



HAL
open science

Synthèse de nouveaux iminosucres et évaluation comme inhibiteurs et sondes sélectives des α -glucosidases

Thibault Rancon

► **To cite this version:**

Thibault Rancon. Synthèse de nouveaux iminosucres et évaluation comme inhibiteurs et sondes sélectives des α -glucosidases. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV095 . tel-04626955

HAL Id: tel-04626955

<https://theses.hal.science/tel-04626955v1>

Submitted on 27 Jun 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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie organique

Unité de recherche : Département de Chimie Moléculaire

Synthèse de nouveaux iminosucres et évaluation comme inhibiteurs et sondes sélectives des α -glucosidases

Synthesis of novel iminosugars and evaluation as inhibitors and selective probes for α -glucosidases

Présentée par :

Thibault RANCON

Direction de thèse :

Sandrine PY
DIRECTRICE DE RECHERCHE CNRS,
Université Grenoble Alpes
Aurélié BOUCHET-SPINELLI
MAITRE DE CONFERENCES,
Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Co-encadrante de
thèse

Rapporteurs :

Emmanuelle TREVISIOL
DIRECTRICE DE RECHERCHE CNRS, INSA
Sébastien GOUIN
DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS, Nantes-Universités

Thèse soutenue publiquement le 20 décembre 2022, devant le jury composé de :

Sandrine PY DIRECTRICE DE RECHERCHE CNRS, Université Grenoble Alpes	Directrice de thèse
Sylvain COTTAZ PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes	Président du jury
Jean-Bernard BEHR PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université de Reims Champagne-Ardennes	Examineur
Gwladys POURCEAU MAITRE DE CONFÉRENCES, Université de Picardie Jules Vernes	Examinatrice
Emmanuelle TREVISIOL DIRECTRICE DE RECHERCHE CNRS, INSA	Rapporteur
Sébastien GOUIN DIRECTEUR DE RECHERCHE CNRS, Nantes-Universités	Rapporteur

Invités :

Aurélié BOUCHET-SPINELLI
MAITRE DE CONFÉRENCES,
Université Grenoble Alpes



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, le Dr Emmanuelle Trévisiol, et le Dr Sébastien Gouin d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie également pour leur participation à ce jury le Pr Sylvain Cottaz, le Dr Gwladys Pourceau, et enfin le Pr Jean-Bernard Behr qui a également collaboré à l'obtention de résultats exposés dans ce manuscrit.

J'aimerais remercier le Dr Sandrine Py et le Dr Aurélie Bouchet-Spinelli, mes deux encadrantes également membres de ce jury de thèse, pour m'avoir apporté leur aide et leurs conseils tout au long de ces 3 années. Je conserverai une affection toute particulière pour Sandrine, ma « maman » de chimie, pour son implication dans ma formation depuis déjà 4 ans (le temps passe vite quand on s'amuse, non ?), alors que je n'étais encore qu'étudiant en master. Malgré les quelques difficultés rencontrées au cours de cet exercice de rédaction, peut-être un peu plus complexe que prévu, j'ai apprécié nos échanges et regretterai nos efficaces « points café ». J'ai également apprécié les échanges décomplexés et les (parfois cocasses) anecdotes sur l'enseignement que j'ai pu partager avec Aurélie...d'autant plus nécessaires pour gérer la frustration engendrée par la SPR !

Je remercie également les membres de mon comité de suivi individuel, le Dr Nicole Thielens, le Dr David Goyard et le Dr Nicolas Leconte pour leur écoute en toutes occasions, et pour les nombreuses suggestions qu'ils ont faites lors de nos réunions annuelles. De même, je souhaite remercier chaleureusement les membres du jury de sélection du Labex Arcane pour leur bienveillance : Dr Carole Duboc, Dr Olivier Sénèque, Dr Guillaume Nonglaton, Dr Didier Gasparutto, Dr Anna Szarpak et Dr Marine Peuchmaur.

Je remercie le Pr Stephen Withers pour m'avoir très chaleureusement accueilli pendant 3 mois, au sein de son groupe de recherche à l'Université de Colombie-Britannique (et pour la petite « soirée de Noël » !). De même, je remercie Mr Seyed Amirhossein Nasserri pour m'avoir patiemment accueilli et guidé pendant ce séjour, pour sa curiosité, et enfin pour ses talents exceptionnels de metteur en scène/concepteur de comédies musicales. Je conserve d'excellents souvenirs de cette expérience et des personnes que j'ai rencontré à cette occasion (Charlotte, Jane, Alberto, Karina...). Je remercie également l'organisme MITACS pour avoir financé et rendu possible cette expérience. Ces souvenirs canadiens en appelant d'autres, je remercie chaleureusement le Pr Andreea R. Schmitzer qui m'a accueilli dans son équipe en 2018, et dont je retiendrai les très grandes qualités humaines.

Bien entendu, je souhaite remercier l'ensemble des membres des plateaux de l'ICMG et plus particulièrement les personnels des plateaux RMN (Mr Romain Sanahugues), PSM (Mme Laure Fort, Mr Rodolphe Gueret, Mme Amélie Durand), et PSB (Dr Rémy Lartia) pour leur contribution aux résultats présentés dans ce manuscrit. Je remercie également Mme Nathalie Camerino, Mme Sarah Mauduit et Mme Agnieszka Janowska pour leur accompagnement.

J'aimerais également remercier le Dr Pascale Delangle, directrice du SyMMES, et le Dr Didier Boturyn, directeur du DCM. De même, je tiens à remercier le Pr Jean-François Poisson et le Dr Yanxia Hou-Broutin, qui dirigent respectivement les équipes SeRCO et CREAB au sein desquelles j'ai mené mes travaux pendant ces 3 années.

Je tiens à remercier le Dr Luc Choisnard, ainsi que le Dr Angeline Van Der Heyden pour avoir tous deux dédié une partie de leur temps au suivi de mes travaux, et de m'avoir fait bénéficier de leurs expertises respectives à plusieurs reprises. Cela m'aura beaucoup apporté, merci !

Je remercie l'ensemble des membres (actuels ou passés) de l'équipe SeRCO : Yannick, Véronique, Renaud, Naoual, Pierre-Yves, Mathieu, Adrien, Alice, Anaïs, Salia, Éloïse (la « belle gosse lunettes de soleil » !), Émilie, Mladena, Gabriel, Anestis, Sébastien, Frédéric, Bernard, Pierre-Marc, Kévin, Pascale, Andrew, Florian, Benjamin, Isabelle, Chukuka, Rayhane Tuyen, Gaëtan, Abdelkarim et Funmi. Je remercie particulièrement Martine Fayolle pour la synthèse de la nitrone (dans ce manuscrit, ce sera la nitrone **3**, qu'on se le dise), et pour l'aide qu'elle m'a toujours apportée au laboratoire. Une petite mention spéciale à mon stagiaire Roman Griffet, pour son sérieux et sa bonne humeur à toute épreuve. Et oui oui, il en manque un ou deux, mais votre tour arrive !

De même, j'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe CREAB : Martial, Yoann, Élodie, Loïc, Didier, Pierre-Henri, José, Christine, Larry, Oleksii, Jonathan, Nicolas, Pau, Charlène, Stéphane, Marielle, Marion, Mathilde et Élise. Un grand merci à Raphaël Mathey et Arnaud Buhot pour leurs précieux conseils relatifs à l'acquisition et l'exploitation des résultats en SPRi.

Je remercie mes amis pour leur soutien : Juju, Coq, Dédé, Baptou, Justine...et tous les autres. Merci d'avoir été là, disponibles pour me changer les idées dans les moments les plus délicats, pour une petite partie de Cryptide, de Splendor, pour les week-ends à l'improviste, merci pour votre humour, votre auto-dérision, et parfois aussi votre patience.

Un petit mot également pour quelques personnes avec qui j'ai pu entretenir une forte proximité au cours de ces 3 années au labo. J'ai une pensée toute particulière pour **Mr** (et oui, ça ne partira sans doute jamais complètement) Frédéric Minassian, pour son accompagnement constant depuis la L3...et je ne parle pas de nos allées et venues au Martin's café ! Bien sûr cette thèse aurait également eu une saveur très différente sans la présence des « 3 chipies » du SeRCO : Laura (Loloche) Marchand, Sparta (Spartatouille) Saliba, et Valentine (Pépé !) Perraudin, toujours là pour dédramatiser les situations par des petites piques bien choisies. Enfin, dans cette « équipe des jeunes », et bien qu'ils aient accompli leur propre doctorat au sein d'une équipe dissidente, je remercie mes anciens camarades de promotion, Zakaria Ziani et Elarbi Chatir (la team Simpson). J'ai enfin une pensée pour Mr Benjamin Darses (Adibou), dont je retiendrai nos expéditions du week-end aux serres de Grenoble, et le repérage assidu des jardins et arboretums d'à peu près toute la région Rhône-Alpes.

Bien qu'ils soient intervenus dans ma formation bien avant le début de cette thèse, je remercie Mr Frédéric Bonhomme et Mr Francis Stumbauer. On en a très peu des enseignants qui animent des débats au réfectoire de l'internat, qui réservent un amphithéâtre pour nous montrer leurs westerns préférés, qui annulent des cours de maths pour nous faire visionner « Le Nom de la rose » ou « Jeanne d'arc », ou encore qui marquent chaque départ en vacances en apportant des viennoiseries... Mais ceux-là, impossible de les oublier ! Même si il m'est difficile de mettre des mots précis sur tout ce que vous m'avez apporté, je vous remercie pour votre temps et votre accompagnement.

Enfin je souhaite remercier ma famille, et plus particulièrement mes parents pour m'avoir énormément soutenu et encouragé, dans des moments « pas toujours faciles ». Je remercie également mes grands-parents, et plus particulièrement ma grand-mère, pour son optimisme, ses parties de cartes (et les petits goûters). Pour finir, je remercie mes frères et sœurs : Quentin, Léa et Clémence, merci d'être toujours là, dans les hauts comme dans les bas !

Table des matières

Introduction Générale.....	1
Chapitre I : Introduction et présentation des objectifs.....	3
I. Les glycosidases.....	3
I.1. Nomenclature et classifications des glycosidases	5
I.2. Mécanismes d'action.....	7
II. Les iminosucres	9
II.1. Les iminosucres, inhibiteurs de glycosidases	9
II.2. Travaux précédents de l'équipe	13
III. Les iminosucres, des sondes de glycosidases ?.....	20
III.1. Les sondes de glycosidases	20
III.2. Présentation des objectifs de cette thèse.....	26
Chapitre II : Synthèse de sondes basées sur des iminosucres de type pipéridine.....	31
I. Synthèse de sondes basées sur des dérivés <i>N</i> -alkylés de la DNJ	31
I.1. Synthèse du noyau déoxynojirimycine	31
I.2. Synthèse des bras espaceurs et conjugaison par cycloaddition de Huisgen.....	32
II. Synthèse de sondes basées sur des pipéridines comportant un centre quaternaire en α de l'azote.....	41
II.1. Revue bibliographique sur l'alcynylation de nitrones	41
II.2. Alcynylation diastéréosélective de la cétonitronne 3 par le TMS acétylène	49
II.3. Préparation de sondes de type 2	52
III. Résumé du chapitre	58
Chapitre III : Synthèse d'indolizidines fonctionnalisées par cycloisomérisation d'énynes-1,6....	59
I. Introduction bibliographique : métathèse cyclisante et cycloisomérisation d'énynes-1,6.....	59
I.1. La métathèse d'oléfines – Histoire et rappels	59
I.2. Métathèse d'oléfines cyclisante et synthèse d'iminosucres	61
I.3. Les cycloisomérisations et la métathèse ène-yne cyclisante	64
II. Synthèse d'énynes-1,6 et étude des réactions de cycloisomérisation	70
II.1. Synthèse de l'ényne 26 et cycloisomérisation (1 ^{ère} approche).....	70

II.2 Synthèse de l'ényne 133 et cycloisomérisation (2 ^{ème} approche).....	74
III. Fonctionnalisation de l'indolizidine diène 25	77
III.1. Métathèse croisée d'oléfines	77
II.2. Ozonolyse	79
III.3. Hydroboration-oxydation	80
IV. Elaboration de sondes de type 3 à partir de l'alcool 157	84
IV.1. 1 ^{ère} Approche : conjugaison du noyau indolizidine à un bras espaceur par substitution nucléophile	84
IV.2. 2 ^{ème} Approche : conjugaison du noyau indolizidine avec un bras espaceur comportant une fonction acide carboxylique	88
IV.3. 3 ^{ème} approche : conjugaison du noyau indolizidine à un bras espaceur comportant un azoture organique <i>via</i> une cycloaddition de Huisgen.....	92
V. Résumé du chapitre	96
Chapitre IV : Etude d'interactions iminosucres-glycosidases par SPRi	97
I. La résonance plasmonique de surface (SPR) : une technique utile pour la détection de glycosidases ?.....	98
I.1. Principe physique de la SPR et présentation de la méthode de détection	98
I.2. La SPR(i) appliquée à l'étude des interactions biomoléculaires impliquant des glycosidases	104
II. Détermination des activités inhibitrices de glycosidases des sondes en solution	107
II.1. Présentation de la méthode	107
II.2. Résultats et choix des cibles biologiques d'étude.....	109
III. Conception de biopuces multiplexées par electrospotting pour la détection de glycosidases par SPRi.....	114
III.1. L'immobilisation de biorécepteurs sur surface d'or par formation de SAMs	114
III.2. Fonctionnalisation de surfaces d'or par électro-copolymérisation du pyrrole et conception de biopuces multiplexées (electrospotting)	116
IV. Etudes d'interactions des sondes dérivées d'iminosucres avec des glycosidases par SPRi.....	120
IV.1. Présentation de l'appareillage de SPRi et des types d'expériences réalisées	120
IV.2. Étude d'interaction avec l' α -glucosidase d' <i>Oryza sativa</i>	122

IV.3. Détermination des constantes de dissociation apparentes des iminosucres avec l' α -glucosidase de riz.....	129
IV.4. Étude d'interactions avec la β -glucosidase d' <i>Aspergillus niger</i>	135
V. Résumé du chapitre	139
Conclusion et perspectives	141
Partie Expérimentale	147
Experimental part for chapters 2 and 3.....	147
Material and Instrumentation	147
Synthesis.....	148
Experimental part for chapter 4.....	189
Material and Instrumentation	189
Inhibition of commercial glycosidases.....	189
Preparation of SPRi biochips by electrospotting.....	190
SPRi Kinetic Experiment for the Detection of enzymes	191
Références bibliographiques.....	193
Annexes	201
Annexe 1 : Analyse par diffraction des rayons X de l'hydroxylamine 93	201
Annexe 2 : Acquisition de données et traitements des signaux.....	202

Abréviations et Acronymes

A	Absorbance
A.	<i>Aspergillus</i>
ABPP	Activity-based proteomic probes
Ac	Acétyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
aq.	Aqueux
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane
Bn	Benzyle
Bz	Benzoyle
CAST	Castanospermine
Cat.	Quantité catalytique
CAZy	Carbohydrate-active enzymes
Cbz	Carboxybenzyle
CCD	Charge coupled device
CCM	Chromatographie sur couche mince
COSY	Correlation spectroscopy
CuAAC	Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
Cy	Cyclohexyle
DCE	1,2-Dichloroéthane
DCM	Dichloromethane
DCVC	Dry Column Vacuum Chromatography
DEPTQ	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer including the detection of Quaternary nuclei
ΔR	Variation de réflectivité
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMS	Sulfure de diméthyle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNJ	1-Déoxynojirymicine
E	Enzyme

E. C.	Enzyme commission
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Eq.	Équivalent(s)
ESI	Electrospray ionization
Et	Éthyle
ET [‡]	État de transition
GAA	α -Glucosidase acide
GBA	β -Glucocérébrosidase acide
GH	Glycoside hydrolase
GI	Catalyseur de Grubbs de première génération
GII	Catalyseur de Grubbs de seconde génération
h	Heure(s)
HGI	Catalyseur de Hoveyda-Grubbs de première génération
HGII	Catalyseur de Hoveyda-Grubbs de seconde génération
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMDS	Hexaméthylsilazane
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High-resolution mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear single bond correlation
I	Inhibiteur
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
<i>i</i> -Pr	Isopropyle
IR	Infrarouge
ITC	Isothermal titration calorimetry
IUBMB	International union of biochemistry and molecular biology
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
j	Jours
K_D	Constante de dissociation
K_{Dapp}	Constante de dissociation apparente
K_i	Constante d'inhibition
L	Ligand

LC	Liquid chromatography
LOD	Limit of detection
min	Minutes
Mol%	Pourcentage molaire
Ms	Méthanesulfonyle
MS	Mass spectrometry
<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -Butyle
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NHC	<i>N</i> -Heterocyclic carbene
NJ	Nojirimycine
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
P	Produit
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylèneglycol
Ph	Phényle
Pr	Propyle
R	Récepteur
RCM	Ring-closing metathesis
RCEYM	Ring-closing ene-yne metathesis
r.d.	Ratio diastéréoisomérique
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RX	Rayon X
S	Substrat
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SAM	Self-assembled monolayer
SC	Catalyseur de Schrock
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SeRCO	Synthèse et réactivité en chimie organique
SN	Substitution nucléophile

SPR(i)	Surface plasmon resonance (imaging)
t	Temps
T	Température
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyle
t.a.	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétra- <i>n</i> -butyl ammonium
TBAB	bromure de tétra- <i>n</i> -butyl ammonium
TBS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Triméthylsilyle
Ts	Tosyle
v	Vitesse de réaction

Introduction Générale

Les glycoside hydrolases, ou glycosidases, sont des enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons osidiques. Ces enzymes sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la digestion des oligo- et polysaccharides ou encore la dégradation de la biomasse. Elles jouent aussi un rôle prépondérant dans la reconnaissance cellulaire, au cours des processus d'infection ou d'invasion métastatique. Ces fonctions diverses font des glycosidases des cibles biologiques importantes, susceptibles d'être exploitées pour développer de nouvelles thérapies, mais aussi des catalyseurs biologiques valorisables dans diverses applications industrielles.

Les glycosidases étant quasiment ubiquitaires, il existe une très grande diversité de structures protéiques et de fonctions associées à ces enzymes. Aujourd'hui, grâce à l'analyse génomique, plus de 1 170 000 glycosidases ont été identifiées et répertoriées au sein de 173 familles dans la base de données CAZy, sur la base de leur séquence d'acides aminés. Cependant, seule une infime proportion de ces glycosidases possède une fonction identifiée, et plus faible encore est la proportion d'enzymes dont la structure protéique a été caractérisée. Il existe ainsi un important déséquilibre entre le potentiel que représentent les glycosidases et l'état actuel des connaissances dont dispose la communauté scientifique pour exploiter pleinement ce potentiel.

Afin de comprendre les modes d'action des glycosidases et d'identifier ces enzymes *in vitro* ou *in vivo*, plusieurs types de sondes ont été conçus dans les dernières décennies. Ces sondes sont d'ordinaire des molécules comportant une structure glycomimétique en tant qu'élément de reconnaissance et interagissant avec les glycosidases. En général, elles révèlent la présence de glycosidases dans un milieu en réagissant avec elles pour former des entités détectables par colorimétrie ou fluorimétrie. Si certaines sondes ont permis de caractériser la fonction de glycosidases jusqu'alors inconnues, elles présentent souvent l'inconvénient de les dénaturer, ce qui est un frein à leur caractérisation structurale.

La conception d'un nouveau type de sondes qui permettrait de détecter et d'isoler des glycosidases sans dénaturation de ces dernières a été l'objectif de recherche de cette thèse. Nous avons choisi de concevoir ces sondes en exploitant comme éléments de reconnaissance les iminosucres, une famille de molécules s'associant de façon forte et réversible au site catalytique des glycosidases, mais inertes vis-à-vis de ces enzymes (non métabolisées). Ainsi, cette thèse présente, à travers quatre chapitres, la synthèse de sondes dérivées d'iminosucres, puis la conception de biopuces à partir de ces sondes et les premiers éléments de mise au point d'une méthode de détection d' α -glucosidases par résonance plasmonique de surface (SPR).

Introduction générale

Un premier chapitre présente d'une part la diversité des enzymes de type glycosidases, leurs classifications et leurs modes d'action, puis introduit une famille importante d'inhibiteurs de ces enzymes : les iminosucres. Ces molécules de structure glycomimétique ont été largement exploitées pour moduler l'activité de glycosidases spécifiques. Elles sont ici considérées comme de potentiels éléments de reconnaissance pour la conception de sondes en vue de l'étude fonctionnelle et structurale de glycosidases. Après avoir résumé quelques résultats de notre équipe concernant l'identification d'une famille d'iminosucres sélectifs d' α -glucosidases, nous aborderons les objectifs de cette thèse et décrirons l'approche envisagée pour les atteindre.

Le second chapitre détaille la synthèse de deux types de sondes de glycosidases comportant un noyau de type pipéridine polyhydroxylée en tant qu'élément de reconnaissance. Les premières, conçues pour reconnaître les α - et les β -glucosidases, ont été préparées par conjugaison d'un bras espaceur à un iminosucre de référence, la 1-déoxynojirimycine (DNJ), *via* une cycloaddition de Huisgen. Le deuxième type de sondes décrites dans ce chapitre comporte un noyau pipéridine de configuration D-*gluco* et un centre quaternaire en α de l'atome d'azote, devant permettre une reconnaissance sélective des α -glucosidases. La stratégie de synthèse de ce deuxième type de sondes impliquant l'alcynylation diastéréosélective d'une cétonitrone endocyclique polyalcoxylée, une revue bibliographique consacrée à l'alcynylation de nitrones précèdera nos résultats dans cette seconde sous-partie.

Le troisième chapitre est consacré à la synthèse d'un dernier type de sondes, basé sur un iminosucre bicyclique de la famille des indolizidines polyhydroxylées. La voie de synthèse reposant sur la mise en œuvre d'une réaction de cycloisomérisation d'ényne-1,6 (ou métathèse cyclisante ène-yne), ce chapitre comporte une partie bibliographique dédiée aux réactions de métathèse et de cycloisomérisation d'énynes. La mise en œuvre de réactions de cycloisomérisation-1,6 sur plusieurs énynes est ensuite décrite, suivie de la fonctionnalisation du noyau bicyclique ainsi obtenu selon diverses stratégies, incluant des réactions de métathèse croisée d'oléfines, d'ozonolyse et d'hydroboration/oxydation.

Le dernier chapitre de cette thèse présentera tout d'abord le concept de biocapteurs et la méthode de détection par SPRi. Puis, après avoir présenté et discuté l'activité inhibitrice de glycosidases et la sélectivité des sondes synthétisées pendant ce travail, la conception des biopuces multiplexées par la méthode d'électro-copolymérisation du pyrrole sera décrite. Enfin, l'utilisation de ces biopuces multiplexées pour la détection d' α -glucosidases de riz et de β -glucosidases d'*Aspergillus Niger* par SPR sera présentée dans une sous-partie dédiée.

Chapitre I : Introduction et présentation des objectifs

I. Les glycosidases

Les glycosidases sont des enzymes que l'on retrouve chez tous les organismes vivants à l'exception de quelques *Archaea* et quelques organismes parasites eukaryotes unicellulaires.¹ Elles peuvent être trouvées dans de nombreux compartiments cellulaires, tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, ou les lysosomes, dans lesquels elles assurent différents rôles en hydrolysant divers substrats poly- ou oligosaccharidiques. La **Figure 1** présente de façon schématique le rôle de telles enzymes à travers l'exemple de la dégradation de glycosphingolipides, qui fait intervenir différentes glycosidases à chaque étape d'hydrolyse, chacune étant spécifique d'un substrat précis.

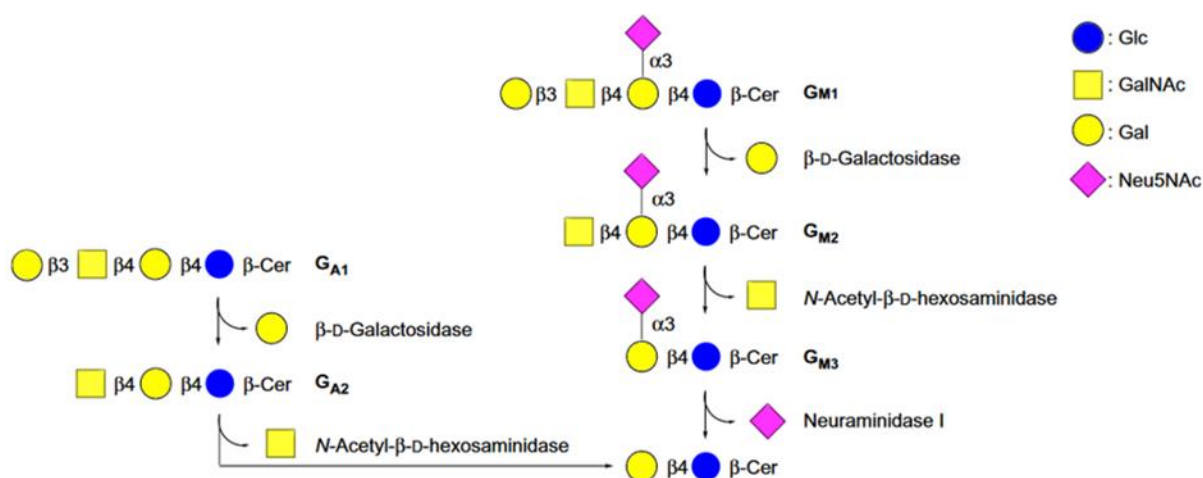


Figure 1 : Dégradation des glycosphingolipides par diverses glycosidases (image de la littérature)²

Étant impliquées dans de nombreux processus biologiques, ces enzymes possèdent des fonctions vitales aussi bien au sein du règne végétal que du règne animal. Chez les végétaux, les glycosidases assurent une fonction essentielle en permettant de libérer l'énergie stockée par la plante sous forme d'amidon. Quatre glycosidases différentes (α -amylase, β -amylase, dextrinase et α -glucosidase) sont par exemple impliquées dans la dégradation de l'amidon présent dans les grains d'orge (*Hordeum vulgare*), et permettent ainsi le bon déroulement du processus germinatif de cette plante.³ Dans le système digestif des animaux, des amylases salivaires et des α -glucosidases intestinales favorisent la dégradation des sucres complexes en oligosaccharides de plus petites tailles ou en monosaccharides (tels le glucose) plus facilement assimilables.

¹ Brás, N. F.; Cerqueira, N. M.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. *Expert Opin. Ther. Patents* **2014**, *24*, 857–874.

² Figure issue de A. E. Stütz, T. M. Wrodnigg in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier, **2016**, 225-302. Reproduite avec la permission de Elsevier, License n°5405850551415, 11 Octobre 2022.

³ Stanley, D.; Rejzek, M.; Naested, H.; Smedley, M.; Otero, S.; Fahy, B.; Thorpe, F.; Nash, R. J.; Harwood, W.; Svensson, B.; Denyer, K.; Field, R. A.; Smith, A. M. *Plant Physiology* **2011**, *155*, 932–943.

Les glycosidases sont également des enzymes essentielles à la maturation des glycoprotéines, en participant à l'élaboration post-traductionnelle de leur partie oligosaccharidique.⁴ Elles jouent aussi un rôle primordial dans la prolifération de pathogènes tels que les virus ou les bactéries. Par exemple dans le cas du virus de la grippe, les particules virales nouvellement répliquées viennent s'ancrer à l'acide sialique qui tapisse la surface des cellules de l'hôte. Ce sont des sialidases (appelées également neuraminidases) exprimées à la surface de ces virions qui vont catalyser l'hydrolyse de l'acide sialique, et participer à la mobilité des particules virales et l'infection de nouvelles cellules.⁵ Chez *Streptococcus pneumoniae*, une bactérie responsable de 1.6 millions de morts par an, une multitude de glycosidases dégrade les glycanes de l'hôte infecté, fournissant ainsi une source de sucres assimilables permettant la prolifération de ce pathogène.⁶

La communauté scientifique a très tôt considéré les glycosidases comme des cibles biologiques de premier plan pour la recherche de nouvelles thérapies, et ces enzymes figurent parmi les premières dont les mécanismes d'action ont été étudiés. Par exemple, des α -glucosidases intestinales étant impliquées dans la dégradation et l'assimilation de polysaccharides complexes par leur hydrolyse en glucose, elles ont été ciblées dans le cadre de traitement du diabète de type II. Dès les années 1990, un inhibiteur de ces enzymes, l'acarbose, a été mis sur le marché sous le nom de Glucobay® par la société Bayer.⁷ Par ailleurs, les sialidases virales étant essentielles à la prolifération du virus de la grippe, des inhibiteurs de ces enzymes ont été développés pour lutter contre cette maladie, l'un des plus connus étant l'Oseltamivir (Tamiflu®, autorisé dès 1999 aux États-Unis, et dès 2002 en Europe).⁵ Dans ces deux exemples, les thérapies proposées reposent sur une inhibition des glycosidases, mais il est aussi possible de tirer avantage de leur activité catalytique. Par exemple, l'équipe de Withers a identifié des glycosidases capables d'hydrolyser les antigènes saccharidiques présents à la surface des globules rouges et a proposé une voie enzymatique pour convertir des cellules sanguines de type A en cellules de type O, ces dernières étant compatibles avec un plus grand nombre de patients lors de transfusions.⁸

Par ailleurs, les propriétés catalytiques des glycosidases ont été valorisées dans le domaine industriel,⁹ notamment dans l'industrie agro-alimentaire.¹⁰ On peut par exemple citer de façon non exhaustive l'utilisation de xylanases (pour la production de pain, de bière, de papier), d'amylases (brassage de la bière) et de pectinases (industrie des jus de fruits).

⁴ Herscovics, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 96–107.

⁵ von Itzstein, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 967–974.

⁶ King, S. J. *Mol. Oral Microbiol.* **2010**, *25*, 15–24.

⁷ Wehmeier, U. F.; Piepersberg, W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 613–625.

⁸ Rahfeld, P.; Sim, L.; Moon, H.; Constantinescu, I.; Morgan-Lang, C.; Hallam, S. J.; Kizhakkedathu, J. N.; Withers, S. G. *Nat Microbiol* **2019**, *4*, 1475–1485.

⁹ Shrivastata, S. *Industrial applications of glycoside hydrolases*, Springer, **2020**.

¹⁰ Sørensen, J. F.; Kragh, K. M.; Sibbesen, O.; Delcour, J.; Goesaert, H.; Svensson, B.; Tahir, T. A.; Brufau, J.; Perez-Vendrell, A. M.; Bellincampi, D.; D'Ovidio, R.; Camardella, L.; Giovane, A.; Bonnin, E.; Juge, N. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2004**, *1696*, 275–287.

L'utilisation de nouvelles enzymes possédant de meilleures propriétés catalytiques, ou compatibles avec des gammes de températures élevées et étant susceptibles de fonctionner malgré la présence d'inhibiteurs endogènes peut présenter un avantage économique indéniable. Pour cette raison, il existe aujourd'hui une activité importante visant à identifier de nouvelles glycosidases plus performantes, ou à modifier les enzymes déjà connues par le biais des biotechnologies afin d'optimiser leur efficacité catalytique dans les applications actuelles. De plus, les glycosidases en tant que biocatalyseurs suscitent un nouvel intérêt lié à la demande énergétique. Les conséquences néfastes liées à l'exploitation d'énergies fossiles ont amené la communauté scientifique à considérer de nouvelles sources d'énergie, et notamment l'utilisation de biocarburants qui seraient issus de la biomasse. Celle-ci étant majoritairement composée de polysaccharides complexes tels que la cellulose, elle n'est pas directement convertible en biocarburants et nécessite au préalable d'être dégradée. Malgré la grande stabilité de la cellulose, certaines glycosidases sont capables de catalyser sa dégradation de façon très efficace,¹¹ et pourraient donc constituer de précieux outils pour la production de biocarburants.^{12,13}

I.1. Nomenclature et classifications des glycosidases

Au fil des années, l'analyse génomique a permis d'identifier un grand nombre de glycosidases au sein de divers organismes, et une nomenclature spécifique a été établie pour en désigner les différentes sous-familles. En fonction de la position de la liaison glycosidique hydrolysée dans la chaîne saccharidique, on discerne les exo-glycosidases des endo-glycosidases. Alors que les exo-glycosidases agissent en extrémité des chaînes oligosaccharidiques et libèrent un monosaccharide (*Schéma 1*), les endo-glycosidases sont susceptibles de reconnaître un fragment glycone composé de plusieurs sucres, et hydrolysent ainsi des liaisons osidiques précises au sein même de la chaîne saccharidique.¹⁴

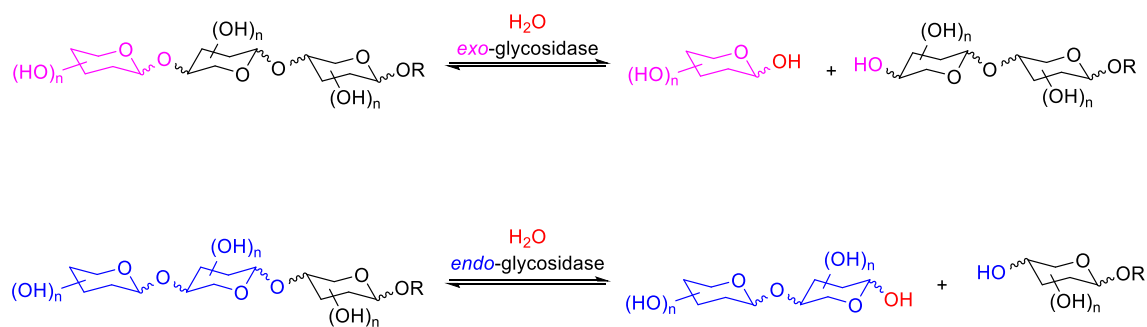


Schéma 1

On distingue également les α -glycosidases et les β -glycosidases, qui hydrolysent respectivement les liaisons osidiques comportant des résidus de configuration anomérique α ou β .

¹¹ Wolfenden, R.; Lu, X.; Young, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814–6815.

¹² Lopezcasado, G.; Urbanowicz, B.; Damasceno, C.; Rose, J. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **2008**, *11*, 329–337.

¹³ Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Pandey, A.; Ganansounou, E. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 1352–1361.

¹⁴ Ernst, B., Hart, G. W., & Sinay, P. *Carbohydrates in chemistry and biology*. Wiley Blackwell, **2000**, Vol 3, 497-511.

Enfin, les glycosidases sont aussi nommées en fonction des substrats dont elles catalysent l'hydrolyse et du monosaccharide qu'elles libèrent.¹⁵ Ainsi une α -amylase est une glycosidase catalysant l'hydrolyse de l'amidon (α -1,4-polyglucoside) en libérant des résidus D-glucosylés, ce qui implique que les amylases appartiennent à la famille des α -glucosidases. D'une façon générale, les glucosidases catalysent l'hydrolyse d'oligosaccharides glucosylés, et libèrent un monosaccharide ou un oligosaccharide comportant un résidu D-glucose à son extrémité réductrice, les mannosidases hydrolysent des substrats mannosylés, etc. Afin de répertorier toutes les glycosidases connues ainsi que leurs propriétés (substrat naturel, structure tridimensionnelle), plusieurs bases de données ont été créées. Au sein de celles-ci, les glycosidases sont classées de différentes façons : en fonction du type de réactions qu'elles catalysent, ou bien de leur séquence d'acides aminés.

Selon la nomenclature de l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), les enzymes sont classées en 6 groupes en fonction de la réaction chimique qu'elles catalysent, puis réparties en plusieurs sous-groupes, et sont différenciées par un numéro E.C. (Enzyme Commission) qui leur est propre.¹⁶ Suivant cette classification, la famille E.C. 3. des hydrolases rassemble les enzymes catalysant des réactions d'hydrolyse. Au sein de ce groupe, on trouve par exemple et de façon non exhaustive, des enzymes agissant sur des fonctions esters (E.C. 3.1.X), sur des liaisons peptidiques (E.C. 3.4.X) et les liaisons glycosidiques (E.C. 3.2.X), ces dernières correspondant aux glycosylases. À nouveau, ce groupe des glycosylases contient plusieurs sous-familles, dont la famille E.C. 3.2.1., qui correspond aux enzymes agissant sur les liaisons *O*- ou *S*-glycosidiques : les glycosidases. À cette nomenclature est associée (entre autres) la base de données Explor-Enzyme,¹⁷ accessible en ligne et contenant notamment : la réaction catalysée par l'enzyme, des publications scientifiques associées à cette enzyme, des liens vers d'autres bases de données...etc. La classification adoptée par l'IUBMB est basée sur la spécificité des substrats (glucoside, mannoside, galactoside...) et parfois sur le mécanisme d'action des glycosidases. Ainsi, cette classification n'est pas pertinente quand une enzyme catalyse plusieurs réactions différentes, et de plus, elle ne prend pas en compte les caractéristiques structurales des différentes enzymes. Par conséquent, des enzymes possédant une structure différente mais catalysant la même réaction vont porter le même numéro E.C. Pour cette raison, B. Henrissat a proposé en 1991 une nouvelle classification des glycosidases basée sur les séquences des acides aminés,¹⁸ laquelle est utilisée pour structurer la base de données CAZy (Carbohydrate-Active enZymes).¹⁹ Cette base de données recense des informations relatives à de nombreuses protéines classées en 5 grandes classes d'enzymes, dont les glycoside hydrolases (glycosidases).

¹⁵ Davies, G.; Henrissat, B. *Structure* **1995**, 3, 853–859.

¹⁶ a) <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb>; b) McDonald, A. G.; Boyce, S.; Tipton, K. F. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, D593–D597.

¹⁷ <https://www.enzyme-database.org/>

¹⁸ Henrissat, B. *Biochem. J.* **1991**, 280, 309–316.

¹⁹ a) <http://www.cazy.org>; b) Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, D490–D495.

En 2013, 159 274 séquences ADN associées à 133 familles de glycosidases avaient été rapportées dans CAZy.^{19b} En septembre 2021, le nombre de séquences ADN pour les glycosidases atteignait 995 295 séquences, répertoriées dans 171 familles, et aujourd'hui environ 1 130 000 séquences sont réparties dans 173 familles de glycosidases, ce qui montre un intérêt réel de la communauté scientifique pour ces enzymes. Cependant, même si de nouvelles glycosidases sont découvertes régulièrement grâce à l'analyse génomique, la majorité des protéines identifiées ne comportent ni fonction, ni structure connue. Par exemple, en septembre 2021 parmi les 995 295 séquences génétiques répertoriées comme glycosidases, seules 0.7% (7248) étaient caractérisées en termes de fonction, et moins de 0.16% (1567) possédaient une structure 3D connue.²⁰ La base de données CAZy permet donc de prendre conscience que les glycosidases sont nombreuses et diverses, mais elle souligne aussi que la grande majorité de cette diversité reste à explorer. Pour cela, le développement de nouveaux outils permettant de différencier (et éventuellement d'isoler) des glycosidases ayant des propriétés spécifiques parmi toutes celles identifiées grâce aux progrès de la génomique est une nécessité. Idéalement, de tels outils permettraient la caractérisation fonctionnelle mais aussi structurale d'enzymes encore méconnues, susceptibles de présenter un intérêt pour des applications spécifiques.

I.2. Mécanismes d'action

Les glycosidases représentent des catalyseurs particulièrement efficaces, capables d'accélérer l'hydrolyse des glycosides par un facteur 10^{17} .¹¹ Bien qu'il existe une multitude de structures et de substrats associés à ces enzymes, deux mécanismes seulement suffisent à expliquer les propriétés catalytiques de la plupart d'entre elles. Sur la base de ces mécanismes, il est possible de distinguer deux catégories de glycosidases : celles dont l'hydrolyse de la liaison osidique mène à l'inversion de configuration du carbone anomérique (inverting glycosidases), et celles pour lesquelles l'hydrolyse se produit avec rétention nette de configuration du carbone anomérique (retaining glycosidases).^{21,15} Cette distinction remonte aux travaux menés par Koshland sur les mécanismes d'action des enzymes, publiés en 1953.²²

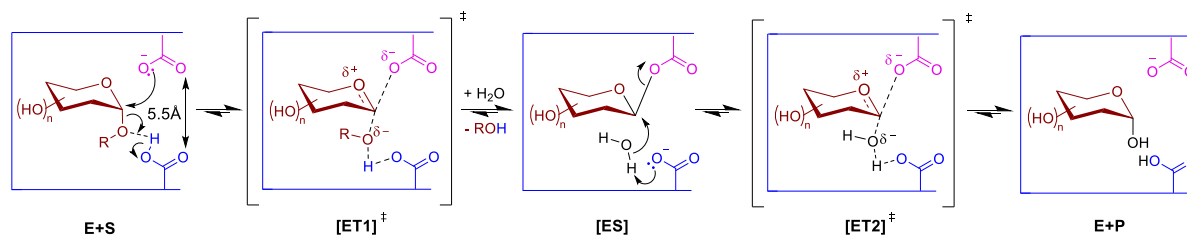
Ces mécanismes d'action des glycosidases comportent un point commun : ils reposent tous les deux sur l'action de 2 résidus de types acides carboxyliques dans le site actif de l'enzyme (**Schéma 2**). Dans le cas des enzymes fonctionnant avec rétention de configuration anomérique, l'un des résidus assure une catalyse acido-basique, tandis que l'autre se comporte successivement comme un nucléophile puis un nucléofuge mais n'est pas impliqué dans un transfert de proton. En revanche, dans le cas des enzymes fonctionnant avec inversion de configuration anomérique, ces 2 résidus se comportent comme des catalyseurs acido-basiques.

²⁰ Drula, E.; Garron, M.-L.; Dogan, S.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Terrapon, N. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D571–D577.

²¹ a) McCarter, J. D.; Stephen Withers, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885–892. b) Zechel, D. L.; Withers, S. *G. Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11–18.

²² Koshland, D. E. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416–436.

Mécanisme de type Koshland avec rétention de configuration anomérique



Mécanisme de type Koshland avec inversion de configuration anomérique

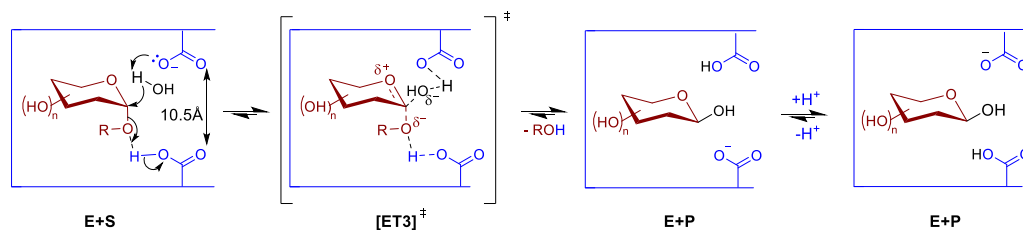


Schéma 2

Dans le mécanisme avec rétention de configuration anomérique, les deux résidus acides carboxyliques sont séparés par une distance de 5.5 Å, ce qui ne permet pas la présence simultanée de la molécule d'eau et du glycoside substrat. L'oxygène glycosidique est donc activé par le résidu carboxylique (bleu), avant d'être déplacé par le résidu nucléophile (en rose), menant alors à la formation d'un complexe covalent enzyme-substrat. Ce processus met en jeu une assistance anchimérique de l'oxygène endocyclique, et se caractérise par la formation d'un état de transition de type oxocarbénium. Ensuite, tandis que le résidu aglycone est évacué hors du site actif, une molécule d'eau peut s'insérer dans celui-ci. Le résidu carboxylate (bleu) peut alors activer la molécule d'eau qui vient s'ajouter sur le complexe covalent et provoque la libération du résidu osidique. Ainsi la succession des deux substitutions nucléophiles sur le carbone anomérique s'accompagne d'une double inversion de configuration, ce qui conduit à une rétention nette de configuration. Dans le mécanisme avec inversion de configuration anomérique, l'espace entre les deux résidus est plus important (10.5 Å), ce qui permet à la molécule d'eau et au substrat de se trouver à proximité l'un de l'autre dès le début de la réaction. Dans un mécanisme concerté, l'oxygène glycosidique est activé par le résidu acide, ce qui en fait un bon nucléofuge immédiatement déplacé par la molécule d'eau qui est elle-même déprotonée par le second résidu sous forme carboxylate. À l'inverse du mécanisme précédent, il y a donc inversion de configuration, et il n'y a pas de formation d'un complexe covalent enzyme-substrat.

Bien que les deux mécanismes représentés dans le *Schéma 2* permettent d'expliquer l'activité catalytique des glycosidases, ils ne permettent pas de comprendre la sélectivité de ces enzymes pour leur(s) substrat(s). Pour cette raison de nombreuses molécules interagissant avec le site actif de ces glycosidases ont été synthétisées, dont divers inhibiteurs. Parmi les composés les plus largement étudiés en tant qu'inhibiteurs de glycosidases figurent les iminosucres, des molécules glycomimétiques qui seront présentées dans le chapitre suivant.

II. Les iminosucres

II.1. Les iminosucres, inhibiteurs de glycosidases

Les iminosucres sont des composés glycomimétiques définis comme « des sucres dans lesquels l'oxygène endocyclique est remplacé par un atome d'azote basique », selon O. Martin et P. Compain.²³

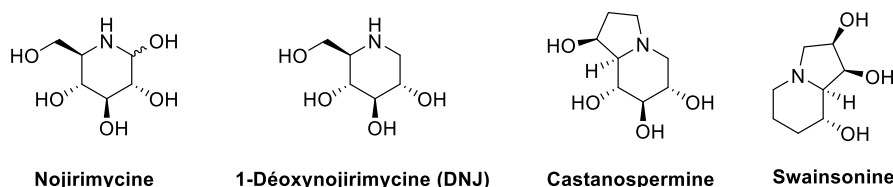


Figure 2 : Quelques iminosucres emblématiques

Ces composés ont été découverts à partir des années 1960, avec par exemple la 1-déoxynoijirimycine souvent appelée DNJ (Figure 2). Cette molécule a été obtenue pour la première fois en 1966, par réduction chimique de la nojirimycine, un composé naturel produit par plusieurs souches de champignons de la famille des *Streptomyces* (Schéma 3).²⁴ La DNJ a été synthétisée l'année suivante par Paulsen *et al.*²⁵ puis isolée directement des feuilles de mûrier *Morus alba* quelques années plus tard,²⁶ raison pour laquelle ce composé est parfois nommé moranoline.

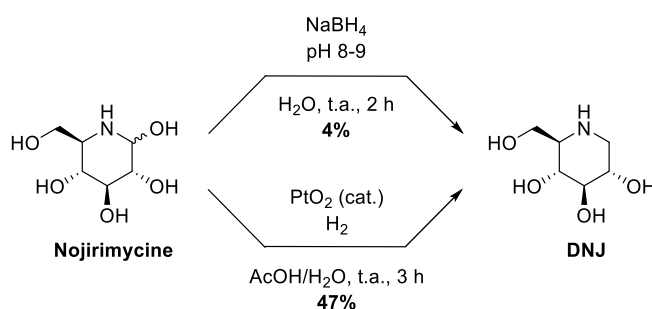


Schéma 3

C'est seulement 10 ans plus tard, en 1976, que les chimistes du groupe Bayer découvrent les excellentes propriétés inhibitrices d' α -glucosidases de la DNJ.²⁷ D'autres iminosucres vont alors être isolés de sources naturelles, et démontrer d'excellentes propriétés inhibitrices de glycosidases.²⁷ On peut par exemple citer la swainsonine (voir Figure 2) qui a été isolée de *Swainsona canescens* en 1979,²⁸ après que des fermiers australiens eurent constaté que l'ingestion de cette plante par les moutons leur causait une maladie dont les symptômes étaient similaires à ceux provoqués par la mannosidose.

²³ Compain, P.; Martin, O.R. *Iminosugars: From synthesis to therapeutic applications* Wiley, 2007.

²⁴ a) Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Nida, T. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1966**, *19*, 288–292. b) Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Ito, T.; Niida T. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2125–2144.

²⁵ Paulsen, H.; Sangster, I.; Heyns, K. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 802–815.

²⁶ Yagi, M.; Kouno T.; Aoyagi, Y.; Murai, H. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *50*, 571–572.

²⁷ Stütz, A. E. *Iminosugars as glycosidase inhibitors: nojirimycin and beyond*; Wiley, Weinheim, 1999.

²⁸ Colegate, S.; Dorling, P.; Huxtable, C. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2257–2264.

De fait, la swainsonine s'est avérée être un puissant inhibiteur de certaines α -mannosidases.²⁹ C'est aussi la toxicité d'une plante (*Castanospermum australe*) pour le bétail qui a mené à l'identification de la castanospermine en 1981 à partir des graines de cette plante.³⁰ Cependant la configuration des centres stéréogènes rapportée dans la littérature à cette époque s'est avérée fautive, et c'est seulement après la synthèse totale de la castanospermine par Bernotas *et al.* que la véritable structure de ce composé a été connue (voir **Figure 2**).³¹ La castanospermine s'est elle aussi avérée être un puissant inhibiteur de glycosidases, notamment des α - et des β -glucosidases.²⁹

Au fur et à mesure que de nouveaux iminosucres ont été caractérisés en tant qu'inhibiteurs de glycosidases, il a été possible d'établir un mode d'action commun à toute cette classe de composés, tout en validant l'existence d'une sélectivité de certains iminosucres pour des glycosidases précises. Rapidement, des iminosucres inhibant des glycosidases dont l'activité catalytique pouvait être corrélée à une pathologie se sont révélés être d'excellents candidats pour développer des applications thérapeutiques.³² Des recherches visant alors à comprendre (et à améliorer) l'affinité et la sélectivité des iminosucres pour certaines glycosidases spécifiques ont été menées, au cours desquelles de nombreux iminosucres non naturels ont été préparés. Ainsi des analogues *N*-alkylés,^{33,34,35} puis plus tard *C-I*-alkylés de la DNJ,³⁶ ont été synthétisés et leur activité biologique a été rapportée dans la littérature (**Figure 3**). De tels travaux ont par exemple permis de constater que la *N*-alkylation de la DNJ pouvait améliorer l'affinité et la sélectivité pour certaines glycosidases. Legler *et coll.* ont par exemple rapporté que la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de la *N*-méthyl-DNJ était de 300 nM pour la glucosidase I de foie de veau et de 130 μ M pour la glucosidase II, tandis que l'IC₅₀ de la DNJ pour ces deux glucosidases est respectivement de 3 μ M et 20 μ M.³⁷ Ces observations indiquent donc que la *N*-méthyl-DNJ est beaucoup plus sélective (et affine) de la glucosidase I que ne l'est la DNJ. En 1995, Asano *et al.* ont proposé une explication à cette différence de propriétés inhibitrices par un changement de conformation induit par la *N*-alkylation de la DNJ.^{35a}

²⁹ Legler, G. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 319–384.

³⁰ Hohenschutz, L. D.; Bell, E. A.; Jewess, P. J.; Leworthy, D. P.; Pryce, R. J.; Arnold, E.; Clardy, J. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 811–814.

³¹ Bernotas, R. C.; Ganem, B. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 165–168.

³² a) Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645–1680. b) Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265–295. c) Asano, N. *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R – 104R. d) Nash, R. J.; Kato, A.; Yu, C.-Y.; Fleet, G. W. *Fut. Med. Chem.* **2011**, *3*, 1513–1521.

³³ Schweden, J.; Borgmann, C.; Legler, G.; Bause, E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *248*, 335–340.

³⁴ Yoshikuni, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 121–128.

³⁵ a) Asano, N.; Kizu, H.; Oseki, K.; Tomioka, E.; Matsui, K.; Okamoto, M.; Baba, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2349–2356. b) Asano, N.; Nishida, M.; Kato, A.; Kizu, H.; Matsui, K.; Shimada, Y.; Itoh, T.; Baba, M.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Lilley, P. M. de Q.; Watkin, D. J.; Fleet, G. W. J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2565–2571.

³⁶ Godin, G.; Compain, P.; Martin, O. R.; Ikeda, K.; Yu, L.; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5991–5995.

³⁷ Hettkamp, H.; Legler, G.; Bause, E. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 85–90.

Chapitre I : Introduction et présentation des objectifs

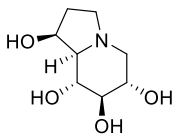
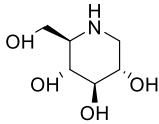
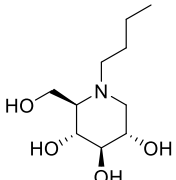
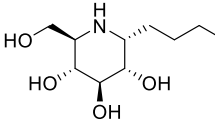
				
	castanospermine	DNJ	N-Butyl-DNJ (miglustat)	α-1-C-Butyl-DNJ
α -glucosidase (riz):	$K_i = 0.015 \mu\text{M}$	$K_i = 0.01 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50} = 50 \text{ nM}$	$\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 420 \text{ nM}$
α -glucosidase (<i>S. Cerevisiae</i>):	$K_i > 1500 \mu\text{M}$	$K_i = 12.6 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50} = 190 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} > 1 \text{mM}$	$\text{IC}_{50} = 465 \mu\text{M}$
sucre intestinal (rat):	$K_i = 0.55 \text{ nM}$	$\text{IC}_{50} = 210 \text{ nM}$	$\text{IC}_{50} = 58 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 3.8 \mu\text{M}$
β -glucosidase (<i>P. Dulcis</i>):	$K_i = 1.5 \mu\text{M}$	$K_i = 47 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50} = 81 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} > 1 \text{mM}$	$\text{IC}_{50} > 1 \text{mM}$
β -glucocérébrosidase humaine:	-	$\text{IC}_{50} = 195 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 399 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 70 \mu\text{M}$
β -galactosidase intestinale (rat):	-	$\text{IC}_{50} = 26 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 274 \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} = 230 \mu\text{M}$

Figure 3 : Propriétés inhibitrices de glycosidases de quelques iminosucres^{29,36,38}

Malgré de tels travaux, les molécules synthétisées au cours de cette période possédaient une sélectivité modeste, comme on peut le voir dans la **Figure 3**. Par exemple, la *N*-butyl-DNJ et l' α -1-C-butyl-DNJ inhibent diverses glycosidases, et possèdent des sélectivités anomériques faibles. Néanmoins, les investigations entreprises à cette époque ont permis d'identifier plusieurs molécules de synthèse qui ont ensuite été utilisées pour développer des applications thérapeutiques (**Figure 4**).

