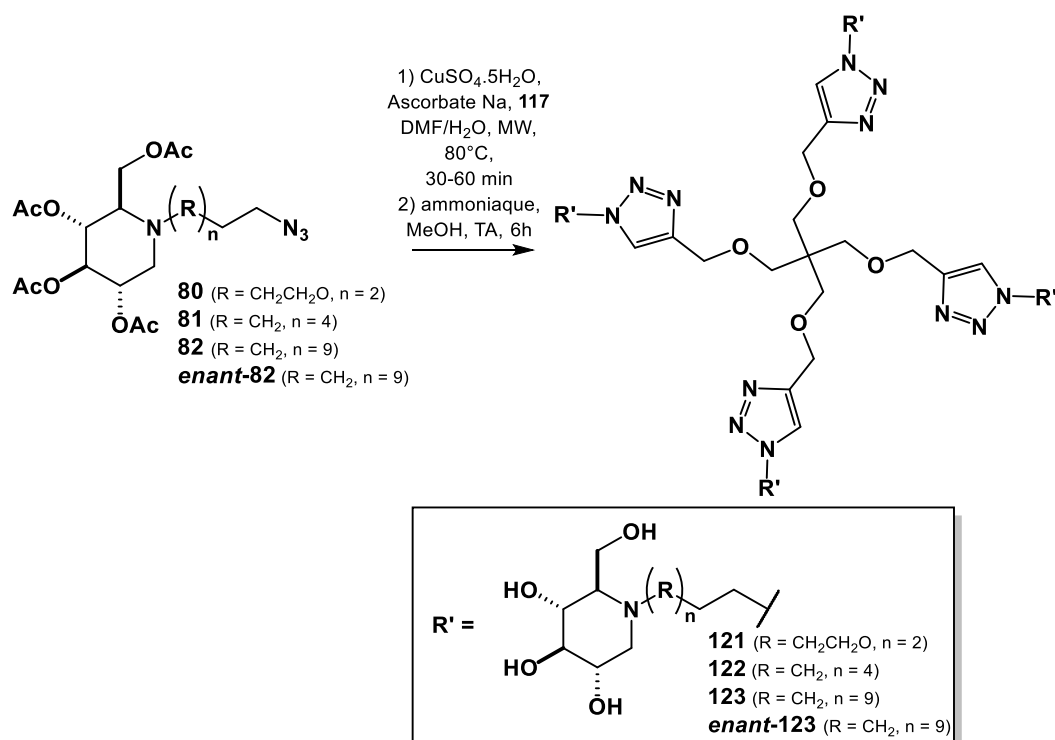
III.1. Synthèses des objets multivalents dérivés de la L et D-DNJ

III.1.1. Synthèses par réaction de type CuAAC

Toutes les synthèses des objets multivalents obtenus par réaction de type CuAAC ont été réalisées dans un réacteur micro-onde comme décrit dans la thèse du Dr. Stauffert.²¹⁸ Les réactions « click » ont été réalisées dans un mélange de solvant eau/DMF en présence de sulfate de cuivre préalablement activé par agitation dans l'eau avec de l'ascorbate de sodium afin de passer de l'état Cu(II) à Cu(I). Les produits acétylés synthétisés ont été séparés du cuivre grâce à des lavages répétés avec une solution aqueuse saturée en EDTA, permettant la chélation du cuivre et le passage de celui-ci en phase aqueuse. Les objets multivalents sont ensuite désacétylés en présence d'ammoniaque dans le méthanol.

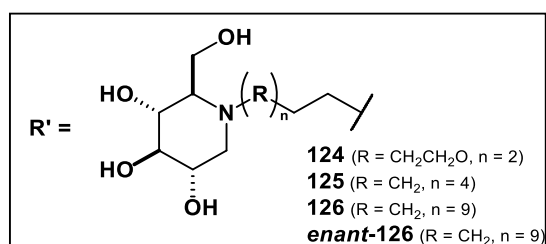
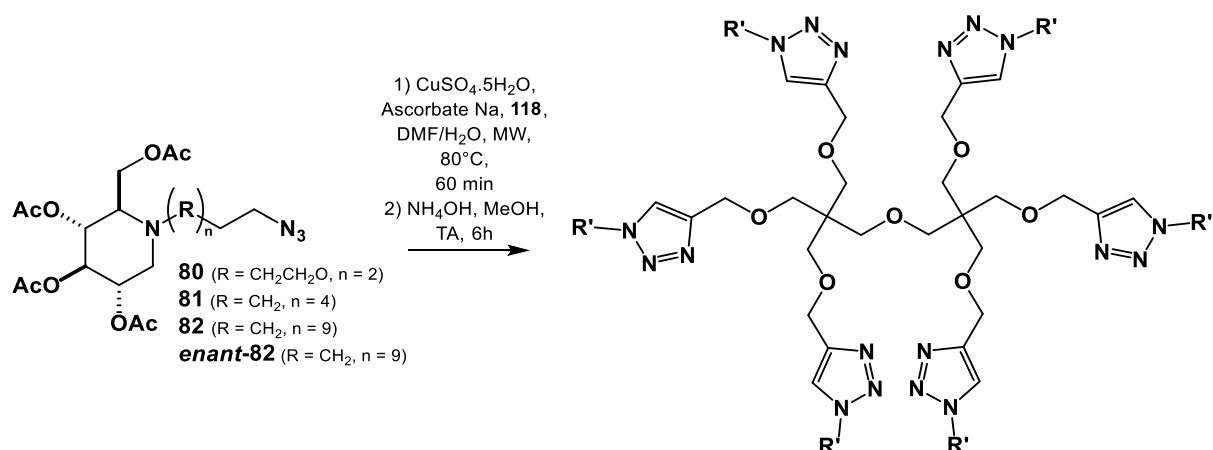
Quatre objets tétramériques et quatre objets hexamériques ont été synthétisés en suivant cette voie de synthèse et sont rapportés *Tableau 11* et *Tableau 12*.

SYNTHESES DE LIGANDS MULTIVALENTS D'INTERET THERAPEUTIQUE



Composé	L/D	Espaceur	Rendement (%)
121	D	PEG	72
122	D	C6	100
123	D	C11	100
enant-123	L	C11	81

Tableau 11 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés multivalents **121** à **enant-123** (seul l'énantiomère de forme D est représenté)

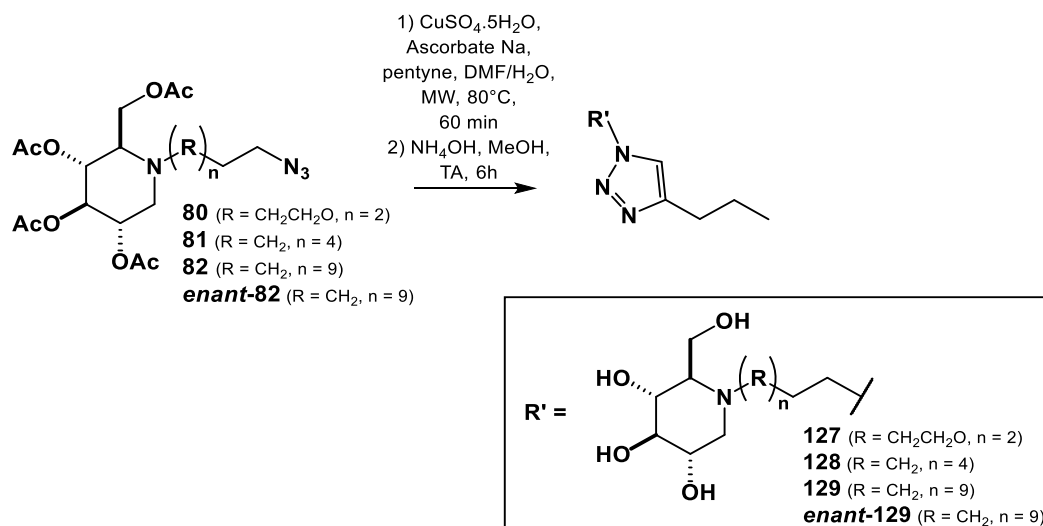


Composé	L/D	Espaceur	Rendement (%)
124	D	PEG	57
125	D	C6	81
126	D	C11	86
enant-126	L	C11	90

Tableau 12 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés **124** à **enant-126** (seul l'énantiomère de forme D est représenté)

Les rendements obtenus après ces deux étapes sont élevés pour les objets multivalents tétramériques et hexamériques avec les espaceurs de type alkyle. En revanche, les rendements observés sont plus faibles pour les composés multivalents **121** et **124** obtenus avec l'espaceur de type PEG.

Afin de pouvoir mettre en évidence des effets multivalents sur l'inhibition des enzymes étudiées, des références monomériques ont été synthétisées avec du pentyne (Tableau 13).



Composé	L/D	Espaceur	Rendement (%)
127	D	PEG	51
128	D	C6	47
129	D	C11	39
enant-129	L	C11	24

Tableau 13 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés **127** à **enant-129** (seul l'énantiomère de forme D est représenté)

Les rendements associés à ces réactions sont plus faibles que pour la synthèse des objets multivalents et varient en fonction de l'espaceur utilisé. Cela est dû à la formation de sous-produits synthétiques d'oxydation UV-visibles, séparables par chromatographie, qui ne sont pas observés lors de la synthèse des objets multivalents (Schéma 30). Des sous-produits d'oxydations similaires en présence de pentyne ont déjà été observés dans la littérature.^{217,219} Ainsi, des rendements plus faibles sont observés pour les composés **129** et **enant-129** avec l'espaceur de 11 carbones.

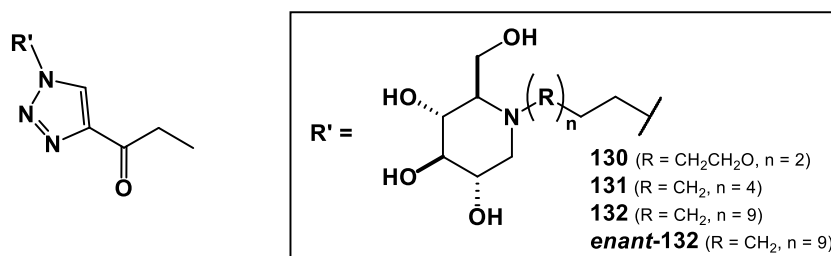


Schéma 30 : Sous-produits d'oxydations **130**, **131**, **132** et **enant-132** (seul l'énantiomère de forme D est représenté)

III.1.2. SYNTHESES PAR REACTION DE TYPE SPAAC

Les objets multivalents obtenus par réaction de type SPAAC (strain promoted azide-alkyne cycloaddition) seront décrits dans cette partie. La réaction de « click » de type SPAAC consiste en la cycloaddition entre un alcyne cyclique contraint et un azoture. Contrairement à la réaction de CuAAC, celle-ci est biocompatible et ne nécessite pas la présence de cuivre ou de tout autre catalyseur.^{220,221} La réaction est réalisée spontanément à température modérée grâce à la contrainte présente sur l'alcyne cyclique qui le rend très réactif. En effet, cette pré-distorsion permet de réduire l'énergie nécessaire pour atteindre la géométrie de l'état de transition, améliorant ainsi les interactions orbitales et induisant un abaissement du niveau énergétique des barrières d'activation.²²² En revanche, contrairement à la réaction de CuAAC, la réaction de SPAAC n'est pas régiosélective et conduit donc à un mélange de régioisomères.

Depuis sa première description en 1953 par Blomquist *et al.*,²²³ entre un cyclooctyne et un azoture de phényle, l'utilisation de la réaction de SPAAC s'est étendue à de nombreux domaines de recherche.^{220,221} De nombreux cyclooctynes modifiés ont été synthétisés afin d'améliorer les propriétés cinétiques de la réaction (Figure 53).²²⁴

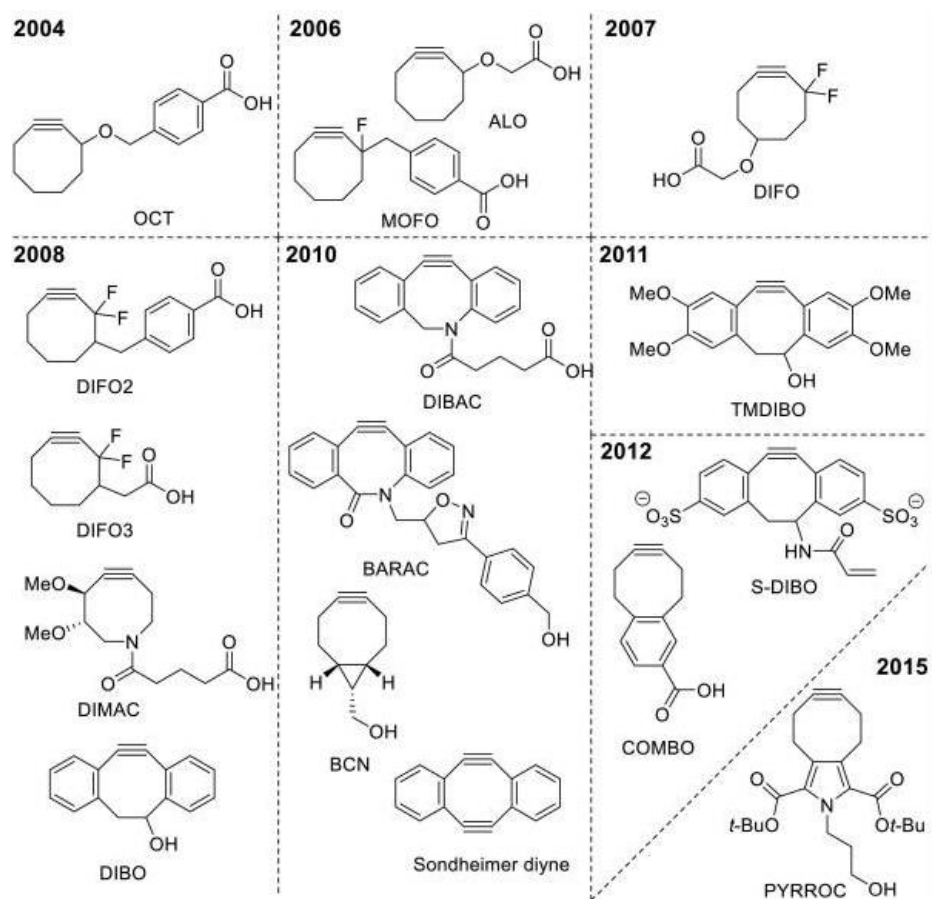


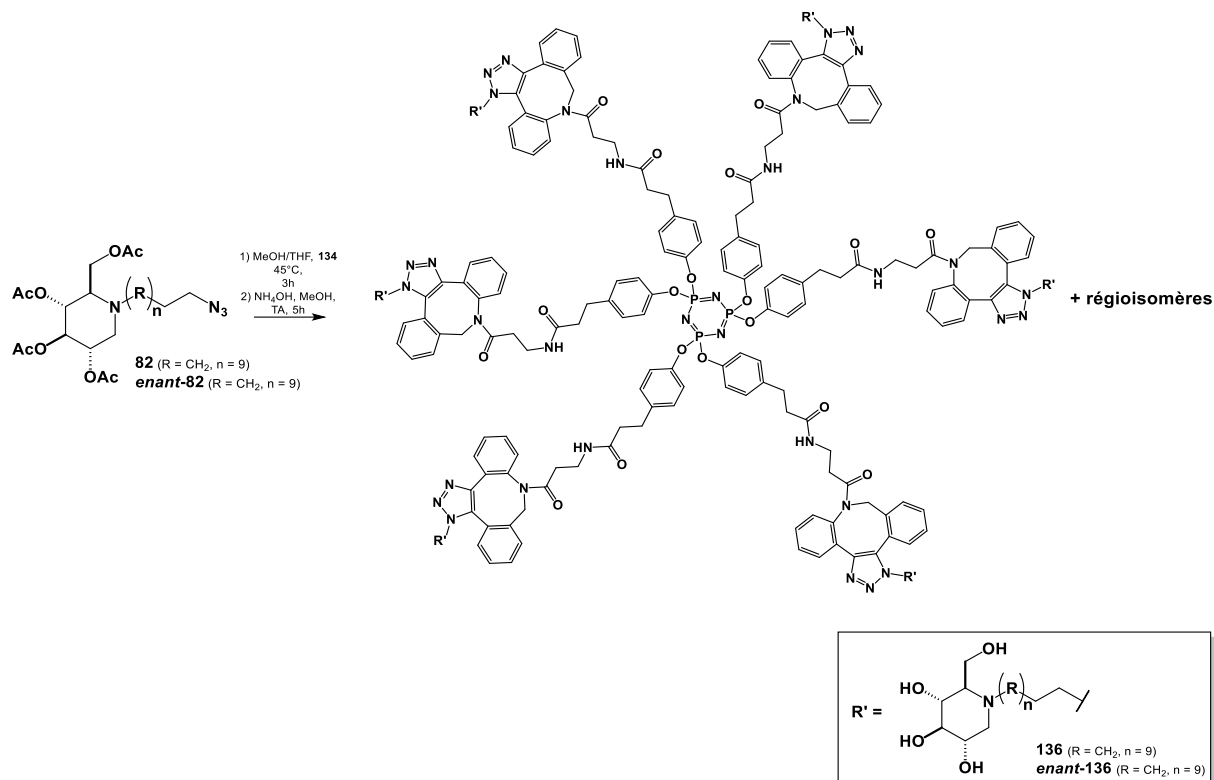
Figure 53 : Exemple de dérivés de cyclooctyne pour la SPAAC ²²⁴

Les cyclooctynes utilisés peuvent se diviser en deux groupes : les cyclooctynes aliphatiques et les cyclooctynes dibenzylés. Cette seconde classe est connue pour leur réactivité accrue par rapport aux cyclooctynes aliphatiques. Ce gain de réactivité est le résultat de la déformation du cyclooctyne par les nombreux carbones hybridés sp^2 . ²²⁴ Le premier représentant de cette classe est le DIBO (dibenzocyclooctyne) développé par Ning *et al.* ²²⁵ Depuis, des analogues plus réactifs comme le DIBAC ou le BARAC (biarylazacyclooctyne) ont été développés. Le BARAC étant très, voire trop réactif, il souffre d'un manque de stabilité et se décompose rapidement. Quant au DIBAC, aussi connu sous le nom de ADIBO ou DBCO, développé par Debets *et al.*, il offre un bon compromis entre réactivité et stabilité. ²²⁶ En effet, il est à la fois plus réactif que le DIBO est plus stable que le BARAC, ce qui en fait un cyclooctyne de choix pour la SPAAC. Aujourd'hui, de nombreux composés DIBO et DIBAC sont notamment développés pour des études biologiques de marquage ou d'imagerie moléculaire. ^{227,228}

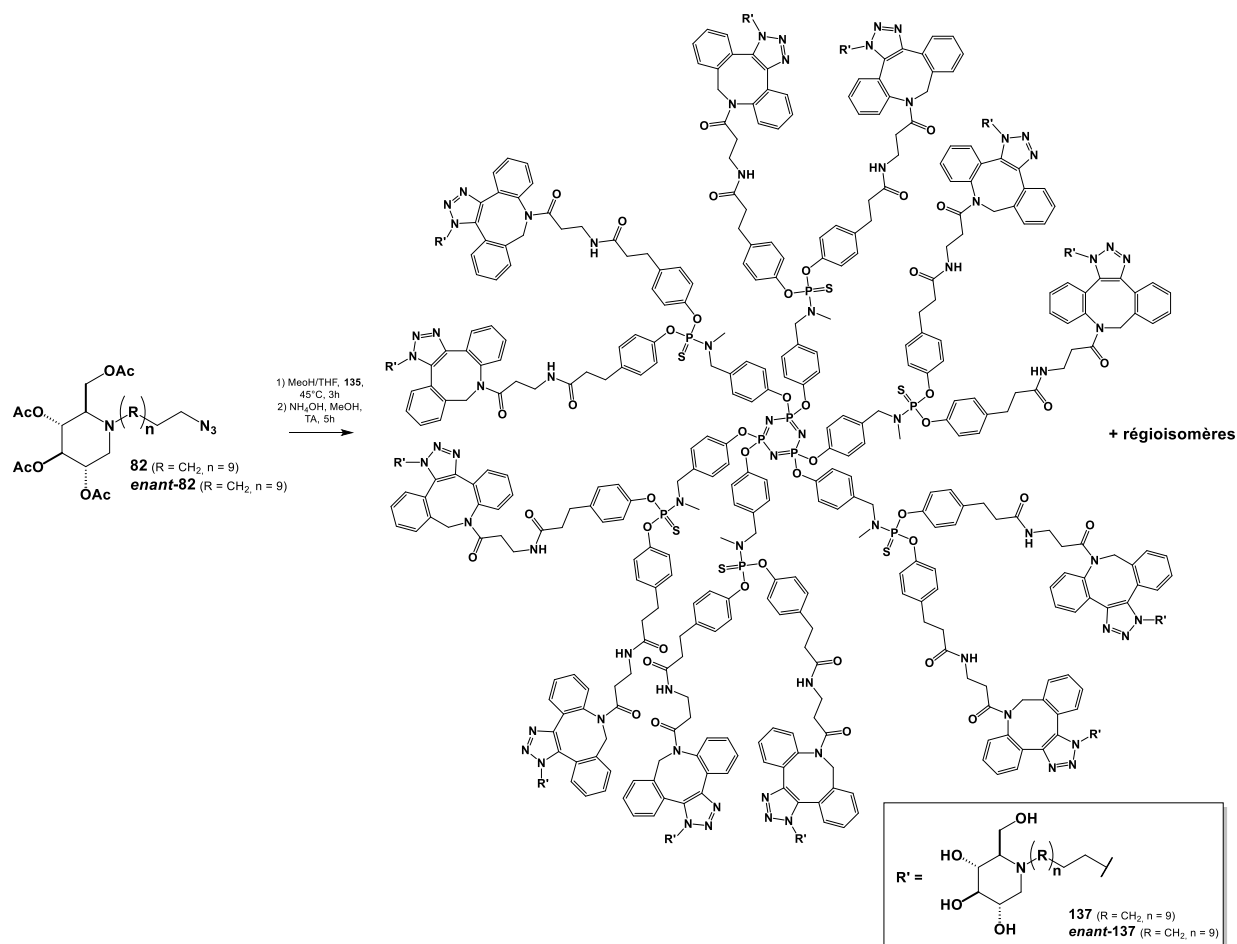
A partir des plateformes hexamériques **134** (G0) et dodécamériques **135** (G1) fonctionnalisées par des groupements DIBAC en notre possession, des composés multivalents ont été synthétisés (sous la forme d'un mélange de régioisomères). Le protocole expérimental a été mis au point par notre équipe lors de travaux antérieurs. ²¹⁶ La plateforme fonctionnalisée et le ligand d'intérêt, ici des dérivés de la L ou D-DNJ, ont été incubés dans un mélange de solvant THF/MeOH, puis mis sous agitation à 1200 rpm à 45°C pendant 5h, avec un suivi par MALDI-TOF. Une désacétylation en présence d'ammoniaque et de méthanol a ensuite été effectuée pour conduire aux composés désirés.

SYNTHESES DE LIGANDS MULTIVALENTS D'INTERET THERAPEUTIQUE

Les mélanges de régioisomères **136** et *enant-136* hexavalents, et **137** et *enant-137* dodécavalents ont été synthétisés en suivant ce protocole (Tableau 14). Par soucis de clarté, un seul régioisomère et énantiomère sera représenté pour chacune des réactions.



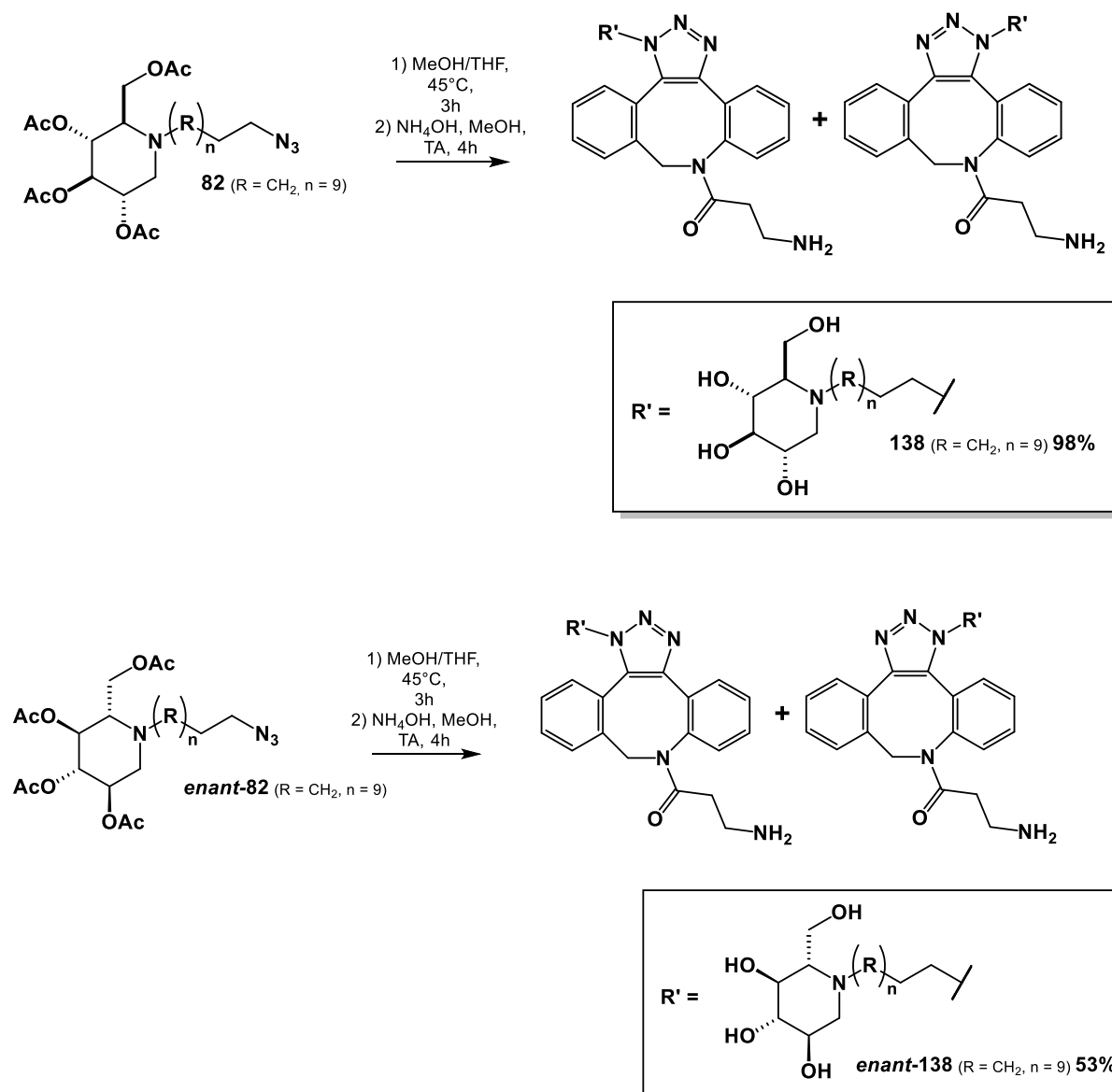
SYNTHESES DE LIGANDS MULTIVALENTS D'INTERET THERAPEUTIQUE



Composé	L/D	Espaceur	Rendement (%)
136	D	C11	78
enant-136	D	C11	50
137	L	C11	39
enant-137	L	C11	67

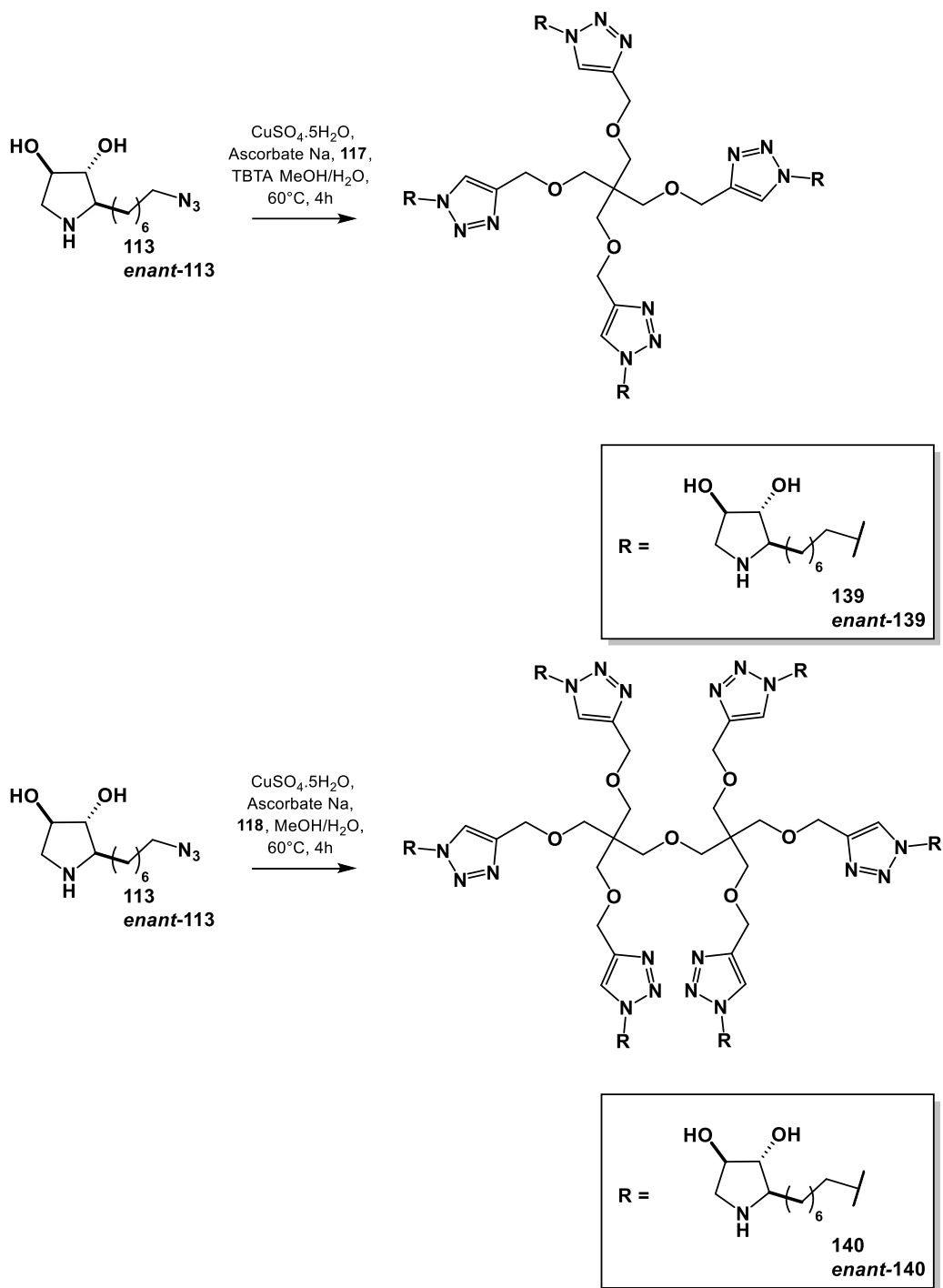
Tableau 14 : Rendements obtenus pour la synthèse des composés multivalents **136** et **137** et leurs énantiomères (seul l'énantiomère de forme D et un seul régioisomère est représenté)

Comme précédemment, des références monomériques ont été synthétisées avec de l'azidobenzocyclooctyne-amine commerciale afin de pouvoir évaluer les effets multivalents sur l'inhibition d'enzymes d'intérêt. La même voie de synthèse que pour les objets multivalents a été utilisée et les mélanges de régioisomères **138** et **enant-138** ont été synthétisés avec des rendements respectifs de **98%** et **53%** (Schéma 31).

Schéma 31 : Synthèse des composés monovalents **138** et *enant-138*

III.2. SYNTHESES DES OBJETS MULTIVALENTS DERIVES D'AR88 ET ENANT-AR88

La synthèse d'objets multivalents obtenus à partir de **113** et *enant-113* a été réalisée. Quatre objets multivalents ont été obtenus par chimie « click » de type CuAAC, puis purifiés par chromatographie d'exclusion stérique. Deux objets tétravalents **139** et *enant-139* ainsi que deux objets hexavalents **140** et *enant-140* ont été synthétisés (Tableau 15).

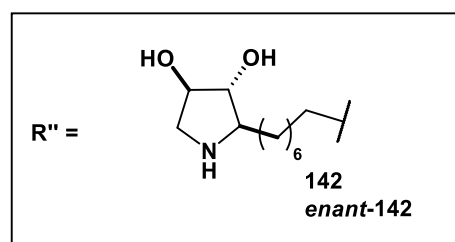
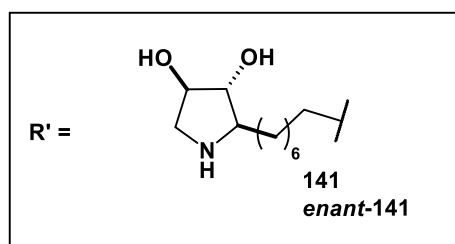
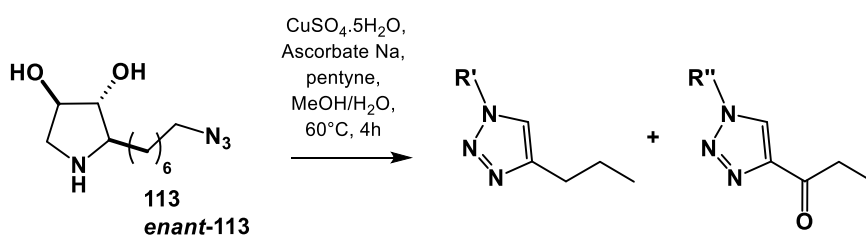


Composé	Rendement (%)
139	59
enant-139	51
140	53
enant-140	48

Tableau 15 : Rendement des composés multivalents **139** et **140** et leurs énantiomères (seul l'énantiomère analogue de l'AR88 est représenté)

Contrairement aux dérivés DNJ, les réactions de « click » avec les dérivés d'**AR88** et *enant-AR88* ont été réalisées directement avec les fonctions alcool libres, puis les produits obtenus ont été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique. Malgré l'obtention des objets multivalents souhaités en une seule étape de synthèse, les rendements restent modestes. Il serait peut-être préférable d'acétyler les composés **113** et *enant-113* avant de réaliser la réaction de « click », ce qui permettrait également de simplifier la méthode de purification.

Les composés monovalents **141** ou *enant-141* ont été synthétisés par réaction du **113** et *enant-113* avec du pentyne, avec des rendements respectifs de **57** et **80%** (Tableau 16). De nouveau, des sous-produits d'oxydations **142** et *enant-142*, en faible quantités ont été observés avec cette réaction. Contrairement aux monomères dérivés du D/L-DNJ, les sous-produits **142** et *enant-142* n'ont pas pu être séparés du produit souhaité, mais ont pu être quantifiés dans le mélange par RMN.



Composé	Rendement (%)	Rendement produits oxydés (%)
141	57	6
<i>enant-141</i>	80	8

Tableau 16 : Synthèse des composés **141** et *enant-141* et des sous-produits associés **142** et *enant-142*

III.3. SYNTHESES DES OBJETS MULTIVALENTS DE LA NAC

Les objets multivalents de la NAC ont été obtenus *via* une réaction de chimie « click » de type thiol-ène. Ce type de réaction forme une liaison thioether à partir d'un thiol et d'un alcène (Schéma 32).^{229,230}

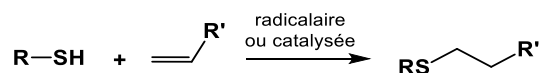


Schéma 32 : Réaction de type thiol-ène

Cette réaction est retrouvée dans de nombreux domaines de recherche allant de la chimie des matériaux pour la formation de polymères²³¹, de la chimie médicinale avec la chimie des peptides²³² ou des dendrimères^{210,233}, à des applications biomédicales avec des hydrogels²³⁴.

Contrairement à la CuAAC, ce type de réaction ne nécessite pas forcément un catalyseur métallique. Deux types de mécanisme sont possibles en fonction de la nature de l'alcène utilisé. Soit la fonction thioether est formée grâce à une réaction radicalaire, en présence ou non d'un amorceur (souvent un photoinitiateur), soit c'est un mécanisme ionique qui entre en jeu (Schéma 33).^{229,232,235,236} Si l'alcène est conjugué à un groupement électroattracteur, une addition de Michael aura lieu en présence d'un catalyseur basique, généralement une base azotée ou une phosphine.^{235,236} En revanche, si l'alcène est lié à un groupement électrodonneur alors la réaction aura lieu en condition acide.²³⁵

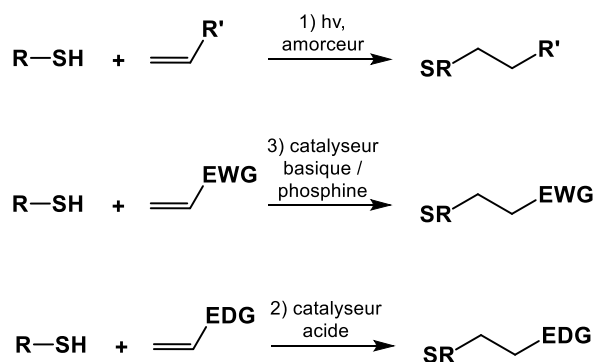
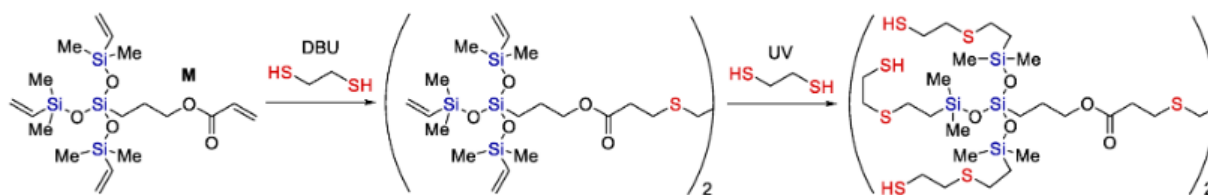


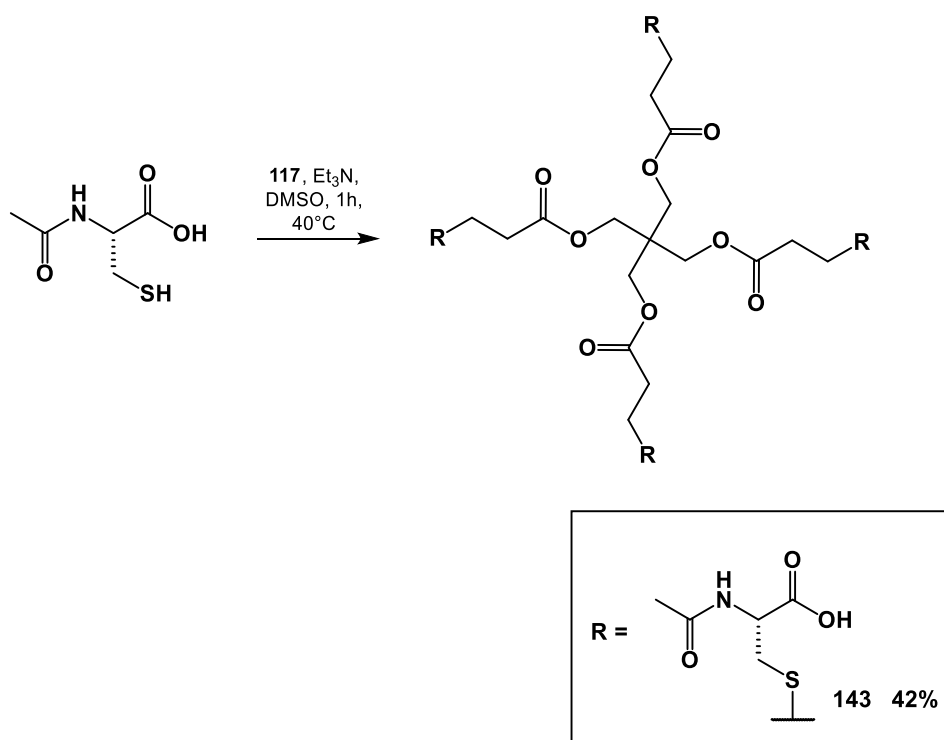
Schéma 33 : Différentes réactivités des réactions de type thiol-ène

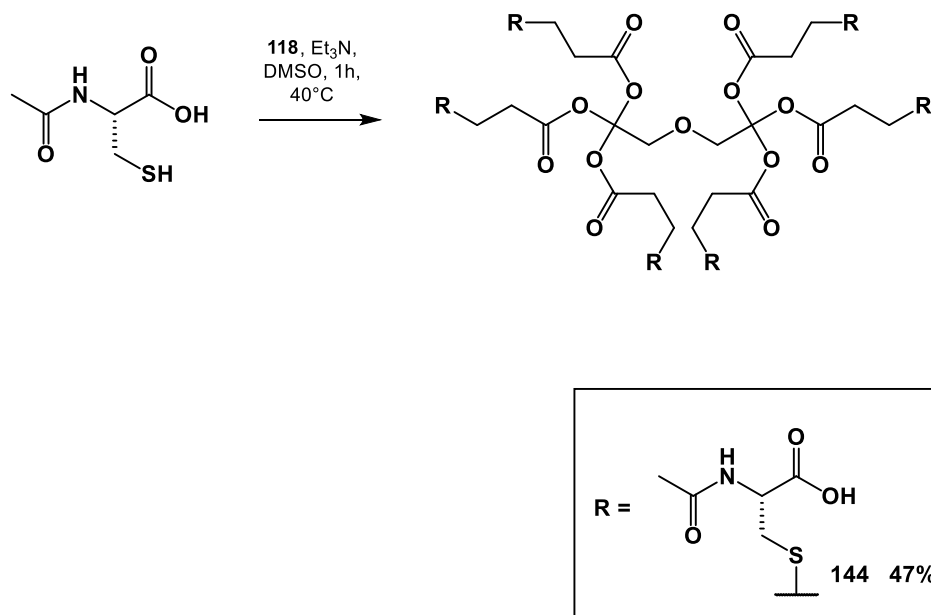
Les différentes réactivités qu'offre ce type de chimie permettent de combiner les réactions sans avoir de produits secondaires. Zhang *et al.* l'ont d'ailleurs démontré lors de leurs travaux portant sur la synthèse d'un dendrimère issu de deux réactions différentes de chimie de type thiol-ène. Une réaction de type addition de Michael est d'abord réalisée en présence de DBU, suivie d'une réaction radicalaire à l'aide de DMPA (2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone), un photoinitiateur, sous lampe UV.²³³ Ce cycle de réaction est répété afin de former des dendrimères à multiples générations (Schéma 34).

Schéma 34 : Différentes réactions de type thiol-ène sur un même composé ²³³

Dans notre cas, les plateformes utilisées portent un groupement électro attracteur conjugué à la double liaison. Une addition de Michael sera alors effectuée en présence de triéthylamine comme catalyseur. Une fois les composés obtenus, ils seront purifiés par HPLC (phase inverse).

Deux objets multivalents **143** et **144** ont ainsi été synthétisés (Schéma 35) selon le protocole décrit par Shen *et al.*²¹⁰ Cependant, les produits souhaités sont obtenus sous la forme de sels de triéthylammonium. Les composés sont purifiés par HPLC (phase inverse) à pH acide (pH = 2.5) afin de protoner les fonctions acides et décomplexer la triéthylamine. Les rendements des réactions après purification par HPLC sont de **42%** pour le composé tétravalent et **47%** pour le composé hexavalent. Une baisse importante de rendement est observée lors de la purification. Les conditions de purifications n'ont à ce jour pas été optimisées.



Schéma 35 : Synthèses des composés **143** et **144**

Pour cette famille de composés, il n'est pas utile de synthétiser une référence monomérique car la NAC peut être utilisée comme référence.

IV. CONCLUSION

Plus de 30 composés finaux, dont 18 objets multivalents et 8 références monovalentes, à partir de 5 pharmacophores, ont été synthétisés au cours de ce travail. L'ensemble des objets multivalents ont été obtenus par différentes réactions de chimie « click » (CuAAC, SPAAC et thiol-ène (addition de Michael)) avec des rendements modestes à élevés.

12 objets multivalents de valence allant de 4 à 12 ont été synthétisés avec les pharmacophores L et D-DNJ. L'ensemble des composés a été obtenu par chimie « click » de type CuAAC ou SPAAC, avec 4 types de plateformes différentes dont 2 dendrimères de haut poids moléculaire. En effet, deux objets synthétisés ont un poids moléculaire supérieur à $10700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Des rendements élevés ont été observés pour la synthèse des objets multivalents par réaction de « click » de type CuAAC (**57** à **100%** ; 2 étapes) et d'autres plus modestes pour ceux obtenus par SPAAC (**39** à **78%** ; 2 étapes). Il est important de rappeler que les objets multivalents obtenus par réactions de SPAAC sont un mélange de régioisomères. En revanche, des rendements plus faibles sont observés pour la synthèse des références monovalentes par CuAAC à cause du sous-produit d'oxydation formé lors de la réaction.

Deux objets multivalents de valence 4 et 6 ont été synthétisés avec le pharmacophore NAC, via une réaction de chimie « click » de type thiol-ène (addition de Michael), rapide et efficace. Cependant, des travaux d'optimisation, notamment pour l'étape de purification, sont à prévoir afin d'améliorer le rendement global de la réaction.

Quatre objets multivalents et deux références monovalentes ont été synthétisés avec les pharmacophores AR88 et *enant*-AR88, en collaboration avec le Dr. Tran. Ces objets ont été obtenus par chimie « click » de type CuAAC, avec des rendements modestes (**48** à **59%**). Une voie envisagée pour améliorer ces rendements serait d'acétyler les dérivés « clickables » **113** et *enant*-**113** avant la réaction de CuAAC. De plus, la purification des produits acétylés obtenus après réaction de « click » serait plus aisée. En outre, 4 analogues de *enant*-AR88 (*enant*-**103** à *enant*-**106**) et 1 dérivé analogue de AR88 (**103**) ont été synthétisés. Ces composés ont été obtenus par l'utilisation de différents aldéhydes et alcynes. L'étape d'allénylation énantiosélective permet l'utilisation d'aldéhydes variés et l'ensemble des aldéhydes commerciaux a permis d'obtenir les allènes correspondants. Parmi eux, 6 composés ont conduit à un produit cyclique après cyclisation intramoléculaire. L'étape de cyclisation intramoléculaire s'est avérée plus délicate, et seuls les dérivés pyrrolidines **95** et *enant*-**95** à *enant*-**98** ont pu être obtenus avec un rendement quantitatif, ainsi que le composé spiro *enant*-**107**, avec un rendement plus modeste. L'optimisation des conditions de cyclisation de ce dernier est en cours de réalisation. L'obtention de ce composé spiro en deux étapes ouvre la voie à une synthèse rapide d'autres composés spiro. Pour conclure, cette voie de synthèse a démontré la possibilité d'obtenir, facilement en 2 étapes, une variété de dérivés pyrrolidines, ainsi qu'un composé spiro.

EVALUATIONS BIOLOGIQUES SUR LES
GLYCOSIDASES D'INTERET

Les activités biologiques des différents composés dont la synthèse a été présentée dans le précédent chapitre ont été évaluées vis-à-vis de chacune des enzymes cibles (MGAM/ α -amylase, GAA et GCase). Les résultats expérimentaux sont présentés en fonction des trois maladies d'intérêt : DT2, MP et MG.

I. EVALUATIONS BIOLOGIQUES DES COMPOSES CONTRE LE DIABETE DE TYPE 2

Préalablement à l'évaluation de l'effet hypoglycémiant recherché dans le développement de traitement contre le DT2, des essais d'inhibition enzymatique préliminaires sur deux enzymes d'intérêt ont été effectués avec nos composés. Pour rappel, l'inhibition de l'activité catalytique de ces enzymes permet de réguler la glycémie chez les patients atteints de DT2. Les deux enzymes sélectionnées sont la *rhGAA* comme modèle pour la MGAM humaine et l' α -amylase pancréatique porcine.

I.1. EVALUATIONS DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES COMPOSES POUR LA GAA

La *rhGAA* a été choisie comme enzyme modèle pour remplacer la MGAM humaine qui n'est pas commerciale. Cette enzyme a été sélectionnée pour deux raisons :

- Elle fait partie de la même famille des α -glucosidases (EC.3.2.1.20) que la MGAM et diffère de cette dernière par sa localisation dans l'organisme ;¹¹
- Cette enzyme partage une forte homologie de séquence avec la MGAM (per id. > 44%, Query Cover > 98%) (Figure 54 ; Annexe 2).

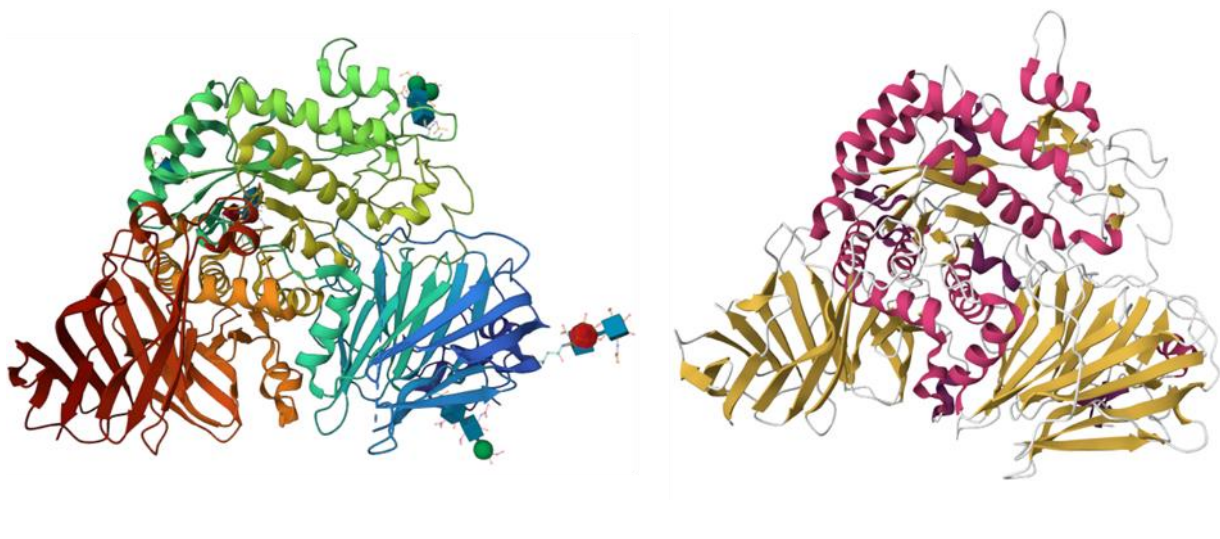


Figure 54 : Structure cristallographique de la GAA (PDB : 5NN3)¹⁴ à gauche et de la MGAM à droite (PDB : 2QLY)²³⁷

EVALUATIONS BIOLOGIQUES SUR LES GLYCOSIDASES D'INTERET

Afin de valider ce choix de modèle, nous avons comparé l'activité inhibitrice de deux références connues pour ces deux enzymes, l'acarbose et le miglitol. Ces deux composés sont deux traitements actuellement commercialisés pour leur activité inhibitrice envers la MGAM humaine contre le DT2. Pour ce faire, un test enzymatique reposant sur le dosage du produit de la réaction d'hydrolyse du substrat par l'enzyme, le 4-méthylumbelliferyl (4-MU), par spectroscopie de fluorescence à pH acide (pH = 4,3) ($\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) a été réalisé.

Il est retrouvé dans la littérature des IC_{50} variant de 5,7 à 22,1 μM pour l'acarbose et 3,7 μM pour le miglitol sur la MGAM.^{137,238} Nous avons constaté que ces valeurs sont proches de celles retrouvées avec la *rhGAA* (tableau 17), ce qui permet de valider ce choix de modèle.

Pour ce projet, nous nous sommes concentrés sur les composés possédant comme pharmacophore la D-DNJ (pharmacophore du miglitol). Comme décrit précédemment, ce pharmacophore est connu pour sa forte activité inhibitrice pour les glycosidases, notamment la GAA et la MGAM. L'activité inhibitrice de ces composés a donc été évaluée et les IC_{50} et effets multivalents sont rapportés Tableau 17.

Composé	Espaceur	Valence	IC_{50} (μM)	rp/n^*
acarbose	-	-	22,35 \pm 1,36	-
miglitol	-	-	0,991 \pm 0,093	-
127	PEG	1	1,024 \pm 0,077	-
121	PEG	4	0,508 \pm 0,053	<1
124	PEG	6	0,733 \pm 0,059	<1
128	C6	1	0,175 \pm 0,005	-
122	C6	4	0,032 \pm 0,002	1,4
125	C6	6	0,043 \pm 0,004	<1
129	C11	1	0,240 \pm 0,037	-
123	C11	4	0,011 \pm 0,001	5,7
126	C11	6	0,023 \pm 0,001	1,8
138	C11	1	0,033 \pm 0,005	-
136	C11	6	0,038 \pm 0,005	<1
137	C11	12	0,401 \pm 0,026	<1

* $rp = (IC_{50} \text{ monovalent}) / (IC_{50} \text{ multivalent})$

Tableau 17 : IC_{50} et effet multivalent des composés 121 à 138 vis-à-vis de la *rhGAA*

L'ensemble des composés synthétisés testés se sont révélés être de très bons inhibiteurs de la *rhGAA* avec des IC_{50} allant de 10,5 à 1024 nM. Les composés multivalents ont montré des IC_{50} inférieures aux références (miglitol et acarbose). Pour les composés multivalents 121 à 126 obtenus avec une plateforme de type pentaérytritol et leurs références monovalentes 127, 128 et 129 correspondantes, trois constats peuvent être formulés :

- Tous les composés multivalents sont de meilleurs inhibiteurs que leur référence monovalente respective. Des effets multivalents avec des rapports rp/n allant de 1,4 à 5,7 ont pu être observés avec les composés 122, 123 et 126. A notre connaissance, le composé 123 ($IC_{50} = 10,5 \text{ nM}$) possède l'effet multivalent le plus élevé observé sur l'inhibition de la *rhGAA*. Ce composé est respectivement 94 et 2000 fois plus inhibiteur pour la *rhGAA* que le miglitol et l'acarbose

- A valence égale, les composés avec l'espaceur alkyle C6 et C11 sont des inhibiteurs 5 à 70 fois plus puissants que ceux avec l'espaceur PEG. La substitution d'une chaîne alkyle par un espaceur moins hydrophobe diminue l'activité inhibitrice du composé ;
- Pour un espaceur donné, l'objet tétramérique est plus inhibiteur que l'objet hexamérique. Cette baisse d'activité peut être imputée soit à la plateforme par sa nature ou sa géométrie spatiale, soit à l'augmentation de la valence. L'augmentation de la valence au-delà de 4 ne permet pas d'améliorer l'activité inhibitrice des dérivés D-DNJ pour la *rhGAA*.

Pour les composés multivalents **136** et **137** obtenus avec une plateforme à cœur cyclotriphosphazène et leur référence monovalente **138** (mélanges de régioisomères) deux observations peuvent être établies :

- Le composé **138** monomérique, est un excellent inhibiteur avec une IC_{50} de 32,9 nM. C'est le composé monovalent D-DNJ le plus inhibiteur de la *rhGAA* comparé aux inhibiteurs dérivés de la D-DNJ décrits dans la littérature. Il est 8 fois plus puissant que la D-DNJ elle-même (IC_{50} = 150 nM) ;⁹⁷
- Le composé multivalent **136** de valence 6 est meilleur inhibiteur que le composé **137** de valence 12.

L'ensemble de ces résultats apporte des informations importantes sur l'effet de la multivalence sur l'inhibition de la *rhGAA*. Premièrement, la *rhGAA* est sensible à la multivalence et un effet multivalent a pu être observé pour trois des composés testés. Le rapport *rp/n* maximum est de 5,7, ce qui est à ce jour l'effet multivalent sur l'inhibition de la *rhGAA* le plus élevé observé avec ce pharmacophore, même s'il reste modeste. Deuxièmement, l'augmentation de la valence ne permet pas forcément d'améliorer l'activité inhibitrice.

Pour conclure, le recours à la multivalence avec les dérivés D-DNJ est sans nul doute une piste intéressante à exploiter pour le développement de nouveaux traitements hypoglycémiantes contre le DT2, étant donné la forte activité inhibitrice des composés multivalents synthétisés. De plus, un composé monovalent, le composé **138**, possédant le même pharmacophore que le miglitol lié à un groupement DIBAC, présente une activité inhibitrice environ 30 fois supérieure au miglitol. L'impact du groupement DIBAC sur l'activité inhibitrice est en cours d'évaluation *via* des études de cristallographie et de modélisation moléculaire. Il sera intéressant de poursuivre cette étude, en évaluant l'effet hypoglycémiant des composés les plus inhibiteurs par des tests *in vivo* sur modèle murin.

I.2. EVALUATIONS DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES COMPOSES POUR L' α -AMYLASE

Par la suite, quelques composés ont été évalués pour leur activité inhibitrice envers l' α -amylase, une glycosidase d'intérêt contre le DT2. Ce test enzymatique repose sur le dosage colorimétrique par l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) du glucose. L'enzyme hydrolyse l'amidon, libérant ainsi des unités glucoses capables de réduire le DNS en acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur rouge ($\lambda_{abs} = 540$ nM). L'enzyme choisie comme modèle pour ces tests d'activité est l' α -amylase porcine pancréatique qui est une α -amylase intestinale de mammifère commerciale. Pour valider notre méthode, nous avons évalué la capacité inhibitrice des deux références acarbose et miglitol et les avons comparés à la littérature. Comme décrit dans la littérature, seul l'acarbose a montré une activité inhibitrice avec une $IC_{50} = 7,38$ μ M proche de celle décrite par Kulkarni *et al.* (IC_{50} =15,0 μ M)²³⁹ et

Timalsina *et al.* ($IC_{50}=9,8 \mu M$)²⁴⁰ pour l' α -amylase porcine pancréatique et par Yilmazer-Musa *et al.* ($IC_{50}= 10,7 \mu M$)²⁴¹ pour l' α -amylase salivaire humaine.

Les activités inhibitrices des composés multivalents **121** à **137** et le composé monovalent **138** ont été évaluées et rapportées *Tableau 18*. Ces composés ont été sélectionnés pour deux raisons. La première car ce sont ceux qui ont montré une bonne activité inhibitrice sur la rhGAA comme modèle de la MGAM humaine. La deuxième est que ce sont des composés multivalents. En effet, cette enzyme catalyse préférentiellement l'hydrolyse de sucres complexes grâce aux nombreux sous-sites de liaison présents à sa surface qui permettent d'augmenter l'affinité de ces sucres complexes pour la protéine, ce qui laisse penser qu'elle serait sensible à l'effet multivalent.

Composé	Espaceur	Valence	IC_{50} (μM)	rp/n^*
acarbose	-	-	$7,38 \pm 1,33$	-
miglitol	-	-	NI**	-
121	PEG	4	NI**	-
124	PEG	6	NI**	-
122	C6	4	NI**	-
125	C6	6	NI**	-
123	C11	4	NI**	-
126	C11	6	NI**	-
138	C11	1	NI**	-
136	C11	6	NI**	-
137	C11	12	NI**	-

* $rp = (IC_{50} \text{ monovalent}) / (IC_{50} \text{ multivalent})$; ** 2 mM

Tableau 18 : IC_{50} et effet multivalent des composés 121 à 138 vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique

Aucun de ces composés n'a montré d'activité inhibitrice envers l' α -amylase pancréatique porcine. La multivalence n'a pas permis d'améliorer l'activité inhibitrice du pharmacophore D-DNJ vis-à-vis de cette enzyme. L'ensemble de ces composés sont donc totalement sélectifs de la MGAM vis-à-vis de de l' α -amylase pancréatique.

Dans l'éventualité de trouver de nouveaux pharmacophores inhibiteurs de cette enzyme, des évaluations de la capacité inhibitrice des composés monovalents et multivalents dérivés de l'AR88 et son énantiomère ont été réalisées. Les résultats sont rapportés dans le *Tableau 19*.

Composé	Dérivé	Valence	IC ₅₀ (μM) / %inhibition	rp/n*
acarbose	-	-	7,38 ±1,33	-
miglitol	-	-	NI**	-
141	AR88	1	NI**	-
139	AR88	4	NI**	-
140	AR88	6	NI**	-
<i>enant-141</i>	<i>enant-AR88</i>	1	NI**	-
<i>enant-139</i>	<i>enant-AR88</i>	4	NI**	-
<i>enant-140</i>	<i>enant-AR88</i>	6	100%** 100%***	-

* rp =(IC₅₀ monovalent)/(IC₅₀ multivalent) ; **évaluée à 2 mM ; ***évaluée à 2 μM

Tableau 19 : IC₅₀ et effet multivalent des composés 139 à 141 vis-à-vis de l'α-amylase pancréatique

Aucun des composés évalués, excepté le composé **enant-140**, n'a montré d'activité inhibitrice pour l'α-amylase porcine pancréatique. En effet, seul ce composé a totalement inhibé l'activité catalytique de l'enzyme à 2 μM. Ce composé devrait donc être testé à des concentrations plus faibles.

Pour conclure, il a été observé que l'ensemble des composés, excepté le composé **enant-140**, sont non-inhibiteurs de l'α-amylase porcine pancréatique et sont donc totalement sélectifs vis-à-vis de la rhGAA. La multivalence n'a pas permis d'observer une activité inhibitrice avec ces composés. En revanche, le composé **enant-140** possède une forte activité inhibitrice pour cette enzyme. Il serait donc intéressant de déterminer son IC₅₀ et tenter de comprendre pourquoi seul ce composé s'est révélé être inhibiteur.

II. EVALUATIONS BIOLOGIQUES DES COMPOSES CONTRE LA MALADIE DE POMPE

Pour rappel, l'enzyme déficiente impliquée dans la MP est la GAA. Avant d'évaluer la capacité chaperon des composés synthétisés pour cette enzyme, plusieurs tests enzymatiques préliminaires ont été réalisés. En premier lieu, l'activité inhibitrice des composés a été évaluée sur une enzyme recombinante humaine (rhGAA) afin de déterminer les concentrations qui seront utilisées pour les tests d'activités chaperon et d'évaluer un potentiel effet de multivalence sur l'inhibition. Dans un second temps, la stabilisation de la rhGAA par les composés a été évaluée *in vitro* par DSF et par dénaturation thermique. A partir de ces résultats préliminaires, l'évaluation de l'activité chaperon de certains composés a été effectuée sur trois types de fibroblastes de patients atteints de la MP, fournis par le Pr. Levade (Institut fédératif de biologie, Toulouse), en collaboration avec le Dr. GIBOT (Laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique, Toulouse).

II.1. EVALUATIONS DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES COMPOSES VIS-A-VIS DE LA GAA

Dans un premier temps, nous avons vérifié la validité de notre test en comparant l'IC₅₀ de l'acarbose et du miglitol obtenue par rapport aux valeurs de la littérature. Pour rappel une IC₅₀ de 22,35 µM pour l'acarbose a été déterminé, une valeur d'un ordre de grandeur similaire à celle retrouvée par Okumyia *et al.* (59 µM) sur une *rhGAA*.⁹⁰ L'IC₅₀ obtenu du miglitol est de 0,991 µM, une valeur proche de celle retrouvée par Kato *et al.* (3,7 µM).⁹⁷

Puis, les IC₅₀ de chacun des composés ont été déterminés. Les résultats enzymatiques seront présentés en fonction des pharmacophores de chaque composé.

II.1.1. PHARMACOPHORE D-DNJ

Les activités inhibitrices des composés **121** à **138** ont été évaluées, et ont été rapportées précédemment (partie I.1) dans le *tableau 17*, que nous rappelons ci-dessous. Le principe du test enzymatique a été décrit précédemment (partie I.1) et est détaillé dans la partie expérimentale.

Composé	Espaceur	Valence	IC ₅₀ (µM)	rp/n*
acarbose	-	-	22,35 ±1,36	-
miglitol	-	-	0,991 ±0,093	-
127	PEG	1	1,02 ±0,078	-
121	PEG	4	0,508 ±0,053	<1
124	PEG	6	0,733 ±0,059	<1
128	C6	1	0,175 ±0,005	-
122	C6	4	0,032 ±0,002	1,4
125	C6	6	0,043 ±0,004	<1
129	C11	1	0,240 ±0,037	-
123	C11	4	0,011 ±0,001	5,7
126	C11	6	0,023 ±0,001	1,8
138	C11	1	0,033 ±0,005	-
136	C11	6	0,038 ±0,005	<1
137	C11	12	0,401 ±0,026	<1

* $rp = (IC_{50} \text{ monovalent}) / (IC_{50} \text{ multivalent})$

Tableau 17 : IC₅₀ et effet multivalent des composés **127** à **138** sur la *rhGAA*

Pour rappel, il a été conclu que la *rhGAA* est sensible à la multivalence et des effets multivalents ont pu être observés avec trois composés (**122**, **123** et **126**). Un rapport *rp/n* de 5,7, ce qui est à ce jour l'effet multivalent sur l'inhibition de la *rhGAA* le plus élevé observé avec ce pharmacophore a été évalué. De plus, l'ensemble des composés multivalents ont montré des activités inhibitrices supérieures à celles des références monovalentes. En revanche, l'augmentation de la valence ne permet pas forcément d'améliorer l'activité inhibitrice.

II.1.2. PHARMACOPHORE L-DNJ

Contrairement à son énantiomère, la L-DNJ est non-inhibitrice vis-à-vis de la GAA.³⁸ Six composés multivalents porteurs de ce pharmacophore ont été synthétisés et leurs capacités inhibitrices ont été évaluées (Tableau 20). Tous ces composés possèdent un espaceur de type C11 afin de comparer leur activité avec leur énantiomère respectif (exceptés pour les composés **enant-136** à **enant-138** qui sont des mélanges de régioisomères). Les IC₅₀ des composés **enant-129** et **enant-136** n'ont pas pu être déterminés car ces deux composés sont trop faiblement inhibiteurs de la rhGAA.

Composé	Espaceur	Valence	IC ₅₀ (μM) / %inhibition	rp/n*
acarbose	-	-	22,35 ±1,36	-
miglitol	-	-	0,991 ±0,093	-
enant-129	C11	1	21%**	-
enant-123	C11	4	95,2 ±25,0	35
enant-126	C11	6	25,6 ±3,4	53
enant-138	C11	1	25,8 ±3,1	-
enant-136	C11	6	17%***	-
enant-137	C11	12	NI***	-

* rp = (IC₂₁ monovalent)/(IC₂₁ multivalent) ; **évaluée à 2mM ; ***évaluée à 1mM

Tableau 20 : IC₅₀ et effet multivalent des composés **enant-129** à **enant-137** sur la rhGAA

Au vu des résultats, trois constats peuvent être formulés :

- Les composés multivalents **enant-123** et **enant-126** (plateforme pentaérythritol) sont plus inhibiteurs que leur référence monovalente et une approximation des effets multivalents avec des rapports rp/n de 35 et 53 respectivement a été estimée à partir de leurs IC₂₁ (concentration correspondant à 21% d'inhibition) car l'IC₅₀ de la référence monovalente **enant-129** n'a pas pu être déterminée ;
- Pour les composés ayant une plateforme à coeur pentaérythritol, le composé hexamère est plus inhibiteur que le composé tétramère ;
- Les composés hexavalent **enant-136** et dodécavalent **enant-137** (plateforme à coeur cyclotriphosphazène) sont moins inhibiteurs que leur référence monovalente. L'effet du groupement DIBAC semble augmenter légèrement l'activité inhibitrice de ce pharmacophore. Cette observation a également été faite pour les dérivés de D-DNJ. De plus, la forme hexamérique est faiblement inhibitrice alors que la forme dodécamérique ne l'est pas.

Certains composés se sont révélés être inhibiteurs de la rhGAA et sont, à notre connaissance, les premiers dérivés L-DNJ montrant une activité inhibitrice sur cette enzyme.³⁸ Ces composés restent cependant de faibles inhibiteurs, environ 1000 fois moins puissants que leurs équivalents dérivés de D-DNJ. Des observations similaires à celles observées avec leur énantiomère ont été établies. Premièrement, la rhGAA semble sensible à la multivalence et de forts effets multivalents extrapolés à partir de l'IC₂₁ de 25 et 53 ont été observés pour deux composés. Deuxièmement, le groupement DIBAC influe fortement sur l'activité inhibitrice. En revanche, l'influence de la valence est plus difficile à

évaluer avec ce pharmacophore. En effet, l'activité inhibitrice croit lorsque la valence augmente pour les composés **enant-123** et **enant-126**, alors qu'elle décroît avec les composés **enant-136** et **enant-137**.

II.1.3. PHARMACOPHORE AR88 ET ENANT-AR88

L'activité inhibitrice des dérivés des pyrrolidines AR88 et *enant*-AR88 a été évaluée. Ces résultats nous permettront également d'évaluer la sélectivité de ces composés pour la GCCase (partie III.).

Les activités inhibitrices des composés **139** à **141**, de leurs énantiomères ainsi que des analogues de AR88 (**103**) et *enant*-AR88 (**enant-103** à **enant-106**) ont été évaluées et rapportées *Tableau 21*.

Composé	Dérivé	Valence	IC ₅₀ (μM) / %inhibition	rp/n*
AR88	-	-	23%**	-
<i>enant</i> -AR88	-	-	76%**	-
141	AR88	1	86%**	-
139	AR88	4	92,30 ±6,76	-
140	AR88	6	65,10 ±5,72	-
103	AR88	1	299,13 ±96,40	-
<i>enant</i> - 141	<i>enant</i> -AR88	1	225,31 ±20,48	-
<i>enant</i> - 139	<i>enant</i> -AR88	4	78,15 ±16,17	<1
<i>enant</i> - 140	<i>enant</i> -AR88	6	18,97 ±5,04	2,0
<i>enant</i> - 103	<i>enant</i> -AR88	1	NI**	-
<i>enant</i> - 104	<i>enant</i> -AR88	1	NI**	-
<i>enant</i> - 105	<i>enant</i> -AR88	1	NI**	-
<i>enant</i> - 106	<i>enant</i> -AR88	1	NI**	-

* $rp = (IC_{50} \text{ monovalent}) / (IC_{50} \text{ multivalent})$; **évaluée à 2mM ;

Tableau 21 : IC₅₀ et effet multivalent des composés **103** à **141** et des énantiomères sur la rhGAA

Pour les composés multivalents **139** et **140** et leurs énantiomères obtenus avec une plateforme de type pentaérytritol et leur référence monovalente **141** et *enant*-**141** correspondante, on peut observer que :

- Pour une même valence, les composés issus de *enant*-AR88 sont plus inhibiteurs que ceux issus de AR88 ;
- Les composés monovalents sont moins inhibiteurs que les objets multivalents correspondants. Un effet multivalent avec un *rp/n* de 2 a été déterminé avec le composé hexamérique *enant*-**140** ;
- Les composés hexavalents **140** et *enant*-**140** sont plus inhibiteurs que les composés tétravalents **139** et *enant*-**139**.

Pour les composés analogues dérivés d'*enant*-AR88 (composés **enant-103** à **enant-106**), aucune activité inhibitrice n'a été observée sur la *rhGAA*. Ces résultats indiquent soit que la chaîne alkyle est nécessaire à l'activité inhibitrice de ce pharmacophore vis-à-vis de la *rhGAA*, soit que substituer la chaîne par un groupement plus encombrant nuit à la liaison ligand-enzyme. Il serait intéressant de faire une étude par arrimage moléculaire pour rationaliser ces résultats. En revanche, pour le composé **103**, dérivé de l'AR88, une activité inhibitrice plus forte que la référence AR88 pour la *rhGAA* est observée ($IC_{50} = 299 \mu M$).

Pour conclure, tous les objets multivalents synthétisés sont plus inhibiteurs que leur référence monovalente et un effet multivalent avec le composé **enant-140** a été observé. En revanche, la modification du pharmacophore *enant*-AR88 n'a pas conduit à une amélioration de l'activité inhibitrice, alors que cela a été le cas pour le composé **103** dérivé de l'AR88. Les groupements positionnés en alpha de l'azote central joue donc un rôle primordial sur l'activité inhibitrice vis-à-vis de la *rhGAA*. De plus, pour une plateforme donnée, les objets avec le pharmacophore AR88 ou *enant*-AR88 ont montré une puissance inhibitrice 1000 fois plus faible par rapports à leur équivalents avec le pharmacophore D-DNJ.

II.1.4. PHARMACOPHORE NAC

La molécule de NAC est décrite comme non-inhibitrice de la GAA dans la littérature à une concentration de 10 mM.⁹⁹ L'activité inhibitrice de ses dérivés multivalents **143** et **144** a été évaluée et rapportée *Tableau 22*.

Composé	Valence	IC_{50} (μM)	<i>rp/n</i> *
NAC	1	NI**	-
143	4	NI**	-
144	6	43,25 \pm 3,58	-

* $rp = (IC_{50} \text{ monovalent}) / (IC_{50} \text{ multivalent})$; **évaluée à 2mM

*Tableau 22 : IC_{50} et effet multivalent des composés NAC, **143** et **144** sur la *rhGAA**

En accord avec la littérature, NAC n'est pas inhibiteur de la *rhGAA* à 2 mM. Le même résultat a été obtenu avec le composé tétramérique **143**. En revanche, une activité inhibitrice avec le composé hexamérique **144** a été observée avec une IC_{50} évaluée à 43,3 μM . Aucun effet multivalent n'est calculé pour le composé **144**, étant donné que la référence monomérique utilisée, la NAC, est non-inhibitrice.

II.2. EVALUATION DE LA CAPACITE STABILISATRICE DES COMPOSES POUR LA GAA

II.2.1. PRESENTATION DE LA DSF ET VALIDATION DU PROTOCOLE

La capacité des composés à stabiliser l'enzyme *rhGAA* a été évaluée par DSF. Cette technique permet de déterminer si un composé est ligand de la protéine et si sa liaison a un effet stabilisant ou déstabilisant sur celle-ci. Le principe de cette technique repose sur l'interaction ligand-protéine (Figure 55). La protéine est incubée et chauffée en présence d'un colorant, le SYPRO orange. Le SYPRO orange dont la longueur d'onde d'absorption maximale est à 490 nm et la longueur d'onde d'émission à 530 nm possède la particularité d'avoir un rendement quantique de fluorescence faible en milieu hydrophile et élevé en milieu hydrophobe. Au cours de la montée en température, la protéine va se dénaturer, exposant ainsi ses parties hydrophobes au colorant. Les interactions SYPRO orange-protéines de plus en plus nombreuses vont augmenter la valeur de fluorescence jusqu'à un maximum correspondant à une dénaturation totale de la protéine. Au-delà de ce plateau, le temps et la montée en température vont provoquer l'agrégation des parties hydrophobes des protéines dénaturées, limitant ainsi les interactions SYPRO orange-protéines et expliquant la baisse de fluorescence. A partir du plateau haut et bas de la fluorescence, le T_m « melting temperature » de la protéine peut être déterminé. Celui-ci correspond à la température à laquelle la protéine est dénaturée à 50%. Un composé est considéré ligand de la protéine si, en sa présence, la valeur de T_m de la protéine augmente ou diminue. Il est important d'ajouter que plus le ΔT_m (différence de température entre le T_m de la protéine seul et celui en présence de ligand) est grand, plus cela traduit une stabilisation importante de la protéine induite par le ligand.

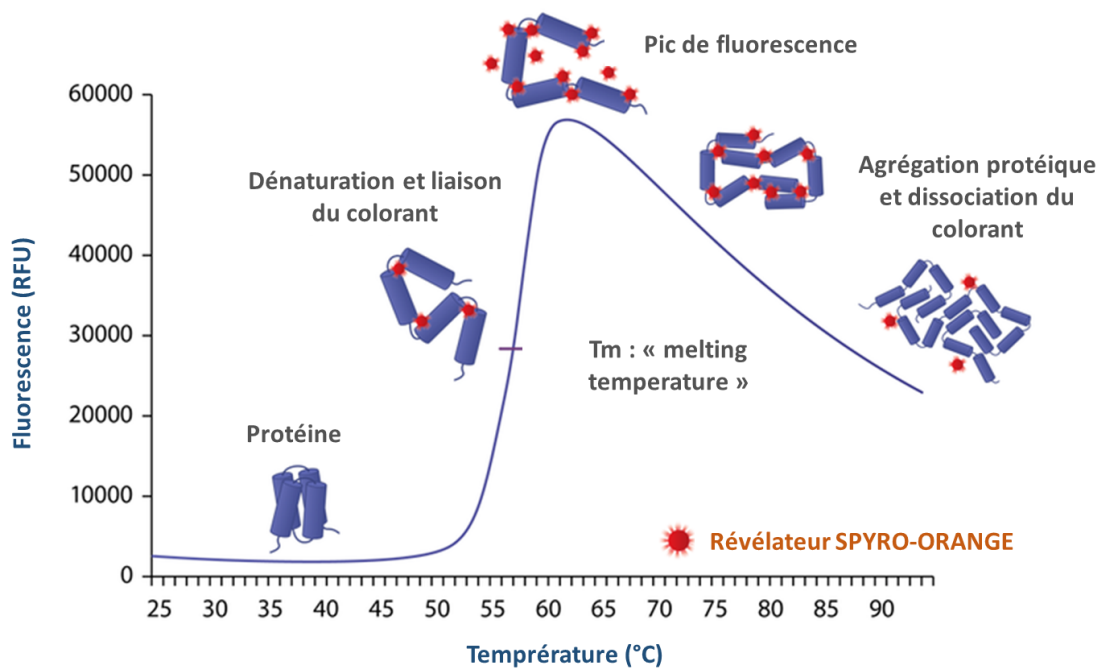


Figure 55 : Schéma général d'une courbe de fluorescence obtenu par DSF (extrait de ²⁴²)

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie a été obtenu avec un CFX96 Real-Time PCR system issu de la plateforme intégrée de criblage de Toulouse (PICT) (TOULOUSE).

Le protocole expérimental utilisé pour obtenir les résultats présentés ci-dessous est adapté du protocole décrit par Bruckmann *et al.*⁵⁵ La protéine utilisée pour le test provient du Myozyme® la concentration protéique utilisée est de 1 mg.mL⁻¹, une concentration 10 fois plus importante que pour l'étude de Bruckmann, mais qui est nécessaire à l'observation du signal. Ces tests n'auraient pas pu être réalisés avec l'enzyme recombinante (R&D systems) utilisée pour les tests d'inhibition à cause de la quantité en protéine trop importante nécessaire.

Dans l'étude de Bruckmann, le T_m de la *rhGAA* est de 64,2 +/- 0,4°C à pH = 4.3 ou 67,9 +/- 0,9°C à pH = 7.0. Un T_m de 63,5 +/- 0,3°C à pH = 7.0 a été déterminé pour la *rhGAA* selon notre protocole. Une légère différence de T_m a été observée mais les valeurs restent du même ordre de grandeur.

Afin de valider notre protocole, les T_m de la *rhGAA* en présence de 2 ligands, l'acarbose et la D-NN-DNJ (*Figure 10*) ont été déterminés. Les valeurs de T_m et les ΔT_m en présence de ces composés obtenues selon notre protocole et par Bruckmann sont similaires, ce qui permet de valider la méthode expérimentale (*Tableau 23*).

Composé	[C] (μM)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	T_m (°C) (référence)*	ΔT_m (°C) (référence)*
Acarbose	2000	71,3 ±0,3	7,8	70	5,8
D-NN-DNJ	2,5	68,6 ±0,3	5,1	67	2,8

*valeur de l'étude de Bruckmann *et al.*⁵⁵

Tableau 23 : Valeurs de T_m et ΔT_m de la *rhGAA* avec l'acarbose et le D-NN-DNJ

L'ensemble des composés a été évalué selon ce protocole et les résultats seront présentés en fonction des pharmacophores de chaque composé. Les concentrations maximales sélectionnées dans cette étude sont identiques pour chaque pharmacophore et sont d'environ 100 fois la valeur de l'IC₅₀.

II.2.2. PHARMACOPHORE D-DNJ

Les différentes capacités stabilisatrices des objets multivalents **121** à **127** et du composé monovalent **138** ont été évaluées à trois concentrations différentes et rapportées *Tableau 24*.

Composé	Espaceur	Valence	[C] (μM)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)*
Acarbose			2000	71,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,3
D-NN-DNJ			25	75,5 \pm 0,3	12,0 \pm 0,3
121	PEG	4	0,25	63,8 \pm 0,3	-
			2,5	69,2 \pm 0,3	5,7 \pm 0,3
			25	75,2 \pm 0,3	11,7 \pm 0,3
124	PEG	6	0,25	63,5 \pm 0,3	-
			2,5	69,2 \pm 0,3	5,7 \pm 0,3
			25	75,8 \pm 0,3	12,3 \pm 0,3
122	C6	4	0,25	63,5 \pm 0,3	-
			2,5	74,9 \pm 0,3	11,4 \pm 0,3
			25	79,7 \pm 0,3	16,2 \pm 0,3
125	C6	6	0,25	63,8 \pm 0,3	-
			2,5	76,4 \pm 0,3	12,9 \pm 0,3
			25	79,4 \pm 0,3	15,9 \pm 0,3
123	C11	4	0,25	63,5 \pm 0,3	-
			2,5	65,3 \pm 0,3	1,8 \pm 0,3
			25	80,9 \pm 0,3	17,4 \pm 0,3
126	C11	6	0,25	63,5 \pm 0,3	-
			2,5	63,5 \pm 0,3	-
			25	79,7 \pm 0,3	16,2 \pm 0,3
138	C11	1	0,25	63,5 \pm 0,3	-
			2,5	63,5 \pm 0,3	-
			25	74,3 \pm 0,3	10,8 \pm 0,3
136	C11	6	0,25	63,5 \pm 0,3	-
			2,5	63,5 \pm 0,3	-
			25	76,4 \pm 0,3	12,9 \pm 0,3
137	C11	12	0,25	63,8 \pm 0,3	-
			2,5	63,8 \pm 0,3	-
			25	63,8 \pm 0,3	-

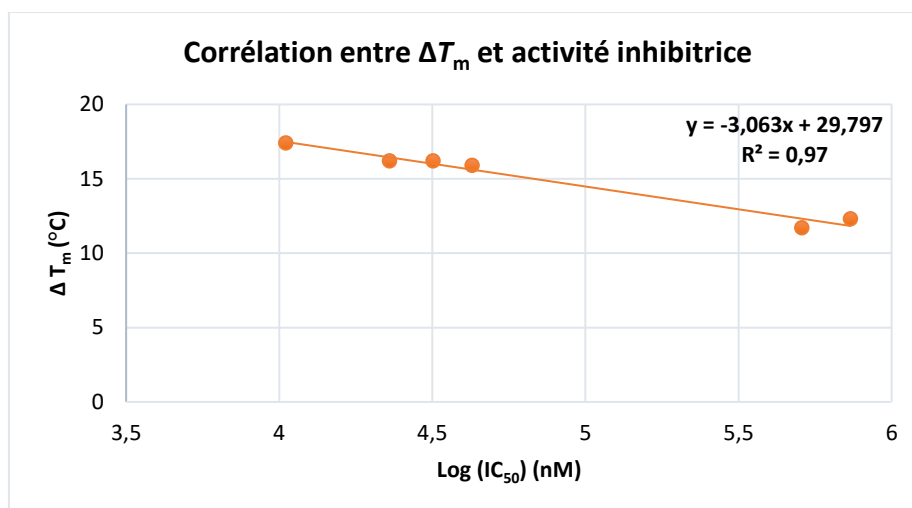
*Les ΔT_m inférieures ou égales à 0,3 ne sont pas prises en comptes

Tableau 24 : Valeurs de T_m et ΔT_m de la rhGAA avec les composés 121 à 137

Pour les composés multivalents issus de plateformes dérivés du pentaérythritol **121** à **126**, quatre conclusions peuvent être tirées de ces résultats :

- Les ΔT_m sont élevés ($>10^{\circ}\text{C}$) à forte concentration (25 μM) et un effet dose-dépendant est observé pour tous les composés testés ;
- Les composés **121** et **124** avec l'espaceur PEG stabilisent moins la protéine à forte concentration que les composés avec les espaceurs alkyles C6 et C11 ;
- A forte concentration, les ΔT_m des composés avec un espaceur alkyle C6 ou C11 sont plus élevés que le ΔT_m de référence de la D-NN-DNJ à la même concentration ou de l'acarbose à une concentration 80 fois plus faible ;
- Une corrélation entre le log de l'activité inhibitrice et ΔT_m a pu être mise en évidence (Tableau 25).

1



2

Composé	IC ₅₀ (μM)	ΔT_m max (°C)*
123	10,5	17,4
126	22,9	16,2
122	31,8	16,2
125	42,6	15,9
121	508,0	11,7
124	733,0	12,3

*Le ΔT_m max a été sélectionné ([C]= 25 μM)

Tableau 25 : Comparatif IC₅₀ et ΔT_m des composés **121** à **126** (1) courbe de corrélation $f(\log(IC_{50})) = \Delta T_m$; (2) valeurs IC₅₀ et ΔT_m

Pour les composés **136** et **137** obtenus à partir de plateformes à cœur cyclotriphosphazène et leur référence monovalente **138**, il est observé que :

- Le composé hexamérique **136** et la référence **138** ont des ΔT_m élevés à forte concentration, alors qu'aucun effet n'est observé pour le composé **137**. La raison principale envisagée est la faible solubilité observée de ce dernier dans les conditions expérimentales ;
- La capacité stabilisatrice des composés n'est pas corrélable avec l'activité inhibitrice, en raison du trop faible nombre de données à notre disposition.

Ces résultats mettent en évidence que tous les composés multivalents, excepté le composé **137**, ont une forte capacité stabilisatrice vis-à-vis de la *rhGAA*. Cette capacité est supérieure à celle de la D-NN-DNJ et de l'acarbose, à l'exception de **138** et **124**. A notre connaissance, le composé **123** a montré la plus forte capacité stabilisatrice vis-à-vis de la *rhGAA* ($\Delta T_m = 17,4$ °C) observée dans la littérature. De plus, une corrélation entre activité stabilisatrice et activité inhibitrice a pu être mise en évidence.

II.2.3. PHARMACOPHORE L-DNJ

Les capacités stabilisatrices des différents objets multivalents **enant-123** à **enant-137** et du composé monovalent **enant-138** ont été évaluées et rapportées *Tableau 26*.

Composé	Espaceur	Valence	[C] (μM)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)*
Acarbose			2000	71,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,3
D-NN-DNJ			25	75,5 \pm 0,3	12,0 \pm 0,3
enant-123	C11	4	25	62,9 \pm 0,3	-0,6 \pm 0,3
			250	62,6 \pm 0,3	-0,9 \pm 0,3
			2500	-	-
enant-126	C11	6	25	63,5 \pm 0,3	-
			250	63,5 \pm 0,3	-
			2500	64,7 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3
enant-138	C11	1	25	63,8 \pm 0,3	-
			250	64,4 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3
			2500	71,6 \pm 0,3	8,1 \pm 0,3
enant-136	C11	6	25	63,8 \pm 0,3	-
			250	63,8 \pm 0,3	-
			2500	-	-
enant-137	C11	12	25	63,8 \pm 0,3	-
			250	63,8 \pm 0,3	-
			2500	-	-

*Les valeurs inférieures ou égales à 0,3 ne sont pas prises en compte

Tableau 26 : Valeurs de T_m et ΔT_m des composés **enant-123** à **enant-137**

Aucune activité stabilisatrice significative n'a été observée aux trois concentrations testées pour l'ensemble de ces composés excepté pour le composé monomérique **enant-138** et dans une moindre mesure le composé multivalent **enant-126** qui sont également les composés les plus inhibiteurs.

Il est possible qu'aucun effet stabilisateur n'ait été observé avec les autres composés L-DNJ en raison des concentrations trop faibles sélectionnées pour l'évaluation. Il faudrait vraisemblablement refaire des évaluations à des concentrations supérieures, ce que nous n'avons pas pu réaliser par manque de temps et de quantité de composés disponibles.

II.2.4. PHARMACOPHORE AR88 ET ENANT-AR88

Les capacités stabilisatrices des composés multivalents issus de l'AR88 et **enant-AR88** et leur référence monovalente ont été évaluées (*Tableau 27*).

Composé	Valence	[C] (μM)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)*
Acarbose		2000	71,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,3
D-NN-DNJ		25	75,5 \pm 0,3	12,0 \pm 0,3
141	1	2,5	63,2 \pm 0,3	-
		25	63,5 \pm 0,3	-
		250	63,5 \pm 0,3	-
139	4	2,5	62,9 \pm 0,3	-0,6 \pm 0,3
		25	62,9 \pm 0,3	-0,6 \pm 0,3
		250	63,8 \pm 0,3	-
140	6	2,5	63,2 \pm 0,3	-
		25	62,9 \pm 0,3	-0,6 \pm 0,3
		250	-	-
enant-141	1	2,5	62,9 \pm 0,3	-0,6 \pm 0,3
		25	62,9 \pm 0,3	-0,6 \pm 0,3
		250	64,1 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3
enant-139	4	2,5	62,6 \pm 0,3	-0,9 \pm 0,3
		25	63,2 \pm 0,3	-
		250	64,7 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3
enant-140	6	2,5	62,9 \pm 0,3	-0,6 \pm 0,3
		25	63,2 \pm 0,3	-
		250	63,5 \pm 0,3	-

*Les valeurs inférieures ou égales à 0,3 ne sont pas prises en comptes

Tableau 27 : Valeurs de T_m et ΔT_m pour la rhGAA avec les composés 139 à 141

Aucun effet stabilisant aux concentrations testées n'a été observé, excepté pour le composé **enant-139** où un faible effet, néanmoins significatif, a pu être constaté. Ce composé, est le second composé le plus inhibiteur parmi les 6 composés testés.

Une nouvelle fois les concentrations utilisées lors de ces évaluations sont probablement trop faibles pour observer un effet stabilisant vis-à-vis de la rhGAA.

II.2.5. PHARMACOPHORE DE LA NAC

Les capacités stabilisatrices des composés multivalents greffés avec NAC ainsi que du composé de référence monovalent NAC ont été évaluées à plusieurs concentrations (Tableau 28) qui ont été sélectionnées afin de pouvoir déterminer les constantes de dissociation (K_D) (Figure 56). Ces K_D nous permettront de calculer les effets multivalents s'il y en a, qui pour rappel n'ont pas été déterminés sur l'inhibition de la rhGAA du fait que certains composés étaient non-inhibiteurs.

Composé	Valence	[C] (μM)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)*
Acarbose		2000	71,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,3
D-NN-DNJ		25	75,5 \pm 0,3	12,0 \pm 0,3
NAC	1	250	63,5 \pm 0,3	-
		500	63,5 \pm 0,3	-
		750	63,5 \pm 0,3	-
		960	63,9 \pm 0,3	0,4 \pm 0,3
		1920	63,9 \pm 0,3	0,4 \pm 0,3
		2000	64,1 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3
		4800	65,0 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3
		5000	66,2 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3
		10000	67,4 \pm 0,3	2,9 \pm 0,3
		19200	67,7 \pm 0,3	4,2 \pm 0,3
		143	4	2,5
25	63,5 \pm 0,3			-
240	63,8 \pm 0,3			-
250	63,5 \pm 0,3			-
500	64,7 \pm 0,3			1,2 \pm 0,3
750	65,9 \pm 0,3			2,4 \pm 0,3
960	65,9 \pm 0,3			2,4 \pm 0,3
1000	66,8 \pm 0,3			3,3 \pm 0,3
1920	67,7 \pm 0,3			4,2 \pm 0,3
2000	66,5 \pm 0,3			3,0 \pm 0,3
144	6			2,5
		25	63,5 \pm 0,3	-
		240	63,8 \pm 0,3	-
		250	63,5 \pm 0,3	-
		500	64,7 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3
		750	65,9 \pm 0,3	2,4 \pm 0,3
		960	67,1 \pm 0,3	3,6 \pm 0,3
		1000	66,8 \pm 0,3	3,3 \pm 0,3
		1920	67,8 \pm 0,3	4,3 \pm 0,3

*Les valeurs inférieures ou égales à 0,3 ne sont pas comptabilisées

Tableau 28 : Valeurs de T_m et ΔT_m des composés NAC, 143 et 144

Il est à remarquer que les 3 composés atteignent un effet stabilisant maximum ($\Delta T_m = 4,2 \pm 0,3$ $^{\circ}\text{C}$) identique mais à des concentrations différentes avec un effet dose-dépendant. A concentration égale, les composés multivalents ont un effet stabilisant plus élevé que leur référence monovalente.

A partir de ces données, des K_D ont pu être déterminées selon le protocole décrit par Iacono *et al.*¹⁰⁰ en traçant les courbes $T_m = f(\log[C])$ (Figure 56). Le composé tétramérique a une affinité pour la rhGAA similaire au composé hexamérique. Les composés multivalents ont une plus grande affinité pour l'enzyme que la NAC. Des effets multivalents avec des rapports β/n de 2 et 1,2 pour les composés **143** et **144** respectivement ont pu être calculés (Figure 56).

Composé	Valence	K_D (mM)	β/n^*
NAC	1	5,079 \pm 0,651	-
143	4	0,636 \pm 0,092	2
144	6	0,692 \pm 0,071	1,2

* $\beta = (K_D \text{ monovalent}) / (K_D \text{ multivalent})$

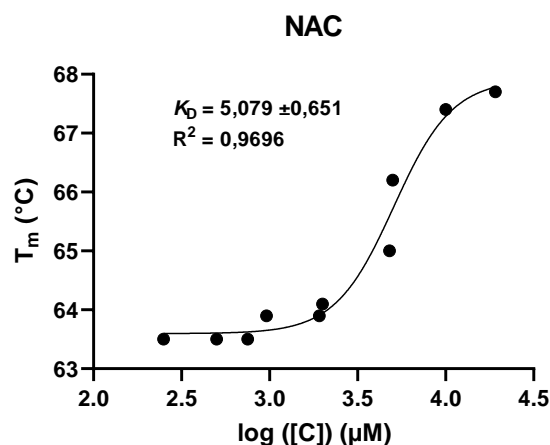


Figure 56 : Détermination de K_D de NAC, **143** et **144** (1) résultats ; (2) exemple de courbe de $T_m = f(\log[C])$ avec la NAC

Ces résultats positifs mettent en évidence l'augmentation d'affinité engendrée par la multivalence avec ce pharmacophore. En effet, les objets multivalents ont une affinité 10 fois plus forte pour l'enzyme que la NAC et des effets multivalents allant jusqu'à 2 ont été observés.

II.3. EVALUATION DE L'ACTIVITE CHAPERON DES COMPOSES 143 ET 144 VIS-A-VIS DE LA GAA

Par la suite, seuls les composés **143** et **144** et leur référence monovalente, la NAC, ont été évalués *in vitro* et *in cellulo* comme CP de la GAA. Ces composés ont été sélectionnés en première approche pour trois raisons. Premièrement, ces composés ont montré un gain d'affinité pour l'enzyme, par rapport à la NAC, et des effets multivalents ont été observés pour les deux composés. Deuxièmement, **143** est un composé non-inhibiteur et **144** faiblement inhibiteur. Il n'y a donc pas ou peu de compétition entre effet chaperon et inhibition : la fenêtre thérapeutique pour de tels composés serait plus large. Enfin, NAC est déjà approuvé comme médicament contre la bronchite chronique ou comme supplément nutritionnel pour les personnes atteintes du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et possède donc un dossier AMM. On peut donc espérer qu'il y aurait des risques limités à développer des traitements à partir de ce pharmacophore.

Deux tests différents ont été réalisés pour évaluer l'activité chaperon de ces composés. Un test *in vitro* de dénaturation thermique de la rhGAA a été réalisé afin d'évaluer la capacité d'un composé à une concentration donnée à sauvegarder l'activité enzymatique. Un test *in cellulo* nous a permis

d'évaluer l'AR de la GAA de fibroblastes de patients atteints de la MP après trois jours d'incubation avec nos composés. Tous les tests cellulaires ont été réalisés en collaboration avec le Dr. L. Gibot (Laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique, TOULOUSE)

II.3.1. EVALUATION DE L'ACTIVITE CHAPERON POUR LA GAA PAR DENATURATION THERMIQUE *IN VITRO*

L'activité de l'enzyme a été mesurée à 37°C et correspond à l'activité enzymatique avant dénaturation. Puis l'enzyme est dénaturée thermiquement à 52°C pendant deux durées données (15 et 30 min) et les AR sont calculées selon la formule :

$$AR = \frac{A_{\text{après dénaturation}}}{A_{\text{avant dénaturation}}} \times 100$$

Ce test est réitéré en présence des composés **143**, **144** ou de la NAC (Tableau 29 et 30).

Pour la NAC à forte concentration (10 mM), l'AR enzymatique observée est légèrement supérieure aux deux temps comparativement à l'AR de contrôle (Tableau 29). En revanche, à 1 et 0,1 mM, aucun effet sur l'AR de la rhGAA de contrôle n'a été observé. Un faible effet de sauvegarde de l'AR a donc été constaté avec ce composé, mais uniquement à forte concentration.

Composé	Valence	[C] (mM)	%AR _{15min}	%AR _{30min}
Contrôle*	-		64	51
NAC	1	0,1	62	47
		1	65	51
		10	67	58
143	4	0,1	62	49
		1	76	77
		10	97	94

*Le contrôle est réalisé en absence de composé

Tableau 29 : %AR de rhGAA après deux temps de dénaturation en présence des composés NAC et **143**

Pour le composé **143**, il est observé qu'après 15 ou 30 min de chauffage à 1 et 10 mM, l'AR de la rhGAA est nettement supérieure à l'AR sans composé (Tableau 29). Cette sauvegarde de l'AR est supérieure à celle observée avec la NAC aux deux temps et deux concentrations données avec un effet dose-dépendant. En effet, à 10 mM, la quasi-totalité de l'AR de la rhGAA a été sauvegardée/restaurée alors qu'une partie seulement est sauvegardée/restaurée à 1mM et aucune à 0,1 mM (Tableau 29).

En revanche, pour le composé **144**, les résultats sont nettement moins encourageants (Tableau 30). Aucune sauvegarde de l'activité de la rhGAA n'a été observée aux deux temps de dénaturation et aux trois concentrations testées. De plus, une perte totale d'activité est observée à 10 et 1 mM, et une perte quasi totale à 0,1 mM. Il semblerait que les concentrations choisies pour le test soient trop élevées et que l'inhibition soit trop importante à ces concentrations.

Composé	Valence	[C] (mM)	%AR _{15min}	%AR _{30min}
Contrôle	-		70	60
144	6	0,1	10	6
		1	0	0
		10	0	0

*Le contrôle est réalisé en absence de composé

Tableau 30 : %AR de rhGAA après deux temps de dénaturation en présence de **144**

Pour conclure, une sauvegarde quasi totale de l'activité enzymatique avec le composé multivalent tétramérique **143**, bien plus importante que celle observée avec la NAC, a été observée à 10 mM. De plus, un effet dose-dépendant avec ce composé a été constaté. En effet, une sauvegarde partielle de l'activité à 1 mM a été observée, plus importante qu'avec la NAC à une concentration 10 fois supérieure. La multivalence a permis à la fois d'augmenter l'AR après dénaturation thermique mais également de diminuer la concentration nécessaire en composé pour observer un effet stabilisant. En revanche, pour l'hexamère **144**, aucun effet stabilisant/destabilisant a été observé. Cet effet est certainement dû au choix des concentrations. Un ajustement des concentrations avec ce composé sera nécessaire.

Cependant, ces travaux préliminaires sont effectués sur enzyme recombinante non mutée et dénaturée thermiquement. De plus, ces essais enzymatiques *in vitro* ne prennent en compte ni la perméation ni la complexité du système cellulaire. Des tests cellulaires sur cellules de patients atteints de la MP ont donc été réalisés.

II.3.2. EVALUATION DE L'ACTIVITE CHAPERON VIS-A-VIS DE LA GAA *IN CELLULO*

Avant d'évaluer l'activité chaperon des composés **143** et **144**, leur cytotoxicité à 2 mM sur une lignée de fibroblastes sains a été évaluée. Aucune cytotoxicité n'a été observée pour ces composés.

Pour évaluer l'activité de nos composés comme CP, trois types de fibroblastes de patients atteints par la MP nous ont été fournis par le Pr. Levade (Institut fédératif de biologie, TOULOUSE). La détermination des mutations génétiques associées à chacune de ces cellules primaires a été préalablement réalisée à l'Institut fédératif de Biologie de Toulouse et ces mutations sont rapportées dans le *Tableau 31*.