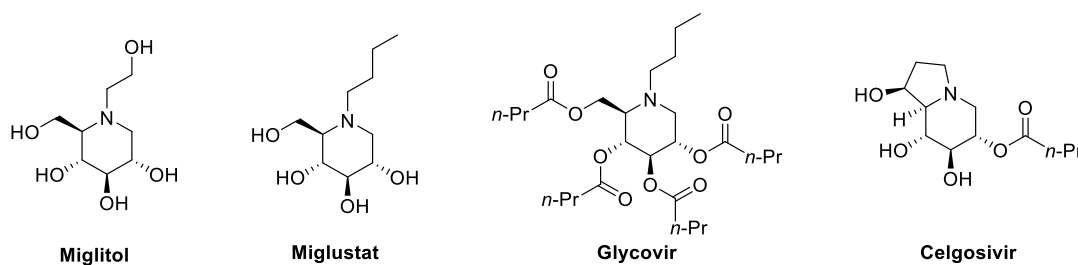


Figure 4 : Quelques iminosucres développés pour des applications thérapeutiques

Par exemple, le Miglitol, un analogue *N*-hydroxyéthylé de la DNJ a été identifié comme étant un puissant inhibiteur des α -glucosidases intestinales. Cette molécule a été commercialisée dès 1996 par le groupe Bayer sous le nom de Glyset®, en tant que traitement du diabète de type II.³⁹ En inhibant l'activité catalytique de ces enzymes, ce composé permet de limiter l'hydrolyse d'oligosaccharides en glucose, et de réduire son absorption au niveau de l'intestin. Un autre analogue *N*-alkylé de la DNJ, le Miglustat, a été commercialisé en 2002 par Actelion (aujourd'hui intégré à Johnson & Johnson). Sous l'appellation Zavesca®, ce composé a été prescrit en tant que traitement d'une maladie lysosomale, la maladie de Gaucher,⁴⁰ puis l'usage de cette molécule a été étendu au traitement de la maladie de Niemann-Pick de type C.⁴¹

³⁸ Kato, A.; Hayashi, E.; Miyauchi, S.; Adachi, I.; Imahori, T.; Natori, Y.; Yoshimura, Y.; Nash, R. J.; Shimaoka, H.; Nakagome, I.; Koseki, J.; Hirono, S.; Takahata, H. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10347–10362.

³⁹ Scott, L. J.; Spencer, C. M. *Drugs* **2000**, *59*, 521–549.

⁴⁰ Ficicioglu, C. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 425–431.

⁴¹ Pineda, M.; Walterfang, M.; Patterson, M. C. *Orphanet J. Rare Dis.* **2018**, *13*, 140.

Enfin des iminosucres ont aussi été testés cliniquement comme antiviraux, tels le Glycovir et le Celgosivir,^{32c} pro-drogues dérivées respectivement de la DNJ et de la castanospermine. Après métabolisation, ces molécules inhibent des α -glucosidases impliquées dans la maturation des chaînes oligosaccharidiques de glycoprotéines virales, ce qui leur confère une activité contre le virus de l'immunodéficience humaine (HIV).^{32c} Des études ont également démontré que la swainsonine possédait une bonne activité anti-métastatique, et ce composé a été suggéré comme un candidat potentiel pour le développement de composés anti-cancéreux.⁴²

L'activité biologique des iminosucres en tant qu'inhibiteurs de glycosidases a été rationalisée en s'appuyant sur un principe initialement énoncé par Pauling,⁴³ et développé par Wolfenden.⁴⁴ En vertu de ce principe, l'affinité des enzymes pour des structures moléculaires proches de l'état de transition de la réaction qu'elles catalysent est supérieure à leur affinité pour les substrats de ces mêmes réactions. Les réactions d'hydrolyse de glycoconjugués impliquant la formation d'un état de transition de type oxocarbénium (*Schéma 2*), les glycosidases possèdent une bonne affinité pour toute molécule mimant cet état de transition. Grâce à leur structure cyclique polyhydroxylée et à la présence dans ces molécules d'un atome d'azote protoné en conditions physiologiques, les iminosucres miment la structure de l'état de transition oxocarbénium, caractérisé par une charge partielle portée par l'atome d'oxygène comme le montre la *Figure 5*.

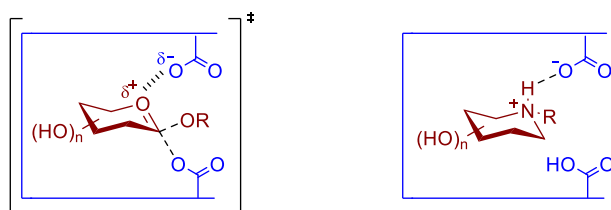


Figure 5 : Comparaison des structures de l'état de transition oxocarbénium formé lors de l'hydrolyse d'un glycoconjugué dans le site catalytique d'une glycosidase, et d'un iminosucre dans le même site

La majorité des iminosucres n'étant pas transformée par les glycosidases, ces derniers résident dans le site actif en s'y associant *via* des interactions de faible énergie de type électrostatiques, liaisons hydrogènes et/ou interactions hydrophobes. Bien qu'elle soit réversible, cette association est forte et les iminosucres résident dans le site catalytique des glycosidases, qui n'est plus à même d'accueillir le substrat naturel des enzymes. L'activité catalytique de l'enzyme est alors inhibée : on parle ainsi d'un mode d'inhibition compétitif réversible. Des iminosucres agissant en tant qu'inhibiteurs non-compétitifs de glycosidases ont été rapportés dans la littérature,⁴⁵ ce mode d'inhibition est cependant moins répandu et ne sera pas considéré dans cette thèse.

⁴² Olden, K.; Breton, P.; Grzegorzewski, K.; Yasuda, Y.; Gause, B. L.; Oredipe, O. A.; Newton, S. A.; White, S. L. *Pharmacol. Ther.* **1991**, *50*, 285–290.

⁴³ Pauling, L. *Chem. Eng. News Archive* **1946**, *24*, 1375–1377.

⁴⁴ Wolfenden, R. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 10–18.

⁴⁵ Asano, N.; Ikeda, K.; Yu, L.; Kato, A.; Takebayashi, K.; Adachi, I.; Kato, I.; Ouchi, H.; Takahata, H.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 223–229.

II.2. Travaux précédents de l'équipe

Avant de décrire les travaux précédents et les résultats obtenus par notre équipe, nous commenterons les choix qui ont été faits en termes de représentation des molécules dans ce manuscrit. Dans la littérature, il existe plusieurs façons de représenter les structures des sucres et des iminosucres (**Figure 6**). Ainsi, la DNJ et ses dérivés sont souvent représentés sous la forme de chaises, par analogie avec une représentation classique en chimie des sucres (formalisme 1). Ces mêmes molécules peuvent aussi être représentées selon le formalisme 2, classique en chimie organique et utilisé jusqu'à présent. L'ensemble du cycle est représenté dans un même plan, et l'orientation des substituants est retranscrite par des liaisons en coins volants, ce qui permet de déterminer les configurations relatives et absolues des centres stéréogènes. Dans ce formalisme, la structure *D-gluco* (mise en évidence en rouge), est représentée différemment pour le *D*-glucose et le *L*-sorbose tétrabenzylé.

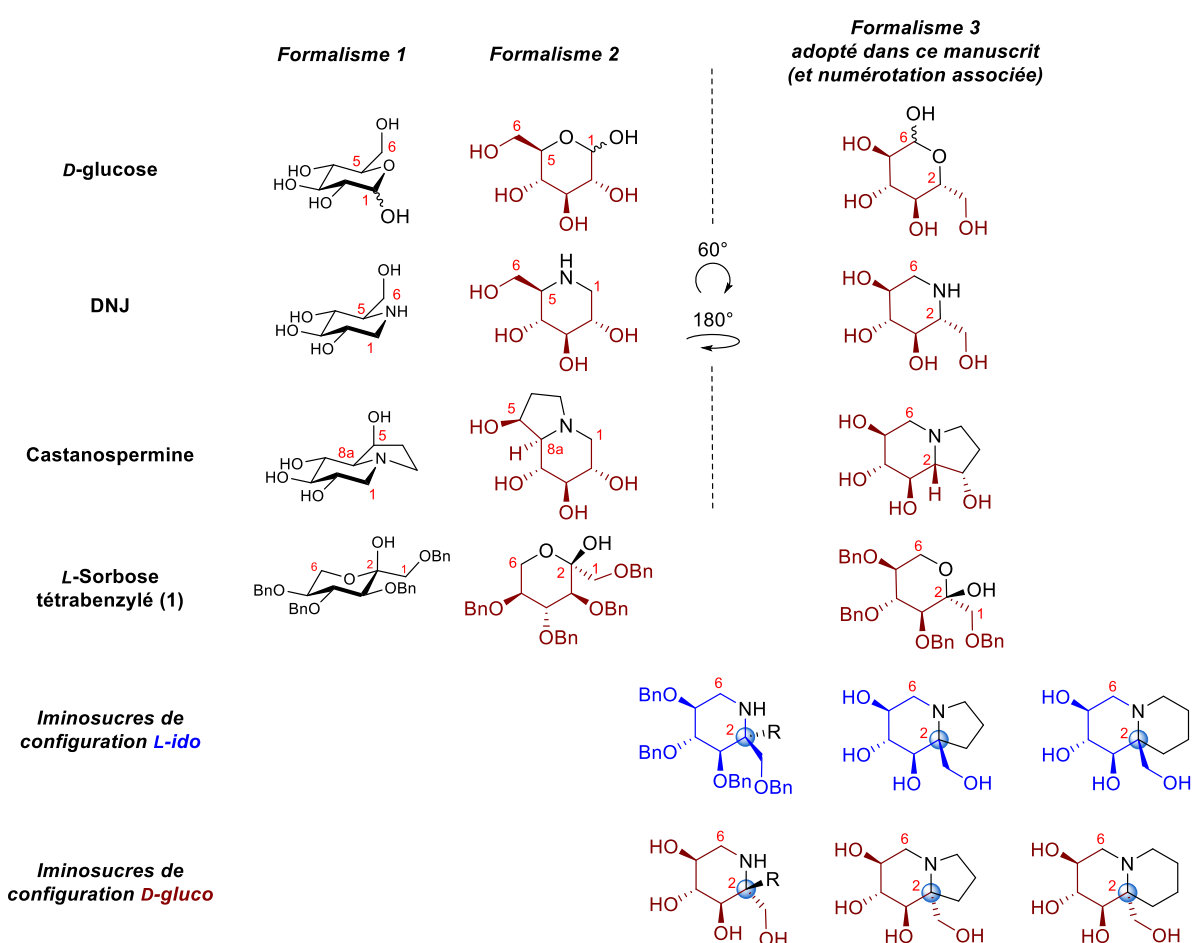


Figure 6 : Représentations et numérotations des structures glycomimétiques

Dans cette thèse nous avons adopté le formalisme 3 souvent utilisé pour représenter les iminosucres bicycliques tels que la castanospermine. Cette représentation a pour avantage de faire apparaître l'analogie de configuration entre la DNJ, la castanospermine et les iminosucres de configuration *D-gluco* synthétisés dans notre équipe à partir du *L*-sorbose tétrabenzylé.

Si ce formalisme peut surprendre, il permet une continuité dans la représentation des structures et dans la numérotation des atomes au cours des synthèses. Par exemple, selon la configuration (*R* ou *S*) du centre quaternaire en α de l'azote, les iminosucres synthétisés seront de configuration *D-gluco* (représentée en rouge) ou *L-ido* (représentée en bleu). Alors que ce centre quaternaire est en position correspondant à la position 5 du D-glucose selon le formalisme 2, il se trouve en position 2 des pipéridines obtenues à partir de la nitrone **3**, selon la numérotation des atomes du L-sorbose tétrabenzylé utilisé pour préparer cette nitrone (**Schéma 4**). La numérotation a donc été homogénéisée dans le formalisme 3, et par analogie, les centres quaternaires en jonction de cycle dans les iminosucres bicycliques synthétisés se verront donc attribuer la position 2, suivant une numérotation spécifique à cette thèse et indépendante des conventions de nomenclature des bicycles de type « indolizidine », selon lesquelles la position 8a devrait être attribuée à l'atome de carbone en cette position.

Depuis plusieurs années, l'équipe Synthèse et Réactivité en Chimie Organique (SeRCO) du Département de Chimie Moléculaire étudie la synthèse d'iminosucres et évalue l'activité biologique de nouvelles molécules de cette famille, principalement en tant qu'inhibiteurs de glycosidases. En particulier, elle a montré que des iminosucres comportant un centre quaternaire en α de l'azote peuvent être obtenus à partir de la cétonitronne **3**, elle-même synthétisée à partir du L-sorbose tétrabenzylé (**1**).⁴⁶

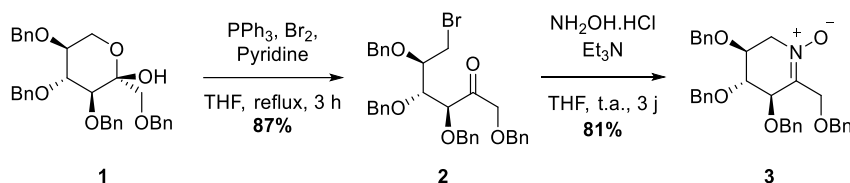


Schéma 4

Cette cétonitronne **3** a été utilisée dans l'équipe comme intermédiaire clé afin d'accéder à plusieurs familles d'iminosucres bicycliques telles que des indolizidines polyhydroxylées (**Schéma 5**),⁴⁶ et des quinolizidines polyhydroxylées (**Schéma 6**).⁴⁷ La stratégie de synthèse adoptée a permis d'obtenir de façon plus ou moins diastéréosélective des iminosucres originaux, comportant un centre quaternaire en α de l'azote avec la configuration *R* ou *S* selon les conditions employées pour réaliser des additions nucléophiles de composés organométalliques sur la nitrone **3**. Ceci a permis de comparer les activités inhibitrices de glycosidases des composés de structure *L-ido* et *D-gluco*.

Ainsi, des iminosucres de configuration *L-ido* (tels que **6a** ou **9a**) et *D-gluco* (tels que **6b** ou **9b**) ont été obtenus de façon efficace et leurs activités inhibitrices ont été évaluées sur un panel de glycosidases commerciales en collaboration avec le Pr Jean-Bernard Behr (**Tableau 1**).

⁴⁶ Boisson, J.; Thomasset, A.; Racine, E.; Cividino, P.; Banchelin Sainte-Luce, T.; Poisson, J.-F.; Behr, J.-B.; Py, S. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3662–3665.

⁴⁷ Vieira Da Cruz, A.; Kanazawa, A.; Poisson, J.-F.; Behr, J.-B.; Py, S. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9866–9872.

Chapitre I : Introduction et présentation des objectifs

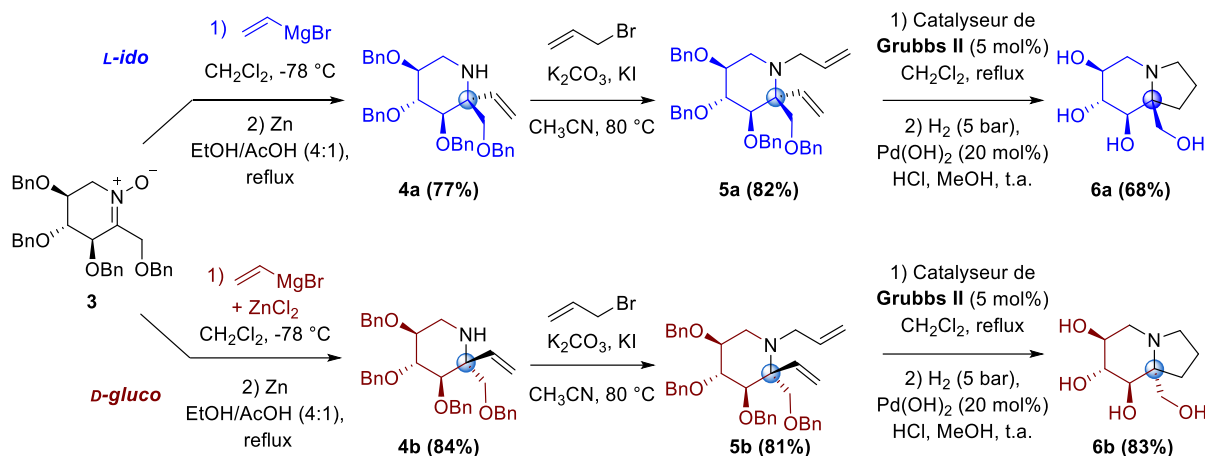


Schéma 5

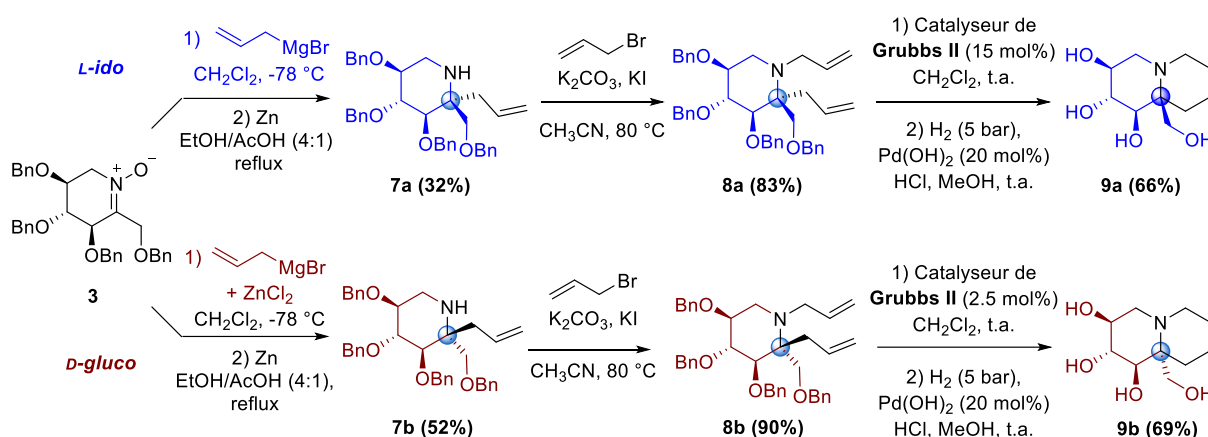


Schéma 6

Enzyme	6a^{a,b,c}	6b^{a,b,c}	9a^{a,b,c}	9b^{a,b,c}
α -glucosidase <i>O. sativa</i> [IC ₅₀] ^d	99% [2.2]	100% [0.052]	98% [107]	97% [0.047]
α -glucosidase <i>S. cerevisiae</i> [IC ₅₀] ^d	80% [N.D.]	82% [N.D.]	89% [N.D.]	97% [300]
β -glucosidase <i>P. dulcis</i>	89%	N.I.	26%	N.I.
β -galactosidase <i>A. oryzae</i>	10%	N.I.	11%	7%
α -mannosidase Jack Beans	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
β -mannosidase <i>H. pomatia</i>	N.I.	N.I.	N.D.	N.D.
α -rhamnosidase <i>A. niger</i>	53%	24%	8%	11%

^{a)} Exprimé en % d'inhibition, pour une concentration de 1 mM en inhibiteur

^{b)} N.I. : Pas d'inhibition

^{c)} N.D. : Non déterminé

^{d)} [IC₅₀] en μM

Tableau 1 : Activités inhibitrices de quelques iminosucres synthésés par l'équipe SeRCO

On remarque tout d'abord que l'ensemble des composés présentés dans le **Tableau 1** sont des inhibiteurs sélectifs de glucosidases car ils n'inhibent pas les autres enzymes testées, de type mannosidases ou rhamnosidase.

De plus, les composés **6b** et **9b** présentant la configuration D-*gluco* montrent aussi une sélectivité anomérique intéressante, ceux-ci inhibant les α -glucosidases (plus particulièrement l' α -glucosidase de riz) sans inhiber les β -glucosidases (*Prunus dulcis*). Les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) de ces composés ont été déterminées dans les cas des plus fortes inhibitions (> 95% d'inhibition à une concentration en iminosucre de 1 mM). Ainsi, il a été observé une différence d'au moins deux ordres de grandeur entre le pouvoir inhibiteur de l' α -glucosidase de riz des composés présentant la configuration D-*gluco* par rapport à leurs analogues de configuration L-*ido*. Cette configuration semble donc être un élément structural essentiel favorisant l'interaction entre ces iminosucres et les α -glucosidases, des résultats publiés récemment par Kato *et coll.* viennent également accréditer cette hypothèse.⁴⁸ Pour cette raison, nous avons choisi de représenter cette structure D-*gluco* en rouge tout au long de ce manuscrit.

L'excellent pouvoir inhibiteur de l' α -glucosidase de riz de l'indolizidine **6b** et de la quinolizidine **9b** a été confirmé en déterminant leurs constantes d'inhibition (K_i). Celles-ci sont de l'ordre du nanomolaire, très proches de celles observées pour les inhibiteurs de référence que sont la castanospermine et la DNJ, et qui présentent toutes deux une plus faible sélectivité vis-à-vis des β -glucosidases (**Figure 7**).²⁹

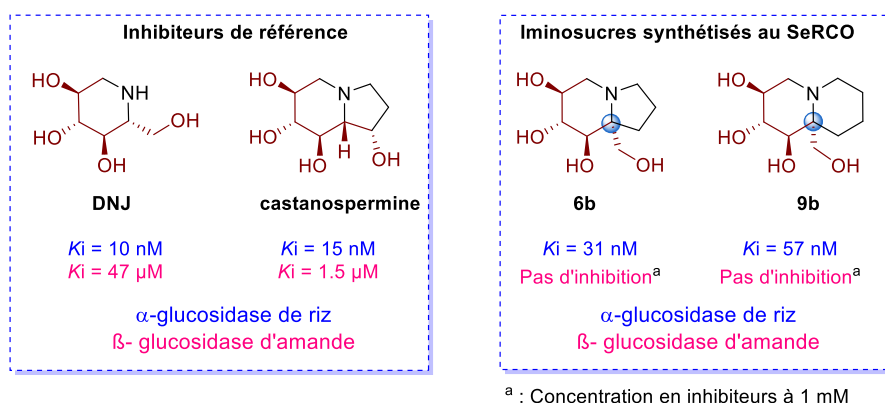


Figure 7 : Activités inhibitrices de glucosidases – Comparaison des iminosucres de l'équipe SeRCO avec les inhibiteurs de référence

La puissante inhibition de l' α -glucosidase de riz par les molécules **6b** et **9b**, et surtout la sélectivité de cette inhibition a amené notre équipe à engager diverses collaborations en vue de définir les caractéristiques structurales conférant à ces iminosucres leurs propriétés inhibitrices d' α -glucosidases et leur bonne sélectivité. En effet, ces propriétés paraissaient intéressantes car l' α -glucosidase de riz est une enzyme de la famille GH31 dans la classification CAZy, et on trouve dans cette famille plusieurs enzymes humaines représentant des cibles thérapeutiques potentielles.

Ainsi, une étude cristallographique a été menée en collaboration avec l'équipe du Pr Gideon J. Davies à l'Université de York (UK) pour analyser l'interaction de différents iminosucres avec une α -glucosidase bactérienne appartenant elle aussi à la famille GH31.

⁴⁸ Lu, T.-T.; Shimadate, Y.; Cheng, B.; Kanekiyo, U.; Kato, A.; Wang, J.-Z.; Li, Y.-X.; Jia, Y.-M.; Fleet, G. W. J.; Yu, C.-Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *224*, 113716.

L'enzyme *CjAgd31B*, caractérisée par l'équipe du Pr Davies,⁴⁹ a été mise en contact avec des solutions contenant divers iminosucres, pour obtenir des clichés des complexes enzyme-iminosucre (par diffraction des rayons X) résultant de l'insertion de ces iminosucres dans le site catalytique de l'enzyme. La figure ci-dessous représente d'une part la castanospermine complexée dans le site actif de l' α -glucosidase *CjAgd31B* et d'autre part l'indolizidine **6b** complexée dans le site de cette même enzyme (*Figure 8*).

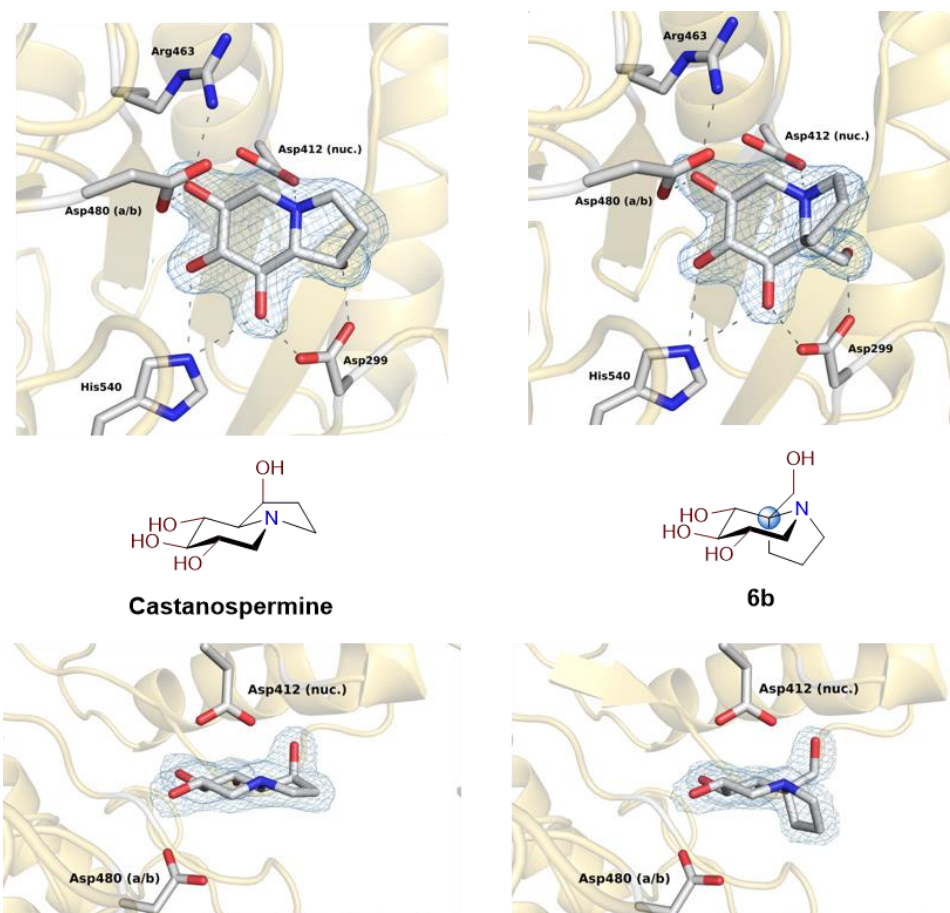


Figure 8 : Clichés RX d'iminosucres complexés à l' α -glucosidase bactérienne *CjAgd31B*
(Collaboration Pr G. J. Davies, York University (UK))

Ces clichés montrent que dans le site actif de *CjAgd31B*, ces deux iminosucres adoptent une position et une orientation très similaires. Ainsi l'atome d'azote est à proximité de l'aspartate 412 (résidu nucléophile du site catalytique de cette enzyme). De plus les différents groupements hydroxyles de chaque iminosucre interagissent *via* des liaisons hydrogènes avec les mêmes résidus du site actif : l'aspartate 299, l'arginine 463, l'aspartate 480 et l'histidine 540. En revanche si la structure de la castanospermine est relativement plate, l'indolizidine **6b** adopte une conformation coudée, son cycle à 5 chaînons étant orienté de façon quasiment perpendiculaire au cycle à 6 chaînons. L'origine de cette conformation provient du centre quaternaire en jonction de cycle (en position α de l'atome d'azote), dont la configuration bien précise impose cette conformation coudée.

⁴⁹ Larsbrink, J.; Izumi, A.; Hemsworth, G. R.; Davies, G. J.; Brumer, H. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 43288–43299.

La différence de conformation de ces deux iminosucres bicycliques permet d'élaborer une hypothèse (représentée graphiquement ci-dessous) expliquant leur différence de sélectivité vis-à-vis des α -glucosidases. En effet, l'accueil d'un D-glucoside de configuration anomérique α - ou β - requiert la présence d'un canal en périphérie du site actif, dans lequel s'insère ce qui deviendra le résidu aglycone après hydrolyse comme le montre la **Figure 9-A**. La présence de ce canal et son orientation sont compatibles avec la conformation coudée de **6b** (**Figure 9-B**), offrant ainsi à ce composé un espace suffisant pour se loger au sein du site actif des α -glucosidases avec lequel il interagit alors fortement *via* les liaisons hydrogène mentionnées ci-dessus, ce qui explique son activité inhibitrice envers ces enzymes. Cependant, comme on le voit sur cette même **Figure 9-B**, le site actif d'une β -glucosidase disposant d'un canal à l'orientation différente (puisqu'adapté à l'accueil d'un β -D-glucoside,) se révèle incompatible avec l'insertion de **6b**.

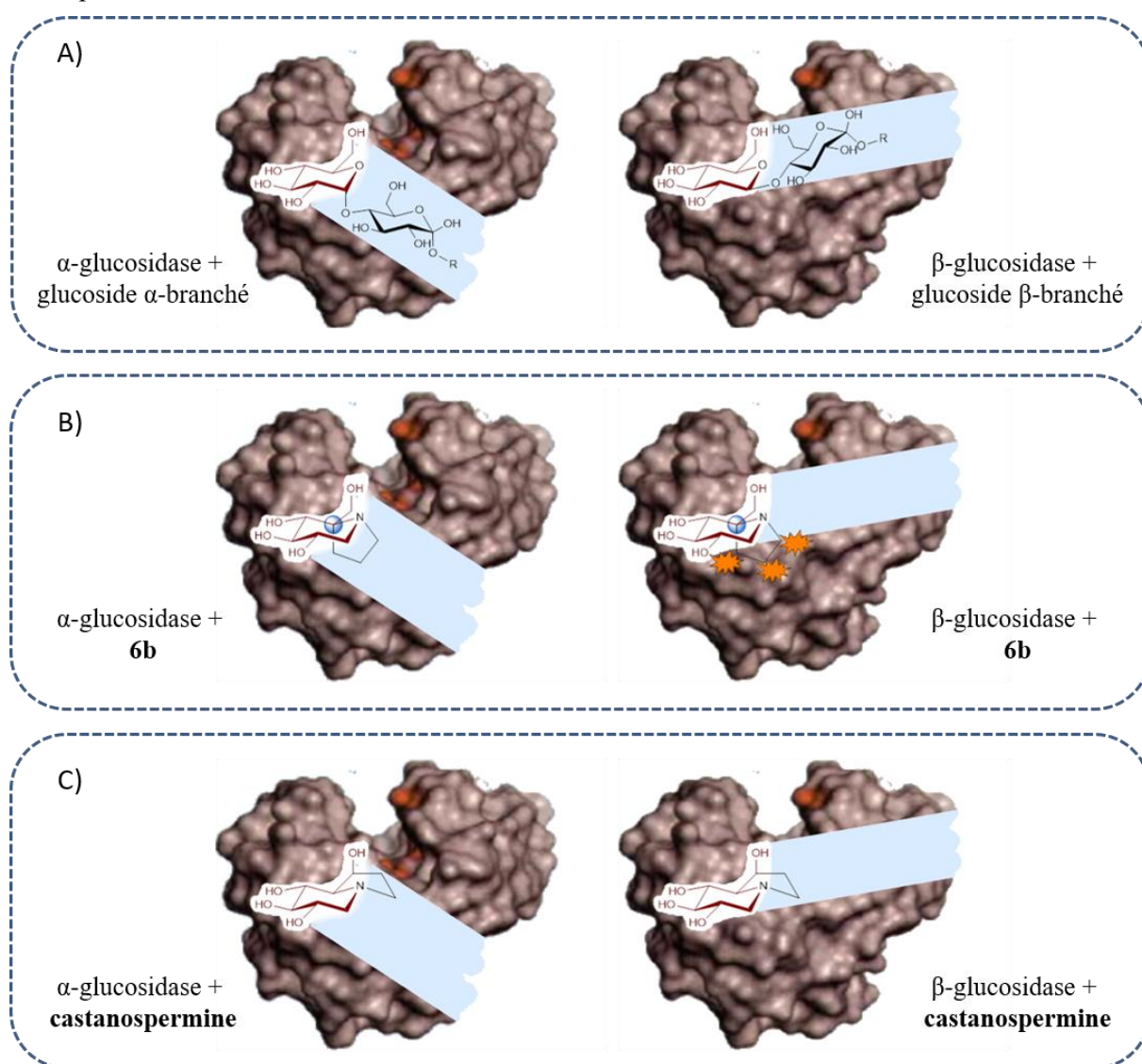


Figure 9 : Sélectivité de l'indolizidine **6b** pour les α -glucosidases – Hypothèse

Cette hypothèse pourrait expliquer l'absence d'inhibition des β -glucosidases par les iminosucres **6b** et **9b**, leur association au site actif de telles enzymes étant empêchée par un encombrement stérique directement relié à la configuration du centre quaternaire en jonction de cycle. De même, cette hypothèse pourrait expliquer que la castanospermine, à la forme plus plane (*Figure 9-C*), présente une mauvaise sélectivité entre α - et β -glucosidases. Elle est en effet susceptible de s'insérer au sein du site actif des α - ou des β -glucosidases pour lesquelles elle démontre de bonnes propriétés inhibitrices (voir *Figure 3*).²⁹

III. Les iminosucres, des sondes de glycosidases ?

III.1. Les sondes de glycosidases

L'importance des glycosidases et les nombreuses applications thérapeutiques et industrielles discutées précédemment ont mené la communauté scientifique à développer des outils pour détecter ces enzymes et explorer leurs mécanismes d'action. Ces outils, qui sont en général des molécules conçues pour interagir sélectivement avec les glycosidases et révéler leur présence, sont appelés des « sondes ». Il en existe plusieurs familles dont une première catégorie regroupant les sondes dites « bio-activables ».⁵⁰ Ces composés comportent un noyau glycosidique et sont susceptibles de libérer une molécule chromogénique ou fluorogénique au cours de leur hydrolyse par des glycosidases (*Schéma 7*).

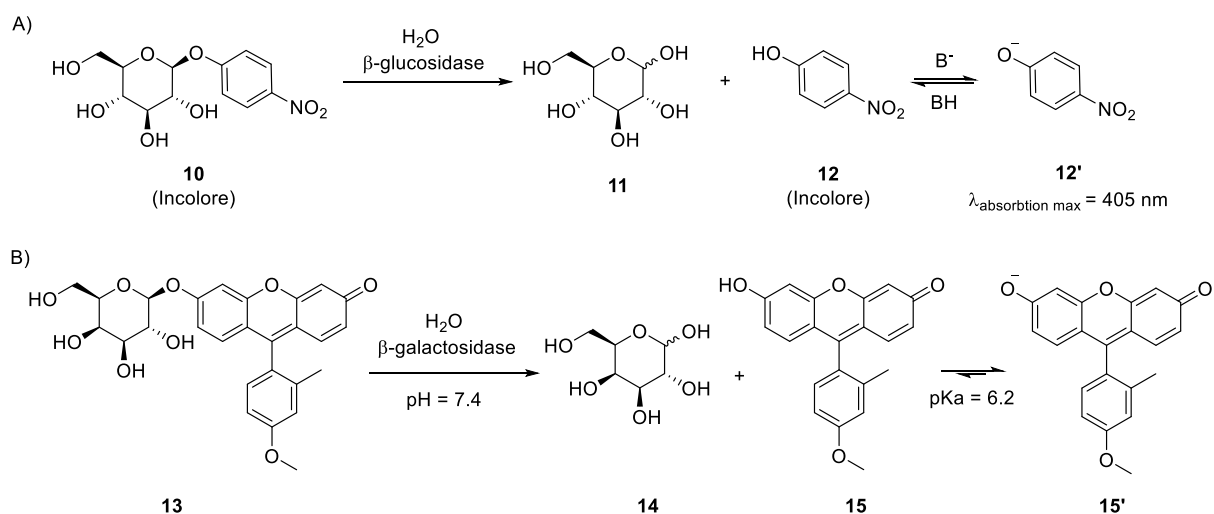


Schéma 7

Les sondes de ce type ont été les premières utilisées (dès 1909 par Harrison et Van der Leek pour la détection de β -glucosidases), il en existe une grande diversité et certaines de ces sondes sont aujourd'hui disponibles dans le commerce ce qui a contribué à populariser leur usage. Par exemple, les *p*-nitrophénylglycosides tels que la molécule **10** (*Schéma 7-A*) font partie des substrats les plus couramment utilisés pour étudier les glycosidases, par exemple afin de caractériser leur activité enzymatique, et déterminer la capacité de diverses molécules à les inhiber. L'hydrolyse de ces composés mène au relargage de *p*-nitrophénol (**12**) dont la base conjuguée (l'ion *p*-nitrophénolate généré par addition d'une base après la réaction enzymatique) émet une intense coloration jaune, quantifiable par spectrophotométrie. Si cette méthode de détection constitue la méthode historique et reste la plus communément utilisée, l'équipe de Wang a proposé de quantifier le *p*-nitrophénol libéré par une mesure d'ampérométrie (transduction électrochimique), ce qui permet une meilleure sensibilité et une détection plus rapide qu'en réalisant une mesure d'absorbance (transduction optique).⁵¹

⁵⁰ Burke, H. M.; Gunnlaugsson, T.; Scanlan, E. M. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 10576–10588.

⁵¹ Tangkuaram, T.; Gerlach, J. Q.; Xiang, Y.; Kawde, A.-N.; Dai, Z.; Bhavanandan, V. P.; La Belle, J. T.; Veerasai, W.; Joshi, L.; Wang, J. *Analyst* **2006**, 131, 889-891.

Des sondes reposant sur un principe de fonctionnement identique mais comportant un fluorophore (la 4-méthylumbelliférone ou des dérivés de la fluorescéine) au lieu d'un chromophore sont aussi couramment employées. Par exemple, la sonde **13** (*Schéma 7-B*) a été utilisée avec succès par l'équipe du Pr Urano pour localiser des β -galactosidases au sein de cellules bactériennes.⁵² Au cours de l'hydrolyse du composé **13**, le composé **15** (2-Me-4-OMe TokyoGreen) est libéré dans le milieu, ce composé étant majoritairement présent sous sa forme basique **15'** qui est fortement fluorescente. De manière générale ces sondes sont de structures peu complexes, et il suffit de changer le noyau glycosidique pour cibler différents types de glycosidases. De même, il est possible de changer la nature du chromophore/fluorophore afin de s'adapter à l'environnement dans lequel se trouvent les glycosidases ciblées. On peut néanmoins relever que si ces sondes sont efficaces pour localiser des glycosidases à la fonction précise (dans un milieu complexe par exemple), elles se dissocient des enzymes d'intérêt après hydrolyse et ne permettent donc pas de les identifier précisément, ou de les isoler afin de réaliser (par exemple) une caractérisation structurale.

Un second type de sondes nommées en anglais les « activity-based proteomics probes » et qui seront nommées sondes ABPP par la suite, a été décrit dans la littérature.^{53,54} Celles-ci se composent tout d'abord d'un élément de reconnaissance permettant l'interaction avec le site catalytique des enzymes cibles. Dans le cas des glycosidases, cet élément de reconnaissance est souvent une structure glycomimétique. Un second élément de structure nommé « reporter » permet de visualiser la sonde liée aux protéines ainsi imagées, il s'agit typiquement d'un fluorophore, un radioélément, etc. Celui-ci est généralement associé à l'élément de reconnaissance par le biais d'une structure appelée « linker », même si ce dernier élément de structure n'est pas indispensable. En revanche, selon Willems *et al.*,^{54a} ainsi que selon Stubbs,⁵³ la structure d'une ABPP doit nécessairement comporter une fonction qualifiée de piège électrophile, menant à la formation d'une liaison covalente entre l'enzyme et la sonde ABPP. Par conséquent, ces sondes sont souvent préparées à partir de composés connus pour inhiber les glycosidases de façon irréversible. Par exemple, le groupe de Withers a préparé une sonde permettant d'imager une β -glucocérébrosidase acide humaine recombinante (GBA1, utilisée comme traitement contre la maladie de Gaucher), afin de visualiser la distribution de cette glycosidase dans l'organisme après son administration. Cette sonde a été conçue à partir du 2,4-dinitrophényl-2-déoxy-2-fluoro- β -D-glucoopyranoside (**16**) qui est un inhibiteur irréversible de β -glucosidases (*Figure 10*).⁵⁵

⁵² Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888–4894.

⁵³ Stubbs, K. A. *Carbohydr. Res.* **2014**, *390*, 9–19.

⁵⁴ a) Willems, L. I.; Jiang, J.; Li, K.-Y.; Witte, M. D.; Kallemeijn, W. W.; Beenakker, T. J. N.; Schröder, S. P.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Overkleeft, H. S. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 10864–10872.
b) Wu, L.; Armstrong, Z.; Schröder, S. P.; de Boer, C.; Artola, M.; Aerts, J. M.; Overkleeft, H. S.; Davies, G. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *53*, 25–36.

⁵⁵ Withers, S. G.; Street, I. P.; Bird, P.; Dolphin, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7530–7531.

En introduisant un isotope radioactif dans sa structure (l'isotope ^{18}F), le composé radioactif **16*** a été obtenu et exploité afin de contrôler *in vivo* la biodistribution de la GBA1 injectée par voie intraveineuse à des souris.⁵⁶ On remarque ici que le composé **16*** constitue une sonde dont la structure est dépourvue de linker. L'isotope radioactif qui joue le rôle de « reporter » fait partie de la structure glycomimétique.

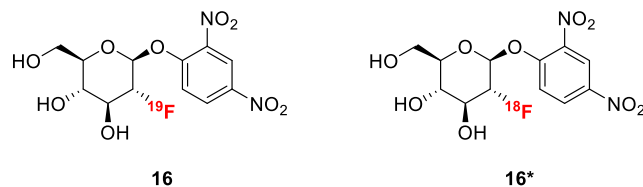


Figure 10 : Marquage de la β -glucocérébrosidase acide - Withers et coll.

De très nombreuses sondes de glycosidases ont également été développées par l'équipe du Pr Overkleeft depuis une dizaine d'années. Les sondes **17** et **18** ont été les premières développées par cette équipe, afin d'imager (par fluorescence) la GBA1 au sein de fibroblastes de patients atteints de la maladie de Gaucher.⁵⁷ Dérivées du cyclophellitol qui est lui-même un inhibiteur irréversible des β -glucosidases, ces sondes reposent sur l'utilisation de motifs BODIPY en tant que « reporters ».

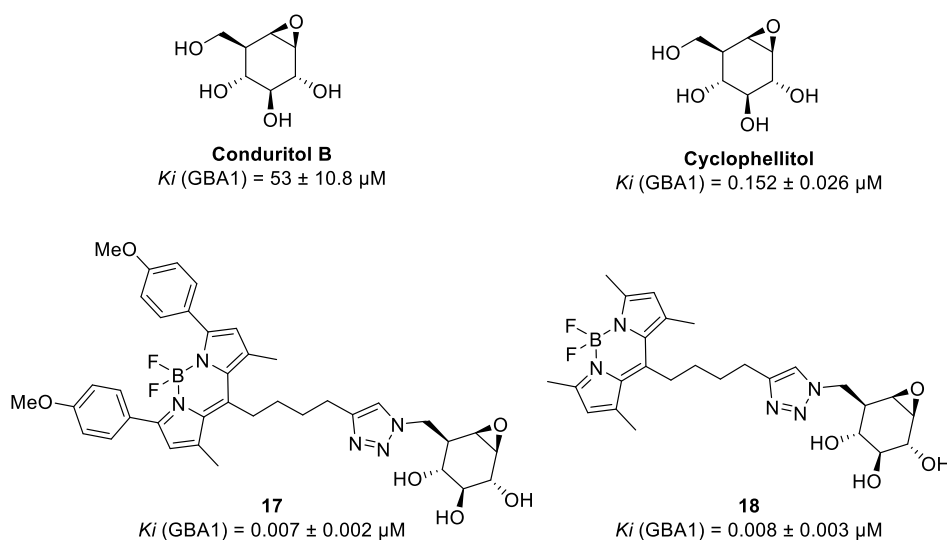


Figure 11 : Premières sondes ABPP développées à partir du cyclophellitol - Overkleeft et coll.

De façon surprenante les sondes **17** et **18** possèdent des constantes d'inhibition pour la GBA1 (humaine, recombinante) très inférieures à celle du cyclophellitol. Les auteurs ont expliqué ce constat par l'hydrophobicité accrue des sondes **17** et **18** par rapport au cyclophellitol, et par le positionnement des BODIPY dans une poche hydrophobe localisée près du site actif de l'enzyme (*via* des études de docking moléculaire).

⁵⁶ Phenix, C. P.; Rempel, B. P.; Colobong, K.; Doudet, D. J.; Adam, M. J.; Clarke, L. A.; Withers, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 10842–10847.

⁵⁷ Witte, M. D.; Kallemeijn, W. W.; Aten, J.; Li, K.-Y.; Strijland, A.; Donker-Koopman, W. E.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; Bleijlevens, B.; Kramer, G.; Florea, B. I.; Hooibrink, B.; Hollak, C. E. M.; Ottenhoff, R.; Boot, R. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 907–913.

En pré-incubant la GBA1 avec du conduritol B, les auteurs ont remarqué que les sondes **17** et **18** perdaient alors leur capacité à imager la GBA1. Ce test et l'obtention de structures cristallographiques de la GBA1 inhibée par le conduritol B ont permis de déterminer le site de liaison des sondes avec précision. Une fois le mécanisme d'action élucidé, la sonde **18** a été injectée (100 nM) à des souris par voie intraveineuse, puis les tissus de ces souris ont été prélevés. L'analyse d'extraits cellulaires par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) a permis de visualiser la GBA1, imagée par **18** dans de nombreux tissus (**Figure 12**). Dans l'intestin, une multitude de protéines se retrouvent imagées par la sonde **18**, ce qui s'explique par la présence d'autres glycosidases, dont une lactase (la lactase-phloridzine hydrolase) connue pour être sensible au conduritol B.⁵⁸ Cependant, dans les autres tissus la détection de la GBA1 se montre tout à fait sélective.

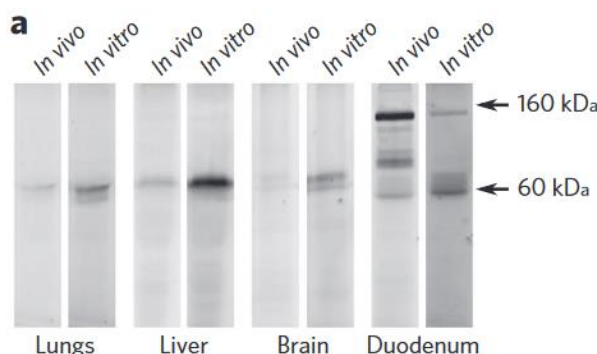


Figure 12 : Marquage de la GBA par la sonde **28** dans plusieurs tissus cellulaires (image de la littérature)⁵⁹

Quelques années plus tard, l'équipe d'Overkleeft a poursuivi ces travaux en préparant les sondes **19** et **20**, contenant une fonction aziridine en tant que piège électrophile (**Figure 13**), et ces nouvelles sondes (ainsi que les sondes **17** et **18**) ont été testées sur plusieurs types de GBA humaines.⁶⁰

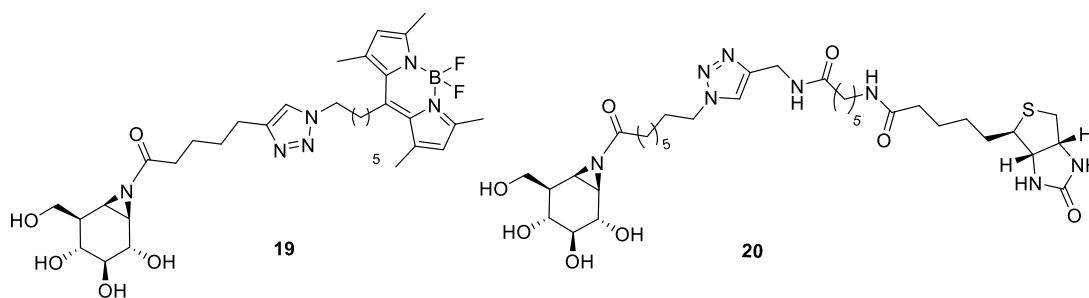


Figure 13 : Sondes ABPP dérivées du cyclophellitol et comportant une N-acylaziridine en tant que piège électrophile - Overkleeft et coll.

⁵⁸ Arribas, J. C. D.; Herrero, A. G.; Martín-Lomas, M.; Cañada, F. J.; He, S.; Withers, S. G. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6996–7005.

⁵⁹ Figure issue de la référence 57. Reproduite avec la permission de **Springer Nature**, License n° 5397541015549, 28 Septembre 2022.

⁶⁰ Kallemeijn, W. W.; Li, K.-Y.; Witte, M. D.; Marques, A. R. A.; Aten, J.; Scheij, S.; Jiang, J.; Willems, L. I.; Voorn-Brouwer, T. M.; Van Roomen, C. P. A. A.; Ottenhoff, R.; Boot, R. G.; Van den Elst, H.; Walvoort, M. T. C.; Florea, B. I.; Codée, J. D. C.; Van der Marel, G. A.; Aerts, J. M. F. G.; Overkleeft, H. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12529–12533.

Tandis que les premières sondes **17** et **18** se sont montrées sélectives de la GBA1 avec un IC₅₀ de l'ordre du nM, les sondes **19** et **20** ont inhibé les GBA1 avec des valeurs d'IC₅₀ légèrement inférieures, et ont également permis de marquer les GBA2 et GBA3 (**Tableau 2**).

Sonde	GBA1 ^a	GBA2 ^a	GBA3 ^a
17	1.24 ± 0.04	> 100,000	> 100,000
18	1.94 ± 0.08	> 100,000	> 100,000
19	1.15 ± 0.04	0.149 ± 0.01	3.51 ± 0.24
20	0.98 ± 0.06	0.130 ± 0.02	3.86 ± 0.42

^a IC₅₀ en nM

Tableau 2 : Inhibition de différentes GBA humaines par des sondes ABPP – Overkleeft et coll.

En se basant sur ces résultats, le groupe d'Overkleeft a suggéré la conception de nouvelles sondes, dont le « reporter » pourrait être incorporé *via* la formation d'une *N*-acyl aziridine. Cette méthode permet de changer l'orientation du reporter en faisant varier la configuration de l'aziridine, de façon à mimer un glycoside α - ou β -branché. Ce concept a ainsi été étendu par cette équipe à la détection de diverses glycosidases, telles que des α -D-glucosidases (de la famille GH31),⁶¹ des β -D-glucosidases,^{57,60,62} des α -amylases,⁶³ des α - et β -D-galactosidases,⁶⁴ des mannosidases,⁶⁵ etc.

Les ABPPs constituent donc des outils précieux pour approfondir la compréhension du fonctionnement des glycosidases. Il existe néanmoins des facteurs limitant l'utilisation de ces sondes ABPP, directement corrélés à leur mode d'action. Tout d'abord, la liaison irréversible entre ces sondes et les glycosidases ciblées entraîne une perte d'activité définitive, et une légère modification de la structure enzymatique. Les ABPPS constituent donc une méthode d'analyse « destructive » des glycosidases.

⁶¹ Jiang, J.; Kuo, C.-L.; Wu, L.; Franke, C.; Kallemeijn, W. W.; Florea, B. I.; van Meel, E.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Boot, R. G.; Davies, G. J.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 351–358.

⁶² Rowland, R. J.; Chen, Y.; Breen, I.; Wu, L.; Offen, W. A.; Beenakker, T. J.; Su, Q.; Nieuwendijk, A. M. C. H.; Aerts, J. M. F. G.; Artola, M.; Overkleeft, H. S.; Davies, G. J. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 16377–16388.

⁶³ Chen, Y.; Armstrong, Z.; Artola, M.; Florea, B. I.; Kuo, C.-L.; de Boer, C.; Rasmussen, M. S.; Abou Hachem, M.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Aerts, J. M. F. G.; Davies, G. J.; Overkleeft, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 2423–2432.

⁶⁴ a) Willems, L. I.; Beenakker, T. J. M.; Murray, B.; Scheij, S.; Kallemeijn, W. W.; Boot, R. G.; Verhoek, M.; Donker-Koopman, W. E.; Ferraz, M. J.; van Rijssel, E. R.; Florea, B. I.; Codée, J. D. C.; van der Marel, G. A.; Aerts, J. M. F. G.; Overkleeft, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11622–11625. b) Willems, L. I.; Beenakker, T. J. M.; Murray, B.; Gagestein, B.; van den Elst, H.; van Rijssel, E. R.; Codée, J. D. C.; Kallemeijn, W. W.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 6044–6056. c) Marques, A. R. A.; Willems, L. I.; Herrera Moro, D.; Florea, B. I.; Scheij, S.; Ottenhoff, R.; van Roomen, C. P. A. A.; Verhoek, M.; Nelson, J. K.; Kallemeijn, W. W.; Biela-Banas, A.; Martin, O. R.; Cachón-González, M. B.; Kim, N. N.; Cox, T. M.; Boot, R. G.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *A ChemBioChem* **2017**, *18*, 402–412.

⁶⁵ a) Schröder, S. P.; Kallemeijn, W. W.; Debets, M. F.; Hansen, T.; Sobala, L. F.; Hakki, Z.; Williams, S. J.; Beenakker, T. J. M.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Davies, G. J.; Overkleeft, H. S. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 9983–9992. b) Armstrong, Z.; Kuo, C.-L.; Lahav, D.; Liu, B.; Johnson, R.; Beenakker, T. J. M.; de Boer, C.; Wong, C.-S.; van Rijssel, E. R.; Debets, M. F.; Florea, B. I.; Hissink, C.; Boot, R. G.; Geurink, P. P.; Ovaa, H.; van der Stelt, M.; van der Marel, G. M.; Codée, J. D. C.; Aerts, J. M. F. G.; Wu, L.; Overkleeft, H. S.; Davies, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 13021–13029.

De plus, le mode d'action de ces sondes requiert que le mécanisme catalytique de l'enzyme ciblée repose sur la formation d'un complexe covalent enzyme-substrat,^{53,54b} ce qui n'est pas le cas pour toutes les glycosidases (Cf sous-partie I.2. *Mécanismes d'action*). Par exemple, les glycosidases hydrolysant leur substrat avec inversion (nette) de configuration anomérique ne forment aucun complexe covalent enzyme-substrat au cours de l'hydrolyse. Pour cette raison les sondes ABPP ne permettent pas l'étude des glycosidases agissant selon ce mécanisme, ce qui constitue une limitation conséquente du champ d'applications de ces outils.

Les iminosucres sont des molécules qui se lient de façon forte mais réversible au site actif des glycosidases, ce qui leur permet de s'associer à ces enzymes sans dégrader leur structure, ni causer de perte définitive de leurs propriétés catalytiques. De plus, cette association est observée à la fois pour les glycosidases agissant avec rétention ou avec inversion de configuration anomérique, ce qui fait des iminosucres des composés pertinents pour confectionner des sondes de glycosidases, comme relevé par Gandy *et al.*⁶⁶ Ces auteurs ont publié en 2011 une méthode permettant la conception de sondes similaires aux ABPPs, ciblant différentes glycosidases à l'aide de différents noyaux iminosucres en tant qu'éléments de reconnaissance. Pour cela des noyaux iminosucres de configuration *D-gluco*, *D-manno* et *D-galacto* ont été conjugués à un azoture aromatique photosensible (en rouge, **Figure 14**).

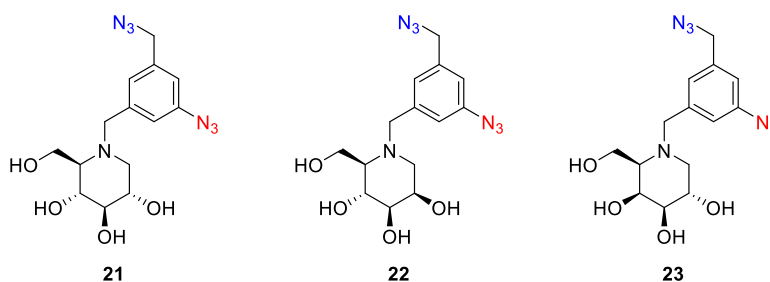


Figure 14 : Sondes dérivées d'iminosucres – Gandy *et al.*

Les auteurs ont pu démontrer par des tests colorimétriques que l'activité inhibitrice de chaque composé était sélective d'une famille de glycosidases, en fonction de la configuration du noyau iminosucre. Par exemple, le composé **21** de structure *D-gluco* s'est avéré sélectif des glucosidases, et plus spécifiquement des α -glucosidases. Lorsque ces composés ont été incubés avec les enzymes cibles puis irradiés à la lumière UV, une liaison covalente entre le noyau aromatique et des résidus du site catalytique des enzymes cibles a été formée. Les glycosidases marquées ont par la suite été conjuguées à un groupe « reporter » grâce à la seconde fonction azoture (en bleu, **Figure 14**) avant d'être analysées par SDS-PAGE et Western blot. Ainsi l'utilisation d'un noyau iminosucre en tant qu'élément de reconnaissance a permis la conception d'une sonde originale, compatible avec des glycosidases agissant avec rétention ou inversion de configuration anomérique. Ces sondes conservent néanmoins l'inconvénient d'altérer les enzymes avec lesquelles elles interagissent à travers la formation d'un complexe covalent enzyme-sonde.

⁶⁶ Gandy, M. N.; Debowski, A. W.; Stubbs, K. A. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5037–5039.

Cet inconvénient pourrait être écarté en utilisant une nouvelle catégorie de sondes ne comportant aucun piège électrophile et capables de se lier aux glycosidases grâce à la seule affinité d'un noyau iminosucre utilisé comme élément de reconnaissance.

III.2. Présentation des objectifs de cette thèse

L'équipe SeRCO ayant identifié une famille d'iminosucres possédant une affinité forte et sélective pour les α -glucosidases, l'objectif de cette thèse a été d'exploiter ces structures en tant qu'éléments de reconnaissance pour concevoir des sondes permettant de détecter et d'isoler sélectivement des α -glucosidases présentes dans divers milieux biologiques. Pour cela, il était nécessaire dans un premier temps de synthétiser de nouvelles molécules analogues de **6b** ou **9b**, conservant les éléments structuraux essentiels à la reconnaissance sélective des α -glucosidases comme discuté précédemment, et comportant aussi une poignée fonctionnelle permettant l'introduction d'un bras espaceur et d'une fonction d'ancrage à un dispositif de détection (*Schéma 8*).

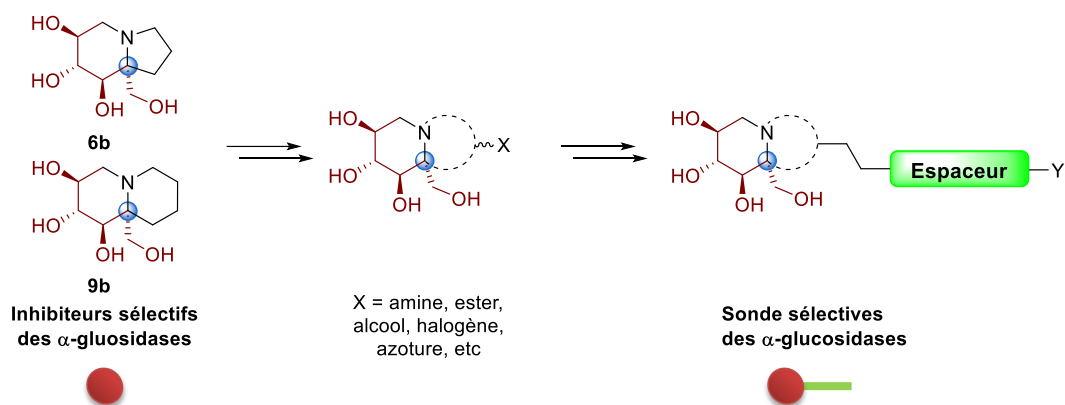


Schéma 8

Afin d'assurer la détection des enzymes en utilisant ces sondes, une méthode de détection basée sur l'imagerie par résonance plasmonique de surface (en anglais surface plasmon resonance imaging, ou SPRi) a été envisagée. Cette méthode présente de nombreux avantages pour l'étude des interactions biomoléculaires, lesquels sont discutés dans le chapitre 4 de cette thèse. Sa mise en œuvre requiert de disposer les sondes sur une surface solide (un prisme optique à la surface dorée), l'ensemble étant alors nommé une biopuce.

Par conséquent, la conception de biopuces implique de mettre au point la méthode de greffage des sondes sur surface d'or, tel que représenté de façon schématique sur la *Figure 15*. Cette méthode repose sur l'élaboration d'un film de polypyrrole à la surface d'un prisme d'or par électro-copolymérisation des sondes en présence de pyrrole. Pour cette raison la structure finale des sondes se décomposera en trois parties : le noyau iminosucre permettant la reconnaissance des α -glucosidases (les cibles biologiques ou analytes), un bras espaceur, et enfin un noyau pyrrole qui constitue la fonction d'ancrage des sondes.

Cette méthode de conception des biopuces laisse beaucoup de liberté pour optimiser les biopuces obtenues : on peut notamment changer la nature des bras espaceurs ainsi que leur longueur, afin de leur conférer une rigidité plus ou moins importante. On peut également changer le type de glycosidases ciblées en faisant varier le noyau iminosucre.

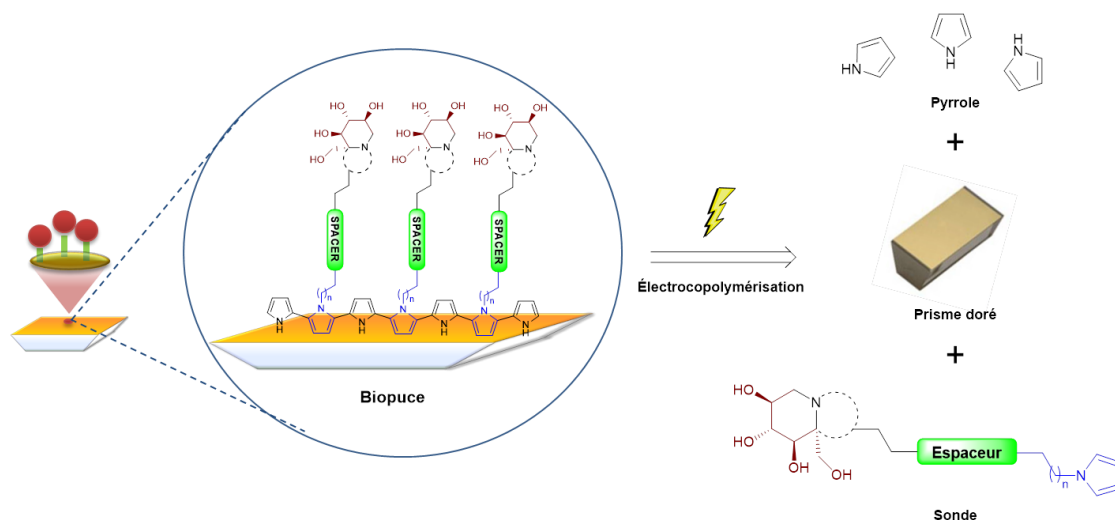


Figure 15 : Projet - Confection de biopuces utilisables en SPRi (représentation schématique d'un film de polypyrrole)

Après greffage des sondes sur une surface solide, l'objectif final de cette thèse était de développer une méthode de détection sélective des α -glucosidases, comme représenté dans la **Figure 16**. À l'aide des biopuces confectionnées, il était envisageable de détecter les enzymes dans des milieux biologiques complexes (tels que des lysats cellulaires). Puis, grâce à l'interaction réversible entre les iminosucres et les glycosidases, les enzymes retenues pouvaient ensuite être isolées, ce qui constituerait une première étape de purification avant la caractérisation structurale de ces enzymes.

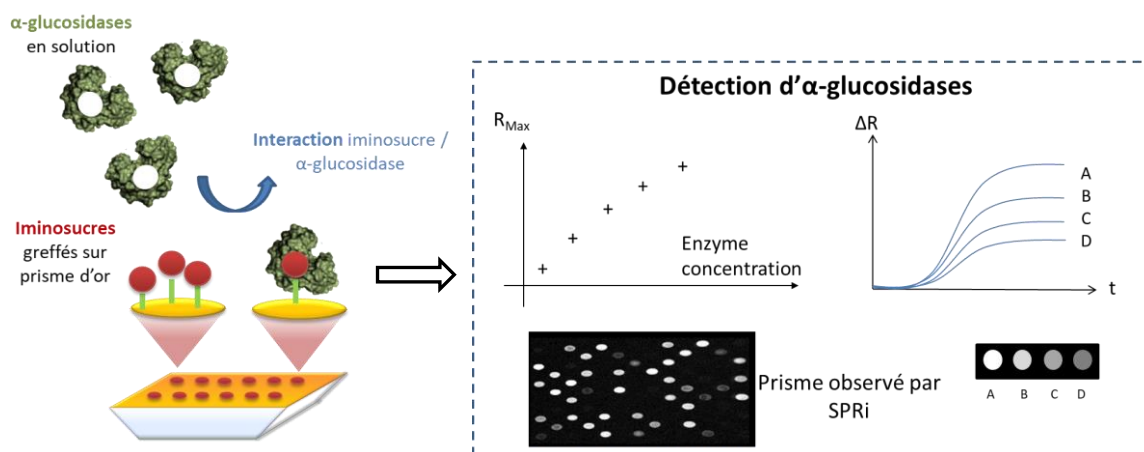


Figure 16 : Projet - Détection sélective d' α -glucosidases en solution par SPRi

Trois familles de sondes basées sur différents noyaux iminosucres ont été envisagées afin de concevoir les biopuces compatibles avec une détection par SPRi (**Figure 17**). La première famille choisie présente comme élément de reconnaissance un iminosucre dérivé de la DNJ, qui a pour avantage d'être facilement fonctionnalisable grâce à la présence dans sa structure d'un atome d'azote nucléophile.

De plus, la « chimie de la DNJ » ayant déjà été explorée, les sondes de **type 1** devaient être relativement faciles à préparer et permettraient de calibrer les méthodes de fonctionnalisation de la surface d'or.

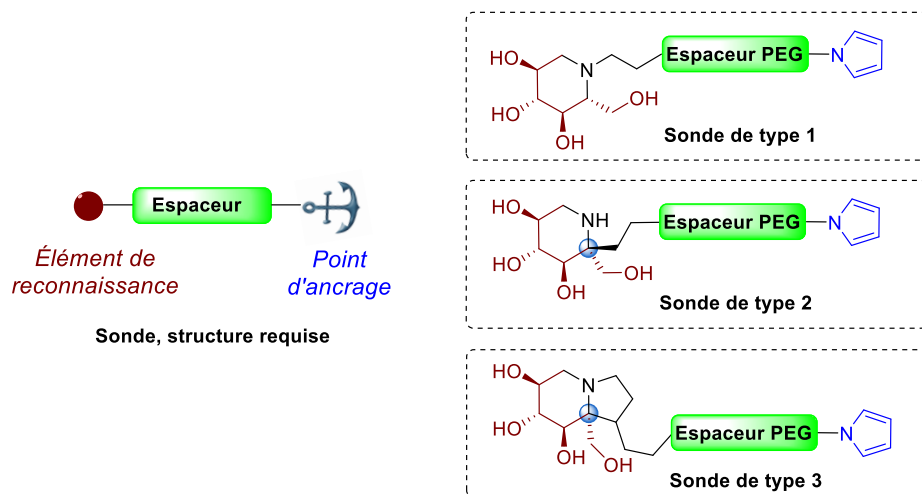


Figure 17 : Structure schématique des types de sondes envisagées pour la conception des biopuces

Les sondes de **type 2** reposent aussi sur un iminosucre de type pipéridine en tant qu'élément de reconnaissance, mais la présence d'un centre quaternaire en α de l'atome d'azote devrait conférer à ces sondes une sélectivité pour les α -glucosidases. Initialement notre projet ne prévoyait qu'un seul type de sondes sélectives des α -glucosidases, qui étaient les sondes de **type 3**. Compte tenu de l'excellente diastéréosélectivité des additions d'organométalliques sur la cétonitrone **3** précédemment réalisées dans l'équipe,⁴⁶ nous avons développé une méthode efficace d'alcynylation diastéréosélective de cette cétonitrone pour concevoir les sondes de **type 3**. C'est au cours de ces travaux que la synthèse de sondes de **type 2** a été identifiée comme une opportunité de confectionner rapidement des sondes sélectives d' α -glucosidases, avec un nombre restreint d'étapes. La stratégie présentée dans le **Schéma 9** a donc été établie pour confectionner les sondes de **type 2**, en additionnant un précurseur alcynylé de bras espaceur sur la cétonitrone **3**.

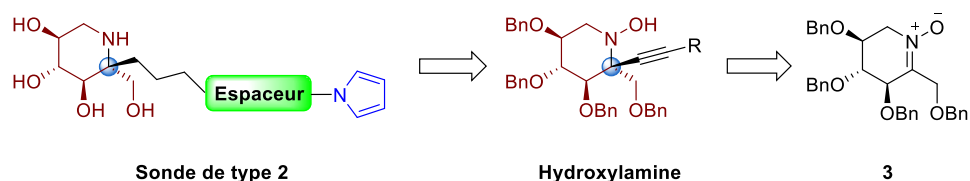


Schéma 9

Enfin, les sondes de **type 3** ciblées pendant ce travail sont basées sur un motif de reconnaissance de type indolizidine polyhydroxylée, analogue de **6b**. La synthèse de ces sondes est plus complexe que celle des précédentes, et requiert un grand nombre d'étapes de synthèse. Afin de confectionner ce type de sondes, la voie de synthèse du noyau indolizidine a été modifiée afin d'introduire une poignée fonctionnelle permettant l'accrochage du bras espaceur au niveau de l'iminosucre bicyclique. La nouvelle approche implique une métathèse cyclisante de l'ényne **26**, lui-même obtenu par alcynylation diastéréosélective de la cétonitrone **3** (**Schéma 10**).

Chapitre I : Introduction et présentation des objectifs

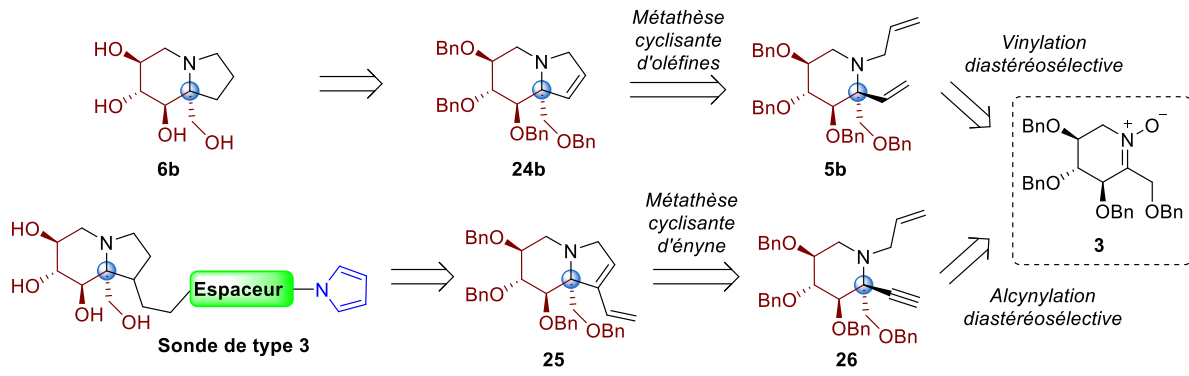


Schéma 10

Chapitre II : Synthèse de sondes basées sur des iminosucres de type pipéridine

I. Synthèse de sondes basées sur des dérivés *N*-alkylés de la DNJ

La 1-déoxynojirimycine (DNJ) constitue un puissant inhibiteur d' α -glucosidases mais ne possède qu'une faible sélectivité anomérique, et possède en conséquence une bonne activité inhibitrice de β -glucosidases.²⁹ Nous avons donc choisi de préparer des sondes dérivées de cet inhibiteur, en considérant que ces sondes de **type 1** reconnaîtraient les α -glucosidases, et dans une moindre mesure les β -glucosidases. La synthèse de telles sondes pouvant s'appuyer sur toute une « chimie de la DNJ » déjà décrite dans la littérature, elles représenteront de premiers composés relativement faciles d'accès. De telles sondes permettront ensuite de développer la méthode de conception des biopuces ainsi que la méthode de détection des glycosidases par SPRi. Elles représentent également des structures pouvant être utilisées pour évaluer la sélectivité de la détection par les sondes de **type 2** et de **type 3**.

I.1. Synthèse du noyau déoxynojirimycine

Parmi les différentes voies de synthèse de la DNJ connues,⁶⁷ nous avons sélectionné celle décrite par Compain *et al.* en 2010,⁶⁸ qui a pour intermédiaire le dérivé tétra-*O*-benzylé **30**, directement utilisable dans notre approche vers la synthèse de sondes par *N*-alkylation. Cette voie de synthèse utilise comme produit de départ le tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose (**27**) commercial, et permet l'obtention de **30** en 4 étapes (*Schéma 11*). Elle repose sur la mise en œuvre d'une oxydation de Moffatt de l'alcool **28** suivie d'une amination réductrice intramoléculaire et diastéréosélective. Ces deux étapes successives mènent à un mélange des lactames **29a** et **29b**, avec un ratio diastéréoisomérique de 85/15 (déterminé par RMN ¹H) en faveur du lactame **29b** qui est obtenu avec un rendement de 51% sur 2 étapes. Après réduction de **29b** par le LiAlH₄, la DNJ tétra-*O*-benzylée **30** a été obtenue avec un rendement global de 44% à partir du tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose (**27**). La DNJ a été obtenue à partir de **30**, par hydrogénolyse pallado-catalysée des groupements benzyles en milieu acide dans le méthanol, selon les conditions préconisées par Kigushi *et al.*⁶⁹

⁶⁷ a) Matos, C. R. R.; Lopes, R. S. C.; Lopes, C. C. *Synthesis* **1999**, *4*, 571–573. b) Setoi, H.; Takeno, H.; Hashimoto, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2642–2645. c) Fleet, G. W. J.; Carpenter, N. M.; Petursson, S.; Ramsden, N. G. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 409–412. d) Bagal, S. K.; Davies, S. G.; Lee, J. A.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Scott, P. M.; Thomson, J. E. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 136–139. e) Danoun, G.; Cecon, J.; Greene, A. E.; Poisson, J.-F. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4221–4224. (exemples choisis, liste non exhaustive).

⁶⁸ Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena-Barragán, T.; Ortiz-Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753–5756.

⁶⁹ Kiguchi, T.; Tajiri, K.; Ninomiya, I.; Naito, T. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5819–5833.

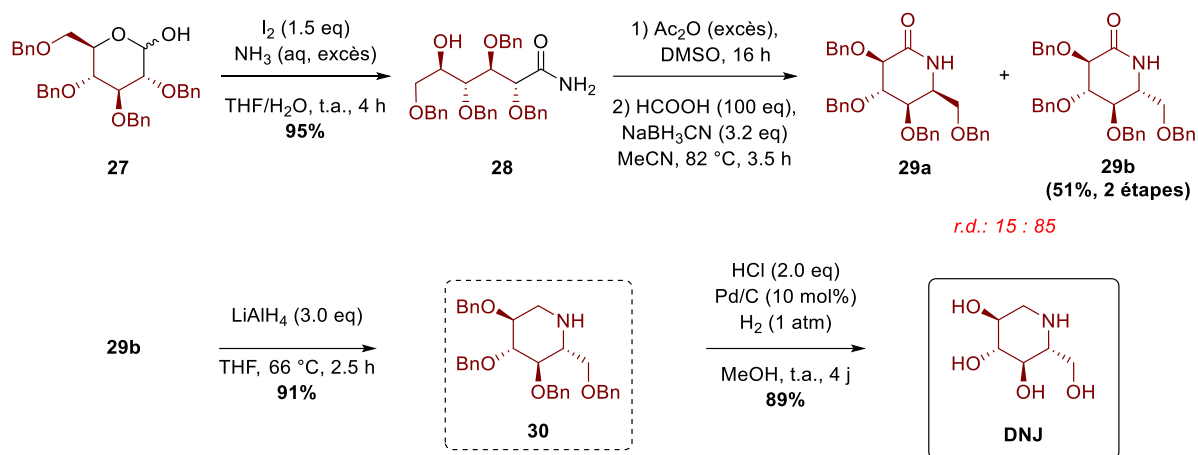


Schéma 11

I.2. Synthèse des bras espaceurs et conjugaison par cycloaddition de Huisgen

Les réactions de cycloaddition de Huisgen englobent un large ensemble de cycloadditions 1,3-dipolaires dont les mécanismes ont été étudiés par Rolf Huisgen à partir des années 1960.⁷⁰ Cependant dans le langage courant, le terme de cycloaddition de Huisgen est généralement associé à la réaction entre un azoture organique et un alcyne, (*Schéma 12*), bien que la première réaction de ce type ait été rapportée par Arthur Michael, en 1888.⁷¹ Dans la suite de ce manuscrit, le terme de cycloaddition de Huisgen sera associé exclusivement aux réactions de cycloadditions 1,3-dipolaires entre un azoture organique et un alcyne.

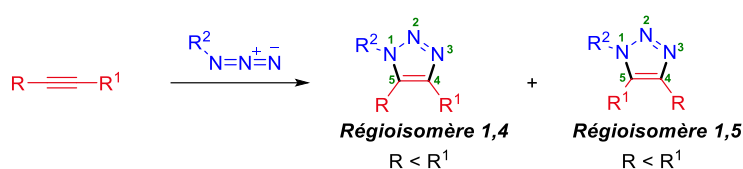


Schéma 12

Connue depuis la fin du XIX^e siècle, la cycloaddition de Huisgen va connaître un regain d'intérêt au début des années 2000, lorsqu'une variante de cette réaction va être rapportée simultanément par les équipes de Barry Sharpless et de Morten Meldal (qui seront tous deux distingués par le prix Nobel de chimie de 2022 pour ces travaux).^{72,73} En utilisant une source de cuivre à l'état d'oxydation +I en quantité catalytique, cette variante dite "CuAAC" (pour Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition") présente l'avantage de mener à d'excellents rendements à température ambiante, ce qui n'est pas le cas en l'absence de cuivre où des températures élevées sont requises, impliquant un risque de dégradation des fonctions les plus sensibles.

⁷⁰ Breugst, M.; Reissig, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12293–12307.

⁷¹ Michael, A., *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94–95.

⁷² Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

⁷³ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

De plus, tandis que la réaction de cycloaddition de Huisgen sans ajout de cuivre mène à la formation d'un mélange de cycloadduits substitués en -1,4 et -1,5 (**Schéma 12**) la variante CuAAC conduit à la formation ultra-préférentielle du cycloadduit-1,4. Bien que le premier mécanisme proposé par le groupe de Sharpless repose sur la formation d'un simple acétylure de cuivre,⁷² c'est par la suite la formation d'un complexe à 2 centres métalliques qui a été proposée et demeure aujourd'hui la plus communément acceptée.^{74,75} Le mécanisme précis de la réaction CuAAC ne fait cependant pas encore l'objet d'un consensus scientifique, et de nouvelles hypothèses sont régulièrement publiées.^{76,77,78}

La cycloaddition de Huisgen fait partie des réactions de chimie dite « click » grâce à son efficacité, sa cinétique rapide à température ambiante, sa compatibilité à divers solvants incluant l'eau et les milieux biologiques, et grâce à l'orthogonalité des fonctions azoture et alcyne. Elle constitue un outil adapté à de nombreuses applications pouvant aller de la fonctionnalisation de polymères à la préparation de substances thérapeutiques, en passant par le marquage de biomolécules *in vivo*.^{67d,70} Dans la littérature on retrouve plusieurs exemples de conjugués de la DNJ confectionnés par le biais de cycloadditions de Huisgen.^{68,79,80,81,82} Aussi, nous avons privilégié cette stratégie et avons dans un premier temps introduit une fonction alcyne sur le composé **30** (**Schéma 13**), afin de pouvoir ensuite le conjuguer à un bras espaceur. Le bromure d'homopropargyle a été préféré au bromure de propargyle afin d'éloigner le futur triazole de la structure D-*gluco* et de ne pas perturber l'interaction entre le noyau DNJ et les glycosidases ciblées. En utilisant ce réactif un rendement de 86% a été obtenu pour le produit **31**. Ce rendement est proche de celui obtenu par Blériot *et coll.* en l'absence de KI, et dans des conditions similaires par ailleurs (75% en 48 h).^{80b} Un rendement similaire est également obtenu lorsque le tosylate dérivé de l'alcool homopropargylique est employé (71%).^{80a}

⁷⁴ Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2250–2255.

⁷⁵ Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216–2230.

⁷⁶ Özen, C.; Tüzün, N. Ş.; *J. Mol. Graph. Model.* **2012**, *34*, 101–107.

⁷⁷ Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715–2750.

⁷⁸ Ziegler, M. S.; Lakshmi, K. V.; Tilley, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5378–5386.

⁷⁹ a) Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825–13831. b) Decroocq, C.; Stauffert, F.; Pamlard, O.; Oulaïdi, F.; Gallienne, E.; Martin, O. R.; Guillou, C.; Compain, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 830–833.

⁸⁰ a) Ardes-Guisot, N.; Alonzi, D. S.; Reinkensmeier, G.; Butters, T. D.; Norez, C.; Becq, F.; Shimada, Y.; Nakagawa, S.; Kato, A.; Blériot, Y.; Sollogoub, M.; Vauzeilles, B. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5373. b) Cendret, V.; Legigan, T.; Mingot, A.; Thibaudeau, S.; Adachi, I.; Forcella, M.; Parenti, P.; Bertrand, J.; Becq, F.; Norez, C.; Désiré, J.; Kato, A.; Blériot, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10734–10744.

⁸¹ Marra, A.; Zelli, R.; D'Orazio, G.; La Ferla, B.; Dondoni, A. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 9387–9393.

⁸² a) Diot, J.; García-Moreno, M. I.; Gouin, S. G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt, K.; Kovensky, J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357–363. b) Brissonnet, Y.; Ortiz Mellet, C.; Morandat, S.; Garcia Moreno, M. I.; Deniaud, D.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Šesták, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18427–18435. c) Hurtaux, T.; Sfihi-Loualia, G.; Brissonnet, Y.; Bouckaert, J.; Mallet, J.-M.; Sendid, B.; Delpace, F.; Fabre, E.; Gouin, S. G.; Guérardel, Y. *Carbohydr. Res.* **2016**, *429*, 123–127.

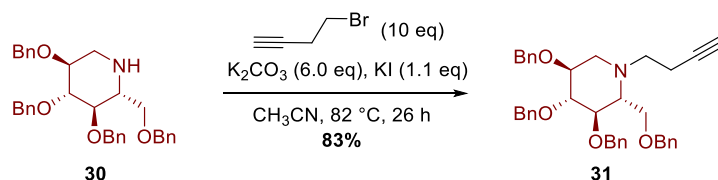


Schéma 13

En parallèle, un bras espaceur comportant un azoture à une extrémité et un noyau pyrrole à l'autre extrémité a été synthétisé en 4 étapes (*Schéma 14*). Pour préparer le composé **32a**, le triéthylène glycol a été utilisé pour des raisons de disponibilité, bien que le 1,2-bis-(2-chloroéthoxy)-éthane ait pu être employé pour économiser une étape.⁸³

Tout d'abord le triéthylène glycol a été transformé en *bis*-mésylate dans une première étape, à l'issue de laquelle il a été isolé mais n'a pas été purifié (le rendement de cette première transformation n'a donc pas été déterminé). Le *bis*-mésylate intermédiaire a ensuite été transformé en *bis*-azoture **32a** par réaction avec de l'azoture de sodium en excès dans un mélange DMF/éthanol (1 : 4) pendant 24 heures au reflux de l'éthanol, selon les conditions utilisées par Wang *et al.*⁸⁴ En raison de son explosivité, le *bis*-azoture **32a** n'a pas été isolé pur mais conservé sous forme de solution dans l'éther diéthylique. Après avoir pesé la solution, les fractions molaires d'éther diéthylique et de **32a** ont été déterminées par RMN ¹H et la quantité totale de **32a** dans la solution a pu être déterminée, un rendement de 85% pour les deux premières étapes a ainsi été estimé.

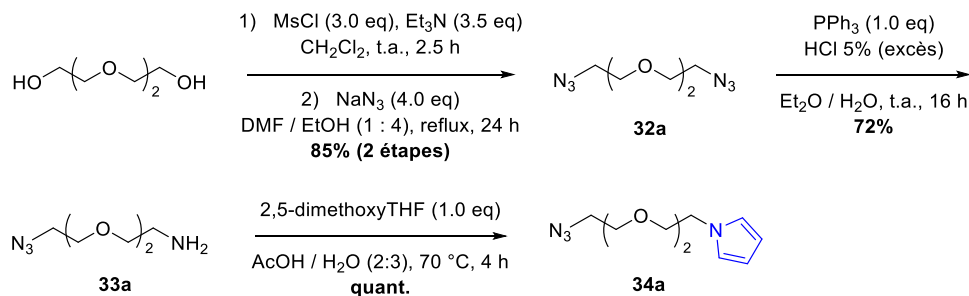


Schéma 14

L'une des deux fonctions azoture a par la suite été réduite *via* une réaction de Staudinger dans un mélange biphasique,⁸³ permettant l'obtention de l'amine primaire **33a** avec un rendement de 72%. Malgré nos recherches, n'avons trouvé aucune mention de la synthèse de **34a** par une autre équipe avant ces travaux. Il a été obtenu par une synthèse de Paal Knorr,⁸⁵ en utilisant une procédure plusieurs fois utilisée dans notre laboratoire, proche des conditions rapportées par Kumar *et al.*⁸⁶

⁸³ Klein, E.; DeBonis, S.; Thiede, B.; Skoufias, D. A.; Kozielski, F.; Lebeau, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6474–6488.

⁸⁴ Wang, C.; Abegg, D.; Hoch, D. G.; Adibekian, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2911–2915.

⁸⁵ Balakrishna, A.; Aguiar, A.; Sobral, P. J. M.; Wani, M. Y.; Almeida e Silva, J.; Sobral, A. J. F. N. *Catal. Rev.* **2019**, *61*, 84–110.

⁸⁶ Kumar, S.; Krishnananth, S.; Mathew, J.; Pomerantz, Z.; Lellouche, J.-P.; Ghosh, S. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 2570–2579.

Le bras espaceur **34a** ainsi obtenu a par la suite été engagé dans une réaction de cycloaddition de Huisgen CuAAC avec le composé **31**, conduisant à la formation d'un unique cycloadduit à température ambiante (*Schéma 15*).

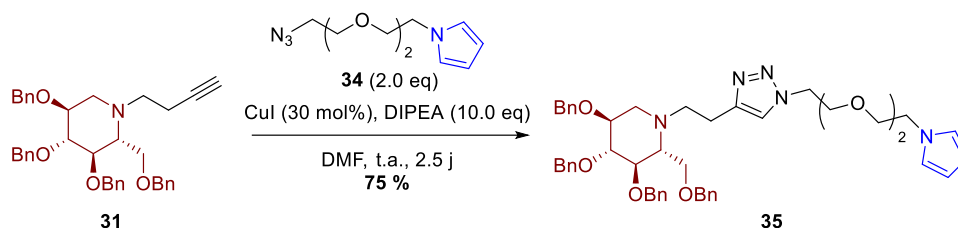


Schéma 15

Selon les observations rapportées par Marra *et al.*,⁸⁷ dans un cycloadduit substitué en -1,4, la différence de déplacements chimiques des deux atomes de carbone du triazole ($\delta_{C4}-\delta_{C5}$) est positive (~ 25 ppm), alors qu'elle est négative (~ -5 ppm) pour un cycloadduit substitué en -1,5. Comme le montre la *Figure 18*, le spectre DEPTQ du produit unique obtenu (**35**) suggère que ce composé soit substitué en -1,4 ($\delta_{C4}-\delta_{C5} = 23.5$ ppm), ce qui est cohérent avec la réaction de Huisgen CuAAC.

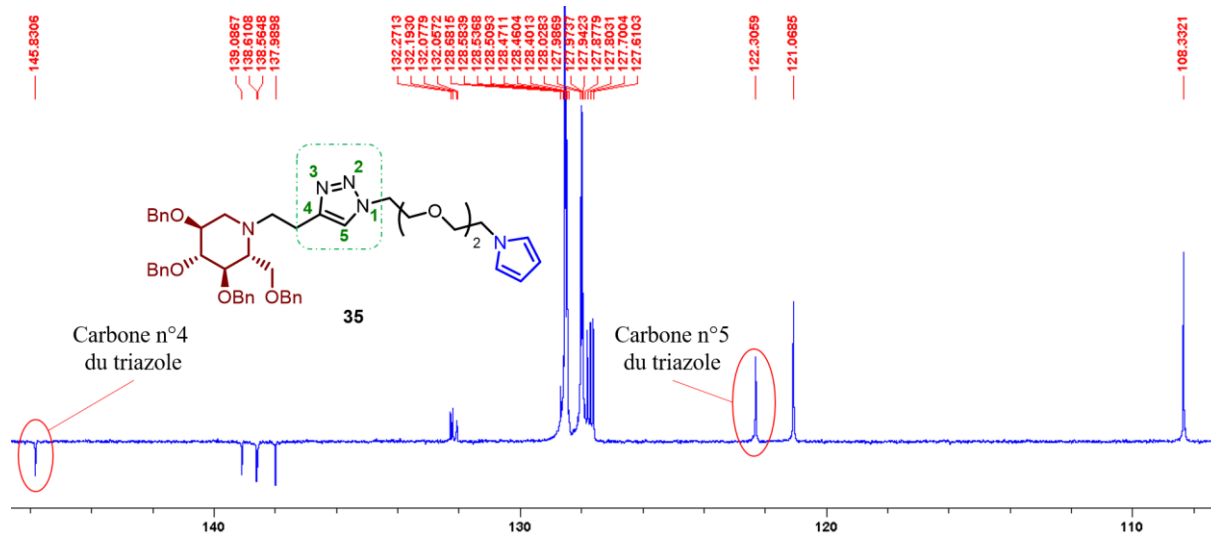


Figure 18 : Spectre DEPTQ partiel du cycloadduit **35** en solution dans $CDCl_3$

À l'issue de cette étape, le retrait des groupements benzyles demeurerait la dernière étape à accomplir afin que le noyau iminosucre puisse convenablement interagir avec les glycosidases. Malheureusement, malgré plusieurs tentatives, l'hydrogénolyse pallado-catalysée de **35** s'est avérée difficile et nous n'avons pas réussi à isoler le composé souhaité (*Schéma 16*). En effet les réactions de débenzylation pallado-catalysées peuvent être inhibées par les amines, ce qui est parfois utilisé avantageusement dans certaines synthèses, par exemple afin de discriminer un groupe benzyle (Bn) d'un carbamate de benzyle (Cbz).⁸⁸

⁸⁷ a) Marra, A.; Vecchi, A.; Chiappe, C.; Melai, B.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2458–2461. b) Dondoni, A.; Marra, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546–7557.

⁸⁸ Czech, B. P.; Bartsch, R. A. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4076–4078.

Cependant, lorsque l'amine et les groupes benzyles à retirer sont indissociables, il est souvent nécessaire d'opérer en milieu acide pour éviter l'empoisonnement du catalyseur par l'atome d'azote et réaliser convenablement la débenzylation.

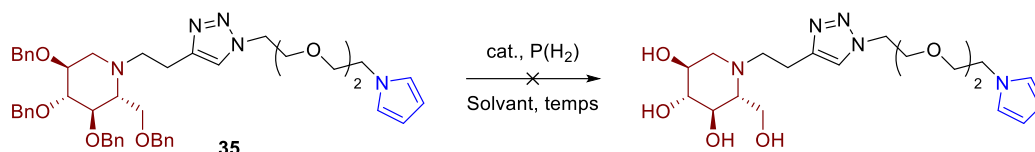


Schéma 16

Dans un premier temps, le PdCl₂ (0.5 eq) a été employé à la fois en tant que source de palladium et d'acide (ce complexe générant deux molécules de HCl lors de son activation), dans le méthanol et sous pression atmosphérique d'hydrogène selon des conditions mises en œuvre par Szcześniak *et al.*⁸⁹ Néanmoins, après 1 jour de réaction à température ambiante, l'analyse du mélange réactionnel brut par RMN ¹H a révélé la présence de signaux aromatiques correspondant à des protons de groupes benzyles, mettant en évidence une réaction incomplète alors que la disparition des signaux caractéristiques du noyau pyrrole suggérait une polymérisation de celui-ci. Une analyse par spectrométrie de masse du mélange obtenu n'a pas permis de mettre en évidence la présence du produit attendu. Un deuxième essai a été réalisé en utilisant le palladium sur charbon (0.2 eq) et en augmentant la pression de H₂ (3 atm) dans un mélange d'acide acétique et d'éthanol (1 : 1 en volume).⁹⁰ Après 24 heures, l'analyse par RMN ¹H du mélange brut obtenu a révélé la présence du composé **35**. Cependant, l'intégration des signaux du pyrrole et des signaux aromatiques correspondant aux groupements benzyles suggère une dégradation du pyrrole. Un dernier essai a été mis en œuvre en utilisant un mélange d'acide acétique, de tétrahydrofurane et d'eau (4 : 2 : 1 en volume, respectivement), en conservant le Pd/C en tant que catalyseur.⁹¹ Malgré un temps de réaction accru, des signaux aromatiques correspondant aux groupements benzyles ont là aussi été observés par RMN ¹H, tandis que les signaux caractéristiques du pyrrole avaient disparu. Une analyse par spectrométrie de masse n'a pas permis de révéler de traces du produit attendu. Ces essais préliminaires d'hydrogénolyse du composé **35** ont donc mis en évidence la difficulté à manipuler le noyau pyrrole sensible dans les conditions d'hydrogénolyse, et la nécessité de retarder le plus possible la formation de ce noyau dans la voie de synthèse. La stratégie de synthèse a donc été modifiée afin de procéder à la formation du noyau pyrrole après la débenzylation du noyau iminosucre.

Afin de tester cette nouvelle approche, deux nouveaux bras espaceurs **36a** et **36b** ont été préparés, chacun comportant une fonction azoture, et une fonction amine primaire protégée sous forme de carbamate de benzyle (Schéma 17).

⁸⁹ Szcześniak, P.; Stecko, S.; Staszewska-Krajewska, O.; Furman, B. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1880–1888.

⁹⁰ Pabba, J.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 2006–2019.

⁹¹ Ye, X.-S.; Sun, F.; Liu, M.; Li, Q.; Wang, Y.; Zhang, G.; Zhang, L.-H.; Zhang, X.-L. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3688–3691.

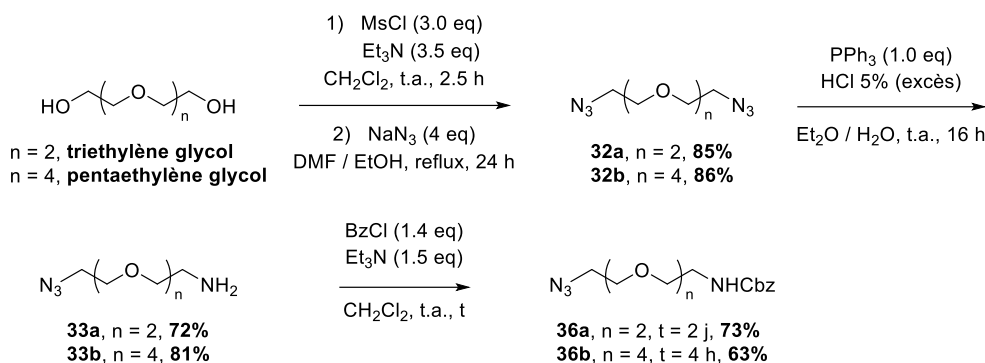


Schéma 17

Ces composés **36a** et **36b** constituent deux bras espaceurs de tailles différentes, ce qui pourra influencer les propriétés des sondes après leur greffage sur surface solide. En effet la taille (et la rigidité) des bras conditionnera l'accessibilité des noyaux iminosucres, cruciale pour la bonne association avec les glycosidases en solution. La synthèse de l'amine **33a** ayant déjà été entreprise, la synthèse de **36a** a été réalisée à partir de ce composé. Le bras espaceur **36b** a pour sa part été préparé à partir du pentaéthylène glycol en utilisant des conditions identiques à celles employées pour la synthèse de **36a**. La cycloaddition de Huisgen CuAAC du dérivé alcynylé **31** avec les bras espaceurs **36a** et **36b** a été réalisée comme précédemment, et a conduit uniquement aux régioisomères -1,4 (respectivement **37a** et **37b**) avec d'excellents rendements (Schéma 18).

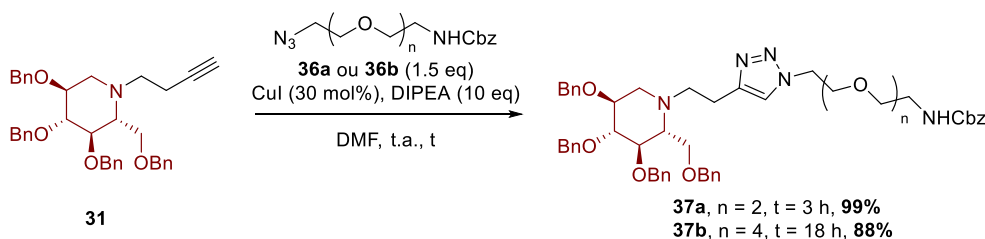


Schéma 18

Le retrait des groupes benzyles (Bn) et carboxybenzyle (CBz) a par la suite été réalisé en une étape, par hydrogénolyse pallado-catalysée en milieu acide (Schéma 19). En l'absence de fonction sensible à l'acidité du milieu, un large excès d'acide chlorhydrique a été employé afin de neutraliser les effets de l'amine tertiaire présente et de l'amine primaire libérée lors du retrait du carboxybenzyle. Dans ces conditions, les produits **38a** et **38b** ont été obtenus avec d'excellents rendements.

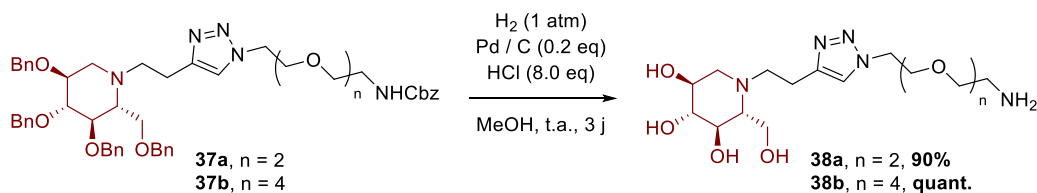


Schéma 19

À l'issue de cette étape, la formation du noyau pyrrole a été réalisée par la méthode de Paal-Knorr (*Schéma 20*), en utilisant un précurseur de succinaldéhyde, le 2,5-diméthoxytétrahydrofurane (**39**) dans un mélange d'acide acétique et d'eau,⁸⁶ ces conditions ayant donné de bons résultats lors de la synthèse de **34a**.

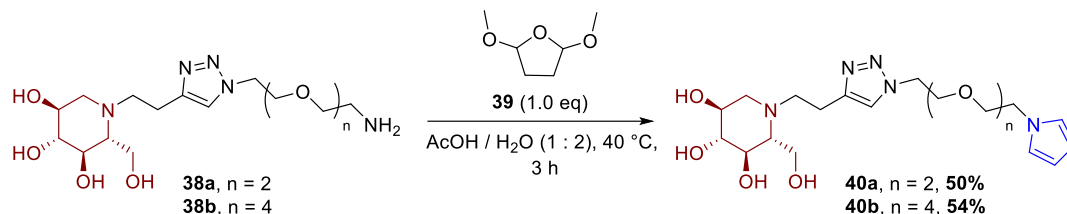


Schéma 20

L'inconvénient majeur de cette réaction est la génération de produits secondaires résultant de la polymérisation du succinaldéhyde, qui peut être limitée par un suivi assidu de la réaction par LC-MS ainsi qu'un bon contrôle de la température. Malgré ces précautions, la présence de sous-produits complexifie fortement la purification par chromatographie préparative (HPLC en phase inverse) et les composés souhaités **40a** et **40b** n'ont été isolés qu'avec des rendements modestes.

Le noyau pyrrole a donc été introduit par une seconde méthode, en couplant l'amine primaire à un ester activé fonctionnalisé par un noyau pyrrole. Cette méthode a été largement décrite dans la littérature, les esters de *N*-hydrosuccinimide étant souvent utilisés dans l'eau,⁹² ou le DMF,⁹³ avec de bons résultats. Dans un premier temps, l'acide 3-aminopropanoïque aussi appelé aussi β -alanine (**41**) a été converti en **42** par le biais d'une synthèse de Paal-Knorr (*Schéma 21*) dans des conditions déjà utilisées précédemment. La transformation de **42** à **43** a ensuite été réalisée comme préconisée dans la littérature,⁹⁴ en employant le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) en tant que réactif de couplage. Cette réaction mène à la formation du composé **43** sous la forme d'un solide blanc peu soluble dans l'eau.

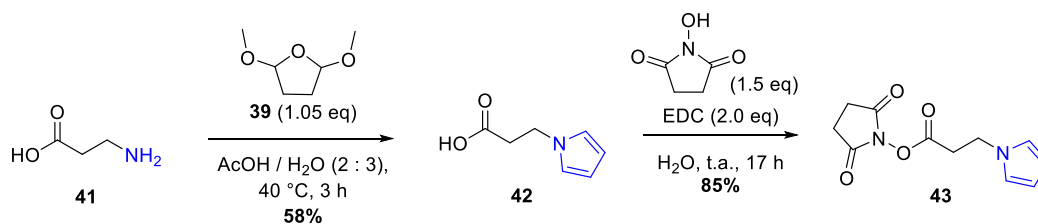


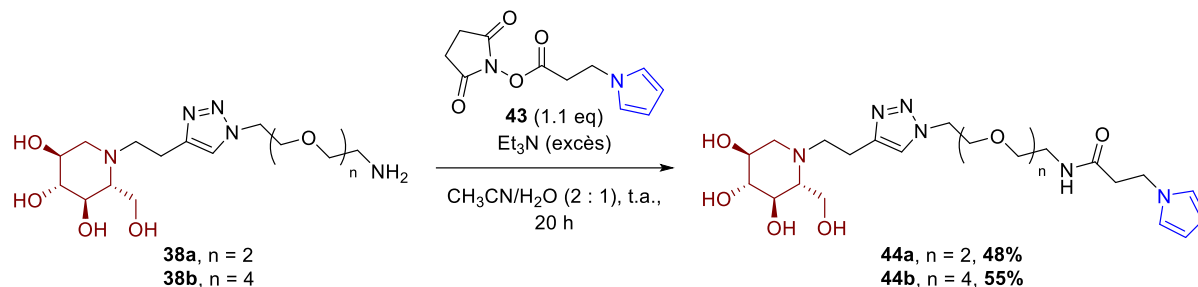
Schéma 21

⁹² Murata, H.; Cummings, C. S.; Koepsel, R. R.; Russell, A. J. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1919–1926.

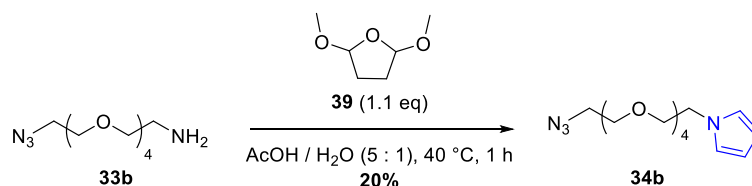
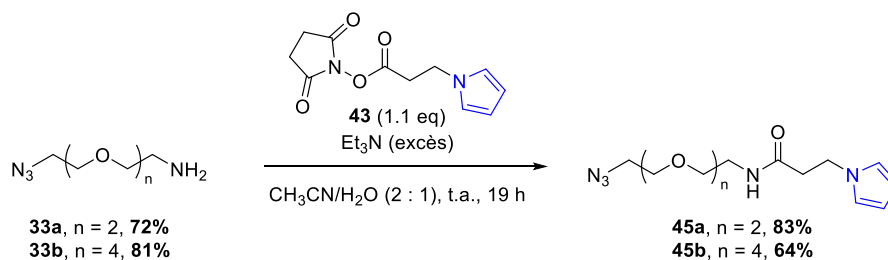
⁹³ Hendrick, C. E.; Jorgensen, J. R.; Chaudhry, C.; Strambeanu, I. I.; Brazeau, J.-F.; Schiffer, J.; Shi, Z.; Venable, J. D.; Wolkenberg, S. E. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 1182–1190.

⁹⁴ Azioune, A.; Ben Slimane, A.; Ait Hamou, L.; Pleuvy, A.; Chehimi, M. M.; Perruchot, C.; Armes, S. P. *Langmuir* **2004**, *20*, 3350–3356.

Les amines primaires **38a** ou **38b** ont été ensuite additionnées sur le composé **43** afin de former les amides **44a** et **44b** correspondant, selon des conditions réactionnelles proches de celles préconisées par Washner *et al.*⁹⁵ Cependant, au lieu d'utiliser la DIPEA pour contrôler précisément le pH à 9.4 comme préconisé, la réaction a été conduite en présence d'un excès de triéthylamine (**Schéma 22**).



Dans ces conditions la conversion des amines **38a** et **38b** a été complète après une vingtaine d'heures, et seuls les produits **44a** et **44b** ont été identifiés dans le produit brut, ainsi que le *N*-hydrosuccinimide et le composé **43**, ce réactif étant utilisé en léger excès. Pour cette raison, une purification par chromatographie HPLC préparative en phase inverse a été réalisée. Celle-ci engendrant une importante perte de matière, les rendements obtenus à l'aide de cette seconde méthode ne sont pas supérieurs à ceux délivrés par la précédente synthèse de Paal-Knorr. Ainsi, à l'issue de ces premières synthèses, 4 sondes de **type 1** ont été obtenues, en 8 étapes à partir du tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose. En utilisant les mêmes conditions réactionnelles, des composés témoins ont été synthétisés à partir des composés **33a** et **33b** (**Schéma 23** et **Schéma 24**). Ces composés ont plus tard été utilisés pour vérifier que l'activité inhibitrice des différentes sondes peut être corrélée à la présence des noyaux iminosucres, et ont également été utilisés au cours des expériences de SP*Ri*.



⁹⁵ Washner, J.; Désogère, P.; Abston, E.; Graham-O'Regan, K. A.; Wang, J.; Rotile, N. J.; Schirmer, M. D.; Santos Ferreira, D. D.; Sui, J.; Fuchs, B. C.; Lanuti, M.; Caravan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5593–5596.

On remarque que les rendements sont supérieurs pour les composés **45a** et **45b** à ceux obtenus pour les sondes **44a** et **44b**. Ceci s'explique par l'absence de noyau iminosucre : il n'est pas nécessaire dans ce cas de recourir à la chromatographie HPLC préparative et ces composés ont pu être purifiés par chromatographie sur colonne de silice (phase normale), ce qui a minimisé les pertes de matière. En revanche, le composé **34b** a été obtenu avec un rendement faible, car la réaction (suivie par CCM) a été arrêtée avant complétion pour éviter toute polymérisation de **34b** (afin d'être utilisé comme contrôle, seule une quantité limitée de **34b** était requise).