Fibroblaste	Allèle 1	Allèle 2	%AR GAA
P1	c.-32-13T>G	c.2237G>A	9,1-11,3
P2	c.1504A>G	c.1932delC	5,3-6,5
P3	c.-32-13T>G	c.1076-1G>C et c.2065G>A	17,7-22

Tableau 31 : Mutations et AR des cellules primaires P1, P2 et P3

Au préalable, l'AR de GAA des cellules primaires P1 à P3 a été évaluée deux fois par des tests d'activité. Pour déterminer ces AR, l'activité de deux lignées de fibroblastes sains a également été évaluée comme témoins (Tableau 31).

Ces valeurs sont en accord avec les données de la littérature. En effet, les cellules primaires P1 à P3 proviennent de patients adultes, une AR inférieure à 30% était donc attendue. De plus les AR inférieures à 1% sont généralement observées pour des formes infantiles.^{50,52}

Sur les cellules primaires de plus faibles AR, P1 et P2, les évaluations de l'activité CP ont été réalisées à deux concentrations (0,1-1 mM) pour les complexes **143** et **144** et à une concentration (1 mM) pour la référence NAC afin de pouvoir comparer l'activité CP des objets multivalents avec cette référence.

Une évaluation plus approfondie avec P3 a été réalisée car elle est jugée plus intéressante du faite de son AR plus élevée. Les évaluations de l'activité CP des composés **143** et **144** ont été réalisées à quatre concentrations (0,05-0,1-0,2-1 mM) et la référence NAC à 1 mM.

Un composé sera considéré comme un CP de la GAA si l'AR est supérieure après l'incubation de ce composé en milieu cellulaire comparée à l'activité en absence de composé. Par ailleurs, les résultats d'activité de la GAA ont été normalisés par un contrôle positif, ici la β -galactosidase (β -GAL), pour laquelle l'activité catalytique n'est pas affectée dans les cellules de patients atteints de la MP (Figure 57 et 58).

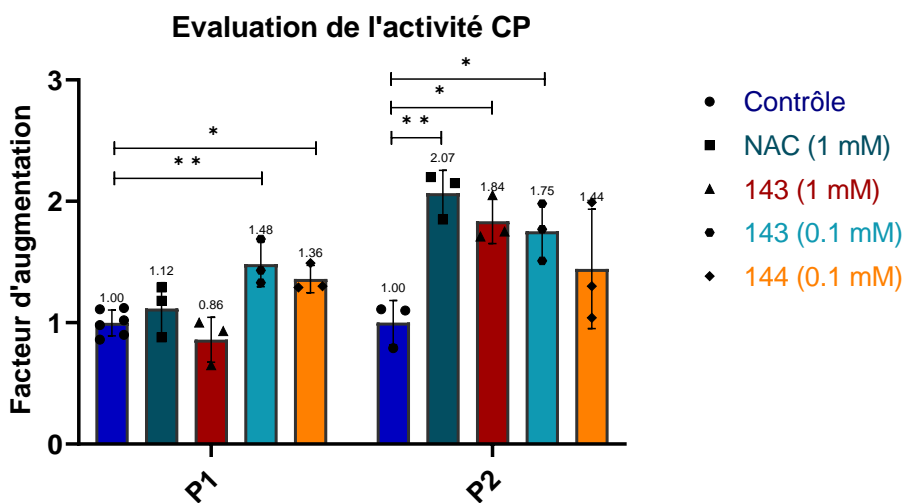


Figure 57 : Activité chaperon des composés **143**, **144** et NAC, sur P1 et P2

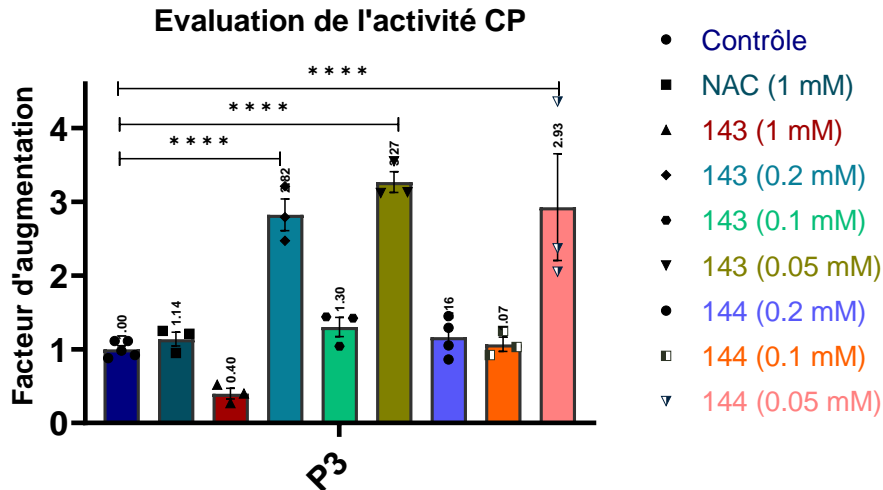


Figure 58 : Activité chaperon des composés **143**, **144** et NAC, sur P3

- Pour la NAC

Malgré l'augmentation de l'AR de la GAA dans chacune des cellules primaires après traitement par la NAC, un effet significatif est seulement observé sur les cellules primaires P2 (facteur d'augmentation de 2,1) (Figure 57). Ceci est principalement expliqué par la concentration trop faible utilisée en NAC. En effet, dans la littérature, des effets chaperon sont observés avec ce composé mais à des concentrations plus élevées (10 mM).⁹⁹ Nous nous sommes toutefois restreints à une concentration de 1 mM afin de pouvoir comparer avec les objets multivalents.

- Pour le composé tétravalent **143**

Ce composé multivalent **143** a montré des effets chaperon significatifs sur l'ensemble des cellules primaires testées (Figure 57 et 58). Il a montré un effet significatif à 1mM équivalent à la NAC à 1mM sur les cellules primaires P2 (facteur d'augmentation de 1,8) et des effets significatifs similaires voire supérieurs à la NAC à 1mM sur P1 (facteur d'augmentation de 1,5) et P2 (facteur d'augmentation de 1,8) à 0,1 mM, une concentration 10 fois plus faible. Sur les cellules primaires P3, de forts effets chaperon avec ce composé ont été observés à 0,05 mM (facteur d'augmentation de 3,3) et 0,2 mM (facteur d'augmentation de 2,8), alors que la NAC n'a pas montré d'effet significatif. Un effet plus faible (facteur d'augmentation de 1,3) a été observé à la concentration de 0,1 mM, ce qui n'est pas cohérent avec les autres résultats. En effet, mise à part cette valeur, un effet dose-dépendant est observé : le facteur d'augmentation croît lorsque la concentration décroît. Ce dernier résultat reste donc à confirmer par d'autres évaluations.

- Pour le composé hexavalent **144**

Le composé hexavalent **144** montre des résultats similaires. En effet, sur les cellules primaires P1, P2 et P3, des facteurs d'augmentation de 1,4 pour P1 et P2, et 2,9 pour P3 aux plus faibles concentrations testées, respectivement 0,1 mM pour P1 et P2 et 0,05 mM pour P3, sont observés (Figure 57 et 58). Ces effets sont légèrement inférieurs à ceux observés avec le composé tétravalent **143**. Cependant, ce composé semble avoir été testé à des concentrations trop élevées. En effet, sur toutes

les cellules primaires testées, la concentration de 1 mM a entraîné la mort cellulaire et n'est donc pas représentée ici. De plus, seule la concentration la plus faible a permis d'observer un effet chaperon sur toutes les cellules primaires. Ainsi, avec P3, seule la concentration de 0,05 mM a permis d'observer un effet chaperon significatif.

Pour conclure, des résultats positifs ont été obtenus avec les composés multivalents **143** et **144** avec une augmentation de l'activité d'un facteur 3,3 et 2,9 à 50 μ M. Ces effets sont plus élevés que ceux obtenus avec la NAC et à des concentrations 20 fois plus faibles. Il serait intéressant de tester ces composés à des concentrations encore plus faibles. Par ces résultats, nous avons démontré que la multivalence permettait d'augmenter l'activité comme CP de la GAA de ligand monovalent et de diminuer la concentration nécessaire à l'observation de ces effets. De plus, ces deux molécules sont, à notre connaissance, les premiers CP multivalents inhibiteurs et non inhibiteurs de la GAA décrits à ce jour.

III. EVALUATION DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES COMPOSES POUR LA GCASE

Avant d'évaluer la capacité chaperon sur la GCCase des composés multivalents synthétisés, l'évaluation préliminaire de la capacité inhibitrice de ces composés a été effectuée sur la GCCase. Ces résultats nous permettent non seulement de déterminer si la multivalence a amélioré l'activité inhibitrice des composés synthétisés vis-à-vis de la GCCase, d'évaluer les effets multivalents observés, mais également de définir les concentrations en composés à utiliser pour l'évaluation de l'activité chaperon. De plus, nous utiliserons ces résultats afin d'évaluer la sélectivité de ces composés vis-à-vis de la GAA et de la GCCase.

Dans le but de déterminer l'activité inhibitrice des composés pour la GCCase, des tests d'activité ont été réalisés sur l'enzyme recombinante humaine *rhGCCase*. L'activité inhibitrice des dérivés de l'AR88 et de son énantiomère, a été évaluée et rapportée dans le *Tableau 32*. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Tran.²¹⁷

Composé	Dérivé	Valence	IC ₅₀ (μ M) GCCase	rp/n*
AR88	-	-	0,78	-
enant-AR88	-	-	59,6	-
141	AR88	1	6,6 \pm 0,4	-
139	AR88	4	0,642 \pm 0,040	2,6
140	AR88	6	0,327 \pm 0,010	3,4
enant-141	enant-AR88	1	105,1 \pm 14,0	-
enant-139	enant-AR88	4	4,1 \pm 0,5	6,4
enant-140	enant-AR88	6	2,2 \pm 0,07	8,0
enant-103	enant-AR88	1	18,8 \pm 4,5	-
enant-104	enant-AR88	1	100,9 \pm 55,5	-
enant-105	enant-AR88	1	42,9 \pm 11,3	-
enant-106	enant-AR88	1	296,3 \pm 33,9	-

*rp=(IC₅₀ monovalent)/(IC₅₀ multivalent)

Tableau 32 : IC₅₀ et effet multivalent des composés *enant-103* à *141*

EVALUATIONS BIOLOGIQUES SUR LES GLYCOSIDASES D'INTERET

L'ensemble des composés testés sont des inhibiteurs de la *rhGC*ase avec des IC_{50} allant de 0,327 à 296,3 μ M. Nous avons pu constater que :

- Les composés monovalents **141** et *enant-141*, dérivés de l'AR88 et de son énantiomère, sont moins inhibiteurs que l'AR88 et *enant-AR88*. On peut donc dire que la présence du groupement triazole entraîne une baisse d'activité ;
- Les composés dérivés de *enant-AR88* sont moins inhibiteurs que ceux dérivés de l'AR88, mais présentent toutefois des effets multivalents plus élevés pour les objets multivalents dérivés de *enant-AR88* ;
- Tous les objets multivalents synthétisés sont de meilleurs inhibiteurs que leur référence monovalente et que les composés de référence AR88 et *enant-AR88*. Des effets multivalents ont été observés avec l'ensemble des composés avec des valeurs de *rp/n* allant de 2,6 à 8,0. Il est observé que l'effet multivalent augmente avec la valence.

En comparant maintenant les activités inhibitrices de ces composés vis-à-vis de la GAA, plusieurs observations peuvent être faites (Tableau 33) :

- Le composé AR88 est plus inhibiteur pour la *rhGC*ase que son énantiomère, alors que le résultat inverse est observé avec la *rhGAA* ;
- Tous les composés synthétisés sont plus inhibiteurs vis-à-vis de la *rhGC*ase que de la *rhGAA*. Ainsi, les indices de sélectivité sont élevés pour les composés multivalents issus des dérivés de l'AR88. Les composés **139** et **140** sont respectivement 144 et 199 fois plus inhibiteurs pour la *rhGC*ase que pour la *rhGAA*. Pour les dérivés de *enant-AR88*, la sélectivité est passé d'un facteur 2 pour la référence monovalente *enant-141* à un facteur 19 et 9 pour l'objet tétravalent *enant-139* et hexavalent *enant-140* respectivement.

Composé	Dérivé	Valence	IC_{50} (μ M) GCCase	IC_{50} (μ M) GAA / %inhibition	Sélectivité GAA/GCCase
AR88	-	-	0,780	23%*	ND
<i>enant-AR88</i>	-	-	59,6	76%*	ND
141	AR88	1	6,60 \pm 0,40	86%*	ND
139	AR88	4	0,642 \pm 0,040	92,3 \pm 6,8	144
140	AR88	6	0,327 \pm 0,010	65,1 \pm 5,7	199
<i>enant-141</i>	<i>enant-AR88</i>	1	105,1 \pm 14,0	225,3 \pm 20,5	2
<i>enant-139</i>	<i>enant-AR88</i>	4	4,10 \pm 0,50	78,1 \pm 16,1	19
<i>enant-140</i>	<i>enant-AR88</i>	6	2,20 \pm 0,07	19 \pm 5,0	9
<i>enant-103</i>	<i>enant-AR88</i>	1	18,8 \pm 4,5	NI	-
<i>enant-104</i>	<i>enant-AR88</i>	1	100,9 \pm 55,5	NI	-
<i>enant-105</i>	<i>enant-AR88</i>	1	42,9 \pm 11,3	NI	-
<i>enant-106</i>	<i>enant-AR88</i>	1	296,3 \pm 33,9	NI	-

*%inhibition à 2 mM

Tableau 33 : IC_{50} des composés *enant-103* à **141**, et indice de sélectivité *rhGAA/rhGC*ase des composés *enant-103* à **141**

Pour les analogues de AR88 **103** et *enant-AR88* *enant-103* à *enant-106*, les IC_{50} vis-à-vis de la *rhGC*ase ont été évalués et rapportés (Tableau 32).

Il a été observé que le composé **enant-103** et **enant-105** sont plus inhibiteurs que la référence **enant-AR88**, alors que les composés **enant-104** et **enant-106** sont respectivement 2 et 5 fois moins inhibiteurs que la référence **enant-AR88**. La substitution de la chaîne en alpha permet de moduler fortement l'activité inhibitrice. Pour ce qui est de la sélectivité, l'ensemble de ces dérivés sont totalement sélectifs pour la *rhGC*ase car aucune inhibition n'a été observée avec ces composés pour la *rhGAA*.

Ces résultats prometteurs montrent la sensibilité de la *rhGC*ase pour la multivalence avec des effets multivalents observés pour tous les composés multivalents synthétisés. De plus, il a été constaté que leur sélectivité vis-à-vis de la GAA notamment peut être améliorée par la multivalence. Cette sélectivité peut être également améliorée par la modification de la chaîne carbonée en alpha de l'azote. En effet, le composé **enant-103**, un dérivé de **enant-AR88**, où la chaîne alkyle a été substituée par un groupement cyclopropyle, a une puissance inhibitrice supérieure à **enant-AR88** et est totalement sélectif pour la GC_{ase}.

IV. CONCLUSION

Dans ce dernier chapitre, l'objectif était d'évaluer les activités biologiques des composés synthétisés sur différentes glycosidases d'intérêt impliquées dans la MP, la MG ou le DT2.

Pour la MP, l'activité inhibitrice de l'ensemble des composés vis-à-vis de la GAA a été évaluée. Cette enzyme s'est révélée être sensible à la multivalence et plusieurs des composés multivalents ont vu leur activité inhibitrice augmentée par rapport aux références monovalentes. De plus, de nombreux effets multivalents, avec des rapports rp/n allant jusqu'à 53 pour le composé **enant-126**, ont été observés. En effet, un effet multivalent a été observé pour au moins un composé avec chaque pharmacophore inhibiteur. Par la suite, l'activité stabilisatrice de ces composés pour la GAA a été évaluée par DSF. Tous les composés possédant le pharmacophore D-DNJ (à l'exception de **137**) et NAC ont montré une activité stabilisatrice avec des ΔT_m atteignant 17,4 °C pour le composé **123**. Cette étude a permis de déterminer des K_D pour les composés dérivés de la NAC et a permis de mettre en évidence un effet multivalent pour les deux composés multivalents évalués. Cependant, seuls les dérivés de NAC ont pu voir leur activité chaperon évaluée *in cellulo* sur trois types différents de fibroblastes atteints de la MP. Les deux composés multivalents ont montré des effets chaperon sur toutes les cellules primaires testées. Le facteur d'augmentation maximum a été observé avec **143** et **144** à la concentration la plus faible (50 μ M) avec des facteurs d'augmentation atteignant respectivement 3,3 et 2,9 sur la souche P3. Cet effet est plus important que celui observé avec la NAC (1,14) à une concentration 20 fois plus élevée (1 mM). L'objectif initial de ce projet était de savoir si la multivalence nous permettait d'augmenter l'activité chaperon de la NAC ainsi que de diminuer la concentration nécessaire. Nous pouvons conclure par ces résultats que les objectifs sont atteints avec les composés multivalents **143** et **144** qui sont les premiers chaperons pharmacologiques multivalents inhibiteurs et non-inhibiteurs de la GAA décrits dans la littérature. Cependant, malgré la sensibilité de la GAA vis-à-vis de la multivalence, il a été observé qu'augmenter la valence au-delà de 4 n'améliorait pas ou peu les activités biologiques avec les plateformes utilisées dans ce travail et pouvait même être préjudiciable.

Pour la MG, des dérivés de AR88 et de son énantiomère ont été évalués pour leur activité inhibitrice de la GC_{ase} dans le but de développer par la suite des CP multivalents et monovalents de la GC_{ase}. Il a été démontré que la GC_{ase} est sensible à la multivalence avec ces objets. En effet, l'ensemble des composés a conduit à un effet multivalent avec des rapports rp/n allant de 2,6 à 8,0. De plus, il a

été démontré que la multivalence permettait d'améliorer la sélectivité de ces composés vis-à-vis de la GCCase comparée à la GAA. Enfin, l'évaluation de l'activité inhibitrice des dérivés de *enant-AR88* a permis d'établir que la substitution de la chaîne alkyle en α de l'azote permet de moduler l'activité inhibitrice et la sélectivité pour la GAA. En effet, le composé ***enant-103***, un dérivé où la chaîne alkyle a été substituée par un groupement cyclopropyle, a conduit à une augmentation de l'activité d'un facteur 3 comparée à *enant-AR88*, et de la sélectivité pour la GCCase. Ce composé n'a montré aucune inhibition de la GAA à 2 mM.

Pour le DT2, les résultats sont, en revanche, plus mitigés. En effet, d'excellents résultats d'inhibition ont été observés pour les composés multivalents vis-à-vis de la *rhGAA*, utilisée comme enzyme modèle de l' α -glucosidase intestinale. Des IC_{50} atteignant des valeurs de l'ordre de la dizaine de nanomolaire pour le composé **123**, avec un effet multivalent avec un rapport *rp/n* de 5,7, ont été observés. De plus, un composé monovalent, le composé **138**, a montré une activité inhibitrice remarquable avec un IC_{50} = 32,9 nM. Ces deux composés et de nombreux autres objets multivalents synthétisés sont des candidats intéressants dans le développement d'hypoglycémiantes, inhibiteurs d' α -glucosidase, contre le DT2. En revanche, l'ensemble des composés dérivés de la D-DNJ et ceux dérivés de l'AR88 et son énantiomère, testés sur l' α -amylase, se sont révélés être non inhibiteurs de cette enzyme, excepté le composé ***enant-140***. Ils sont donc totalement sélectifs pour l' α -glucosidase intestinale. Ce composé a montré une activité inhibitrice intéressante et son IC_{50} ainsi que son mode de liaison à la protéine devraient être évalués prochainement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif général du projet était d'évaluer l'intérêt de la multivalence pour le développement de composés thérapeutiques qui ciblent des glycosidases impliquées dans deux types de pathologies, les MSL (MP et MG) et le DT2.

Afin de parvenir à nos objectifs, 18 objets multivalents et 14 objets monovalents ont été synthétisés obtenus par trois différents types de chimie click (CuAAC, SPAAC, thiol-ène (addition de Michael)) à partir de 5 pharmacophores différents qui sont la L ou D-DNJ, l'AR88, l'*enant*-AR88 et la NAC. Ces composés ont vu leurs activités biologiques évaluées sur les différentes enzymes cibles.

Le premier sous-objectif découlant de ce projet était de réaliser la preuve de concept concernant l'utilisation de la multivalence pour développer des nouveaux CP de la GAA contre la MP. Pour cela, des composés multivalents et leurs références monovalentes ont été synthétisés par chimie « click » (CuAAC, SPAAC et thiol-ène (addition de Michael)) à partir de 5 pharmacophores différents avec 6 types de plateformes. Les activités inhibitrices et stabilisatrices de l'ensemble des composés multivalents synthétisés ont été évaluées, ainsi que l'activité chaperon des composés multivalents dérivés de la NAC (**143** et **144**). Des effets multivalents calculés à partir des IC_{50} et des K_D ont été observés sur plusieurs composés multivalents, confirmant ainsi la sensibilité de cette enzyme à la multivalence. Par DSF nous avons montré que les produits multivalents porteurs de pharmacophores D-DNJ et NAC, stabilisent la GAA avec pour chacun un effet dose-dépendant. Des ΔT_m allant jusqu'à 17,4°C ont même été observés avec le composé tétramérique dérivé de la D-DNJ **123**. C'est à notre connaissance l'effet stabilisant le plus élevé observé sur la GAA. Pour finir, l'évaluation de l'activité chaperon des dérivés multivalent de la NAC *in cellulo* sur 3 types de fibroblastes de patients atteints de la MP a montré des résultats prometteurs. En effet, les deux composés **143** et **144** ont montré des effets CP à faibles concentrations sur les trois lignés testées (50-100 μM) avec des facteurs d'augmentation de l'AR de la GAA allant jusqu'à 3,27 et 2,93 sur les cellules primaires P3. Ces effets sont bien supérieurs à ceux observés en présence de la NAC à 1 mM. La multivalence a permis de diminuer la concentration nécessaire à l'observation d'un effet chaperon avec le pharmacophore NAC. A ce jour, ce sont les premiers chaperons pharmacologiques multivalents (inhibiteurs et non inhibiteurs) de la GAA. Au vu de ces résultats, nous pouvons donc affirmer que la preuve de concept a été démontrée.

Notre étude ouvre la voie à d'autres essais. A court terme, il serait intéressant d'identifier les concentrations minimales permettant d'observer un effet chaperon avec les composés **143** et **144**. Par ailleurs, l'utilisation de nos composés en thérapie combinée avec la *rhGAA* devrait également être effectuée. Enfin, l'activité comme CP de la GAA des autres composés synthétisés devrait être évaluée.

A plus long terme, il serait intéressant de synthétiser et d'évaluer l'activité de nouveaux CP multivalents porteurs de la fonction NAC greffée à diverses plateformes de valence ou de topologie différente. Cette méthode pourrait ensuite être appliquée avec la L-carnitine, un autre acide aminé non-inhibiteur ayant montré un effet CP sur la GAA.¹⁰⁰ Pour finir, il pourrait être envisagé de développer des composés hétéromultivalents en greffant des pharmacophores NAC et DNJ, qui sont deux CP connus mais se liant à des sites différents de la GAA.⁹⁹ Avec de tels composés hétéromultivalents, un effet synergique pourrait être observé permettant d'augmenter l'effet chaperon mais ils pourraient également s'adresser à un plus large spectre de mutations associées à la maladie.

Un autre objectif de ce projet était de développer de nouveaux chaperons pharmacologiques multivalents ou non de la GCase contre la MG, à partir du pharmacophore de l'AR88 et son énantiomère. Premièrement, nous avons synthétisé des analogues « clickables » de l'AR88 et son énantiomère et greffé ces composés à différentes plateformes par chimie « click » (CuAAC). Deuxièmement, nous avons développé et optimisé la voie de synthèse qui permettait d'obtenir ces pharmacophores, notamment deux étapes, l'allénylation et la cyclisation intramolécule, afin de

développer de nouveaux ligands de la protéine. A partir de divers aldéhydes commerciaux, 20 aminoallènes et hydroxyaminoallènes ont été obtenus avec des rendements modestes. Ces résultats ont montré que cette réaction peut être réalisée dans ces conditions avec une variété d'aldéhydes et d'alcynes, et que cette réaction mérite d'être élargie à d'autres substrats. En revanche, les résultats sont plus mitigés pour la cyclisation intramoléculaire. Seules les pyrrolidines substituées en alpha ont pu être obtenues à partir de leur allène précurseur ainsi qu'un composé spiro, le composé **enant-107**. Cette voie de synthèse permet l'obtention de composés spiro azotés en seulement deux étapes, permettant ainsi un accès rapide à cette famille de composés.

Ensuite, l'activité inhibitrice pour la GCase des composés multivalents et dérivés monovalents obtenus, excepté **enant-107**, a été évaluée. Des effets multivalents avec des rapports rp/n allant jusqu'à 8,0 pour le composé hexavalent **enant-140** ($IC_{50} = 2,2 \mu M$) ont été observés avec l'ensemble des composés multivalents issus de l'AR88 et son énantiomère, confirmant ainsi la sensibilité de l'enzyme à la multivalence. Pour les analogues de l'AR88 et **enant-AR88**, il a été observé que la substitution de la chaîne alkyle en alpha de l'azote permettait de moduler l'activité inhibitrice des composés envers la GCase, mais également d'augmenter la sélectivité de ces composés pour cette enzyme vis-à-vis de la GAA. Un composé, **enant-103**, a même montré une activité inhibitrice 3 fois plus forte que son analogue alkylé. Cependant, l'effet chaperon de ces composés restent à démontrer *in cellulo*.

De manière plus générale, les premiers résultats obtenus montrent l'intérêt de la multivalence pour la GAA et la GCase. Il serait intéressant de développer la multivalence pour la thérapie par CP à l'ensemble des maladies de surcharge lysosomale. Il sera nécessaire pour cela de développer de nouveaux pharmacophores, notamment par le biais de la modélisation moléculaire ou de tests de criblage qui ne reposent pas sur l'activité inhibitrice du ligand mais sur son affinité ou son activité stabilisatrice pour sa cible.

La D-DNJ et ses dérivés sont des inhibiteurs connus de la MGAM. Nous avons donc évalué l'activité de certains composés comme inhibiteurs de la MGAM et de l' α -amylase afin de développer de nouveaux hypoglycémiantes contre le DT2. La GAA et la MGAM étant toutes les deux des α -glucosidases et partageant une forte homologie structurale, la GAA a été choisie comme modèle de la MGAM humaine qui est, elle, non commerciale. Pour l' α -amylase pancréatique humaine, son équivalent porcin commercial a été préféré. L'ensemble des composés, excepté le composé **enant-140**, se sont révélés être non inhibiteurs de l' α -amylase pancréatique et donc totalement sélectifs de la MGAM. L'étude de l'activité inhibitrice des composés sur un modèle de MGAM a montré que l'ensemble des composés multivalents partageant le pharmacophore D-DNJ sont des inhibiteurs puissants ($IC_{50} < 1 \mu M$). Ils ont une meilleure capacité inhibitrice que leur référence monovalente ou que le miglitol (991 nM) et l'acarbose (22350 nM) qui sont actuellement utilisés comme traitement de type IAG contre le DT2. De plus, des effets multivalents jusqu'à 5,7 avec des IC_{50} allant à 10,5 nM ont été observés, montrant ainsi l'intérêt de la multivalence dans le développement d'inhibiteurs de MGAM. Le composé monovalent **138** a montré une activité inhibitrice remarquable avec une IC_{50} de 32,9 nM, ce qui est, à notre connaissance, le dérivé D-DNJ monovalent le plus inhibiteur pour cette enzyme. Il serait alors intéressant d'évaluer l'effet hypoglycémiant *in vivo* sur modèle murin des composés les plus inhibiteurs.

PARTIE EXPERIMENTALE

I EXPERIMENTAL PART FOR BIOLOGICAL EVALUATION

Thermal shift assays

Differential scanning fluorimetry was carried out in 96-well plate with a CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The assays were carried out with Myozyme[®]. A solution of Mcllvain Buffer (20 μ L) (100 mM citric acid, 200 mM Na₂HPO₄, pH= 7.0), inhibitors, Myozyme[®] (2.5 μ L) [C= 10 mg/mL], and SYPRO Orange (2.5 μ L) (100X) was mixed and poured into a V-bottom 96-well plate. The plate was heated from 20°C to 95°C. The data were collected at increments of 0.3 °C by monitoring fluorescence (λ_{ex} = 560-590 nM and λ_{em} = 610-650 nM). Three replicates of each condition were performed. The T_m of the protein is obtained by calculating the sigmoid derivative (fluorescence (RFU) / temperature (°C)).

General procedure for GAA enzyme assays

The experiments were performed with *rhGAA* (8329-GH-025) purchased from R&D system (Minneapolis, MN, USA), and 4-methylumbelliferyl α -D-glucopyranoside (4-MUG- α) (69591) purchased from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA). In the black 96-well plate, *rhGAA* (10 μ L; 2.2 μ g.mL⁻¹) in the Mcllvain buffer modified (100 mM citric acid, 200 mM Na₂HPO₄, pH= 4.5, with 0.25% (w/v) sodium taurocholate and 0.1% (v/v) triton X-100) was transferred to a solution of compounds (40 μ L) in ethanol dissolved in Mcllvain buffer (100 mM citric acid, 200 mM Na₂HPO₄, pH= 4.5) in triplicate. The plate was incubated 30 min at 37 °C. Then, the enzymatic reaction was initiated with a substrate solution (25 μ L) of (4-MUG- α) dissolved in DMSO (16 mg.mL⁻¹) diluted by 10 in Mcllvain buffer (pH= 4.5). After 15 min, a stop solution (100 μ L) of glycine/NaOH (100 mM, pH= 10.6) was added and the fluorescence was measured by a FLUOstar microplate reader (BMG Labtech) with λ_{ex} = 335 nM and λ_{em} = 460 nM).

For the IC₅₀ determination, the well (duplicate) containing only substrate without enzyme correspond to the blank was subtracted from the others fluorescence values measured. Then, the fluorescence value of the well (triplicate) containing substrate and enzyme without compound correspond to 100% of *rhGAA* activity. The percentage of inhibition was calculated by the formula below:

$$\% \text{Enzymatic inhibition} = \left(1 - \frac{(\text{Fluorescence (enzyme + compound)} - \text{blank})}{(\text{Fluorescence (enzyme 100\% activity)} - \text{blank})} \right) \times 100$$

The values of IC₅₀ and standard deviation were determined by the software GraphPad Prism 9.5.1, from the percentage inhibition values obtained with 6 or more concentrations of inhibitors.

General procedure for GCase enzyme assays

The experiments were performed with *rhGCase* (7410-GHB) purchased from R&D system (Minneapolis, MN, USA), and 4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside (4-MUG- β) (69591) purchased from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA). In the black 96-well plate, *rhGCase* (25 μ L; 0.5 μ g.mL⁻¹) in the Mcllvain buffer modified (100 mM citric acid, 200 mM Na₂HPO₄, pH= 5.3, with 0.25% (w/v) sodium taurocholate and 0.1% (v/v) triton X-100) was transferred to a solution of compounds (25 μ L) in ethanol dissolved in Mcllvain buffer (100 mM citric acid, 200 mM Na₂HPO₄, pH= 5.3) in triplicate. The plate was incubated 30 min at 37 °C. Then, the enzymatic reaction was initiated with a substrate solution (25 μ L) of (4-MUG- β) dissolved in DMSO (7.5 mg.mL⁻¹) diluted by 10 in Mcllvain buffer (pH= 5.3). After 15 min, a stop

PARTIE EXPERIMENTALE

solution (100 μL) of glycine/NaOH (100 mM, pH= 10.6) was added and the fluorescence was measured by a FLUOstar microplate reader (BMG Labtech) with $\lambda_{\text{ex}}= 335 \text{ nM}$ and $\lambda_{\text{em}}= 460 \text{ nM}$.

The values of IC_{50} and standard error were obtained with the same procedure previously described (General procedure for GCCase enzyme assays).

General procedure for α -amylase enzyme assays

The experiments were performed with α -amylase pancreatic porcine (A3176), starch (33615), and 3,5-dinitrosalicylic acid (128848) purchased from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA). A solution of coloring (DNS) reagent was prepared from 1 g of 3,5-dinitrosalicylic acid, 1 g of NaOH, 0.02 g of phenol crystal, and 30 g of potassium sodium tartrate, mixed in water 70 mL. In the quartz cell, α -amylase (25 μL ; 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the phosphate buffer (20 mM sodium phosphate monobasic, 20 mM sodium phosphate dibasic, 6 mM NaCl, pH= 7.0) was transferred to a solution of compounds (50 μL) in ethanol dissolved in phosphate buffer (20 mM sodium phosphate monobasic, 20 mM sodium phosphate dibasic, 6 mM NaCl, pH= 7.0) in duplicate. The cell was incubated 20 min at 37 °C. Then, the enzymatic reaction was initiated with a substrate solution (25 μL) of starch previously dissolved in phosphate buffer (0.8% (w/v)) at 80 °C for 30 min. After 10 min, a solution of coloring (DNS) reagent (400 μL) was added, and the cell was heated at 90°C for 15 min. After cooling at rt, the absorbance was measured by a Cary 3500 (Agilent) at $\lambda= 540 \text{ nM}$.

For the IC_{50} determination, the cell containing only substrate without enzyme correspond to the blank and was automatically subtracted from the others absorbance values measured. Then, the absorbance value of the cell (duplicate) containing substrate and enzyme without compound correspond to 100% of α -amylase activity. The percentage of inhibition was calculated by the formula below:

$$\% \text{Enzymatic inhibition} = \left(1 - \frac{(\text{Absorbance (enzyme + compound)} - \text{blank})}{(\text{Absorbance (enzyme 100\% activity)} - \text{blank})} \right) \times 100$$

The values of IC_{50} and standard deviation were determined by the software GraphPad Prism 9.5.1, from the percentage inhibition values obtained with 6 or more concentrations of inhibitors.

General procedure for cell culture

Fibroblasts were cultured in T25 flasks for 24 h. They are then treated with the compound at the desired concentration or ethanol (0.25%) as a control, previously diluted in 4 mL culture medium (DMEM, glucose 4.5 g.L⁻¹, 10% BSA (v/v)). After 72 h incubation, the flasks were scraped in presence of phosphate buffered saline and the contents centrifuged (300 g, 5 min, 7 °C). The supernatant is removed and the pellet transferred with an aqueous solution Triton X-100 (200 μL , 1% (v/v)) and transferred to a 1.5 mL eppendorf. The eppendorfs are then placed in an ice-water bath and sonicated with a Vibra-Cell® probe close to the eppendorf (power: 60%). The eppendorfs are then stored in a freezer at -65°C for 48 h.

Bradford Test

The experiments were performed with Coomassie Plus reagent (23238) purchased from ThermoFisher Scientific (Breda, The Netherlands), starch (33615) and 3,5-dinitrosalicylic acid (128848) purchased from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA). The evaluation of the protein quantity in the eppendorfs were

evaluated by the Bradford method. In the 96-well clear plate, 5 μL of the protein solution was transferred in the solution of Coomassie Plus reagent (290 μL) previously gently shaken at rt in triplicate. The plate was shaken for 30 sec and incubate at rt for 10 min. The absorbance was measured by a FLUOstar microplate reader (BMG Labtech) at $\lambda = 595 \text{ nm}$. The same experiment was carried out using a BSA (bovine serum albumin) solution at different known concentrations in triplicate. The values (triplicate) of the well without protein correspond to the blank were subtracted from the others fluorescence values measured. The absorbance values obtained make it possible to plot a curve (Absorbance/[BSA]) which is used to determine the protein concentration of our various samples.

General procedure to evaluate GAA activity

The 4-Methylumbelliferyl α -D-glucopyranoside (4-MUG- α) (69591) and 4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (4-MUGal- β) (M1633) were purchased from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA). 10 to 20 μL of the cell lysate (final concentration= $6.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, determined by Bradford) were mixed with 25 μL of McIlvain buffer modified (100 mM citric acid, 200 mM Na_2HPO_4 , pH= 4.6, with 0.25% (w/v) sodium taurocholate and 0.1% (v/v) Triton X-100) and transferred in the 96-well black plate. The plate was incubated at 37°C for 50 min. After, 20 μL of this mixture was transferred into a solution (50 μL) of substrate (4-MUG- α) dissolved in DMSO ($24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) diluted by 8 in McIlvain buffer (100 mM citric acid, 200 mM Na_2HPO_4 , pH= 4.6) in triplicate. The plate was shaken for 2 min and incubated at 37°C for 70 min. Then, a stop solution (200 μL) of glycine/NaOH (500 mM, pH= 10.6) was added and the fluorescence was measured by a FLUOstar microplate reader (BMG Labtech) with $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 446 \text{ nm}$). In parallel, the activity of acid β -galactosidase was determined with the same protocol with a solution of substrate (4-MUGal- β) dissolved in DMSO ($3.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) diluted by 3 in McIlvain buffer (100 mM citric acid, 200 mM Na_2HPO_4 , pH= 4.6) in duplicate as a control lysosomal enzyme.

$$\text{Fold GAA activity} = \left(\frac{\frac{(\text{Fluorescence (GAA + compound)} - \text{blank})}{(\text{Fluorescence } (\beta\text{Gal} + \text{compound}) - \text{blank})}}{\frac{(\text{Fluorescence (residual GAA activity)} - \text{blank})}{(\text{Fluorescence (residual } \beta\text{Gal activity)} - \text{blank})}} \right)$$

II EXPERIMENTAL PART FOR CHEMICAL SYNTHESIS

All reagents were obtained from commercial suppliers and used without any further purification. Standard inert atmosphere techniques were used in handling all air and moisture sensitive reagents. Dichloromethane (DCM) and tetrahydrofuran (THF) were obtained by filtration through a drying column on a filtration system. Dimethylformamide (DMF) and dioxane was purchased anhydrous over molecular sieves. Triethylamine and DIPEA were distilled over KOH under reduced pressure and stored over KOH under nitrogen.

Thin-layer chromatography (TLC) analyses were performed on precoated, aluminum-backed silica gel (Merck 60 F254). Visualization of the developed chromatogram was performed by UV light (254 nm) and using 10% phosphomolybdic acid in ethanol or aqueous potassium permanganate (KMnO₄). Preparative flash chromatography was performed with SDS silica gel 60 (35-70 μm) from Macherey Nagel.

All ¹H, ¹³C and ³¹P NMR spectra were acquired on a Bruker Avance 300, 400 or 500 MHz spectrometer. All spectra were obtained in CDCl₃, D₂O or CD₃OD. For CDCl₃, spectra were referenced to 7.26 ppm for ¹H or 77.16 ppm for ¹³C, for D₂O to 4.79 for ¹H and CD₃OD to 4.87 ppm for ¹H or to 49.00 ppm for ¹³C. NMR data are reported as: chemical shift (δ) in parts per million (ppm), multiplicity (br= broad, s= singlet, d= doublet, t= triplet, q= quartet, p= pentuplet, m= multiplet, dd= doublet of doublets, dt= doublet of triplets, dq= doublet of quadruplets, td= triplet of doublets, qd= quadruplet of doublets, qt= quadruplets of triplets, ddd= doublet of doublets of doublets, ddt= doublet of doublet of triplets), coupling constant (J) in Hertz (Hz) and integration. Assignments of ¹H and ¹³C signals were made by DEPT, ¹H-¹H COSY, HSQC and HMBC experiments. The exponents "1" or "2" will be used for the rotameric protons or carbons, and the exponents "A" or "B" will be used for the regiosimic protons. The numbering chosen for assigning the various atoms is not in accordance with the IUPAC numbering.

Dendrimer derivatives synthesis was monitored by mass spectrometry in MALDI-TOF using a Waters Micro MX spectrometer. A 10 mg/mL solution of 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) in CH₃OH/H₂O (1:1, v:v) was prepared and used as matrix. A solution of dendrimer derivative was prepared in CH₂Cl₂/CH₃OH (100 μM). Both matrix and compound solution were mixed in 9:1 volume ratio before being deposited onto the plate and dried at room temperature and atmospheric pressure.

High pressure liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on a Waters device connected to a PDA (λ= 210 nm or λ= 225 nm or λ= 280 nm) and mass spectrometry for reverse phase analyses.

Chiral HPLC analyses were performed to determine enantiomeric excess (ee) with a Lux cellulose-3 column (3 μM, 4.6x150 mm) with a flow of 0.6 mL.min⁻¹ or CHIRALPACK® IG column (3 μM ; 4.6x100 mm)

Mass spectrometry (MS) data were obtained on a ThermoQuest TSQ 7000 spectrometer and high-resolution MS data were obtained with Xevo G2 QTOF spectrometer.

Optical rotations were measured at with λ= 589 nm (sodium lamp) a Jasco polarimeter at 20 °C. [α]_D²⁰ values are given in deg.dm⁻¹.cm³.g⁻¹. The concentration (c) is indicated in gram per 100 mL.

PARTIE EXPERIMENTALE

General procedure A: In the flame-dried Schlenk tube with a polytetrafluoroethylene plug, CuBr_2 (0.3 eq) previously dried, *N*-Boc-propargylamine (1.5 eq) and (*R*) or (*S*)-diphenylprolinol (1.3 eq), were added to a solution of aldehyde (1.5 eq) in the dioxane under Ar. The mixture was stirred at 80 °C for 16 h, then at 130 °C for 4 h. After cooling to rt, the mixture was diluted with DCM, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2) under the conditions described below.

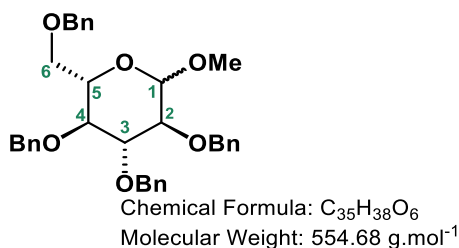
General procedure B: In the flame-dried Schlenk tube with a polytetrafluoroethylene plug, CuBr_2 (0.3 eq) previously dried, *N*-Boc-propargylamine (1.5 eq) and (*R*) or (*S*)-diphenylprolinol (1.3 eq), were added to a solution of aldehyde (1.5 eq) in the dioxane under Ar. The mixture was stirred at 130 °C for 16 h. After cooling to rt, the reaction was quenched with HCl (1 M), then extracted with Et_2O , washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2) under the conditions described below.

General procedure C: To a solution of allene (1.0 eq) in acetone (0.300 M), AgNO_3 (0.4 eq) was added. The mixture was stirred at rt in the dark for 48 h. After, the mixture was filtered through a celite pad with E.A., then concentrated to give the desired product without further purification.

General procedure D: To a solution of pyrroline (1.0 eq) in dry DCM (0.200 mmol/mL) under Ar, a solution of *meta*-chloroperoxybenzoic acid (3.0 eq) in dry DCM over MgSO_4 (0.400 mmol/mL) was added dropwise. The mixture was stirred at rt for 48 h to 72 h. Then, the reaction was quenched with NaOH (10% w/v), extracted with DCM, dried over MgSO_4 , and concentrated. The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2) under the conditions described below.

General procedure E: To a solution of epoxide (1.0 eq) in dioxane (0.150 M), a solution of aqueous H_2SO_4 solution (3 M) (8.0 eq) was added dropwise. The mixture was stirred at reflux for 4h. After cooling to rt, the reaction was quenched with an aqueous NaOH solution (3M) to reach pH= 10. Then, the mixture was evaporated, solubilize with brine and E.A., and the organic phase has been concentrated. The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2) under the conditions described below.

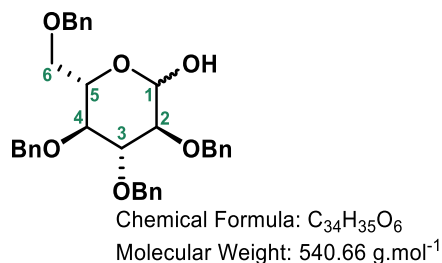
General procedure F: To a solution of azide (1.1 eq per alkyne) and alkyne (1.0 eq) in DMF ([alkyne]= 0.01 M) (previously degassed), a pre-mixed solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.3 eq per alkyne) and *L*-ascorbic acid sodium (0.5 eq per alkyne) in water ([$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]= 0.1 M) was added. The mixture was stirred in the micro-wave (20 W) at 80 °C for 30 min. Then, the mixture was extracted with E.A., washed 5 times with a aqueous EDTA_{sat} solution to remove the copper, dried over MgSO_4 , and concentrated. The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2 , E.A./E.P.). After, the product was diluted in MeOH (0.010 M) and ammonia (32%) (25.0 eq per alkyne) was added dropwise. The mixture was stirred at rt for 4 at 6 h. Then, the mixture was diluted with MeOH, then co-evaporated with toluene (2 times). After MeOH was added and concentrated to give the desired production without any further purification.

Compound *enant-61*: α/β -methyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-L-glucopyranoside

Acetyl chloride (0.13 mL, 1.88 mmol) was added dropwise to a solution of L-glucose (100.0 mg, 0.555 mmol) in MeOH (2.50 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h. Then, the mixture was quenched with TEA until pH = 7, concentrated and dry on a vacuum ramp (1 h). The mixture was diluted in DMF (5.00 mL) under Ar at 0 °C. NaH 60% (360.0 mg, 9.000 mmol) was added over 30 min, then, benzyl bromide (1.03 mL, 8.640 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt overnight. After, the mixture was poured into water (10.00 mL), extracted with DCM (3 x 10.00 mL), washed with NH₄Cl_{aq} (10.00 mL), brine (10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 88:12) to give **61** as a colorless oil with a **72%** yield (220.5 mg, 0.398 mmol).

R_f 0.31/0.41 (anomer α/β) (P.E./E.A. 85:15, KMnO₄)

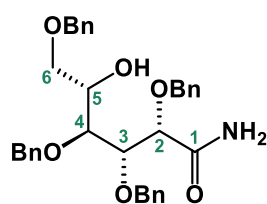
Spectral data are in accordance with literature.²⁴³

Compound *enant-62*: 2,3,4-tri-*O*-benzyl-L-glucopyranose

Hydrochloric acid 5M (0.08 mL, 0.400 mmol) and CuCl₂ (24.6 mg, 0.144 mmol) were added to a solution of **61** (80.0 mg, 0.144 mmol) in acetic acid (0.50 mL) at 70 °C under Ar. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 2.5 h. Then, the mixture was quenched with water (5.00 mL), extracted with DCM (3 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 80:20) to give **enant-62** as a white solid with a **53%** yield (41.0 mg, 0.076 mmol).

R_f 0.43/0.51 (anomer α/β) (P.E./E.A. 75:25, KMnO₄)

Spectral data are in accordance with literature.^{244,245}

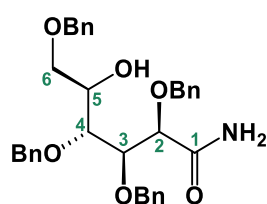
Compound *enant-63*: Tétrà-*O*-benzyl-L-gluconamide

Chemical Formula: $C_{34}H_{37}NO_6$
Molecular Weight: $555.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Ammonia_{aq} (20.00 mL) and I₂ (826.0 mg, 3.254 mmol) were added to a solution of ***enant-62*** (1.10 g, 2.035 mmol) in THF (4.50 mL). The reaction mixture was stirred at rt overnight. Then, the mixture was quenched with Na₂S₂O_{3aq} 5% (5.00 mL), stirred 10 min, extracted with Et₂O (3 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product does not require any further purification to give ***enant-63*** as a colorless gel with a **89%** yield (1005.0 mg, 1.809 mmol).

R_f 0.14 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)

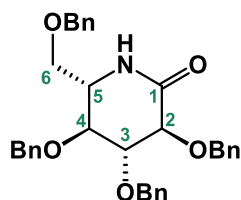
Spectral data are in accordance with literature.¹⁵⁴

Compound **63: Tétrà-*O*-benzyl-D-gluconamide**

Chemical Formula: $C_{34}H_{37}NO_6$
Molecular Weight: $555.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **63** (4.15 g, 7.468 mmol) was prepared by the same protocol starting from **62** (4.08 g, 7.547 mmol). The crude product does not require any further purification to give **63** as a colorless gel with a **99%** yield.

Spectral data identical to compound ***enant-63***.

Compound *enant-64*: Tétrà-*O*-benzyl-L-glucono-1,5-lactam

Chemical Formula: $C_{34}H_{35}NO_5$
Molecular Weight: $537.66 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound ***enant-63*** (4.50 g, 8.101 mmol) was added to a solution of DMSO (30.00 mL, 422.300 mmol) and acetic anhydride (18.00 mL, 190.420 mmol) under N₂. The reaction mixture was stirred at rt 18 h. After, the mixture was cooled at 0 °C, quenched with water (30.00 mL), stirred 15 min, extracted with Et₂O (3 x 30.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The mixture was solubilized in ACN

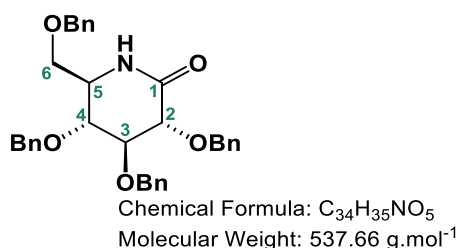
PARTIE EXPERIMENTALE

(180.00 mL), formic acid (31.00 mL, 821.645 mmol) and NaBH_3CN (1.63 g, 25.920 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at reflux 3 h. After, the mixture was cooled at $0\text{ }^\circ\text{C}$, quenched with HCl_{aq} 0.1M (20.00 mL), poured into a solution of E.A. (50.00 mL) and $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ (50.00 mL), extracted with E.A. (3 x 50.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 70:30) to give **enant-64** as a white solid with a **53%** yield (2.29 g, 4.252 mmol).

R_f 0.28 (P.E./E.A. 70:30, KMnO_4)

Spectral data are in accordance with literature.¹⁵⁴

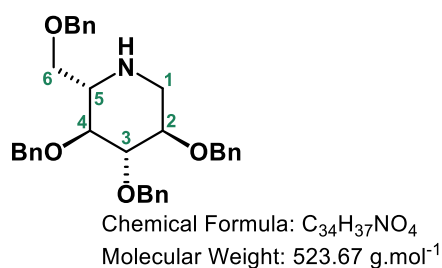
Compound 64: Tétrá-O-benzyl-D-glucono-1,5-lactam



Compound **64** (2.26 g, 4.203 mmol) was prepared by the same protocol starting from **63** (4.15 g, 7.468 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 70:30) to give **64** as a white solid with a **56%** yield.