II. Synthèse de sondes basées sur des pipéridines comportant un centre quaternaire en α de l'azote

L'addition de précurseurs de bras espaceurs alcynylés sur la cétonitrone **3** dérivée du L-sorbose (**Schéma 25**) a été envisagée suite aux travaux relatifs à l'alcynylation diastéréosélective de cette cétonitrone, afin d'accéder rapidement à des sondes comportant à la fois la structure D-*gluco* et un centre quaternaire en α de l'azote.

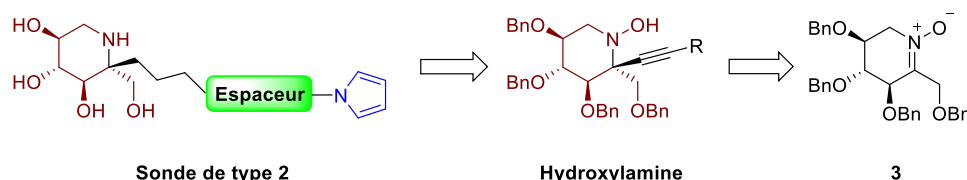


Schéma 25

Après une revue bibliographique sur les réactions d'alcynylation de nitrones cycliques polyalcoylées et les diastéréosélectivité observées, ce type de réaction a tout d'abord été mis en œuvre entre la cétonitrone **3** et un alcyne simple, le triméthylsilylacétylène. Puis elle a été reproduite en utilisant des bras espaceurs dérivés de polyéthylène glycols propargylés.

II.1. Revue bibliographique sur l'alcynylation de nitrones

L'addition nucléophile d'alcynes sur des nitrones est une réaction connue depuis les années 1990, les premiers exemples ayant été rapportés par Tronchet *et al.*,⁹⁶ ainsi que Merino *et al.*⁹⁷ Lorsque la nitrone de départ comporte un ou plusieurs centres stéréogènes, la diastéréosélectivité de cette réaction peut être excellente, selon la position du ou des centres stéréogènes. Par souci de concision, nous nous focaliserons ici sur les exemples d'alcynylations diastéréosélectives d'aldonitrones et de cétonitrones endocycliques. Pour réaliser de telles réactions, différents alcynures organométalliques ont été employés, tels que des alcynures de lithium, de magnésium, de zinc, d'aluminium ou de cuivre.

Les alcynyl lithiens

En 1995, Tronchet *et al.* ont rapporté le premier exemple d'alcynylation d'une nitrone cyclique polyalcoylée à 5 chaînons (**Schéma 26**).⁹⁶ L'addition nucléophile sur l'aldonitrone **46** d'un phénylacétylure organométallique a été décrite comme complètement diastéréosélective, celui-ci s'additionnant sur la face opposée au substituant en C3 pour former uniquement l'hydroxylamine **47** de configuration relative *trans* en positions C2 et C3.

⁹⁶ Tronchet, J. M. J.; Balkadjian, M.; Zosimo-Landolfo, G.; Barbalat-Rey, F.; Lichtle, P.; Ricca, A.; Komaromi, I.; Bernardinelli, G.; Geoffroy, M. *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 17–34.

⁹⁷ Merino, P.; Anoro, S.; Castillo, E.; Merchan, F.; Tejero, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1887–1890.

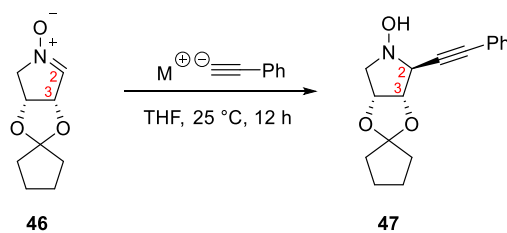


Schéma 26

Malheureusement, cet article comportant des contradictions, il n'est pas possible de savoir si l'acétylure employé était un acétylure de sodium (indiqué en partie expérimentale) ou de lithium (tableau récapitulatif des résultats). De même il est impossible de savoir si le rendement de la réaction est de 20% (tel qu'indiqué dans le texte), ou de 80% (dans le tableau des résultats).

Quelques années plus tard, Murahashi *et coll.* ont réalisé la synthèse d'alcoïdes bicycliques en utilisant des nitrones préparées à partir d'acides α -aminés. Au cours de ce travail, ils ont étudié la diastéréosélectivité de l'alcynylation de l'aldonitronne à 5 chaînons **48**, substituée en C4 (Schéma 27).⁹⁸ La formation préférentielle du produit **49a** de configuration relative *trans* en C2 et C4 résulte d'une addition de l'alcynure de lithium sur la face *Re*, et a été rationalisée par l'encombrement stérique du substituant OTBS qui adopterait une position quasiment axiale et écranterait la face *Si* (Figure 19).

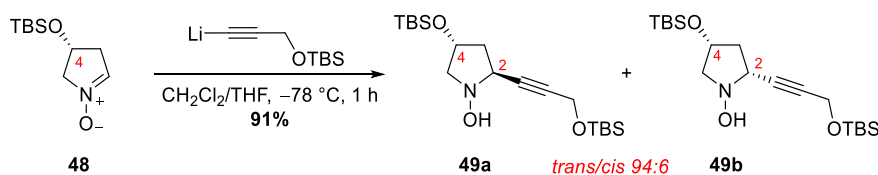


Schéma 27

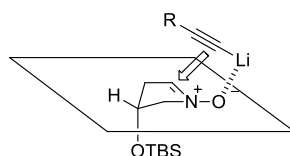
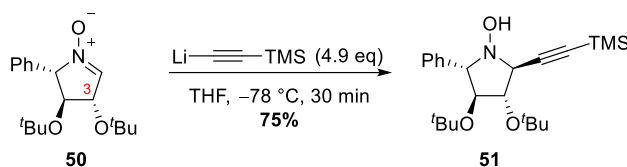


Figure 19 : Alcynylation diastéréosélective d'une aldinitrone cyclique - Murahashi *et coll.*

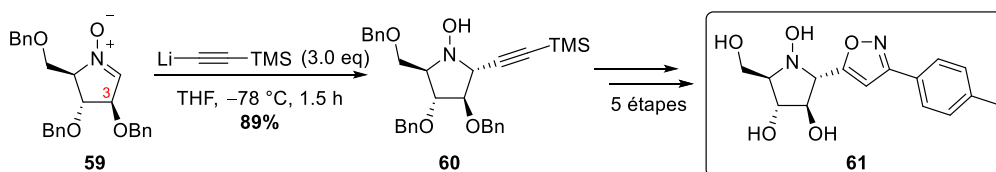
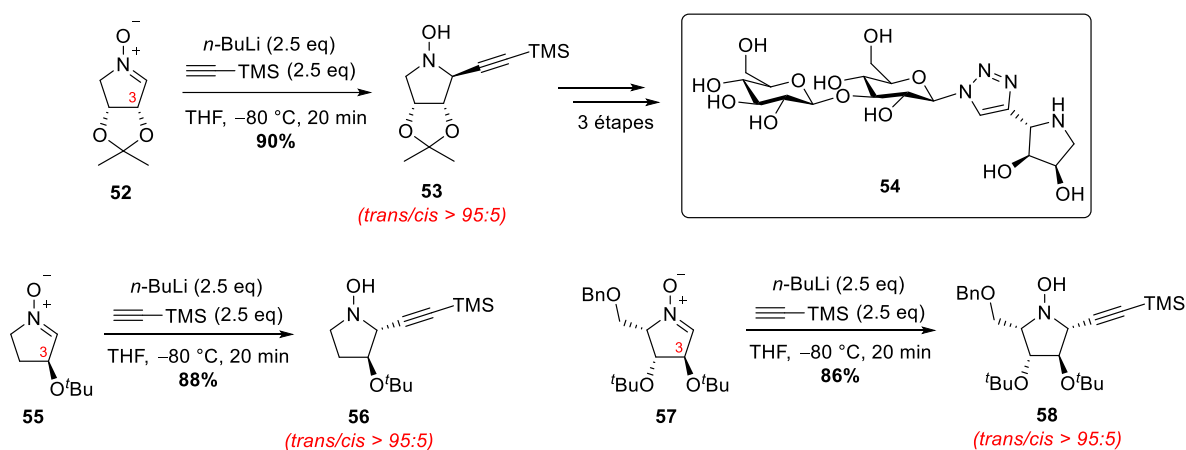
L'alcynure ayant probablement été le plus utilisé lors d'additions nucléophiles sur des nitrones est le triméthylsilylacétylure de lithium (généralement préparé par addition de *n*-BuLi sur un excès d'alcyne à -10 °C dans le THF). En 2003, le groupe de Goti a décrit son addition sur l'aldonitronne **50** dans le THF à -78 °C, conduisant à l'hydroxylamine **51** avec une diastéréosélectivité totale (Schéma 28).⁹⁹

⁹⁸ Ohtake, H.; Imada, Y.; Murahashi, S.-I. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1999**, 72, 2737–2754.

⁹⁹ Goti, A.; Cicchi, S.; Mannucci, V.; Cardona, F.; Guarna, F.; Merino, P.; Tejero, T. *Org. Lett.* **2003**, 5, 4235–4238.



Plus tard, cette réaction sera utilisée sur trois autres aldionitrone à 5 chaînons (**52**, **55**, et **57**) par l'équipe de Merino,¹⁰⁰ constituant l'étape clé de la synthèse de plusieurs glycomimétiques. Pour chacune des trois additions, un ratio diastéréoisomérique supérieur à 95:5 a été observé en faveur du produit *trans*. Cette excellente diastéréosélectivité a été expliquée par un contrôle stérique, le nucléophile approchant à l'opposé du substituant en C3. Les hydroxylamines **53**, **56** et **58** ont été transformées en pyrrolidines, puis greffées par cycloaddition de Huisgen à des mono-, di-, ou trisaccharides, pour aboutir à des glycomimétiques tels que **54** (Schéma 29). Le groupe de Cheng a aussi adopté une approche similaire pour la synthèse de pyrrolidines comportant un motif triazolyle ou isoxazolyle, qui ont été évaluées comme inhibiteurs de glycosidases (Schéma 30).¹⁰¹



Tyler *et coll.* ont décrit l'alcynylation de l'aldionitrone cyclique **65** dérivée du D-ribofuranose par le 1-lithio-diéthoxypropyne qu'ils ont comparé à la même réaction sur l'imine **62**, laquelle requiert l'ajout dans le milieu réactionnel d'une quantité stœchiométrique de tétrachlorure d'étain (Schéma 31).¹⁰²

¹⁰⁰ García-Viñuales, S.; Delso, I.; Merino, P.; Tejero, T. *Synthesis* **2016**, 48, 3339–3351.

¹⁰¹ Lin, C.-K.; Cheng, L.-W.; Li, H.-Y.; Yun, W.-Y.; Cheng, W.-C. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 2100–2107.

¹⁰² Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Hausler, H.; Larsen, J. S.; Tyler, P. C. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2217–2220.

Les auteurs ont noté la meilleure réactivité de la nitrone **65**. Cependant ils ont par la suite rencontré des difficultés pour réduire l'hydroxylamine **66** en amine secondaire en présence de poudre de zinc, cette réaction étant systématiquement accompagnée par une réduction importante de l'alcyne en alcène. Le rendement de l'alcynylation de **65** n'est pas mentionné, et la diastéréosélectivité des deux additions n'est pas commentée.

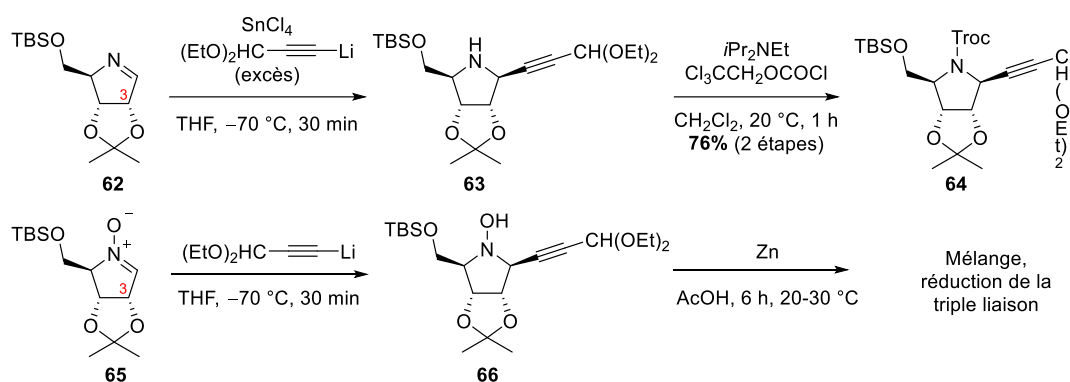


Schéma 31

Enfin, l'alcynylation diastéréosélective de l'aldonitronne à 6 chaînons **67** a été une étape clé dans la synthèse de la (+)-swainsonine proposée par le groupe de Caprio (Schéma 32).¹⁰³ Celle-ci a été réalisée comme précédemment dans le THF à -78°C et a conduit à l'hydroxylamine **68** de configuration *trans* de façon totalement diastéréosélective, et avec un excellent rendement de 90%. La synthèse de la molécule **33** présentée dans le même article a permis de montrer que cette méthode pouvait être étendue à la synthèse de quinolizidines.

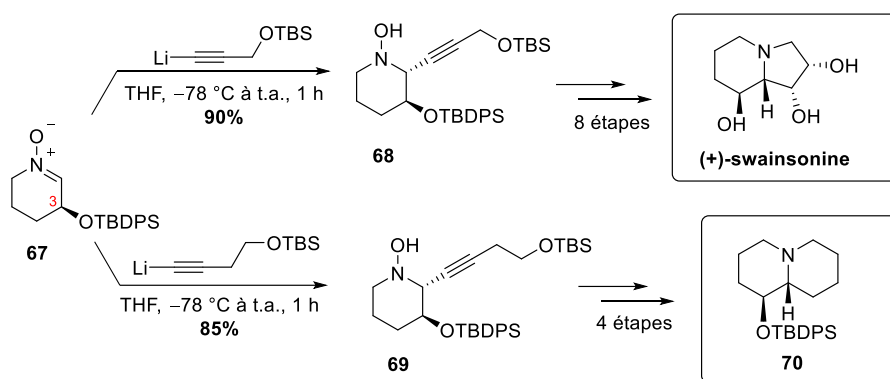


Schéma 32

Les auteurs ont rationalisé la stéréosélectivité de ces additions par un contrôle stérique de l'approche du nucléophile avec une trajectoire axiale sur un conformère majoritaire de la nitrone **67** (demi-chaîne dans laquelle le groupe OTBDPS en C3 serait axial) qui serait stabilisé par un recouvrement entre les orbitales π^* de la C=N et σ^* de la CO. Cet exemple est à notre connaissance le seul exemple d'alcynylation d'une nitronne cyclique alcoylée à 6 chaînons ayant été publié avant nos travaux.

¹⁰³ Archibald, G.; Lin, C.-P.; Boyd, P.; Barker, D.; Caprio, V. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7968–7980.

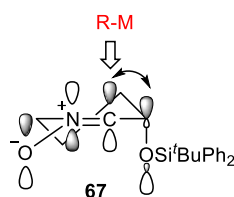


Figure 20 : Stéréosélectivité de l'alcynylation de la nitrone cyclique **67** – Caprio et coll.

Les alcynyl zinciques

En 1999, le groupe de Carreira a préconisé l'emploi de quantités catalytiques de $Zn(OTf)_2$ en présence d'amines tertiaires pour induire l'alcynylation d'aldonitrones acycliques en évitant la formation d'acétylures basiques, tels que les lithiens ou les magnésiens.¹⁰⁴ Quelques années plus tard, la même équipe a publié une « méthode optimisée », employant 1.5 équivalent de $ZnCl_2$ et 1.5 équivalent de triéthylamine dans le toluène à température ambiante pour réaliser ces transformations.¹⁰⁵ En réalité, cette méthode n'est applicable qu'à l'addition d'alcynes vrais particulièrement encombrés tels que le triméthylsilylacétylène, le phénylacétylène, ou le 2-méthyl-3-butyne-2-ol, le $ZnCl_2$ catalysant une cyclisation en isoxazolines dans le cas d'alcynes moins encombrés. De façon indépendante, notre équipe a aussi constaté que l'alcynylation de nitrones pouvait être effectuée dans des conditions douces et en l'absence de base, en traitant un mélange de nitrone et d'alkyne vrai en solution dans le toluène par 20 mol% de diéthylzinc, à température ambiante.¹⁰⁶ Liu *et al.* ont judicieusement exploité cette méthode pour additionner l'alkyne **72** sur l'aldonitrone à 5 chaînons **71** dérivée du D-glucose, et ainsi accéder à l'hydroxylamine **73**, un précurseur du *pseudo*-disaccharide **74** comme inhibiteur potentiel d'UDP-Galf transférase mycobactérienne (Schéma 33).¹⁰⁷

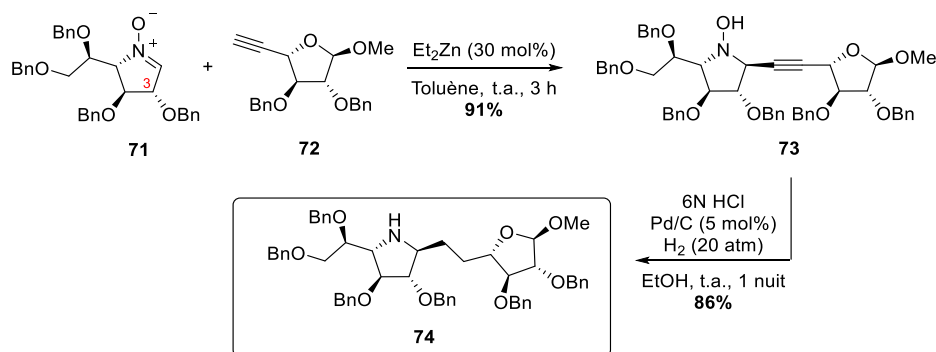


Schéma 33

¹⁰⁴ (a) Frantz, D. E.; Fässler, R.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11245–11246. (b) Fässler, R.; Frantz, D. E.; Oetiker, J.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *41*, 3054–3056.

¹⁰⁵ Topić, D.; Aschwanden, P.; Fässler, R.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5329–5330.

¹⁰⁶ Pinet, S.; Pandya, S. U.; Chavant, P. Y.; Ayling, A.; Vallée, Y. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1463–1466.

¹⁰⁷ Liu, C.; Kang, H.; Wightman, R. H.; Jiang, S. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1192–1194.

Lors de cette alcynylation, l'hydroxylamine **73** a été obtenue avec un excellent rendement de 91% sous la forme d'un seul diastéréoisomère.

Plus récemment, le groupe de Kobayashi a préconisé l'usage d'une quantité catalytique de In(HMDS)₂OTf (1 mol%) dans le THF,¹⁰⁸ ou de Zn(HMDS)₂ (5 mol%) dans le toluène,¹⁰⁹ pour réaliser ce type de transformation de façon encore plus efficace que par l'usage du diéthylzinc ou du mélange de tribromure d'indium et de *N,N*-diisopropyléthylamine (15-25 mol%).¹¹⁰ Cependant, aucun des exemples reportés dans ces études ne permet d'analyser la stéréosélectivité de ces réactions.

Les alcynyl alanes et les alcynylcuivreux

En 2007, l'addition d'alcynes vrais sur des nitrones en présence d'une quantité stoechiométrique de triméthylaluminium a été rapportée dans la littérature sur des nitrones acycliques,¹¹¹ suivie très rapidement par les travaux de Pillard *et al.* sur une nitronne endocyclique à 5 chaînons dérivée du D-arabinose (**Schéma 34**).¹¹²

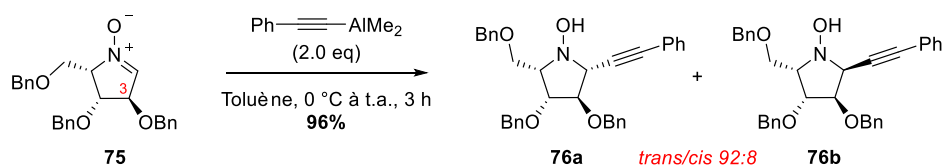


Schéma 34

La réaction entre l'acétylure d'aluminium et la nitronne **75** dans le toluène a permis d'obtenir d'excellents rendements et un bon ratio diastéréoisomérique de 92/8 en faveur du produit *trans* **76a**, qui correspond à une attaque du nucléophile sur la face prochirale *Re* de la nitronne **75**. Cette approche du nucléophile a pu être rationalisée par les auteurs à l'aide d'un modèle de Felkin-Ahn.

Enfin, le groupe de Michalak a récemment décrit l'utilisation d'un complexe de cuivre (I) comportant un ligand carbène *N*-hétérocyclique comme catalyseur de l'alcynylation en phase aqueuse de nitrones insolubles dans l'eau. Cette réaction a lieu en présence d'une base telle que la triéthylamine pour les alcynes comportant un substituant aromatique ou la *N,N,N',N'*-tétraméthylguanidine pour les alcynes comportant un substituant aliphatique, qui sont moins acides.¹¹³ Plusieurs alcynes vrais ont ainsi été additionnés en présence de triéthylamine à des aldonitrones cycliques à 5 chaînons, avec de bons rendements ainsi qu'une excellente diastéréosélectivité (**Schéma 35**). Cette méthode a notamment été appliquée à une synthèse efficace de la (+)-lentiginosine à partir de la nitronne **80** (l'hydroxylamine **82** ayant été obtenue avec un rapport diastéréoisomérique de 89:11).

¹⁰⁸ Yamashita, Y.; Saito, Y.; Imaizumi, T.; Kobayashi, S. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3958–3962.

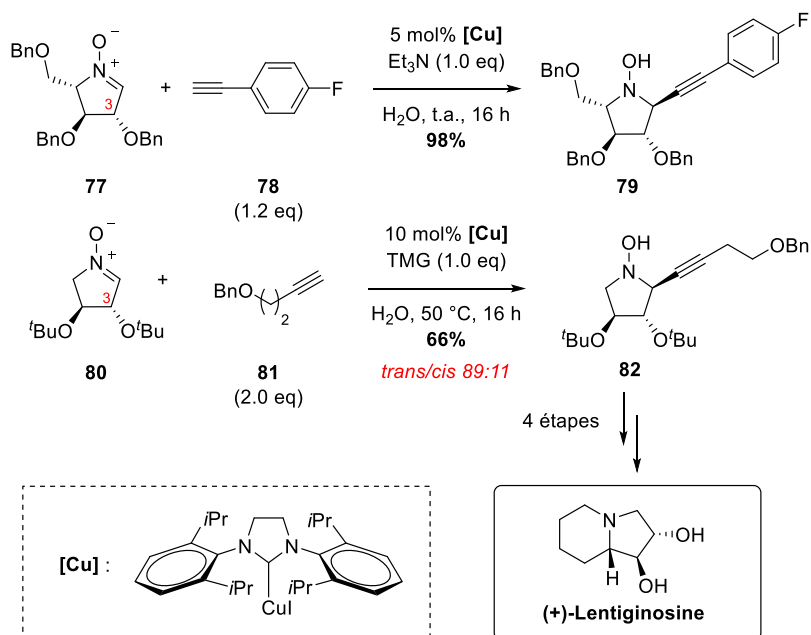
¹⁰⁹ Saito, Y.; Yamashita, Y.; Kobayashi, S. *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 976–977.

¹¹⁰ Ji, D.-M.; Xu, M.-H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2952–2955.

¹¹¹ Bunlaksananusorn, T.; Lecourt, T.; Micouin, L. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1457–1459.

¹¹² Pillard, C.; Desvergnès, V.; Py, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6209–6213.

¹¹³ Woźniak, Ł.; Staszewska-Krajewska, O.; Michalak, M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1933–1936.



L'ensemble des exemples d'alcynylation de nitrones décrits ci-dessus montre que quel que soit le composé organométallique utilisé, l'addition sur des aldonitrones cycliques (le plus souvent à 5 chaînons) se produit généralement sur la face opposée au substituant alcoxy situé en position 3 ou 4 de la nitron. Les diastéréosélectivités décrites sont généralement très bonnes, et les hydroxylamines propargyliques résultant de ces réactions sont souvent isolées sous la forme d'un seul diastéréoisomère.

Alcynylation de cétonitrones

L'alcynylation de cétonitrones a été beaucoup moins étudiée que celle des aldonitrones. À notre connaissance, seules trois équipes se sont intéressées à ce type de réaction. Dans l'objectif de synthétiser des radicaux nitroxydes α,α' -tétrasubstitués, l'équipe de Hideg a additionné des alcynures de magnésium (préparés par réaction d'alcynes vrais avec du bromure d'éthylmagnésium dans le THF), sur des cétonitrones endocycliques à 5 chaînons non chirales,¹¹⁴ mais aussi sur des cétonitrones chirales à 5 ou 6 chaînons (**Schéma 36**).¹¹⁵ Cette équipe a observé que les hydroxylamines propargyliques issues de ces réactions pouvaient ensuite évoluer vers la formation d'isoxazolines, résultant de leur cyclisation spontanée. Lors de l'alcynylation des nitrones chirales **86** et **87**, des mélanges de diastéréoisomères ont toujours été obtenus, dans lesquels les hydroxylamines résultant d'une alcynylation sur la face opposée au substituant benzyle sont majoritaires (r.d. > 70:30).

¹¹⁴ (a) Bárácz, N. M.; Hankovszky, O. H.; Sár, G. P.; Jerkovich, K.; Hideg, K. *Synthesis* **1996**, 2, 204–208. (b) Sár, C. P.; Jekő, J.; Fajér, P.; Hideg, K. *Synthesis* **1999**, 6, 1039–1045. (c) Sár, C. P.; Ösz, E.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2005**, 2, 255–259. (d) Balog, M.; Abé, C.; Kálai, T.; Steinhoff, H.-J.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2007**, 11, 1663–1670.

¹¹⁵ Sár, C. P.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Arkivoc* **2012**, 5, 47–59.

Bien que les auteurs n'aient pas discuté cette sélectivité, on peut supposer que l'encombrement dû au substituant benzyle est responsable de l'approche du nucléophile sur la face opposée. Cependant, la stéréo-différenciation du benzyle avec le méthyle est moins bonne qu'avec un atome d'hydrogène, et la diastéréosélectivité se retrouve moins bonne que dans les cas précédents.

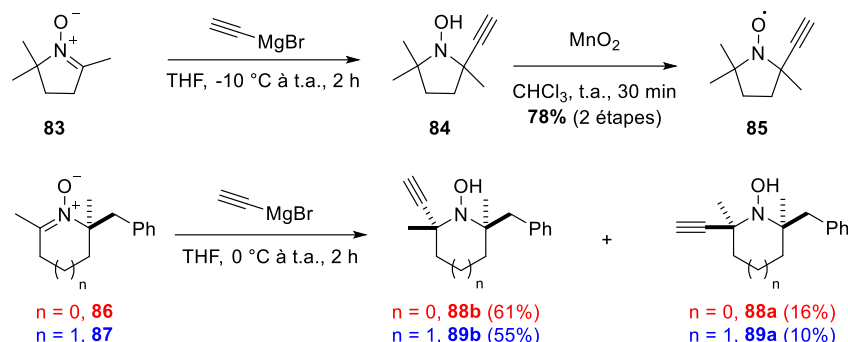


Schéma 36

Des membres de notre équipe ont étudié l'alcynylation de la cétonitrone **90** synthétisée à partir d'une imidazolidinone, comme méthode pour accéder à des précurseurs d'acide α -aminés quaternaires (Schéma 37).¹¹⁶ Au cours de ces travaux, il s'est avéré que l'alcynylation de la cétonitrone **90** qui est relativement encombrée nécessitait l'utilisation de quantités stoechiométriques de diméthylzinc, alors que des quantités catalytiques avaient été utilisées avec succès dans le cas d'aldonitrone acycliques,¹⁰⁶ ou cycliques.¹⁰⁷ De plus, il a été observé que dans les conditions réactionnelles employées, l'hydroxylamine issue de l'addition nucléophile se transformait en imidazoisoxazole par une cyclisation. Par exemple, l'addition de 1-éthynylcyclohexène sur la nitronne **90** a mené à un mélange d'hydroxylamine **91** et d'imidazoisoxazole **92**, dans un rapport proche de 1 / 1 après 6 heures de réaction. Avec un temps de réaction de 18 heures, l'imidazoisoxazole **92** est même obtenu seul (94%).

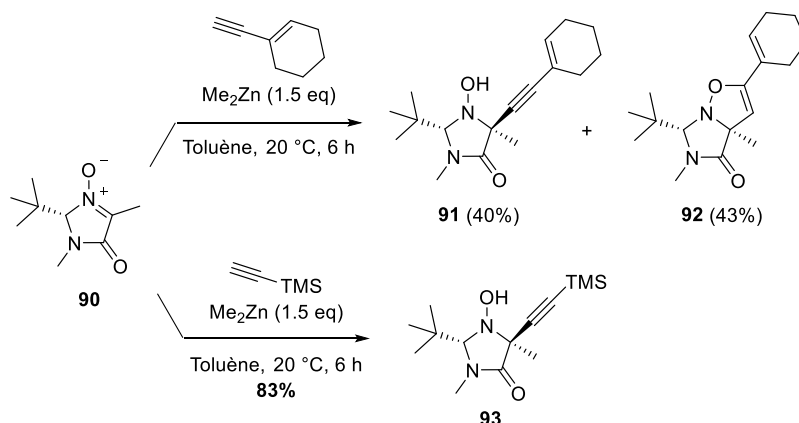


Schéma 37

Cette cyclisation a été observée sur la quasi-totalité des produits d'addition et seule l'utilisation de triméthylsilylacétylène, qui est un alcyne encombré, a mené à un unique produit : l'hydroxylamine **93**.

¹¹⁶ Cantagrel, F.; Pinet, S.; Gimbert, Y.; Chavant, P. Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2694–2701.

Dans tous les cas, la diastéréosélectivité de l'addition nucléophile a été totale, en faveur d'une addition en *trans* du groupement *tert*-Bu, qui écranthe la face *Re* de la nitrone **90**.

Enfin, Murga *et coll.* ont étudié la stéréosélectivité de l'addition de divers composés organométalliques (alkyl-, aryl-, allyl- et alcynyl- lithiens ou magnésiens) sur une cétonitronne endocyclique **58** dérivée du L-érythrose (**Schéma 38**).¹¹⁷ Quelles que soient les espèces utilisées, les auteurs ont observé que le nucléophile approchait majoritairement sur la face *Si* de la nitrone, avec des diastéréosélectivités moyennes à bonnes (r.d. de 70:30 à 95:5).

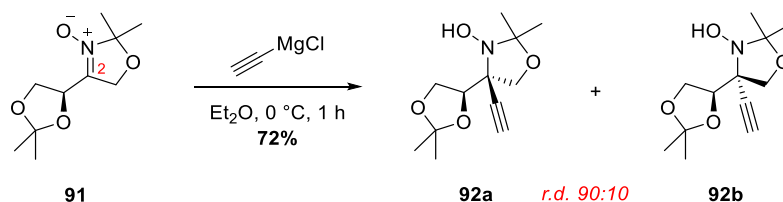


Schéma 38

Parmi ces exemples, la réaction d'alcynylation de **91** par le chlorure d'acétylénymagnésium dans l'éther à 0 °C a conduit à la formation des hydroxylamines propargyliques diastéréoisomères **92a** et **92b** en proportions 90:10, avec un rendement de 72%.

II.2. Alcynylation diastéréosélective de la cétonitronne **3** par le TMS acétylène

Les premiers essais d'alcynylation réalisés au cours de ce travail ont été effectués avec le triméthylsilylacétylène, pour former l'hydroxylamine **93**, qui sera utilisée comme intermédiaire clé de la synthèse des indolizidines (présentée dans le chapitre III de ce manuscrit).

Comme nous l'avons vu précédemment, aucun exemple d'alcynylation de cétonitronne polyalcoylée à 6 chaînons n'avait été décrit dans la littérature avant nos travaux. Au cours d'essais préliminaires, l'addition de triméthylsilylacétylène sur la nitrone **3** a été réalisée en présence d'une quantité catalytique de diéthylzinc dans le toluène, selon les conditions réactionnelles décrites par Pinet *et al.*¹⁰⁶ et reproduite par Liu *et al.* sur une aldonitronne endocyclique à 5 chaînons (voir **Schéma 33**, p45).¹⁰⁷ Cependant la réaction s'est avérée très incomplète malgré des temps de réaction de plusieurs heures à température ambiante. La réaction a donc été reproduite en employant 2 équivalents de diéthylzinc préalablement mélangés avec le triméthylsilylacétylène dans le toluène pendant 30 min à 0 °C, avant ajout de la nitrone, également en solution dans le toluène (**Schéma 39**). Après 5 heures de réaction à température ambiante, la nitrone **3** a été totalement transformée en hydroxylamine **93**, produite sous la forme d'un seul diastéréoisomère, avec un rendement de 88%.

¹¹⁷ Marco, J. A.; Carda, M.; Murga, J.; Portolés, R.; Falomir, E.; Lex, J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3237–3240.

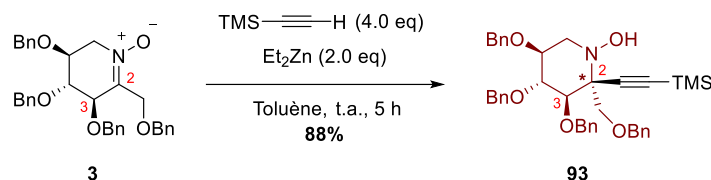


Schéma 39

Après purification par chromatographie sur silice et recristallisation dans l'éthanol, l'hydroxylamine **93** a été analysée par diffraction de rayons X (voir [Annexe 1](#)) et la configuration du centre quaternaire formé en C2 a été déterminée comme étant *R* (**Figure 21**). L'hydroxylamine **93** résulte donc de l'addition de l'acétylure de zinc sur la face *Si* de la cétonitrone **3**, malgré l'encombrement généré par le substituant alcoxybenzyle en C3 de la nitrone.

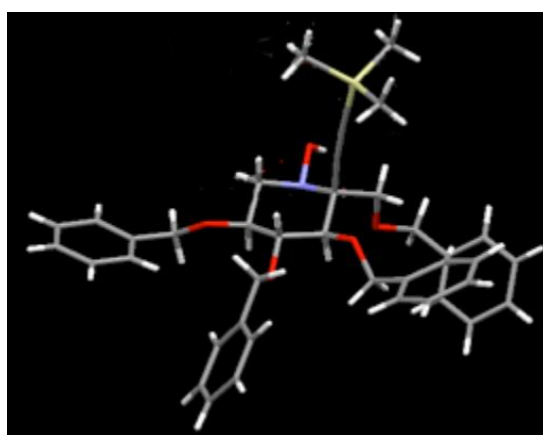


Figure 21 : Structure cristallographique de l'hydroxylamine **93**

Cette diastéréosélectivité est donc contraire à celle rapportée dans la plupart des alcynylations de nitrones décrites dans le paragraphe précédent. Cependant, elle est en accord avec de précédentes observations de notre équipe lors de cycloadditions,¹¹⁸ ou de vinylation en présence de dichlorure de zinc,⁴⁶ sur cette même cétonitrone **3**. Cette diastéréosélectivité peut être expliquée en considérant l'énergie des états de transition possibles pour l'addition de triméthylsilylacétylène sur la cétonitrone **3**, qui existe majoritairement sous la forme de deux conformations demi-chaises (**Schéma 40**). Des calculs de DFT ont montré que la conformation **B** dans laquelle tous les substituants de la nitrone sont axiaux est légèrement plus stable que la conformation **A** dans laquelle ils sont équatoriaux, que les calculs soient effectués dans le vide ou en considérant un modèle de solvant toluène.¹¹⁹ Ceci est également en accord avec l'analyse conformationnelle de la nitrone **67** à 6 chaînons rapportée par l'équipe de Caprio (voir **Figure 20**, p45).¹⁰³ Cependant, la différence d'enthalpie libre entre les deux conformères de la cétonitrone **3** suppose une faible prédominance de la forme **B** sur la forme **A** (ratio de ~2.3 : 1 en faveur de **B**).

¹¹⁸ Tangara, S.; Aupic, C.; Kanazawa, A.; Poisson, J.-F.; Py, S. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4842–4845.

¹¹⁹ Tangara, S.; Kanazawa, A.; Fayolle, M.; Philouze, C.; Poisson, J.-F.; Behr, J.-B.; Py, S. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 16735–16743.

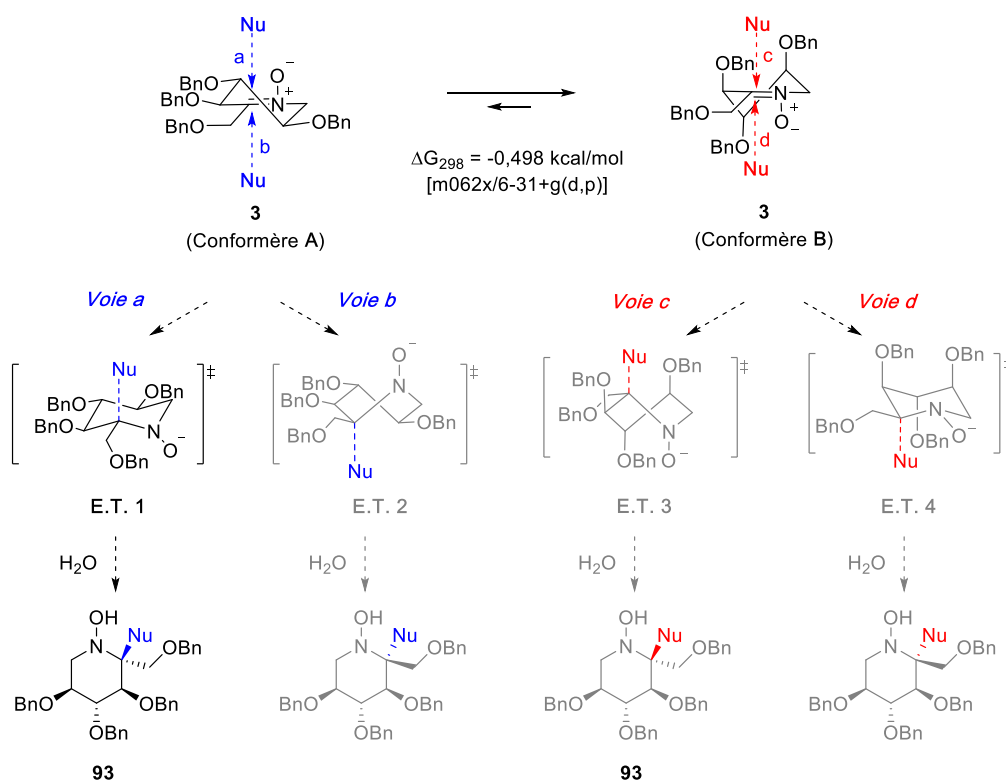


Schéma 40

Pour expliquer la formation de l'hydroxylamine **93** obtenue, nous pouvons considérer deux approches du nucléophile sur la nitrone **3** : la voie *a*, ou la voie *c* (Schéma 40), respectivement sur le conformère **A** et le conformère **B**. La voie *a* mène à un état de transition de type chaise (E.T. 1) de faible énergie, tandis que la voie *c* mène à un état de transition de type bateau croisé (E.T. 3) de plus haute énergie. En accord avec le principe de Curtin-Hammett, si la réaction est plus rapide sur le conformère **A**, la consommation de ce dernier peut déplacer l'équilibre de **B** vers **A** (ceci est valable uniquement pour un équilibre rapide), ce qui mène alors à la formation préférentielle de l'hydroxylamine **93**.

Le nucléophile aurait aussi pu s'additionner selon les voies *b* ou *d*. La voie *b* semble très défavorisée, puisqu'elle met en jeu le conformère minoritaire et mène à la formation d'un état de transition E.T.2, de type bateau croisé. En revanche, la voie *d* semblait la plus favorisée puisqu'elle provient d'une alcynylation sur le conformère **B** majoritaire, et qu'elle mène à un état de transition de type chaise (E.T. 4) de faible énergie. Cependant, les résultats expérimentaux montrent que d'autres facteurs doivent être pris en compte. Par exemple, l'encombrement stérique entre le nucléophile et les substituants a une influence sur la diastéréosélectivité de l'alcynylation, comme cela a d'ailleurs été montré par Maughan *et al.* sur une imine analogue à la cétone **3**.¹²⁰ On peut donc raisonnablement supposer qu'ici l'orientation des substituants axiaux du conformère **B** gêne toute approche du nucléophile, rendant ce conformère peu réactif en comparaison de **A**.

¹²⁰ Maughan, M. A. T.; Davies, I. G.; Claridge, T. D. W.; Courtney, S.; Hay, P.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3788–3792.

II.3. Préparation de sondes de type 2

Compte tenu de l'excellente diastéréosélectivité de l'alcynylation de la cétonitrone **3** par le triméthylsilylacétylène, l'utilisation d'alcynes vrais pouvant jouer le rôle de bras espaceurs a ensuite été considérée pour une préparation rapide et convergente des sondes de **type 2**. Ainsi, les alcynes **95a** et **95b** ont été préparés à partir du triéthylène glycol et du pentaéthylène glycol (*Schéma 41*).

La première étape de la synthèse consiste à réaliser une mono-mésylation de diols symétriques, et pour cette raison, le chlorure de mésyle a été utilisé en défaut. À l'issue de cette réaction les mésylates intermédiaires ont été isolés et engagés sans être purifiés dans la seconde étape, au cours de laquelle le mésylate a été substitué par l'azoture de sodium dans des conditions proches de celles rapportées par Simonin *et al.*¹²¹ Ces auteurs préconise l'utilisation de DMF en tant que solvant, ce qui permet de chauffer le milieu réactionnel à une température de 100 °C. Cependant, l'utilisation d'éthanol au reflux s'est avéré suffisante pour obtenir les produits **94a** et **94b** avec des rendements respectifs de 73% et 74% après purification, et pour deux étapes (un rendement de 58% en **94a** est rapporté par Simonin *et al.*, pour la seule étape de substitution). La propargylation de l'alcool **94a** a ensuite été réalisée selon des conditions rapportées dans la littérature,¹²² dans un mélange biphasique (soude aqueuse / toluène), en utilisant le bromure de propargyle en excès et en présence d'une quantité catalytique de bromure de tétra-*n*-butyl ammonium (TBAB), qui joue un rôle d'agent de transfert de phase. Cette procédure a donné un bon rendement de 85%, et a été également utilisée pour la propargylation de **94b**.

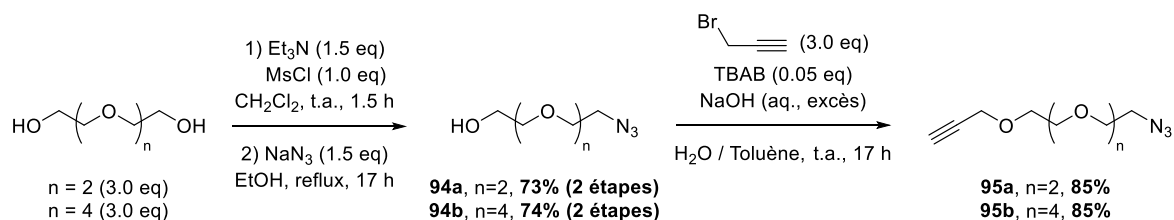


Schéma 41

Les composés **95a** et **95b** obtenus ont ensuite été additionnés sur la cétonitrone **3** dans des conditions similaires à celles utilisées pour l'addition de triméthylsilylacétylène (*Schéma 42*). Tout d'abord, 3 équivalents de l'alcyne utilisé ont été mélangés au diéthylzinc (1.5 équivalents) dans le toluène et à température ambiante pendant 30 minutes, puis la cétonitrone **3** en solution dans le toluène a été ajoutée à ce mélange (*Schéma 42*). Bien qu'un seul équivalent de diéthylzinc soit normalement suffisant pour obtenir une conversion complète de la cétonitrone **3**, des rendements généralement inférieurs à 50% ont été obtenus lorsque des quantités inférieures à 1.5 équivalents de ce réactif ont été employés.

¹²¹ Simonin, J.; Vernekar, S. K. V.; Thompson, A. J.; Hothersall, J. D.; Connolly, C. N.; Lummis, S. C. R.; Lochner, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 1151–1155.

¹²² Loska, R.; Janiga, A.; Gryko, D. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2013**, 17, 104–117.

Des titrations par le diiode ont permis de constater une dégradation relativement rapide de ce réactif, qui n'a pas été préparé avant utilisation mais utilisé sous la forme d'une solution commerciale 1.0 M dans un mélange d'hexanes. À l'issue de la réaction, les hydroxylamines **96a** et **96b** ont été obtenues chacune sous la forme d'un seul diastéréoisomère, d'après le spectre RMN ¹H des produits bruts obtenus. Après purification par chromatographie sur silice, elles ont été isolées avec des rendements satisfaisants de 73% et 64% respectivement.

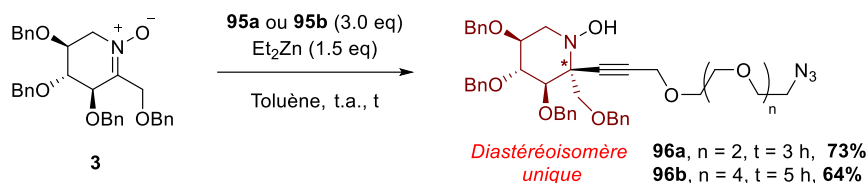


Schéma 42

À ce stade, la configuration du centre stéréogène nouvellement formé n'a pas pu être déterminée, l'absence de cristaux empêchant la détermination par diffraction de rayons X tandis que les expériences de RMN NOESY réalisées n'ont pas permis d'identifier avec certitude une corrélation exploitable. La configuration des produits **96a** et **96b** a donc été déterminée *a posteriori*. À l'issue de cette réaction d'alcynylation, une réduction pallado-catalysée en milieu acide des composés **96a** et **96b** devait permettre de réduire la triple liaison, la fonction hydroxylamine et la fonction azoture, tout en assurant la débenzylation des noyaux iminosucres afin d'accéder aux composés **97a** et **97b** en une seule étape (tel que représenté pour le composé **97a**, Schéma 43).

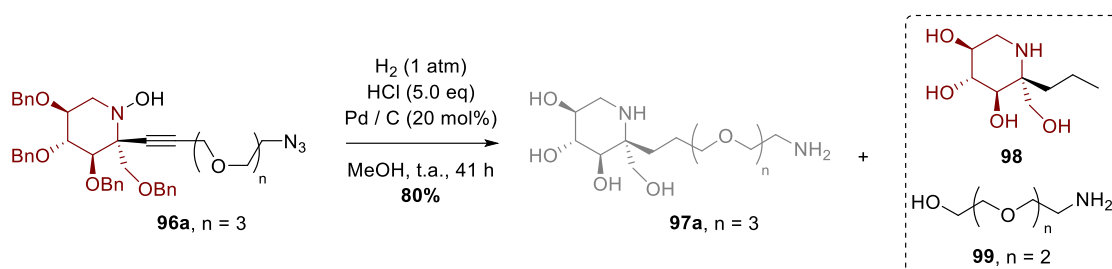


Schéma 43

L'analyse du produit brut par RMN ¹H semblait indiquer la formation d'un produit très cohérent avec l'amine **97a**. Cependant, après purification par résine échangeuse de cations, une analyse par RMN ¹³C (DEPTQ) a révélé la présence d'un groupement méthyle (δ 14.0 ppm) invalidant la présence de **97a**. Des expériences de RMN HSQC et HMBC complémentaires ont permis de déterminer la structure des produits **98** et **99**, lesquels comportent tous deux une fonction amine ayant assuré leur accroche sur la résine échangeuse de cations au cours de la purification.

La pipéridine **98** ayant déjà été synthétisée au laboratoire,¹²³ son spectre RMN ¹H a été comparé au spectre du mélange obtenu, validant ainsi l'hypothèse réalisée. Les produits **98** et **99** résultent d'une coupure de l'éther propargylique dans les conditions d'hydrogénolyse en milieu acide, suivie d'une réduction complète des produits de coupure. Après une recherche approfondie, il s'est avéré qu'une réaction similaire avait été rapportée dans la littérature par Rambabu *et al.* en 2013, en présence d'éthanolamine et en utilisant l'eau comme solvant.¹²⁴ Le mécanisme proposé par les auteurs suggère l'importance de la proticité du solvant dans cette réaction. Pour cette raison, nous avons par la suite placé l'hydroxylamine **96a** dans des conditions plus « douces » d'hydrogénation. En remplaçant le méthanol par de l'acétate d'éthyle et en n'ajoutant aucune source d'acide dans le milieu réactionnel, une hydrogénation ménagée de la triple liaison a été réalisée dans un premier temps. À l'issue de cette première étape, un mélange relativement complexe de produits a été obtenu. Une analyse par RMN ¹³C (DEPTQ) a mis en évidence la disparition des signaux caractéristiques de la triple liaison C8-C9, prouvant que la réduction de l'alcyne avait bien été réalisée, même si les fonctions hydroxylamine, azoture et les groupes benzyles n'avaient été que partiellement transformés. Ce mélange de produits a ensuite été traité dans des conditions d'hydrogénolyse des groupes benzyles, en milieu acide afin d'empêcher la désactivation du catalyseur. La combinaison de ces deux étapes a cette fois permis d'obtenir le produit souhaité (**97a**) avec un excellent rendement de 92%. Par la suite cette séquence réactionnelle a permis d'isoler l'amine **97b** avec un rendement de 70% à partir de **96b**.

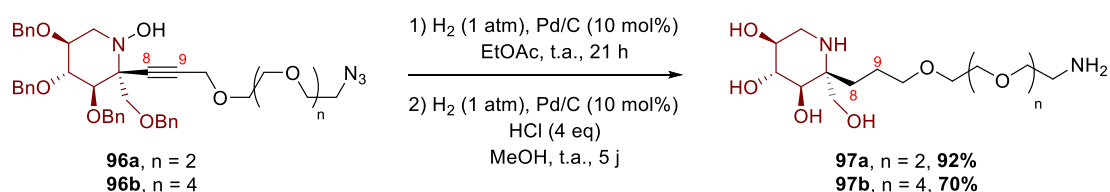


Schéma 44

Les amines primaires **97a** et **97b** ont ensuite été transformées par couplage avec **43** en présence de triéthylamine, menant aux sondes (**100a** et **100b**) comportant un noyau pyrrole, avec des rendements respectifs de 68% et 40% (Schéma 45).

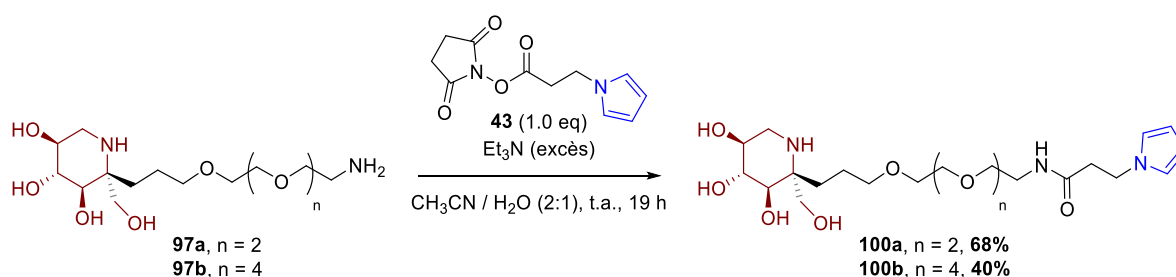


Schéma 45

¹²³ Py, S.; Kanazawa, A.; Vieira Da Cruz, A.; Tangara, S. (2020) *Brevet FR3109523*. Courbevoie – France. Institut national de la propriété industrielle.

¹²⁴ Rambabu, D.; Bhavani, S.; Swamy, N. K.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1169–1173.

Au cours de la caractérisation des composés **100a** et **100b**, la configuration du centre quaternaire de chacun de ces composés a pu être déterminée, grâce à des expériences de RMN NOESY, la méthode étant décrite ci-dessous pour le composé **100b**.

Tout d'abord, sur le spectre de RMN ^1H , les signaux correspondant aux protons H6 ont été identifiés : ces signaux se présentent sous la forme de deux doublets de doublets, pour lesquels on peut d'ailleurs remarquer la présence d'une constante de couplage commune ($^2J_{\text{H6ax-H6eq}} \sim 13\text{Hz}$) caractérisant le couplage géminel entre ces deux protons (**Figure 22**). Par la suite on remarque que l'un des doublets de doublets ($\delta = 2.58\text{ ppm}$) possède une seconde constante de couplage supérieure à 10 Hz ($^3J_{\text{H6ax-H5}} = 10,7\text{ Hz}$). Or, seuls deux protons en positions axiale/axiale peuvent en être à l'origine, puisque pour deux protons en positions équatoriale/axiale ou équatoriale/équatoriale, la constante de couplage associée est généralement comprise entre 0 et 5 Hz. Le proton H6_{ax} a donc été identifié comme celui pour lequel le déplacement chimique est $\delta = 2.58\text{ ppm}$, tandis que le proton H6_{eq} correspond au signal pour lequel $\delta = 2.92\text{ ppm}$.