Spectral data identical to compound **enant-64**.

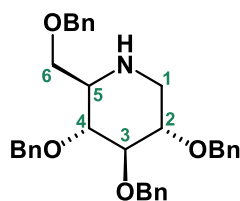
Compound *enant-65*: Tétrá-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-L-glucitol



LAH (53.0 mg, 1.397 mmol) in dry THF (1.80 mL) was added dropwise to a solution of **enant-64** (160.0 mg, 0.298 mmol) in dry THF (2.40 mL) at $0\text{ }^\circ\text{C}$ under N_2 . The reaction mixture was stirred at reflux for 3.5 h. After, the mixture was cooled at $0\text{ }^\circ\text{C}$, quenched with water (0.06 mL) and NaOH (0.06 mL), then stirred 15 min. After, water (0.42 mL) was added, and the crude product was purified by celite filtration with Et_2O (30.00 mL) to give **enant-65** as a colorless oil with a **100%** yield (156.0 mg, 0.298 mmol).

R_f 0.31 (P.E./E.A. 50:50, KMnO_4)

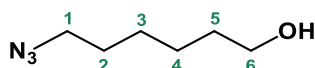
Spectral data are in accordance with literature.¹⁵⁴

Compound 65: Tétrà-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol

Chemical Formula: $C_{34}H_{37}NO_4$
Molecular Weight: $523.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **65** (1.9 mg, 3.706 mmol) was prepared by the same protocol starting from **64** (2.29 g, 4.252 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 60:40 to 40:60) to give **65** as a colorless oil with a **87%** yield.

Spectral data identical to compound *enant-65*.

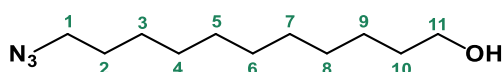
Compound 68: 6-azidohexan-1-ol

Chemical Formula: $C_6H_{13}N_3O$
Molecular Weight: $143.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Sodium azide (2.8 mg, 42.720 mmol) was added to a solution of 6-bromo-1-hexanol (2.23 mL, 17.092 mmol) in dry DMF (30.00 mL) under Ar. The reaction mixture was stirred at rt overnight. Then, the solvent was evaporated, and DCM (20.00 mL) was added, washed with water (3 x 20.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product does not require any further purification to give **68** as a yellow oil with a **95%** yield (2.33 g, 16.237 mmol).

R_f 0.48 (P.E./E.A. 80:20, PMA)

Spectral data are in accordance with literature.²⁴⁶

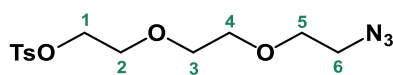
Compound 69: 11-azidoundecan-1-ol

Chemical Formula: $C_{11}H_{23}N_3O$
Molecular Weight: $213.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Sodium azide (594.00 mg, 9.181 mmol) was added to a solution of 11-bromo-1-undecanol (960.0 mg, 3.822 mmol) in dry DCM (20.00 mL) under Ar. The reaction mixture was stirred at rt overnight. Then, the solvent was evaporated, and DCM (10.00 mL) was added, washed with water (3 x 10.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product does not require any further purification to give **69** as a yellow oil with a **99%** yield (807.0 mg, 3.783 mmol).

R_f 0.20 (P.E./E.A. 70:30, PMA)

Spectral data are in accordance with literature.²⁴⁷

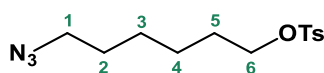
Compound 71: 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate

Chemical Formula: $C_{13}H_{19}N_3O_5S$
Molecular Weight: $329.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Sodium azide (57.3 mg, 0.819 mmol) was added dropwise to a solution of PEG-ditosylate (507.0 mg, 1.106 mmol) in dry DMF (10.00 mL) over 30 min, under Ar at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt overnight. Then, the mixture was quenched with water (20.00 mL), extracted with DCM (3 x 20.00 mL), washed with brine (20.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 80:20 to 70:30) to give **71** as a colorless oil with a **60%** yield (162.0 mg, 0.492 mmol).

R_f 0.55 (P.E./E.A. 60:40, KMnO_4)

Spectral data are in accordance with literature.²⁴⁸

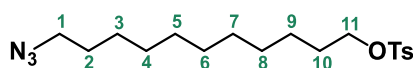
Compound 72: 6-azidohexyl 4-methylbenzenesulfonate

Chemical Formula: $C_{13}H_{19}N_3O_3S$
Molecular Weight: $297.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dry TEA (6.80 mL, 48.384 mmol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (4.65 g, 24.369 mmol) was added to a solution of **68** (2.33 g, 16.251 mmol) in dry DCM (50.00 mL) under N_2 . The reaction mixture was stirred at rt 20h. Then, the mixture was quenched with brine (60.00 mL), extracted with DCM (3 x 30.00 mL), washed with water (60.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 90:10) to give **72** as a colorless oil with a **81%** yield (3.92 g, 13.182 mmol).

R_f 0.71 (P.E./E.A. 80:20, PMA)

Spectral data are in accordance with literature.²⁴⁹

Compound 73: 11-azidoundecyl 4-methylbenzenesulfonate

Chemical Formula: $C_{18}H_{29}N_3O_3S$
Molecular Weight: $367.51 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

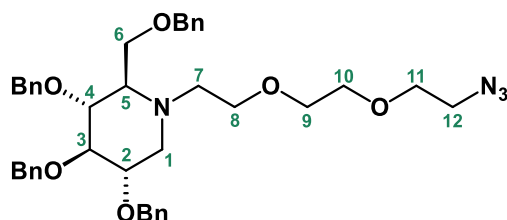
Dry TEA (3.15 mL, 22.695 mmol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (2164.00 mg, 11.351 mmol) was added to a solution of **69** (1.61 g, 7.565 mmol) in dry DCM (50.00 mL) under N_2 . The reaction mixture was stirred at rt for 20h. Then, it was quenched with brine (60.00 mL), extracted with DCM (3 x 30.00 mL), washed with water (60.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 98:20) to give **73** as a colorless oil with a **86%** yield (2.38 g, 6.483 mmol).

R_f 0.46 (P.E./E.A. 90:10, PMA)

PARTIE EXPERIMENTALE

Spectral data are in accordance with literature.²⁵⁰

Compound 74



Chemical Formula: $C_{40}H_{48}N_4O_6$
Molecular Weight: $680.85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

71 (235.6 mg, 0.716 mmol) and K_2CO_3 (110.8 mg, 0.802 mmol) were added to a solution of **65** (150.0 mg, 0.286 mmol) in dry ACN (2.00 mL) under N_2 . The reaction mixture was stirred at $85^\circ C$ for 4 days. Then, the mixture was quenched with $CHCl_3$ (15.00 mL), concentrated, then $CHCl_3$ (15.00 mL) and water (15.00 mL) were added, extracted with $CHCl_3$ (3 x 15.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/E.A. 96:4 to 70:30) to give **74** as a yellow oil with a **84%** yield (163.6 mg, 0.240 mmol).

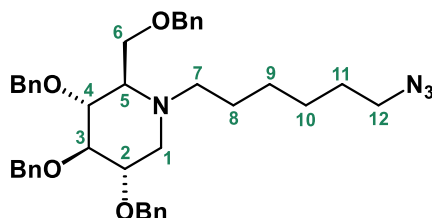
R_f 0.15 (P.E./E.A. 80:20, $KMnO_4$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.40-7.11 (m, 20H, H_{Bn}), 4.99 (d, 1H, $J_{Bn-Bn} = 11.7 \text{ Hz}$, H_{Bn}), 4.90 (d, 1H, $J_{Bn-Bn} = 10.9 \text{ Hz}$, H_{Bn}), 4.84 (d, 1H, $J_{Bn-Bn} = 11.7 \text{ Hz}$, H_{Bn}), 4.75-4.64 (m, 2H, H_{Bn}), 4.53 (d, 1H, $J_{Bn-Bn} = 12.0 \text{ Hz}$, H_{Bn}), 4.44 (d, 1H, $J_{Bn-Bn} = 12.0 \text{ Hz}$, H_{Bn}), 4.42 (d, 1H, $J_{Bn-Bn} = 10.9 \text{ Hz}$, H_{Bn}), 3.82-3.45 (m, 13H, $H_{2-4+6+peg}$), 3.29 (t, 2H, $J_{12-11} = 5.1 \text{ Hz}$, H_{12}), 3.20 (dd, 1H, $J_{1-1'} = 11.2 \text{ Hz}$, $J_{1-2} = 5.2 \text{ Hz}$, H_1), 2.97 (t, 2H, $J_{1-2} = 5.6 \text{ Hz}$, H_7), 2.53-2.37 (m, 2H, $H_{1'+5}$) ppm.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 138.6-138.0-136.2 (C_{Bn}), 128.6-128.5-128.5-128.0-128.0-127.9 (C_{Bn}), 87.4 (C_3), 78.8-77.4 (C_{2+4}), 75.3-73.5-72.8-70.8-70.6-70.2-68.1 ($C_{Bn+8-11}$), 65.9 (C_6), 64.2 (C_5), 57.4 (C_1), 55.4 (C_7), 50.8 (C_{12}) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: $C_{40}H_{49}N_4O_6$ [$M+H$] $^+$: 681.3652; found: 681.3660

Compound 75



Chemical Formula: $C_{40}H_{48}N_4O_4$
Molecular Weight: $648.85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

72 (791.6 mg, 2.700 mmol) and K_2CO_3 (449.0 mg, 3.249 mmol) were added to a solution of **65** (565.6 mg, 1.080 mmol) in dry ACN (15.00 mL) under N_2 . The reaction mixture was stirred at $85^\circ C$ for 4 days. Then, the mixture was quenched with $CHCl_3$ (15.00 mL), concentrated, then $CHCl_3$ (15.00 mL) and water (15.00 mL) were added, extracted with $CHCl_3$ (3 x 15.00 mL), dried over Na_2SO_4 , and

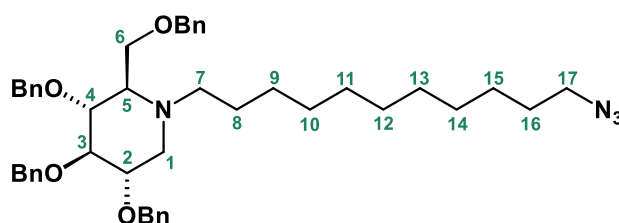
PARTIE EXPERIMENTALE

concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 85:15) to give **75** as a yellow oil with a **73%** yield (514.3 mg, 0.793 mmol).

R_f 0.43 (P.E./E.A. 70:30, KMnO₄)

Spectral data are in accordance with literature.¹⁰

Compound 76



Chemical Formula: C₄₅H₅₈N₄O₄
Molecular Weight: 718.98 g.mol⁻¹

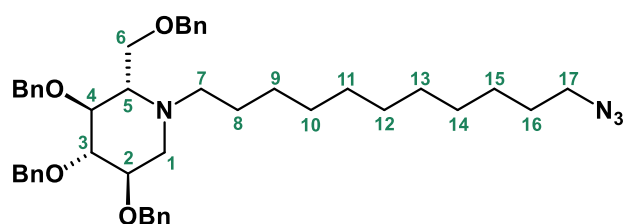
73 (365.0 mg, 0.994 mmol) and K₂CO₃ (183.0 mg, 1.324 mmol) were added to a solution of **65** (215.0 mg, 0.411 mmol) in dry ACN (2.50 mL) under N₂. The reaction mixture was stirred at 85 °C for 4 days. Then, the mixture was quenched with CHCl₃ (5.00 mL), concentrated, then CHCl₃ (5.00 mL) and water (5.00 mL) were added, extracted with CHCl₃ (3 x 5.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 85:15) to give **76** as a yellow oil with a **83%** yield (244.6 mg, 0.340 mmol).

R_f 0.60 (P.E./E.A. 70:30, KMnO₄)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.40-7.07 (m, 20H, H_{Bn}), 4.96 (d, 1H, J_{Bn-Bn} = 11.2 Hz, H_{Bn}), 4.88 (d, 1H, J_{Bn-Bn} = 11.0 Hz, H_{Bn}), 4.81 (d, 1H, J_{Bn-Bn} = 11.2 Hz, H_{Bn}), 4.67 (dd, 2H, J_{Bn-Bn} = 15.1 Hz, J_{Bn-Bn} = 11.6 Hz, H_{Bn}), 4.48 (dd, 2H, J_{Bn-Bn} = 13.6 Hz, J_{Bn-Bn} = 12.4 Hz, H_{Bn}), 4.41 (d, 1H, J_{Bn-Bn} = 11.0 Hz, H_{Bn}), 3.71-3.41 (m, 5H, H₂₊₃₊₄₊₆), 3.26 (t, 1H, J₁₇₋₁₆ = 6.9 Hz, H₁₇), 3.09 (dd, 1H, J_{1-1'} = 11.1 Hz, J₁₋₂ = 5.0 Hz, H₁), 2.72-2.50 (m, 2H, H₇), 2.34-2.27 (m, 1H, H₅), 2.23 (t, 1H, J_{1'-1} = J_{1'-2} = 11.1 Hz, H_{1'}), 1.68-1.49 (m, 4H, H₈₊₁₆), 1.47-1.07 (m, 14H, H₉₋₁₅) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 139.2-138.7-138.0 (C_{Bn}), 128.6-128.5-128.5-128.5-128.0-128.0-128.0-127.8-127.7-127.6 (C_{Bn}), 87.5 (C₃), 78.7-78.7 (C₂₊₄), 75.5-75.4-73.6-72.9 (C_{Bn}), 65.4 (C₆), 63.8 (C₅), 54.6 (C₁), 52.5 (C₇), 51.6 (C₁₇), 29.7-29.7-29.7-29.7-29.3-29.0-27.6-26.9-23.7 (C₈₋₁₆) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₄₅H₅₉N₄O₄ [M+H]⁺: 719.4536; found: 719.4539

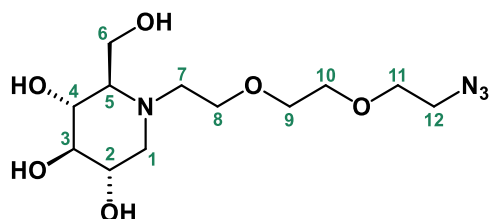
Compound *enant-76*

Chemical Formula: C₄₅H₅₈N₄O₄
Molecular Weight: 718.98 g.mol⁻¹

73 (525.0 mg, 1.430 mmol) and K₂CO₃ (263.7 mg, 1.908 mmol) were added to a solution of *enant-65* (240.0 mg, 0.458 mmol) in dry ACN (2.50 mL) under N₂. The reaction mixture was stirred at 85 °C for 4 days. Then, the mixture was quenched with CHCl₃ (5.00 mL), concentrated, then CHCl₃ (5.00 mL) and water (5.00 mL) were added, extracted with CHCl₃ (3 x 5.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 85:15) to give *enant-76* as a yellow oil with a **76%** yield (217.0 mg, 0.301 mmol).

R_f 0.60 (P.E./E.A. 70:30, KMnO₄)

Spectral data identical to compound *enant-76*.

Compound **77**

Chemical Formula: C₁₂H₂₄N₄O₆
Molecular Weight: 320.35 g.mol⁻¹

BCl₃ (1M in DCM) (3.00 mL, 3.000 mmol) was added to a solution of **74** (305.0 mg, 0.447 mmol) in DCM (4.50 mL) at -60 °C under N₂. The reaction mixture was allowed to warm to 0 °C and stirred for 4 h. Then, the mixture was quenched with water/MeOH (5:20, 10.00 mL), concentrated, then diluted with the same solution (10.00 mL), then concentrated, and reiterated this operation 2 times. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 80:20) to give **77** as a yellow oil with a **98%** yield (140.0 mg, 0.437 mmol).

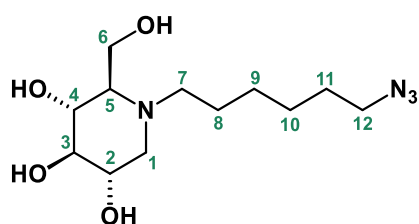
R_f 0.27 (DCM/MeOH 80:20, KMnO₄)

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 3.99 (AB part of an ABX system, 2H, Δδ= 0.042, J_{6-6'} = J_{6'-6} = 12.5 Hz, J₆₋₅ = 3.0 Hz, J_{6'-5} = 2.5 Hz, H_{6+6'}), 3.83 (t, 2H, J₈₋₇ = 5.0 Hz, H₈), 3.75-3.62 (m, 7H, H₂₊₉₋₁₁), 3.57 (t, 1H, J₄₋₃ = J₄₋₅ = 9.0 Hz, H₄), 3.48-3.15 (m, 6H, H_{3+1+7+7'+12}), 2.96-2.79 (m, 2H, H_{1'+5}) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 78.4 (C₃), 71.3-71.2-70.9-67.0 (C₈₋₁₁), 69.8 (C₄), 68.7 (C₂), 67.8 (C₅), 56.7 (C₆), 56.1 (C₁), 53.3 (C₇), 51.6 (C₁₂) ppm.

HR-MS (DCI-CH₄) m/z calculated for: C₁₂H₂₅N₄O₆ [M+H]⁺: 321.1774; found: 321.1772

Compound 78



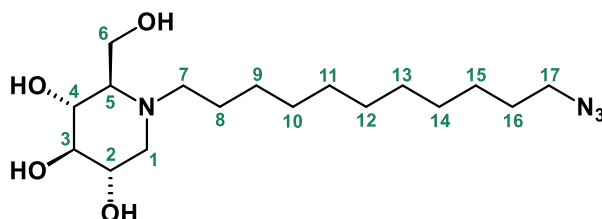
Chemical Formula: $C_{12}H_{24}N_4O_4$
Molecular Weight: $288.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

BCl_3 (1M in DCM) (2.00 mL, 2.000 mmol) was added to a solution of **75** (189.0 mg, 0.291 mmol) in DCM (5.00 mL) at -60°C under N_2 . The reaction mixture was allowed to warm to 0°C and stirred for 4 h. Then, the mixture was quenched with water/MeOH (5:20, 10.00 mL), concentrated, then diluted with the same solution (10.00 mL), then concentrated, and reiterated this operation 2 times. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH 80:20) to give **78** as a yellow oil with a **100%** yield (84.0 mg, 0.291 mmol).

R_f 0.30 (DCM/MeOH 82:18, KMnO_4)

Spectral data are in accordance with literature.¹⁰

Compound 79



Chemical Formula: $C_{17}H_{34}N_4O_4$
Molecular Weight: $358.48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

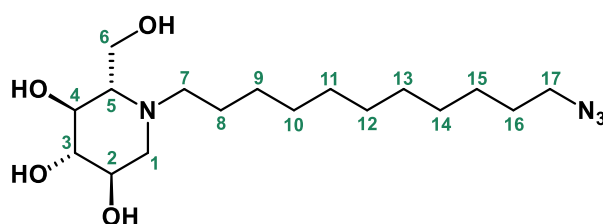
BCl_3 (1M in DCM) (2.15 mL, 2.150 mmol) was added to a solution of **76** (230.0 mg, 0.320 mmol) in DCM (3.80 mL) at -60°C under N_2 . The reaction mixture was allowed to warm to 0°C and stirred for 4 h. Then, the mixture was quenched with water/MeOH (5:20, 10.00 mL), concentrated, then diluted with the same solution (10.00 mL), then concentrated, and reiterated this operation 2 times. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH 80:20) to give **79** as a yellow oil with a **99%** yield (114.0 mg, 0.318 mmol).

R_f 0.45 (DCM/MeOH 80:20, KMnO_4)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ 3.97 (AB part of an ABX system, 2H, $\Delta\delta = 0.135$, $J_{6-6'} = J_{6'-6} = 12.6 \text{ Hz}$, $J_{6-5} = 2.7 \text{ Hz}$, $J_{6'-5} = 1.7 \text{ Hz}$, $\text{H}_{6+6'}$), 3.70 (ddd, 1H, $J_{2-1} = 11.0 \text{ Hz}$, $J_{2-3} = 9.1 \text{ Hz}$, $J_{2-1'} = 4.8 \text{ Hz}$, H_2), 3.56 (t, 1H, $J_{4-3} = J_{4-5} = 9.6 \text{ Hz}$, H_4), 3.41-3.16 (m, 5H, containing at 3.27 (t, $J_{17-16} = 6.5 \text{ Hz}$, H_{17}) and H_{3+1+7}), 3.14-2.99 (m, 1H, H_7), 2.94-2.73 (m, 2H, H_{1+5}), 1.84-1.50 (m, 4H, H_{8+16}), 1.45-1.27 (s, 14H, H_{9-15}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ 78.4 (C_3), 69.5 (C_4), 68.4 (C_2), 67.3 (C_5), 56.2 (C_6), 55.3 (C_1), 54.0 (C_7), 52.4 (C_{17}), 30.5-30.5-30.5-30.2-30.2-29.8-27.8-27.7-24.4 (C_{8-16}) ppm.

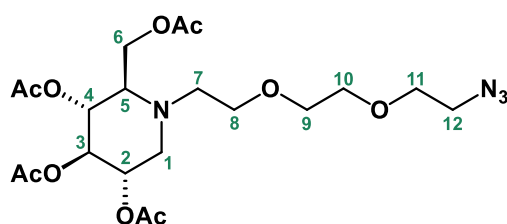
HR-MS (DCI- CH_4) m/z calculated for: $C_{17}H_{35}N_4O_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 359.2658; found: 359.2643

Compound *enant-79*

Chemical Formula: C₁₇H₃₄N₄O₄
Molecular Weight: 358.48 g.mol⁻¹

BCl₃ (1M in DCM) (2.00 mL, 2.000 mmol) was added to a solution of *enant-76* (215.0 mg, 0.299 mmol) in DCM (3.00 mL) at -60 °C under N₂. The reaction mixture was allowed to warm to 0 °C and stirred for 4 h. Then, the mixture was quenched with water/MeOH (5:20, 10.00 mL), concentrated, then diluted with the same solution (10.00 mL), then concentrated, and reiterated this operation 2 times. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 80:20) to give **79** as a yellow oil with a **98%** yield (105.0 mg, 0.293 mmol).

Spectral data identical to compound *enant-79*.

Compound **80**

Chemical Formula: C₂₀H₃₂N₄O₁₀
Molecular Weight: 488.49 g.mol⁻¹

DMAP (5.0 mg, 0.041 mmol) was added to a solution of **77** (130.0 mg, 0.406 mmol) in Ac₂O (6.00 mL) and pyridine (6.00 mL) under N₂. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. Then, the mixture was cooled at 0 °C, quenched with water (10.00 mL), extracted with DCM (3 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated with toluene (3 x 10.00 mL). The crude product does not require any further purification to give **80** as a colorless oil with a **76%** yield (116.0 mg, 0.307 mmol).

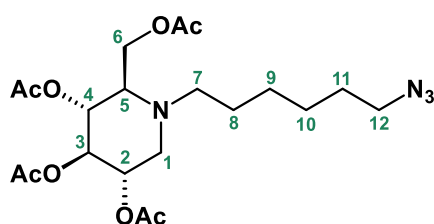
R_f 0.62 (P.E./E.A. 50:50, KMnO₄)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.08-4.81 (m, 3H, H₂₋₄), 4.20 (AB part of an ABX system, 2H, Δδ = 0.099, J_{6-6'} = J_{6'-6} = 12.3 Hz, J₆₋₅ = 2.2 Hz, J_{6'-5} = 1.6 Hz, H_{6+6'}), 3.67-3.44 (m, 8H, H₈₋₁₁), 3.35 (t, 2H, J₁₂₋₁₁ = 4.7 Hz, H₁₂), 3.18 (dd, 1H, J_{1-1'} = 11.8 Hz, J₁₋₂ = 4.3 Hz, H₁), 3.02-2.72 (m, 3H, H_{5+7+7'}), 2.50 (t, 1H, J_{1'-1} = J_{1'-2} = 10.7 Hz, H_{1'}), 2.02 (s, 3H, H_{Ac}), 1.96 (s, 6H, H_{Ac}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 171.0-170.4-170.0-169.7 (C_{Ac}), 74.7 (C₃), 70.7-70.6-70.1-68.4 (C₈₋₁₁), 69.5 (C₂₊₄), 61.4 (C₅), 59.6 (C₆), 53.5 (C₁), 50.8 (C₇), 50.7 (C₁₂), 20.9-20.9-20.8-20.7 (C_{Ac}) ppm.

HR-MS (DCI-CH₄) m/z calculated for: C₂₀H₃₃N₄O₁₀ [M+H]⁺: 489.2197; found: 489.2194

Compound 81



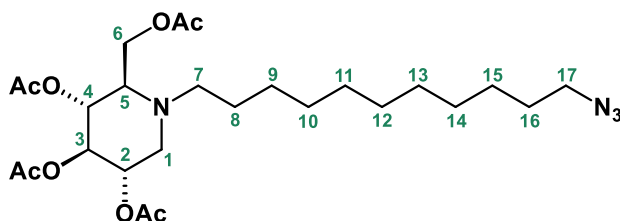
Chemical Formula: C₂₀H₃₂N₄O₈
Molecular Weight: 456.50 g.mol⁻¹

DMAP (6.3 mg, 0.017 mmol) was added to a solution of **78** (150.0 mg, 0.519 mmol) in Ac₂O (7.50 mL) and pyridine (7.50 mL) under N₂. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. Then, the mixture was cooled at 0 °C, quenched with water (10.00 mL), extracted with DCM (3 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated with toluene (3 x 10.00 mL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 80:20) to give **81** as a yellow oil with a **70%** yield (165.0 mg, 0.361 mmol).

R_f 0.74 (P.E./E.A. 50:50, KMnO₄)

Spectral data are in accordance with literature.¹⁰

Compound 82



Chemical Formula: C₂₅H₄₂N₄O₈
Molecular Weight: 526.63 g.mol⁻¹

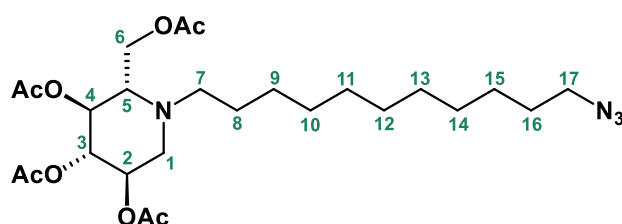
DMAP (6.7 mg, 0.055 mmol) was added to a solution of **79** (55.0 mg, 0.153 mmol) in Ac₂O (4.50 mL) and pyridine (4.50 mL) under N₂. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. Then, the mixture was cooled at 0 °C, quenched with water (10.00 mL), extracted with DCM (3 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated with toluene (3 x 10.00 mL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 80:20) to give **82** as a yellow oil with a **84%** yield (67.3 mg, 0.128 mmol).

R_f 0.64 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.08-4.87 (m, 3H, H₂₋₄), 4.11 (d, 2H, J₆₋₅ = 2.8 Hz, H₆), 3.22 (t, 2H, J₁₇₋₁₆ = 7.3 Hz, H₁₇), 3.16 (dd, 1H, J_{1-1'} = 11.2 Hz, J₁₋₂ = 5.8 Hz, H₁), 2.76-2.45 (m, 3H, H_{5+7+7'}), 2.29 (dd, 1H, J_{1'-1} = 11.2 Hz, J_{1'-2} = 10.3 Hz, H_{1'}), 2.03 (s, 3H, H_{Ac}), 1.98 (s, 6H, H_{Ac}), 1.97 (s, 3H, H_{Ac}), 1.62-1.10 (m, 18H, H₈₋₁₆) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 170.9-170.4-170.1-169.8 (C_{Ac}), 74.7 (C₃), 69.6, 69.5 (C₂₊₄), 61.9 (C₅), 59.5 (C₆), 52.9 (C₁), 51.8 (C₇), 51.5 (C₁₇), 29.6-29.5-29.5-29.5-29.5-29.2-28.9-27.2-26.7-24.6 (C₈₋₁₆), 20.9-20.9-20.8-20.7 (C_{Ac}) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₇H₃₄N₄O₄ [M-4Ac+5H]⁺: 359.2658; found: 359.2665

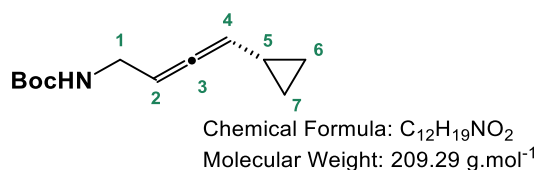
Compound *enant-82*

Chemical Formula: C₂₅H₄₂N₄O₈
Molecular Weight: 526.63 g.mol⁻¹

enant-79 (89.7 mg, 0.248 mmol) was added to a solution of Ac₂O (5.00 mL) and pyridine (5.00 mL) under N₂. The reaction mixture was stirred at rt for 5 h. Then, the mixture was cooled at 0 °C, quenched with water (10.00 mL), extracted with DCM (3 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated with toluene (3 x 10.00 mL). The crude product does not require any further purification to give ***enant-82*** as a colorless oil with a **89%** yield (116.00 mg, 0.220 mmol).

R_f 0.64 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)

Spectral data identical to compound **82**.

Compound **83: *tert*-butyl (*R*)-(4-cyclopropylbuta-2,3-dien-1-yl)carbamate**

Compound **83** (208.0 mg, 0.993 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from cyclopropanecarboxaldehyde (0.170 mL, 2.853 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 97: 3 to 94:6) to give **83** as a pale yellow oil with a **36%** yield.

volatile product

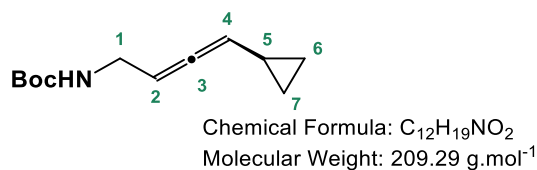
R_f 0.30 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -30.8 (c 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.22 (m, 1H, H₂), 5.09 (m, 1H, H₄), 4.66 (brs, 1H, H_{NH}), 3.75-3.54 (m, 2H, H₁), 1.41 (s, 9H, H_{Boc}), 1.28-1.14 (m, 1H, H₅), 0.74-0.60 (m, 2H, H₆₋₇) 0.37-0.27 (m, 2H, H₆₋₇) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 202.7 (C₃) 155.7 (C_{Boc}), 98.5 (C₄), 90.9 (C₂), 39.5 (C₁), 28.5 (C_{Boc}), 9.5 (C₅), 7.0-6.8 (C₆₋₇) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) m/z calculated for: C₁₂H₂₃N₂O₂ [M+NH₄]⁺: 227.2 ; found: 227.2

Compound *enant-83*: tert-butyl (S)-(4-cyclopropylbuta-2,3-dien-1-yl)carbamate

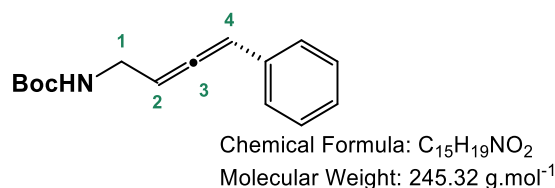
Compound ***enant-83*** (195.5 mg, 0.934 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from cyclopropanecarboxaldehyde (0.170 mL, 2.853 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 97:3 to 94:6) to give ***enant-83*** as a pale yellow oil with a **40%** yield.

volatile product

R_f 0.30 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = +5.6 (c 1.0, CHCl₃)

Spectral data identical to compound **83**.

Compound **84: tert-butyl (R)-(4-phenylbuta-2,3-dien-1-yl)carbamate**

Compound **84** (70.6 mg, 0.288 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from benzaldehyde (0.048 mL, 0.467 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 100 to 93:7) to give **84** as a colorless oil with a **62%** yield.

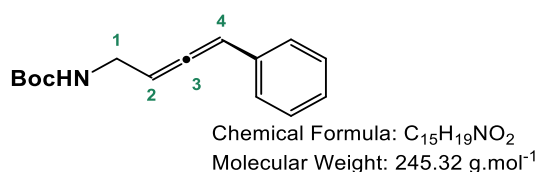
[α]_D²⁰ = -195.0 (c 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.35-7.16 (m, 5H, H_{Bn}), 6.29 (dt, 1H, J₄₋₂ = 6.4 Hz, J₄₋₁ = 3.2 Hz, H₄), 5.65 (q, J₂₋₄ = 5.8 Hz, 1H, H₂), 4.72 (brs, 1H, H_{NH}), 3.99-3.71 (m, 2H, H₁), 1.42 (s, 9H, H_{Boc}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 204.5 (C₃) 155.7 (C_{Boc}), 134.0 (C_{qBn}), 128.6-128.6-127.2-126.9-126.9 (C_{Bn}), 97.4 (C₄), 93.4 (C₂), 79.5 (C_{Boc}), 39.0 (C₁), 28.4 (C_{Boc}) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) m/z calculated for: C₁₅H₂₃N₂O₂ [M+NH₄]⁺: 263.2 ; found: 263.1

ee >99% (t_R (major)= 2.97 min, t_R (minor)= 3.79 min, column CHIRALPACK® IG (3 μM ; 4.6x100 mm), A/B 95:5 to 50:50) ; A= CO₂, B= isopropanol

Compound *enant-84*: tert-butyl (S)-(4-phenylbuta-2,3-dien-1-yl)carbamate

PARTIE EXPERIMENTALE

Compound **enant-84** (33.3 mg, 0.136 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from benzaldehyde (0.032 mL, 0.310 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 100 to 93:7) to give **enant-84** as a colorless oil with a **64%** yield.

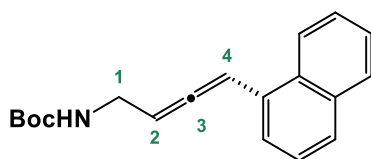
R_f 0.18 (P.E./E.A. 95:5, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = +150.7 (c 1.0, CHCl₃)

Spectral data identical to compound **84**.

ee >99% (t_R (minor)= 2.97 min, t_R (major)= 3.79 min, column CHIRALPACK® IG (3 μM ; 4.6x100 mm), A/B 95:5 to 50:50) ; A= CO₂, B= isopropanol

Compound **85**: *tert*-butyl (*R*)-(4-(naphthalen-1-yl)buta-2,3-dien-1-yl)carbamate



Chemical Formula: C₁₉H₂₁NO₂
Molecular Weight: 295.38 g.mol⁻¹

Compound **85** (29.9 mg, 0.101 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from naphthaldehyde (0.086 mL, 0.633 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5) to give **85** as a pale yellow oil with a **24%** yield.

R_f 0.17 (P.E./E.A. 95:5, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -99.5 (0.6, CHCl₃)

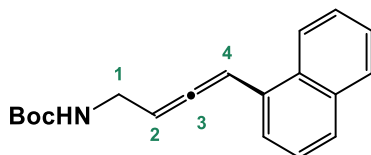
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.23-7.40 (m, 7H, H_{aro}), 7.00 (dt, 1H, J₄₋₂ = 6.5 Hz, J₄₋₁ = 3.3 Hz, H₄), 5.69 (q, J₂₋₄ = 5.8 Hz, 1H, H₂), 4.77 (brs, 1H, H_{NH}), 4.01-3.77 (m, 2H, H₁), 1.41 (s, 9H, H_{Boc}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 206.0 (C₃) 155.8 (C_{Boc}), 134.0-130.9-130.3 (C_{qaro}), 128.8-127.9-126.3-125.9-125.8-125.7-123.6 (C_{aro}), 94.0 (C₄), 92.6 (C₂), 79.6 (C_{Boc}), 39.3 (C₁), 28.4 (C_{Boc}) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) m/z calculated for: C₁₉H₂₅N₂O₂ [M+NH₄]⁺: 313.2 ; found: 313.1

ee **88%** (t_R (minor)= 3.33 min, t_R (major)= 3.63 min, column CHIRALPACK® IG (3 μM ; 4.6x100 mm), A/B 85:15) A= CO₂, B= isopropanol

Compound **enant-85**: *tert*-butyl (*S*)-(4-(naphthalen-1-yl)buta-2,3-dien-1-yl)carbamate



Chemical Formula: C₁₉H₂₁NO₂
Molecular Weight: 295.38 g.mol⁻¹

PARTIE EXPERIMENTALE

Compound **enant-85** (27.4 mg, 0.093 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from naphthaldehyde (0.043 mL, 0.316 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5) to give **enant-85** as a pale yellow oil with a **44%** yield.

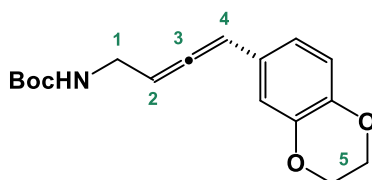
R_f 0.17 (P.E./E.A. 95:5, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = +131.2$ (c 1.0, CHCl₃)

ee 92% (*t_R* (major)= 3.32 min, *t_R* (minor)= 3.62 min, column CHIRALPACK® IG (3 μM ; 4.6x100 mm), A/B 85:15) A= CO₂, B= isopropanol

Spectral data identical to compound **85**.

Compound **86**: *tert*-butyl (*R*)-(4-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)buta-2,3-dien-1-yl)carbamate



Chemical Formula: C₁₇H₂₁NO₄
Molecular Weight: 303.36 g.mol⁻¹

Compound **86** (8.4 mg, 0.028 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from 1,4-benzodioxan-6-carboxaldehyde (27.7 mg, 0.169 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5 to 90:10) to give **86** as a pale yellow oil with a **16%** yield.

R_f 0.13 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

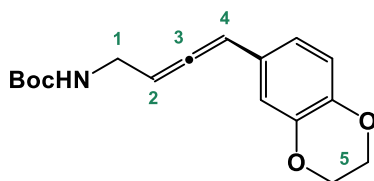
$[\alpha]_D^{20} = -140.5$ (c 0.6, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.87-6.71 (m, 3H, H_{Bn}), 6.16 (dt, 1H, *J*₄₋₂ = 6.4 Hz, *J*₄₋₁ = 3.8 Hz, H₄), 5.60 (q, *J*₂₋₄ = 5.8 Hz, 1H, H₂), 4.75 (brs, 1H, H_{NH}), 4.22 (s, 4H, H₅), 3.99-3.67 (m, 2H, H₁), 1.40 (s, 9H, H_{Boc}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 203.8 (C₃) 155.6 (C_{Boc}), 143.5-142.5-127.2 (C_{qBn}), 120.1-117.3-115.3 (C_{Bn}), 96.7 (C₄), 93.3 (C₂), 79.4 (C_{Boc}), 64.3 (C₅), 39.1 (C₁) 28.3 (C_{Boc}) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) *m/z* calculated for: C₁₇H₂₅N₂O₄ [M+NH₄]⁺: 321.2 ; found: 321.2

ee 98% (*t_R* (major)= 4.79 min, *t_R* (minor)= 5.28 min, column CHIRALPACK® IG (3 μM ; 4.6x100 mm), A/B 80:20) A= CO₂, B= ACN

Compound *enant-86*: tert-butyl (S)-(4-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)buta-2,3-dien-1-yl)carbamate

Chemical Formula: C₁₇H₂₁NO₄
Molecular Weight: 303.36 g.mol⁻¹

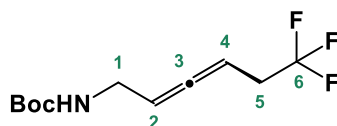
Compound ***enant-86*** (32.4 mg, 0.107 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from 1,4-benzodioxan-6-carboxaldehyde (52.5 mg, 0.320 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5 to 90:10) to give ***enant-86*** as a pale yellow oil with a **50%** yield.

R_f 0.13 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = +119.2, (c = 1.0, CHCl₃)

ee **82%** (t_R (minor)= 4.81 min, t_R (major)= 5.28 min, column CHIRALPACK® IG (3 μM ; 4.6x100 mm), A/B 80:20) A= CO₂, B= ACN

Spectral data identical to compound **86**.

Compound *enant-87*: tert-butyl (S)-(6,6,6-trifluorohexa-2,3-dien-1-yl)carbamate

Chemical Formula: C₁₁H₁₆F₃NO₂
Molecular Weight: 251.25 g.mol⁻¹

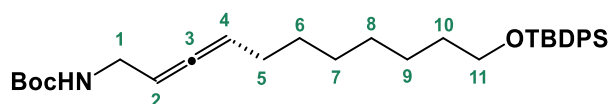
Compound ***enant-87*** (11.8 mg, 0.047 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from 3,3,3-trifluoropropanal (0.030 mL, 0.322 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5 to 90:10) to give ***enant-87*** as a pale yellow oil with a **22%** yield.

R_f 0.26 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.40-5.28 (m, 1H, H₂), 5.28-5.17 (m, 1H, H₄), 4.30 (brs, 1H, H_{NH}), 3.77-3.67 (m, 2H, H₁), 2.79 (m, 2H, H₅), 1.44 (s, 9H, H_{Boc}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 206.5 (C₃) 156.0 (C_{Boc}), 126.0 (q, J_{6-F} = 276.2 Hz, C₆), 91.3 (C₂), 83.7 (q, J_{4-F} = 3.7 Hz, C₄), 79.5 (C_{Boc}), 38.8 (C₁), 34.5 (q, J_{5-F} = 29.0 Hz, C₅), 28.5 (C_{Boc}) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) m/z calculated for: C₁₁H₂₀F₃N₂O₂ [M+NH₄]⁺: 269.2 ; found: 269.0

Compound 89: tert-butyl (R)-(11-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)undeca-2,3-dien-1-yl)carbamate

Chemical Formula: C₃₄H₄₇NO₃Si
Molecular Weight: 521.82 g.mol⁻¹

Compound **89** (3.60 g, 6.899 mmol) was prepared by general procedure **B** starting from **116** (5.80 g, 15.300 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5) to give **89** as a colorless oil with a **60%** yield.

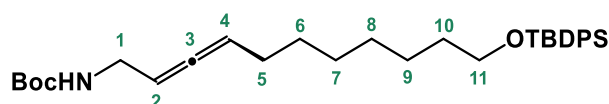
R_f 0.17 (P.E./E.A. 90:0, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -25.9, (c 1.1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.69-7.64 (m, 4H, H_{TBDPS}), 7.45-7.33 (m, 6H, H_{TBDPS}), 5.29-5.20 (m, 1H, H₄), 5.20-5.11 (m, 1H, H₂), 4.58 (bs, 1H, H_{NH}), 3.73-3.64 (m, 2H, H₁), 3.65 (t, J₁₋₂ = 6.5 Hz, 2H, H₁₁), 1.99 (qd, 1H, J₅₋₄ = J₅₋₆ = 6.9 Hz, J₅₋₂ = 2.7 Hz, H₅), 1.63-1.51 (m, 2H, H₁₀), 1.45 (s, 9H, H_{Boc}), 1.42-1.23 (m, 8H, H₆₋₉), 1.05 (s, 9H, H_{TBDPS}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 203.3 (C₃) 155.8 (C_{Boc}), 135.7-134.2-129.6-127.7 (C_{TBDPS}), 94.1 (C₄), 89.2 (C₂), 79.3 (C_{Boc}), 64.1 (C₁₁), 39.5 (C₁), 32.6 (C₁₀), 29.3-29.2-25.8 (C₆₋₉), 28.8 (C₅), 28.5 (C_{Boc}), 27.0 (C_{TBDPS}), 19.2 (C_{TBDPS}) ppm.

ee **95%** (t_R (major)= 14.472 min, t_R (minor)= 13.187 min, column Lux cellulose-3, A/B 15:85) ; A= H₂O + 0.1% HCOOH, B= ACN + 0.1% HCOOH

Compound enant-89: tert-butyl (S)-(11-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)undeca-2,3-dien-1-yl)carbamate

Chemical Formula: C₃₄H₄₇NO₃Si
Molecular Weight: 521.82 g.mol⁻¹

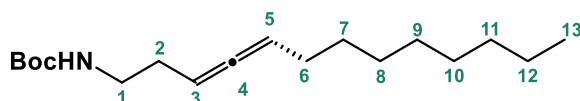
Compound **enant-89** (1.24 g, 2.124 mmol) was prepared by general procedure **B** starting from **enant-116** (1.97 g, 5.149 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5) to give **enant-89** as a colorless oil with a **53%** yield.

R_f 0.17 (P.E./E.A. 90:0, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = +22.7 (c 0.9, CHCl₃)

ee **93%**

Spectral data identical to compound **89**.

Compound 90: *tert*-butyl (*R*)-trideca-3,4-dien-1-ylcarbamate

Chemical Formula: C₁₈H₃₃NO₂
Molecular Weight: 295.47 g.mol⁻¹

Compound **90** (33.0 mg, 0.112 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from nonanal (0.055 mL, 0.320 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Hept/DCM 100 to 70:30) to give **90** as a colorless oil with a **52%** yield.

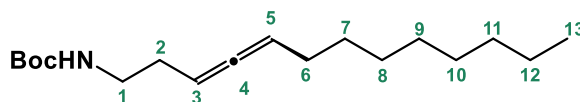
R_f 0.46 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -40.9 (c 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.13 (qt, 1H, J₅₋₃ = J₅₋₆ = 6.4 Hz, J₅₋₂ = 3.0 Hz, H₅), 5.03 (qt, J₃₋₅ = J₃₋₂ = 6.4 Hz, J₃₋₆ = 3.0 Hz, 1H, H₃), 4.63 (brs, 1H, H_{NH}), 3.27-3.08 (m, 2H, H₁), 2.14 (qd, 1H, J₂₋₁ = J₂₋₃ = 6.6 Hz, J₂₋₅ = 3.0 Hz, H₂), 2.14 (qd, 1H, J₆₋₇ = J₆₋₅ = 6.6 Hz, J₆₋₃ = 3.0 Hz, H₆), 1.49-1.19 (m, 12H, H₇₋₁₂), 1.43 (s, 9H, H_{Boc}), 0.87 (t, 3H, J₆₋₅ = 6.7 Hz, H₁₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 204.7 (C₄) 155.9 (C_{Boc}), 92.1 (C₅), 88.1 (C₃), 79.2 (C_{Boc}), 40.0 (C₁), 32.0-29.4-29.4-29.3-29.3-22.8 (C₇₋₁₂), 29.5 (C₂), 29.0 (C₆), 28.6 (C_{Boc}), 14.2 (C₁₃) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) m/z calculated for: C₁₈H₃₇N₂O₂ [M+NH₄]⁺: 313.3 ; found: 313.3

Compound *enant*-90: *tert*-butyl (*S*)-trideca-3,4-dien-1-ylcarbamate

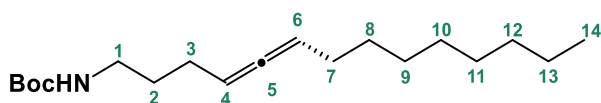
Chemical Formula: C₁₈H₃₃NO₂
Molecular Weight: 295.47 g.mol⁻¹

Compound ***enant*-90** (79.0 mg, 0.267 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from nonanal (0.109 mL, 0.634 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/DCM 100 to 70:30) to give ***enant*-90** as a colorless oil with a **63%** yield.

R_f 0.46 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = +38.9 (c 1.0, CHCl₃)

Spectral data identical to compound **90**.

Compound 91: *tert*-butyl (*R*)-tetradeca-4,5-dien-1-ylcarbamate

Chemical Formula: C₁₉H₃₅NO₂
Molecular Weight: 309.49 g.mol⁻¹

PARTIE EXPERIMENTALE

Compound **91** (7.3 mg, 0.024 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from nonanal (0.054 mL, 0.314 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/DCM 100 to 60:40) to give **91** as a yellow pale oil with a **11%** yield.

R_f 0.46 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

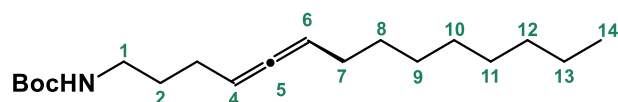
$[\alpha]_D^{20} = -25.9$ (c 0.8, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.14-5.0 (m, 2H, H₄₋₆), 4.53 (brs, 1H, H_{NH}), 3.23-3.09 (m, 2H, H₁), 2.05-1.90 (m, 4H, H₃₊₇), 1.58 (q(5), 2H, J₂₋₁ = J₂₋₃ = 7.2 Hz, H₂), 1.50-1.17 (m, 12H, H₈₋₁₃), 1.43 (s, 9H, H_{Boc}), 0.87 (t, 3H, J₆₋₅ = 7.0 Hz, H₁₄) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 204.0 (C₅) 156.1 (C_{Boc}), 91.7 (C₆), 90.1 (C₄), 79.2 (C_{Boc}), 40.2 (C₁), 32.0-29.5-29.5-29.4-29.4-29.3 (C₈₋₁₃), 29.1 (C_{3 or 7}), 26.3 (C_{3 or 7}), 28.6 (C_{Boc}), 26.3 (C_{3/7}), 14.2 (C₁₃) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) m/z calculated for: C₁₉H₃₉N₂O₂ [M+NH₄]⁺: 327.3; found: 327.3

Compound *enant-91*: *tert*-butyl (S)-tetradeca-4,5-dien-1-ylcarbamate



Chemical Formula: C₁₉H₃₅NO₂
Molecular Weight: 309.49 g.mol⁻¹

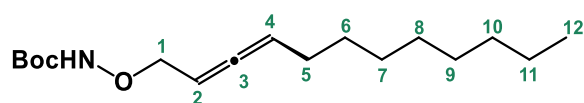
Compound *enant-91* (33.0 mg, 0.107 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from nonanal (0.109 mL, 0.634 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/DCM 100 to 60:40) to give *enant-91* as a yellow pale oil with a **25%** yield.

R_f 0.51 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = +37.2$, (c 1.0, CHCl₃)

Spectral data identical to compound **91**.

Compound *enant-93*: *tert*-butyl (S)-(dodeca-2,3-dien-1-yloxy)carbamate



Chemical Formula: C₁₇H₃₁NO₃
Molecular Weight: 297.44 g.mol⁻¹

Compound *enant-93* (88.4 mg, 0.297 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from nonanal (0.192 mL, 1.151 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5 to 85:15) to give *enant-93* as a pale yellow oil with a **38%** yield.

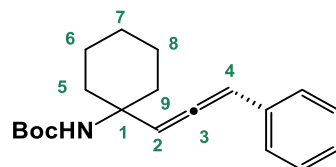
R_f 0.25 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.17 (brs, 1H, H_{NH}), 5.30-5.16 (m, 2H, H₂₊₄), 4.35-4.27 (m, 2H, H₁), 2.06-1.94 (m, 2H, H₅), 1.56-1.36 (m, 12H, H₆₋₁₁), 1.47 (s, 9H, H_{Boc}), 0.87 (t, 3H, J₁₂₋₁₁ = 7.0 Hz, H₁₂) ppm.

PARTIE EXPERIMENTALE

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 206.6 (C_3) 156.8 (C_{Boc}), 92.3 (C_4), 86.6 (C_2), 81.8 (C_{Boc}), 75.0 (C_1), 32.0-29.5-29.4-29.2-29.2-28.5 (C_{6-11}), 28.5 (C_{Boc}), 14.2 (C_{12}) ppm.

Compound **94**: *tert*-butyl (*R*)-(1-(3-phenylpropa-1,2-dien-1-yl)cyclohexyl)carbamate



Chemical Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_2$
Molecular Weight: $313.44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound **94** (42.6 mg, 0.122 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from benzaldehyde (0.045 mL, 0.448 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/E.A. 95:5 to 80:20) to give **94** as a yellow pale oil with a **46%** yield.

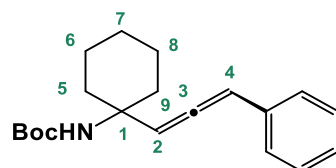
R_f 0.40 (P.E./E.A. 90:10, KMnO_4)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.30-7.20 (m, 4H, H_{Bn}), 7.18-7.09 (m, 1H, H_{Bn}), 6.22 (d, 1H, $J_{4-2} = 6.4 \text{ Hz}$, H_4), 5.86 (d, 1H, $J_{2-4} = 6.4 \text{ Hz}$, H_2), 4.5 (brs, 1H, H_{NH}), 2.06-1.91 (m, 1H, H_5), 1.66-1.15 (m, 9H, $\text{H}_{5'-9}$), 1.38 (s, 9H, H_{Boc}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 203.4 (C_3) 154.5 (C_{Boc}), 134.6-132.6-130.2-128.7-128.4-127.0-126.9 (C_{aro}), 120.1-117.3-115.3 (C_{Bn}), 102.9 (C_4), 97.5 (C_2), 79.2 (C_{Boc}), 54.9-29.8-25.6-22.0-22.0 (C_{5-9}), 28.6 (C_{Boc}) ppm.

LR-MS (DCI-NH_3) m/z calculated for: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 314.2; found: 314.3

Compound *enant-94*: *tert*-butyl (*S*)-(1-(3-phenylpropa-1,2-dien-1-yl)cyclohexyl)carbamate

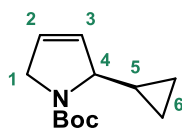


Chemical Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_2$
Molecular Weight: $313.44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Compound *enant-94* (45.2 mg, 0.144 mmol) was prepared by general procedure **A** starting from benzaldehyde (0.61 mL, 0.596 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/E.A. 95:5 to 80:20) to give *enant-94* as a yellow pale oil with a **36%** yield.

R_f 0.40 (P.E./E.A. 90:10, KMnO_4)

Spectral data identical to compound **94**.

Compound 95: tert-butyl (R)-2-cyclopropyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylate

Chemical Formula: C₁₂H₁₉NO₂
Molecular Weight: 209.29 g.mol⁻¹

Compound **95** (124.0 mg, 0.592 mmol) was prepared by general procedure **C** starting from **83** (124.9 mg, 0.596 mmol). The crude product was purified by celite filtration (E.A.) to give **95** as a colorless oil with a **99%** yield.

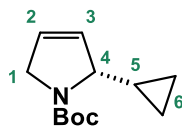
volatile product

R_f 0.30 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

Rotameric ratio (1/2) 0.35

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.83-5.53 (m, 2H, H₂₊₃), 4.42-3.92 (m, 3H, H₁₊₄), 1.48 (s, 9H, H_{Boc}), 0.90-0.73 (m, 1H, H₅), 0.56-0.09 (m, 4H, H₆) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 154.8 (C_{Boc(rota1)}), 154.6 (C_{Boc(rota2)}), 128.9 (C₃), 125.8 (C_{2(rota1)}), 125.7 (C_{2(rota2)}), 79.5 (C_{Boc(rota1)}), 79.0 (C_{Boc(rota2)}), 66.5 (C₄), 54.0 (C_{1(rota2)}), 53.6 (C_{1(rota1)}), 28.6 (C_{Boc}), 15.2 (C_{5(rota1)}), 14.7 (C_{5(rota2)}), 4.0-3.2-3.2-0.5 (C_{6(rota1/2)}) ppm.

Compound enant-95: tert-butyl (S)-2-cyclopropyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylate

Chemical Formula: C₁₂H₁₉NO₂
Molecular Weight: 209.29 g.mol⁻¹

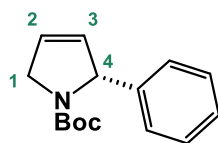
Compound **enant-95** (167.0 mg, 0.798 mmol) was prepared by general procedure **C** starting from **enant-84** (170.0 mg, 0.812 mmol). The crude product was purified by celite filtration (E.A.) to give **enant-95** as a colorless oil with a **98%** yield.

volatile product

R_f 0.30 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

Rotameric ratio (1/2) 0.35

Spectral data identical to compound **95**.

Compound *enant-96*: tert-butyl (*R*)-2-phenyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate

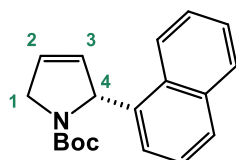
Chemical Formula: C₁₅H₁₉NO₂
Molecular Weight: 245.32 g.mol⁻¹

Compound ***enant-96*** (60.0 mg, 0.245 mmol) was prepared by general procedure **C** starting from ***enant-84*** (60.0 mg, 0.245 mmol). The crude product was purified by celite filtration (E.A.) to give ***enant-96*** as a colorless oil with a **100.0%** yield.

R_f 0.18 (P.E./E.A. 95:5, KMnO₄)

Rotameric ratio (1/2) 0.31

Spectral data are in accordance with literature.²⁵¹

Compound *enant-97*: tert-butyl (*R*)-2-(naphthalen-1-yl)-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate

Chemical Formula: C₁₉H₂₁NO₂
Molecular Weight: 295,38 g.mol⁻¹

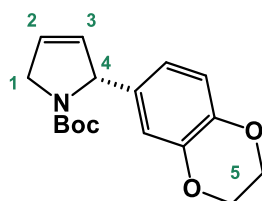
Compound ***enant-97*** (45.0 mg, 0.152 mmol) was prepared by general procedure **C** starting from ***enant-85*** (45.0 mg, 0.152 mmol). The crude product was purified by celite filtration (E.A.) to give ***enant-97*** as a colorless oil with a **100%** yield.

R_f 0.17 (P.E./E.A. 95:5, KMnO₄)

Rotameric ratio (1/2) 0.65

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.15-8.05 (m, 1H, H_{aro}), 7.90-7.70 (m, 2H, H_{aro}), 7.55-7.33 (m, 4H, H_{aro}), 6.37 (bs, 0.35H, H_{4(rota2)}), 6.25 (t, 0.65H, J₄₋₃ = J₄₋₂ = 4.2 Hz H_{4(rota1)}), 6.00-5.74 (m, 2H, H_{2+3(rota1/2)}), 4.49 (d, 1H, J₁₋₂ = 4.6 Hz H_{1(rota1/2)}), 4.49-4.30 (m, 1H, H_{1'(rota1/2)}), 1.47 (s, 3.1H, H_{Boc(rota2)}), 1.01 (s, 5.9H, H_{Boc(rota1)}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 154.3 (C_{Boc}), 138.7-137.6-129.0-127.7-127.6-126.1-125.9-125.7-125.6-123.4-122.9-122.7-122.4 (C_{aro(rota1/2)}), 131.0 (C_{3(rota1)}), 130.6 (C_{3(rota2)}), 124.7 (C_{2(rota1)}), 124.6 (C_{2(rota2)}), 79.9 (C_{Boc(rota2)}), 79.6 (C_{Boc(rota1)}), 65.2 (C_{4(rota2)}), 64.8 (C_{4(rota1)}), 54.4 (C_{1(rota2)}), 53.9 (C_{1(rota1)}), 28.7 (C_{Boc(rota2)}), 28.2 (C_{Boc(rota1)}) ppm.

Compound *enant-98*: tert-butyl (R)-2-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate

Chemical Formula: C₁₇H₂₁NO₄
Molecular Weight: 303.36 g.mol⁻¹

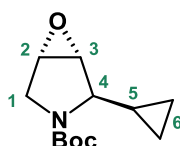
Compound ***enant-98*** (60.7 mg, 0.200 mmol) was prepared by general procedure **C** starting from ***enant-86*** (60.7 mg, 0.200 mmol). The crude product was purified by celite filtration (E.A.) to give ***enant-98*** as a colorless oil with a **100%** yield.

R_f 0.13 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

Rotameric ratio (1/2) 0.40

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.83-6.62 (m, 3H, H_{aro}), 5.90-5.63 (m, 2H, H_{2+3(rota1/2)}), 5.45-5.37 (m, 1H, H_{4(rota1)}), 5.30-5.22 (m, 0.6H, H_{4(rota2)}), 4.32-4.16 (m, 6H, H_{1+10-11(rota1/2)}), 1.43 (s, 3.6H, H_{Boc(rota1)}), 1.26 (s, 5.4H, H_{Boc(rota2)}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 154.2 (C_{Boc(rota2)}) 153.9 (C_{Boc(rota1)}), 143.3-143.1-142.6-142.5-135.6-135.2-119.8-119.5-117.2-116.7-115.5-115.1 (C_{aro(rota1/2)}), 131.3 (C_{3(rota1)}), 131.0 (C_{3(rota2)}), 124.5 (C_{2(rota2)}), 124.3 (C_{2(rota1)}), 79.5 (C_{Boc(rota2)}), 79.4 (C_{Boc(rota1)}), 67.4 (C_{4(rota2)}), 67.2 (C_{4(rota1)}), 64.3-64.3 (C₅), 54.0 (C_{1(rota1)}), 53.5 (C_{1(rota2)}), 28.4 (C_{Boc(rota1)}), 28.2 (C_{Boc(rota2)}) ppm.

Compound 99: tert-butyl (1*R*,2*R*,5*S*)-2-cyclopropyl-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate

Chemical Formula: C₁₂H₁₉NO₃
Molecular Weight: 225.29 g.mol⁻¹

Compound **99** (76.0 mg, 0.337 mmol) was prepared by general procedure **D** starting from **95** (124.0 mg, 0.592 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 80:20) to give **99** as a colorless oil with a **57%** yield.

volatile product

R_f 0.29 (P.E./E.A. 80:20, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -12.0 (c 1.0, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.35

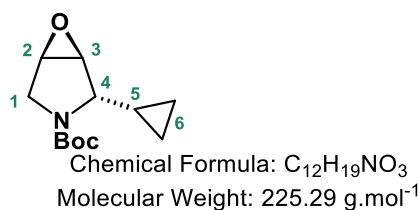
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.88 (d, 0.35H, J_{1-1'} = 13.0 Hz, H_{1(rota1)}), 3.78 (d, 0.65H, J_{1-1'} = 13.0 Hz, H_{1(rota2)}), 3.73-3.40 (m, 3H, H_{2(rota1/2)}, H_{3(rota1/2)}, H_{4(rota1/2)}), 3.24 (d, 0.65H, J_{1'-1} = 13.0 Hz, H_{1'(rota2)}), 3.24 (d, 0.35H, H_{1(rota1)}) 1.41 (s, 3.1H, H_{Boc(rota1)}), 1.40 (s, 5.9H, H_{Boc(rota2)}), 0.78-0.24 (m, 5H, H₅₋₆) ppm.

PARTIE EXPERIMENTALE

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 155.3 ($\text{C}_{\text{Boc(rota1)}}$) 155.2 ($\text{C}_{\text{Boc(rota2)}}$), 79.9 ($\text{C}_{\text{Boc(rota1)}}$), 79.7 ($\text{C}_{\text{Boc(rota2)}}$), 61.6 ($\text{C}_{4(\text{rota1})}$), 60.9 ($\text{C}_{4(\text{rota2})}$), 58.7 ($\text{C}_{3(\text{rota1})}$), 58.1 ($\text{C}_{3(\text{rota2})}$), 54.6 ($\text{C}_{2(\text{rota2})}$), 54.1 ($\text{C}_{2(\text{rota1})}$), 47.4 ($\text{C}_{1(\text{rota2})}$), 46.7 ($\text{C}_{1(\text{rota1})}$), 28.5 ($\text{C}_{\text{Boc(rota1)}}$), 28.5 ($\text{C}_{\text{Boc(rota2)}}$), 11.9 ($\text{C}_{5(\text{rota1})}$), 11.7 ($\text{C}_{5(\text{rota2})}$), 3.8 ($\text{C}_{6(\text{rota1})}$), 3.2 ($\text{C}_{6(\text{rota2})}$), 1.8 ($\text{C}_{6(\text{rota2})}$), 1.7 ($\text{C}_{6(\text{rota1})}$) ppm.

LR-MS (DCI-NH_3) m/z calculated for: $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 226.1 ; found: 226.1 ; $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{H}+\text{NH}_4]^+$: 187.11 ; found: 187.1

Compound *enant-99*: tert-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-cyclopropyl-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate



Compound *enant-99* (16.8 mg, 0.075 mmol) was prepared by general procedure **D** starting from *enant-95* (17.5 mg, 0.084 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 80:20) to give *enant-99* as a colorless oil with a **89%** yield.

volatile product

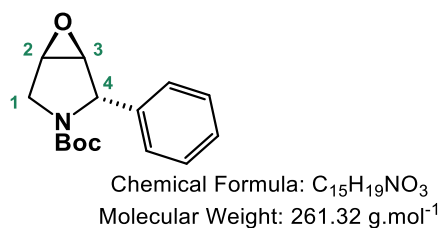
R_f 0.29 (P.E./E.A. 80:20, KMnO_4)

$[\alpha]_D^{20} = +11.3$, (c 0.9, CHCl_3)

Rotameric ratio (1/2) 0.35

Spectral data identical to compound **99**.

Compound *enant-100*: tert-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-phenyl-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate



Compound *enant-100* (61.9 mg, 0.237 mmol) was prepared by general procedure **D** starting from *enant-96* (60.0 mg, 0.245 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 95:5 to 90:10) to give *enant-100* as a colorless oil with a **97%** yield.

R_f 0.42 (P.E./E.A. 80:20, KMnO_4)

$[\alpha]_D^{20} = +80.5$ (c 1.0, CHCl_3)

Rotameric ratio (1/2) 0.35

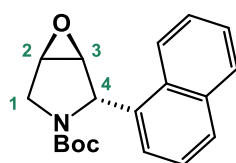
PARTIE EXPERIMENTALE

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.44-7.10 (m, 5H, H_{aro}), 5.12 (s, 0.35H, H_{4(rota1)}), 4.95 (s, 0.65H, H_{4(rota2)}), 4.02 (d, 0.65H, *J*_{1-1'} = 12.7 Hz, H_{1(rota2)}), 3.97 (d, 0.35H, *J*_{1-1'} = 12.7 Hz, H_{1(rota1)}), 3.78 (dd, 0.65H, *J*₂₋₁ = 1.0 Hz, *J*₂₋₃ = 2.7 Hz, H_{2(rota2)}), 3.73 (dd, 0.35H, *J*₂₋₁ = 1.0 Hz, *J*₂₋₃ = 2.7 Hz, H_{2(rota1)}), 3.65-3.52 (m, 2H, H_{1+3(rota1/2)}) 1.43 (s, 3.1H, H_{Boc(rota1)}), 1.26 (s, 5.9H, H_{Boc(rota2)}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) 154.7 (C_{Boc(rota2)}), 154.6 (C_{Boc(rota1)}), 139.0-138.4-129.0-128.8-128.0-128.0-126.7-126.6 (C_{aro(rota1/2)}), 80.3 (C_{Boc(rota1)}), 80.2 (C_{Boc(rota2)}), 62.2 (C_{4(rota2)}), 61.5 (C_{4(rota1)}), 60.4 (C_{3(rota2)}), 59.8 (C_{3(rota1)}), 55.6 (C_{2(rota1)}), 55.3 (C_{2(rota2)}), 48.2 (C_{1(rota1)}), 47.7 (C_{1(rota2)}), 28.6 (C_{Boc(rota1)}), 28.3 (C_{Boc(rota2)}) ppm.

HR-MS (DCI-CH₄) *m/z* calculated for: C₁₁H₁₂NO₃ [M-C(CH₃)₃+2H]⁺: 206.0817 ; found: 206.0803

Compound *enant-101*: *tert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-(naphthalen-1-yl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate



Chemical Formula: C₁₉H₂₁NO₃
Molecular Weight: 311.38 g.mol⁻¹

Compound *enant-101* (18.2 mg, 0.058 mmol) was prepared by general procedure **D** starting from *enant-97* (40.0 mg, 0.135 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 87:13) to give *enant-101* as a colorless oil with a **43%** yield.

R_f 0.66 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)

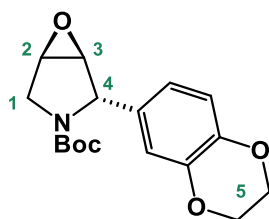
[α]_D²⁰ = +103.7 (c 0.4, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.65

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.24-7.23 (m, 7H, H_{aro}), 5.95 (s, 0.65H, H_{4(rota1)}), 5.81 (s, 0.35H, H_{4(rota2)}), 4.15 (d, 0.65H, *J*_{1-1'} = 13.0 Hz, H_{1(rota1)}), 4.12 (d, 0.35H, *J*_{1-1'} = 13.0 Hz, H_{1(rota2)}), 3.77-3.61 (m, 3H, H_{1'-3(rota1/2)}), 1.47 (s, 3.1H, H_{Boc(rota2)}), 1.15 (s, 5.9H, H_{Boc(rota1)}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 154.8 (C_{Boc}), 134.2-134.1-133.9-133.3-130.7-130.7-129.6-129.1-128.6-128.5-126.6-126.0-125.6-125.5-122.9-122.6-122.4 (C_{aro(rota1/2)}), 80.4 (C_{Boc(rota1)}), 80.2 (C_{Boc(rota2)}), 60.2 (C_{4(rota2)}), 59.6 (C_{4(rota1)}), 59.4 (C_{3(rota2)}), 59.2 (C_{3(rota1)}), 55.6 (C_{2(rota1)}), 55.3 (C_{2(rota2)}), 48.5 (C_{1(rota1)}), 47.9 (C_{1(rota2)}), 28.6 (C_{Boc(rota1)}), 28.2 (C_{Boc(rota2)}) ppm.

LR-MS (DCI/CH₄) *m/z* calculated for: C₁₉H₂₁NO₃ [M]⁺: 311.2 ; found: 311.2

Compound *enant-102*: tert-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate

Chemical Formula: C₁₇H₂₁NO₅
Molecular Weight: 319.36 g.mol⁻¹

Compound ***enant-102*** (15.0 mg, 0.049 mmol) was prepared by general procedure **D** starting from ***enant-98*** (60.0 mg, 0.198 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 95:5 to 90:10) to give ***enant-102*** as a colorless oil with a **25%** yield.

R_f 0.38 (P.E./E.A. 80:20, KMnO₄)

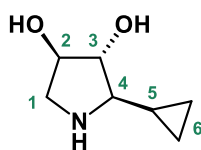
[α]_D²⁰ = +77.8 (c 1.0, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.40

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.88-6.63 (m, 3H, H_{aro}), 5.00 (s, 0.4H, H_{4(rota1)}), 4.84 (s, 0.6H, H_{4(rota2)}), 4.26 (s, 2.4H, H_{5(rota2)}), 4.26 (s, 1.6H, H_{5(rota1)}), 3.96 (t, 1H, J_{1-1'} = 12.7 Hz, H_{1(rota1/rota2)}), 3.76 (dd, 0.6H, J₂₋₁ = 1.0 Hz, J₂₋₃ = 2.9 Hz, H_{2(rota2)}), 3.70 (dd, 0.4H, J₂₋₁ = 1.0 Hz, J₂₋₃ = 2.9 Hz, H_{2(rota1)}), 3.58-3.49 (m, 2H, H_{1+3(rota1/rota2)}) 1.42 (s, 2.6H, H_{Boc(rota1)}), 1.25 (s, 5.4H, H_{Boc(rota2)}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 154.6 (C_{Boc(rota1/2)}), 143.6 (C_{aro(rota2)}), 143.1 (C_{aro(rota1)}), 132.1 (C_{aro(rota2)}), 131.6 (C_{aro(rota1)}), 119.6 (C_{aro(rota2)}), 119.5 (C_{aro(rota1)}), 117.7 (C_{aro(rota1)}), 117.3 (C_{aro(rota2)}), 115.4 (C_{aro(rota2)}), 115.2 (C_{aro(rota1)}), 80.0 (C_{Boc(rota1)}), 79.9 (C_{Boc(rota2)}), 64.3-64.3-64.3-64.3 (C_{5(rota1/2)}), 61.3 (C_{4(rota2)}), 60.8 (C_{4(rota1)}), 60.0 (C_{3(rota2)}), 59.6 (C_{3(rota1)}), 55.4 (C_{2(rota1)}), 55.0 (C_{2(rota2)}), 47.9 (C_{1(rota1)}), 47.3 (C_{1(rota2)}), 28.4 (C_{Boc(rota1)}), 28.3 (C_{Boc(rota2)}) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₇H₂₁NNaO₅ [M+Na]⁺: 342.13 ; found: 342.13

Compound 103: (2*R*,3*R*,4*R*)-2-cyclopropylpyrrolidine-3,4-diol

Chemical Formula: C₇H₁₃NO₂
Molecular Weight 143.19 g.mol⁻¹

Compound **103** (7.4 mg, 0.052 mmol) was prepared by general procedure **E** starting from **99** (40.0 mg, 0.178 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/EtOH/ammonia 80:7:9:4) to give **103** as a colorless oil with a **29%** yield.

R_f 0.28 (DCM/MeOH/EtOH/ammonia 76:11:7:6, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -2.5 (c 1.0, MeOH)

Diastereoisomeric ratio (103/*dias-103*) 0.80

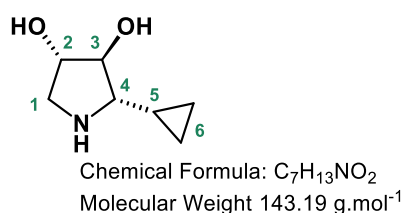
PARTIE EXPERIMENTALE

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz) δ 4.11 (dt, 1H, $J_{2-1} = 5.9$ Hz, $J_{2-3} = 3.8$ Hz, $J_{2-1'} = 3.8$ Hz, H₂), 3.88 (brdd, 1H, $J_{3-4} = 5.7$ Hz, $J_{3-2} = 3.8$ Hz, H₃), 3.07 (A part of an ABX system, dd, 1H, $J_{1-1'} = 12.5$ Hz, $J_{1-2} = 5.9$ Hz, $\Delta\delta = 0.059$ ppm, H₁), 2.86 (B part of an ABX system, dd, 1H, $J_{1-1'} = 12.5$ Hz, $J_{1'-2} = 3.8$ Hz, $\Delta\delta = 0.046$ ppm, H_{1'}), 2.17 (dd, 1H, $J_{4-3} = 5.6$ Hz, $J_{4-5} = 9.3$ Hz, H₄), 0.98-0.85 (m, 1H, H₅), 0.61-0.49 (m, 2H, H₆), 0.36-0.15 (m, 2H, H₆) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 75 MHz) δ 84.4 (C₃), 79.7 (C₂), 71.4 (C₄), 52.5 (C₁), 15.3 (C₅), 4.6 (C₆), 4.1 (C₆) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₇H₁₄NO₂ [M+H]⁺: 144.1024 ; found: 144.1027

Compound *enant-103*: (2S,3S,4S)-2-cyclopropylpyrrolidine-3,4-diol



Compound *enant-103* (25.6 mg, 0.179 mmol) was prepared by general procedure **E** starting from *enant-99* (130.0 mg, 0.577 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/EtOH/ammonia 80:7:9:4) to give *enant-103* as a colorless oil with a **32%** yield.

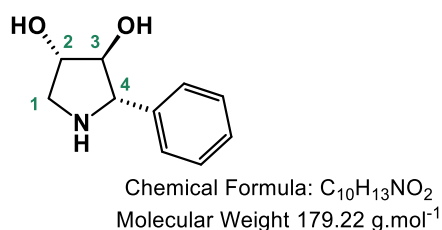
R_f 0.28 (DCM/MeOH/EtOH/ammonia 76:11:7:6, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = +0.7$ (c 1.0, MeOH)

Diastereoisomeric ratio (compound *enant-103*/*dias-enant-103*) 0.80

Spectral data identical to compound **103**.

Compound *enant-104*: (2S,3S,4S)-2-phenylpyrrolidine-3,4-diol



Compound *enant-104* (6.2 mg, 0.027 mmol) was prepared by general procedure **E** starting from *enant-100* (17.0 mg, 0.055 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/EtOH/ammoniac 80:7:9:4) to give *enant-104* as a colorless oil with a **19%** yield.

R_f 0.20 (DCM/MeOH/EtOH/ammonia 80:7:9:4, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = +2.5$ (c 0.8, MeOH)

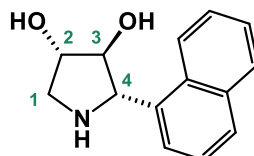
Diastereoisomeric ratio (*enant-104*/*dias-enant-104*) 0.80

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 7.50-7.19 (m, 5H, H_{aro}), 4.17-4.08 (s, 1H, H₄), 3.96 (ddd, 1H, $J_{2-3} = 0.5$ Hz, $J_{2-1'} = 2.8$ Hz, $J_{2-1} = 5.7$ Hz, H₂), 3.81 (brd, 1H, $J_{3-4} = 9.0$ Hz, H₃), 3.46 (dd, 1H, $J_{1-2} = 5.2$ Hz, $J_{1-1'} = 12.0$ Hz, H₁), 3.46 (dd, 1H, $J_{1'-2} = 2.8$ Hz, $J_{1'-1} = 12.0$ Hz, H_{1'}) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 144.4 (C_{aro}), 129.9-129.9-129.1-128.2-128.2 (C_{aro}), 84.8 (C₃), 78.4 (C₂), 69.1 (C₄), 52.6 (C₁) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₀H₁₄NO₂ [M+H]⁺: 180.1024 ; found: 180.1025

Compound *enant*-105: (2S,3S,4S)-2-(naphthalen-1-yl)pyrrolidine-3,4-diol



Chemical Formula: C₁₄H₁₅NO₂
Molecular Weight: 229.28 g.mol⁻¹

Compound ***enant*-105** (6.2 mg, 0.027 mmol) was prepared by general procedure **E** starting from ***enant*-101** (17.0 mg, 0.055 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/EtOH/ammonia 87:6:6:1) to give ***enant*-105** as a colorless oil with a **50%** yield.

R_f 0.24 (DCM/MeOH/ammoniac 86:13:1, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -2.70 (c 0.7, MeOH)

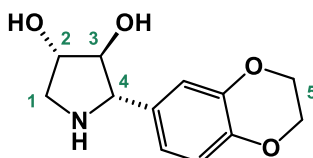
Diastereoisomeric ratio (*enant*-105/*dias-enant*-105) 0.80

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 8.21-7.47 (m, 7H, H_{aro}), 4.93-4.75 (s, 1H, H₄), 4.42-4.34 (m, 2H, H₂₊₃), 3.46 (dd, 1H, $J_{1-2} = 5.4$ Hz, $J_{1-1'} = 12.5$ Hz, H₁), 3.22-3.14 (m, 1H, H_{1'}) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 135.3 (C_{aro}), 134.8 (C_{aro}), 132.5 (C_{aro}), 129.8-129.6-127.7-127.1-126.6-124.9-123.9 (C_{aro}), 83.6 (C₃), 78.2 (C₂), 64.5 (C₄), 52.2 (C₁) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₄H₁₆NO₂ [M+H]⁺: 230.1181 ; found: 230.1185

Compound *enant*-106: (2S,3S,4S)-2-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)pyrrolidine-3,4-diol



Chemical Formula: C₁₂H₁₅NO₄
Molecular Weight 237.26 g.mol⁻¹

Compound ***enant*-106** (1.2 mg, 0.005 mmol) was prepared by general procedure **E** starting from ***enant*-102** (13.0 mg, 0.041 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/EtOH/ammoniac 87:6:6:1) to give ***enant*-106** as a colorless oil with a **13%** yield.

R_f 0.20 (DCM/MeOH/ammonia 88:12:1, KMnO₄)

Diastereoisomeric ratio (*enant*-106/*dias-enant*-106) 0.70

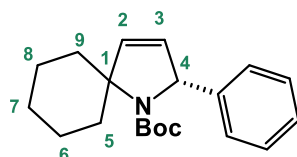
PARTIE EXPERIMENTALE

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 6.95 (d, 1H, $J_{\text{aro-aro}} = 2.1$ Hz, H_{aro}), 6.90 (dd, 1H, $J_{\text{aro-aro}} = 8.3$ Hz, $J_{\text{aro-aro}} = 2.1$ Hz, H_{aro}), 6.80 (d, 1H, $J_{\text{aro-aro}} = 8.3$ Hz, H_{aro}), 4.22 (s, 4H, H₅), 4.14-4.09 (m, 1H, H₄), 3.95 (dd, 1H, $J_{2-1'} = 3.0$ Hz, $J_{2-1} = 5.7$ Hz, H₂), 3.79-3.71 (m, 1H, H₃), 3.19-3.11 (m, 1H, H₁), 3.07-2.99 (m, 1H, H_{1'})

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 145.1 (C_{aro}), 144.8 (C_{aro}), 134.5 (C_{aro}), 121.5 (C_{aro}), 118.3 (C_{aro}), 117.4 (C_{aro}), 85.6 (C₃), 79.3 (C₂), 70.9 (C₄), 65.7 (C₆), 53.5 (C₁)

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₂H₁₆NO₄ [M+H]⁺: 238.1079 ; found: 238.1083

Compound *enant-107*: *tert*-butyl (*R*)-2-phenyl-1-azaspiro[4.5]dec-3-ene-1-carboxylate



Chemical Formula: C₂₀H₂₇NO₂
Molecular Weight: 313.44 g.mol⁻¹

AuCl (0.50 mg) was added to a solution of *enant-94* (29.1 mg, 0.093 mmol) in DCM (6.50 mL) under N₂. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h. Then, the mixture was quenched with water (10.00 mL), washed with brine (2 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 100:0 to 80:20) to give *enant-107* as a yellow oil with a **45%** yield (13.0 mg, 0.041 mmol).

R_f 0.45 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

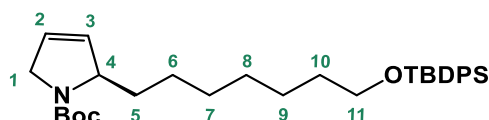
Rotameric ratio (1/2) 0.80

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.35-7.10 (m, 5H, H_{aro}), 6.22 (dd, 0.8H, $J_{2-3} = 6.1$ Hz, $J_{2-4} = 2.5$ Hz, H_{2(rota1)}), 6.19 (dd, 0.2H, $J_{2-3} = 6.1$ Hz, $J_{2-4} = 2.5$ Hz, H_{2(rota2)}), 5.63 (dd, 0.2H, $J_{3-2} = 6.1$ Hz, $J_{3-4} = 2.1$ Hz, H_{3(rota2)}), 5.58 (dd, 0.8H, $J_{3-2} = 6.1$ Hz, $J_{3-4} = 2.1$ Hz, H_{3(rota1)}), 5.43 (t, 1H, $J_{4-2} = J_{4-3} = 2.1$ Hz, H₄), 2.77 (m, 1.6H, H_{5or9}), 2.52 (m, 0.4H, H_{5or9}), 1.88-0.80 (m, 8H, H_{6-8+5or9}), 1.26 (s, 2.8H, H_{Boc}), 1.12 (s, 6.2H, H_{Boc}) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 153.7 (C_{aro(rota2)}), 153.1 (C_{aro(rota1)}), 143.3 (C_{aro(rota1)}), 142.2 (C_{aro(rota2)}), 131.9-131.8-130.2-128.5-128.4-128.2-127.0 (C_{aro(rota1/2)}), 126.7 (C_{3(rota1)}), 126.5 (C_{3(rota2)}), 79.8 (C_{Boc(rota2)}), 79.2 (C_{Boc(rota1)}), 71.4 (C_{1(rota1)}), 70.9 (C_{1(rota2)}), 69.9 (C_{4(rota1)}), 69.6 (C_{4(rota2)}), 36.3-35.6-35.4-33.9 (C_{5+9(rota1/2)}), 28.7 (C_{Boc(rota2)}), 28.3 (C_{Boc(rota1)}), 25.9 (C_{7(rota2)}), 25.5 (C_{7(rota1)}), 24.7-24.6-24.5-24.5 (C_{6+8(rota1/2)}) ppm.

LR-MS (DCI-NH₃) m/z calculated for: C₂₀H₂₇NO₂ [M+H]⁺: 314.2 ; found: 314.3

Compound 108: *tert*-butyl-(*R*)-2-(7-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)heptyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylate



Chemical Formula: C₃₂H₄₇NO₃Si
Molecular Weight: 521.82 g.mol⁻¹

PARTIE EXPERIMENTALE

Compound **108** (2.06 g, 3.944 mmol) was prepared by general procedure **C** starting from **89** (2.1 mg, 4.024 mmol). The crude product was purified by celite filtration (E.A.) to give **108** as a colorless oil with a **98%** yield.

R_f 0.17 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

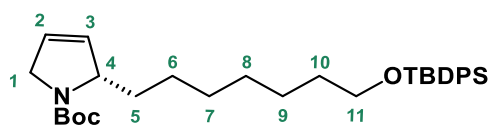
Rotameric ratio (1/2) 0.6

ee **94%** (t_R (major) = 16.112 min, t_R (minor) = 15.297 min, Column Lux 3 μm amylose-1 4.6x100 mm, H₂O/MeOH = 15:85)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.75-7.61 (m, 4H, H_{aro}), 7.47-7.33 (m, 6H, H_{aro}), 5.80-5.60 (m, 2H, H_{2-3(rota1/2)}), 5.61-5.50 (m, 1H, H_{4(rota2)}), 5.50-5.42 (m, 1H, H_{4(rota1)}), 4.23 (d, 1H, J_{H1-H1'} = 15.7 Hz, H_{1(rota1)}), 4.15 (d, 1H, J_{H1-H1'} = 15.7 Hz, H_{1(rota2)}), 4.08-3.94 (m, 1H, H_{1(rota1/2)}), 3.66 (t, 2H, J_{H11-H10} = 6.5, H₁₁), 1.72-1.52 (m, 4H, H₉₋₁₀), 1.49 (s, 9H, H_{Boc}), 1.40-1.17 (m, 8H, H₅₋₈), 1.06 (s, 9H, H_{TBDPS}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 154.6 (C_{Boc}), 135.7-134.3 (C_{aro}), 130.5 (C_{2 or 3(rota1)}), 130.3 (C_{2 or 3(rota 2)}), 129.6-127.7 (C_{aro}), 125.2 (C_{2or3(rota 2)}), 125.0 (C_{2or3(rota1)}), 79.4 (C_{Boc(rota 2)}), 79.2 (C_{Boc(rota 1)}), 64.3 (C₄), 64.1 (C₁₁), 53.9 (C_{1(rota 1)}), 53.7 (C_{1(rota 2)}), 34.2, 33.6, 32.7, 29.8, 29.5, 25.9, 24.7, 24.3 (C_{5-10(rota 1/2)}), 28.7 (C_{Boc}), 27.0 (C_{TBDPS}), 19.4 (C_{TBDPS}) ppm.

Compound *enant-108*: *tert*-butyl-(*S*)-2-(7-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)heptyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylate



Chemical Formula: C₃₂H₄₇NO₃Si
Molecular Weight: 521.82 g.mol⁻¹

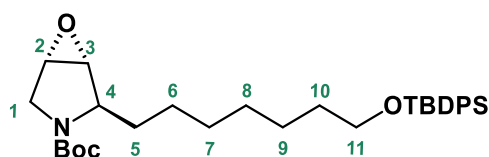
Compound *enant-108* (1.05 g, 2.008 mmol) was prepared by general procedure **C** starting from *enant-89* (1.10 g, 2,116 mmol). The crude product was purified by celite filtration (E.A.) to give *enant-108* as a colorless oil with a **95%** yield.

R_f 0.17 (P.E./E.A. 90:10, KMnO₄)

Rotameric ratio (1/2) 0.6

Spectral data identical to compound **108**.

Compound **109**: *tert*-butyl (1*R*,2*R*,5*S*)-2-(7-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)heptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate



Chemical Formula: C₃₂H₄₇NO₄Si
Molecular Weight: 537.82 g.mol⁻¹

PARTIE EXPERIMENTALE

Compound **109** (448.0 mg, 0.833 mmol) was prepared by general procedure **D** starting from **108** (0.5 mg, 0.958 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 75:25) to give **109** as a colorless oil with a **87%** yield.

R_f 0.32 (P.E./E.A. 80:20, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = -24.5$ (c 1.0, CHCl₃)

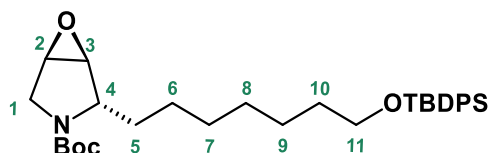
Rotameric ratio (1/2) 0.4

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.74-7.66 (m, 4H, H_{aro}), 7.45-7.34 (m, 6H, H_{aro}), 4.08 (dd, *J*₄₋₅ = 7.4 Hz, *J*₄₋₃ = 5.0 Hz, 1H, H_{4(rota1)}), 3.99 (t, *J*₄₋₅ = 6.1 Hz, 1H, H_{4(rota2)}), 3.91 (d, *J*_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota2)}), 3.79 (d, *J*_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota1)}), 3.69 (t, *J*₁₁₋₁₀ = 6.4 Hz, 2H, H_{11(rota2)}), 3.69 (t, *J*₁₁₋₁₀ = 6.4 Hz, 2H, H_{11(rota1)}), 3.61 (d, *J*₂₋₃ = 3.0 Hz, 1H, H_{2(rota2)}), 3.59 (d, *J*₂₋₃ = 3.0 Hz, 1H, H_{2(rota1)}), 3.46-3.42 (m, 1H, H₃), 3.26 (d, *J*_{1'-1} = 12.9 Hz, 1H, H_{1'(rota2)}), 3.22 (d, *J*_{1'-1} = 12.9 Hz, 1H, H_{1'(rota1)}), 1.67-1.49 (m, 4H, H₉₋₁₀), 1.46 (s, 9H, H_{Boc}), 1.43-1.25 (m, 8H, H₅₋₈), 1.08 (s, 9H, H_{TBDPS}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.9 (C_{Boc(rota2)}), 154.6 (C_{Boc(rota1)}), 135.5 (C_{aro}), 134.1 (C_{aro}), 129.5, 127.6 (C_{aro}), 79.7 (C_{Boc(rota2)}), 79.6 (C_{Boc(rota1)}), 69.9 (C₁₁), 58.6 (C_{3(rota2)}), 58.1 (C_{3(rota1)}), 57.8 (C_{4(rota2)}), 57.6 (C_{4(rota1)}), 54.8 (C_{2(rota1)}), 54.2 (C_{2(rota2)}), 47.1 (C_{1(rota1)}), 46.5 (C_{1(rota2)}), 33.5, 31.1, 29.7, 29.2, 25.7, 25.5, 24.7, 24.3 (C_{5-10(rota1/2)}), 28.5 (C_{Boc}), 27.7 (C_{TBDPS}), 19.3 (C_{TBDPS}) ppm.

HR-MS (DCI-CH₄) *m/z* calculated for: C₃₂H₄₈NO₄Si [M+H]⁺: 538.3353 ; found: 538.3353

Compound *enant-109*: *tert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-(7-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)heptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate



Chemical Formula: C₃₂H₄₇NO₄Si
Molecular Weight: 537.82 g.mol⁻¹

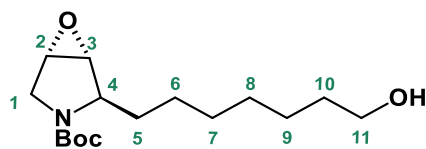
Compound *enant-109* (803.0 mg, 1.493 mmol) was prepared by general procedure **D** starting from *enant-108* (1050.0 mg, 2,012 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 75:25) to give *enant-109* as a colorless oil with a **74%** yield.

R_f 0.32 (P.E./E.A. 80:20, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = +27.2$ (c 1.06, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.4

Spectral data identical to compound **109**.

Compound 110: *tert*-butyl (1*R*,2*R*,5*S*)-2-(7-hydroxyheptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate

Chemical Formula: C₁₆H₂₉NO₄
Molecular Weight: 299.41 g.mol⁻¹

A solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride (1M/THF) (5.20 mL, 5.200 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of **109** (1.40 g, 2.603 mmol) in dry THF (26.00 mL) under N₂ and stirred at rt overnight. Then, the mixture was quenched with HCl (1M), extracted with Et₂O (3 x 30.00 mL), washed with water (20.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 60:40) to give **109** as a colorless oil with a **95%** yield (740.00 mg, 2.472 mmol).

R_f 0. 37 (P.E./E.A. 50:50, KMnO₄)

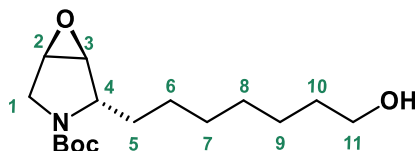
[α]_D²⁰ = -55.6 (c 1.20, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.4

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.01 (dd, J₄₋₅ = 7.4 Hz, J₄₋₃ = 5.0 Hz, 1H, H_{4(rota1)}), 3.91 (t, J₄₋₅ = 7.4 Hz, J₄₋₃ = 5.0 Hz, 1H, H_{4(rota2)}), 3.82 (d, J_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota2)}), 3.74 (d, J_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota1)}), 3.60-3.51 (m, 3H, H₂₊₁₁), 3.42-3.37 (m, 1H, H₃), 3.22-3.19 (m, 1H, H_{1'(rota2)}), 3.18-3.15 (m, 1H, H_{1'(rota1)}), 1.61-1.42 (m, 4H, H₉₋₁₀), 1.39 (s, 9H, H_{Boc(rota2)}), 1.38 (s, 9H, H_{Boc(rota1)}), 1.33-1.25 (m, 8H, H₅₋₈) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.1 (C_{Boc(rota2)}), 154.7 (C_{Boc(rota1)}), 79.9 (C_{Boc(rota2)}), 79.7 (C_{Boc(rota1)}), 62.7 (C₁₁), 58.6 (C_{3(rota1)}), 58.1 (C_{4(rota1)}), 57.9 (C_{3(rota2)}), 57.9 (C_{4(rota2)}), 54.9 (C_{2(rota1)}), 54.3 (C_{2(rota2)}), 47.1 (C_{1(rota1)}), 46.6 (C_{1(rota2)}), 32.7, 32.6, 31.1, 30.5, 29.7, 29.6, 29.3, 29.2, 26.2, 25.7, 25.6, 25.5, 25.4 (C_{5-10(rota1/2)}), 28.5 (C_{Boc}) ppm.

HR-MS (DCI-CH₄) m/z calculated for: C₁₆H₃₀NO₄ [M+H]⁺: 300.2181 ; found: 300.2185

Compound *enant*-110: *tert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-(7-hydroxyheptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate

Chemical Formula: C₁₆H₂₉NO₄
Molecular Weight: 299.41 g.mol⁻¹

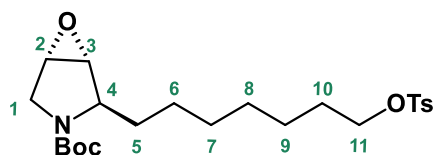
Compound ***enant*-110** (283.0 mg, 0.945 mmol) was prepared by the same protocol starting from **110** (720.0 mg, 1.341 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 60:40) to give ***enant*-110** as a colorless oil with a **71%** yield.

R_f 0. 37 (P.E./E.A. 50:50, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = +37.6 (c 1.1, CHCl₃)

PARTIE EXPERIMENTALE

Rotameric ratio (1/2) 0.4

Spectral data identical to compound **110**.**Compound 111: tert-butyl (1*R*,2*R*,5*S*)-2-(7-hydroxyheptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate**Chemical Formula: C₂₃H₃₅NO₆SMolecular Weight: 453.59 g.mol⁻¹

TEA (0.150 mL, 1.076 mmol) was added to a solution of **110** (202.0 mg, 0.675 mmol) in dry DCM (5.00 mL) under N₂. After, DMAP (10.00 mg, 0.082 mmol) and *p*-toluene sulfonyl chloride (254.0 mg, 1.332 mmol) were then added the reaction mixture was stirred at rt overnight. Then, the mixture was quenched with NaHCO₃ aq sat (3 x 10.00 mL), extracted with DCM (3 x 10.00 mL), washed with brine (10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 60:40) to give **111** as a yellow oil with a **97%** yield (297.0 mg, 0.655 mmol).

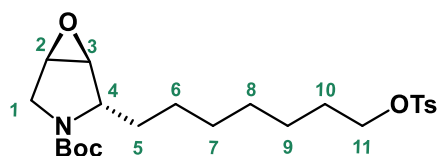
R_f 0.38 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)[α]_D²⁰ = -35.5 (c 1.2, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.4

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, *J*_{aro} = 8.2 Hz, 2H, H_{aro}), 7.30 (d, *J*_{aro} = 8.2 Hz, 2H, H_{aro}), 4.01-3.87 (m, 2H, H_{4(rota1/2)}), 3.97 (t, *J*₁₁₋₁₀ = 6.4 Hz, 2H, H_{11(rota2)}), 3.96 (t, *J*₁₁₋₁₀ = 6.4 Hz, 2H, H_{11(rota1)}), 3.83 (d, *J*_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota2)}), 3.73 (d, *J*_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota1)}), 3.56 (dd, *J*₂₋₃ = 3.0 Hz, *J*_{2-1'} = 1.3 Hz, 1H, H_{2(rota2)}), 3.56 (dd, *J*₂₋₃ = 3.0 Hz, *J*_{2-1'} = 1.3 Hz, 1H, H_{2(rota1)}), 3.39 (t, *J*₃₋₂ = 3.0 Hz, 1H, H₃), 3.20 (dd, *J*_{1'-1} = 12.9 Hz, *J*_{1'-2} = 1.3 Hz, 1H, H_{1'(rota1)}), 3.17 (dd, *J*_{1'-1} = 12.9 Hz, *J*_{1'-2} = 1.3 Hz, 1H, H_{1'(rota2)}), 1.65-1.14 (m, 12H, H₅₋₁₀), 1.38 (s, 9H, H_{Boc(rota1)}), 1.38 (s, 9H, H_{Boc(rota1)}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.0 (C_{Boc(rota2)}), 154.7 (C_{Boc(rota1)}), 144.7-132.7-129.8-127.8 (C_{aro}) 79.7 (C_{Boc(rota2)}), 79.6 (C_{Boc(rota1)}), 70.7 (C_{11(rota1)}), 70.6 (C_{11(rota2)}), 59.1 (C_{3(rota1)}), 58.0 (C_{4(rota1)}), 58.0 (C_{3(rota2)}), 57.5 (C_{4(rota2)}), 54.8 (C_{2(rota1)}), 54.3 (C_{2(rota2)}), 47.1 (C_{1(rota1)}), 46.5 (C_{1(rota2)}), 31.0, 30.4, 29.4, 29.4, 28.8, 28.8, 28.7, 25.4, 25.4, 25.3, 25.2 (C_{5-10(rota1/2)}), 28.5 (C_{Boc}) ppm.

HR-MS (DCI-CH₄) *m/z* calculated for: C₂₃H₃₆NO₆S [M+H]⁺: 454.2250 ; found: 454.2263

Compound *enant-111*: *tert*-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-(7-hydroxyheptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate

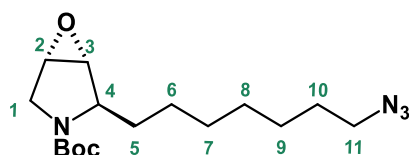
Chemical Formula: C₂₃H₃₅NO₆S
Molecular Weight: 453.59 g.mol⁻¹

Compound ***enant-111*** (394.5 mg, 0.870 mmol) was prepared by the same protocol starting from ***enant-110*** (275.0 mg, 0.918 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 60:40) to give ***enant-111*** as a yellow oil with a **95%** yield.

R_f 0. 38 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)

Rotameric ratio (1/2) 0.4

Spectral data identical to compound ***enant-111***.

Compound **112: *tert*-butyl (1*R*,2*R*,5*S*)-2-(7-azidoheptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate**

Chemical Formula: C₁₆H₂₈N₄O₃
Molecular Weight: 324.43 g.mol⁻¹

Sodium azide (65.0 mg, 1.000 mmol) was added to a solution of **111** (205.0 mg, 0.452 mmol) in dry DMF (2.00 mL) under N₂. The mixture was stirred at 40°C overnight. Then, the mixture was concentrated, diluted with E.A. (10 mL) and water (10.00 mL), extracted with E.A. (3 x 10.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product does not require any further purification to give **112** as a colorless oil with a **93%** yield (136.0 mg, 0.419 mmol).

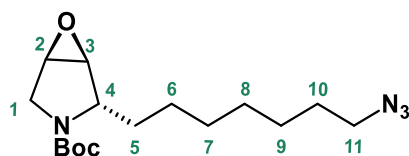
R_f 0. 24 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -35.5 (c 1.2, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.4

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.01 (dd, J₄₋₅ = 7.4 Hz, J₄₋₃ = 5.2 Hz, 1H, H_{4(rota1)}), 3.92 (t, J₄₋₃ = J₄₋₅ = 6.1 Hz, 1H, H_{4(rota2)}), 3.84 (d, J_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota2)}), 3.73 (d, J_{1-1'} = 12.9 Hz, 1H, H_{1(rota1)}), 3.57 (dd, J₂₋₃ = 3.0 Hz, J_{2-1'} = 1.3 Hz, 1H, H_{2(rota2)}), 3.54 (dd, J₂₋₃ = 3.0 Hz, J_{2-1'} = 1.3 Hz, 1H, H_{2(rota1)}), 3.40 (t, J₃₋₂ = 3.0 Hz, 1H, H₃), 3.28-3.16 (m, 3H, H_{11(rota1/2)+1'(rota1/2)}), 1.65-1.16 (m, 12H, H₅₋₁₀), 1.40 (s, 9H, H_{Boc(rota2)}), 1.39 (s, 3.4H, H_{Boc(rota1)}) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.0 (C_{Boc(rota2)}), 154.7 (C_{Boc(rota1)}), 79.8 (C_{Boc(rota2)}), 79.6 (C_{Boc(rota1)}), 58.6 (C_{3(rota1)}), 58.1 (C_{4(rota1)}), 57.8 (C_{3(rota2)}), 57.6 (C_{4(rota1)}), 54.9 (C_{2(rota1)}), 54.3 (C_{2(rota2)}), 51.5 (C_{11(rota1/2)}), 47.1 (C_{1(rota1)}), 46.5 (C_{1(rota2)}), 31.1, 30.5, 29.6, 29.5, 29.1, 29.0, 28.8, 28.5, 26.6, 26.6, 25.5, 25.5 (C_{5-10(rota1/2)}), 28.5 (C_{Boc}) ppm.