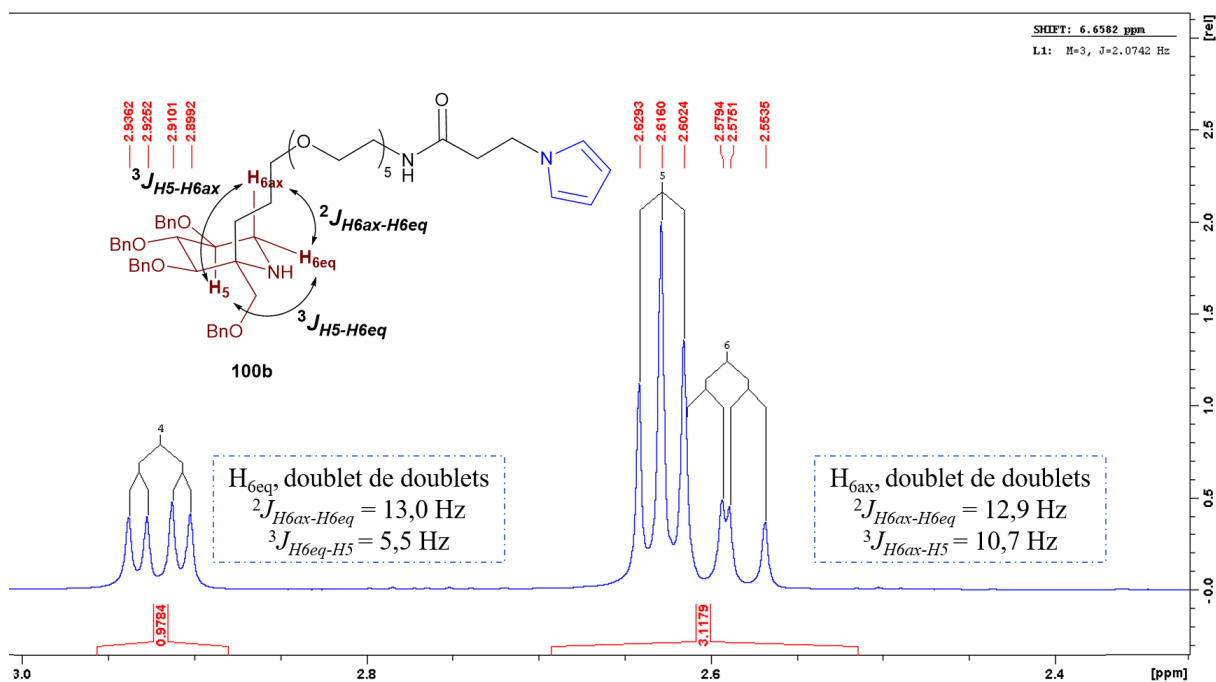


Figure 22 : Identification des protons H6 du composé **100b**

Par la suite, une corrélation NOESY identifiée entre un signal attribué aux protons H8, et le signal correspondant à H6_{ax} nous a permis de déterminer la configuration du centre quaternaire C2 comme étant *R*, tel qu'on peut le voir sur la **Figure 23**. Une telle configuration résulte donc d'une addition sur la face *Si* de la cétonitrone **3**, ce qui est cohérent avec la diastéréosélectivité observée au cours de l'addition de triméthylsilylacétylène (**Schéma 39**, p50).

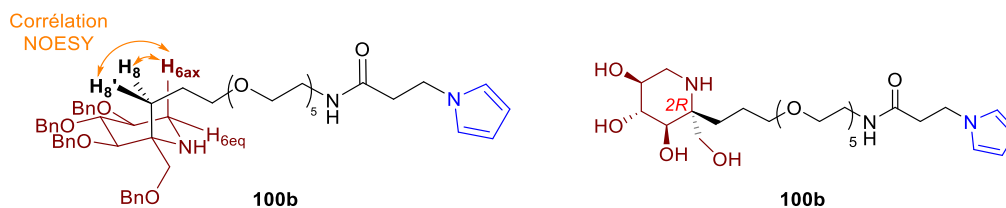


Figure 23 : Détermination de la configuration du centre quaternaire du composé **100b**

Une fois les deux sondes **100a** et **100b** synthétisées, un essai de synthèse de Paal-Knorr a été réalisé à partir de ces composés (*Schéma 46*, *Schéma 47*), bien que cette méthode se soit avérée difficile à mettre en œuvre au cours de la synthèse des sondes de **type 1**.

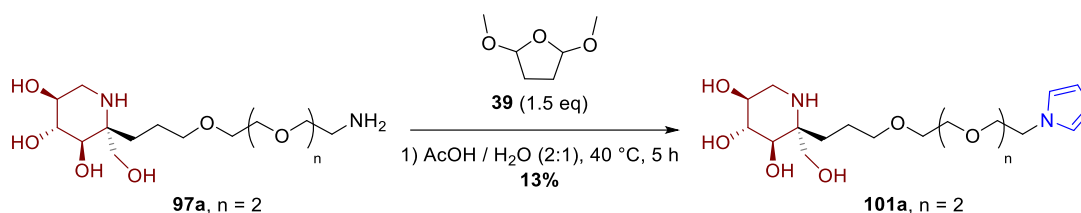


Schéma 46

Dans un premier essai, l'amine **97a** a réagi avec le 2,5-diméthoxytétrahydrofurane (**39**) à 40 °C, et la réaction a été suivie par CCM et LC-MS. Après 5 heures, le composé **101a** a été identifié en tant que produit ultra-majoritaire de la réaction par LC-MS (colonne en phase inverse, *Figure 24*).

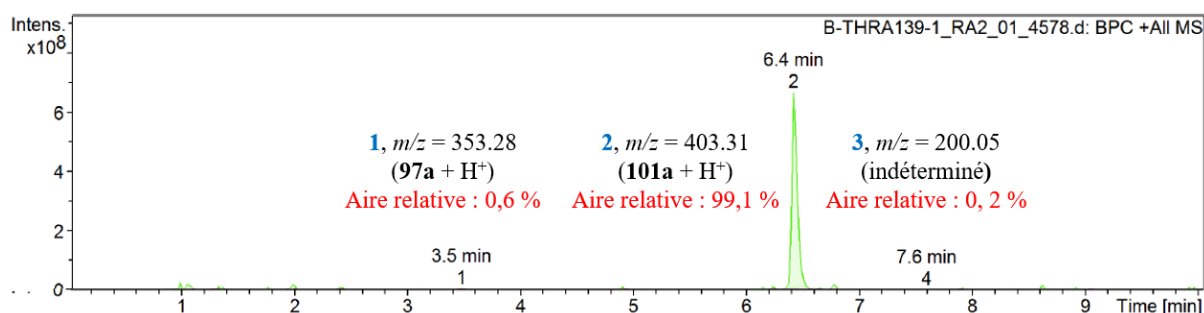


Figure 24 : Suivi LCMS de la synthèse de Paal-Knorr de **97a** en **101a** ($t = 5$ h)

La purification par HPLC préparative en phase inverse, déjà utilisée précédemment a cependant entraîné de fortes pertes de matière, et un rendement de seulement 13% a été obtenu pour le produit **101a** purifié. La réaction de l'amine primaire **97b** avec le 2,5-diméthoxytétrahydrofurane (1.1 équivalent) a alors été entreprise dans un mélange d'acide acétique et d'eau (*Schéma 47*). La réaction a été suivie par CCM (révélée à la ninhydrine), et aucun avancement de la réaction n'a été observé après 1h30 à température ambiante. Le milieu réactionnel a été chauffé à 40 °C, en ajoutant de l'eau et une nouvelle portion de **39** (0.5 équivalent). Ainsi, la réaction s'est avérée quasiment complète après 45 minutes supplémentaires. Malgré une légère quantité résiduelle de **97b**, la réaction a alors été stoppée pour éviter toute polymérisation.

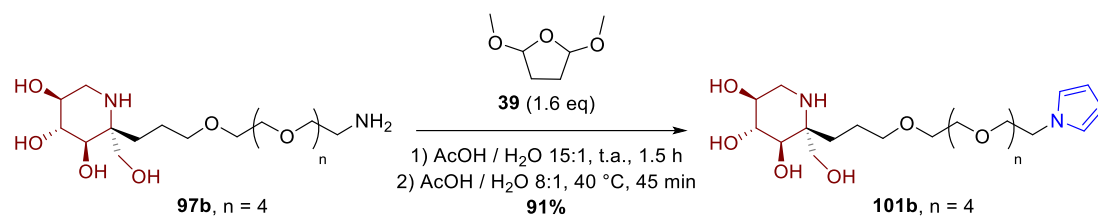


Schéma 47

Afin d'éviter les fortes pertes induites par l'emploi de la HPLC préparative, la purification du composé **101b** a été réalisée par chromatographie sur colonne de silice, dans un mélange de méthanol et d'ammoniaque aqueux, ce qui a permis d'obtenir un très bon rendement en **101b**.

III. Résumé du chapitre

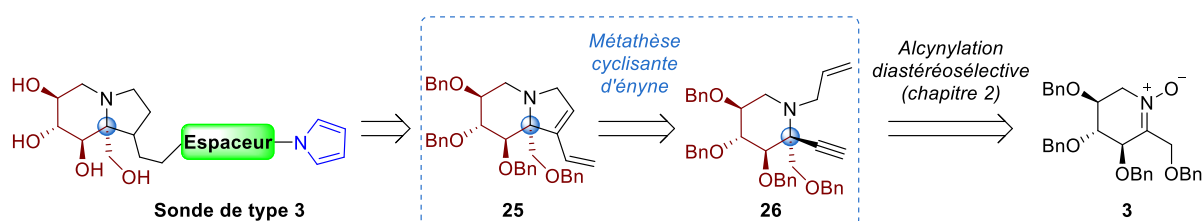
Au cours de ce chapitre, nous avons mis au point plusieurs méthodes permettant d'accéder aux sondes de **type 1** et de **type 2**, dont les structures suggèrent des sélectivités différentes vis-à-vis des α - et des β -glucosidases.

Une première méthode a tout d'abord été mise au point lors de la synthèse des sondes de **type 1**, reposant sur la fonctionnalisation d'un noyau DNJ par cycloaddition de Huisgen. Une telle stratégie a permis d'obtenir quatre sondes de **type 1**, basées sur 2 bras espaceurs de tailles différentes. Ces sondes ont été obtenues à partir du tétra-*O*-benzyl- D-glucopyranose, avec des rendements compris entre 16 et 18%, en 8 étapes.

Dans une seconde partie, nous avons proposé une voie de synthèse convergente des sondes de **type 2**, basées sur un noyau iminosucre de type pipéridine polyhydroxylée *C*-alkylée. Après avoir étudié la diastéréosélectivité de l'alcynylation des nitrones polyalcoxylées à travers plusieurs exemples de la littérature, nous avons démontré que l'addition de triméthylsilylacétylène sur la cétonitronne **3** permettait d'obtenir l'hydroxylamine **93** sous la forme d'un unique diastéréoisomère avec un excellent rendement. De nouvelles réactions d'alcynylation de la cétonitronne **3** par des alcynes plus complexes ont été mises en œuvre, permettant d'accéder à quatre sondes de **type 2** en 4 étapes et avec des rendements compris entre 9 et 46% à partir de la cétonitronne **3**.

Chapitre III : Synthèse d'indolizidines fonctionnalisées par cycloisomérisation d'énynes-1,6

Ce chapitre est dédié à la synthèse des sondes de **type 3**, qui se distinguent des sondes décrites dans le chapitre précédent par leur motif de reconnaissance des glycosidases, ici basé sur un noyau iminosucre bicyclique de type indolizidine. Dans la littérature, on peut trouver plusieurs stratégies de synthèse permettant d'accéder à des indolizidines polyhydroxylées, à partir de divers précurseurs.¹²⁵ Dans ces travaux, la voie de synthèse choisie pour préparer ces sondes s'appuie d'une part sur une alcynylation diastéréosélective de la cétonitrone **3**, et d'autre part sur une étape de métathèse cyclisante d'ényne, permettant d'obtenir le diène **25** auquel peuvent être conjugués des bras espaceurs (*Schéma 48*).



Après une première partie bibliographique sur la métathèse cyclisante d'alcènes (notamment appliquée à la synthèse d'iminosucres) et la métathèse cyclisante d'énynes (aussi appelée cycloisomérisation d'énynes) ce chapitre présente l'application de ce type de réactions à la synthèse des sondes de glycosidases de **type 3**.

I. Introduction bibliographique : métathèse cyclisante et cycloisomérisation d'énynes-1,6

I.1. La métathèse d'oléfines – Histoire et rappels

La réaction de métathèse d'oléfines est une réaction connue depuis les années 1970 mais ses applications en chimie organique se sont beaucoup développées à la fin des années 1990. De la synthèse de polymères à la conception de molécules à visée thérapeutique, elle s'est rapidement imposée comme un outil incontournable en chimie de synthèse, et a fait l'objet de très nombreuses revues.¹²⁶ Le mécanisme de cette réaction, élucidé par Grubbs,¹²⁷ ainsi que par Chauvin et Hérisson,¹²⁸

¹²⁵ Fraňová, P.; Marchalín, Š. *Recent Eur J Org Chem* **2022**, *35*, 1–17.

¹²⁶ Voir notamment : (a) Fürstner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3012–3043. (b) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4490–4527. (c) Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A. R. *Nature* **2007**, *450*, 243–251. (d) C. Majumdar, K.; Muhuri, S.; Ul Islam, R.; Chattopadhyay, B. *Heterocycles* **2009**, *78*, 1109–1169.

¹²⁷ (a) Grubbs, R. H.; Brunck, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2538–2540. (b) Grubbs, R. H.; Burk, P. L.; Carr, D. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3265–3267.

¹²⁸ Hérisson, J.-L.; Chauvin, Y. *Makromol. Chem.* **1971**, *141*, 161–176.

fait intervenir une cycloaddition [2+2] entre un alkylidène métallique et une oléfine, pour former un intermédiaire métallocyclobutane (**Schéma 49**).

Cet intermédiaire subit alors une cycloréversion pour libérer un nouvel alkylidène métallique, et une nouvelle oléfine. Ainsi, le premier alkylidène métallique peut être employé en quantité catalytique.

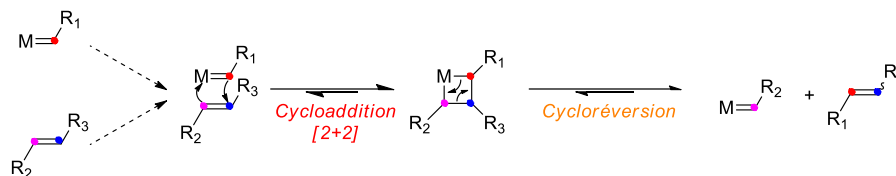


Schéma 49

Les premiers complexes alkylidène métalliques utilisés pour réaliser ces réactions comprennent différents métaux de transition : le tungstène,^{127,128} le molybdène,¹²⁹ ou encore le niobium et le tantalum.¹³⁰ L'un des plus connus des catalyseurs historiques est le catalyseur de Schrock à base de molybdène (**Figure 25**), mais sa sensibilité à l'oxygène et à l'humidité peuvent en limiter les applications.^{126a,b} Au début des années 1990, l'équipe de Grubbs a préparé un premier catalyseur à base de ruthénium,¹³¹ puis d'autres complexes (dont **GI**, **Figure 25**) démontrant une meilleure stabilité à l'air et aux hautes températures que leurs prédécesseurs, ainsi qu'une meilleure compatibilité avec un large ensemble de groupes fonctionnels.¹³² Néanmoins, ces catalyseurs sont en général moins actifs que le catalyseur de Schrock.^{126b} Les catalyseurs au ruthénium dits « de seconde génération », dans lesquels une des trialkylphosphines a été substituée par un ligand de type carbène *N*-hétérocyclique (NHC), sont apparus à la fin des années 1990 (**GII**, **HGII**, **Figure 25**). Ces derniers sont encore plus tolérants à la présence d'eau ou d'oxygène dans le milieu réactionnel et sont en général plus actifs que ceux de première génération dans les réactions de métathèse d'oléfines.^{133,134}

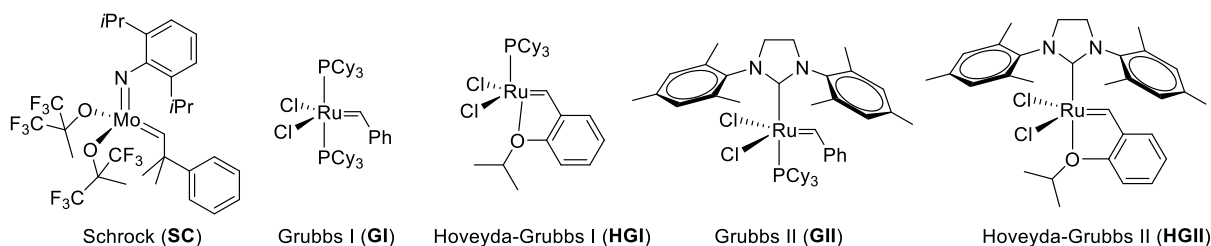


Figure 25 : Catalyseurs communément utilisés dans les réactions de métathèse d'oléfines

¹²⁹ Seyferth, K.; Taube, R. *J. Mol. Catal.* **1985**, *28*, 53–69.

¹³⁰ Schrock, R.; Rocklage, S.; Wengrovius, J.; Rupprecht, G.; Fellmann, J. *J. Mol. Catal.* **1980**, *8*, 73–83.

¹³¹ (a) Nguyen, S. T.; Johnson, L. K.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974–3975. (b) Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9858–9859.

¹³² Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18–29.

¹³³ Schöll, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953–956.

¹³⁴ Fürstner, A.; Ackermann, L.; Gabor, B.; Goddard, R.; Lehmann, C. W.; Mynott, R.; Stelzer, F.; Thiel, O. R. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3236–3253.

I.2. Métathèse d'oléfines cyclisante et synthèse d'minosucres

La métathèse cyclisante (*Ring-Closing Metathesis*, ou RCM) est un cas particulier de réaction de métathèse qui permet de former un nouveau cycle (*Schéma 50*).

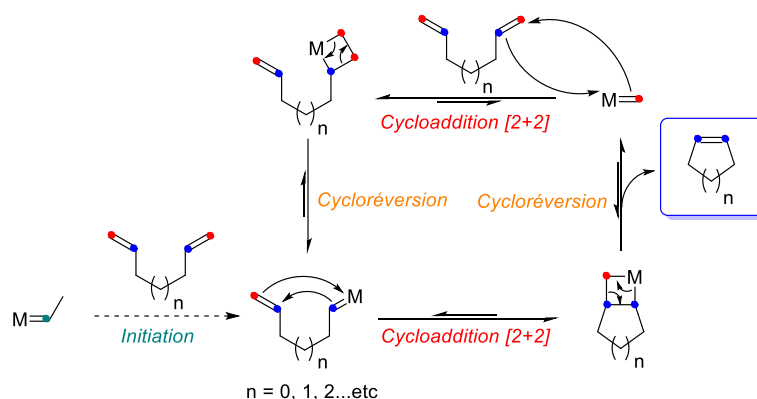


Schéma 50

Les réactions de métathèse cyclisante ont été largement appliquées à la synthèse d'minosucres, et ont fait l'objet de plusieurs revues.¹³⁵ Une des limitations à l'usage de cette réaction réside dans la présence d'un ou plusieurs atomes d'azote basiques dans les molécules, susceptibles d'interagir avec les complexes métalliques utilisés comme catalyseurs et de les désactiver. Plusieurs stratégies ont été explorées pour réduire la disponibilité du doublet de l'azote, la première étant de l'associer à un groupe électroattracteur. Ainsi dès 2003, des 1-déoxy-minosucres ont été synthétisés *via* une réaction de métathèse d'oléfines en présence de catalyseur **GI** (10 mol%) pour former un cycle à 6 chaînons avec un rendement de 80%, à partir de la *N*-acétyl-*N*-allylamine **102**, dans laquelle le doublet de l'azote est rendu indisponible par protection sous forme d'acétamide (*Schéma 51*).¹³⁶

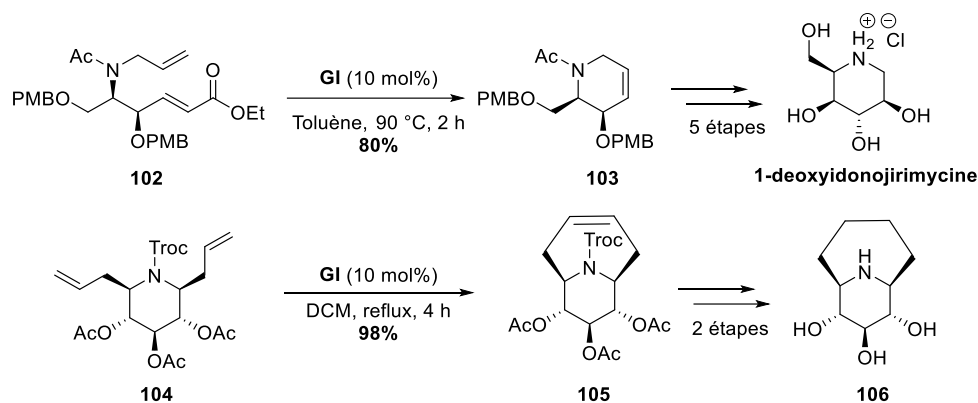


Schéma 51

¹³⁵ (a) Pandit, U. K.; Overkleeft, H. S.; Borer, B. C.; Bieräugel, H. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 959-968. (b) Compain, Philippe. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1829-1846. (c) Dragutan, I.; Dragutan, V.; Demonceau, A. *RSC Adv.* **2012**, 2, 719-736. (d) Dragutan, V.; Dragutan, I.; Demonceau, A.; Vosloo, H. C.M. *Curr. Org. Chem.* **2013**, 17, 2721-2739. (e) Ratmanova, N. K.; Andreev, I. A.; Leontiev, A. V.; Momotova, D.; Novoselov, A. M.; Ivanova, O. A.; Trushkov, I. V. *Tetrahedron* **2020**, 76, 131031.

¹³⁶ Singh, O. V.; Han, H. *Tetrahedron. Lett.* **2003**, 44, 2387-2391.

De façon similaire, Chagnault *et al.* ont transformé le diène **104** dans lequel l'atome d'azote est protégé sous forme de carbamate en composé bicyclique **105**, formant un cycle à 7 chaînons par métathèse cyclisante en présence de **GI** (10 mol%) avec 98% de rendement (*Schéma 51*).¹³⁷ La protection des fonctions azotées par un groupe électroattracteur n'étant pas toujours possible (notamment dans le cas des amines tertiaire), l'ajout d'acide dans le milieu réactionnel constitue une alternative conduisant à la protonation de l'atome d'azote et permettant d'éviter la désactivation du catalyseur. Par exemple le groupe de Vankar a travaillé sur la synthèse d'analogues de la (-)-steviamine,¹³⁸ un iminosucre naturel isolé en 2010 des feuilles de *Stevia rebaudiana*.¹³⁹ Lors de la métathèse cyclisante du mélange de diènes **108a** et **108b**, l'utilisation d'APTS en tant qu'additif a été obligatoire pour observer la formation des produits bicycliques correspondants (*Schéma 52*). Cette méthode a également été utilisée par Verhelst *et al.* pour proposer une voie d'accès à des indolizidines et quinolizidines polyhydroxylées,¹⁴⁰ et d'autres exemples sur des substrats azotés sont disponibles dans la littérature.¹⁴¹

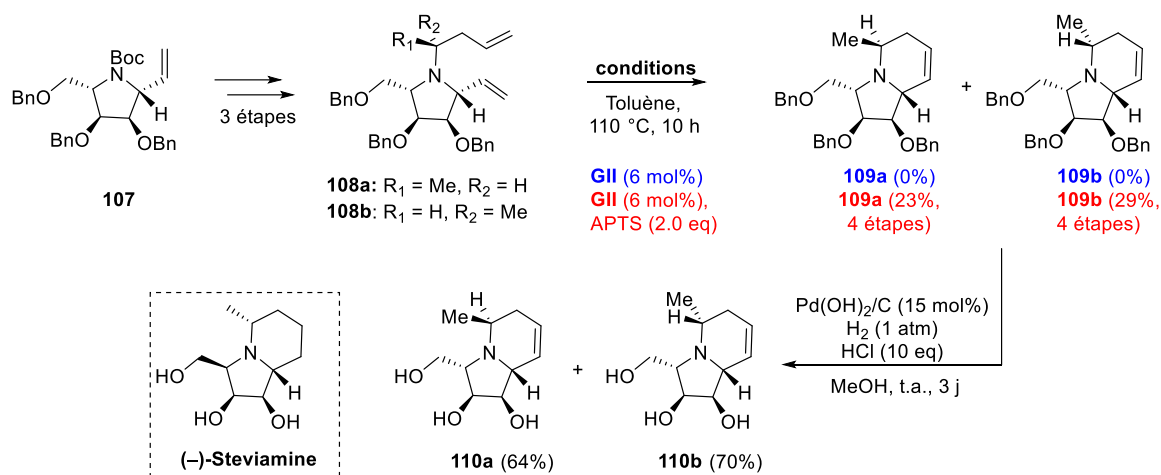


Schéma 52

L'utilisation d'acides de Lewis en tant qu'additifs a également été proposée pour conduire des réactions de métathèse cyclisante sur des substrats azotés. Par exemple, l'étude réalisée par le groupe de Yu (*Schéma 53*) montre l'intérêt d'utiliser un acide de Lewis dans les réactions de métathèse cyclisante sur des amines tertiaires.¹⁴² En l'absence d'isopropylate de titane, l'amine **111** est faiblement convertie en produit **112**, alors que celui-ci est obtenu avec un rendement de plus de 90% lorsque cet additif est utilisé.

¹³⁷ Chagnault, V.; Compain, P.; Lewinski, K.; Ikeda, K.; Asano, N.; Martin, O. R. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3179–3182.

¹³⁸ Ansari, A. A.; Vankar, Y. D. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9383–9395.

¹³⁹ Michalik, A.; Hollinshead, J.; Jones, L.; Fleet, G. W. J.; Yu, C.-Y.; Hu, X.-G.; van Well, R.; Horne, G.; Wilson, F. X.; Kato, A.; Jenkinson, S. F.; Nash, R. J. *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 136–138.

¹⁴⁰ Verhelst, S. H. L.; Paez Martinez, B.; Timmer, M. S. M.; Lodder, G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9598–9603.

¹⁴¹ Wright, D. L.; Schulte, J. P.; Page, M. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1847–1850.

¹⁴² Yang, Q.; Xiao, W.-J.; Yu, Z. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 871–874.

Cependant, on remarque que l'utilisation d'isopropylate de titane n'est pas le seul paramètre qui varie entre les deux essais. Un essai complémentaire avec une même charge en catalyseur **GII** permettrait de valider l'influence de l'acide de Lewis sur l'efficacité de la transformation.

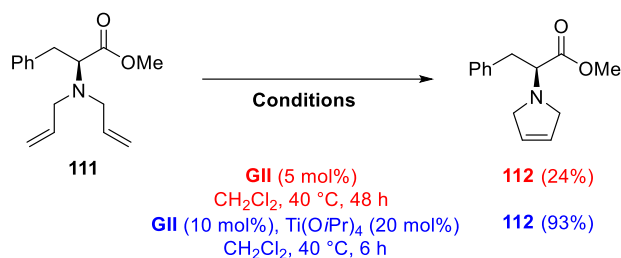


Schéma 53

On trouve aussi dans la littérature de nombreux cas de réactions de métathèse cyclisante efficaces sur des amines sans introduction d'additifs acides. Il s'agit le plus souvent d'amines tertiaires, peu nucléophiles, pour lesquelles l'encombrement stérique suffit à prévenir toute coordination du catalyseur. Par exemple, notre équipe a montré que les *N*-allylpipéridines **5b** et **8b** cyclisent en bicycles **24b** et **113b** en présence du seul catalyseur **GII** et en l'absence d'acide (Schéma 54).^{46,47}

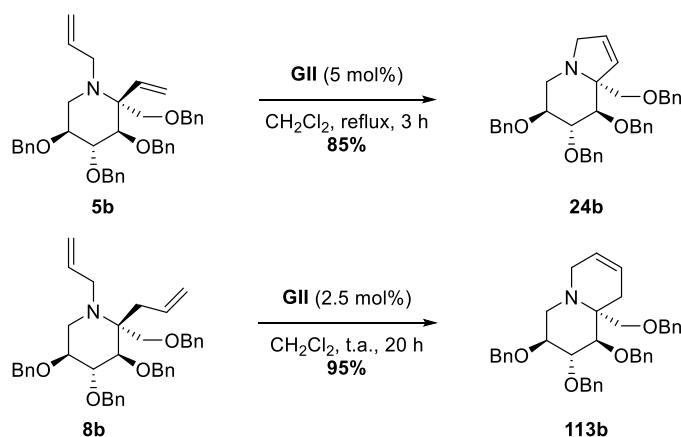


Schéma 54

Un autre exemple a été rapporté par Gonda *et al.* et décrit l'utilisation de l'amine **114** comme substrat de métathèse cyclisante pour former un composé *spiro* **115** comme intermédiaire dans la synthèse de la pyrrolizidine polyhydroxylée **116** (Schéma 55).¹⁴³

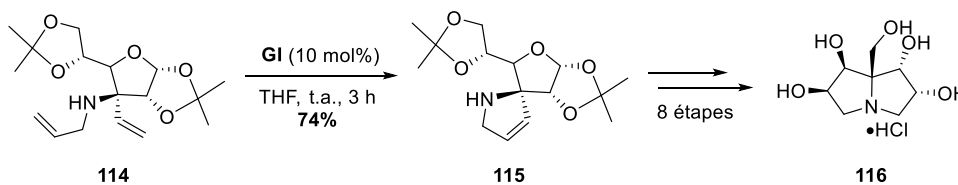


Schéma 55

¹⁴³ Gonda, J.; Elečko, J.; Martinková, M.; Fábian, M. *Tetrahedron. Lett.* **2016**, *57*, 2895–2897.

Dans cette réaction, un cycle à 5 chaînons est facilement formé (rendement de 74%) en présence de catalyseur **GI** (10 mol%) à température ambiante, sans ajout d'acide au milieu réactionnel.

Hormis l'utilisation éventuelle d'additifs dans les réactions de métathèses cyclisantes, d'autres paramètres peuvent s'avérer cruciaux pour l'efficacité de ces réactions, tels que le choix du solvant et de la température de réaction. Par exemple, au cours d'une synthèse de la (-)-lentiginosine par Ayad *et al.*,¹⁴⁴ la cyclisation de **117** en présence de **GII** a totalement échoué au reflux du dichlorométhane, mais s'est révélée efficace dans le toluène à 70 °C, permettant d'isoler le produit **118** avec un rendement de 72% (*Schéma 56*).

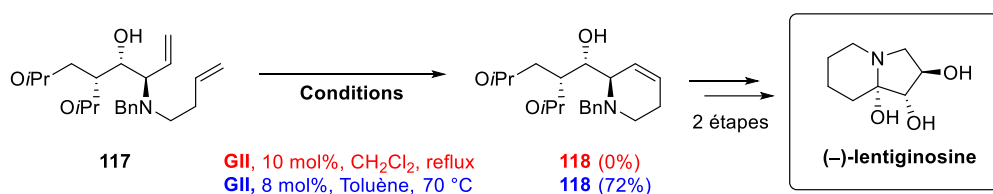


Schéma 56

Enfin, le choix du catalyseur constitue un paramètre clé dans la mise en œuvre des réactions de métathèse. Comme cela a été rappelé précédemment, il existe de très nombreux catalyseurs de métathèse avec des propriétés bien distinctes (*Figure 25*). Les catalyseurs au ruthénium de type Grubbs, plus faciles à manipuler, ont été les plus utilisés pour la synthèse d'iminosucres comme l'illustrent l'ensemble des exemples rapportés jusqu'à présent.

I.3. Les cycloisomérisations et la métathèse ène-yne cyclisante

Le terme de cycloisomérisation est très général car il englobe, selon les substrats, plusieurs réactions aux mécanismes variés et aboutissant à la formation d'un large ensemble de produits.^{145,146} Nous nous intéresserons ici uniquement à la cycloisomérisation d'énynes-1,6 et à la formation de diènes-1,3 (*Schéma 57*). Deux produits peuvent être formés par cette réaction : le produit *endo* pour lequel les atomes de carbones de l'alcyne sont incorporés dans le cycle nouvellement formé, et le produit *exo* dans lequel ces atomes de carbone se situent à l'extérieur du cycle formé.^{146a}

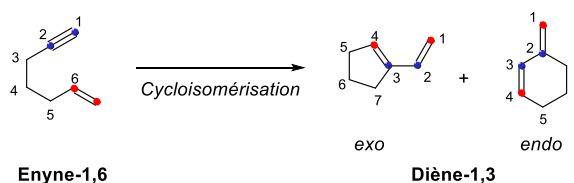


Schéma 57

¹⁴⁴ Ayad, T.; Génisson, Y.; Baltas, M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2626-2631.

¹⁴⁵ Pradal, A. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, **2012**.

¹⁴⁶ (a) Hu, Y.; Bai, M.; Yang, Y.; Zhou, Q. *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 2256-2275. (b) Li, J.; Lee, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 4269-4287.

Les premières réactions de cycloisomérisation de ce type ont été rapportées dans la littérature en 1985, par Sivavec et Katz,¹⁴⁷ ainsi que par Trost et Lautens.¹⁴⁸ Nous savons aujourd'hui que les réactions décrites par ces deux équipes obéissent à des mécanismes très différents, malgré la formation de produits similaires à partir d'énynes-1,6 dans les deux cas. Avec un large éventail de conditions réactionnelles et de catalyseurs permettant de promouvoir la cycloisomérisation d'énynes-1,6, pas moins de cinq mécanismes différents sont désormais acceptés pour rationaliser le cours de ces réactions.^{146a} Ici, nous nous focaliserons sur les transformations faisant intervenir des complexes carbéniques en tant que catalyseurs. En 1994, Mori et Kinoshita ont rapporté les premières cycloisomérisations d'énynes-1,6 en diènes-1,3 par un complexe de ruthénium de type Grubbs, durant lesquelles seul le produit *exo* est formé (**Schéma 58**).¹⁴⁹

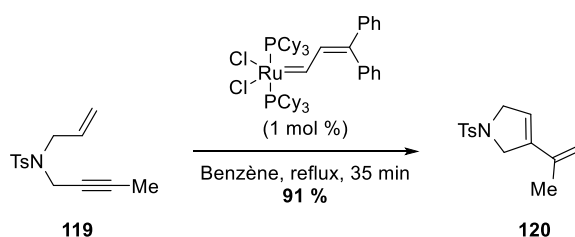


Schéma 58

On admet aujourd'hui que la réaction peut se dérouler selon deux voies, dites « ène-yne » (**Schéma 59**) ou « yne-ène » (**Schéma 60**) selon que le complexe carbénique réagit en premier avec la double ou la triple liaison de l'ényne.^{146,150}

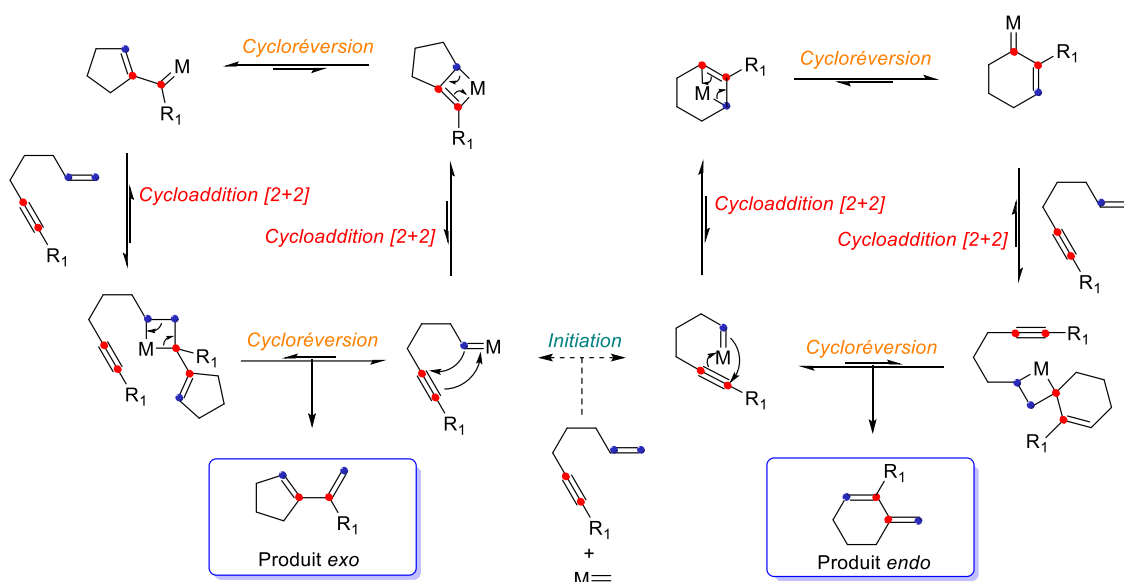


Schéma 59

¹⁴⁷ Katz, T. J.; Sivavec, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 737–738.

¹⁴⁸ Trost, B. M.; Lautens, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1781–1783.

¹⁴⁹ Kinoshita, A.; Mori, M. *Synlett* **1994**, *12*, 1020-1022.

¹⁵⁰ Kitamura, T.; Sato, Y.; Mori, M. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 678–693.

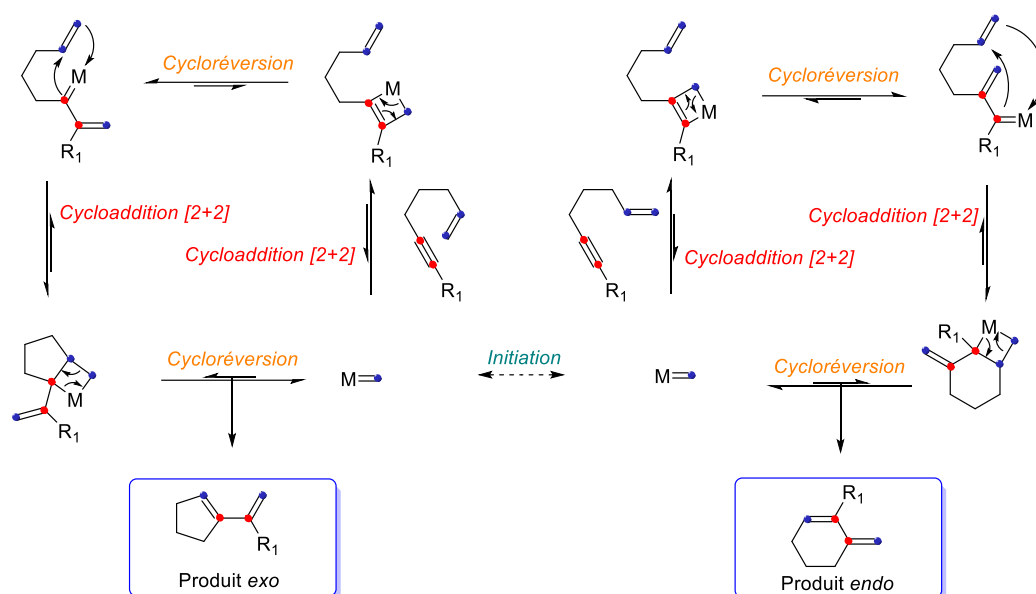


Schéma 60

Quelle que soit la voie suivie, elle peut théoriquement mener aux deux produits *endo* ou *exo*. Si certains auteurs suggèrent que chacune de ces deux voies est responsable de la formation de l'un ou l'autre des deux produits,^{146a} nous n'avons pas trouvé de consensus à ce sujet.

Le mécanisme des réactions de cycloisomérisation d'énynes catalysées par des complexes carbéniques est analogue à celui des réactions de métathèses d'oléfines, avec une succession de cycloadditions/cycloréversions. C'est d'ailleurs pour cette raison que le terme de « métathèse ène-yne cyclisante » (*Ring-Closing Ene-Yne Metathesis*, abrégé RCEM ou RCEYM) est utilisé pour qualifier ces transformations. Dans la suite de ce rapport, les deux termes pourront être utilisés indifféremment.

Dans le cas des ényne-1,6, le produit *exo* semble favorisé par rapport au produit *endo*.^{146,151} Néanmoins, la nature du catalyseur peut influencer la formation préférentielle de l'un des deux produits possibles (*Schéma 61*). Hoveyda *et coll.* ont par exemple montré que les catalyseurs à base de ruthénium favorisent la formation du produit *exo*, et qu'il est possible d'inverser cette sélectivité en faveur du produit *endo* en utilisant un catalyseur à base de molybdène.¹⁵¹ L'encombrement stérique apporté par les ligands semble être à l'origine de la sélectivité, mais la nature même du métal utilisé peut aussi influencer la sélectivité *endo/exo*.¹⁵²

¹⁵¹ Lee, Y.-J.; Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10652–10661.

¹⁵² Zhao, Y.; Hoveyda, A. H.; Schrock, R. R. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 784–787.

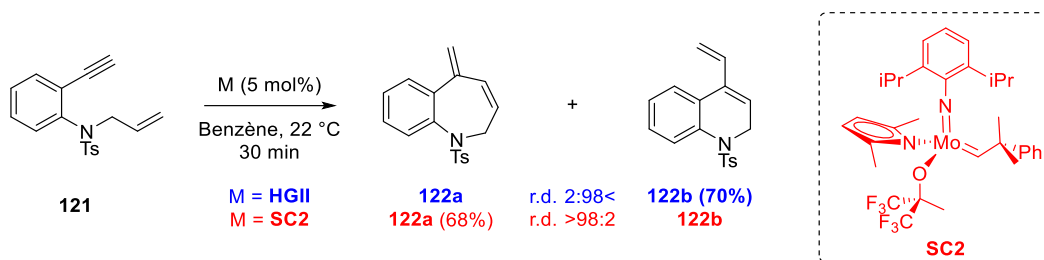


Schéma 61

Le groupe de Mori a grandement contribué à développer les réactions de cycloisomérisations, et a notamment mis en évidence les effets bénéfiques de la présence d'éthylène dans le milieu réactionnel afin d'augmenter l'efficacité de ce type de réaction.¹⁵³ Pour certains substrats tels que l'ényne **123**, la cycloisomérisation s'effectue avec de faibles rendements sous argon, mais peut atteindre des rendements quantitatifs lorsqu'elle est conduite sous atmosphère d'éthylène (*Schéma 62*). L'hypothèse du groupe de Mori est que l'éthylène, en réagissant avec le catalyseur, limiterait sa perte de réactivité au cours de la réaction. On remarque cependant que le composé **125**, dont la structure est analogue à **123**, cycloisomérisé en produit **126** avec un excellent rendement de 89% sous atmosphère d'argon (*Schéma 62*).

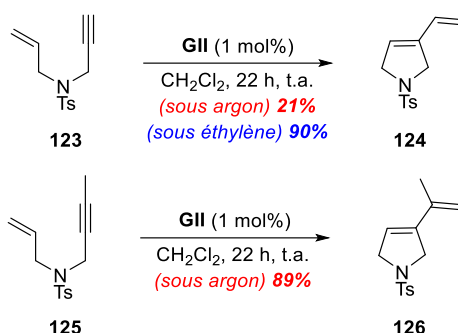


Schéma 62

D'autres exemples de cycloisomérisations d'énynes réalisées sous atmosphère d'argon avec de très bons rendements existent,¹⁵⁴ et le rôle de l'éthylène dans ces réactions reste difficile à interpréter. En 2011, le groupe de Fogg a suggéré un mécanisme expliquant la désactivation du catalyseur dans la voie ène-yne (*Schéma 63*).¹⁵⁵ Le cycle catalytique de la cycloisomérisation selon la voie ène-yne ayant déjà été représenté en détails (voir *Schéma 59*, p65), il a ici été représenté sous forme résumée (en bleu, *Schéma 63*). Dans ce cycle catalytique, l'alkylidène **M1** réagit avec la fonction alcène d'un ényne **E1** dans une métathèse croisée aboutissant à la formation du produit de cycloisomérisation (*exo*) et de l'alkylidène **M2**. Cependant, il peut aussi réagir avec la fonction alcyne de **E1**, conduisant alors à la formation de l'alkylidène **M3**, qui est un « dimère » de l'ényne de départ.

¹⁵³ Mori, M.; Sakakibara, N.; Kinoshita, A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6082–6083.

¹⁵⁴ Yang, Q.; Alper, H.; Xiao, W.-J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 769–771.

¹⁵⁵ Grotevendt, A. G. D.; Lummiss, J. A. M.; Mastronardi, M. L.; Fogg, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15918–15921.

Une élimination réductrice mène alors à la formation du composé bicyclique **M4** dans lequel le ruthénium se retrouve désactivé, avec un degré d'oxydation de +I au lieu de +II pour les alkylidènes **M1**, **M2** et **M3**. En se basant sur ce mécanisme, le groupe de Fogg a suggéré que l'éthylène empêche la formation de l'intermédiaire **M3**, ce qui éviterait la formation de **M4** et préserverait ainsi l'activité catalytique du complexe de ruthénium.

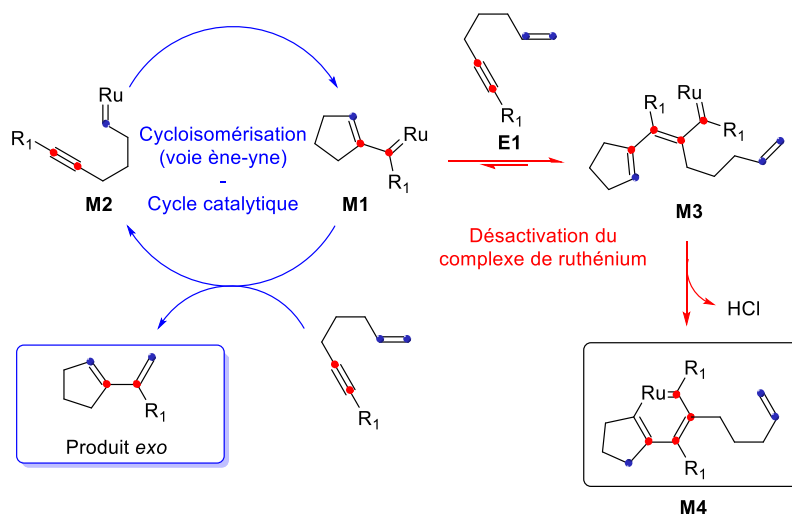


Schéma 63

En plus des travaux relatifs à l'usage d'éthylène, le groupe de Mori a aussi été le premier à proposer une synthèse totale utilisant une réaction de cycloisomérisation d'énynes-1,6 comme étape clé, en 1996. Cette synthèse est celle de la (-)-stemoamide, molécule naturelle aux propriétés insecticides (**Schéma 64**).¹⁵⁶

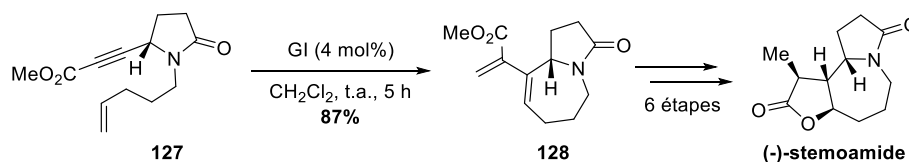


Schéma 64

Ainsi, bien que la possibilité de former deux structures différentes soit une limitation à l'emploi des réactions de cycloisomérisations, un grand intérêt a été porté à ce type de réactions et la cycloisomérisation d'énynes-1,6 a été utilisée pour la synthèse de nombreux autres produits naturels, tels que la roséophiline,¹⁵⁷ la (+)-anatoxine-a,¹⁵⁸ la (+)-β-érythroidine,¹⁵⁹ et bien d'autres.^{126b,146}

¹⁵⁶ Kinoshita, A.; Mori, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8356–8357.

¹⁵⁷ Trost, B. M.; Doherty, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3801–3810.

¹⁵⁸ Brenneman, J. B.; Martin, S. F. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1329–1331.

¹⁵⁹ Fukumoto, H.; Takahashi, K.; Ishihara, J.; Hatakeyama, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2731–2734.

Cet usage en synthèse organique s'explique principalement par la puissance de cette méthode qui permet de former des molécules cycliques tout en assurant une excellente économie d'atomes, comme l'illustre bien un exemple rapporté par Grubbs *et coll.* en 1998.¹⁶⁰ Il s'agit d'une séquence tandem comprenant un enchainement de réactions de métathèses d'énynes cyclisantes, rapporté dans un article dédié aux réactions de polycyclisations. En une seule étape, à 25 °C et en utilisant seulement 4 mol% de catalyseur **GI**, 4 cycles ont été formés à partir de **129**, permettant d'obtenir un noyau stéroïde **130** avec un rendement de 70% (**Schéma 65**). Ce rendement montre que les problèmes de régiosélectivité ou de désactivation des catalyseurs peuvent être surmontés par une conception astucieuse du substrat engagé dans la réaction de cycloisomérisation.

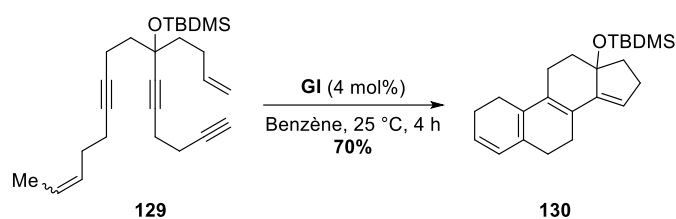


Schéma 65

¹⁶⁰ Zuercher, W. J.; Scholl, M.; Grubbs, R. H. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4291–4298.

II. Synthèse d'énynes-1,6 et étude des réactions de cycloisomérisation

II.1. Synthèse de l'ényne **26** et cycloisomérisation (1^{ère} approche)

L'addition du triméthylsilylacétylène sur la cétonitrone **3** conduisant à l'hydroxylamine **93** de configuration *D-gluco* avec une grande efficacité a été décrite dans le chapitre précédent (Chapitre II, p49). La synthèse d'un ényne-1,6 pouvant servir de précurseur pour la formation du noyau indolizidine à partir de cette hydroxylamine a alors été entreprise.

La réduction de l'hydroxylamine **93** par du zinc dans un mélange d'acide acétique et d'éthanol chauffé à 65 °C sous irradiation par des ultra-sons a conduit à la pipéridine **131** avec un bon rendement de 93%. Cette méthode avait précédemment été utilisée dans notre équipe pour réduire des *N*-hydroxypipéridines vinylées ou allylées en pipéridines correspondantes.^{46,47}

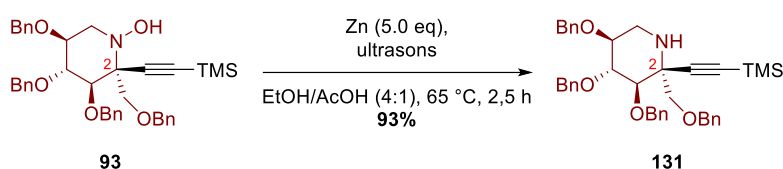


Schéma 66

Par la suite, l'ényne **26** peut être obtenu par *N*-allylation puis désilylation par K_2CO_3 dans le méthanol (rendement 88% sur deux étapes), ou directement en retirant le groupement triméthylsilyle sans isoler l'intermédiaire **132**, avec dans ce cas un rendement de 92% et un gain de temps puisqu'un traitement est évité (Schéma 67).

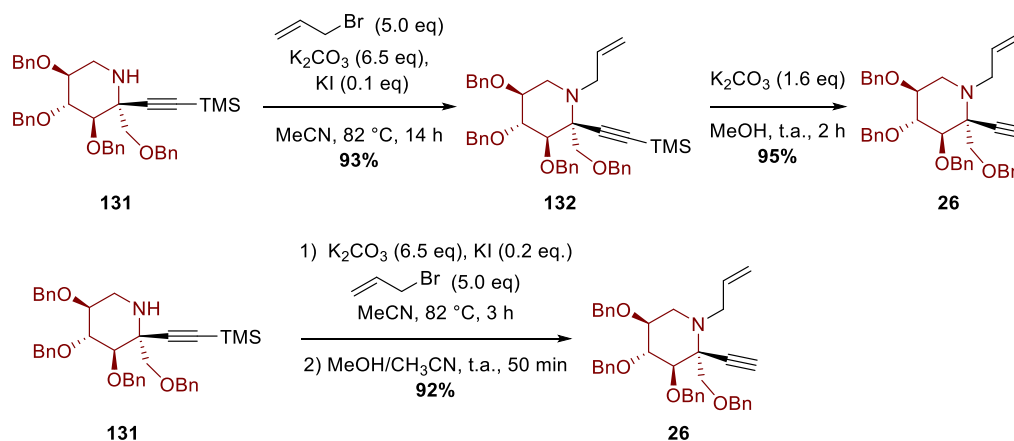


Schéma 67

Si les réactions de métathèse cyclisante d'oléfines ont largement été utilisées pour la synthèse d'iminosucres, ce n'est pas le cas des réactions de cycloisomérisations d'énynes-1,6. Des exemples impliquant des substrats dérivés de sucres ont été rapportés,¹⁶¹ mais nous n'avons pas trouvé de synthèse d'iminosucre faisant intervenir une réaction de ce type.

¹⁶¹ Sayyad, A. A.; Kaliappan, K. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 2017, 5055–5065.

Ainsi différentes conditions ont été considérées pour promouvoir la cycloisomérisation de l'ényne **26** (*Schéma 68*), afin d'identifier les plus efficaces, comme indiqué dans le *Tableau 3*.