Compound *enant-112*: tert-butyl (1*S*,2*S*,5*R*)-2-(7-azidoheptyl)-6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxylate

Chemical Formula: C₁₆H₂₈N₄O₃
Molecular Weight: 324.43 g.mol⁻¹

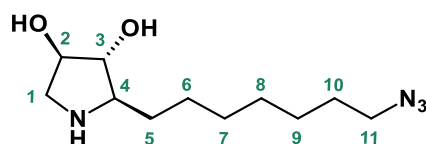
Compound ***enant-112*** (232.0 mg, 0.715 mmol) was prepared by the same protocol starting from ***enant-111*** (380.0 mg, 0.838 mmol) and NaN₃ (119.0 mg, 1.830 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 60:40) to give ***enant-112*** as a yellow oil with a **85%** yield.

R_f 0.24 (P.E./E.A. 60:40, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = +45.8 (c 1.4, CHCl₃)

Rotameric ratio (1/2) 0.4

Spectral data identical to compound **112**.

Compound **113: (2*R*,3*R*,4*R*)-2-(7-azidoheptyl)pyrrolidine-3,4-diol**

Chemical Formula: C₁₁H₂₂N₄O₂
Molecular Weight: 242.32 g.mol⁻¹

Compound **113** (515.0 mg, 2.125 mmol) was prepared by general procedure **E** starting from **112** (1100.0 mg, 3.390 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/ammonia 84:16:1) to give pure **113** as a yellow solid with a **63%** yield.

R_f 0.17 (DCM/MeOH/ammonia 84:16:1, KMnO₄)

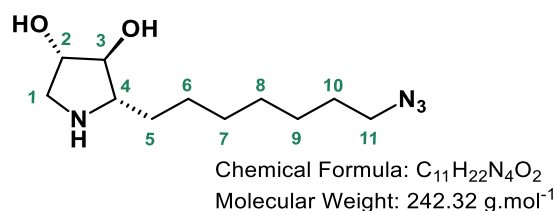
[α]_D²⁰ = +0.7 (c 1.2, MeOH)

Diastereoisomeric ratio (compound **113/114**) 0.82

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 3.95 (dt, J₂₋₁ = 5.2 Hz, J_{2-1'} = J₃₋₂ = 2.8 Hz, 1H, H₂), 3.60 (dd, J₃₋₄ = 5.1 Hz, J₃₋₂ = 2.8 Hz, J_{3-1'} = 1.0 Hz, 1H, H₃), 3.29 (t, J₁₁₋₁₀ = 6.8 Hz, 2H, H₁₁), 3.00 (dd, J_{1-1'} = 12.2 Hz, J₁₋₂ = 5.2 Hz, 1H, H₁), 2.82 (ddd, J_{1'-1} = 12.2 Hz, J_{1'-2} = 2.8 Hz, J_{1'-3} = 1.0 Hz, 1H, H_{1'}), 2.77-2.68 (m, 1H, H₄), 1.72-1.31 (m, 12H, H₅₋₁₀) ppm.

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 84.3 (C₃), 79.0 (C₂), 69.2 (C₄), 53.0 (C₁), 52.4 (C₁₁), 35.0, 30.6, 30.1, 29.9, 28.0, 27.8 (C₅₋₁₀) ppm.

HR-MS (DCI-CH₄) m/z calculated for: C₁₁H₂₃N₄O₂ [M+H]⁺: 243.1821 ; found: 243.1824

Compound *enant*-113: (2*S*,3*S*,4*S*)-2-(7-azidoheptyl)pyrrolidine-3,4-diol

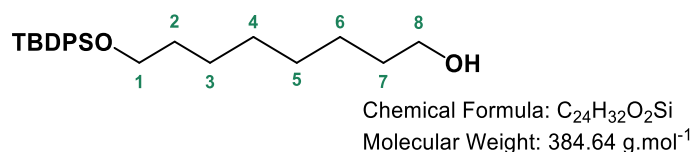
Compound ***enant*-113** (77.8 mg, 0.321 mmol) was prepared by the same protocol starting from ***enant*-112** (232.5.0 mg, 0.717 mmol). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/ammonia 84:16:1) to give ***enant*-113** as a yellow solid with a **45%** yield.

R_f 0.17 (DCM/MeOH/ammonia 84:16:1, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -0.7 (c 1.5, MeOH)

Diastereoisomeric ratio (compound ***enant*-113** / ***enant*-114**) 0.82

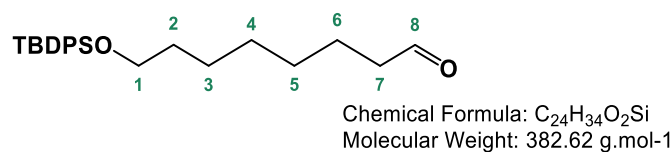
Spectral data identical to compound **113**

Compound 115: 8-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)octan-1-ol

To a solution of octanediol (2.16 g, 14.774 mmol) in dry DCM (50 mL) at rt under Ar, was added imidazole (817.0 mg, 12.000 mmol). The reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h (complete dissolution). After, TBDS-Cl (1.900 mL, 7.310 mmol) was added dropwise over 10 min. After 3h, NaHCO_{3(aq)} sat. solution (30 mL) was added, extracted with DCM (3 x 100 mL). The combined organic layers were dried with Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 85:15 to 80:20) to give **115** as a white solid with a **79%** yield (2.21 g, 5.783 mmol).

R_f 0.34 (P.E./E.A. 80:20, KMnO₄)

Spectral data are in accordance with literature.²⁵²

Compound 116: 8-((*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy)octanal

To a solution of **115** (2.16 g, 5.645 mmol) in dry E.A. (56 mL) at rt under Ar, was added 2-iodoxybenzoic acid (3.16 g, 11.291 mmol). The reaction mixture has been refluxed during 3.5 h. After, the mixture was cooled to rt, and the white precipitate was filtered on a celite pad (E.A.). The filtrate

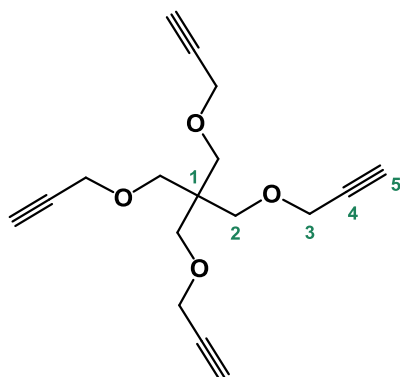
PARTIE EXPERIMENTALE

was dried with MgSO_4 , filtered and concentrated. The compound **116** was obtained without any purification as a colorless oil with a **97%** yield (2.09 g, 5.496 mmol).

R_f 0.45 (P.E./E.A. 90:10, KMnO_4)

Spectral data are in accordance with literature.²⁵³

Compound 117: Tétrá-*O*-(prop-2-yn-1-yl)-pentaerythritol



Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_4$

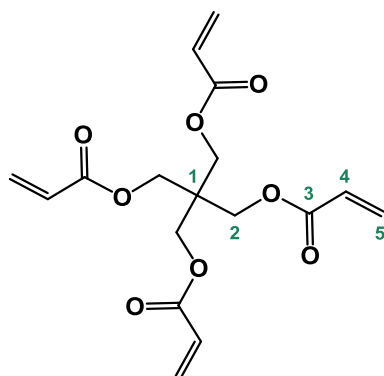
Molecular Weight: $288.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

NaH (60%) (1.04 g, 20.720 mmol) was added in three portions at 0°C under Ar to a solution of pentaerythritol (500.0 mg, 3.700 mmol) in dry DMF (50.00 mL) and stirred for 45 min. Then, propargyl bromide (80% in toluene) (5.28 g, 35.520 mmol) was added dropwise for 30 min at 0°C , and the mixture was stirred at rt for 20 h. Then, the mixture was quenched with a saturated solution of NH_4Cl (50.00 mL), extracted with Et_2O (3 x 100.00 mL), washed with brine and dried over Na_2SO_4 , and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , P.E./E.A. 90:10 to 70:30) to give **117** as a yellow solid with a **73%** yield (775.0 mg, 2.690 mmol).

R_f 0.41 (P.E./E.A. 90:10, KMnO_4)

Spectral data are in accordance with literature.²⁰⁹

Compound 118: Tétrá-*O*-acryloyl-pentaerythritol



Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_8$

Molecular Weight: $352.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

PARTIE EXPERIMENTALE

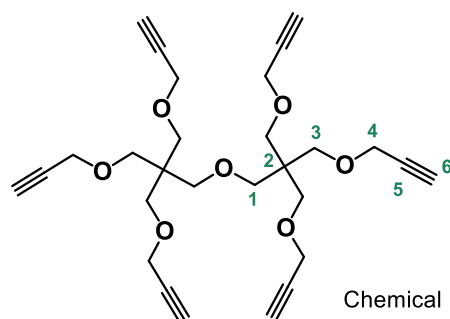
Acryloyl chloride (2.60 mL, 32.173 mmol) was added dropwise to a solution of pentaerythritol (1.00 g, 7.354 mmol) and TEA (5.00 mL, 35.972 mmol) in dry DCM (20.00 mL) at 0°C, over 1.25 h. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 2.5 h. Then, the mixture was quenched with Na₂CO_{3(aq)} 10% (50.00 mL), extracted with DCM (3 x 100.00 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 75:25) to give **118** as a colorless oil with a **22%** yield (580.0 mg, 1.646 mmol).

R_f 0.38 (P.E./E.A. 70:30, KMnO₄)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.41 (dd, J₅₋₄ = 17.3 Hz, J_{5'-5} = 1.4 Hz, 4H, H₅), 6.10 (dd, J₄₋₅ = 17.3 Hz, J_{5'-4} = 10.4 Hz, 4H, H_{5'}), 5.87 (dd, J_{5'-4} = 10.4 Hz, J_{5'-5} = 1.4 Hz, 4H, H_{5'}), 4.29 (s, 8H, H₂)

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁰

Compound 119: Hexa-O-acryloyl-dipentaerythritol

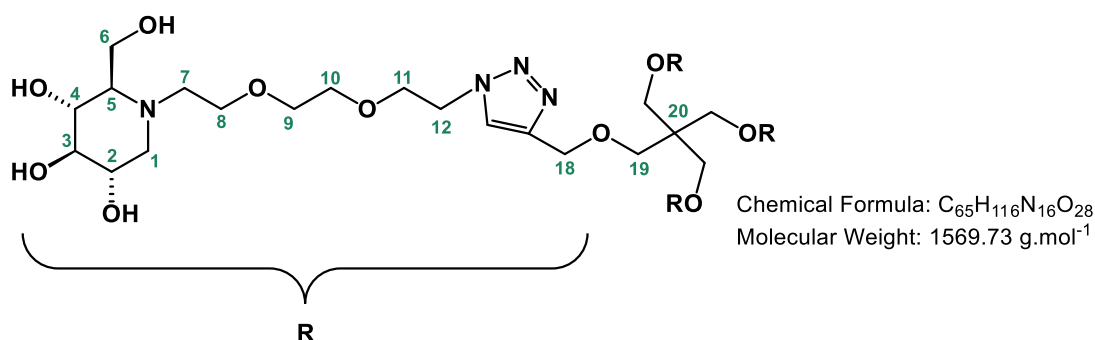


NaH (60%) (965.7 mg, 19.320 mmol) was added in three portion at 0 °C under Ar to a solution of dipentaerythritol (595.0 mg, 2.300 mmol) in dry DMF (50.00 mL) and stirred for 45 min. Then, propargyl bromide (80% in toluene) (4924.99 mg, 33.120 mmol) was added dropwise for 30 min at 0 °C, and the mixture was stirred at rt for 20 h. Then, the mixture was quenched with NH₄Cl_{aq} sat (50.00 mL), extracted with Et₂O (3 x 100.00 mL), washed with brine and dried over Na₂SO₄, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, P.E./E.A. 90:10 to 70:30) to give **117** as a yellow solid with a **57%** yield (643.0 mg, 1.332 mmol).

R_f 0.52 (P.E./E.A. 80:20, KMnO₄)

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁷

Compound 121



PARTIE EXPERIMENTALE

Compound **121** (19.7 mg, 0.013 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **80** (36.5 mg, 0.075 mmol) to give **121** as a yellow oil with a **72%** yield.

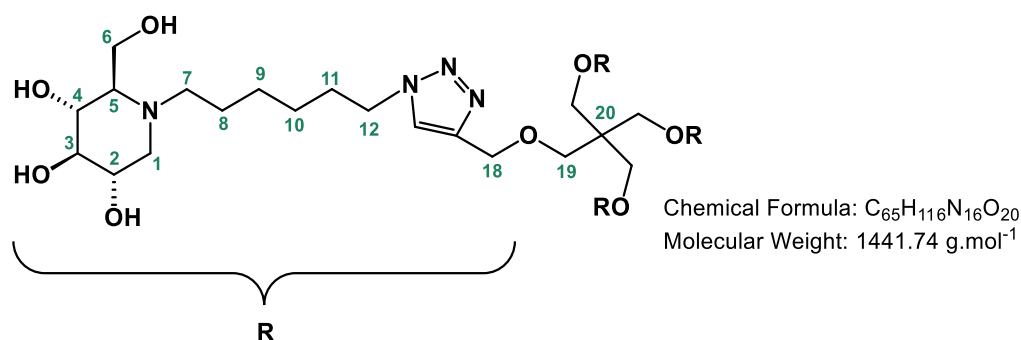
$$[\alpha]_D^{20} = -2.6 \text{ (c 1.0, MeOH)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) δ 7.98 (s, 4H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 4.57 (t, 8H, $J_{12-11} = 5.0$ Hz, H_{12}), 4.52 (s, 8H, H_{18}), 3.98-3.82 (m, 8H, H_6), 3.88 (m, 8H, H_{peg}), 3.56-3.36 (m, 32H, $\text{H}_{2+4+\text{peg}}$), 3.46 (s, 8H, H_{19}), 3.16 (t, 4H, $J_{3-2} = J_{3-4} = 9.1$ Hz, H_3), 3.10-2.96 (m, 8H, H_{1+7}), 2.68 (dt, 4H, $J_{7'-7} = 14.4$ Hz, $J_{7'-8} = 4.7$ Hz, $\text{H}_{7'}$), 2.31 (t, 4H, $J_{7'-8} = 11.0$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 2.23 (dt, 4H, $J_{5-4} = 9.5$ Hz, $J_{5-6} = 2.7$ Hz, H_5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75 MHz) δ 146.0 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 125.7 ($\text{C}_{\text{triazole}}$), 80.4 (C_3), 71.8 ($\text{C}_{4\text{or}2}$), 71.4-71.4-70.4-69.6 (C_{peg}), 70.2 ($\text{C}_{2\text{or}4}$), 70.0 (C_{19}), 67.7 (C_5), 65.4 (C_{18}), 59.3 (C_6), 58.6 (C_1), 52.6 (C_7), 51.3 (C_{12}), 46.5 (C_q) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: $\text{C}_{65}\text{H}_{116}\text{N}_{16}\text{O}_{28}$ $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$: 393.2115; found: 393.2116

Compound 122

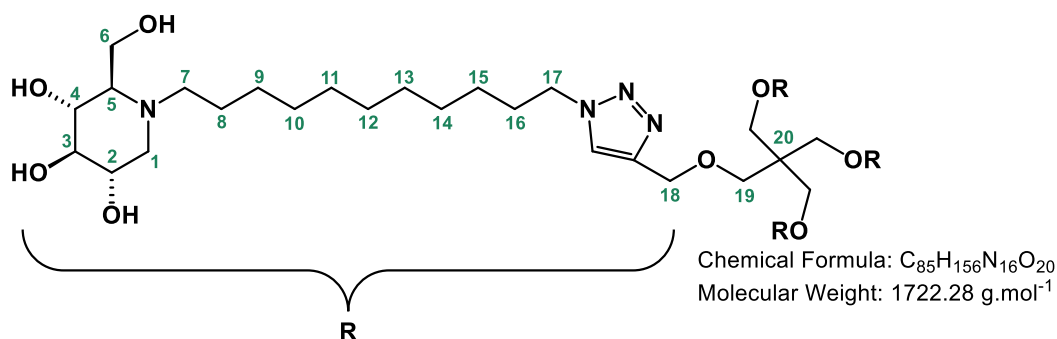


Compound **122** (34.7 mg, 0.024 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **81** (48.0 mg, 0.105 mmol) to give **122** as a yellow oil with a **100%** yield.

$$[\alpha]_D^{20} = -9.9 \text{ (c 1.1, MeOH)}$$

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁶

Compound 123



Compound **123** (21.0 mg, 0.012 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **82** (27.1 mg, 0.051 mmol) to give **123** as a yellow oil with a **100%** yield.

$$[\alpha]_D^{20} = -6.1 \text{ (c 0.9, MeOH)}$$

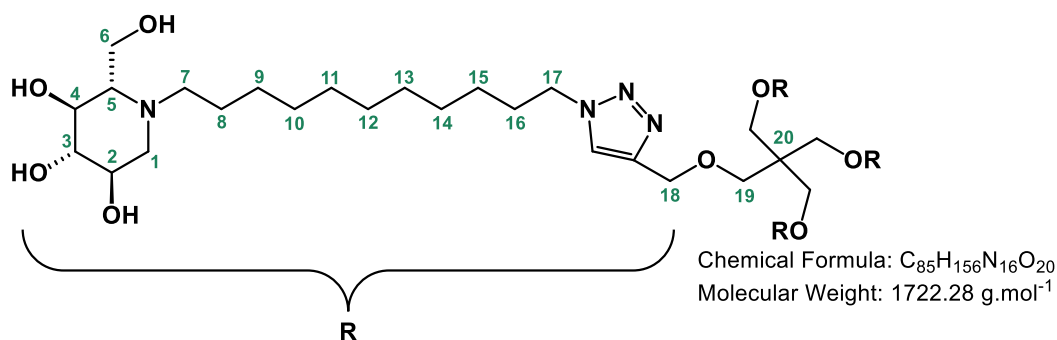
PARTIE EXPERIMENTALE

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 7.92 (s, 4H, H_{triazole}), 4.50 (s, 8H, H₁₈), 4.38 (t, 8H, $J_{17-16} = 7.0$ Hz, H₁₇), 3.92-3.82 (m, 8H, H₆), 3.56-3.36 (m, 8H, H₂₊₄), 3.43 (s, 8H, H₁₉), 3.15 (t, 4H, $J_{3-2} = J_{3-4} = 9.0$ Hz, H₃), 3.01 (dd, 4H, $J_{1-1'} = 11.2$ Hz, $J_{1-2} = 4.9$ Hz, H₁), 2.93-2.79 (m, 4H, H₇), 2.72-2.57 (m, 4H, H₇), 2.35-2.15 (m, 8H, H_{1'+5}), 1.94-1.81 (m, 8H, H₁₆), 1.61-1.41 (m, 8H, H₈), 1.42-1.38 (m, 56H, H₉₋₁₅) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 124.8 (C_{triazole}), 80.2 (C₃), 71.3 (C₄), 70.2 (C₂), 69.8 (C₁₉), 67.4 (C₅), 65.4 (C₁₈), 58.9 (C₆), 57.3 (C₁), 53.8 (C₇), 51.3 (C₁₇), 49.8 (C₂₀), 31.3 (C₁₆), 30.7-30.6-30.6-30.5-30.1-28.5-27.5-25.0 (C₈₋₁₅) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₈₅H₁₆₀N₁₆O₂₀ [M+4H]⁴⁺: 431.5506; found: 431.2992

Compound *enant-123*

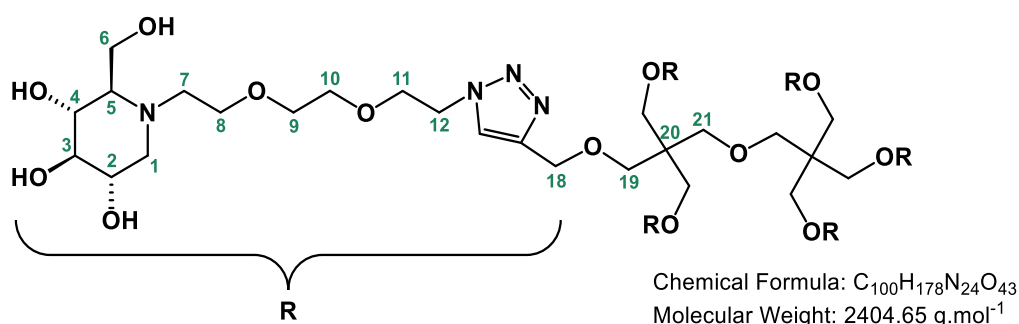


Compound *enant-123* (12.6 mg, 0.007 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from *enant-82* (20.0 mg, 0.038 mmol) to give *enant-123* as a yellow oil with a **81%** yield.

$[\alpha]_D^{20} = +9.1$ (c 0.5, MeOH)

Spectral data identical to compound **123**.

Compound **124**



Compound **124** (12.6 mg, 0.005 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **80** (28.5 mg, 0.058 mmol) to give **124** as a yellow oil with a **57%** yield.

$[\alpha]_D^{20} = -3.7$ (c 0.8, MeOH)

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 7.97 (s, 6H, H_{triazole}), 4.57 (t, 12H, $J_{12-11} = 5.0$ Hz, H₁₂), 4.52 (s, 12H, H₁₈), 3.94-3.79 (m, 12H, H₆), 3.90-3.86 (m, 12H, H_{peg}), 3.64-3.32 (m, 52H, H_{2+4+peg+21}), 3.35 (s, 12H, H₁₉), 3.16

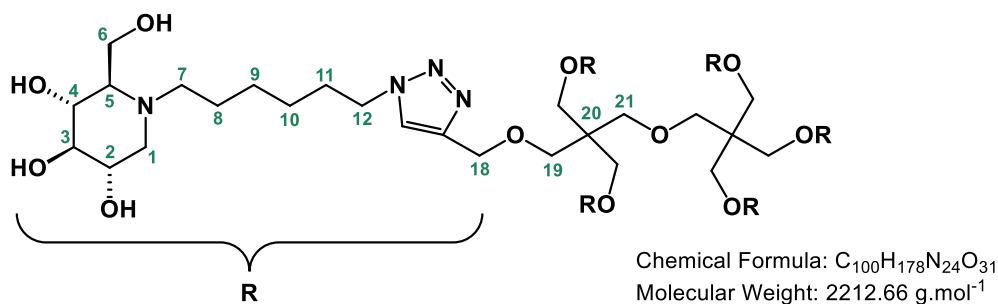
PARTIE EXPERIMENTALE

(t, 6H, $J_{3-2} = J_{3-4} = 9.1$ Hz, H₃), 3.10-2.96 (m, 12H, H₁₊₇), 2.67 (dt, 6H, $J_{7-7} = 14.2$ Hz, $J_{7-8} = 4.8$ Hz, H₇), 2.30 (t, 6H, $J_{1'-1} = J_{1'-2} = 11.0$ Hz, H_{1'}), 2.21 (dt, 6H, $J_{5-4} = 9.5$ Hz, $J_{5-6} = 2.7$ Hz, H₅) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 146.1 (C_{triazole}), 125.6 (C_{triazole}), 80.5 (C₃), 71.8 (C_{4or2}), 71.4-71.4-70.9-70.4-69.6 (C_{peg+21}), 70.6 (C_{2or4}), 70.2 (C₁₉), 67.8 (C₅), 65.5 (C₁₈), 59.4 (C₆), 58.7 (C₁), 52.6 (C₇), 51.4 (C₁₂), 46.8 (C_q) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₀₀H₁₇₈N₂₄O₄₃ [M+5H]⁵⁺: 481.8580; found: 491.8593

Compound 125

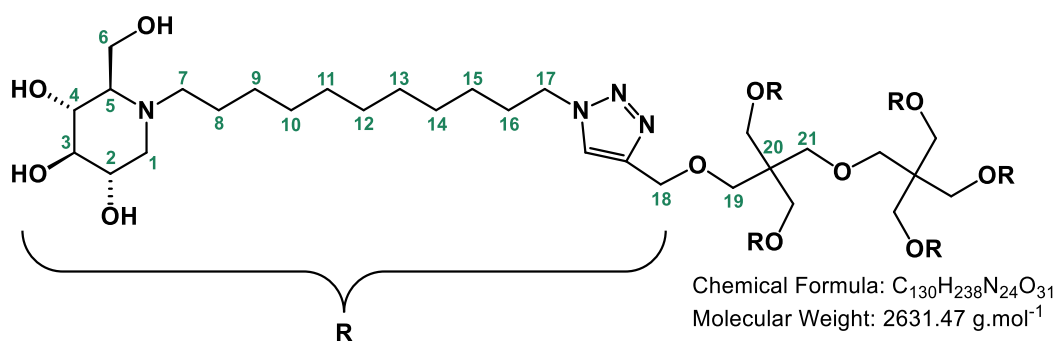


Compound **125** (8.2 mg, 0.006 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **81** (14.3 mg, 0.032 mmol) to give **125** as a yellow oil with a **81%** yield.

$[\alpha]_D^{20} = -10.6$ (c 1.1, MeOH)

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁶

Compound 126



Compound **126** (13.8 mg, 0.005 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **82** (27.0 mg, 0.051 mmol) to give **126** as a yellow oil with a **86%** yield.

$[\alpha]_D^{20} = -7.7$ (c 1.0, MeOH)

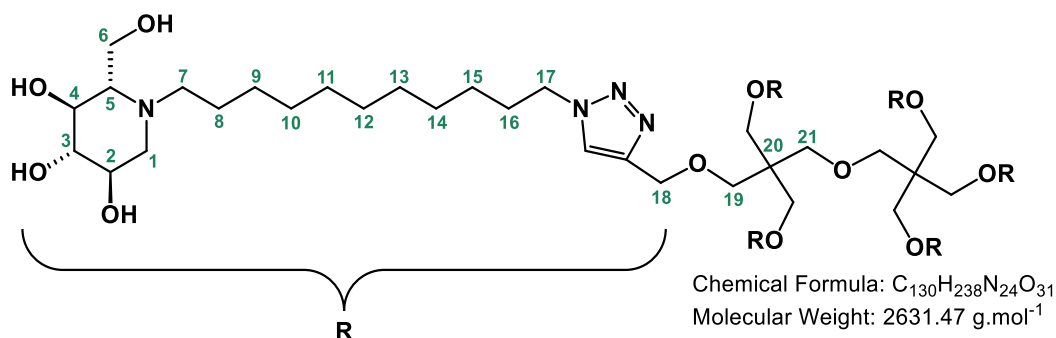
¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 7.93 (s, 6H, H_{triazole}), 4.52 (s, 12H, H₁₈), 4.37 (t, 12H, $J_{17-16} = 7.0$ Hz, H₁₇), 3.87 (brs, 8H, H₆), 3.56-3.26 (m, 20H, H₂₊₄₊₂₁), 3.41 (s, 12H, H₁₉), 3.14 (t, 6H, $J_{3-2} = J_{3-4} = 9.0$ Hz, H₃), 3.01 (dd, 6H, $J_{1'-1} = 11.0$ Hz, $J_{1'-2} = 4.5$ Hz, H₁), 2.87-2.77 (m, 6H, H₇), 2.66-2.53 (m, 6H, H₇), 2.31-2.11 (m, 12H, H_{1'+5}), 1.92-1.85 (m, 12H, H₁₆), 1.58-1.40 (m, 12H, H₈), 1.41-1.18 (m, 84H, H₉₋₁₅) ppm.

PARTIE EXPERIMENTALE

¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 145.9 (C_{triazole}), 124.9 (C_{triazole}), 80.5 (C₃), 72.0 (C₄), 70.7 (C₂), 70.2 (C₁₉), 67.4 (C₅), 65.5 (C₁₈), 59.4 (C₆), 57.7 (C₁), 53.8 (C₇), 51.4 (C₁₇), 46.7 (C₂₀), 31.4 (C₁₆), 30.7-30.7-30.6-30.6-30.1-28.6-27.5-25.2 (C₈₋₁₅) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₃₀H₂₃₈N₂₄O₃₁ [M+5H]⁵⁺: 527.5641; found: 527.5638

Compound *enant*-126

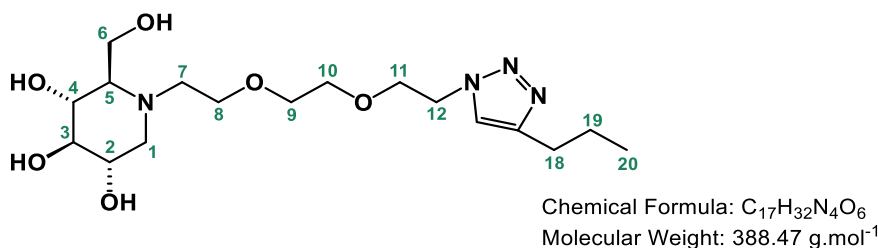


Compound *enant*-126 (4.8 mg, 0.002 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from *enant*-82 (20.5 mg, 0.039 mmol) to give *enant*-126 as a yellow oil with a **90%** yield.

$[\alpha]_D^{20} = +2.8$ (c 0.3, MeOH)

Spectral data identical to compound **126**.

Compound **127**



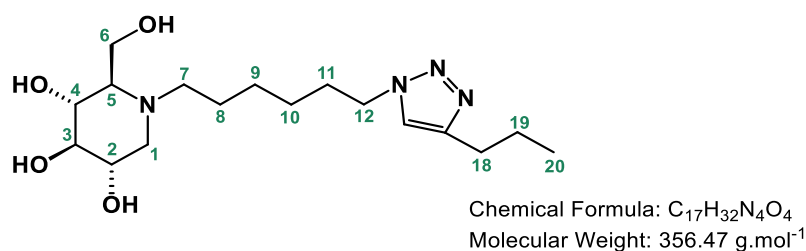
Compound **127** (6.6 mg, 0.017 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **80** (16.0 mg, 0.033 mmol) to give **127** as a yellow oil with a **51%** yield.

$[\alpha]_D^{20} = -1.2$ (c 0.3, MeOH)

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) δ 7.87 (s, 1H, H_{triazole}), 4.82 (t, 2H, $J_{12-11} = 5.0$ Hz, H₁₂), 3.97 (t, 2H, $J_{\text{peg-peg}} = 5.0$ Hz, H_{peg}), (AB part of an ABX system, 2H, $\Delta\delta = 0.126$, $J_{6-6'} = J_{6'-6} = 12.6$ Hz, $J_{6-5} = 3.2$ Hz, $J_{6'-5} = 2.7$ Hz, H_{6+6'}), 3.70-3.50 (m, 7H, H_{2+4+3+peg}), 3.43-3.23 (m, 2H, H_{peg}), 3.10 (dd, 1H, $J_{1-1'} = 11.9$ Hz, $J_{1-2} = 5.0$ Hz, H₁), 3.05-2.93 (m, 1H, H₇), 2.82-2.69 (m, 1H, H₇), 2.69 (t, 2H, $J_{18-19} = 7.2$ Hz, H₁₈), 2.43-2.29 (m, 2H, H_{1'+5}), 1.67 (h, 2H, $J_{19-18} = J_{19-20} = 7.5$ Hz, H₁₉), 0.96 (t, 2H, $J_{20-19} = 7.5$ Hz, H₂₀) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 300 MHz) δ 146.1 (C_{triazole}), 125.6 (C_{triazole}), 80.5 (C₃), 71.8 (C_{4or2}), 71.4-71.4-70.9-70.4-69.6 (C₈₋₁₁₊₂₁), 70.6 (C_{2or4}), 70.2 (C₁₉), 67.8 (C₅), 65.5 (C₁₈), 59.4 (C₆), 58.7 (C₁), 52.6 (C₇), 51.4 (C₁₂), 46.8 (C_q) ppm.

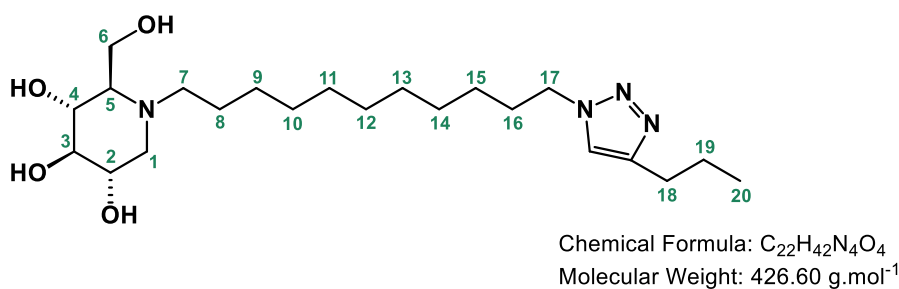
HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₁₇H₃₂N₄NaO₆ [M+Na]⁺: 411.2220; found: 411.2224

Compound 128

Compound **128** (10.0 mg, 0.028 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **81** (28.0 mg, 0.061 mmol) to give **128** as a colorless oil with a **47%** yield.

$$[\alpha]_D^{20} = -10.6 \text{ (c 1.1, MeOH)}$$

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁶

Compound 129

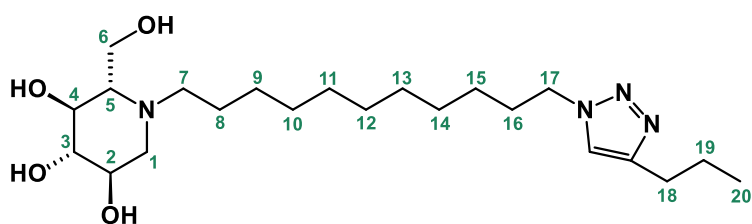
Compound **129** (6.4 mg, 0.015 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from **82** (20.0 mg, 0.038 mmol) to give **129** as a colorless oil with a **39%** yield.

$$[\alpha]_D^{20} = -6.0 \text{ (c 0.2, MeOH)}$$

¹H-NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 7.71 (s, 1H, H_{triazole}), 4.35 (t, 2H, $J_{17-16} = 7.0 \text{ Hz}$, H₁₇), 3.85 (brs, 2H, H₆), 3.54-3.31 (m, 2H, H₂₊₄), 3.13 (t, 1H, $J_{3-2} = J_{3-4} = 9.0 \text{ Hz}$, H₃), 3.01 (dd, 1H, $J_{1-1'} = 11.3 \text{ Hz}$, $J_{1-2} = 4.9 \text{ Hz}$, H₁), 2.87-2.75 (m, 1H, H₇), 2.72-2.53 (m, 6H, H_{7'}), 2.66 (t, 2H, $J_{18-19} = 7.2 \text{ Hz}$, H₁₈), 2.26-2.10 (m, 2H, H_{1'+5}), 1.97-1.83 (m, 2H, H₁₆), 1.69 (h, 2H, $J_{19-18} = J_{19-20} = 7.5 \text{ Hz}$, H₁₉), 1.57-1.41 (m, 2H, H₈), 1.41-1.19 (m, 14H, H₉₋₁₅), 0.96 (t, 2H, $J_{20-19} = 7.2 \text{ Hz}$, H₂₀) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ 123.1 (C_{triazole}), 80.6 (C₃), 72.0 (C₄), 70.7 (C₂), 67.4 (C₅), 59.4 (C₆), 57.7 (C₁), 53.8 (C₇), 51.2 (C₁₇), 31.4 (C₁₆), 30.7-30.7-30.5-30.5-30.0-28.6-28.3-27.5-25.2-23.8-23.7 (C₈₋₁₅₊₁₈₋₂₀) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: $C_{22}H_{42}N_4O_4 [M+H]^+$: 427.3284; found: 427.3277

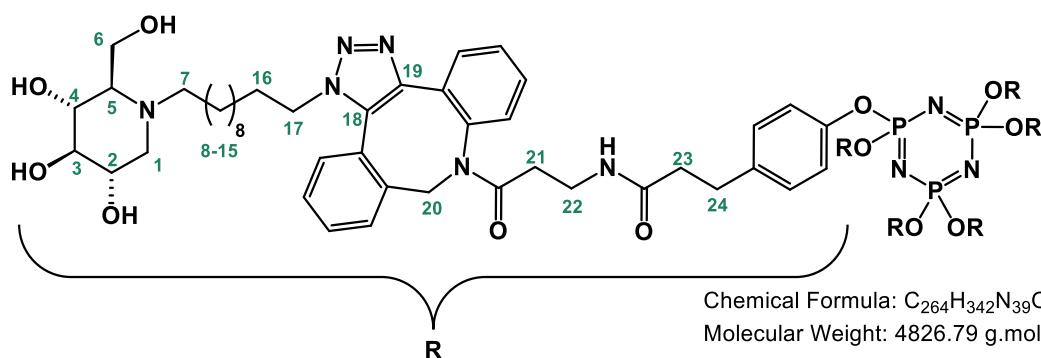
Compound *enant-129*

Chemical Formula: C₂₂H₄₂N₄O₄
Molecular Weight: 426.60 g.mol⁻¹

Compound *enant-129* (4.1 mg, 0.009 mmol) was prepared by general procedure **F** starting from *enant-82* (20.0 mg, 0.038 mmol) to give *enant-129* as a colorless oil with a **25%** yield.

$[\alpha]_D^{20} = +2.2$ (c 0.3, MeOH)

Spectral data identical to compound **129**.

Compound **136**

Chemical Formula: C₂₆₄H₃₄₂N₃₉O₄₂P₃
Molecular Weight: 4826.79 g.mol⁻¹

82 (12.4 mg, 0.024 mmol) was added to a solution of **134** (10.0 mg, 0.004 mmol) in MeOH (previously degassed) (0.30 mL) and THF (previously degassed) (0.70 mL) under Ar. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 3 h at 1200 rpm. Then, the mixture was concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/ammonia 80:16:4) to give a colorless oil. The product was then solubilized in MeOH (1.50 mL), and aqueous ammonia (0.40 mL) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. Then, the mixture was concentrated. **136** was obtained as a white solid without any further purification with a **78%** yield (14.0 mg, 0.003 mmol).

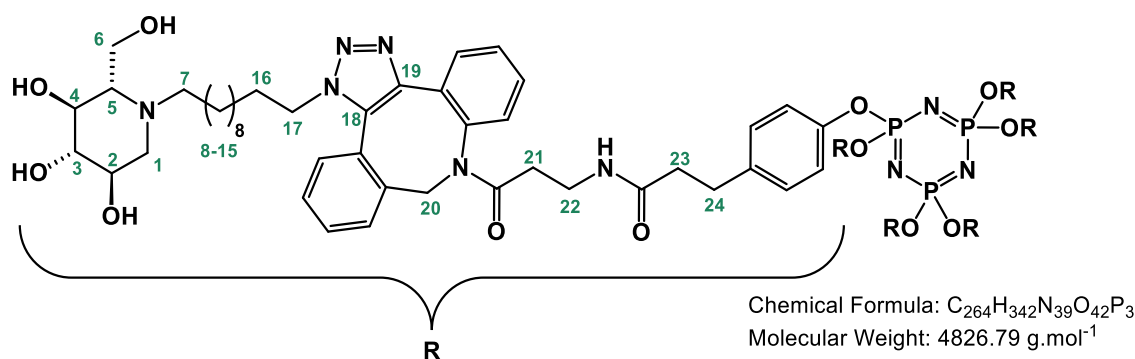
Regioisomer ratio (A/B) 0.54

³¹P-NMR (CD₃OD/toluene-D₈, 300 MHz) δ 9.09 (s, 3P)

MALDI-TOF (Linear positive) (before desacetylation) m/z calculated for: C₃₁₂H₃₉₀N₃₉O₆₆P₃ [M]⁺: 5831.76; found: 6038.78

MALDI-TOF (Linear positive) m/z calculated for: C₂₆₄H₃₄₂N₃₉O₄₂P₃ [M]⁺: 4826.79; found: 4826.97

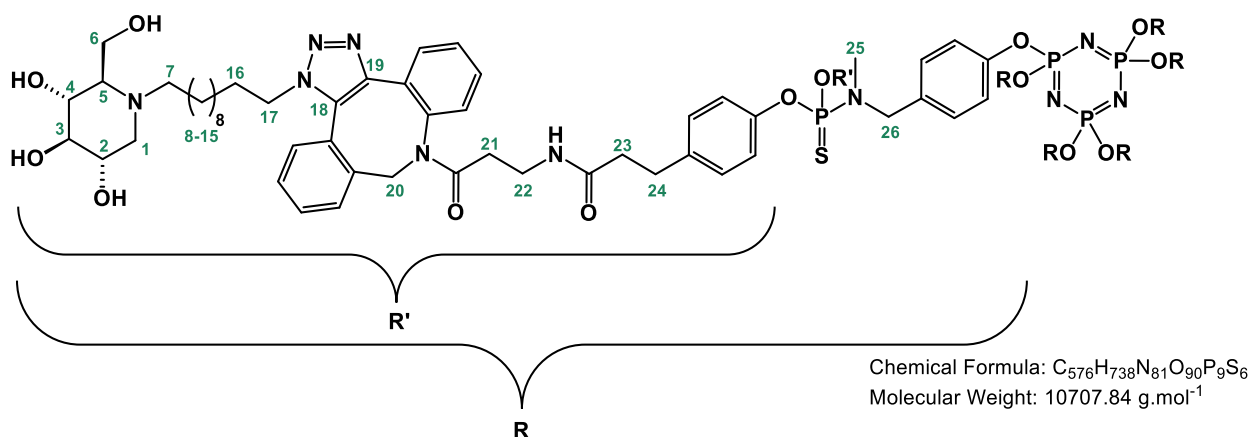
HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₂₆₄H₃₄₂N₃₉O₄₂P₃ [M+6H]⁶⁺: 805.4266; found: 805.4274

Compound *enant-136*

Compound *enant-136* (9.0 mg, 0.002 mmol) was prepared by the same protocol starting from *enant-82* (12.4 mg, 0.024 mmol). *Enant-136* was obtained as a colorless oil without any further purification with a **50%** yield.

Regioisomer ratio (A/B) 0.54

Spectral data identical to compound **136**.

Compound **137**

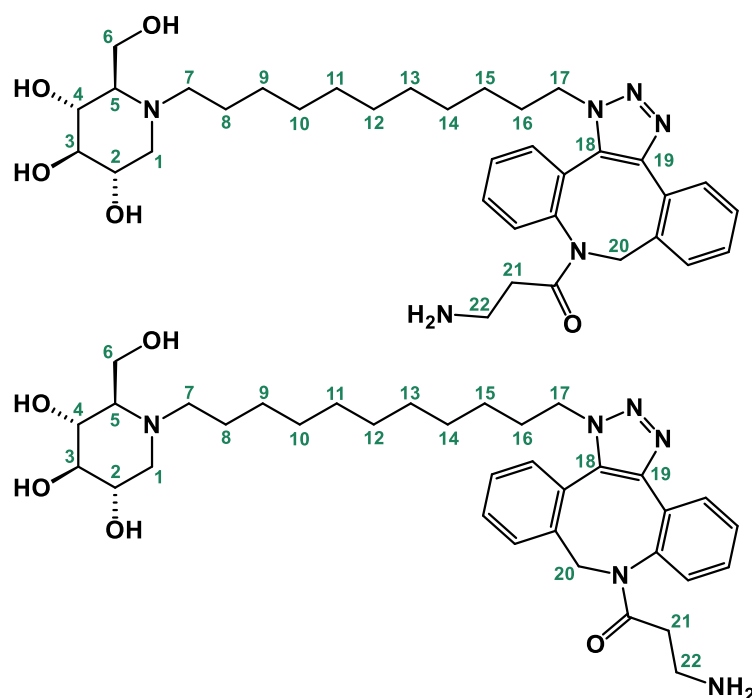
82 (11.1 mg, 0.021 mmol) was added to a solution of **135** (11.2 mg, 0.002 mmol) in MeOH (previously degassed) (0.30 mL) and THF (previously degassed) (0.70 mL) under Ar. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 3 h at 1200 rpm. Then, the mixture was concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/ammonia 80:16:4) to give a yellow oil. The product was then solubilized in MeOH (0.50 mL), and aqueous ammonia (0.15 mL), and Toluene (0.25 mL) were added. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. Then, the mixture was concentrated. **137** was obtained as a white solid without any further purification with a **39%** yield (7.3 mg, 0.001 mmol).

Regioisomer ratio (A/B) 0.54

³¹P-NMR (CD₃OD, toluene-D₈, 300 MHz) δ 68.5 (s, 6P), 9.2 (s, 3P)

MALDI-TOF (Linear positive) (before desacetylation) m/z calculated for: C₆₇₂H₈₃₆N₈₁O₁₃₈P₉S₆ [M]⁺: 10718.68 ; found: 12844

Compound 138



Chemical Formula: $C_{35}H_{50}N_6O_5$
Molecular Weight: 634.82 g.mol⁻¹

82 (6.4 mg, 0.012 mmol) was added to a solution of azadibenzocyclooctyne-amine (3.3 mg, 0.012 mmol) in MeOH (previously degassed) (0.36 mL) and THF (previously degassed) (0.15 mL) under Ar. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 3 h at 1200 rpm. Then, the mixture was concentrated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH/ammonia 80:20:2) to give a yellow oil. The product was then solubilized in MeOH (1.00 mL), and aqueous ammonia (0.19 mL) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. Then, the mixture was concentrated. **138** was obtained as a white solid without any further purification with a **98%** yield (7.6 mg, 0.012 mmol).

Regioisomer ratio (A/B) 0.65

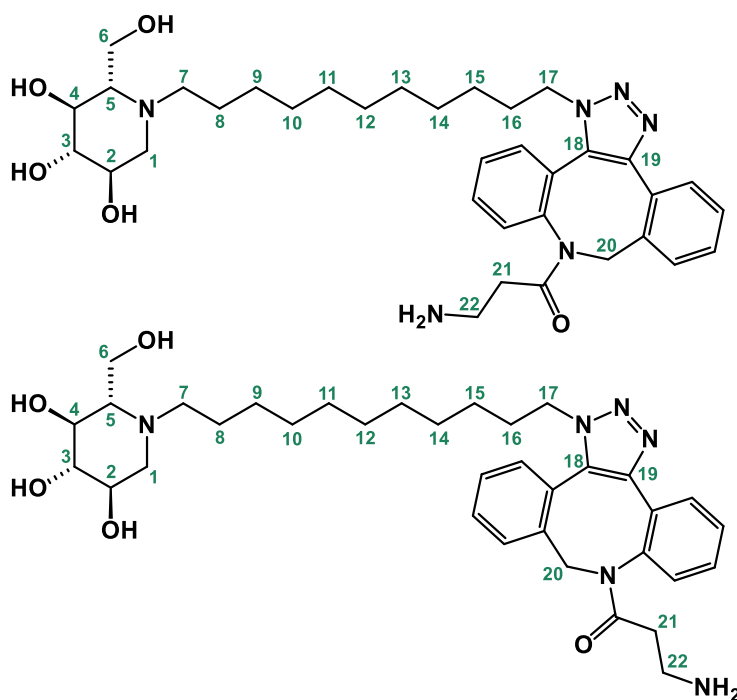
Rotameric ratio (1/2) 0.65

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.81-7.15 (m, 10H, H_{aro}), 6.09 (d, 0.42H, $J_{20-20'}$ = 17.0 Hz, H_{20(régioA)(rota1)}), 5.91 (d, 0.22H, $J_{20-20'}$ = 16.0 Hz, H_{20(régioA)(rota2)}), 5.59 (d, 0.12H, $J_{20-20'}$ = 18.1 Hz, H_{20(régioB)(rota2)}), 5.16 (d, 0.22H, $J_{20-20'}$ = 14.0 Hz, H_{20(régioB)(rota1)}), 5.00 (d, 0.12H, $J_{20'-20}$ = 18.1 Hz, H_{20'(régioB)(rota2)}), 3.73 (d, 0.22H, $J_{20'-20}$ = 14.0 Hz, H_{20'(régioB)(rota1)}), 4.61-4.29 (2.64H, H_{17(régioA/B)+20'(régioA)(rota1/2)}), 3.88-3.80 (m, 2H, H₆), 3.49-3.43 (m, 2H, H₂), 3.37-3.25 (m, 2H, H₄), 3.12 (t, 1H, J_{3-2} = J_{3-4} = 9.2 Hz, H₃), 2.98 (dd, 1H, $J_{1-1'}$ = 11.3 Hz, $J_{1-1'}$ = 5.0 Hz, H₁), 2.83-2.52 (m, 4H, H₇₊₂₂), 2.24-1.95 (m, 4H, H_{1'+5+21}), 1.82-1.05 (m, 18H, H₈₋₁₆) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 173.7-173.4-172.7-172.6 (C_{CO(régio1/2)} (rota1/2)), 152.5-159.3-146.2-144.9-144.2-143.6-143.5-142.4-141.6-141.4-136.7-136.1-134.9-134.5-134.0-133.5-133.3-133.2-133.0-132.7-132.4-132.3-132.2-131.2-131.1-131.1-130.8-130.8-130.5-130.4-130.1-130.0-129.9-129.8-129.8-129.7-129.4-129.2-129.2-129.1-128.9-128.9-128.4-128.2-127.0-126.5-125.8-124.2-123.8-115.6-108.7 (C_{aro(régio1/2)} (rota1/2)+18-19(régio1/2) (rota1/2)), 72.1 (C₄), 70.7 (C₂), 67.4 (C₅), 59.5 (C₆), 57.8 (C₁), 56.6-56.1-53.6-52.2 (C_{20(régio1/2)(rota1/2)}), 53.8 (C₇), 50.0-49.7-49.6 (C_{17(régio1/2)} (rota1/2)), 38.2-38.2-37.9-37.9-37.0-36.8-36.4-31.3-30.9-30.8-30.7-30.6-30.6-30.5-30.3-30.2-29.9-28.6-27.9-27.2-25.2 (C₈₋₁₆₊₂₁₋₂₂) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: $C_{35}H_{51}N_6O_5$ $[M+H]^+$: 635.3921 ; found: 635.3921

Compound *enant-138*



Chemical Formula: $C_{35}H_{50}N_6O_5$
Molecular Weight: 634.82 $g \cdot mol^{-1}$

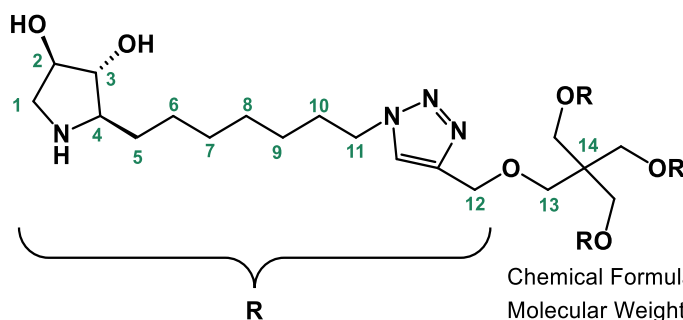
Compound *enant-138* (6.4 mg, 0.010 mmol) was prepared by the same protocol starting from *enant-82* (10.0 mg, 0.019 mmol). *Enant-138* was obtained as a white solid without any further purification with a 53% yield.