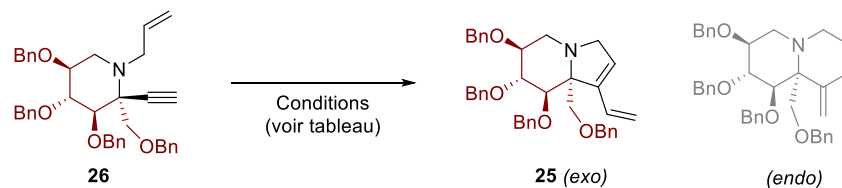


Schéma 68

Entrée ^[a]	Catalyseur	Température	Solvant	Atmosphère	Temps (h)	Résultats
1	GI ^[b]	t.a.	DCM	Ethylène	60	26 (38%) ^[c] , 25 (33%)
2	GI ^[d,e]	t.a.	DCM	Ethylène	48	26 récupéré
3	GII ^[d,e]	t.a.	DCM	Argon	24	26 récupéré
4	GII ^[d]	40 °C	DCM	Argon	22	25 (35%)
5	GII ^[d]	40 °C	DCM	Ethylène	24	25 (69%)
6	GII ^[d,f]	40 °C	DCM	Ethylène	24	25 (78%)
7	GII ^[d]	70 °C	Toluène	Ethylène	7	25 (29%)
8	HGII ^[d]	40 °C	DCM	Ethylène	24	25 (27%)

^a **26** = 10 mM,

^b 30 mol% de catalyseur

^c produit non pur

^d 20 mol% de catalyseur

^e En présence d'acide *para*-toluène sulfonique (1.1 eq)

^f Grosse quantité, n = 540 μmol

Tableau 3 : Cycloisomérisation de l'ényne 26

Dans un premier temps l'ényne **26** en solution dans le dichlorométhane ([**26**] = 10 mM) a été mis en présence de catalyseur **GI** (30 mol%) à température ambiante, sous atmosphère d'éthylène (*Tableau 3*, entrée 1) selon les conditions préconisées par le groupe de Mori.¹⁵³ Cet essai a permis d'obtenir le diène **25** désiré, mais avec un rendement de seulement 33% malgré un temps de réaction long. L'ényne de départ **26** a été récupéré en quantité importante, ce qui indique sa faible réactivité dans ces conditions. Soupçonnant que le manque de réactivité de l'ényne **26** en présence du catalyseur **GI** ne soit dû à la présence de l'atome d'azote basique, un autre essai a été conduit en présence d'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) par analogie avec des travaux du groupe de Djuric sur la synthèse d'azépines par cycloisomérisation d'un ényne-1,8 azoté.¹⁶² Cependant, après 48 h de traitement par 20 mol% de catalyseur **GI** en présence de 1,1 équivalent d'APTS (*Tableau 3*, entrée 2) à température ambiante dans le dichlorométhane, aucune réaction n'a été observée et l'ényne **26** a été récupéré intact.

¹⁶² Gracias, V.; Gasielki, A. F.; Djuric, S. W. *Tetrahedron. Lett.* **2005**, *46*, 9049–9052.

Le catalyseur **GII** ayant donné de meilleurs résultats que **GI** dans plusieurs exemples de cycloisomérisations rapportés dans la littérature,^{154,159,163} nous l'avons utilisé par la suite. En présence de ce catalyseur, à température ambiante et sous atmosphère d'argon (**Tableau 3**, entrée 3) l'ényne **26** est resté inerte. En revanche, à 40 °C (**Tableau 3**, entrée 4) le diène **25** a été obtenu avec un rendement encourageant de 35%. Lorsque la cycloisomérisation de **26** a été conduite dans le dichlorométhane à 40 °C en présence de **GII** (20 mol%) sous atmosphère d'éthylène (**Tableau 3**, entrée 5) le diène **25** a été isolé avec un bon rendement de 69%, contre 35% sous argon. En reproduisant la réaction dans ces conditions sur plus grosse échelle, un rendement de 78% a été atteint (**Tableau 3**, entrée 6). La présence d'éthylène dans le milieu réactionnel est donc apparue bénéfique à cette réaction. En revanche l'utilisation de toluène comme solvant, permettant de conduire la réaction à plus haute température, a été défavorable et dans ces conditions le diène **25** n'a été obtenu qu'avec un rendement de 29% (**Tableau 3**, entrée 7). Enfin le catalyseur **HGII** décrit par plusieurs équipes comme plus efficace que **GII** dans les réactions de métathèse cyclisante,¹⁶⁴ ou croisée,¹⁶⁵ a été moins performant pour promouvoir la cyclisation de **26** en **25** (**Tableau 3**, entrée 8).

De façon remarquable, dans tous les essais réalisés, un unique produit de cycloisomérisation a été détecté, démontrant l'excellente régiosélectivité de cette réaction. Une partie du spectre RMN ¹H de ce produit est représentée ci-dessous (**Figure 26**)

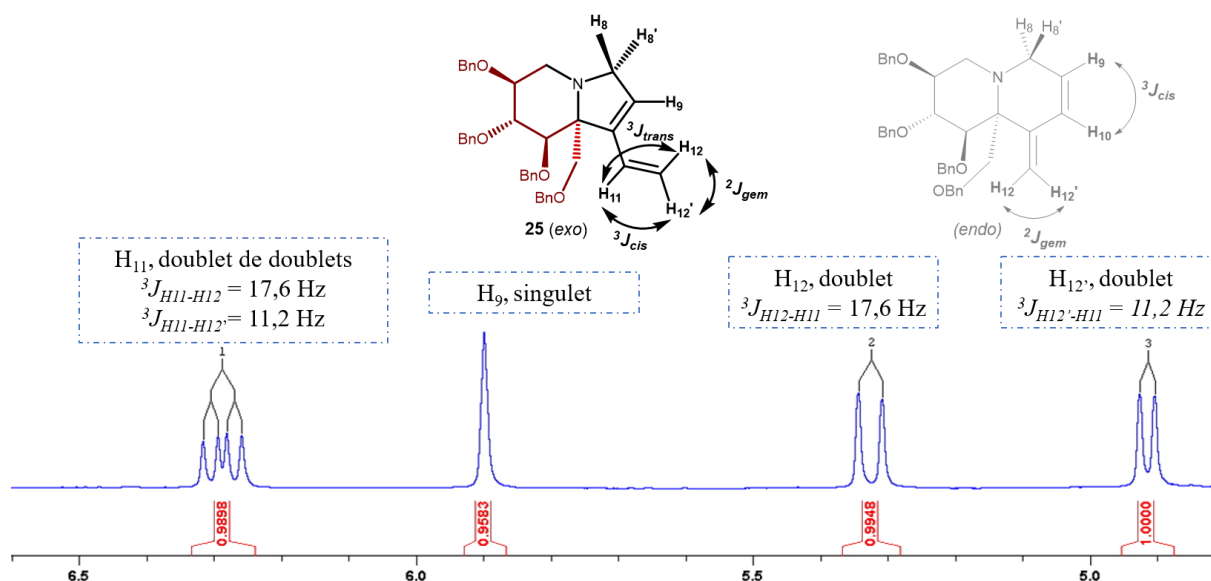


Figure 26 : Spectre RMN ¹H partiel du produit de cycloisomérisation **25** (solvant = CDCl₃)

¹⁶³ Mori, M.; Wakamatsu, H.; Saito, N.; Sato, Y.; Narita, R.; Sato, Y.; Fujita, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3872–3881.

¹⁶⁴ Binder, J. B.; Blank, J. J.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4885–4888.

¹⁶⁵ (a) Kitamura, T.; Sato, Y.; Mori, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9649–9657. (b) Stewart, I. C.; Douglas, C. J.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 441–444. (c) Hoveyda, A. H.; Gillingham, D. G.; Veldhuizen, J. J. V.; Kataoka, O.; Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Harrierty, J. P. A. *Org. Biomol. Chem* **2004**, *2*, 8–23.

On remarque sur ce spectre 4 protons éthyléniques, ce qui est cohérent avec la structure de l'un ou l'autre des produits de cycloisomérisation *exo* (**25**) ou *endo*. Cependant, la multiplicité des signaux et les constantes de couplage des multiplets observés pour les protons éthyléniques permet d'écarter la structure du produit *endo*. En effet ce produit possède deux protons susceptibles de coupler *via* un couplage $^3J_{cis}$ (H9 et H10), tandis que les protons géminaux H12 et H12' peuvent coupler en $^2J_{gem}$ (les constantes de couplage de ce type de protons étant de l'ordre de 0-2 Hz). Aucune constante de couplage caractérisant un couplage géminale n'est présente sur le spectre du produit obtenu, et aucun proton aliphatique n'est susceptible de coupler avec H12 et H12'. La multiplicité des signaux associés aux protons éthyléniques est donc incohérente avec la structure du produit *endo*. En revanche, la présence des deux constantes de couplage différentes est cohérente avec **25** : l'une est associée au couplage $^3J_{trans}$ et l'autre au couplage $^3J_{cis}$, ce qui donne deux doublets différents pour H12 et H12'. Le proton H11 étant impliqué dans les deux couplages, il apparaît sous la forme d'un doublet de doublets. Enfin, le proton H9 apparaît sous la forme d'un singulet, ce qui indique une absence de couplage avec les protons aliphatiques H8 et H8'.

On peut aussi discuter une seconde portion du spectre RMN 1H de **25** (représenté en bleu), en la superposant au spectre de l'ényne de départ **26** (représenté en rouge), l'analyse par RMN étant effectuée en solution dans le $CDCl_3$ pour les deux composés (**Figure 27**).

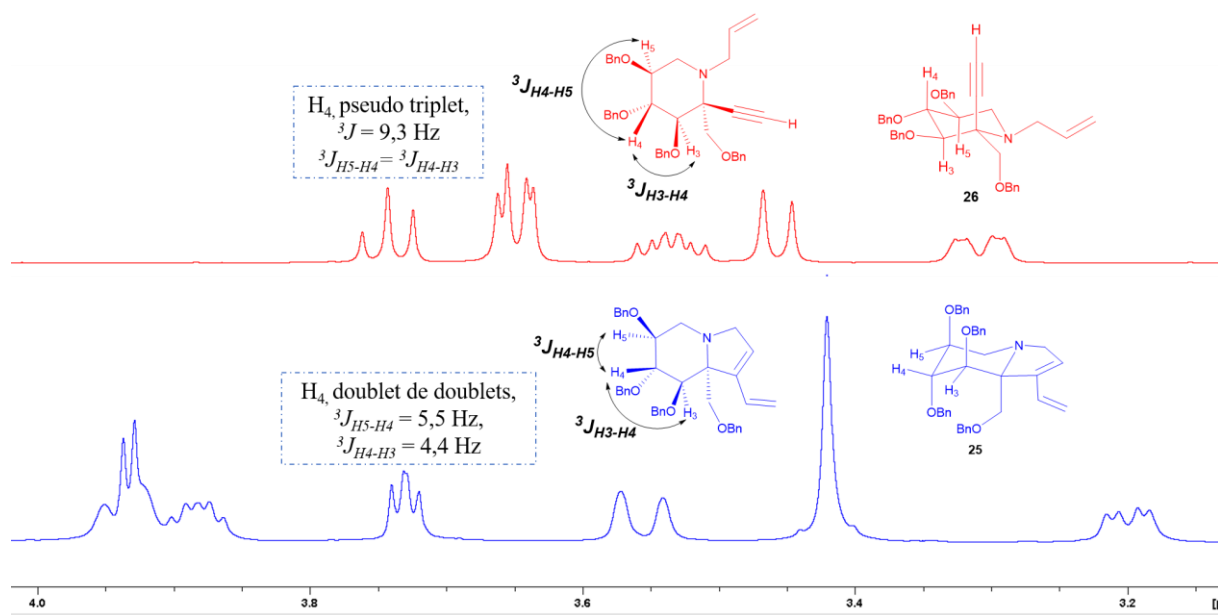


Figure 27 : Spectres RMN 1H partiels de l'ényne **26** et du diène **25** superposés (solvant = $CDCl_3$)

Sur le spectre de l'ényne **26**, le proton H4 est caractérisé par un triplet dont la constante de couplage est de 9.3 Hz. Cette multiplicité s'explique par la proximité des constantes de couplages $^3J_{H4-H5}$ et $^3J_{H3-H4}$, qui sont quasiment identiques. De plus, la valeur de 9.3 Hz indique que pour cet ényne **26**, les protons se trouvent en positions axiales. En revanche, après la réaction de cycloisomérisation, on constate que la multiplicité du proton H4 a changé.

Non seulement deux constantes de couplage peuvent être mesurées pour ce proton, mais surtout les valeurs (proches de 5 Hz) de ces constantes signifient que les substituants benzyles sont passés en positions axiales dans le conformère majoritaire. Ce constat est surprenant, il est cependant cohérent avec les résultats obtenus par Boisson *et al.* au cours de la synthèse de l'indolizidine **6b** (Schéma 69).⁴⁶ On peut ainsi supposer que la formation du cycle à 5 chaînons génère une tension de cycle qui impose ce changement de conformation.

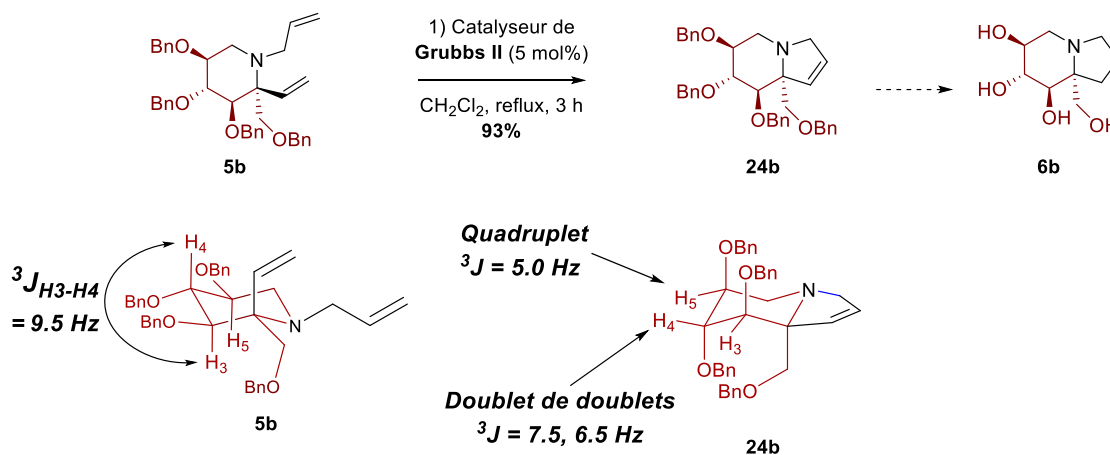


Schéma 69

II.2 Synthèse de l'ényne **133** et cycloisomérisation (2^{ème} approche)

A l'issue de la cycloisomérisation de l'ényne **26**, le diène **25** possédant un squelette indolizidine a été obtenu avec succès. Cependant plusieurs étapes peuvent être nécessaires pour introduire, à partir de ce composé, un groupe fonctionnel compatible avec la confection des sondes de type **3**. Afin d'éviter ces nombreuses étapes, une réaction de cycloisomérisation sur un analogue de l'ényne **26** a été envisagée, permettant d'accéder directement à un diène fonctionnalisé en minimisant les pertes de matière (Schéma 70). En effet, la cycloisomérisation de **133** était susceptible de conduire à un transfert du groupe acétate allylique de la chaîne portée par l'atome d'azote vers la double liaison (disubstituée) formée lors de la cyclisation.

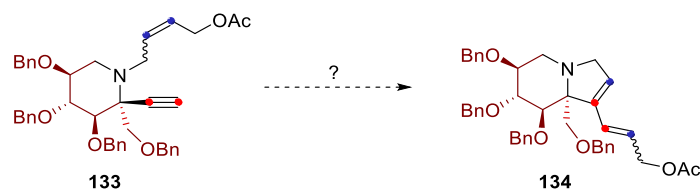
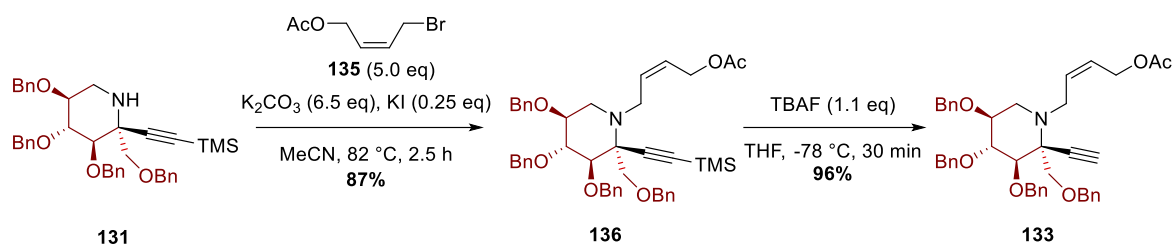
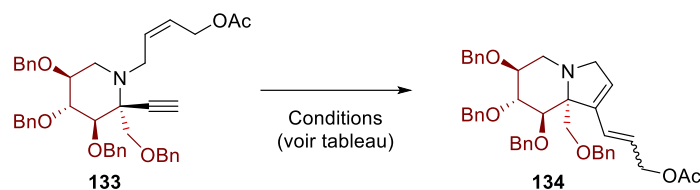


Schéma 70

Pour tester cette voie, l'intermédiaire **136** a été préparé en traitant la pipéridine **131** par le 1-bromo-4-acétoxybut-2-ène (**135**) dans les conditions de *N*-allylation précédemment utilisées, ce qui a permis d'obtenir **136** avec un bon rendement de 87% (Schéma 71). Afin de ne pas affecter l'acétate qui ne résisterait probablement pas à un traitement par K_2CO_3 dans le méthanol, cet intermédiaire **136** a été traité par le fluorure de tétra-*n*-butylammonium à -78°C , formant **133** avec un excellent rendement.



Nous avons par la suite étudié la réaction de cycloisomérisation de l'ényne **133** selon les conditions décrites dans le **Tableau 4** ci-dessous.



Entrée ^[a]	Catalyseur ^[b]	Solvant	Température	Temps	Résultat
1	GII	DCM	40 °C	24 h	133 isomérisé (43%) + décomposition
2 ^[c]	GII	Toluène	80 °C	24 h	134 (28%) + mélange dégradé
3 ^[d]	GII	DCM	40 °C	24 h	134 (29%) + 133 isomérisé (25%)
4 ^[d]	GII	Toluène	80 °C	72 h	133 isomérisé+ additif 137 isomérisé
5 ^[d]	HGII	DCM	1) t.a. 2) 30 °C 3) 40 °C	1) 48 h 2) 24 h 3) 48 h	133 isomérisé (44%) + mélange dégradé
6 ^[d]	GII	DCE	80 °C	96 h	133 isomérisé + mélange dégradé

^[a] : **133** = 10 mM

^[b] : 20 mol%

^[c] : En présence de HCl (2.0 eq)

^[d] : En présence de 1,4-diacétoxybut-2-ène (4.0 eq)

Tableau 4 : Essais de cycloisomérisations de 133

Le premier essai de cycloisomérisation de l'ényne **133** a été mené dans des conditions réactionnelles proches de celles utilisées pour la synthèse du diène **25**, c'est-à-dire en solution dans le dichlorométhane (concentration en **133** de 10 mM) à 40 °C, en présence du catalyseur **GII** (20 mol%), mais en absence d'éthylène. Malheureusement, après 24 h dans ces conditions, le diène **134** n'a pas été détecté dans le mélange de produits formés, qui était relativement complexe (**Tableau 4**, entrée 1). Néanmoins, la réactivité de la double liaison de **133** avec le catalyseur **GII** a pu être mise en évidence car l'ényne **133** initialement présent sous la forme d'un seul isomère *Z*, a été récupéré sous la forme d'un mélange *Z/E* en fin de réaction.

Cet essai a donc montré que le catalyseur **GII** réagit avec la double liaison, mais l'alkylidène intermédiaire ne réagit pas avec la triple liaison pour former le diène **134** désiré. Un deuxième essai a été réalisé à plus haute température dans le toluène, et en présence d'acide chlorhydrique (**Tableau 4**, entrée 2). Ces conditions vigoureuses ont cette fois permis d'isoler le diène **134** désiré (28%), mais elles ont aussi conduit à une forte dégradation du substrat et/ou du produit au vu de la complexité du mélange brut obtenu. L'utilisation d'éthylène a alors été envisagée, afin de reproduire les conditions recommandées par Mori.¹⁵³ Cependant l'éthylène peut aussi réagir avec le produit **134** dans une réaction de métathèse croisée, et mener ainsi au diène **25** déjà obtenu précédemment. Pour cette raison le 1,4-diacétoxybut-2-ène (**137**) a été utilisé comme additif alternatif à l'éthylène. L'ajout de cet additif (4 équivalents) dans des conditions douces similaires à celles de l'entrée 1 a permis d'obtenir le diène **134** souhaité, avec un rendement encore modeste de 29%, mais sans entraîner de dégradation significative (**Tableau 4**, entrée 3). De façon surprenante, l'utilisation de ce même additif à plus haute température dans le toluène n'a pas permis de former le diène **134** (**Tableau 4**, entrée 4).

Le catalyseur **HGII**, décrit dans la littérature comme plus efficace que **GII** pour les métathèses croisées d'oléfines,¹⁶⁵ a alors été testé pour induire la cycloisomérisation de **133**, même si ce catalyseur n'avait pas été avantageux pour la transformation de **26** en **25**. Lorsque **133** a été traité par **HGII** à température ambiante (**Tableau 4**, entrée 5), aucune réaction n'a été observée après 48 h. La température a alors été augmentée de façon graduelle jusqu'à 40 °C, sans que cela n'aboutisse à la formation de **134**. Finalement, un nouvel essai a été effectué en appliquant les meilleures conditions réactionnelles trouvées pour la cycloisomérisation de **133** en **134** (**Tableau 4**, entrée 3) mais en chauffant à 80 °C dans le 1,2-dichloroéthane, afin d'augmenter le taux de conversion de l'ényne **133** en diène **134**. Néanmoins, dans ces conditions le diène **134** n'a pas été isolé et l'ényne **133** (sous forme d'un mélange d'isomères) a été le seul produit pouvant être caractérisé à partir du mélange complexe obtenu (**Tableau 4**, entrée 6). Ces essais n'ayant pas permis d'identifier des conditions réactionnelles permettant l'obtention du diène fonctionnalisé **134** en une seule étape de cycloisomérisation, la fonctionnalisation par métathèse croisée d'oléfines du diène **25** a alors été envisagée.

III. Fonctionnalisation de l'indolizidine diène **25**

III.1. Métathèse croisée d'oléfines

La première stratégie envisagée pour fonctionnaliser l'indolizidine diène **25** en vue de l'associer à un bras espaceur reposait sur une métathèse croisée d'oléfines entre ce diène et différentes oléfines monosubstituées et fonctionnelles **138**, **139**, et **141** (*Schéma 73*).

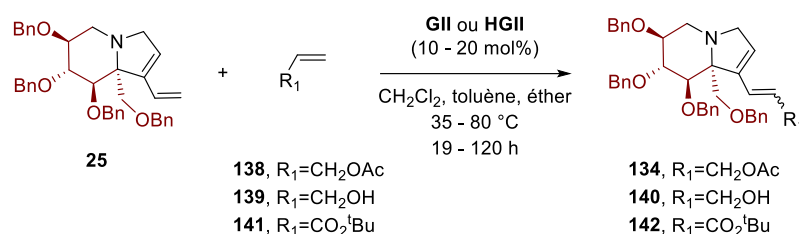


Schéma 73

Ce travail a été réalisé par Mladena Glavas, lors d'un séjour réalisé dans notre équipe pendant sa thèse. Malgré le large éventail de conditions testées pour réaliser ce type de transformation (20 mol% **GII**, différents solvants, différentes températures, durées variées) et l'utilisation de différents additifs (acides sulfoniques, éthylène) tous les essais de métathèse croisée entre le diène **25** et les différentes oléfines n'ont conduit qu'à la formation de mélanges complexes dans lesquels aucune trace des produits souhaités (**134**, **140** et **142**) n'a été détectée. Le catalyseur **HGII** n'a pas non plus permis de favoriser la formation de ces produits.¹⁶⁶

Suite à ces nombreux essais impliquant exclusivement des oléfines monosubstituées, nous avons essayé de réaliser la métathèse croisée du diène **25** et de l'oléfine disubstituée **137**. Le groupe de Mori et celui de Clark ont utilisé avec succès cette oléfine (ou son isomère *E* **137'**) dans des réactions de métathèse croisées au cours de leurs travaux portant sur la synthèse de la (+)-anthramycine^{165a} et la synthèse d'éthers polycycliques,¹⁶⁷ respectivement (*Schéma 74*). Les travaux rapportés par Mori *et coll.* suggèrent une réactivité accrue de **137** par rapport à divers acrylates engagés dans des réactions de métathèses croisées sur un même substrat. L'équipe de Grubbs a aussi rapporté la bonne réactivité de l'oléfine **137'** dans les réactions de métathèses croisées d'oléfines.¹⁶⁸

¹⁶⁶ Mladena Glavas, Rudler Boskovic Institute, Rapport de stage, **2018**.

¹⁶⁷ Clark, J. S.; Elustondo, F.; Kimber, M. C. *Chem. Commun.* **2004**, 2470–2471.

¹⁶⁸ Blackwell, H. E.; O'Leary, D. J.; Chatterjee, A. K.; Washenfelder, R. A.; Bussmann, D. A.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 58–71.

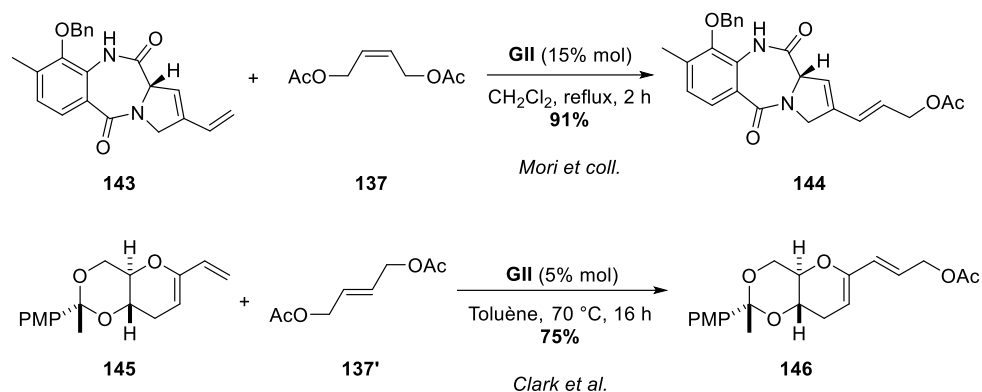


Schéma 74

Le **Tableau 5** ci-dessous résume l'étude de la réaction de métathèse croisée entre le diène **25** et un excès d'alcène **137** pour former le diène **134**.

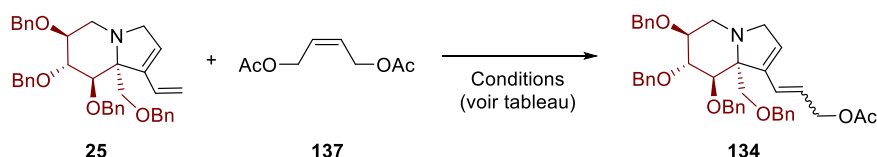


Schéma 75

Entrée	Catalyseur (eq)	Température	Solvant	Temps	Résultat
1 ^[a]	GII (0.25)	40 °C	DCM	3 h	25 (30%) + dégradation
2 ^[a]	GII (0.25)	40 °C	DCM	20 h	25 (22%) + dégradation
3 ^[b]	GII (0.2)	70 °C	Toluène	5 j	Mélange complexe, 25 non récupéré
4 ^[a,c]	GII (0.25)	40 °C	DCM	7 h	25 (43%) + dégradation
5 ^[a,d]	GII (0.2)	40 °C	DCM	6 h	134 , 18% + dégradation
6 ^[a,e]	GII (0.2)	40 °C	DCM	36 h	25 (34%) + dégradation
7 ^[a]	HGII (0.2)	1) t.a. 2) 40 °C	DCM	1) 72 h 2) 7 j	25 (29%) + dégradation

^[a] : **137** = 10 eq

^[b] : **137** = 3.0 eq

^[c] : En présence de BF₃.Et₂O (1.2 eq)

^[d] : En présence d'APTS (1.2 eq)

^[e] : En présence d'APTS (2.0 eq)

 Tableau 5 : Essais de métathèse croisée de **25** avec **137**

Le premier essai mené avec le catalyseur **GII** (25 mol%) au reflux du dichlorométhane pendant 3 h n'a pas permis d'isoler le diène **134** souhaité, seul le produit de départ et un mélange dégradé ont été obtenus (**Tableau 5**, entrée 1). La réaction a alors été conduite sur une durée plus longue mais le résultat a été similaire (**Tableau 5**, entrée 2). Un essai a alors été conduit à 70 °C, dans le toluène (**Tableau 5**, entrée 3), aboutissant à la formation d'un mélange complexe, dans lequel aucune trace du substrat **25** ou du diène **134** n'a été décelée.

Afin d'éviter la possible désactivation du complexe de ruthénium par l'atome d'azote du substrat **25**, un essai en présence d'éthérate de trifluorure de bore a été mené (entrée 4, **Tableau 5**). Un résultat similaire à celui des essais précédents a été obtenu avec la dégradation du substrat de départ **25**. Cependant lorsque l'APTS a été utilisé comme additif, **134** a pu être obtenu avec un rendement de 18%, sous la forme d'un mélange d'isomères *E/Z* (entrée 5, **Tableau 5**). Le temps de réaction a alors été allongé mais un mélange plus fortement dégradé a été obtenu (entrée 6, **Tableau 5**). Avec le catalyseur **HGII** (20 mol%), aucune transformation de **25** n'a été observée après 72 h à température ambiante (**Tableau 5**, entrée 7). Après plusieurs jours à 40 °C, une dégradation du diène substrat **25** a été constatée sans formation du diène **134**. Les nombreux essais entrepris ayant tous mené à une importante dégradation, il est finalement apparu que le diène **25** n'était pas stable. Sa dégradation partielle a même été observée à basse température (-18 °C) sous atmosphère d'argon après quelques semaines de stockage. Bien que la stabilité du produit **134** n'ait pas été évaluée, il est très probable que cette molécule comportant un même motif diénique soit peu stable elle-aussi. Pour ces raisons, la stratégie de fonctionnalisation de **25** a dû être réévaluée en considérant des conditions ne provoquant pas une importante dégradation du substrat, et conduisant à la formation d'un intermédiaire stable.

II.2. Ozonolyse

L'ozonolyse est une réaction qui permet d'oxyder un alcène pour accéder à des composés carbonylés, selon un mécanisme élucidé par Rudolf Criegee.¹⁶⁹ Cette réaction a été appliquée à de très nombreux substrats, et on peut trouver dans la littérature des exemples de réactions d'ozonolyse régiosélectives conduites sur divers diènes conjugués.¹⁷⁰ Le groupe de Żurawiński a développé une méthode pour accéder à des cyclopenténones, molécules qui peuvent ensuite être utilisées pour la synthèse de prostaglandines.¹⁷¹ L'ozonolyse du diène **147** se déroule de façon régiosélective, et mène à l'aldéhyde **148** avec un bon rendement de 76% (**Schéma 76**).

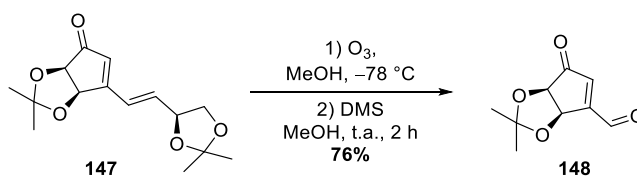


Schéma 76

Nous avons essayé d'appliquer au diène **25** des conditions de réaction similaires afin d'accéder à un aldéhyde (**Schéma 77**).

¹⁶⁹ Criegee, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 745–752.

¹⁷⁰ Veyzoglu, T.; Mitscher, L. A.; Swayze, J. K. *Synthesis* **1980**, 807–810.

¹⁷¹ Łukasik, B.; Mikołajczyk, M.; Bujacz, G.; Żurawiński, R. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 807–816.

Lors du premier essai, l'oxydation du diène **25** par l'ozone suivie d'une réduction par le sulfure de diméthyle a conduit à un mélange complexe, dans lequel ni **25** ni le produit attendu n'ont été identifiés.

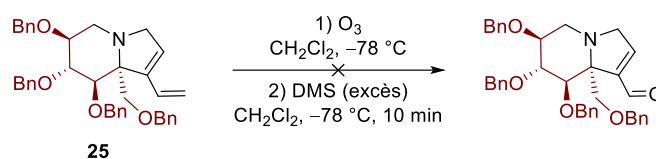


Schéma 77

L'utilisation d'un réducteur tel que le NaBH₄ permet d'accéder directement à un alcool, sans isoler l'aldéhyde, susceptible d'être instable.¹⁷² Malheureusement l'ozonolyse de **25** suivie d'un traitement par NaBH₄ (*Schéma 78*) a aussi mené à la formation d'un mélange complexe, dans lequel le produit souhaité n'a pas été identifié.

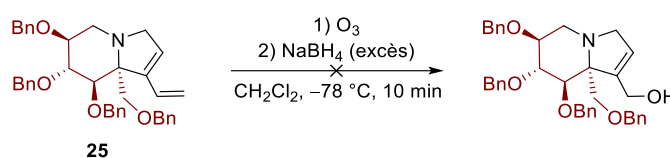


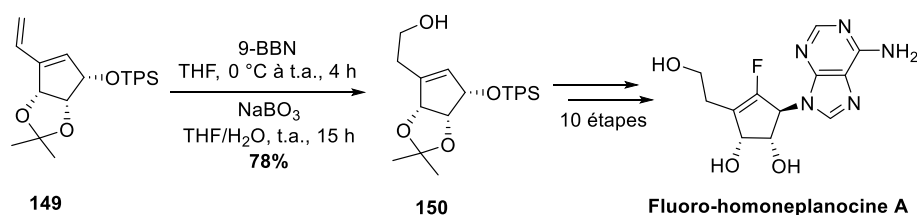
Schéma 78

Plusieurs éléments peuvent expliquer les résultats de ces deux essais. Tout d'abord il est possible que dans les conditions réactionnelles testées, la réaction ne soit pas régiosélective, menant ainsi à un mélange de plusieurs produits de coupure oxydante. De plus, le diène **25** possède un atome d'azote tertiaire, susceptible d'être oxydé en un produit instable.

III.3. Hydroboration-oxydation

Exemples d'hydroboration/oxydation régiosélective de diènes conjugués

Dans la littérature de nombreuses réactions de mono-hydroboration régiosélectives menées sur des diènes conjugués ont été décrites, utilisant divers réactifs d'hydroboration. Parmi ces réactifs, l'un des plus encombrés est le 9-BBN, disponible dans le commerce ou préparé à partir de borane et de 1,5-cyclooctadiène. Ce réactif a été utilisé par Chandra *et al.* lors de la synthèse de la fluoro-homoneplanocine-A, un potentiel antiviral (*Schéma 79*).¹⁷³



¹⁷² Tanaka, M.; Norimine, Y.; Fujita, T.; Suemune, H.; Sakai, K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6952–6957.

¹⁷³ Chandra, G.; Majik, M. S.; Lee, J. Y.; Jeong, L. S. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2134–2137.

Schéma 79

Après hydroboration du diène **149**, l'oxydation par le perborate de sodium dans un mélange THF/eau a mené à l'alcool **150** avec un bon rendement de 78%. Un autre réactif d'hydroboration encombré, le disiamylborane, a été utilisé par l'équipe de Fukuyama lors de l'exploration d'une voie de synthèse de la merrilactone A,^{174a} ainsi que par Takashi et Shibasaki lors de la synthèse d'un analogue de prostacycline (**ZK96480**).^{174b} Au cours de cette synthèse, l'étape d'hydroboration suivie d'une oxydation par le peroxyde d'hydrogène (30% aq) en milieu basique a permis d'obtenir le produit **152**, avec un bon rendement de 90% à partir du diène-1,3 **151**.

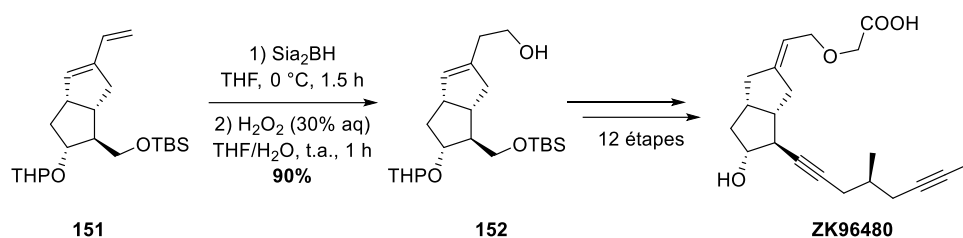


Schéma 80

Le dicyclohexylborane est également un réactif d'hydroboration encombré, qui a été utilisé par l'équipe de Trost sur le diène-1,3 **153**, issu d'une réaction de cycloisomérisation d'ényne.¹⁷⁵ À l'issue de l'étape d'hydroboration, le trialkylborane intermédiaire (non isolé) a été oxydé par le peroxyde d'hydrogène en milieu basique à température ambiante, menant au produit **154** qui a ensuite été transformé en acide kaïnique en 10 étapes.

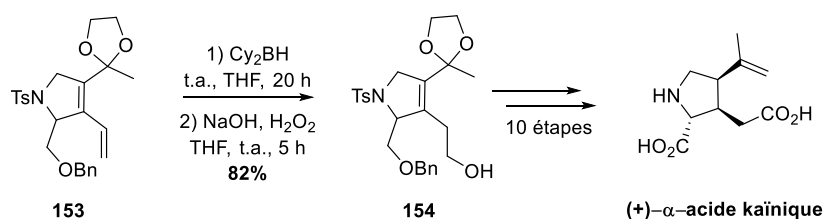


Schéma 81

Enfin, divers complexes de borane ont été utilisés avec succès par le groupe de Kigoshi,¹⁷⁶ ainsi que par Tamiaki et Yagai.¹⁷⁷ On remarque que dans le cas du groupe de Kigoshi (*Schéma 82*), l'utilisation du complexe de borane•sulfure de diméthyle (réactif non encombré) conduit à l'alcool souhaité avec un rendement inférieur (58 %) à celui des cas précédents, pour lesquels des dialkylboranes ont été employés. Cependant la régiosélectivité n'est pas commentée, et on ne sait donc pas si le rendement modeste en alcool **156** est dû à la formation d'un produit secondaire ou à un manque de réactivité.

¹⁷⁴ (a) Harada, K.; Kato, H.; Fukuyama, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7407–7410. (b) Takahashi, A.; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1227–1231.

¹⁷⁵ Trost, B. M.; Rudd, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4763–4776.

¹⁷⁶ Hayakawa, I.; Niida, K.; Kigoshi, H. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11568–11571.

¹⁷⁷ Yagai, S.; Tamiaki, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, *23*, 3135–3144.

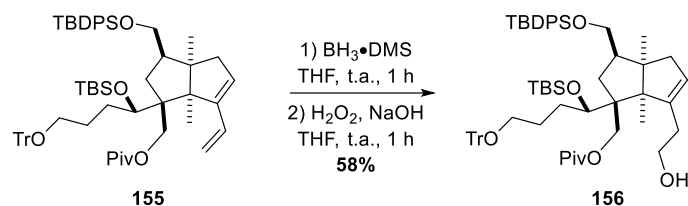


Schéma 82

Hydroboration/oxydation régiosélective du diène **25**

Au cours d'essais préliminaires,¹⁷⁸ le 9-BBN avait été employé en tant que réactif d'hydroboration du diène **25** pour favoriser la régiosélectivité souhaitée. Après oxydation de l'intermédiaire par le perborate de sodium, un mélange complexe de produits a été obtenu, dans lequel l'alcool **157** n'a pas été décelé. L'utilisation du complexe $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$ et du peroxyde de carbamide en tant qu'oxydant a mené à la formation de **157** avec un rendement maximum de 53% (Schéma 83). Néanmoins, le manque de reproductibilité de cette réaction et son rendement encore modeste nous ont amenés à explorer de nouvelles conditions pour réaliser cette hydroboration/oxydation.

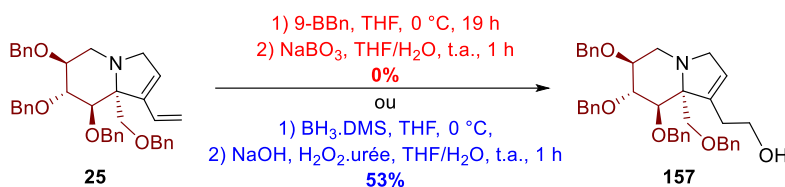


Schéma 83

Le dicyclohexylborane a alors été sélectionné comme réactif d'hydroboration. Ce réactif est disponible dans le commerce, mais il peut aussi être fraîchement préparé en solution par réaction du cyclohexène avec le $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$ dans le THF ou l'éther diéthylique.¹⁷⁹ Le peroxyde de carbamide a été conservé en tant qu'oxydant : facile à manipuler et à peser, il offre aussi l'avantage d'être parfaitement stable, à l'inverse du peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse. Les résultats des essais d'hydroboration/oxydation du diène **25** obtenus avec ces deux réactifs sont décrits ci-dessous (Tableau 6), le dicyclohexylborane ayant été fraîchement préparé juste avant utilisation.

¹⁷⁸ Gautier de Lahaut, G. Rapport de stage de Master 2; Université Paris-Sorbonne, 2018.

¹⁷⁹ Pelter, A.; Smith, K.; Brown, H. C. *Best synthetic methods - Borane reagents*, Academic Press, New York, 1988.

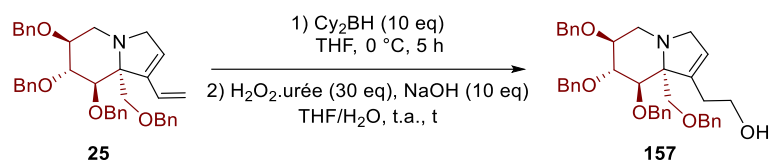


Schéma 84

Entrée	Préformation Cy ₂ BH	Durée d'oxydation	Rendement
1	1h40	2 h	18 % (Oxydation incomplète)
2	1h40	36 h	71 %
3	1h40	22 h	68%
4 ^[a]	2h30	22 h	92%

[a]: **25** fraîchement préparé

Tableau 6 : Hydroboration/oxydation sélective du diène **25** par le dicyclohexylborane

Le premier essai d'hydroboration de **25** a été mené avec 10 équivalents de dicyclohexylborane dans le THF pendant 5 heures, et a été suivi par une oxydation avec un large excès de peroxyde de carbamide, en milieu biphasique basique pendant une durée de seulement 2 heures. Ce premier essai a mené à une transformation très incomplète, l'alcool **157** n'étant obtenu qu'avec un rendement de 18%, accompagné de nombreux produits formant un mélange complexe (**Tableau 6**, entrée 1). Une oxydation a alors été reconduite sur le mélange obtenu, et une formation supplémentaire de **157** a été observée. La durée de l'étape d'oxydation a alors été étendue, ce qui a permis d'obtenir de meilleurs rendements, d'environ 70% dans les 2 essais suivant (**Tableau 6**, entrées 2 et 3). Enfin l'utilisation de diène fraîchement préparé a permis d'obtenir un rendement de 92% (**Tableau 6**, entrée 4), ce qui valide l'importance de ne pas stocker ce diène pour éviter sa décomposition. De façon remarquable, le produit **157** a été le seul produit isolé, malgré l'utilisation d'un large excès de dicyclohexylborane, ce qui démontre une importante différence de réactivité vis-à-vis de l'hydroboration entre la double liaison endocyclique et la double liaison terminale dans le diène **25**.

Lors du premier essai mené dans le DMF (essai 1, **Tableau 7**), solvant aprotique polaire favorisant la S_N2 , l'alcool **157** a été déprotoné par le NaH (à 0 °C), puis le mésylate **158a** a été ajouté, également en solution dans le DMF. Le milieu réactionnel a alors été chauffé à 70 °C pendant 6 h, puis la réaction a été stoppée par addition de méthanol à 0 °C. Après purification du produit brut par chromatographie, une fraction contenant le mésylate **158a** pur (45%) a été isolée, ainsi qu'une fraction contenant **157** et **158a** sous forme de mélange en proportions 2 : 1 d'après le spectre de RMN 1H . Aucune trace du produit **159a** attendu n'a donc été observée au cours de cet essai. Un produit correspondant au mésylate substitué par le méthanol a également été obtenue (42%). Un nouvel essai a alors été conduit dans le THF en utilisant du LiHMDS (essai 2, **Tableau 7**). Dans cet essai, le mésylate (2.0 équivalents) et l'alcool ont été mélangés dans le THF, puis du LiHMDS (1.2 eq) a été ajouté à -78 °C. La réaction a ensuite été conduite à température ambiante, et seuls les produits de départ ont été observés par CCM après 4 h de réaction, ce qui a conduit à un nouvel ajout de LiHMDS (1.2 eq). Le milieu réactionnel s'étant épaissi et aucune progression n'ayant été observée par CCM, du THF a alors été ajouté ainsi qu'une quantité supplémentaire de LiHMDS (10 eq) et du tamis moléculaire 4Å. Aucun avancement n'étant visible sur CCM après 96 h, la réaction a été stoppée, et un mélange des produits de départ a été révélé par analyse RMN 1H .

Dans un dernier essai, l'alcool **157** a été mélangé à de l'hydrure de sodium (5.0 eq) pendant 30 minutes dans le THF à 0 °C (essai 3, **Tableau 7**). Puis, le mélange a été réchauffé à température ambiante et le mésylate **158a** a été ajouté, avec de l'iodure de potassium (0.5 eq). Cet essai a produit un mélange complexe de produits qui a été purifié par chromatographie. Une première fraction correspondant au mésylate **158a** a été identifiée, ce composé a ainsi été récupéré à hauteur de 37% de la quantité initiale. Une seconde fraction constituée d'un mélange de l'alcool **157** et d'un dérivé du mésylate **158a** a également été obtenue. Enfin, dans une dernière fraction, le produit **159a** a été identifié mais en mélange avec d'autres composés, ce qui a empêché sa caractérisation complète. Le rendement correspondant n'a également pas pu être strictement déterminé, mais a été évalué comme inférieur à 20%. Les difficultés rencontrées ont été attribuées à un manque de réactivité du mésylate **158a**. Pour contourner ces difficultés, l'alcool **157** a été converti en mésylate **160** à son tour (**Schéma 88**), dans l'objectif de le faire réagir avec l'alcoolate dérivé du bras espaceur **94a**, toujours *via* une étherification de type Williamson (**Schéma 89**).¹⁷⁸

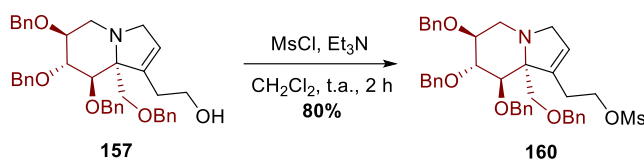


Schéma 88

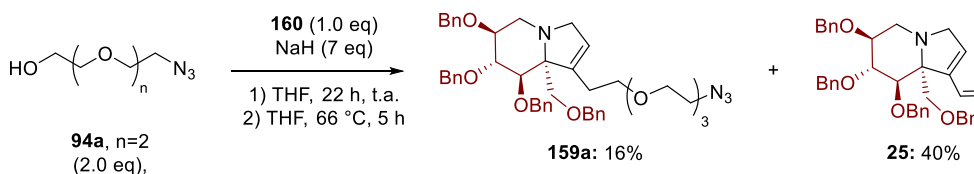


Schéma 89

Cette nouvelle réaction de substitution nucléophile a été réalisée en utilisant comme base l'hydrure de sodium dans le THF. Après 22 h, aucun avancement de la réaction n'a été mis en évidence par le suivi CCM, le milieu a donc été chauffé au reflux du THF pendant 5 h. Le mélange réactionnel a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne, ce qui a permis d'isoler le produit **159a**, avec un rendement de seulement 16%. Le produit majoritaire n'est autre que le diène **25**, résultant d'une réaction d'élimination du mésylate **160**. Cette transformation est favorisée par la basicité du milieu et probablement par la conjugaison de la double liaison formée avec la double liaison endocyclique. Ce résultat a été obtenu lors d'un unique essai, et ces conditions n'ont pas été reproduites par la suite. Pour défavoriser cette élimination indésirable, il a été envisagé de réduire la double liaison endocyclique de **157** avant de transformer l'alcool primaire en sulfonate. Une hydrogénation pallado-catalysée a été envisagée, compte tenu de la résistance des groupes benzyles à l'hydrogénolyse lorsqu'un atome d'azote présent dans la molécule est susceptible de désactiver le catalyseur.⁸⁸ En effet, nous avons pu vérifier que même sous forte pression d'hydrogène (9 atm) et en présence de 10 mol% de palladium sur charbon les quatre groupes protecteurs benzyles de **157** demeurent intacts, tandis que la double liaison C9-C10 est hydrogénée (*Schéma 90*). L'hydrogénation de **157** requiert un temps de réaction long, une forte pression d'hydrogène, et donc l'usage d'un réacteur pour obtenir un bon taux de conversion en **161**. Ce réacteur étant sous forte pression, il n'est pas possible de suivre l'évolution de la réaction et il est arrivé à plusieurs reprises qu'elle soit incomplète. Une durée de trois jours est en général suffisante pour obtenir une conversion quasiment complète, même si un signal résiduel correspondant au proton éthylénique en position C9 reste généralement visible par RMN ¹H du produit brut (~5%). Le rendement de cette transformation demeure donc variable, et est généralement compris entre 50 et 70% après purification de l'alcool **161** par chromatographie sur silice. L'analyse RMN ¹H du produit purifié a permis de constater qu'un seul diastéréoisomère était formé lors de cette transformation (l'alcool **161**). Sa configuration *S* en position C10 a été déterminée par RMN grâce à une expérience NOESY révélant une corrélation entre les protons H3 et H10.

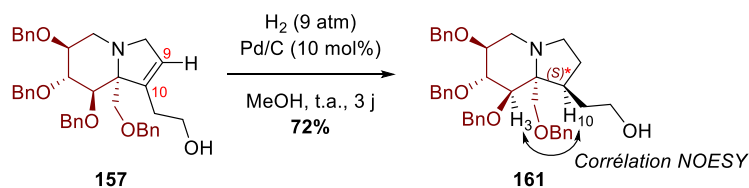


Schéma 90

La formation de cet unique diastéréoisomère n'était pas prévue *a priori*. Elle représente cependant une aubaine et suggère que la conformation de **157** favorise l'hydrogénation sur la face inférieure, qui serait la plus accessible. L'analyse du spectre RMN ¹H de **157** montre que le conformère majoritaire est celui pour lequel les groupement benzyles sont en positions axiales (constante de couplage des protons H3 et H4 proches de 5 Hz, suggérant des positions équatoriales pour ces protons). Ainsi dans le conformère majoritaire, la différence d'accessibilité entre les deux faces de la double liaison n'est pas visible (conformère **C**, *Schéma 91*).

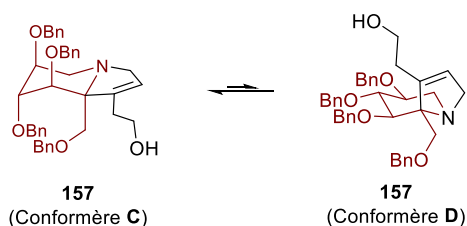


Schéma 91

En revanche, sur le second conformère **D**, on voit que l'une des deux faces est beaucoup moins accessible. Ce conformère **D** permettrait donc d'expliquer la diastéréosélectivité observée, mais le spectre RMN ¹H nous indique qu'il est minoritaire. Si ce conformère **D** était beaucoup plus réactif que le conformère **C**, on pourrait alors expliquer la diastéréosélectivité de l'hydrogénation, en accord avec le principe de Curtin-Hamett. Il est important de souligner que les raisonnements réalisés ici à partir des constantes de couplage observées en RMN ¹H reposent sur l'hypothèse que le cycle à 6 chaînons adopte une conformation chaise, laquelle peut en réalité être déformée par la présence du cycle à 5 chaînons accolé. Par conséquent, des calculs théoriques devront être menés pour déterminer avec certitude l'origine de la diastéréosélectivité de cette hydrogénation.

La méthylation de l'alcool **161** a ensuite été entreprise, en vue de substituer ultérieurement le mésylate qui aurait été obtenu par des alcoolates dérivés de bras espaceurs, avec un moindre risque d'élimination que ce qui avait été observé avec **160**. Malheureusement, le traitement de l'alcool **161** par le chlorure de mésyle en présence d'un excès de triéthylamine dans le dichlorométhane à température ambiante a conduit à la formation d'un mélange très complexe de produits (*Schéma 92*).

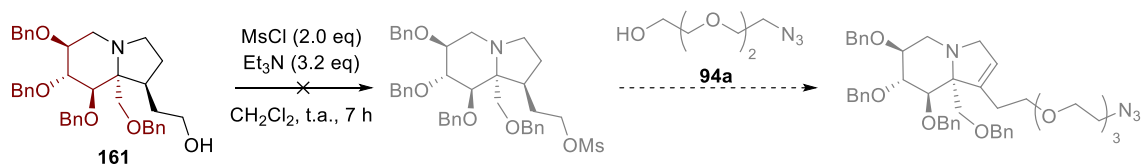


Schéma 92

Bien qu'aucun produit de ce mélange n'ait été isolé par chromatographie sur colonne, une hypothèse peut expliquer l'absence du mésylate attendu à l'issue de cette réaction. Après la méthylation de **161** l'atome d'azote nucléophile pourrait déplacer le mésylate formé *via* une réaction de substitution nucléophile intramoléculaire.

L'ammonium quaternaire intermédiaire serait alors susceptible d'évoluer vers différents produits résultant d'une ouverture de cycle, par élimination ou substitution nucléophile (*Schéma 93*). La présence d'un grand nombre de protons compatibles avec une élimination depuis plusieurs positions explique ainsi la formation d'un mélange très complexe.

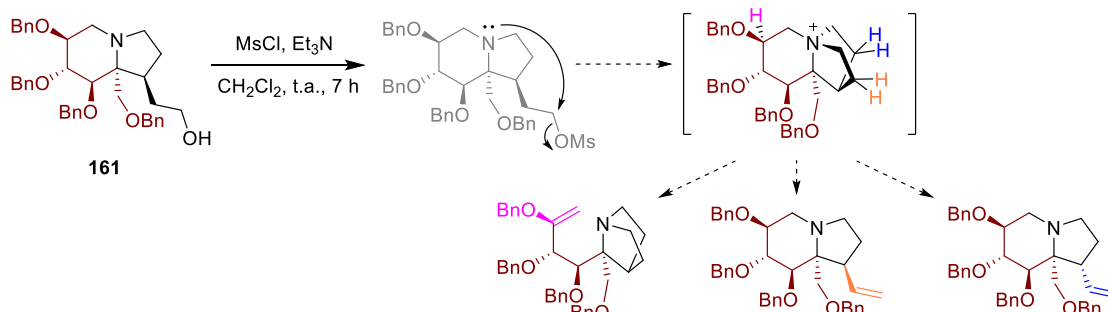


Schéma 93

Bien que cette explication n'ait pas fait l'objet d'analyses approfondies, la stabilité du mésylate **160** vient renforcer l'hypothèse d'une cyclisation intramoléculaire lors de la méthylation de **161**. En effet, la présence de la double liaison de **160** apporterait une rigidité au bicyclic, susceptible d'empêcher la formation d'un ammonium et d'un troisième cycle à partir de ce composé. À ce stade, notre approche initiale pour conjuguer l'alcool **157** à un bras espaceur *via* la substitution de mésylates intermédiaires par des alcoolates a été abandonnée. L'alcool intermédiaire **157** constitue un produit précieux, relativement long et complexe à synthétiser, et il a été jugé préférable de chercher une alternative à la formation d'un lien éther entre **157** et des bras espaceurs pour accéder aux sondes de **type 3** visées.