Regioisomer ratio (A/B) 0.65

Rotameric ratio (1/2) 0.65

Spectral data identical to compound **138**.

Compound **139**



Chemical Formula: $C_{61}H_{108}N_{16}O_{12}$
Molecular Weight: 1257.64 $g \cdot mol^{-1}$

MeOH and water were previously degassed for 1 h under Ar. Then a solution pre-mixed of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (5.5 mg, 0.022 mmol) and L-Ascorbic acid sodium salt (13.1 mg, 0.066 mmol) in water (0.35

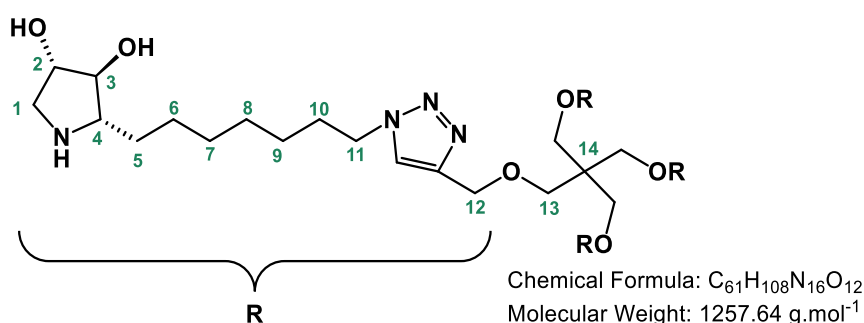
PARTIE EXPERIMENTALE

mL) were added to a solution of **113** (25.00 mg, 0.103 mmol), **117** (5.0 mg, 0.017 mmol), and TBTA (3.6 mg, 0.007 mmol) in MeOH (0.35 mL) in an eppendorf under N₂. The mixture was stirred at 60 °C at 1200 rpm for 3.5 h. The crude was treated with Quadrasil® TU resin (500 mg), then purified by SEC (Sephadex LH-20), with MeOH/water (1:1) to give **139** as a colorless oil with a **59%** yield (13.00 mg, 0,010 mmol).

R_f 0. 17 (ACN/water/ammonia 80:10:10, KMnO₄)

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁷

Compound *enant*-139

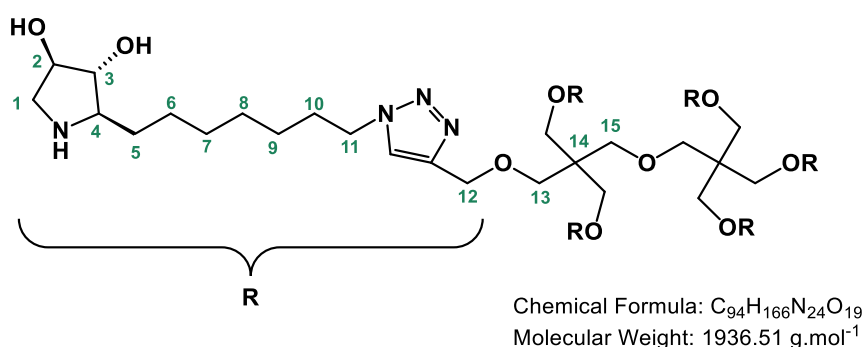


Compound *enant*-139 (9.0 mg, 0.007 mmol) was prepared by the same protocol starting from *enant*-113 (14.5 mg, 1.341 mmol). The crude mixture was treated with Quadrasil® TU resin (500 mg), then purified by SEC (Sephadex LH-20), with MeOH/water (1:1) to give *enant*-139 as a colorless oil with a **51%** yield.

R_f 0. 17 (ACN/water/ammonia 80:10:10, KMnO₄)

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁷

Compound 140



MeOH and water were previously degassed for 1 h under Ar. Then a solution pre-mixed of CuSO₄·5H₂O (6.7 mg, 0.027 mmol) and L-ascorbic acid sodium salt (16.1 mg, 0.081 mmol) in water (0.40 mL) were added to a solution of **113** (25.00 mg, 0.103 mmol), **117** (7.0 mg, 0.015 mmol), and TBTA (4.8 mg, 0.009 mmol) in MeOH (0.40 mL) in an eppendorf under N₂. The mixture was stirred at 60 °C at 1200 rpm for 3.5 h. The crude mixture was treated with Quadrasil® TU resin (500 mg), then purified by SEC (Sephadex LH-20), with MeOH/water (1:1) to give **140** as a colorless oil with a **53%** yield (15.0 mg, 0,008 mmol).

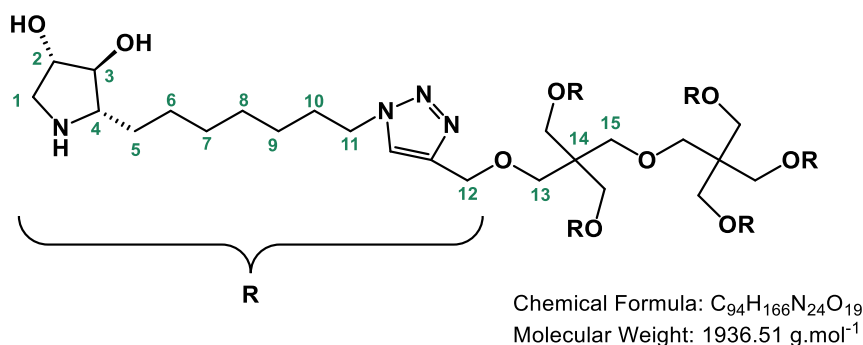
PARTIE EXPERIMENTALE

R_f 0. 10 (ACN/water/ammonia 80:10:10, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = 7.0$, (c 0.3, MeOH)

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁷

Compound *enant*-140



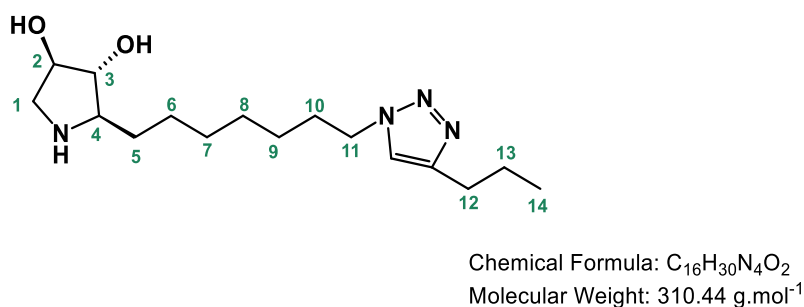
Compound *enant*-140 (9.0 mg, 0.006 mmol) was prepared by the same protocol starting from *enant*-113 (14.5 mg, 1.341 mmol). The crude mixture was treated with Quadrasil® TU resin (500 mg), then purified by SEC (Sephadex LH-20), with MeOH/water (1:1) to give *enant*-140 as a colorless oil with a **48%** yield.

R_f 0. 10 (ACN/water/ammonia 80:10:10, KMnO₄)

$[\alpha]_D^{20} = -1.2$, (c 0.5, MeOH)

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁷

Compound 141



MeOH and water were previously degassed for 1 h under Ar. Then a solution pre-mixed of CuSO₄·5H₂O (8.0 mg, 0.032 mmol) and L-ascorbic acid sodium salt (15.0 mg, 0.075 mmol) in water (0.30 mL) were added to a solution of **113** (16.00 mg, 0.066 mmol), pentyne (0.066 mL, 0.670 mmol), and TBTA (16.0 mg, 0.030 mmol) in MeOH (0.30 mL) in an eppendorf under N₂. The mixture was stirred at 60 °C at 1200 rpm for 3.5 h. The crude mixture was treated with Quadrasil® TU resin (500 mg), then purified by SEC (Sephadex LH-20), with MeOH/water (1:1) to give **140** as a colorless oil with a **57%** (with 10% oxidation product) yield (12.0 mg, 0,039 mmol).

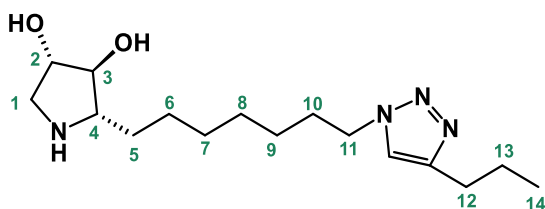
R_f 0. 13 (DCM/MeOH/ammonia 86:14:1, KMnO₄)

PARTIE EXPERIMENTALE

$$[\alpha]_D^{20} = 0.5, (c 0.8, \text{MeOH})$$

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁷

Compound *enant-141*



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2$
Molecular Weight: $310.44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

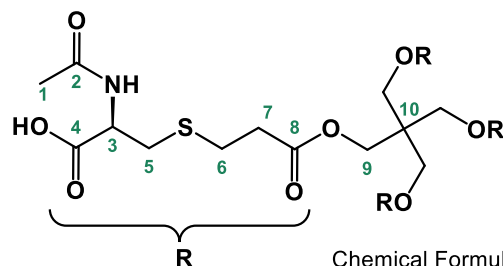
Compound *enant-141* (15.0 mg, 0.048 mmol) was prepared by the same protocol starting from *enant-113* (15.0 mg, 0.062 mmol). The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2 , ACN/water/ammonia 86:14:1) to give *enant-141* as a yellow oil with a **80%** yield (with 12% oxidation product).

R_f 0.13 (DCM/MeOH/ammonia 86:14:1, KMnO_4)

$$[\alpha]_D^{20} = -4.2, (c 0.7, \text{MeOH})$$

Spectral data are in accordance with literature.²¹⁷

Compound 143



Chemical Formula: $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{20}\text{S}_4$
Molecular Weight: $1005.10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

NAC (417.0 mg, 2.555 mmol) was added to a solution of **118** (130.0 mg, 0.426 mmol) and TEA (0.60 mL, 0.426 mmol) in dry DMF (0.80 mL) in an eppendorf under N_2 . The mixture was stirred at 40°C for 4 h. Then, the mixture was quenched with MeOH (1.00 mL) and Et_2O cold (10.00 mL) were added, then mixture was centrifuged. the supernatant was removed, and the white residue (gel) was dried. The operation was repeated with MeOH (1.00 mL) and cold Et_2O (10 mL). The crude product was purified by HPLC (column Atlantis C18 5 μM (4.6 x 100 mm), water (0.1% HCOOH)/MeOH (0.1% HCOOH)) (*annexe 3*) to give **143** as a colorless oil with a **42%** yield (178.0 mg, 0.177 mmol) after lyophilization.

R_f 0.16 (DCM/MeOH 80:20, KMnO_4)

$$[\alpha]_D^{20} = -8.9, (c 1.0, \text{water})$$

PARTIE EXPERIMENTALE

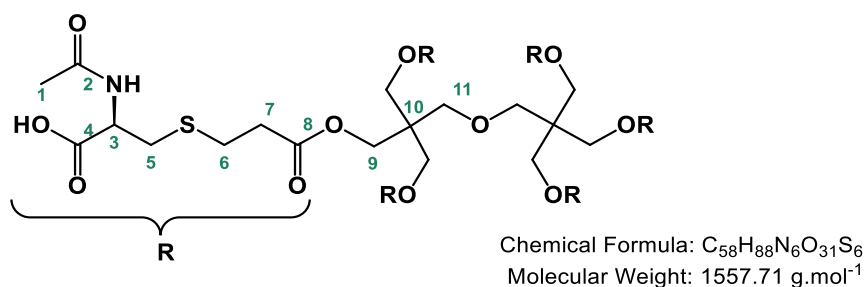
¹H-NMR (D₂O, 500 MHz) δ 4.28 (dd, 4H, $J_{3-5'} = 8.4$ Hz, $J_{3-5} = 4.2$ Hz, H₃), 4.18 (s, 8H, H₉), 2.98 (dd, 4H, $J_{5-5'} = 13.9$ Hz, $J_{5-3} = 4.2$ Hz, H₅), 2.80 (dd, 4H, $J_{5'-5} = 13.9$ Hz, $J_{5'-3} = 8.4$ Hz, H_{5'}), 2.80-2.75 (m, 8H, H₆), 2.71-2.65 (m, 8H, H₇), 1.98 (s, 12H, H₁) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz) δ 176.8 (C₂), 173.8 (C₈), 173.6 (C₄), 62.4 (C₉), 54.4 (C₃), 42.0 (C₁₀), 34.2 (C₇), 33.7 (C₅), 26.7 (C₆), 21.9 (C₁) ppm.

HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₃₆H₅₇N₄O₂₀S₄ [M+H]⁺: 1005.2449 ; found: 1005.2436

tr 8.630 min (column Atlantis C18 5 μM (4.6 x 100 mm), A: water (0.1% HCOOH)/B: MeOH (0.1% HCOOH) A:B (80:20 to 30:70)

Compound 144



NAC (250.0 mg, 1.532 mmol) was added to a solution of **120** (110.5 mg, 0.191 mmol) and TEA (0.055 mL, 0.396 mmol) in dry DMF (0.450 mL) in an eppendorf under N₂. The mixture was stirred at 40 °C for 4 h. Then, the reaction was quenched with MeOH (1.00 mL) and Et₂O cold (10.00 mL) were added, then mixture was centrifuged. the supernatant was removed, and the white residue (gel) was dried. The operation was repeated with MeOH (1.00 mL) and cold Et₂O (10 mL). The crude product was purified by puriflash® (column C18, water (0.1% HCOOH)/MeOH (0.1% HCOOH) 80:20 to 0:100) to give **144** as a white solid with a **47%** yield (140.10 mg, 0.090 mmol).

R_f 0.44 (ACN/water/NH₄OH 86:14:1, KMnO₄)

[α]_D²⁰ = -7.0, (c 1.0, water)

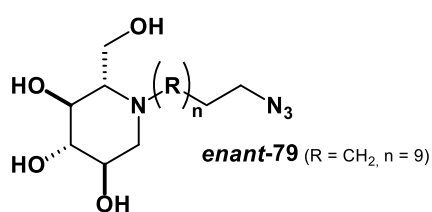
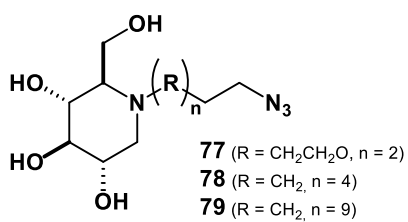
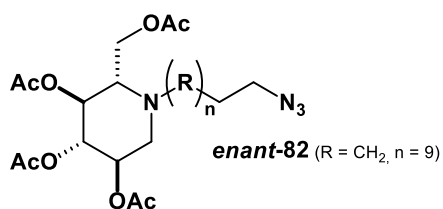
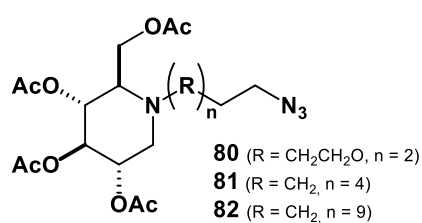
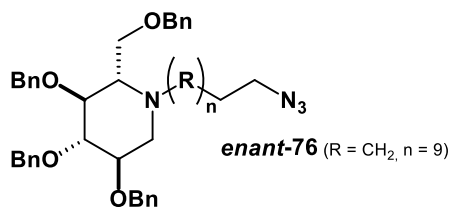
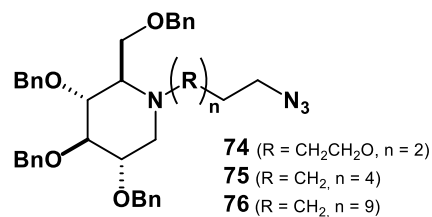
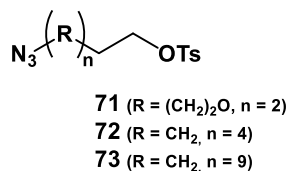
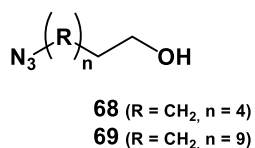
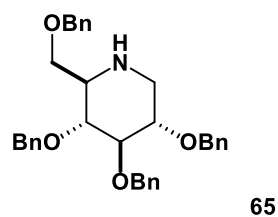
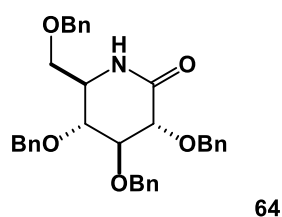
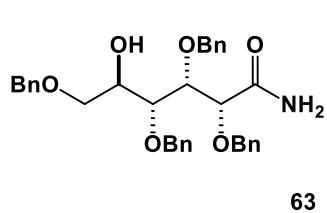
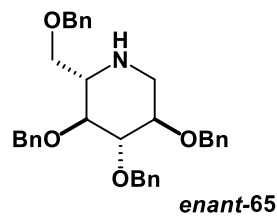
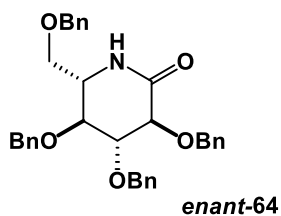
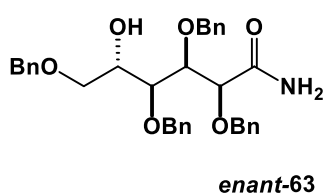
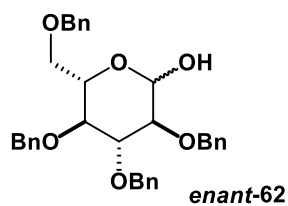
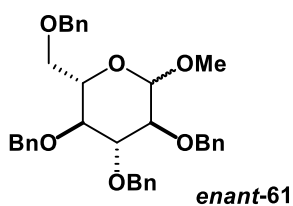
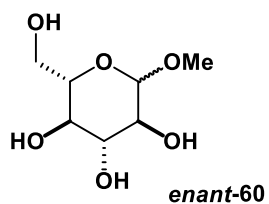
¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) δ 4.54 (dd, 6H, $J_{3-5'} = 8.1$ Hz, $J_{3-5} = 4.6$ Hz, H₃), 4.19 (s, 12H, H₉), 3.66 (s, 4H, H₁₁), 3.09 (dd, 6H, $J_{5-5'} = 13.7$ Hz, $J_{5-3} = 4.6$ Hz, H₅), 2.92 (dd, 6H, $J_{5'-5} = 13.7$ Hz, $J_{5'-3} = 8.1$ Hz, H_{5'}), 2.88-2.80 (m, 12H, H₆), 2.77-2.69 (m, 12H, H₇), 2.04 (s, 18H, H₁) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 75 MHz) δ 173.7-173.2 (C₂₊₄₊₈), 68.9 (C₁₁), 62.9 (C₉), 52.6 (C₃), 42.8 (C₁₀), 34.3 (C₇), 32.7 (C₅), 26.9 (C₆), 21.7 (C₁) ppm.

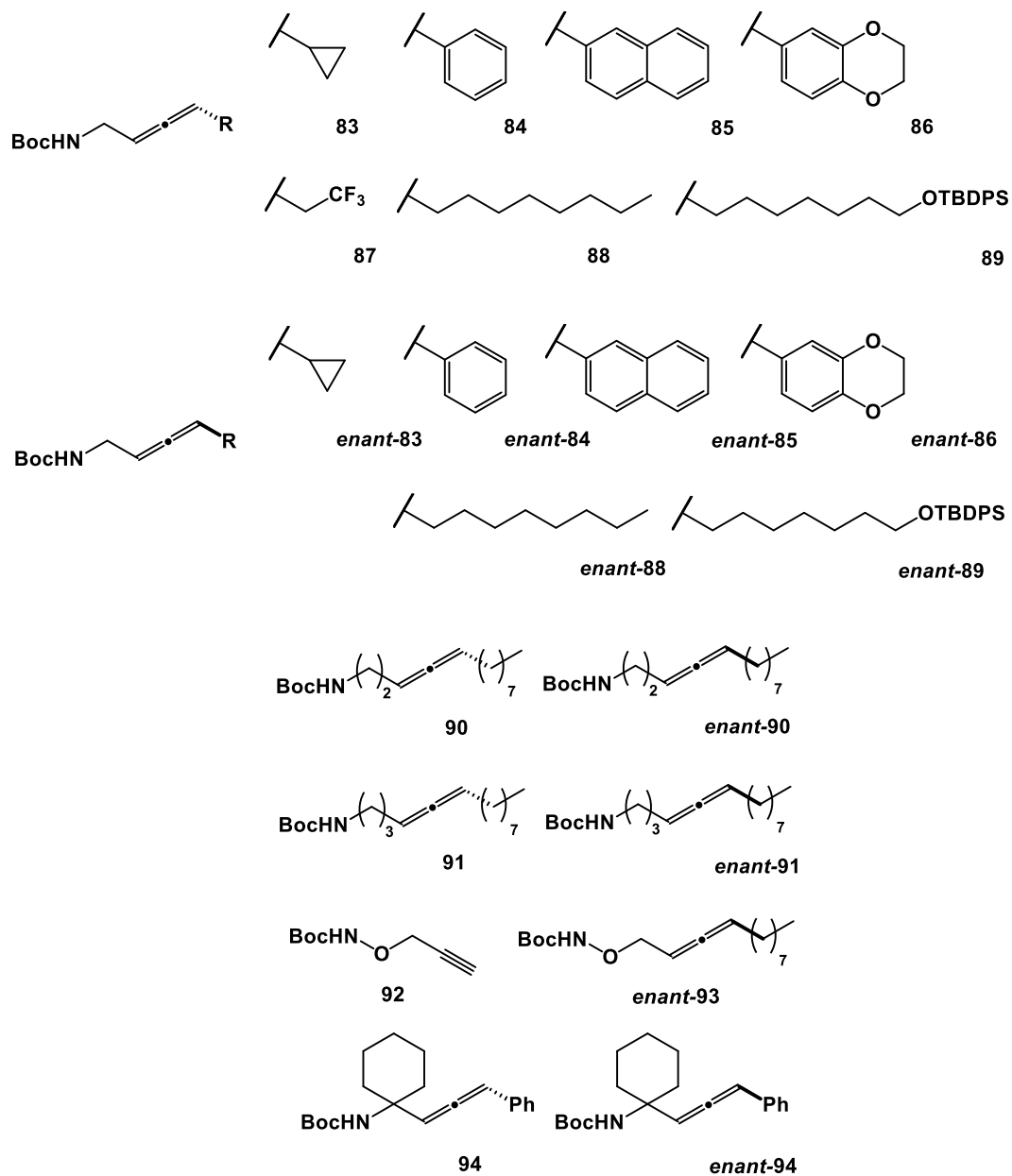
HR-MS (ESI) m/z calculated for: C₅₈H₈₇N₆O₃₁S₆ [M-H]⁻: 1555.3740; found: 1555.3706

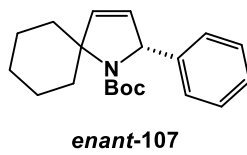
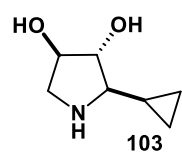
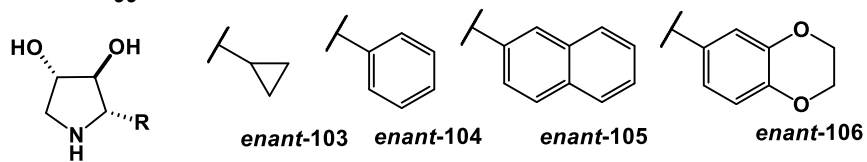
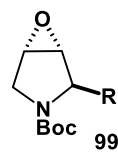
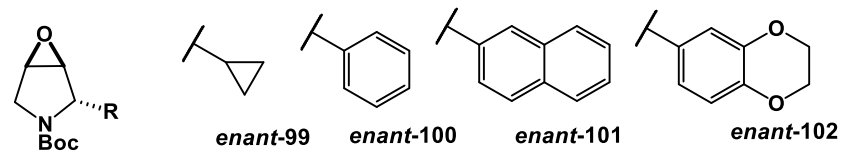
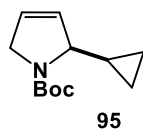
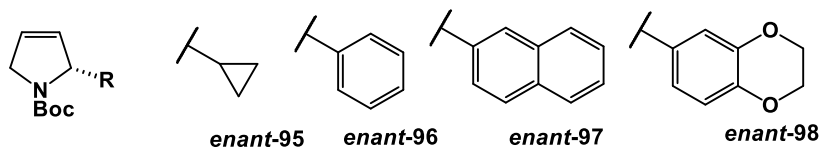
INDEX DES COMPOSES SYNTHETISES

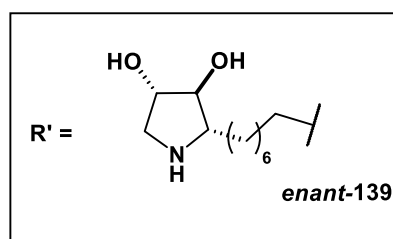
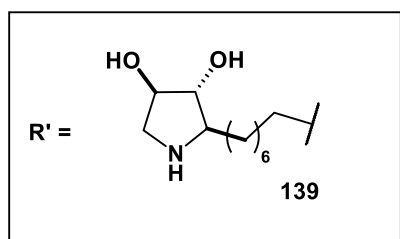
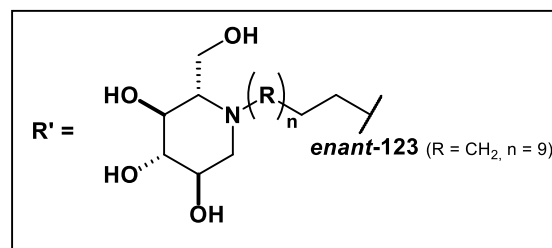
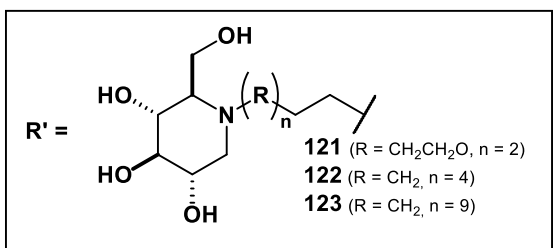
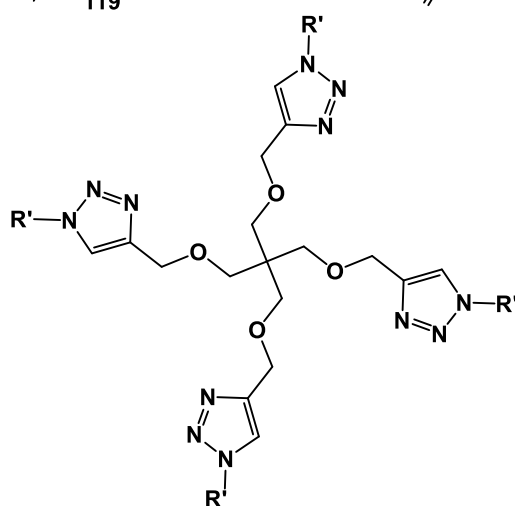
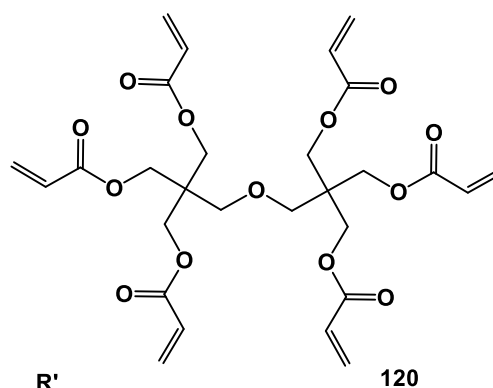
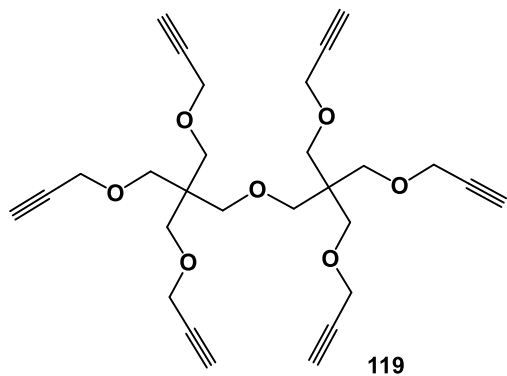
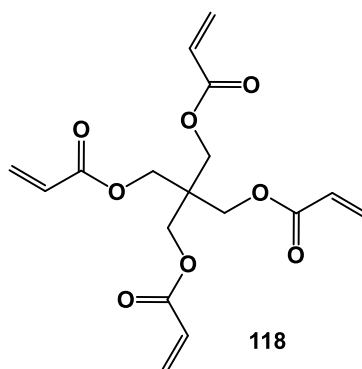
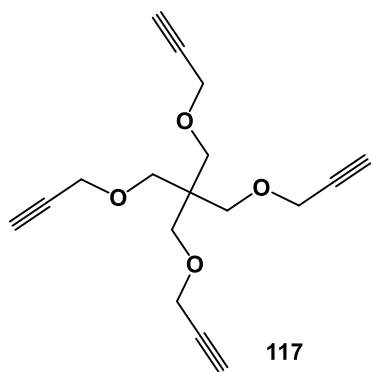
INDEX DES COMPOSES SYNTHETISES

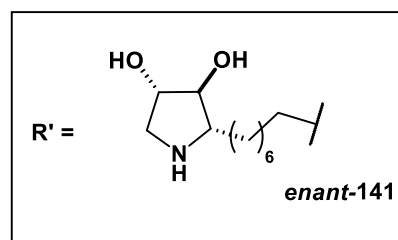
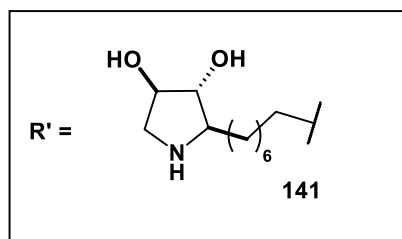
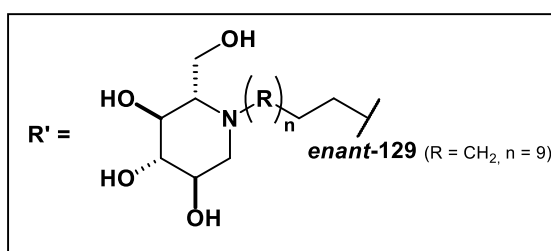
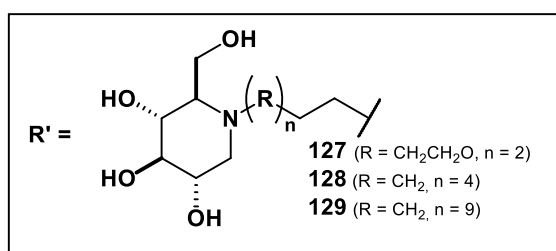
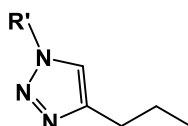
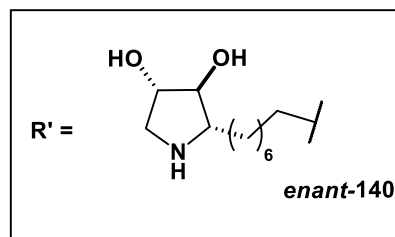
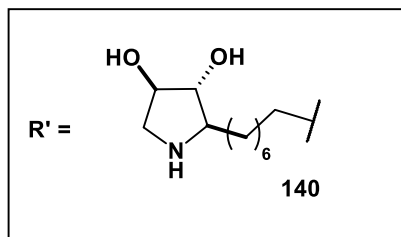
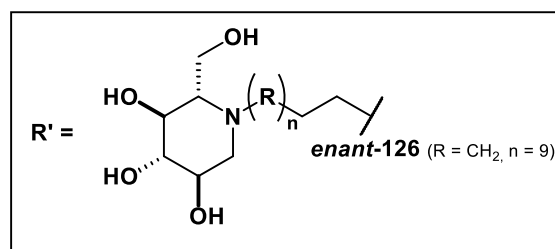
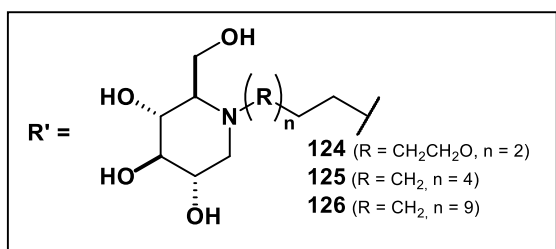
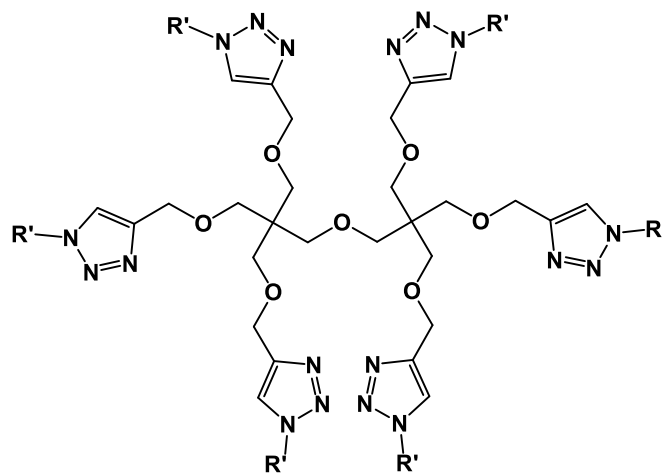


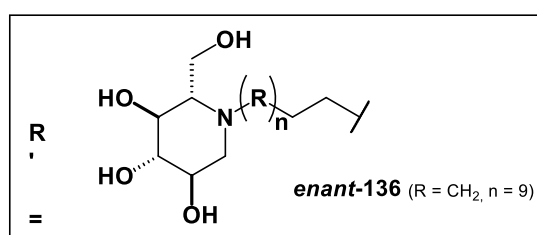
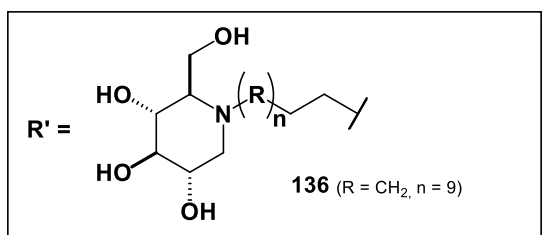
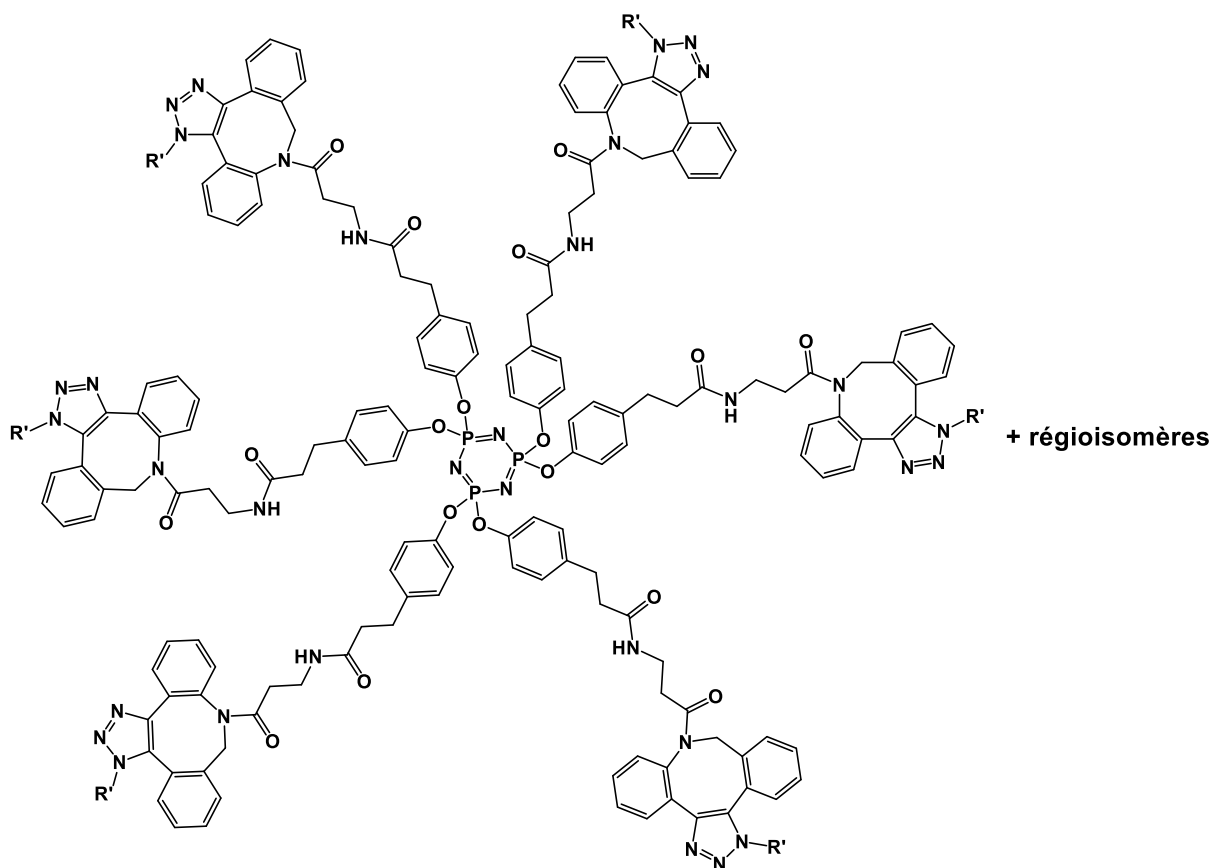
INDEX DES COMPOSES SYNTHETISES

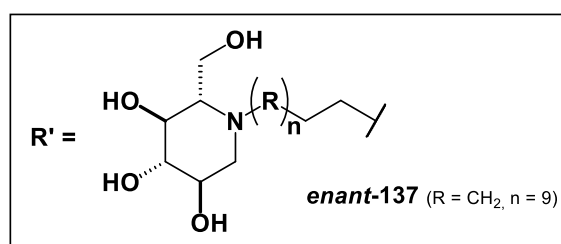
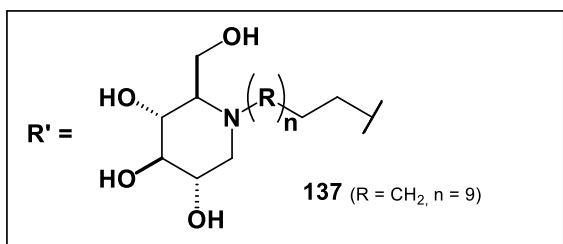
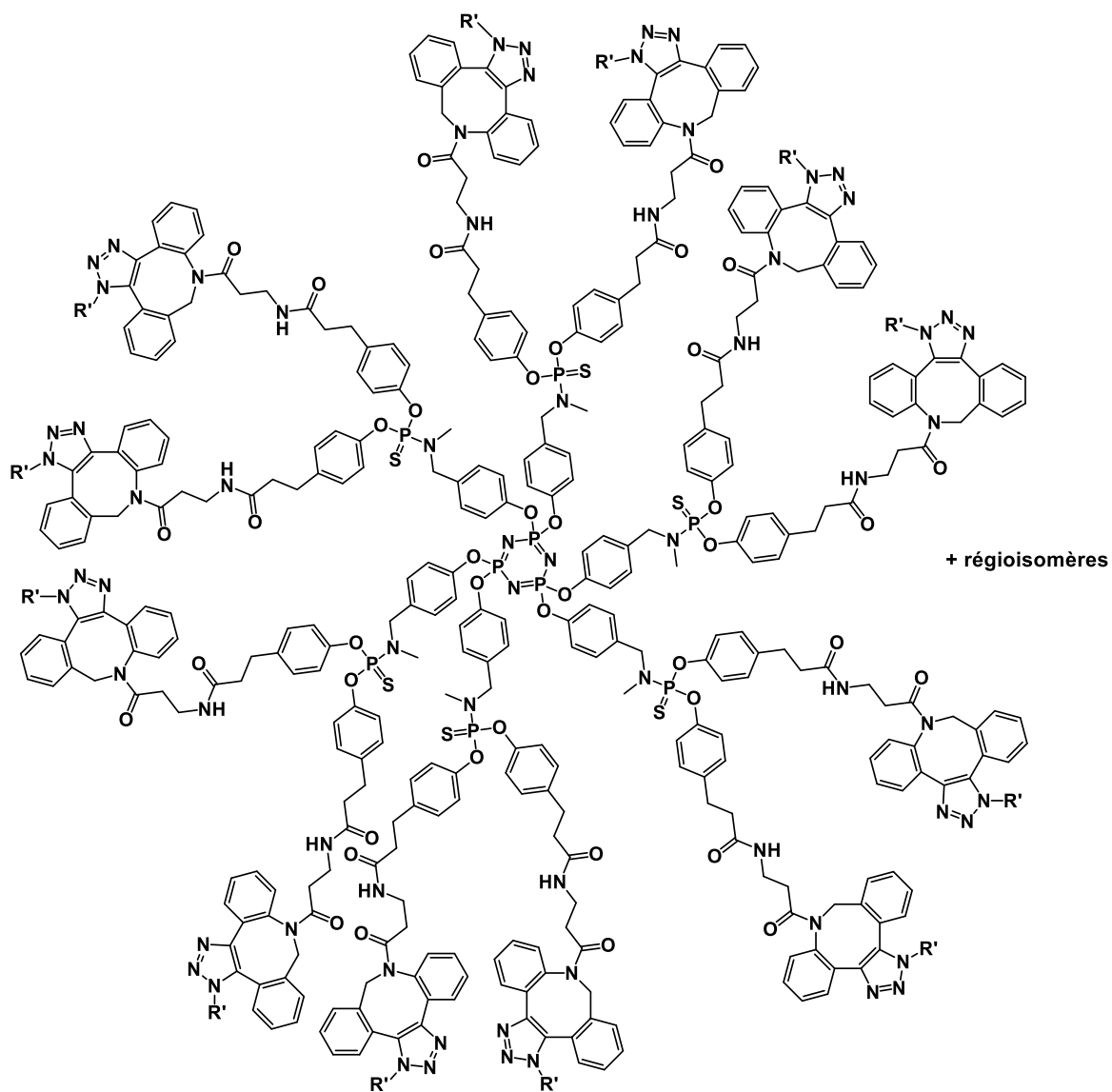


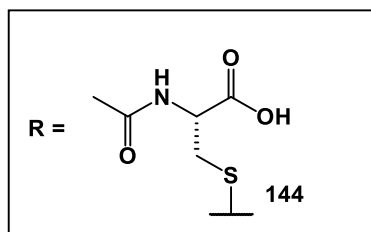
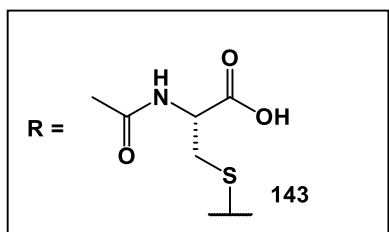
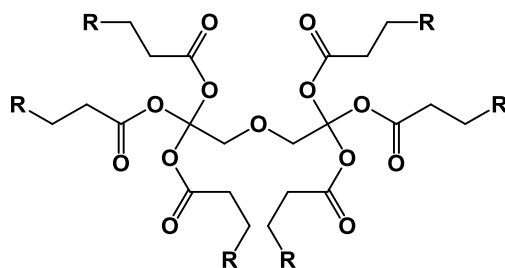
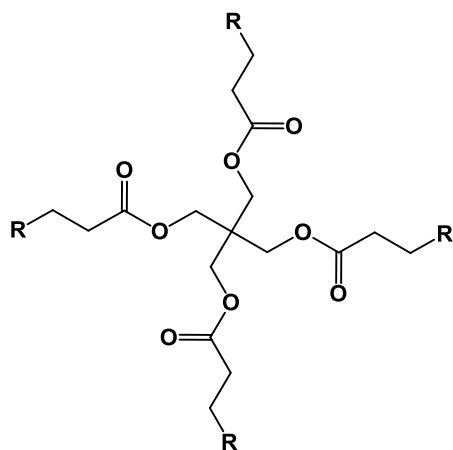
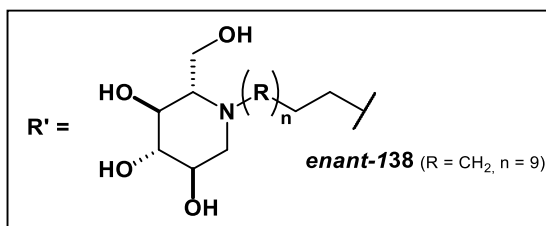
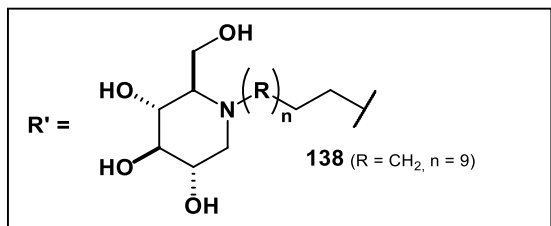
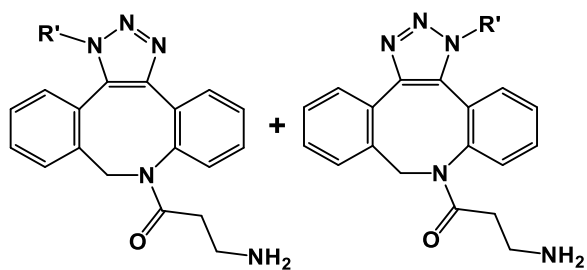












BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Mirabella, S. *et al.* Mechanistic insight into the binding of multivalent pyrrolidines to α -mannosidases. *Chem. - Eur. J.* **23**, 14585–14596 (2017).
2. KOSHLAND Jr. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* **28**, 416–436 (1953).
3. Doonan, S. *et al.* Mechanisms of enzyme action. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **20**, 247–327 (1970).
4. CAZy - GH. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>. (consulté en août 2023)
5. Asano, N. *et al.* Therapeutic Applications of sugar-mimicking glycosidase inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.* **1**, 145–154 (2001).
6. Winchester, B. *et al.* Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists. *Glycobiology* **2**, 199–210 (1992).
7. Lipničanová, S *et al.* Diversity of sialidases found in the human body – A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **148**, 857–868 (2020).
8. Kajimoto, T. *et al.* Inhibitors against glycosidases as medicines. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 13–33 (2009).
9. Fu, J. *et al.* Dual role of fucosidase in cancers and its clinical potential. *J. Cancer* **13**, 3121–3132 (2022).
10. Decroocq, C. Conception et synthèse de nouvelles classes d'iminosucres d'intérêt thérapeutique : chimie click, multivalence et maladies génétiques rares. Thèse de doctorat, Strasbourg (2012).
11. Hakamata, W. *et al.* Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 3–12 (2009).
12. Piel, F. B. *et al.* Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet* **381**, 142 (2013).
13. Platt, F. M. *et al.* Lysosomal storage diseases. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 1–25 (2018).
14. Roig-Zamboni, V. *et al.* Structure of human lysosomal acid α -glucosidase—a guide for the treatment of Pompe disease. *Nat. Commun.* **8**, 1111 (2017).
15. Parenti, G. *et al.* Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annu. Rev. Med.* **66**, 471–486 (2015).
16. Meikle, P. J. *et al.* Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**, 249–254 (1999).
17. Kornfeld, S. Lysosomal enzyme targeting. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 367–374 (1990).
18. Parenti, G. *et al.* New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* **31**, 11–20 (2013).
19. Sly, W. S. Receptor-mediated transport of acid hydrolases to lysosomes. *Curr. Top. Cell. Regul.* **26**, 27–38 (1985).
20. Wilcox, W. R. *et al.* Anti- α -galactosidase A antibody response to agalsidase beta treatment: data from the Fabry registry. *Mol. Genet. Metab.* **105**, 443–449 (2012).

BIBLIOGRAPHIE

21. Kemper, A. R. *et al.* Newborn screening for Pompe disease: synthesis of the evidence and development of screening recommendations. *Pediatrics* **120**, 1327–1334 (2007).
22. Kishnani, P. S. *et al.* Early treatment with alglucosidase alfa prolongs long term survival of infants with Pompe disease. *Pediatr. Res.* **66**, 329–335 (2009).
23. Valayannopoulos, V. *et al.* Le traitement par enzymothérapie des maladies lysosomales. *Arch. Pédiatrie* **18**, 1119–1123 (2011).
24. Grubb, J. H. *et al.* Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2616–2621 (2008).
25. Huynh, H. T. *et al.* Biochemical evidence for superior correction of neuronal storage by chemically modified enzyme in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17022–17027 (2012).
26. Pujols, J. *et al.* Chemical chaperones as novel drugs for Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* **26**, 408–421 (2020).
27. Chaudhuri, T. K. *et al.* Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J.* **273**, 1331–1349 (2006).
28. Zhao, J.-H. *et al.* Chemical chaperone and inhibitor discovery: potential treatments for protein conformational diseases. *Perspect. Med. Chem.* **1**, 39–48 (2007).
29. Nagai, Y., *et al.* Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 188–197 (2010).
30. Han, T.-U. *et al.* Small molecule chaperones for the treatment of Gaucher disease and GBA1-associated Parkinson disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 271 (2020).
31. Parenti, G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol. Med.* **1**, 268–279 (2009).
32. Parenti, G. *et al.* Pharmacological chaperone therapy: preclinical development, clinical translation, and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. *Mol. Ther.* **23**, 1138–1148 (2015).
33. Ya-Juan, W. *et al.* Using pharmacological chaperones to restore proteostasis. *Pharmacol. Res.* **83**, 3–9 (2014).
34. Lieberman, R. L. *et al.* The effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability. *Biochemistry* **48**, 4816–4827 (2009).
35. Leidenheimer, N. J. *et al.* Pharmacological chaperoning: a primer on mechanism and pharmacology. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* **83**, 10–19 (2014).
36. Tran, M. L. *et al.* Second-generation pharmacological chaperones: beyond inhibitors. *Molecules* **25**, 3145 (2020).
37. Borie-Guichot, M. *et al.* Pharmacological chaperone therapy for Pompe disease. *Molecules* **26**, 7223 (2021).
38. D'Alonzo, D. *et al.* N-butyl-L-deoxynojirimycin (L-NBDNJ): Synthesis of an allosteric enhancer of α -glucosidase activity for the treatment of Pompe disease. *J. Med. Chem.* **60**, 9462–9469 (2017).

BIBLIOGRAPHIE

39. Perretta, F. *et al.* Fabry disease: Switch from enzyme replacement therapy to oral chaperone migalastat: what do we know today? *Healthcare* **11**, 449 (2023).
40. Narita, A. *et al.* Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: a pilot study. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **3**, 200–215 (2016).
41. Hughes, D. A. *et al.* Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J. Med. Genet.* **54**, 288–296 (2017).
42. Shen, J.-S. *et al.* Isofagomine increases lysosomal delivery of exogenous glucocerebrosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1071–1075 (2008).
43. Khanna, R. *et al.* The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α -glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease. *PLOS ONE* **7**, 40776 (2012).
44. Parenti, G. *et al.* A chaperone enhances blood α -glucosidase activity in Pompe disease patients treated with enzyme replacement therapy. *Mol. Ther.* **22**, 2004–2012 (2014).
45. Coutinho, M. F. *et al.* Less Is More: Substrate reduction therapy for lysosomal storage disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1065 (2016).
46. Marshall, J. *et al.* Improved management of lysosomal glucosylceramide levels in a mouse model of type 1 Gaucher disease using enzyme and substrate reduction therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* **33**, 281–289 (2010).
47. <https://pompediseasenews.com/news/pompe-disease-treatment-mze001-shows-promise-phase-1-trial/> (consulté en août 2023).
48. Venna, S. Maze therapeutics reports positive data from Pompe disease therapy trial. *Clinical Trials Arena* (2023).
49. Reuser, A.J.J. *et al.* Glycogenosis type II (acid maltase deficiency). *Muscle & nerve.* **3**, 61-69 (1995)
50. Van der Ploeg, A. T. *et al.* Pompe's disease. *Lancet* **372**, 1342–1353 (2008).
51. Dasouki, M. *et al.* Pompe disease: literature review and case series. *Neurol. Clin.* **32**, 751–779 (2014).
52. Deming, D. *et al.* The molecular basis for Pompe disease revealed by the structure of human acid α -glucosidase. 212837 Preprint at <https://doi.org/10.1101/212837> (2017).
53. Moreland, R. J. *et al.* Lysosomal acid α -glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. *J. Biol. Chem.* **280**, 6780–6791 (2005).
54. Hoefsloot, L. H. *et al.* Primary structure and processing of lysosomal alpha-glucosidase; homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex. *EMBO J.* **7**, 1697–1704 (1988).
55. Bruckmann, C. *et al.* Systematic structure–activity study on potential chaperone lead compounds for acid α -glucosidase. *ChemMedChem* **7**, 1943–1953 (2012).
56. Meena, N. K. *et al.* Pompe disease: new developments in an old lysosomal storage disorder. *Biomolecules* **10**, 1339 (2020).

BIBLIOGRAPHIE

57. DeRuisseau, L. R. *et al.* Neural deficits contribute to respiratory insufficiency in Pompe disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 9419–9424 (2009).
58. Vilchez, D. *et al.* Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* **10**, 1407–1413 (2007).
59. Jones, H. N. *et al.* Oropharyngeal dysphagia in infants and children with infantile Pompe disease. *Dysphagia* **25**, 277–283 (2010).
60. Hobson-Webb, L. D. *et al.* Small-fiber neuropathy in pompe disease: first reported cases and prospective screening of a clinic cohort. *Am. J. Case Rep.* **16**, 196–201 (2015).
61. Korlimarla, A. *et al.* An emerging phenotype of central nervous system involvement in Pompe disease: from bench to bedside and beyond. *Ann. Transl. Med.* **7**, 289 (2019).
62. Pena, L. D. M. *et al.* Safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and exploratory efficacy of the novel enzyme replacement therapy avalglucosidase alfa (neoGAA) in treatment-naïve and alglucosidase alfa-treated patients with late-onset Pompe disease: A phase 1, open-label, multicenter, multinational, ascending dose study. *Neuromuscul. Disord.* **29**, 167–186 (2019).
63. Diaz-Manera, J. *et al.* Safety and efficacy of avalglucosidase alfa versus alglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease (COMET): a phase 3, randomised, multicentre trial. *Lancet Neurol.* **20**, 1012–1026 (2021).
64. Pena, L. D. M. *et al.* Postmortem findings and clinical correlates in individuals with infantile-onset Pompe disease. *JIMD Rep.* **23**, 45–54 (2015).
65. Clayton, N. P. *et al.* Antisense oligonucleotide-mediated suppression of muscle glycogen synthase 1 synthesis as an approach for substrate reduction therapy of pompe disease. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **3**, 206 (2014).
66. Guggenbuhl, P. *et al.* Gaucher disease. *JBS* **75**, 116–124 (2008).
67. Futerman, A. H. *et al.* *Gaucher disease*. (Taylor & Francis, 2007).
68. Do, J. *et al.* Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol. Neurodegener.* **14**, 36 (2019).
69. Sheth, J. *et al.* Gaucher disease: single gene molecular characterization of one-hundred Indian patients reveals novel variants and the most prevalent mutation. *BMC Med. Genet.* **20**, 31 (2019).
70. Dandana, A. *et al.* Gaucher Disease: Clinical, biological and therapeutic aspects. *Pathobiology* **83**, 13–23 (2016).
71. Rowland, R. J. *et al.* Design, synthesis and structural analysis of glucocerebrosidase imaging Agents. *Chem. Eur. J.* **27**, 16377–16388 (2021).
72. Ben Bdira, F. *et al.* Stabilization of glucocerebrosidase by active site occupancy. *ACS Chem. Biol.* **12**, 1830–1841 (2017).
73. Zunke, F. *et al.* Characterization of the complex formed by β -glucocerebrosidase and the lysosomal integral membrane protein type-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 3791–3796 (2016).
74. Masson, E. La maladie de Gaucher : quand y penser ? *EM-Consulte* <https://www.em-consulte.com/article/1268618/la-maladie-de-gaucher-quand-y-penser> (consulté en août 2023).

BIBLIOGRAPHIE

75. Schiffmann, R. *et al.* The definition of neuronopathic Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **43**, 1056–1059 (2020).
76. Mignot, C. *et al.* French type 2 Gaucher disease study group. type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. *Brain Dev.* **28**, 39–48 (2006).
77. Stirnemann, J. *et al.* A review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 441 (2017).
78. Scott, L.J. Eliglustat: A Review in Gaucher Disease Type 1. *Drugs.* **75**, 1669–1678 (2015)
79. Nabizadeh, A. *et al.* The clinical efficacy of imiglucerase versus eliglustat in patients with Gaucher's disease type 1: A systematic review. *J. Res. Pharm. Pract.* **7**, 171–177 (2018).
80. Butters, T. D. *et al.* Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis: Application to lysosomal storage disorders. *Chem. Rev.* **100**, 4683–4696 (2000).
81. Schiffmann, R. *et al.* Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Ann. Neurol.* **64**, 514–522 (2008).
82. Stirnemann, J. *et al.* A Review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 441 (2017).
83. Charrow, J. *et al.* The effect of enzyme replacement therapy on bone crisis and bone pain in patients with type 1 Gaucher disease. *Clin. Genet.* **71**, 205–211 (2007).
84. Wenstrup, R. J. *et al.* Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on BMD in type 1 Gaucher disease. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 119–126 (2007).
85. Martínez-Bailén, M. *et al.* GCase Enhancers: A potential therapeutic option for Gaucher disease and other neurological disorders. *Pharmaceuticals* **15**, 823 (2022).
86. Yu, Z., Pharmacologic chaperoning as a strategy to treat Gaucher disease. *FEBS J.* **274**, 4944–4950 (2007).
87. Trapero, A. *et al.* Glucocerebrosidase inhibitors for the treatment of Gaucher disease. *Future Med. Chem.* **5**, 573–590 (2013).
88. Liguori, L. *et al.* Pharmacological chaperones: A therapeutic approach for diseases caused by destabilizing missense mutations. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 489 (2020).
89. Kakavanos, R. *et al.* Stabilising normal and mis-sense variant alpha-glucosidase. *FEBS Lett.* **580**, 4365–4370 (2006).
90. Okumiya, T. *et al.* Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II. *Mol. Genet. Metab.* **90**, 49–57 (2007).
91. Iftikhar, M. *et al.* An overview of therapeutic potential of N-alkylated 1-deoxynojirimycin congeners. *Carbohydr. Res.* **504**, 108317 (2021).
92. Yu, L. *et al.* Alpha-1-C-octyl-1-deoxynojirimycin as a pharmacological chaperone for Gaucher disease. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 7736–7744 (2006).
93. Parenti, G. *et al.* Pharmacological enhancement of mutated alpha-glucosidase activity in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Mol. Ther.* **15**, 508–514 (2007).

BIBLIOGRAPHIE

94. Kato, A. *et al.* Design and pharmacological chaperone effects of N-(4'-Phenylbutyl)-DAB derivatives targeting the lipophilic pocket of lysosomal acid α -glucosidase. *J. Med. Chem.* **66**, 9023–9039 (2023)
95. Lukas, J. *et al.* Enzyme enhancers for the treatment of fabry and Pompe disease. *Mol. Ther.* **23**, 456–464 (2015).
96. Lukas, J. *et al.* US20150258081A1 - Combination of a compound having the ability to rearrange a lysosomal enzyme and ambroxol and/or a derivative of ambroxol - Patent (2015)
97. Kato, A. *et al.* Strategy for designing selective lysosomal acid α -glucosidase inhibitors: binding orientation and influence on selectivity. *Molecules* **25**, 2843 (2020).
98. Li, H.-Y. *et al.* Harnessing polyhydroxylated pyrrolidines as a stabilizer of acid alpha-glucosidase (GAA) to enhance the efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease. *Bioorg. Med. Chem.* **78**, 117129 (2023).
99. Porto, C. *et al.* Pharmacological Enhancement of α -Glucosidase by the Allosteric Chaperone N-acetylcysteine. *Mol. Ther.* **20**, 2201–2211 (2012).
100. Iacono, R. *et al.* Carnitine is a pharmacological allosteric chaperone of the human lysosomal α -glucosidase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **36**, 2068–2079 (2021).
101. Alfonso, P. *et al.* Bicyclic derivatives of L-idonojirimycin as pharmacological chaperones for neuronopathic forms of Gaucher disease. *ChemBioChem Eur. J. Chem. Biol.* **14**, 943–949 (2013).
102. Clemente, F. *et al.* Piperidine azasugars bearing lipophilic chains: stereoselective synthesis and biological activity as inhibitors of glucocerebrosidase (GCCase). *J. Org. Chem.* **86**, 12745–12761 (2021).
103. Clemente, F. *et al.* Glucocerebrosidase (GCCase) activity modulation by 2-alkyl trihydroxypiperidines: Inhibition and pharmacological chaperoning. *Bioorg. Chem.* **98**, 103740 (2020).
104. Sun, Y. *et al.* Isofagomine in vivo effects in a neuronopathic Gaucher disease mouse. *PLoS One* **6**, 19037 (2011).
105. Khanna, R. *et al.* The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *FEBS J.* **277**, 1618–1638 (2010).
106. Yu, Z. *et al.* Isofagomine- and 2,5-anhydro-2,5-imino-D-glucitol-based glucocerebrosidase pharmacological chaperones for Gaucher disease intervention. *J. Med. Chem.* **50**, 94–100 (2007).
107. Maegawa, G. H. B. *et al.* Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 23502–23516 (2009).
108. Bouscary, A. *et al.* Drug repositioning in neurodegeneration: an overview of the use of ambroxol in neurodegenerative diseases. *Eur. J. Pharmacol.* **884**, 173446 (2020).
109. Wang, G.-N. *et al.* Rational design and synthesis of highly potent pharmacological chaperones for treatment of N370S mutant Gaucher disease. *J. Med. Chem.* **52**, 3146–3149 (2009).
110. Tropak, M. B. *et al.* Identification of pharmacological chaperones for Gaucher disease and characterization of their effects on beta-glucocerebrosidase by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *ChemBioChem* **9**, 2650–2662 (2008).
111. Marugan, J. J. *et al.* Evaluation of quinazoline analogues as glucocerebrosidase inhibitors with chaperone activity. *J. Med. Chem.* **54**, 1033–1058 (2011).

BIBLIOGRAPHIE

112. Serra-Vinardell, J. *et al.* Selective chaperone effect of aminocyclitol derivatives on G202R and other mutant glucocerebrosidases causing Gaucher disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **54**, 245–254 (2014).
113. Trapero, A. *et al.* Polyhydroxylated Bicyclic Isooureas and Guanidines Are Potent Glucocerebrosidase Inhibitors and Nanomolar Enzyme Activity Enhancers in Gaucher Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 5474–5484 (2011).
114. Baudoin-Dehoux, C. *et al.* Selective Targeting of the Interconversion between Glucosylceramide and Ceramide by Scaffold Tailoring of Iminosugar Inhibitors. *Molecules.* **24**, 354 (2019).
115. Castellán, T. *et al.* Concise asymmetric synthesis of new enantiomeric C-alkyl pyrrolidines acting as pharmacological chaperones against Gaucher disease. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 7852–7861 (2020).
116. Kato, A. *et al.* Docking study and biological evaluation of pyrrolidine-based iminosugars as pharmacological chaperones for Gaucher disease. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 1039–1048 (2016).
117. Rogers, S. *et al.* Discovery, SAR, and biological evaluation of non-inhibitory chaperones of glucocerebrosidase. in *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program* (National Center for Biotechnology Information (US), 2010).
118. Zheng, J. *et al.* Conversion of quinazoline modulators from inhibitors to activators of β -Glucocerebrosidase. *J. Med. Chem.* **62**, 1218–1230 (2019).
119. Patnaik, S. *et al.* Discovery, structure-activity relationship, and biological evaluation of noninhibitory small molecule chaperones of glucocerebrosidase. *J. Med. Chem.* **55**, 5734–5748 (2012).
120. Den Heijer, J. M. *et al.* A Phase 1B Trial in GBA1-Associated Parkinson's Disease of BIA-28-6156, a Glucocerebrosidase Activator. *Mov. Disord.* **38**, 7, 1197-1208 (2023)
121. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047–1053 (2004).
122. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **33**, S62–S69 (2010).
123. Bytzer, P. *et al.* Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch. Intern. Med.* **161**, 1989–1996 (2001).
124. Kazmi, M. *et al.* A new entry into the portfolio of α -glucosidase inhibitors as potent therapeutics for type 2 diabetes: Design, bioevaluation and one-pot multi-component synthesis of diamine-bridged coumarinyl oxadiazole conjugates. *Bioorg. Chem.* **77**, 190–202 (2018).
125. Gerich, J. E. Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Arch. Intern. Med.* **163**, 1306–1316 (2003).
126. Ley, S. H. *et al.* Epidemiology and Risk Factors of Type 2 Diabetes. *Diabetes Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Treatment* 55–80 (2018)
127. Taylor, S. I. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* **97**, 9–12 (1999).

BIBLIOGRAPHIE

128. Galicia-Garcia, U. *et al.* Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6275 (2020).
129. Czech, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat. Med.* **23**, 804–814 (2017).
130. Capeau, J. Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *médecine/sciences* **19**, 834–839 (2003).
131. DeFronzo, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* **88**, 787–835 (2004).
132. Dhameja, M. *et al.* Synthetic heterocyclic candidates as promising α -glucosidase inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **176**, 343–377 (2019).
133. Guangcui Xu, Y. Z. Type 2 Diabetes Mellitus- Disease, Diagnosis and Treatment. *J. Diabetes Metab.* **06**, (2015).
134. Kim, K.-T., *et al.* Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* **98**, 27–33 (2014).
135. Sugihara, H. *et al.* Comparison of three α -glucosidase inhibitors for glycemic control and bodyweight reduction in Japanese patients with obese type 2 diabetes. *J. Diabetes Investig.* **5**, 206–212 (2014).
136. Leroux-Stewart, J. α -Glucosidase inhibitors. *International Textbook of Diabetes Mellitus.* 673–685 (2015)
137. Morikawa, T. *et al.* Salacinol and related analogs: new leads for type 2 diabetes therapeutic candidates from the thai traditional natural medicine salacia chinensis. *Nutrients* **7**, 1480–1493 (2015).
138. Mooradian, A. D. *et al.* Drug therapy of postprandial hyperglycaemia. *Drugs* **57**, 19–29 (1999).
139. Ag, H. B. B. Pharmacology of α -glucosidase inhibition. *Eur. J. Clin. Invest.* **24**, 3–10 (1994).
140. Chen, X. *et al.* Voglibose (Basen[®], AO-128), One of the Most Important α -Glucosidase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **13**, 109–116 (2006).
141. Joubert, P. H. *et al.* The effect of miglitol and acarbose after an oral glucose load: a novel hypoglycaemic mechanism? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **30**, 391–396 (1990).
142. Joshi, S. R. *et al.* Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review. *Expert Opin. Pharmacother.* **16**, 1959–1981 (2015).
143. Boisselier, J. Mise en œuvre d'un système de confinement et de délivrance moléculaire pour la production in situ de glucose au sein d'un hydrogel conçu pour l'ingénierie tissulaire. Thèse de doctorat, Cergy-Pontoise (2016).
144. Imran, S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of indole derivatives as α -amylase inhibitor. *Bioorg. Chem.* **73**, 121–127 (2017).
145. Kaur, N. *et al.* Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review. *Chem. Biol. Drug Des.* **98**, 539–560 (2021).

BIBLIOGRAPHIE

146. Kato, E. *et al.* Synthesis and α -amylase inhibitory activity of glucose–deoxynojirimycin conjugates. *Tetrahedron* **67**, 7692–7702 (2011).
147. Brayer, G. D. *et al.* Subsite mapping of the human pancreatic α -amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. *Biochemistry* **39**, 4778–4791 (2000).
148. Kato, E. *et al.* Synthesis and study of the pancreatic α -amylase inhibitory activity of methyl acarviosin and its derivatives. *Tetrahedron Lett.* **57**, 1365–1367 (2016).
149. Kim, H. *et al.* Biosensors based on bivalent and multivalent recognition by nucleic acid scaffolds. *Appl. Sci.* **12**, 1717 (2022).
150. Lee, Y. C. *et al.* Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **28**, 321–327 (1995).
151. Lundquist, J. J. *et al.* The cluster glycoside effect. *Chem. Rev.* **102**, 555–578 (2002).
152. Cecioni, S. Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. *Chem. Rev.* **115**, 525–561 (2015).
153. Mammen, M. *et al.* Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2754–2794 (1998).
154. Compain, P. *et al.* Glycosidase inhibition with fullerene iminosugar balls: A dramatic multivalent effect. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 5753–5756 (2010).
155. Choi, H. *et al.* Applying multivalent biomolecular interactions for biosensors. *Chem. Eur. J.* **24**, 19103–19109 (2018).
156. Mulder, A., *et al.* Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 3409–3424 (2004).
157. Florent, T. Caractérisation d’inhibiteurs d’anhydrase carbonique IX, études de complexes supramoléculaires et interactions moléculaires par résonance plasmonique de surface. Thèse de doctorat, Lille (2014)
158. Supuran, C. T. *et al.* *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target.* (Academic Press, 2019).
159. Carta, F. *et al.* Poly(amidoamine) dendrimers show carbonic anhydrase inhibitory activity against α -, β -, γ - and η -class enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 6794–6798 (2015).
160. Carta, F. *et al.* Multivalent Carbonic Anhydrases Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5352 (2019).
161. Deniaud, D. *et al.* Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 966–979 (2011).
162. Gouin, S. G. Multivalent Inhibitors for carbohydrate-processing enzymes: beyond the “Lock-and-Key” concept. *Chem. Eur. J.* **20**, 11616–11628 (2014).
163. Mammen, M. *et al.* Effective inhibitors of hemagglutination by influenza virus synthesized from polymers having active ester groups. insight into mechanism of inhibition. *J. Med. Chem.* **38**, 4179–4190 (1995).
164. Diot, J. *et al.* Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 357–363 (2009).

BIBLIOGRAPHIE

165. Wang, G.-Y. *et al.* Fluorescence sensing and glycosidase inhibition effect of multivalent glycosidase inhibitors based on Naphthalimide-deoxynojirimycin conjugates. *Bioorg. Chem.* **132**, 106373 (2023).
166. Brissonnet, Y. *et al.* Topological effects and binding modes operating with multivalent iminosugar-based glycoclusters and mannosidases. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18427–18435 (2013).
167. Pichon, M. M., *et al.* Tight-binding inhibition of jack bean α -mannosidase by glycoimidazole clusters. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 5801–5817 (2019).
168. Nierengarten, J.-F. *et al.* Giant glycosidase inhibitors: first- and second-generation fullerodendrimers with a dense iminosugar shell. *Chem. Eur. J.* **24**, 2483–2492 (2018).
169. Lafosse, M. *et al.* Bambus[4,6]urils as dual scaffolds for multivalent iminosugar presentation and Ion transport: access to unprecedented glycosidase-directed anion caging agents. *Molecules* **27**, 4772 (2022).
170. Li, J.-J. *et al.* Synthesis, self-assembly behaviours and multivalent glycosidase inhibition effects of a deoxynojirimycin modified perylene bisimide derivative. *J. Mater. Chem. B* **7**, 1270–1275 (2019).
171. Yang, J.-X. *et al.* Multivalent glucosidase inhibitors based on perylene bisimide and iminosugar conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **241**, 114621 (2022).
172. Schneider, J. P. *et al.* Synthesis and glycosidase inhibition properties of calix[8]arene-based iminosugar click clusters. *Pharmaceuticals* **13**, 366 (2020).
173. Lepage, M. L. *et al.* Iminosugar-cyclopeptoid conjugates raise multivalent effect in glycosidase inhibition at unprecedented high levels. *Chem. Eur. J.* **22**, 5151–5155 (2016).
174. Sala, P. D. *et al.* Multivalent resorcinarene clusters decorated with DAB-1 inhitopes: targeting Golgi α -mannosidase from *Drosophila melanogaster*. *Org. Chem. Front.* **8**, 6648–6656 (2021).
175. Li, M. *et al.* Supramolecular azasugar clusters based on an amphiphilic fatty-acid-deoxynojirimycin derivative as multivalent glycosidase inhibitors. *J. Mater. Chem. B* **7**, 1379–1383 (2019).
176. Khan, I. A. *et al.* Discovery of amide-functionalized benzimidazolium salts as potent α -glucosidase inhibitors. *Molecules* **26**, 4760 (2021).
177. Jenis, J. *et al.* Competitive α -glucosidase inhibitors, dihydrobenzoxanthenes, from the barks of *Artocarpus elasticus*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **34**, 1623–1632 (2019).
178. Verastegui-Omaña, B. *et al.* α -glucosidase inhibitors from *Malbranchea flavorosea*. *J. Nat. Prod.* **80**, 190–195 (2017).
179. Quan, N. V. *et al.* Momilactones A and B are α -amylase and α -glucosidase inhibitors. *Molecules* **24**, 482 (2019).
180. Decroocq, C. *et al.* Cyclodextrin-based iminosugar click clusters: the first examples of multivalent pharmacological chaperones for the treatment of lysosomal storage disorders. *ChemBioChem* **13**, 661–664 (2012).
181. Vanni, C. *et al.* 3,4,5-trihydropiperidine based multivalent glucocerebrosidase (GCase) enhancers. *ChemBioChem* **23**, e202200077 (2022).

BIBLIOGRAPHIE

182. Martínez-Bailén, M. *et al.* Synthesis of multimeric pyrrolidine iminosugar inhibitors of human β -glucocerebrosidase and α -galactosidase A: First example of a multivalent enzyme activity enhancer for Fabry disease. *Eur. J. Med. Chem.* **192**, 112173 (2020).
183. Laigre, E. *et al.* Investigation of original multivalent iminosugars as pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher disease. *Carbohydr. Res.* **429**, 98–104 (2016).
184. Joosten, A. *et al.* A systematic investigation of iminosugar click clusters as pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher Disease. *ChemBioChem* **15**, 309–319 (2014).
185. Kolb, H. C. *et al.* Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **40**, 2004–2021 (2001).
186. Fernández-Herrera, M. A. *et al.* Synthesis of the steroidal glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-12,22-dioxo-5 α -cholestan-26-yl β -D-glucopyranoside and its anti-cancer properties on cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo cells. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 4827–4837 (2010).
187. Hoos, R. *et al.* A Convenient Procedure for the Synthesis of 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-D-glucanolactam and D-Nojirilactam. *Helv. Chim. Acta* **76**, 1802–1807 (1993).
188. Overkleeft, H. S. *et al.* A facile transformation of sugar lactones to azasugars. *Tetrahedron* **50**, 4215–4224 (1994).
189. Crabbé, P. *et al.* Efficient homologation of acetylenes to allenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 859–860 (1979)
190. Kuang, J. *et al.* An efficient synthesis of terminal allenes from terminal 1-alkynes. *J. Org. Chem.* **74**, 1763–1765 (2009).
191. Chen, B. *et al.* Efficient synthesis of N-(buta-2,3-dienyl) amides from terminal N-propargyl amides and their synthetic potential towards oxazoline derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 8465–8470 (2012).
192. Kuang, J. *et al.* One-pot synthesis of 1,3-disubstituted allenes from 1-alkynes, aldehydes, and morpholine. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1786–1787 (2010).
193. Huang, X. *et al.* Allenation of terminal alkynes with aldehydes and ketones. *Acc. Chem. Res.* **52**, 1301–1312 (2019).
194. Tang, X. *et al.* Cadmium iodide-mediated allenylation of terminal alkynes with ketones. *Nat. Commun.* **4**, 2450 (2013).
195. Liu, Q. *et al.* Catalytic one-pot synthesis of trisubstituted allenes from terminal alkynes and ketones. *Org. Lett.* **19**, 5174–5177 (2017).
196. Huang, X. *et al.* General CuBr₂-catalyzed highly enantioselective approach for optically active allenols from terminal alkynols. *Chem. Commun.* **51**, 6956–6959 (2015).
197. Tang, X. *et al.* CuBr₂-catalyzed enantioselective routes to highly functionalized and naturally occurring allenes. *Org. Chem. Front.* **2**, 688–691 (2015).
198. Grob, C. A. *et al.* Die 1,4-Eliminierung unter fragmentierung. *Helv. Chim. Acta* **38**, 594–610 (1955).
199. Hutchinson, G., *et al.* Mechanistically guided design of an efficient and enantioselective aminocatalytic α -chlorination of aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 6805–6809 (2021).

BIBLIOGRAPHIE

200. Hamilton, G. L., *et al.* Powerful chiral counterion strategy for asymmetric transition metal catalysis. *Science* **317**, 496–499 (2007).
201. Yu, S. *et al.* Allenes in catalytic asymmetric synthesis and natural product syntheses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 3074–3112 (2012).
202. Ma, S. Transition metal-catalyzed/mediated reaction of allenens with a nucleophilic functionality connected to the α -carbon atom. *Acc. Chem. Res.* **36**, 701–712 (2003).
203. Volz, F. *et al.* Gold catalysis in stereoselective natural product synthesis: (+)-linalool oxide, (–)-isocyclocapitelline, and (–)-isochrysotricine. *Tetrahedron* **65**, 1902–1910 (2009).
204. Frost, J. R. *et al.* Macrocyclization of organo-peptide hybrids through a dual bio-orthogonal ligation: insights from structure–reactivity studies. *ChemBioChem* **14**, 147–160 (2013).
205. Chen, L. *et al.* Expanding indole diversity: direct 1-step synthesis of 1,2-fused indoles and spiroindolines from 2-halo anilines for fast SAR antiviral elucidation against tobacco mosaic virus (TMV). *Mol. Divers.* **21**, 61–68 (2017).
206. Yang, J. *et al.* Design, synthesis, and structure–activity relationship of novel spiropyrimidinamines as fungicides against *Pseudoperonospora cubensis*. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 6485–6492 (2020).
207. Yu, L. *et al.* Spiro derivatives in the discovery of new pesticides: a research review. *J. Agric. Food Chem.* **70**, 10693–10707 (2022).
208. LaLonde, R. L. *et al.* Gold(I)-catalyzed enantioselective synthesis of pyrazolidines, isoxazolidines, and tetrahydrooxazines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 598–601 (2010).
209. Moraes, L. C. *et al.* 1D coordination polymer based on copper(II)-containing tetrameric 1,2,3-triazole ligand from click chemistry: Magnetic and catalytic properties. *Inorganica Chim. Acta* **489**, 93–99 (2019).
210. Ma, X. *et al.* Facile synthesis of polyester dendrimers as drug delivery carriers. *Macromolecules* **46**, 37–42 (2013).
211. Zibarov, A. *et al.* AB₅ derivatives of cyclotriphosphazene for the synthesis of dendrons and their applications. *Molecules* **26**, 4017 (2021).
212. Caminade, A.-M. *et al.* Phosphorus dendrimers: from synthesis to applications. *C. R. Chimie* **6**, 791–801 (2003).
213. Badetti, E. *et al.* Synthesis and structural characterization of a dendrimer model compound based on a cyclotriphosphazene core with tempo radicals as substituents. *Org. Lett.* **15**, 3490–3493 (2013).
214. Wang, L. *et al.* Cyclotriphosphazene core-based dendrimers for biomedical applications: an update on recent advances. *J. Mater. Chem. B* **6**, 884–895 (2018).
215. Caminade, A.-M. *et al.* The specific functionalization of cyclotriphosphazene for the synthesis of smart dendrimers. *Dalton Trans. 2003* **45**, 1810–1822 (2016).
216. Tran, M. L. *et al.* Phosphorus dendrimers for metal-free ligation: design of multivalent pharmacological chaperones against Gaucher disease. *Chem. Eur. J.* e202301210 (2023)

BIBLIOGRAPHIE

217. Tran, N. M. L. Inhibiteurs et chaperons pharmacologiques contre la maladie de Gaucher : d'une approche homomultivalente à hétéromultivalente. Thèse de doctorat, Toulouse (2019).
218. Stauffert, F. Conception et synthèse d'iminosucres di- à tétravalents comme sondes mécanistiques et agents thérapeutiques potentiels. Thèse de doctorat, Strasbourg (2015).
219. Decroocq, C. *et al.* The multivalent effect in glycosidase inhibition: probing the influence of valency, peripheral ligand structure, and topology with cyclodextrin-based iminosugar click clusters. *ChemBioChem* **14**, 2038–2049 (2013).
220. Zeng, D. *et al.* The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **54**, 829–832 (2013).
221. Xu, J. *et al.* Cytocompatible poly(ethylene glycol)-co-polycarbonate hydrogels crosslinked by copper-free, strain-promoted “click” chemistry. *Chem. Asian J.* **6**, 2730–2737 (2011).
222. Svatunek, D. *et al.* Chemoselectivity of tertiary azides in strain-promoted alkyne-azide cycloadditions. *Chem. Weinh.* **25**, 754–758 (2019).
223. Blomquist, A. T. *et al.* Many-membered carbon rings. VII. cyclooctyne. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2153–2154 (1953).
224. Dommerholt, J. *et al.* Strain-promoted 1,3-dipolar cycloaddition of cycloalkynes and organic Azides. *Top. Curr. Chem.* **374**, 16 (2016).
225. Ning, X. *et al.* Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2253–2255 (2008).
226. Debets, M. F. *et al.* Azide: a unique dipole for metal-free bioorthogonal ligations. *ChemBioChem.* **11**, 1168–1184 (2010).
227. Debets, M. F. *et al.* Aza-dibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem. Commun.* **46**, 97–99 (2010).
228. Campbell-Verduyn, L. S. *et al.* Strain-promoted copper-free ‘click’ chemistry for ¹⁸F radiolabeling of bombesin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11117–11120 (2011).
229. Hoyle, C. E. *et al.* Thiol-ene click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1540–1573 (2010).
230. Scanlan, E. M. *et al.* A. Synthetic applications of intramolecular thiol-ene “click” reactions. *Molecules* **19**, 19137–19151 (2014).
231. Keddie, D. J. *et al.* Amphiphilic silicone architectures via anaerobic thiol-ene chemistry. *Org. Lett.* **13**, 6006–6009 (2011).
232. Nolan, M. D. *et al.* Applications of thiol-ene chemistry for peptide science. *Front. Chem.* **8**, 583272 (2020).
233. Zhang, Z., *et al.* Facile and efficient synthesis of carbosiloxane dendrimers via orthogonal click chemistry between thiol and ene. *Macromol. Rapid Commun.* **37**, 318–322 (2016).
234. Summonte, S. *et al.* Thiolated polymeric hydrogels for biomedical application: cross-linking mechanisms. *J. Controlled Release* **330**, 470–482 (2021).

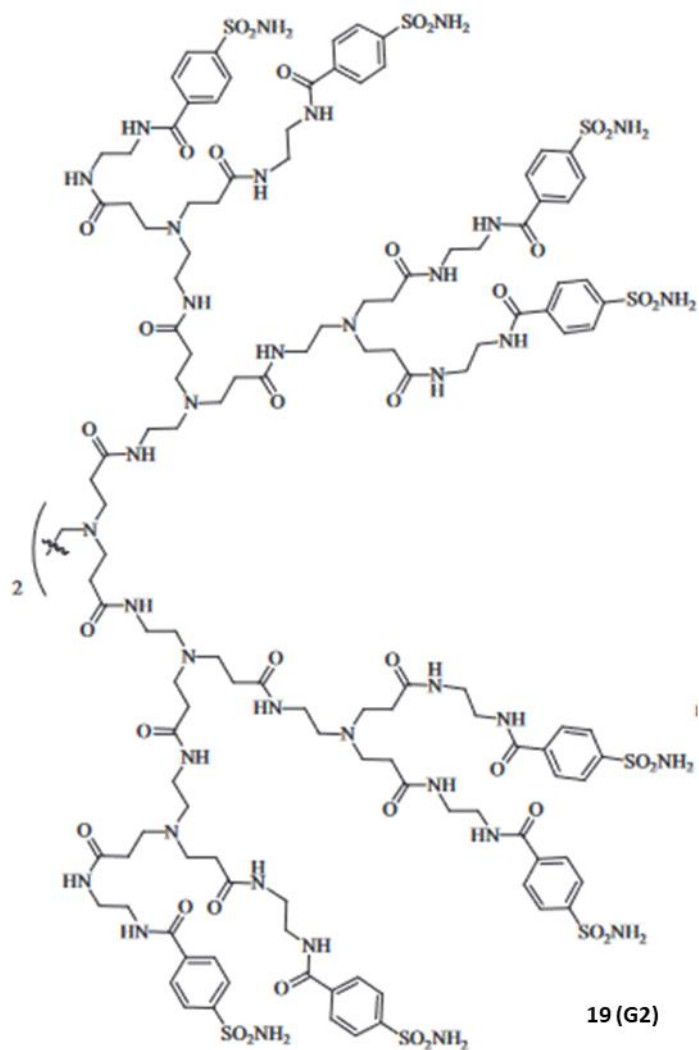
BIBLIOGRAPHIE

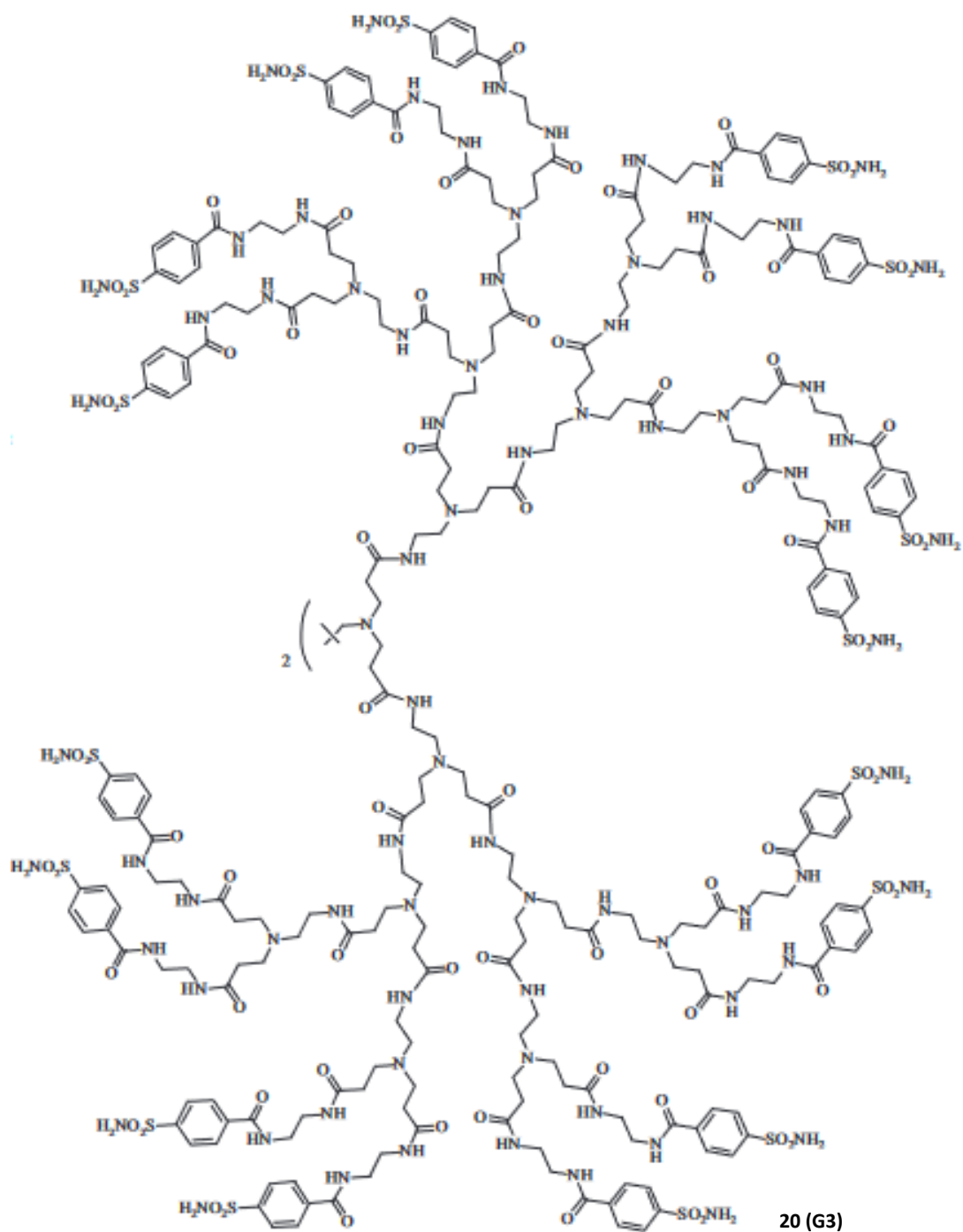
235. Krizhanovskiy, I. *et al.* The use of the thiol-ene addition click reaction in the chemistry of organosilicon compounds: an alternative or a supplement to the classical hydrosilylation? *Polymers* **14**, 3079 (2022).
236. Chan, J. W. *et al.* Sequential phosphine-catalyzed, nucleophilic thiol-ene/radical-mediated thiol-yne reactions and the facile orthogonal synthesis of polyfunctional materials. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5751–5753 (2009).
237. Sim, L. *et al.* Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *J. Mol. Biol.* **375**, 782–792 (2008).
238. Pyner, A. *et al.* Inhibition of human and rat sucrase and maltase activities to assess antiglycemic potential: optimization of the assay using acarbose and polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 8643–8651 (2017).
239. Kulkarni, A. A. *et al.* α -Amylase inhibitory secondary metabolites from *artemisia pallens* wall ex dc—biochemical and docking studies. *Biol. Life Sci. Forum* **11**, 73 (2021).
240. Timalsina, D., *et al.* α -Amylase inhibitory activity of *catunaregam spinosa*: *in vitro* and *in silico* studies. *BioMed Res. Int.* **2021**, e4133876 (2021).
241. Yilmazer-Musa, M. *et al.* Inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity by tea and grape seed extracts and their constituent catechins. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8924–8929 (2012).
242. Thermal Shift Assay Services | Reaction Biology.
<https://www.reactionbiology.com/services/biophysical-assays/thermal-shift-assay-tsa>. (consulté en août 2023)
243. Li, H. *et al.* Carbohydrate based hyper-crosslinked organic polymers with –OH functional groups for CO₂ separation. *J. Mater. Chem. A* **3**, 20913–20918 (2015).
244. Shi, Y.-H. *et al.* SrCl₂ as an efficient cocatalyst for acidic hydrolysis of methyl glycosides. *Chin. Chem. Lett.* **25**, 561–566 (2014).
245. Koppolu, S. R. *et al.* Gold-catalysed glycosylation reaction using an easily accessible leaving group. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 5094–5097 (2015).
246. Speers, A. E. *et al.* Activity-based protein profiling *in vivo* using a copper(i)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4686–4687 (2003).
247. Collman, J. P. *et al.* “Clicking” functionality onto electrode surfaces. *Langmuir* **20**, 1051–1053 (2004).
248. Fernandez-Megia, E. *et al.* A Click Approach to Unprotected Glycodendrimers. *Macromolecules* **39**, 2113–2120 (2006).
249. Wolf, N. *et al.* High-Yielding Water-Soluble Asymmetric Cyanine Dyes for Labeling Applications. *J. Org. Chem.* **85**, 9751–9760 (2020).
250. Yang, J. *et al.* Synthesis of novel highly water-soluble 2:1 cyclodextrin/fullerene conjugates involving the secondary rim of β -cyclodextrin. *Tetrahedron* **60**, 12163–12168 (2004).
251. Wu, C. *et al.* Asymmetric intermolecular heck reaction of aryl halides. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 650–652 (2014).

BIBLIOGRAPHIE

252. Ramishetti, S. *et al.* A Combinatorial library of lipid nanoparticles for rna delivery to leukocytes. *Adv. Mater.* **32**, 1906128 (2020).
253. Yamamoto, A. *et al.* Bongkreic acid analogue, lacking one of the carboxylic groups of its parent compound, shows moderate but pH-insensitive inhibitory effects on the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Chem. Biol. Drug Des.* **86**, 1304–1322 (2015).

ANNEXES





Annexe 1 : Structure chimique des composés 19 (G2) et 20 (G3)

ANNEXES

Job Title	2QLY_1(Chain A Maltase-glucoamylase, intestinal Homo
RID	BFMUB85P114 Search expires on 07-20 20:12 pm Download All
Program	Blast 2 sequences Citation
Query ID	lclQuery_17487 (amino acid)
Query Descr	2QLY_1(Chain A Maltase-glucoamylase, intestinal Homo s: ...
Query Length	870
Subject ID	lclQuery_17489 (amino acid)
Subject Descr	5NN3_1(Chain A Lysosomal alpha-glucosidase Homo sapi ...
Subject Length	872
Other reports	Multiple alignment MSA viewer

Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
722	722	98%	0.0	44.22%	872	Query_17489

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
722 bits(1864)	0.0	Compositional matrix adjust.	390/882(44%)	521/882(59%)	42/882(4%)
Query 12	RINCIPDQPPTKATCDQRGCCWNP----	QGA-VSPWCYYSKNH-SYHVEGNLWNTNAG	64		
Sbjct 9	R+C PD+ T+ C+ RGCC+ P QGA+ PNC++ ++ SY+E NL++ G				
Query 65	FTARLKNLSSPVFGSNVDNLLTAEQYTSNRHFHKLTDQTNRFVEPHVQSFSGNAA		124		
Sbjct 68	YATLTRLTRTP-FFPKDILTLRLDVMETENRHLFTIKDPANRRYVEPLETPRVHS--RA				
Query 125	ASLTQVEISRQPFISKVTRRSNNRVLFDSSIGPLLFADQFLQLSTRLPSYVNGVGLGEHV		184		
Sbjct 125	PSPLYSVEFSEEPFVIVHRQLDGRVLLNTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHL				
Query 185	HQYRHMNKTWPIFNRDTPNGNGTNYLGAQTFFLCLEDASGLSFGVFLMNSNAMEVV		244		
Sbjct 185	-SPLMLSTNTRITLWNRDLAPT-PGANLYGSHPFYLALEDG-GSAHGVLFLNSNAMVV				
Query 245	LQPAPAITYRTIGGILDFYVFLGNTPEQVQVYELIGRPAIPALYALGFLSRVEYGT		304		
Sbjct 242	LQP+PA+++R+ GGILD Y+FLG P+ VVQ+Y+L++G P +P YW LGFLH R+ Y +				
Query 305	DNMREVERNRAAQLPYDVQHADIDYMDERRDF TYDSVDFKGFPEFVNLHNGQKLVII		364		
Sbjct 302	AITRQVVENMTRAHFPLDVQWDLQYMSRRDFTFNKDGRDFPAMVYVGLGFLCRMGYSST				
Query 365	VDPAISNNSSSSKPYGPDYRGSMDKIWNSSDGVTPILIGEVWPGQVTFPDYTNPCAVW		424		
Sbjct 362	VDPAIS +S + Y PYD G +++ + G PLIG+VWPG T FPD+TNP WW				
Query 425	TKEFELFHNQVEFDGIWDMNEVSNFVDSVSGCSTNNLNNPPFTPRILDGFLFCKTLCM		484		
Sbjct 420	EDMVAEFHDQVFPDGMWDMNEPSNFIKRGSEDCPNNELENPPYVGVGGTLQQAATICA				
Query 485	DAVQHWGKQYDIHNLVGYSMAVATAEAAKTVFPNKRSFILTRSTFAGSGKFAHHLGDNT		544		
Sbjct 480	SSHQFLSTHYNLHNLVGLTEAIAASHRALVKAR-GTRPFVISRSTFAGHRYAGHWGDVW				
Query 545	ATNDLRLMSIPGVLEFNLFGIPMVGPDICGFALDTPPEELCRRWMLGAFYFYSRNHNGQG		604		
Sbjct 539	SSNEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTLQAGFYFMRNHSLL				
Query 605	YKDDPASFGADSLNLSRHYLNIRYTLPLYLTLFRAHSRGDTVARPLLHEFYEDNS		664		
Sbjct 599	SLPQEPYFSEPA--QQAMRKALTRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLFPKDS				
Query 665	TWDVHQFLWGPGLLITPVLDEGAEKVMYVPAVWYDYET-----GS-----		707		
Sbjct 657	TWVQLWG LLITPVL G +V Y P WYD +T				
Query 708	QVRWRKQVEMELPGDKIGLHLRGGYIFPTQPNTTTLASRKNPLGLIILDENKEAKGE		767		
Sbjct 717	AIHSEGWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQPMALAVALTKGGEARGE				
Query 768	LFNDDGETKDTVANKVYLLCEFSVTQNRLEVNISQSTYKDPNNLAFNEIKILGTEEPSNV		827		
Sbjct 777	LFNDDGESLEVLERGAYTQVIF-LARNNTIVNELVRVTSSEGAGLQKQVTLGVATAPQ-				
Query 828	TVKHNGVPSQTSPTVTYDSNLKVAIITDIDLLGEAYTVEWA 869				
Sbjct 835	QVLSNGVPVS---NFTYSPDKVLDIC-VSLMLMGEQLVSWC 872				

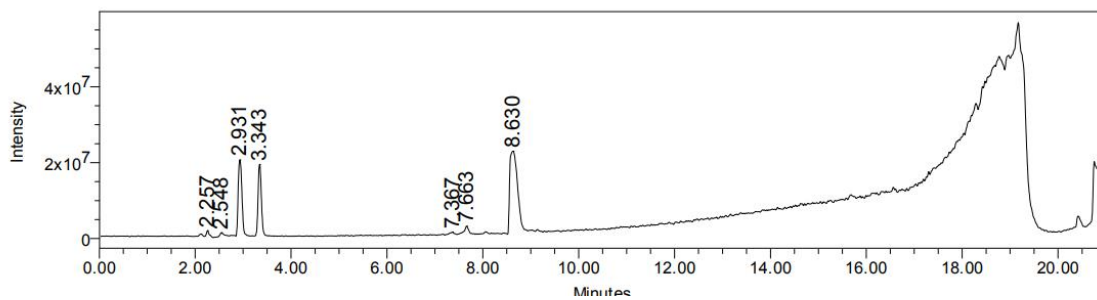
Annexe 2 : Homologie structurale entre le GAA (PDB : 5NN3) et MGAM (PDB : 2QLY) extrait du logiciel BLAST®

ANNEXES

SampleName MBG146-H2O
Injection Volume 10.00 uL

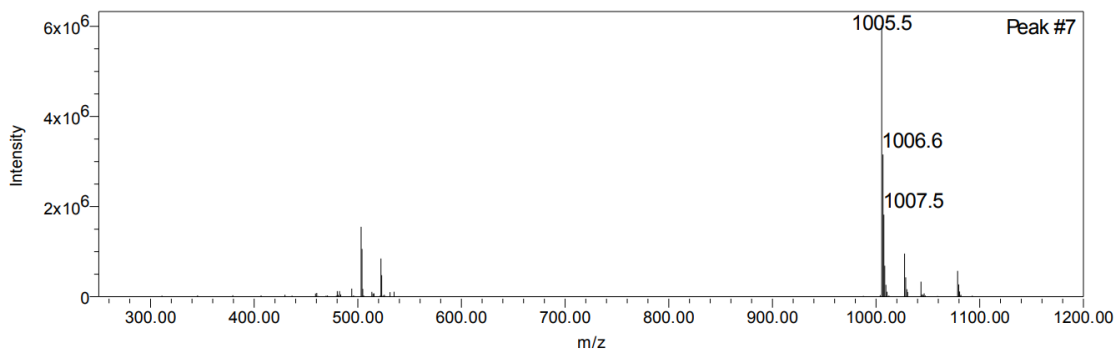
Eluant : H2O+0.1%HCOOH/CH3OH+0.1%HCOOH
Debit 0.8

Vial 1:A,3
Date Acquired 4/29/2021 11:03:00 AM CET
Acq Method Set Generic SQD CH3OH HCOOH1
Processing Method MS TIC pos
Channel SQ 1: MS Scan



SampleName: MBG146-H2O Date Acquired: 4/29/2021 11:03:00 AM CET Retention Time 7.663

Match Plot



SampleName: MBG146-H2O Date Acquired: 4/29/2021 11:03:00 AM CET Retention Time 8.630