IV.2. 2^{ème} Approche : conjugaison du noyau indolizidine avec un bras espaceur comportant une fonction acide carboxylique

L'éthérisation de **157** n'ayant pas fourni de bons résultats, nous avons envisagé de convertir cet alcool en amine, puis de l'associer à un bras espaceur à travers la formation d'un amide afin d'accéder aux sondes de **type 3** (*Schéma 49*).

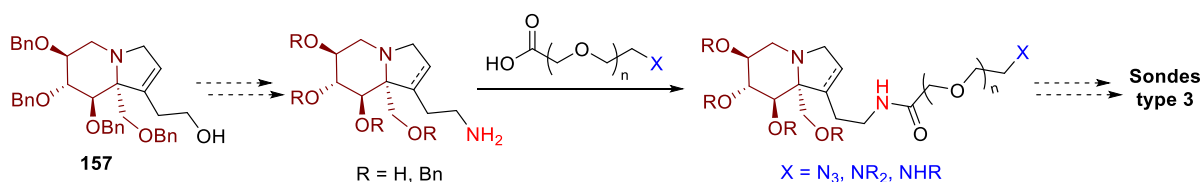
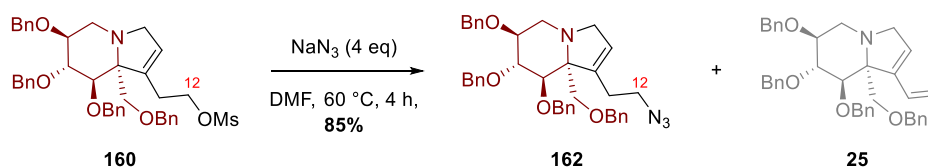
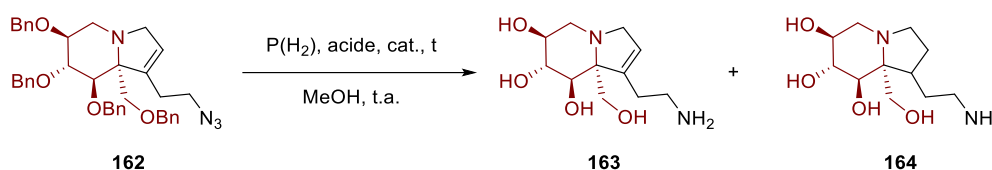


Schéma 49

L'azoture **162** a tout d'abord été préparé afin d'introduire un atome d'azote en position C12 à partir du mésylate **160**, en utilisant de l'azoture de sodium dans le DMF (*Schéma 95*). Contrairement aux alcoolates de sodium utilisés précédemment, les azotures sont des nucléophiles peu basiques (pKa de 4.6 pour le couple $\text{HN}_3 / \text{N}_3^-$), ce qui permettait d'espérer que la réaction de substitution nucléophile du mésylate soit ici plus favorisée que son élimination (conduisant au diène **25**).



Bien que la conversion de **160** en azoture n'ait pas été observée à température ambiante, le composé **162** a pu être obtenu avec un rendement satisfaisant (85%) en seulement 4 heures lorsque le milieu réactionnel a été chauffé à 60 °C. Aucune trace du produit d'élimination **25** n'a été détectée par RMN ¹H ou CCM. Le composé **162** ainsi obtenu a été engagé dans une réaction d'hydrogénolyse pallado-catalysée en milieu acide, afin de réduire en une seule étape la double liaison et la fonction azoture, tout en déprotégeant les différents éthers de benzyle.



Essai	P(H ₂)	Catalyseur	Temps	Acide	Résultat
1	1) 5 atm 2) 10 atm	1) Pd/C (15 mol%) 2) Pd/C (15 mol%)	1) 2 j 2) 3 j	1) HCl (4.0 eq) 2) HCl (6.0 eq)	1) Réaction incomplète, groupements benzyles restant 2) 163 (57%, majoritaire) + benzyles
2	1) 10 atm 2) 10 atm	1) Pd/C (25 mol%) 2) Pd/C (30 mol%)	1) 4 j 2) 4 j	1) HCl (10.0 eq) 2) HCl (10.0 eq)	1) Réaction incomplète, groupements benzyles restant 2) 163 + 164 (1 : 1)

Tableau 8

Dans le premier essai, la réaction a tout d'abord été lancée sous une pression de dihydrogène de 5 atm, et en présence d'acide chlorhydrique (4.0 eq). Après deux jours de réaction, l'analyse du mélange brut par RMN ¹H a révélé la présence d'un fort signal correspondant aux protons aromatiques des groupes benzyles. Une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier également les amines **163** et **164** dans ce mélange réactionnel. La réaction a donc été relancée sous une pression élevée (10 atm) de dihydrogène en présence d'un large excès d'acide (10 eq) afin d'augmenter la conversion en amine **164**. Après 3 jours supplémentaires dans ces conditions, le produit purifié par résine échangeuse de cations a été analysé par RMN ¹H. Celui-ci correspond à l'amine **163**, mais ce produit n'a pas pu être séparé de sous-produits résiduels comportant encore des groupes benzyles non hydrogénolysés, révélés par la présence d'un signal correspondant aux protons aromatiques. Un deuxième essai a été conduit avec une charge plus élevée en catalyseur, une pression de dihydrogène supérieure (10 atm) et un très large excès d'acide (10.0 eq). L'analyse du mélange brut par RMN ¹H après 4 jours de réaction a cependant révélé la présence de signaux aromatiques attribués à des groupements benzyles.

Après avoir relancée la réaction durant 4 jours, l'analyse par RMN ^1H a permis de constater la disparition quasiment complète des groupements benzyles, mais les amines **163** et **164** ont été obtenues sous la forme d'un mélange, en proportions 1 : 1, et n'ont pas pu être séparées. Ces résultats semblent indiquer une désactivation du catalyseur au palladium au cours de la réaction, ce qui était inattendu compte tenu des bons rendements observés lors de la confection des sondes de **type 2** présentée dans le chapitre précédent. Les amines **163** et **164** étant des diamines, la basicité de chacune des amines peut être réduite par la protonation de l'amine voisine (par exemple, l'éthylène diamine possède deux valeurs distinctes de pK_a de 9.95 et 6.90).¹⁸⁰ La présence d'amines libres en proportion non négligeable dans le milieu réactionnel pourrait alors fortement freiner, voire empêcher la débenzylation et la réduction de la double liaison endocyclique, comme montré par Czech *et al.*⁸⁸

Suite à ces difficultés, une utilisation originale de l'azoture **162** permettant sa conversion en amide par le biais d'une ligation de Staudinger avec un bras espaceur a été explorée (*Schéma 97*), cette stratégie reposant sur un article du groupe de Villarasa.¹⁸¹ Au cours de son stage de première année de master, Roman Griffet a étudié cette stratégie et a réussi à obtenir le composé **166** avec un rendement de 33%.¹⁸² Ce résultat démontre que la ligation de Staudinger constituerait une méthode exploitable pour la synthèse des sondes de **type 3**. Néanmoins, le faible rendement de la réaction et la formation d'oxyde de triphénylphosphine difficile à éliminer nous ont conduit à écarter cette alternative pour la synthèse des sondes de **type 3**.

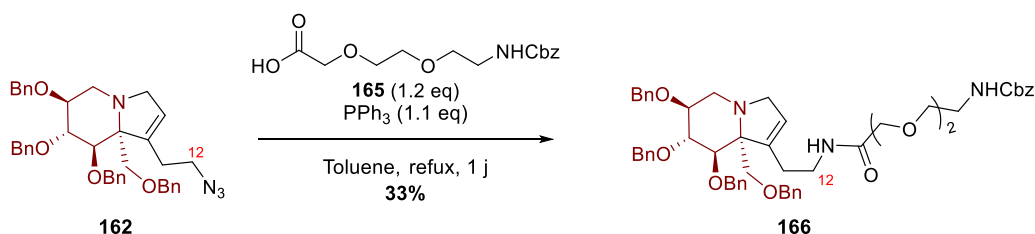


Schéma 97

Une synthèse de Gabriel a été envisagée pour substituer le mésylate **160** par une fonction azotée, tout en résolvant le problème de désactivation du palladium. En effet les phtalimides étant insensibles aux conditions de débenzylation pallado-catalysée, cette voie devait permettre l'hydrogénation de la double liaison et l'hydrogénéolyse des groupements benzyles. En contrepartie, une étape supplémentaire serait indispensable pour convertir le phtalimide en amine primaire, par exemple par traitement avec de l'hydrazine. Un premier essai de substitution de **160** en présence d'un fort excès de phtalimidure de potassium a été mené dans le DMF (*Schéma 98*) à une température de 60 °C, qui s'est avérée insuffisante pour observer la conversion de **160**.

¹⁸⁰ Table des pK_a de D. Evans, (disponible : <https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/pka/>)

¹⁸¹ (a) Garcia, J.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4841–4844. (b) Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4623–4624.

¹⁸² Griffet, R. Rapport de stage de Master 1 ; Université Grenoble Alpes, **2020**.

Après avoir chauffé le mélange réactionnel à 80 °C, la disparition de **160** a été constatée mais l'analyse du mélange brut a révélé la formation majoritaire de l'alcool **157**, issu de l'hydrolyse du mésylate **160** malgré l'utilisation de DMF préalablement distillé. Après purification par chromatographie, le produit **167** a été obtenu, contaminé par du phtalimide résiduel, avec un rendement maximum de 25%. La formation de ce produit d'hydrolyse, non observé lors de l'addition d'azoture de sodium pourtant menée dans des conditions similaires nous a conduit à écarter l'utilisation de phtalimidure de potassium (hygroscopique).

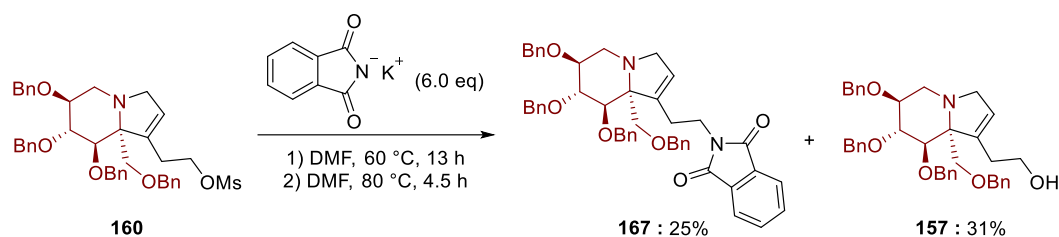


Schéma 98

Un autre essai a alors été conduit à partir de phtalimide et de triéthylamine dans le THF (*Schéma 99*), dans des conditions analogues à celles utilisées par Huang et Hayashi,¹⁸³ ou encore Kojima *et al.*¹⁸⁴

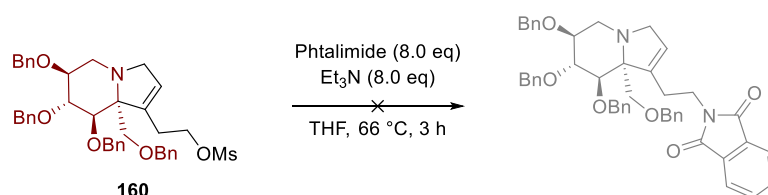


Schéma 99

Dans ces conditions, aucune réaction n'a été observée malgré le large excès de phtalimide après 3 heures au reflux du solvant, et le mésylate **160** a été récupéré à l'issue de la réaction. Bien que plusieurs pistes aient pu être explorées à l'issue de cet essai (réaction de Mitsunobu à partir de l'alcool **157**, réduction de Birch de l'azoture **162**, etc), les bons résultats obtenus lors des premiers essais de cycloaddition de Huisgen conduits en parallèle nous ont amené à abandonner la fonctionnalisation de l'alcool **157** en amine à ce stade.

¹⁸³ Huang, Y.; Hayashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12340–12343.

¹⁸⁴ Kojima, R.; Akiyama, S.; Ito, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7196–7199.

IV.3. 3^{ème} approche : conjugaison du noyau indolizidine à un bras espaceur comportant un azoture organique *via* une cycloaddition de Huisgen

La réaction de cycloaddition de Huisgen CuAAC et ses avantages en synthèse ont déjà été discutés dans le chapitre précédent (Chapitre II, p32). Après avoir essayé de fonctionnaliser l'indolizidine-alcool **157** par un lien éther ou en la transformant en amine primaire, c'est finalement par le biais d'une *O*-propargylation (*Schéma 100*) suivie d'un cycloaddition du composé **168** qu'elle a été associée à deux bras espaceurs (*Schéma 101*).

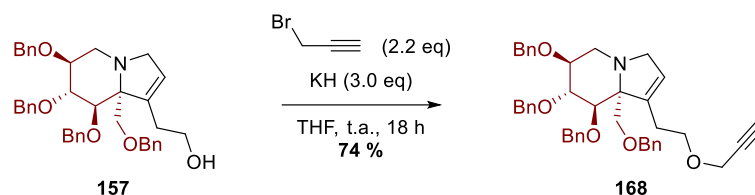


Schéma 100

Afin de déprotoner l'alcool **157**, l'hydrure de potassium a été préféré à l'hydrure de sodium, afin de favoriser la formation d'un alcoolate plus réactif, la paire d'ions étant théoriquement plus dissociée pour un alcoolate de potassium que pour un alcoolate de sodium. Le composé **168**, obtenu avec un bon rendement (74%) dans ces conditions, a par la suite été conjugué au bras **36b** en utilisant des conditions réactionnelles déjà éprouvées pour la synthèse des sondes de **type 1**.

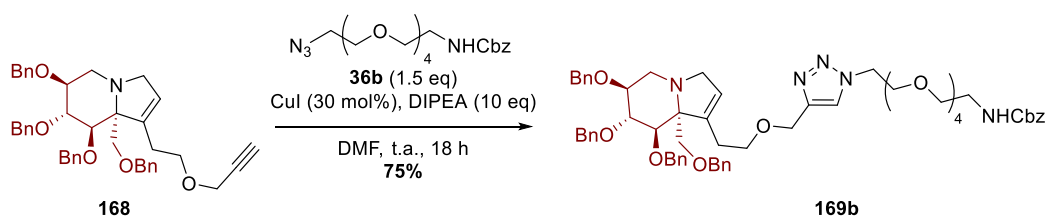


Schéma 101

Comme lors de la confection des sondes de **type 1**, un unique produit a été obtenu, correspondant au produit **169b**, obtenu sous la forme d'un régioisomère unique. Ce cycloadduit **169b** a ensuite été soumis à des conditions d'hydrogénation/hydrogénéolyse pallado-catalysée en milieu acide (*Schéma 102*).

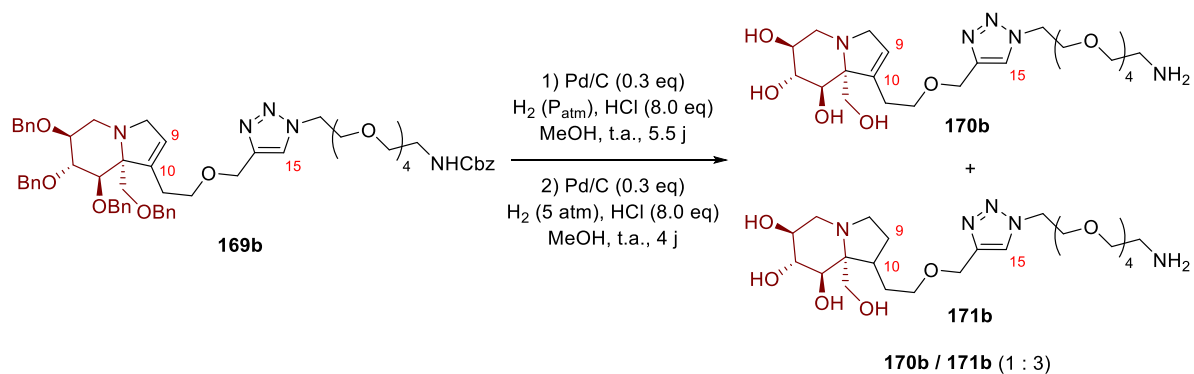


Schéma 102

L'objectif de cette réaction était de retirer l'intégralité des groupements Bn et le CBz, tout en réduisant la double liaison C9-C10. Après 5 jours de réaction sous pression atmosphérique de H₂, le mélange réactionnel a été purifié par résine échangeuse de cations. L'analyse par RMN ¹H a alors révélé une réduction incomplète de la double liaison C9-C10. Dans ce mélange, deux signaux différents et très isolés sont observés pour le proton H15 (8.05 et 7.99 ppm) des produits **170b** et **171b**, avec une intégrale totale de 1.89 pour ces deux signaux. Un signal éthylénique, associé au proton H9 du produit **170b** a été observé avec une intégrale de 1.00 (à 5.68 ppm). Quelques signaux benzyliques résiduels ont également été observés (intégrale de 1.02), ce qui indique que le produit **169b** a été consommé et majoritairement transformé en **170b** et **171b**. Le ratio entre le signal associé à un H9 éthylénique et les signaux associés aux H15 indiquant une distribution d'environ 1 pour 1 après cette première étape d'hydrogénolyse. La réaction a donc été relancée, sous une pression de dihydrogène de 5 atm pendant 4 jours supplémentaires. À l'issue de cette seconde réaction et après purification, un ratio de 1/3 a été trouvé entre H9 et H15 par RMN ¹H. En revanche, les signaux correspondant aux benzyles n'ont pas été observés. Le composé **170b** (minoritaire) a donc été recueilli en mélange avec le produit souhaité **171b**, ces deux composés étant très difficiles à séparer au vu de leurs structures extrêmement proches. Malgré l'utilisation de conditions vigoureuses, l'hydrogénation de la double liaison C9-C10 reste donc une transformation difficile, et l'alcool **161** s'impose donc comme un intermédiaire plus pertinent que l'alcool **157**.

La propargylation de l'alcool **161** a donc été réalisée dans des conditions analogues à celles mises en œuvre à partir de **157** (Schéma 103), puis le composé **172** a par la suite été engagé dans les réactions de cycloaddition avec les bras espaceurs **36a** et **36b** (Schéma 104).

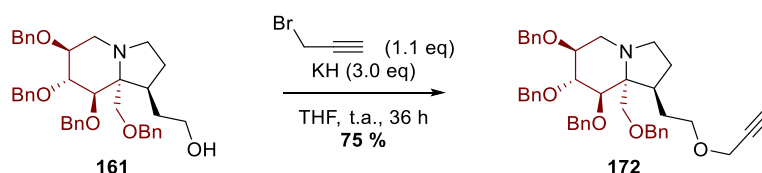


Schéma 103

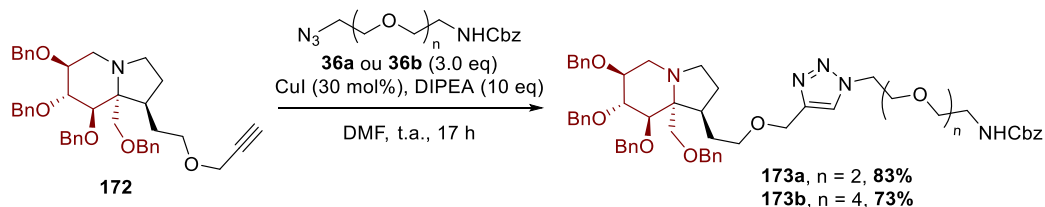


Schéma 104

Les hydrogénolyses pallado-catalysée des cycloadduits **173a** et **173b** ont par la suite été réalisées sous pression atmosphérique de H₂ en présence d'un excès de HCl. Les conjugués **174a** et **174b** ont ainsi été formés avec d'excellents rendements (Schéma 105).

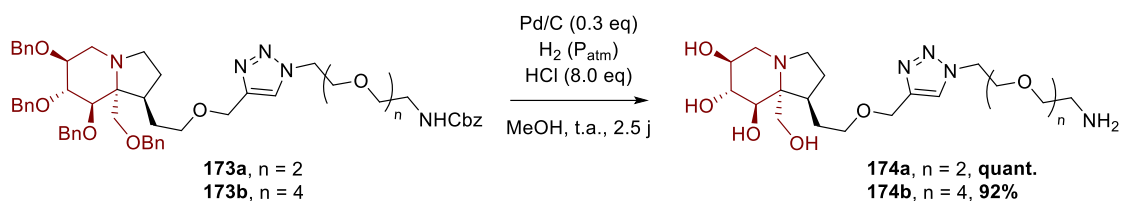


Schéma 105

À l'issue de cette réaction, la formation d'un noyau pyrrole à partir des amines primaires **174a** et **174b** constituait la dernière étape à mettre en œuvre afin d'obtenir les sondes de **type 3**. Un essai de synthèse de Paal-Knorr a été effectué à partir de ces composés, dans les mêmes conditions que celles employées avec succès pour la synthèse des sondes de **type 1** (**40a** et **40b**, p38).

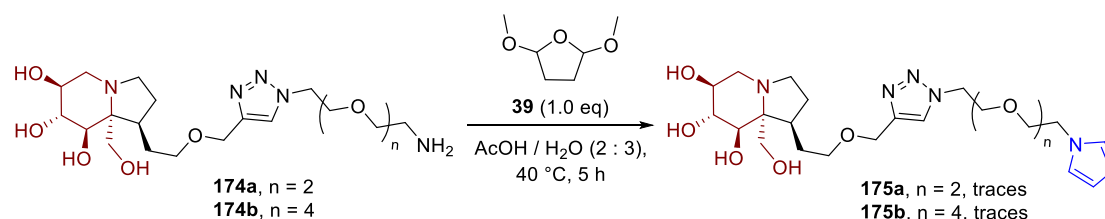


Schéma 106

Cependant en dépit d'un suivi assidu de la réaction par LC-MS, un mélange d'oligomères a été obtenu. La purification de ce mélange par HPLC préparative en phase inverse a permis d'obtenir les produits **175a** et **175b**, mais les rendements particulièrement faibles de ces transformations n'ont pas été déterminés avec précision. De même, la très faible quantité recueillie du composé **175b** n'a pas permis sa caractérisation complète. Les expériences de RMN ^1H ont délivré des signaux peu résolus, à la multiplicité inexploitable, tandis que le spectre RMN ^{13}C s'est avéré incomplet. Ces spectres ne sont donc pas reportés en partie expérimentale. Une analyse par spectrométrie de masse de haute résolution (HRMS) a cependant confirmé la nature du produit purifié.

Les amines **174a** et **174b** étant issues de 10 étapes de synthèse depuis la cétonitrone **3**, de multiples essais de synthèse de Paal-Knorr n'ont pas été envisagés, et ces composés ont été transformés en sondes par le biais du composé **43**, déjà utilisé avec succès pour la confection des sondes de **type 1** et des sondes de **type 2**.

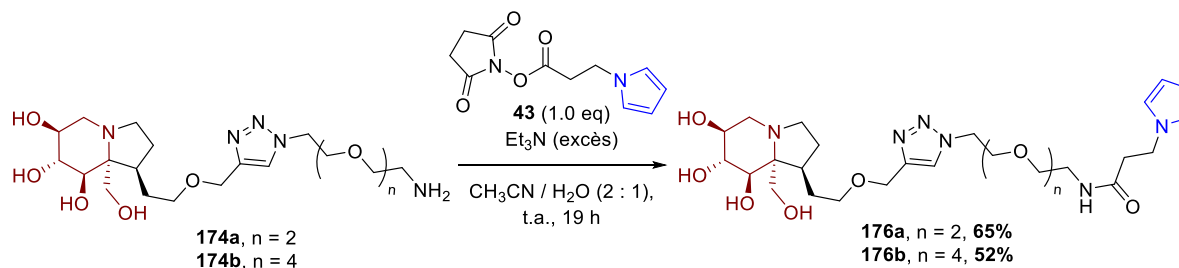


Schéma 107

À l'issue de cette dernière étape, deux sondes de **type 3** ont été obtenues et intégralement caractérisées. Ces deux composés (**176a** et **176b**) comportant chacun un bras espaceur de taille différente nécessitent cependant 11 étapes à partir de la cétonitrone **3**, soit 16 étapes à partir du L-sorbose, ce qui en fait des sondes particulièrement onéreuses.

V. Résumé du chapitre

Après avoir présenté la réaction de cycloisomérisation d'énynes-1,6 et discuté de ses atouts en synthèse, nous avons montré que cette réaction permettait d'accéder à un squelette indolizidine présentant un motif diène-1,3. Les énynes-1,6 **26** et **131** ont été préparés à partir de la pipéridine **129** et ont été traités dans différentes conditions de cycloisomérisation, en vue d'obtenir des intermédiaires comportant un noyau indolizidine. Au cours de cette étude, l'indolizidine **25** a été préparée à partir de l'ényne **26** avec un rendement de 78% *via* une cycloisomérisation totalement régiosélective. Par contre le manque de réactivité de l'ényne **131** n'a pas permis d'obtenir l'indolizidine fonctionnelle **132** avec un rendement suffisant.

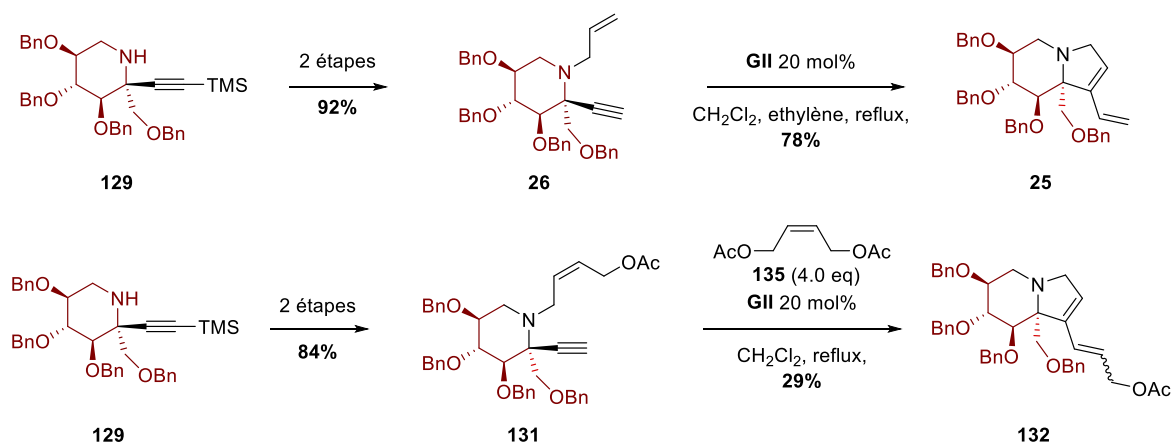


Schéma 108

La fonctionnalisation de l'indolizidine **25** a donc été étudiée, d'abord par métathèse croisée d'oléfines, mais cette stratégie a finalement été abandonnée en vertu du manque de réactivité et de l'instabilité de ce composé dans les conditions réactionnelles utilisées. Une fonctionnalisation par ozonolyse a été envisagée mais s'est également avérée infructueuse. Finalement, l'indolizidine **25** a été fonctionnalisée par une hydroboration/oxydation régiosélective de sa double liaison terminale, qui a permis d'obtenir l'alcool **157** avec un rendement pouvant atteindre 92%.

Cet alcool a servi d'intermédiaire commun à plusieurs stratégies ayant pour but de conjuguer le noyau de type indolizidine obtenu avec un bras espaceur. La stratégie visant à transformer l'alcool **157** en amine par le biais d'un azoture s'est avérée compliquée au vu de la faible réactivité de la double liaison endocyclique dans les réactions d'hydrogénation mises en oeuvre. Finalement, l'alcool **157** a été *O*-propargylé, puis conjugué à deux bras espaceurs distincts *via* la réaction de cycloaddition de Huisgen CuAAC. Les deux conjugués ainsi obtenus ont ensuite été convertis en sondes **176a** et **176b**, à l'issue de 11 étapes de synthèse à partir de la cétonitrone **3**.

Chapitre IV : Etude d'interactions iminosucres-glycosidases par SPRi

Afin d'étudier un phénomène naturel (physique, chimique, biologique...) il est nécessaire de pouvoir le quantifier, afin de décrire, comparer et analyser les différentes observations réalisées. Pour cette raison, l'être humain a inventé des outils permettant de mesurer les phénomènes naturels et délivrant une information sous la forme d'un signal quantifiable : ces outils sont des capteurs. Ils se composent en fait de deux parties : une unité de reconnaissance qui va permettre de capter le phénomène à étudier, appelée « récepteur », et un dispositif nommé « transducteur », capable de convertir le phénomène capté sous la forme d'un signal interprétable et quantifiable par l'homme.

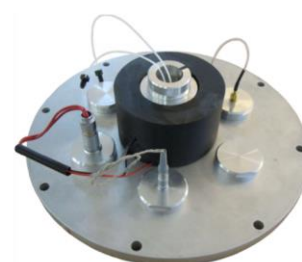
En 1962, L. C. Clark et C. Lyons ont conçu un capteur pour déterminer les pressions partielles sanguines en O₂ et CO₂, reposant sur l'utilisation de l'anhydrase carbonique en tant qu'élément de reconnaissance.¹⁸⁵ L'utilisation d'un biorécepteur (ici une enzyme) a ainsi donné naissance au terme de biocapteur, et L. C. Clark est d'ailleurs souvent qualifié de « père des biocapteurs ». Depuis ce premier exemple, des biocapteurs permettant la détection simultanée de plusieurs analytes ont été développés : on parlera alors de biopuces. Lors de la conception d'un biocapteur ou d'une biopuce, des modes de transduction divers peuvent être utilisés, en fonction de l'analyte ciblé et du récepteur utilisé (**Figure 28**). Par exemple les biocapteurs employant des enzymes (tels que ceux exploités pour le contrôle de la glycémie), utilisent majoritairement un mode de transduction ampérométrique. Les tests de type ELISA, ou encore les tests de grossesse reposant sur l'utilisation d'anticorps, reposent majoritairement sur des transductions de type optique. Enfin les microbalances à quartz constituent des biocapteurs à transduction mécanique.



Transduction ampérométrique



Transduction optique



Transduction mécanique
(microphone piezoélectrique)

Figure 28 : Quelques biocapteurs aux modes de transduction différents

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à un mode de transduction optique largement employé pour la conception de biocapteurs, reposant sur le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR).¹⁸⁶

¹⁸⁵ Clark Jr., L. C.; Lyons, C. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, *102*, 29–45.

¹⁸⁶ Nguyen, H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. *Sensors* **2015**, *15*, 10481–10510.

I. La résonance plasmonique de surface (SPR) : une technique utile pour la détection de glycosidases ?

I.1. Principe physique de la SPR et présentation de la méthode de détection

La résonance plasmonique de surface - Phénomène physique

C'est en 1902 que le phénomène de résonance plasmonique de surface a été rapporté dans la littérature pour la première fois par R. Wood.¹⁸⁷ En observant le spectre de diffraction en réflexion d'une source continue de lumière blanche, celui-ci a remarqué la présence de fines bandes sombres dans le spectre, et dont la position varie selon l'angle d'incidence de la lumière. Quarante ans plus tard, des investigations théoriques menées par U. Fano expliqueront ce phénomène par la présence d'ondes de surface nommées « plasmons ».¹⁸⁸ Les premières études expérimentales des phénomènes permettant la génération des plasmons de surface seront menées en 1968 par Otto,¹⁸⁹ ainsi que Kretschmann et Raether.¹⁹⁰ Les travaux de ces derniers permettront à Liedberg *et al.* de réaliser la première détection de gaz et de biomolécules par SPR, en 1983.¹⁹¹

Le phénomène de résonance plasmonique de surface se produit entre deux milieux possédant des constantes diélectriques de signes opposés, tels qu'un diélectrique et un métal par exemple. Lorsqu'une onde incidente vient se réfléchir à cette interface, elle peut céder une partie de son énergie pour promouvoir une oscillation collective des électrons de la bande de conduction du métal. Ce phénomène donne alors naissance à une onde de surface, qui se propage le long de l'interface entre les deux milieux et dont l'amplitude décroît en s'éloignant de cette interface (onde dite « évanescente »). Afin de comprendre les conditions dans lesquelles ce phénomène se produit, il est nécessaire de résoudre les équations de Maxwell à cette interface. Ces démonstrations sont complexes,¹⁹² et seules quelques conclusions importantes pour les travaux présentés dans ce manuscrit seront discutées ici. Le champ électro-magnétique formé par l'oscillation des électrons connaît une intensité maximum à l'interface métal/diélectrique et diminue ensuite exponentiellement en s'éloignant de cette interface, dans le métal et dans le diélectrique. Dans la direction perpendiculaire à l'interface métal/diélectrique, la décroissance de l'intensité du champ E (**Figure 29**) est caractérisée par sa longueur de propagation sur l'interface (L_x), ainsi que les longueurs de pénétration du champ dont les valeurs diffèrent pour le diélectrique (e_{pd}) et pour le métal (e_{pm}). Ces valeurs sont définies comme les distances où l'amplitude du champ est réduite à $1/e$ de sa valeur maximale (e représente l'exponentielle de 1, soit ~ 2.72).

¹⁸⁷ Wood, R. W. *Proc. Phys. Soc. London* **1902**, 18, 269–275.

¹⁸⁸ Fano, U. *J. Opt. Soc. Am.* **1941**, 31, 213–222.

¹⁸⁹ Otto, A. *Z. Physik* **1968**, 216, 398–410.

¹⁹⁰ Kretschmann, E.; Raether, H. *Z. Naturforschung A* **1968**, 23, 2135–2136.

¹⁹¹ Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299–304.

¹⁹² Maillard, E. Thèse de doctorat, *Imagerie par résonance des plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel*, Université Paris XI, **2004**.

Elles dépendent de la longueur d'onde d'excitation et des constantes de permittivités des matériaux impliqués (ϵ_m pour le métal, et ϵ_d pour le diélectrique). Si on considère par exemple un milieu métallique tel que l'or et un milieu diélectrique comme l'eau, on peut déterminer les longueurs de pénétration théoriques qui ont pour valeurs $e_{pm} = 13$ nm et $e_{pd} = 102$ nm. Ceci montre donc que la majorité (88.5%) du champ E est confinée dans le milieu diélectrique.

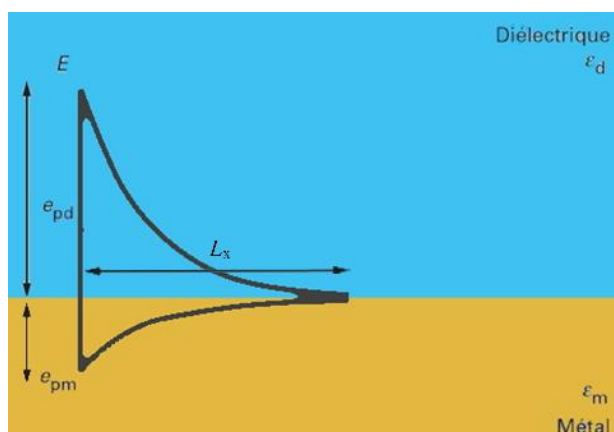


Figure 29 : Représentation d'une onde plasmonique à l'interface entre un métal et un diélectrique (image modifiée)¹⁹³

Afin de promouvoir la résonance plasmonique de surface, la projection du vecteur de propagation de l'onde incidente sur l'interface métal/diélectrique (k_x , **Figure 30**) doit être égale à la constante de propagation de l'onde plasmonique (k_p). En vertu de cette condition il n'est pas possible d'exciter directement l'onde plasmonique à une interface eau/or, du fait du trop faible indice de réfraction de l'eau : il faut d'abord augmenter le vecteur d'onde de l'onde incidente. La méthode la plus communément utilisée consiste à faire passer l'onde incidente à travers un milieu d'indice de réfraction élevé, tel qu'un prisme dit « haut indice » (typiquement en verre). Ce prisme peut être placé soit sur le diélectrique (configuration de Otto), soit sur le métal (configuration de Kretschmann), cette dernière configuration est généralement la plus utilisée pour la biodétection (**Figure 30**).

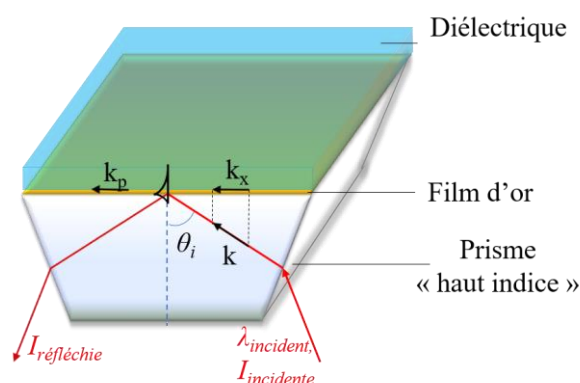


Figure 30 : Augmentation du vecteur d'onde incident par utilisation d'un prisme « haut indice » - Configuration de Kretschmann

¹⁹³ Lecaruyer, P.; Canva, M. *Techniques de l'Ingenieur*, Techniques de l'ingénieur, **2008**, R6718, 1-10.

Dans cette configuration, le vecteur d'onde k de l'onde incidente est dépendant de l'angle d'incidence θ_i , et il est donc possible de faire varier la composante k_x du vecteur d'onde en faisant varier θ_i . Pour une valeur particulière de l'angle d'incidence (appelé alors angle de résonance), la condition d'égalité entre les deux vecteurs d'onde $k_x = k_p$ va alors se trouver vérifiée, ce qui se traduit par l'excitation des plasmons de surface par l'onde incidente, *via* un transfert de l'énergie lumineuse aux électrons de la bande de conduction du métal. Pour cette raison, l'intensité lumineuse du faisceau réfléchi va se trouver plus faible que l'intensité lumineuse du faisceau lumineux incident. La notion de réflectivité R permet de quantifier ce phénomène, elle se définit par la formule suivante et s'exprime en pourcent :

$$R = \frac{I_{réfléchi}}{I_{incidente}} * 100 \quad (\text{Équation 1})$$

Le couplage entre le rayon incident et le phénomène de résonance plasmonique de surface peut ainsi être caractérisé par une courbe représentant la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence θ_i , que l'on nomme généralement « courbe plasmon », et qui atteint un minimum à la valeur de l'angle de résonance.

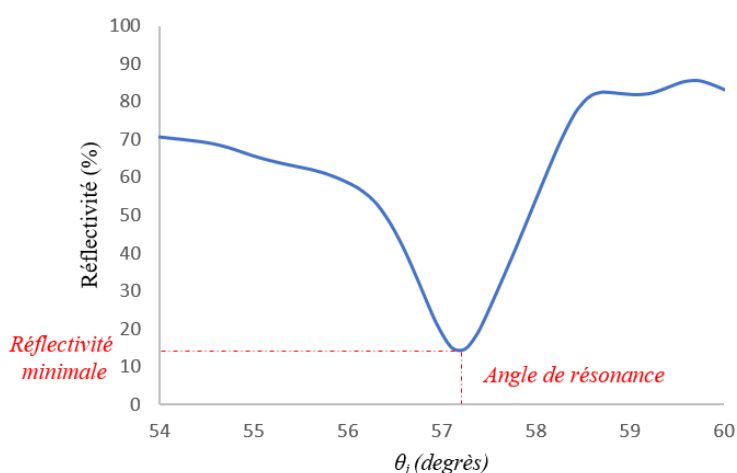


Figure 31 : Exemple de profil de couplage plasmonique (« courbe plasmon »)

Afin de résumer, une onde de surface peut être générée à l'interface entre un métal et un diélectrique par l'intermédiaire d'une oscillation collective des électrons de la bande de conduction de ce métal. Ce transfert d'énergie entre une onde lumineuse incidente et ces électrons est particulièrement sensible à plusieurs paramètres physiques tels que les indices de réfraction des milieux considérés, la longueur d'onde et l'angle d'incidence du faisceau lumineux. Concernant ce dernier paramètre, on appelle angle de résonance l'angle d'incidence pour lequel le couplage entre le faisceau lumineux et l'onde plasmonique de surface est parfait. Pour cette valeur, le phénomène de résonance plasmonique de surface est à son intensité maximale, ce qui se traduit par une réflectivité minimale.

La SPR – Principe de détection

Le phénomène de résonance plasmonique de surface est particulièrement sensible à des changements d'indices optiques à l'interface métal-diélectrique. Kunz *et al.* ont notamment démontré en 1996 qu'il était possible d'observer des variations d'angles de résonance avec une résolution de l'ordre de 10^{-4} degrés (à l'aide d'un algorithme et d'un appareillage adapté), ce qui correspond à une variation d'indice optique à la 6^{ème} décimale.¹⁹⁴ Les dispositifs de SPR peuvent ainsi servir à suivre des interactions entre des récepteurs fixés à la surface d'un métal, et un analyte présent dans un tampon de course (qui ne constitue donc plus un milieu diélectrique au sens strict, mais permet néanmoins la génération de l'onde plasmon). Lors de l'éluion de l'analyte, son association aux récepteurs va provoquer une accumulation de matière à l'interface métal/diélectrique, et entraîner un changement localisé de l'indice optique. Ceci se traduit alors par un changement de l'angle de résonance, qui va être corrélé à la masse d'analyte venant s'adsorber sur la surface.

Il existe plusieurs méthodes permettant de quantifier des interactions entre un récepteur et son analyte par SPR.¹⁹² Une première méthode, nommée méthode d'interrogation angulaire, consiste à suivre l'évolution de la valeur de l'angle de résonance à longueur d'onde fixe en réalisant des séries de mesures pour différentes valeurs d'angles d'incidence, afin de tracer la variation de l'angle de résonance en fonction du temps. À l'inverse il est possible de fixer l'angle d'incidence, afin de faire varier uniquement la longueur d'onde du faisceau incident ce qui constitue alors une méthode appelée méthode d'interrogation spectrale. Une troisième méthode de détection, aujourd'hui couramment utilisée, consiste à fixer la longueur d'onde du faisceau lumineux incident dont la valeur λ_{travail} sera constante tout au long de l'expérience, de même qu'est fixé un angle de travail θ_{travail} (**Figure 32-A**).

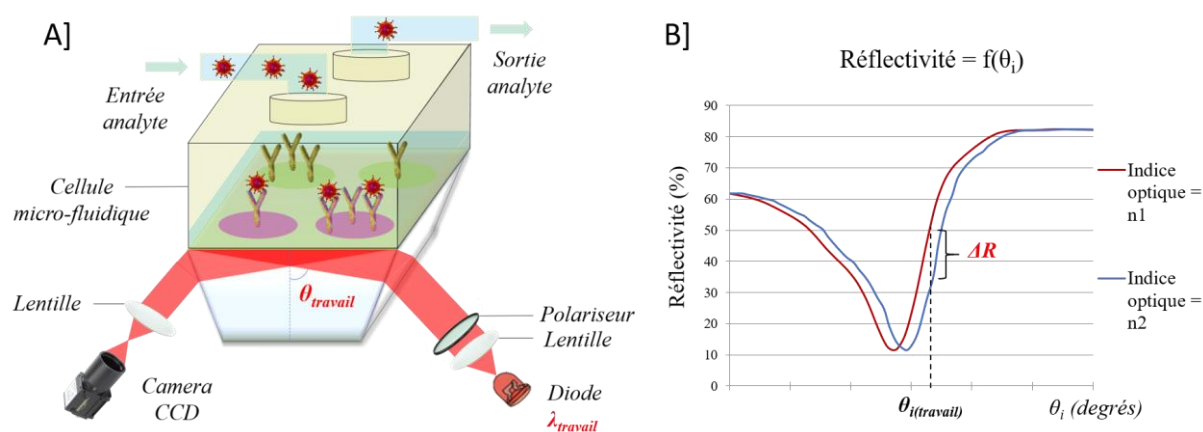


Figure 32 : A) Appareillage de SPR. B) Décalage des courbes plasmon et apparition d'une différence de réflectivité ΔR lors d'une expérience à angle de travail fixe

¹⁹⁴ Kunz, U.; Katerkamp, A.; Renneberg, R.; Spener, F.; Cammann, K. *Sens. Actuators B Chem.* **1996**, 32, 149–155.

Dans ces conditions, toute accumulation de matière à la surface de la puce va se traduire par un changement d'indice optique et un décalage de la courbe plasmon ($Réfectivité = f(\theta_i)$), ce qui à angle fixe se traduit par une variation d'intensité du faisceau réfléchi (ΔR , **Figure 32-B**). En utilisant une caméra CCD (pour Charge Coupled Device), il est possible de retranscrire une image en temps réel de la puce afin de visualiser directement les interactions, d'où l'appellation de SPRi (Surface Plasmon Resonance imaging). Avec un tel dispositif, l'analyse de l'image par un logiciel dédié permet de retranscrire la variation de réflectivité, chaque pixel correspondant à une petite zone de la surface de la puce. En traçant la courbe de réflectivité en fonction du temps, on peut alors obtenir un sensorgramme correspondant au profil cinétique de l'interaction étudiée, tel que représenté sur la **Figure 33**.

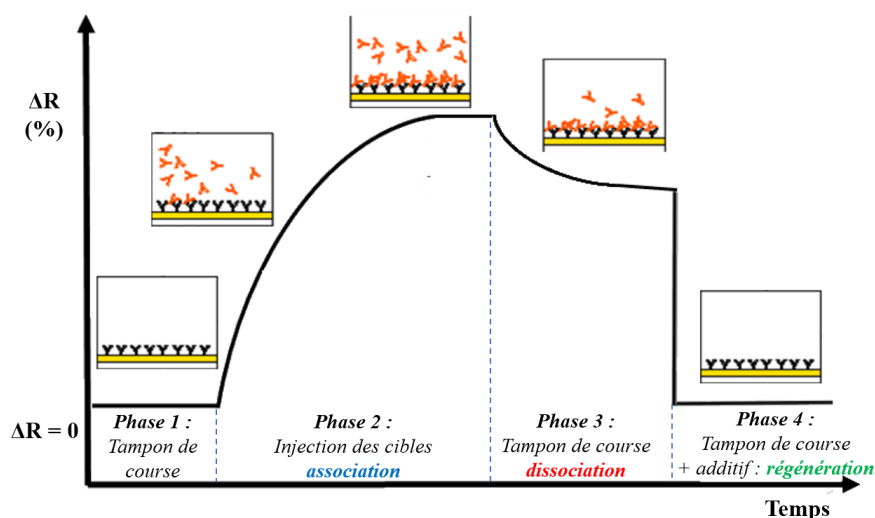


Figure 33 : Profil cinétique obtenu lors du suivi d'une interaction par SPR(i) - Sensorgramme théorique

Dans la phase 1 de l'expérience, le tampon circule sur la puce et l'indice optique reste constant ce qui se traduit par une réflectivité constante (un ΔR nul). En phase 2, l'injection de l'analyte et son association avec les récepteurs provoque une variation de l'indice optique, qui se traduit par un changement de ΔR . Cette variation est plus ou moins rapide et l'allure du sensorgramme dépend de plusieurs paramètres tels que la concentration en analyte, son affinité pour les récepteurs, la densité de récepteurs greffés sur la puce, etc. À l'équilibre thermodynamique de l'interaction analyte-récepteur, la réflectivité n'évolue plus et un plateau est atteint. L'injection de tampon de course (sans analyte) en phase 3 mène ensuite à la dissociation des cibles, ce qui se traduit par une diminution du ΔR . L'expérience visant à étudier l'interaction moléculaire se termine par la phase 3, cependant il est pertinent d'ajouter une phase 4, nommée « régénération » de la puce, et qui a pour but de « laver » la surface afin d'en retirer l'analyte adsorbé. Ceci permet par la suite de réutiliser la puce dans une nouvelle expérience.

Avantages et inconvénients de la SPRi pour l'étude d'interactions biomoléculaires

L'un des avantages de la SPRi est que cette méthode est une méthode dite « label free », c'est-à-dire qu'elle ne nécessite aucun marquage préalable de la cible biologique. Ceci représente un avantage puisqu'au cours d'un marquage, la cible subit une modification structurale susceptible de perturber l'interaction que l'on souhaite étudier. De plus l'étape de marquage rajoute une étape dans le protocole d'analyse. La SPRi est également une méthode d'analyse multiplexée, c'est-à-dire qu'il est possible d'analyser simultanément plusieurs interactions (**Figure 34**). Grâce à la caméra CCD, la surface de la biopuce peut être découpée en une multitude de pixels qui constituent autant de zones indépendantes sur lesquelles des biorécepteurs de natures diverses peuvent être greffés. Au cours d'une expérience de SPRi, il est ainsi possible de suivre plusieurs centaines d'interactions de façon simultanée. Bien qu'il soit aussi possible de faire de la détection parallélisée en SPR classique, le nombre d'interactions étudiées est plus faible : par exemple, les dispositifs SPR Biacore™ (GE Healthcare) fonctionnent classiquement avec des biopuces à 4 canaux. Enfin, la SPR étant très sensible aux variations d'indice optique à la surface de la biopuce,¹⁹⁴ elle permet de détecter des analytes présents en très faible quantité. Cette concentration minimale d'analyte détectable est une propriété très importante d'un biocapteur, que l'on trouve souvent sous l'acronyme LOD (Limit Of Detection).

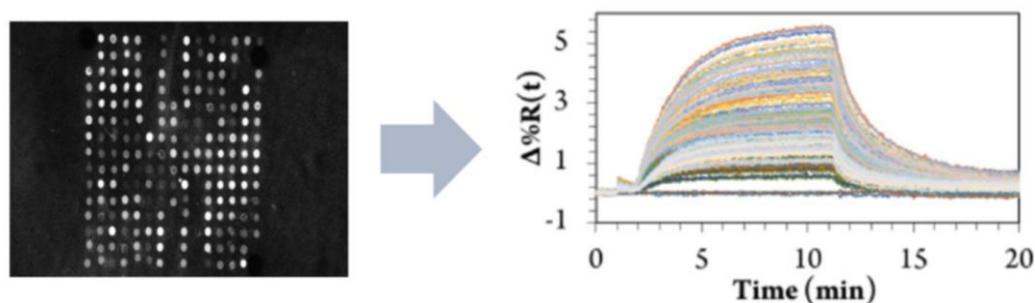


Figure 34 : Analyse simultanée de multiples interactions par SPRi (image de la littérature)¹⁹⁵

Comme pour de nombreuses méthodes de détection, l'adsorption non-spécifique de matière sur la biopuce représente un facteur pouvant limiter l'usage de la SPRi.¹⁹⁶ Il est en effet fréquent que l'analyte injecté puisse s'adsorber à la surface de la biopuce par des interactions faibles (interactions de type Van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques, etc.), sans interagir spécifiquement avec le biorécepteur immobilisé. Cette accumulation indésirable de matière provoque une réponse non spécifique et peut mener à des conclusions erronées lors d'études d'interactions. La forte sensibilité de la SPR vis-à-vis de l'indice optique peut également fausser la détection d'analyte, cet indice pouvant varier sous l'influence de plusieurs paramètres physiques tels que la température du tampon ou sa force ionique.

¹⁹⁵ El Kazzy, M.; Weerakkody, J. S.; Hurot, C.; Mathey, R.; Buhot, A.; Scaramozzino, N.; Hou, Y. *Biosensors* **2021**, *11*, 244.

¹⁹⁶ Lichtenberg, J. Y.; Ling, Y.; Kim, S. *Sensors* **2019**, *19*, 1–17.

Enfin la détection d'analyte de faible masse moléculaire (<200 Da) provoque de faibles variations de ΔR , qui dans certains cas peuvent alors se trouver plus faibles que le bruit du signal. Ainsi, la LOD d'un analyte détecté par SPR est généralement plus importante pour des composés de faible masse moléculaire. Ces inconvénients peuvent représenter des limitations à l'usage de la SPR(i), mais certains sont communs à bon nombre de tests biochimiques et des solutions existent pour les résoudre. Tout d'abord, le greffage de molécules dites « contrôles » (*i.e.* qui ne sont pas censées interagir de façon spécifique avec l'analyte) peut permettre d'identifier et de quantifier la proportion de réponse non-spécifique lors du suivi d'une interaction. De manière complémentaire, l'adsorption non spécifique peut être limitée par diverses méthodes,¹⁹⁶ telles que la saturation de la biopuce par des molécules de type polyéthylène glycols (PEGs) ou par des biomolécules comme les albumines, qui constituent deux méthodes populaires. La SPR reste donc une méthode de transduction particulièrement pertinente pour la conception de biocapteurs, avec un usage dépassant le cadre de la recherche académique. On compte d'ailleurs plusieurs entreprises commercialisant des appareils permettant d'utiliser cette méthode, les plus populaires étant commercialisés par la société Biacore™.

I.2. La SPR(i) appliquée à l'étude des interactions biomoléculaires impliquant des glycosidases

La SPR constituant une technique puissante pour l'étude des interactions biomoléculaires, elle a été largement utilisée pour l'étude d'interactions entre sucres et protéines (sucres-lectines, sucres-anticorps, glycosaminoglycanes-protéines, etc).¹⁹⁷ Plus particulièrement, les publications relatives à l'emploi de la SPR pour l'étude d'interactions impliquant des glycosidases ont été répertoriées ci-dessous.

Un exemple récent est celui publié en 2021 par Dong *et al.* qui ont utilisé la SPR pour identifier de potentiels inhibiteurs d' α -glucosidases dans le quinoa (*Chenopodium quinoa*).¹⁹⁸ Dans ces travaux, une α -glucosidase de levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) a été immobilisée sur une surface d'or, puis un extrait éthanolique de poudre de quinoa a été injecté sur la puce obtenue. La valeur d'IC₅₀ de cet extrait a ainsi été estimée par SPR, et les différents analytes retenus par les α -glucosidases ont été isolés. Pour cela, après avoir élué l'extrait de quinoa, une solution de chlorhydrate de glycine (pH 3) a été incubée pendant 10 minutes dans la cellule micro-fluidique, puis cette solution a été collectée. Ce procédé a été répété une quinzaine de fois, puis les fractions ont été combinées et analysées par chromatographie HPLC couplée à la spectrométrie de masse. De cette façon, 18 molécules interagissant avec l' α -glucosidase de levure ont été identifiées (constituant autant de potentiels inhibiteurs de cette enzyme). Ceci illustre bien le potentiel de la SPR en tant que méthode d'analyse et de micro-purification. On remarque que ces travaux qui consistent à utiliser une α -glucosidase connue pour détecter des inhibiteurs potentiels constituent l'exact opposé des travaux décrits dans cette thèse.

¹⁹⁷ Haseley, S. R.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *Top. Curr. Chem.* **2002**; 218, 93–114.

¹⁹⁸ Dong, Q.; Hu, N.; Yue, H.; Wang, H.; Ku, J. *J. Chromatogr. B* **2021**, 1181, 122919.

Nous avons également trouvé dans la littérature deux publications dans lesquelles des glycosidases ont été étudiées par SPR, en tant qu'analytes en solution. En 2007, Nanduri *et al.* ont publié une méthode de détection des β -galactosidases par SPR, en utilisant une biopuce fonctionnalisée par des bactériophages (phages).¹⁹⁹ Ces auteurs ont tout d'abord identifié un bactériophage montrant une bonne affinité pour une β -galactosidase d'*Escherichia coli* en solution, et un autre ne possédant aucune affinité et servant de contrôle. La nature et la spécificité de l'interaction existant entre le premier bactériophage et la β -galactosidase ciblée ne sont pas commentées par les auteurs. Les bactériophages ont ensuite été élués sur des surfaces d'or, leur adsorption menant à l'obtention des biopuces utilisées pour détecter des β -galactosidases en solution, avec une bonne limite de détection de l'ordre du nanomolaire. La régénération des biopuces n'a pas été détaillée dans l'article, ce qui peut s'expliquer par la méthode de conception mise en œuvre. Une régénération consistant à décrocher la β -galactosidase risquerait également de retirer les phages qui n'ont pas été greffés, mais seulement adsorbés sur la surface. Cette méthode présente aussi l'inconvénient de ne pas contrôler la densité de greffage des bactériophages qui ne sont pas greffés sur des sites spécifiques de la biopuce.

Un autre article publié par Sauer *et al.* en 2013 présente une étude de l'inhibition d'une α -amylase d'*Aspergillus niger* (*A. niger*) par l'acarbose en utilisant un dispositif SPR.²⁰⁰ Deux méthodes de greffage sur surface d'or d'un conjugué de l'acarbose ont été comparées (**Figure 35**).

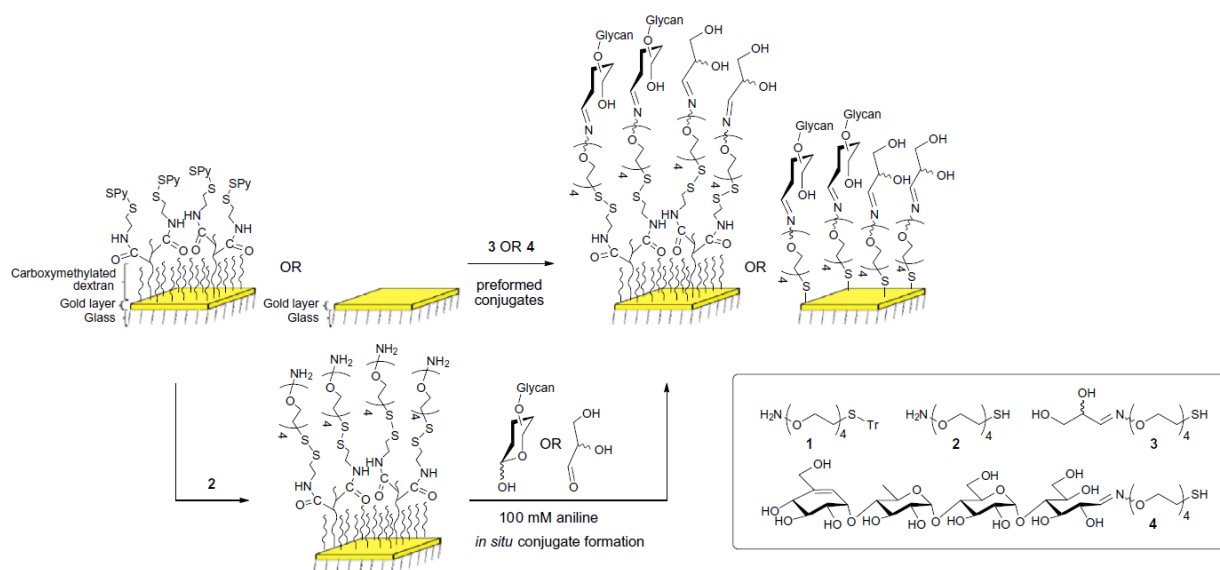


Figure 35 : Biopuces fonctionnalisées via un gel Dextran ou par formation directe d'une SAM (image de la littérature)²⁰¹

¹⁹⁹ Nanduri, V.; Balasubramanian, S.; Sista, S.; Vodyanoy, V. J.; Simonian, A. L. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 589, 166–172.

²⁰⁰ Sauer, J.; Abou Hachem, M.; Svensson, B.; Jensen, K. J.; Thygesen, M. B. *Carbohydr. Res.* **2013**, 375, 21–28.

²⁰¹ Figure issue de la référence 200. Reproduite avec la permission de Elsevier, License n°5392540065926, 19 Septembre 2022.

Dans un premier cas, ce conjugué a été greffé à un polymère de type gel dextran (lui-même supporté sur surface d'or), tandis que dans le second cas le conjugué a été directement lié à la surface d'or grâce à une fonction thiol permettant de former un assemblage de type SAM (Self-Assembled Monolayer). Pour les deux méthodes d'immobilisation, différentes densités de greffage ont été utilisées. Les auteurs ont ainsi pu démontrer qu'à concentration égale de glucoamylase, la réponse obtenue par l'intermédiaire du gel dextran était jusqu'à 10 fois supérieure à celle apportée par le greffage direct sous forme de SAM. Ceci s'explique par la structure tridimensionnelle du gel dextran qui permet au glycoconjugué de présenter une multitude d'orientations possibles, augmentant ainsi sa disponibilité pour l'enzyme en solution. De plus cette structure tridimensionnelle implique que la surface fonctionnalisée par des résidus acarbose est plus importante que dans le cas des SAMs (on parle d'effet d'augmentation de la surface spécifique). Au cours de ces expériences, la LOD n'a pas été déterminée par les auteurs. On constate cependant que les concentrations en enzyme injectées sont comprises entre 50 nM et 25 μ M. Par la suite les biopuces fonctionnalisées avec le dextran ont été utilisées pour déterminer les constantes de dissociation K_D de différents inhibiteurs sur l' α -amylase d'*A. niger*. La méthode employée a fourni des valeurs très cohérentes avec celles déterminées par ITC (Isothermal Titration Calorimetry), les ordres de grandeur des interactions étant conservés (malgré une variation pouvant aller jusqu'à un facteur 7). L'article se conclue par une étude cinétique de l'interaction entre l'acarbose et l' α -amylase, les constantes d'association et de dissociation étant déterminées pour l'enzyme native, ainsi que pour plusieurs protéines mutées.

Ces articles sont, à notre connaissance, les seules publications relatant la détection de glycosidases en solution par SPR. Ainsi même si l'acarbose a été utilisé avec succès pour détecter l' α -amylase d'*A. niger*, à notre connaissance aucune biopuce fonctionnalisée avec des iminosucres n'a été utilisée pour la détection de glycosidases par SPR, ce qui rend notre approche originale et innovante.

II. Détermination des activités inhibitrices de glycosidases des sondes en solution

Avant de procéder à la conception de biopuces utilisables en SPRi à partir des différentes sondes synthétisées pendant ce travail, l'activité inhibitrice de glycosidases de ces sondes a été vérifiée sur un ensemble d'enzymes commerciales. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration, et ces tests d'inhibition ont été réalisés par le Pr Jean-Bernard Behr, de l'université de Reims-Champagne-Ardenne.

II.1. Présentation de la méthode

La détermination de l'activité inhibitrice de glycosidases a été réalisée selon une méthode qui consiste à déterminer l'activité enzymatique en présence et en l'absence d'inhibiteur, tel que représenté ci-dessous (**Figure 36**). Cette méthode a été rapportée par Behr *et coll.*,²⁰² et est dérivée de la méthode décrite par Saul *et al.* en 1984.²⁰³

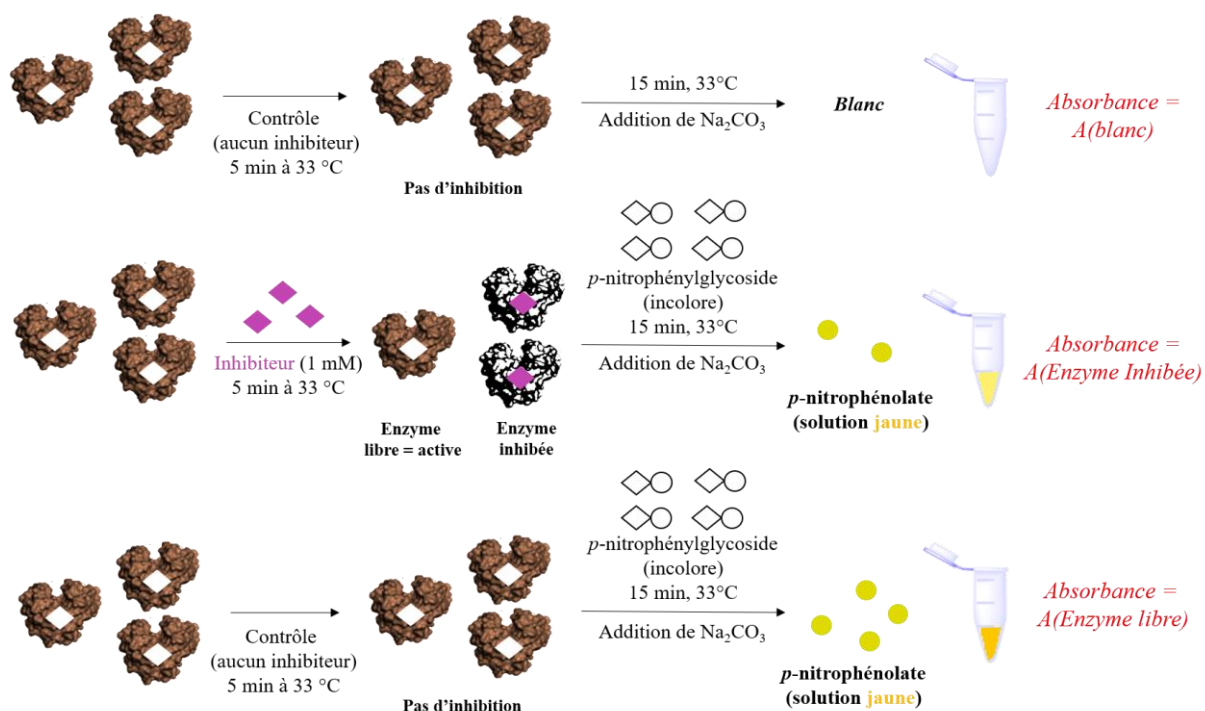


Figure 36 : Détermination de l'activité inhibitrice de glycosidases par spectrophotométrie

Tout d'abord les glycosidases et l'inhibiteur à évaluer sont pré-incubés pendant 5 minutes dans une solution tampon à une concentration précise, dans notre cas cette concentration a été fixée à 1 mM d'inhibiteur. Le choix de la solution tampon est primordial car son pH et sa force ionique doivent permettre une activité catalytique optimale de l'enzyme (en l'absence d'inhibiteur) dans les conditions choisies.

²⁰² Gossan, D. P. A.; Alabdul Magid, A.; Kouassi-Yao, P. A.; Behr, J.-B.; Ahibo, A. C.; Djakouré, L. A.; Harakat, D.; Voutquenne-Nazabadioko, L. *Phytochemistry* **2015**, *109*, 76–83.

²⁰³ Saul, R.; Molyneux, R. J.; Elbein, A. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *230*, 668–675.

Après cette pré-incubation, une quantité saturante (1 mM) de *p*-nitrophénylglycoside est ajoutée au mélange. L'hydrolyse du substrat par la proportion d'enzyme non inhibée mène alors à l'accumulation de *p*-nitrophénol dans le milieu, puis la réaction enzymatique est stoppée après 15 minutes par addition de carbonate de sodium. Ceci provoque une brusque augmentation du pH du mélange, qui interrompt la réaction enzymatique et conduit à la déprotonation de tout le *p*-nitrophénol libéré qui se retrouve alors sous sa forme *p*-nitrophénolate. Cet ion possède une forte absorbance à 405 nm, et peut donc être quantifié par spectrophotométrie, sa concentration en solution étant alors directement proportionnelle à l'activité enzymatique durant les 15 minutes de réaction. Plus l'inhibiteur est efficace, plus l'activité enzymatique est faible et moins l'absorbance à 405 nm est élevée. On peut ainsi quantifier l'efficacité de l'inhibiteur selon la formule :

$$\begin{aligned} \text{Pourcentage d'inhibition} &= 100 - \text{Pourcentage d'activité} \\ &= \left(1 - \frac{A(\text{enzyme inhibée}) - A(\text{blanc})}{A(\text{enzyme libre}) - A(\text{blanc})} \right) * 100 \end{aligned} \quad (\text{Équation 2})$$

Lors des tests effectués par le Pr Jean-Bernard Behr, tous les inhibiteurs sont évalués selon le protocole décrit ci-dessus, puis s'ils démontrent un pourcentage d'inhibition supérieur à 95% dans ces conditions, leur valeur d'IC₅₀ est déterminée. Cette valeur représente la concentration en inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'activité catalytique de l'enzyme, ainsi plus l'inhibiteur est efficace, plus l'IC₅₀ est faible, cependant cette valeur dépend de la concentration et de la nature du substrat utilisé. La valeur d'IC₅₀ est déterminée en mesurant la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du *p*-nitrophenylglycoside pour différentes concentrations en inhibiteur, puis les résultats obtenus sont ensuite représentés sous la forme d'un tracé de Dixon.²⁰⁴ Dans ce graphique, l'inverse de la vitesse initiale est représenté en fonction de la concentration en inhibiteur. On obtient alors une droite à l'équation de type $y = ax + b$:

$$\frac{1}{V_o} = a * [\text{Inhibiteur}] + \frac{1}{V_o \text{ max}} \quad (\text{Équation 3})$$

Pour une concentration en inhibiteur $C_{\text{inhibiteur}} = \text{IC}_{50}$, la vitesse initiale de réaction est alors divisée par 2, ce qui donne :

$$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_o \text{ max} * 0.5} = 2 * \frac{1}{V_o \text{ max}} \quad (\text{Équation 4})$$

Comme le montre la **Figure 37**, il est donc relativement aisé de déterminer la valeur d'IC₅₀, à condition de déterminer suffisamment de valeurs de vitesses initiales de réaction permettant le tracé d'une droite linéaire.

²⁰⁴ Dixon, M. *Biochem. J.* **1953**, 55, 170–171.

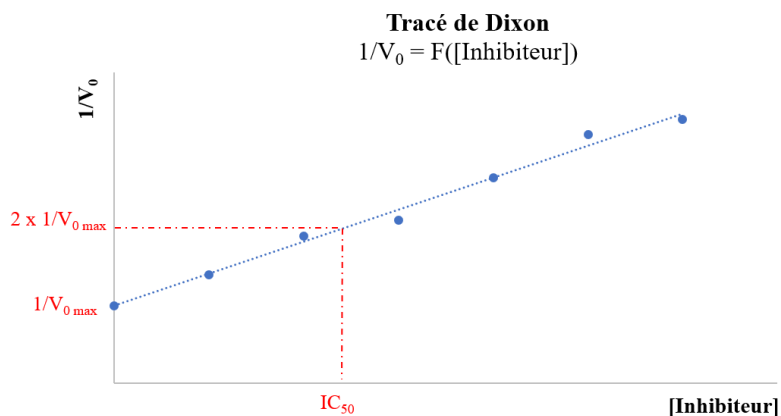


Figure 37 : Détermination d'une valeur d' IC_{50} pour une concentration en substrat fixe à l'aide du tracé de Dixon

II.2. Résultats et choix des cibles biologiques d'étude

Dans les chapitres 2 et 3, les différents composés synthétisés sont nommés à l'aide d'un numéro en fonction de leur ordre d'apparition dans le texte. La structure étant représentée sur les schémas, cette numérotation arbitraire ne représente pas une difficulté pouvant nuire à la compréhension des problématiques abordées. Dans le chapitre 4, il ne sera pas possible de représenter les structures des composés utilisés sur chacun des sensorgrammes obtenus au cours des expériences de SPRI. Ainsi, afin de faciliter la compréhension des résultats, il est préférable d'associer à chaque composé un nom donnant des informations sur sa structure. Chaque sonde sera donc nommée dans ce chapitre selon la nomenclature ci-dessous, qui définit la nature du noyau iminosucré, la longueur du bras espaceur, et la nature du fragment comportant le noyau pyrrole.

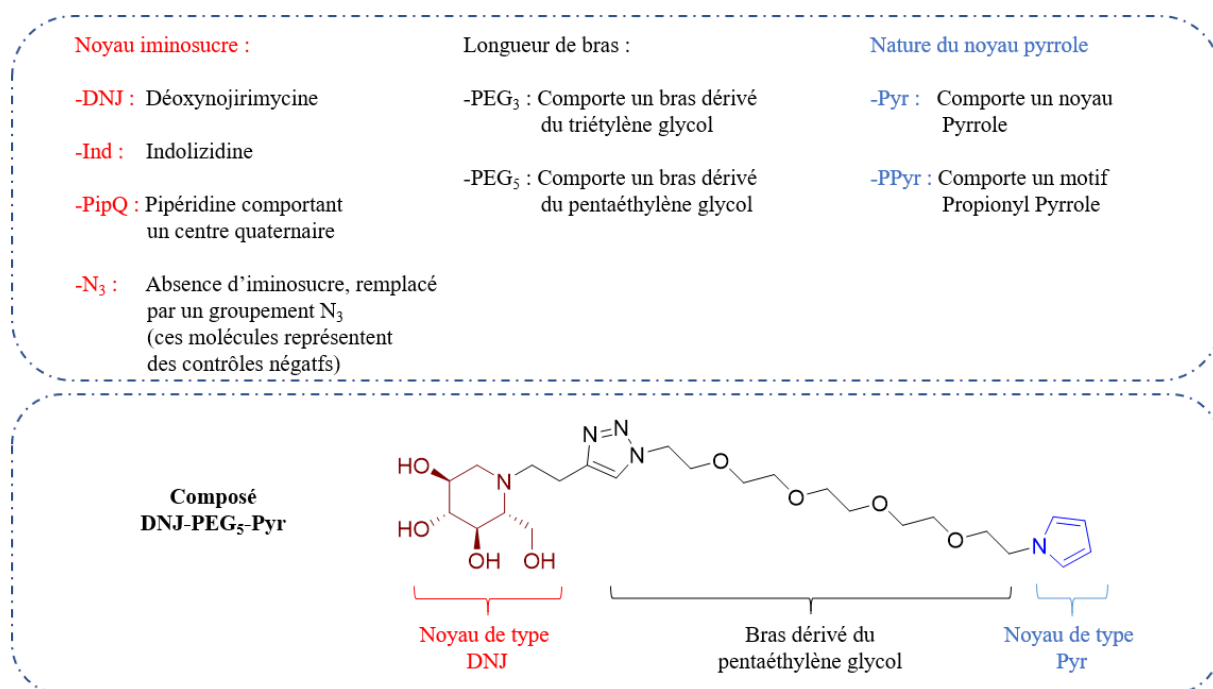


Figure 38 : Nomenclature des sondes de glycosidases utilisées dans le chapitre 4

Les différentes sondes synthétisées sont toutes nommées suivant cette nomenclature dans le **Tableau 9** ci-dessous. Ce tableau montre les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité inhibitrice de glycosidases des différentes sondes préparées pendant ce travail, ainsi que de différents bras espaceurs ne comportant aucun noyau iminosucres. L'activité inhibitrice a été déterminée selon la méthode présentée dans le paragraphe précédent sur l' α -glucosidases de riz (pH 5.1) et de levure (pH 6.2), sur les β -glucosidases d'*Aspergillus niger* et amande (pH 5.6) et sur la β -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* (pH 5.6), qui sont toutes des enzymes commerciales. L'objectif était de déterminer quelles sondes interagissent avec quels types de glycosidases en solution, une étape importante avant de réaliser les expériences de SPR avec des biopuces préparées à partir de ces sondes. Les données d'inhibition de l'indolizidine **6b** ayant inspirée les sondes de **type 3** sont également reportées dans ce tableau.

		Enzyme Composé	α -glucosidase <i>Oryza sativa</i> (riz)	α -glucosidase <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levures)	β -glucosidase <i>Aspergillus niger</i> (champignon)	β -glucosidase <i>Prunus dulcis</i> (amande douce)	β -galactosidase <i>Aspergillus oryzae</i> (champignon)
(Contrôles)		N ₃ -PEG ₃ -PPyr ^{a,b,c}	11%	N.I.	N.I.	N.I.	N.D.
		N ₃ -PEG ₃ -Pyr ^{a,b,c}	20%	N.I.	N.I.	N.I.	N.D.
		N ₃ -PEG ₅ -PPyr ^{a,b,c}	38%	N.I.	N.I.	N.I.	N.D.
		N ₃ -PEG ₅ -Pyr ^{a,b,c}	6%	16%	N.I.	N.D.	6%
Sondes Type 1		DNJ-PEG ₃ -PPyr ^{a,b}	100% IC₅₀ = 0.43 μM	N.I.	99% IC₅₀ = 0.25 μM	57%	100%^d
		DNJ-PEG ₃ -Pyr ^{a,b,c}	100% IC₅₀ = 0.48 μM	N.I.	100% IC₅₀ = 0.22 μM	N.D.	98%^e
		DNJ-PEG ₅ -PPyr ^{a,b}	100% IC₅₀ = 0.41 μM	N.I.	100% IC₅₀ = 0.30 μM	43%	99%^f
		DNJ-PEG ₅ -Pyr ^a	99% IC₅₀ = 0.50 μM	22%	100% IC₅₀ = 0.78 μM	61%	90%^g
Sondes Type 2		PipQ-PEG ₃ -PPyr ^{a,b}	100% IC₅₀ = 0.13 μM	34%	N.I.	62%	22%
		PipQ-PEG ₅ -Pyr ^{a,b,c}	99% IC₅₀ = 0.35 μM	32%	93% IC₅₀ = 52 μM	N.D.	56%
		PipQ-PEG ₅ -PPyr ^{a,b}	100% IC₅₀ = 0.13 μM	10%	89%	N.I.	24%
Sondes Type 3		Ind-PEG ₃ -PPyr ^{a,b}	100% IC₅₀ = 0.38 μM	90%	62%	N.I.	13%
		Ind-PEG ₅ -PPyr ^{a,b}	100% IC₅₀ = 0.41 μM	84%	82%	NI	28%
		Ind-PEG ₅ -Pyr ^c	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Indolizidine 6b ^{a,b,c}	100% IC₅₀ = 0.052 μM	80%	N.I.	N.D.	N.I.	

^{a)} Exprimé en % d'inhibition, pour une concentration de 1 mM en inhibiteur

^{b)} N.I. : Pas d'inhibition

^{c)} N.D. : Non déterminé

^{d)} 88% à 100 μ M d'inhibiteur, 13% à 10 μ M

^{e)} 63% à 100 μ M d'inhibiteur

^{f)} 99% à 100 μ M d'inhibiteur, 61% à 10 μ M

^{g)} 46% à 100 μ M d'inhibiteur

Tableau 9 : Activités inhibitrices des sondes de glycosidases en solution – Coll. Pr J.-B. Behr – Univ. Reims Champagne Ardenne

Tout d'abord, ces résultats valident le fait que la présence d'un noyau iminosucre est essentielle à l'interaction avec les glycosidases puisque seule une très faible activité inhibitrice a été observée pour les composés de type « bras espaceurs » se terminant par un azoture. Ce constat permettra d'utiliser ces composés en tant que contrôles négatifs au cours des expériences de SPRi.

Les sondes de **type 1**, comportant comme noyau iminosucre un dérivé *N*-alkylé de la DNJ, démontrent non seulement une forte activité inhibitrice de l' α -glucosidase de riz (IC₅₀ submicromolaire) mais aussi une activité inhibitrice de la β -glucosidase d'*A. niger* (avec des IC₅₀ du même ordre de grandeur). Les sondes de **type 1** inhibent également, mais dans une moindre mesure, la β -galactosidase d'*A. oryzae*, ce qui s'explique par la forte ressemblance entre la structure *D*-gluco et la structure *D*-galacto reconnue par cette enzyme. Pour cette dernière on constate d'ailleurs une chute du pourcentage d'inhibition lorsque la concentration en inhibiteur décroît à 100 μ M. Les résultats présentés dans ce tableau montrent également que les sondes de **type 1** ne sont pas de bons inhibiteurs de l' α -glucosidase de levure (*S. cerevisia*) et de la β -glucosidase d'amande (*P. dulcis*). Diot *et al.* ont décrit les activités biologiques de composés de type *N*-alkyl DNJ dont la structure est proche des sondes de **type 1**,^{82a} et ont également constaté une absence d'activité inhibitrice pour les α -glucosidases de levures. Cette absence d'activité pour les α -glucosidases de levures peut s'expliquer par plusieurs facteurs : soit un encombrement stérique dû à l'introduction du groupement *N*-alkyl sur le noyau DNJ (comme suggéré par Diot *et al.*),^{82a} soit un changement de conformation de ce noyau DNJ relatif à la *N*-alkylation (comme discuté dans le chapitre 1, p10). Diot *et al.* ont également décrit une activité inhibitrice des β -glucosidases d'amande, également observée par l'équipe de Compain.⁶⁸ Celle-ci n'a pas été observée dans notre cas, mais peut s'expliquer car les tests d'inhibition ont été réalisés à des pH différents pour cette enzyme. D'après les valeurs d'IC₅₀ déterminées, la longueur du bras espaceur ou la nature du fragment comportant le noyau pyrrole (pyrrole ou propionylpyrrole) n'ont pas d'influence sur la capacité des sondes de **type 1** à interagir avec ces glycosidases. Ainsi, ces sondes de **type 1** semblent appropriées pour interagir avec plusieurs glycosidases, et leur manque de sélectivité ne permettra probablement pas de distinguer par SPR des α -glucosidases qui seraient mélangées à d'autres types d'enzymes.

La mesure de l'activité inhibitrice de glycosidases des trois sondes de **type 2** testées montrent que par rapport aux sondes de **type 1**, ces sondes sont plus sélectives de l' α -glucosidase de riz, dont elles sont de puissants inhibiteurs (avec des IC₅₀ de 0.13 à 0.35 μ M). Les pourcentages d'inhibition pour les autres enzymes testées sont bien moins importants. On note que si deux de ces sondes peuvent aussi interagir (de façon moindre) avec la β -glucosidase d'*A. niger*, leur affinité pour l' α -glucosidase de levure, la β -glucosidase d'amande et la β -galactosidase d'*A. oryzae* est faible. Ainsi, on peut espérer que de telles sondes permettent de discriminer des glycosidases selon la famille à laquelle elles appartiennent et reconnaître sélectivement des glycosidases de la famille GH31 (famille de classification de l' α -glucosidase de riz dans la base de données CAZy).

Même si deux sondes de **type 2** possédant un bras de type PEG₅ inhibent légèrement la β -glucosidase d'*A. niger* alors qu'une troisième comportant un bras PEG₃ n'inhibe pas cette enzyme, il est difficile de conclure que la longueur du bras espaceur joue ici un rôle déterminant dans l'activité inhibitrice. Une telle relation structure-activité n'est d'ailleurs observée au sein d'aucune autre famille de sondes, et n'est pas observée avec une autre enzyme. Par conséquent, nous retiendrons que les sondes de **type 2** interagissent fortement avec l' α -glucosidase de riz et que leur interaction avec la β -glucosidase d'*A. niger* est très inférieure à celle des sondes de **type 1**.

Enfin, les sondes de **type 3** dérivées de l'indolizidine **6b** sont des inhibiteurs sélectifs de l' α -glucosidase de riz, et réduisent également l'activité catalytique de l' α -glucosidase de levure. Contrairement à ce qui a été observé pour les sondes de **type 1**, il n'y a pas de perte d'activité inhibitrice pour cette enzyme entre **6b** et les sondes de **type 3**, malgré une augmentation de l'encombrement au voisinage du noyau iminosucre. On peut alors envisager trois hypothèses à partir de cette observation : la première est que l'encombrement généré par l'introduction d'un bras espaceur sur l'indolizidine **6b** est minime, puisque l'introduction de ce bras espaceur se fait sur le cycle à 5 chaînons de l'indolizidine. De même, le changement de conformation du cycle polyhydroxylé (impliqué dans l'interaction avec le site actif de l' α -glucosidase de levure) est probablement minime, et pourrait expliquer que les propriétés inhibitrices soient conservées. On peut enfin supposer que, malgré l'encombrement généré par le bras espaceur, celui-ci n'empêche pas l'insertion dans le site actif de l'enzyme. Un tel constat suggère alors que la perte d'activité inhibitrice observée dans le cas des sondes de **type 1** n'est pas corrélée à l'encombrement apporté par le substituant *N*-alkyl, mais pourrait être relative au changement de pKa de l'atome d'azote impliqué dans la fonctionnalisation du noyau DNJ. Aucune de ces trois hypothèses n'a pu être accréditée à partir des éléments à notre disposition.

Sur la base de ces résultats, deux enzymes modèles ont été sélectionnées en tant que cibles biologiques pour les expériences de SPRi. L' α -glucosidase de riz étant inhibée par les différentes sondes, de premières études d'interaction impliquant cette enzyme pourront être réalisées afin de calibrer la méthode de détection. Cette méthode doit permettre la détection de l' α -glucosidase de riz par des sondes de **types 1, 2, et 3**, disposées sur une biopuce. La sélectivité de la méthode de détection pourra ensuite être évaluée en utilisant une autre glycosidase, possédant une affinité pour les seules sondes de **type 1**. En se basant sur ce critère de sélectivité, la β -galactosidase d'*A. oryzae* représenterait le meilleur choix. Cependant cette enzyme possède une faible affinité pour les sondes de **type 1**, et sa détection en solution pourrait donc être complexe. En revanche, les valeurs d'IC₅₀ des sondes de **type 1** pour l' α -glucosidase de riz et pour la β -glucosidase d'*A. niger* sont très proches. On peut donc supposer qu'une méthode de détection de l' α -glucosidase de riz permettrait également la détection de la β -glucosidase d'*A. niger* par ces sondes de **type 1**.

De plus, si les sondes de **type 2** possèdent une affinité pour la β -glucosidase d'*A. niger*, celle-ci demeure cependant très inférieure à celle obtenue pour les sondes de **type 1**. Par conséquent, l'amplitude des réponses obtenues au cours d'expérience de SPR et les limites de détection de la β -glucosidase d'*A. niger* devraient être différentes pour des plots fonctionnalisés par des sondes de **type 1**, ou de **type 2**. Ces raisons nous ont donc conduit à utiliser la β -glucosidase d'*A. niger* comme seconde cible biologique au cours des études d'interaction par SPRi.

III. Conception de biopuces multiplexées par electrospecking pour la détection de glycosidases par SPRi

Afin d'étudier des interactions biomoléculaires par SPRi, il est nécessaire d'immobiliser des biorécepteurs sur une surface solide, afin de concevoir une biopuce. Les surfaces d'or sont encore très majoritairement utilisées pour concevoir de telles biopuces pour la SPRi, bien qu'il soit également possible d'utiliser d'autres surfaces telles que le graphène (généralement supporté sur un métal qui constitue l'interface générant l'onde plasmon)²⁰⁵. En plus de posséder de bonnes propriétés électromagnétiques, l'or est un métal noble qui ne s'oxyde pas sous l'effet de l'oxygène atmosphérique ou dans l'eau et ne possède pas de toxicité pour les cellules. Ces deux derniers facteurs constituent un avantage particulièrement précieux pour la conception d'un biocapteur amené à fonctionner dans un milieu aqueux et expliquent par exemple que l'or soit préféré à l'argent, qui est plus sensible à l'oxydation.²⁰⁶

Des procédés permettant d'ancrer des biomolécules sur les surfaces d'or ont donc été développés,²⁰⁶ ces méthodes devant conserver l'intégrité structurale des biomolécules fixées afin qu'elles conservent leur activité biologique. Au cours de la fonctionnalisation, il est également nécessaire de considérer une méthode garantissant une bonne accessibilité des biorécepteurs par l'analyte à détecter. Parmi les stratégies permettant l'immobilisation de biorécepteurs sur surface d'or, la conception de couches auto-assemblées de thiols constitue une méthode historique et répandue qui sera rapidement présentée. Puis la méthode d'immobilisation par électro-copolymérisation du pyrrole utilisée au cours de ce travail de thèse sera décrite, avant de détailler le protocole de conception des biopuces multiplexées (electrospecking).

III.1. L'immobilisation de biorécepteurs sur surface d'or par formation de SAMs

Les monocouches auto-assemblées, plus connues sous l'acronyme de SAM (pour Self-Assembled Monolayers) sont des assemblages moléculaires qui se forment par adsorption sur une surface, avant de s'auto-organiser pour former une structure cristalline ou semi-cristalline, hautement ordonnée.²⁰⁷ L'assemblage des molécules en SAM sur une surface est généralement guidé par la présence d'un groupe dit « de tête » qui va posséder une bonne affinité pour cette surface, ce qui va permettre la phase préliminaire d'adsorption (**Figure 39**). Parmi les composés employés pour la conception de SAMs sur l'or, on trouve principalement des molécules comportant un groupement thiol ou un pont disulfure, lesquels possèdent une très bonne affinité pour ce métal.²⁰⁸

²⁰⁵ Szunerits, S.; Maalouli, N.; Wijaya, E.; Vilcot, J.-P.; Boukherroub, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 1435–1443.

²⁰⁶ Oliverio, M.; Perotto, S.; Messina, G. C.; Lovato, L.; De Angelis, F. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 29394–29411.

²⁰⁷ Newton, L.; Slater, T.; Clark, N.; Vijayaraghavan, A. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 376–393.

²⁰⁸ Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170.

Par la suite, les molécules s'étant adsorbées de façon relativement désordonnée vont s'organiser dans l'espace afin de former une structure hautement ordonnée qui constitue la SAM. Ces molécules vont ensuite se lier à la surface d'or *via* une forte liaison soufre-or (~ 210 kJ/mol),²⁰⁸ le mécanisme précis menant à la formation d'une telle liaison demeure cependant sujet à controverse.²⁰⁷

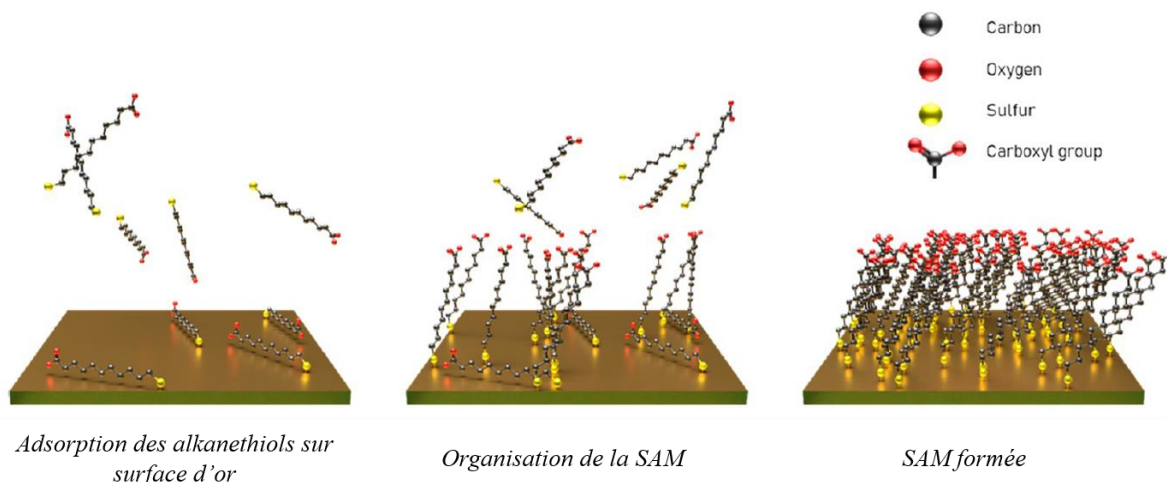


Figure 39 : Formation d'une SAM d'alkanethiols sur une surface d'or (image de la littérature)²⁰⁹

La formation des SAMs à base de thiols ou d'autres molécules soufrées a été très étudiée et reste l'une des méthodes de fonctionnalisation de l'or les plus répandues, principalement car cette méthode est très facile à mettre en œuvre avec un appareillage limité. Il suffit en effet de déposer une goutte de solution de thiols sur une surface d'or pour aboutir à la formation d'une SAM en environ 12-18 h à température ambiante,²⁰⁸ celle-ci pouvant de plus être assemblée dans divers solvants organiques compatibles avec un large ensemble de composés thiolés. Cependant comme le montre la **Figure 39**, les SAMs constituent des assemblages très compacts, dont la forte densité peut s'opposer à une bonne reconnaissance entre le biorécepteur et l'analyte en solution. Il est possible de limiter ce phénomène en confectionnant une SAM « mixte », constituée de deux thiols de tailles différentes. Un tel procédé permet de contrôler la densité de greffage finale, afin de rendre le biorécepteur plus disponible pour sa cible. La formation de SAMs constituant probablement la méthode la plus populaire pour la fonctionnalisation de surfaces d'or à l'heure actuelle, il existe aujourd'hui une littérature très abondante détaillant les différents paramètres physico-chimiques à considérer (température, concentration en thiols et solvants utilisés, temps d'assemblage, etc.) afin de contrôler les propriétés des structures désirées.²⁰⁸ Néanmoins ces considérations ne seront pas abordées dans ce manuscrit, une autre méthode de greffage ayant été utilisée dans le cadre de cette thèse. Cette méthode permettant la formation d'un polymère tridimensionnel repose sur l'électrocopolymérisation du pyrrole et sera décrite dans le paragraphe suivant.

²⁰⁹ Figure reproduite à partir de O'Connell, L.; Marcoux, P. R.; Roupioz, Y. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, 7, 1987–2014. Copyright {2022} American Chemical Society.)

III.2. Fonctionnalisation de surfaces d'or par électro-copolymérisation du pyrrole et conception de biopuces multiplexées (electrospotting)

L'électropolymérisation du pyrrole est un phénomène qui a été mentionné pour la première fois à la fin des années 1960 par Dall'Olio *et al.*,²¹⁰ mais c'est en 1979 que Diaz *et al.* ont produit le premier film de polypyrrole stable sur une électrode de platine par oxydation de pyrrole en solution dans l'acétonitrile,²¹¹ avant de proposer un mécanisme pour cette réaction quelques années plus tard.²¹² En 1986, un biocapteur à glucose a été conçu en piégeant une glucose oxydase dans un film de polypyrrole, selon des protocoles rapportés quasi simultanément par Foulds *et al.* ainsi que Umana *et al.*^{213,214} Depuis ces travaux pionniers, des biocapteurs reposant sur l'utilisation de polymères conducteurs ont été confectionnés et décrits dans la littérature, les films de polypyrrole demeurant parmi les polymères les plus utilisés.^{215,216,217}

En 1994, Livache *et coll.* ont présenté une méthode permettant d'immobiliser des oligonucléotides sur surface d'or par électro-copolymérisation du pyrrole,²¹⁸ laquelle s'est ensuite avérée compatible avec le greffage de plusieurs autres types de biomolécules.²¹⁹ Dans ce procédé, la biomolécule à greffer doit tout d'abord être conjuguée à un noyau pyrrole (**Figure 40-A**), qui constituera un point d'ancrage sur la surface d'or. Le conjugué obtenu constitue alors un premier monomère qui est ensuite mélangé à du pyrrole libre en large excès, jouant le rôle de comonomère. Ce mélange est ensuite déposé au contact de la surface d'or à fonctionnaliser, avant application d'une différence de potentiel permettant la formation des espèces radicalaires tel que représentées dans la **Figure 40-A** (afin de simplifier cette figure, une seule forme limite a été représentée pour chaque espèce radicalaire). Plusieurs mécanismes réactionnels existent pour décrire la réaction de copolymérisation,²²⁰ le mécanisme représenté étant celui proposé initialement par Diaz *et coll.*²¹² Cette réaction peut aboutir à la formation de différents dimères (seul l'hétérodimère a été représenté pour raison de simplification mais les homodimères sont également produits au cours de cette réaction), puis elle va se poursuivre jusqu'à la formation d'un copolymère insoluble dans le milieu qui vient alors s'adsorber sur la surface d'or (**Figure 40-B**).

²¹⁰ A. Dall'olio, Y. Dascola, V. Varacca, V. C. R. Bocchi: *Acad. Sci. Ser. C* **1968**, 267, 433-435.

²¹¹ Diaz, A. F.; Kanazawa, K. K.; Gardini, G. P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 14, 635-636.

²¹² Genies, E. M.; Bidan, G.; Diaz, A. F. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1983**, 149, 101-113.

²¹³ Foulds, N. C.; Lowe, C. R. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1986**, 82, 1259-1264.

²¹⁴ Umana, Mirtha.; Waller, Jess. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 2979-2983.

²¹⁵ Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 443-456.

²¹⁶ Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 345-359.

²¹⁷ Malhotra, B. D.; Chaubey, A.; Singh, S. P. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 578, 59-74.

²¹⁸ Livache, T.; Roget, A.; Dejean, E.; Barthet, C.; Bidan, G.; Teoule, R. *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 2915-2921.

²¹⁹ Bidan, G.; Billon, M.; Galasso, K.; Livache, T.; Mathis, G.; Roget, A.; Torres-Rodriguez, L. M.; Vieil, E. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, 89, 183-194.

²²⁰ Sabouraud, G.; Sadki, S.; Brodie, N. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 283-293.

Les deux types de monomères ayant des vitesses de polymérisation différentes, le ratio entre noyaux pyrrole « libres » et noyaux pyrrole conjugués à la biomolécule est différent dans le copolymère et dans le mélange initial.

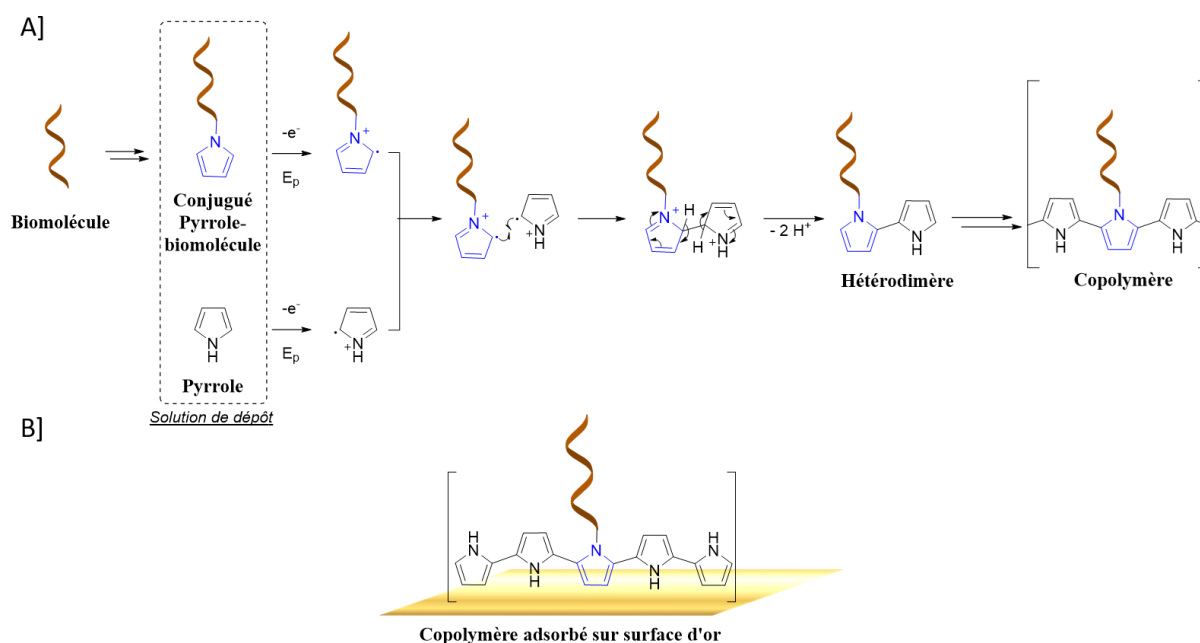


Figure 40 : A] Fonctionnalisation d'une surface d'or avec une biomolécule par électro-copolymérisation selon le mécanisme de Diaz et coll. B] Représentation schématique d'une surface d'or fonctionnalisée par électro-copolymérisation du pyrrole

En utilisant un dispositif susceptible de délimiter la surface d'or fonctionnalisée par électro-copolymérisation, on peut greffer différentes biomolécules sur une même surface d'or : on parle alors d'« electrospotting » (**Figure 41**). Depuis les premiers travaux de Livache *et coll.*, l'electrospotting a été employé au sein du laboratoire SYMMES afin d'immobiliser : de l'ADN pour la détection de brins complémentaires par SPRi,²²¹ des protéines et des peptides pour la détection de protéines,^{222,223} des sucres pour la détection de protéines,²²⁴ et de bactéries²²⁵, etc.

Cette méthode polyvalente a donc été sélectionnée pour concevoir les biopuces à partir des sondes synthétisées dans les chapitres 2 et 3. Pour cela les différents composés à déposer ont été ajoutés à une solution saline destinée à favoriser l'électro-copolymérisation du pyrrole (tampon FDZ), le mélange obtenu étant nommé « solution de dépôt ».

²²¹ Guedon, P.; Livache, T.; Martin, F.; Lesbre, F.; Roget, A.; Bidan, G.; Levy, Y. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 6003–6009.

²²² Grosjean, L.; Cherif, B.; Mercey, E.; Roget, A.; Levy, Y.; Marche, P. N.; Villiers, M.-B.; Livache, T. *Anal. Biochem.* **2005**, 347, 193–200.

²²³ Villiers, M.-B.; Cortès, S.; Brakha, C.; Lavergne, J.-P.; Marquette, C. A.; Deny, P.; Livache, T.; Marche, P. N. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 1554–1559.

²²⁴ Mercey, E.; Sadir, R.; Maillart, E.; Roget, A.; Baleux, F.; Lortat-Jacob, H.; Livache, T. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3476–3482.

²²⁵ Bulard, E.; Bouchet-Spinelli, A.; Chaud, P.; Roget, A.; Calemczuk, R.; Fort, S.; Livache, T. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 1804–1811.

Afin d'obtenir différentes densités de greffage en sondes dans le copolymère final, plusieurs solutions de dépôt ont été préparées, en utilisant des concentrations en sondes de 1 μM à 1 mM. La concentration en pyrrole étant fixe (20 mM), ceci correspond à des ratios sondes/pyrrole allant de 1/20000 à 1/20 dans ces solutions de dépôt. Deux dispositifs ont ensuite été utilisés pour concevoir les biopuces multiplexées, le premier étant un dispositif semi-automatisé et conçu au CREAB (nommé « polypotter »). À l'aide de ce dispositif, les solutions de dépôt ont été prélevées *via* un cône de pipette contenant un fil de platine et mis au contact de la surface à fonctionnaliser (**Figure 41**). Puis la copolymérisation a été déclenchée par application d'une différence de potentiel entre la surface d'or et le fil de platine (2V pendant 100 ms), ce qui a mené à la formation d'un plot de copolymère sur l'or, d'un diamètre d'environ 500 μm . La procédure a alors été répétée en utilisant les différentes solutions de dépôt, ce qui a permis la conception de matrices au sein desquelles chaque plot a été fonctionnalisé de façon différente des plots voisins. Au cours de la conception des biopuces, chaque composé a été déposé à différentes positions de la surface (on parle de répliques).

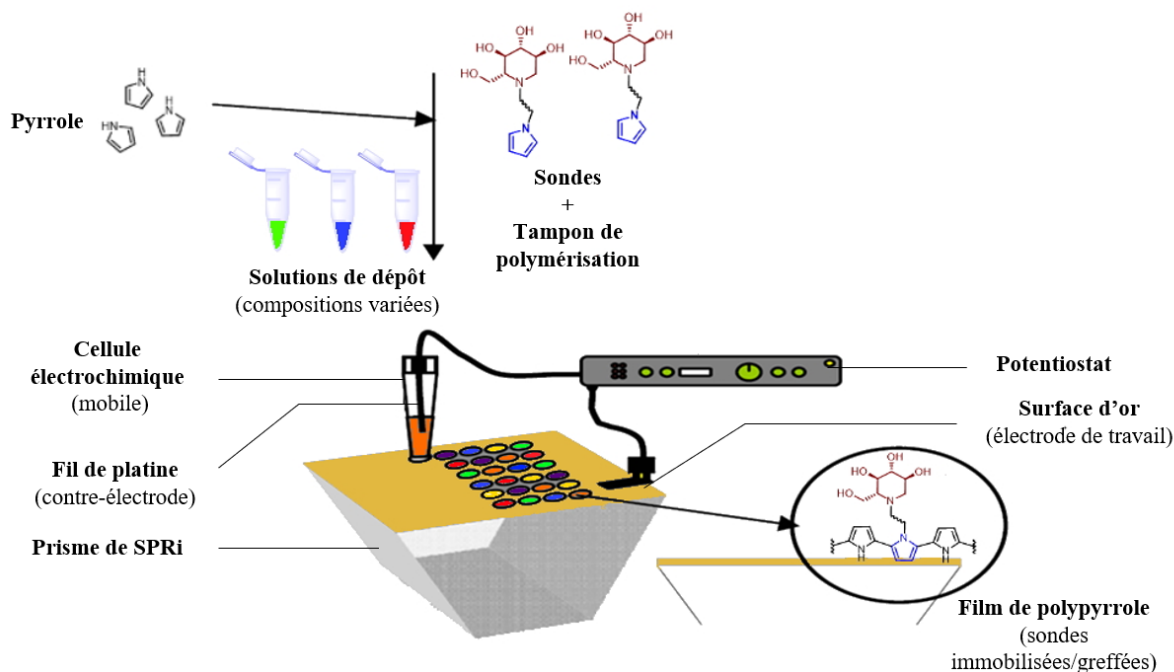
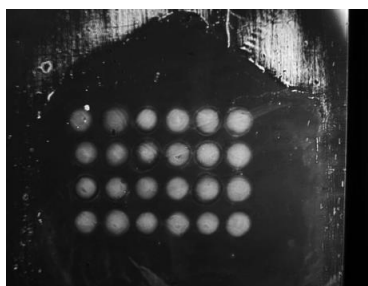


Figure 41 : Procédé d'électrospraying appliqué à la conception des biopuces à iminosucres²²⁶

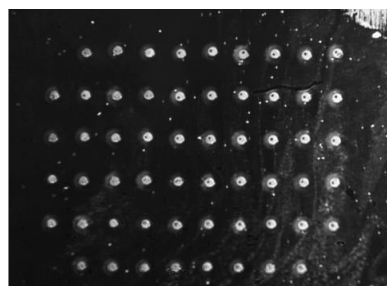
Le polypotter étant un dispositif artisanal et semi-automatisé, les biopuces obtenues à l'aide de ce dispositif ont montré des limitations lors des expériences préliminaires. Un second appareil entièrement automatisé a donc été employé : le OmniGrid® Micro, commercialisé par la société Digilab®. Ce robot piloté par un programme informatique permet de mettre en œuvre des conditions d'électro-copolymérisation totalement similaires à celles utilisées précédemment, mais utilise une cellule électrochimique permettant l'obtention de plots de 200 μm de diamètre (contre 500 μm pour le polypotter).

²²⁶ Figure issue de la référence 222, modifiée avec la permission de Elsevier, License n°5380281250454, 1^{er} Septembre 2022.

Ceci a permis d'augmenter le nombre de plots déposés sur une même biopuce (60 plots maximum, contre ~30 au polypotter). On peut voir en **Figure 42** deux prismes fonctionnalisés avec ces deux dispositifs d'electrospotting, visualisés par SPRi.



Polypotter



Omni Grid® Micro

Figure 42 : Matrices obtenues par electrospotting à l'aide du polypotter et du Omni Grid® Micro

IV. Etudes d'interactions des sondes dérivées d'iminosucres avec des glycosidases par SPRi

Après avoir confectionné les biopuces, les études d'interactions par SPRi ont été entreprises avec l' α -glucosidase de riz et la β -glucosidase d'*A. niger*. Afin de faciliter la compréhension des résultats obtenus, une première sous-partie présentera l'appareillage de SPRi et les expériences mises en œuvre.

IV.1. Présentation de l'appareillage de SPRi et des types d'expériences réalisées

Présentation de l'appareillage de SPRi

Un dispositif de SPRi permettant la détection d'analytes présents dans une phase liquide (ou gazeuse) il peut être vu comme la combinaison de 2 systèmes (**Figure 43**). Un système micro-fluidique permet l'injection de l'analyte et sa circulation jusqu'à la surface de la biopuce, tandis qu'en parallèle, un dispositif optique permettant la transduction permet de détecter et quantifier les interactions entre l'analyte et le récepteur.

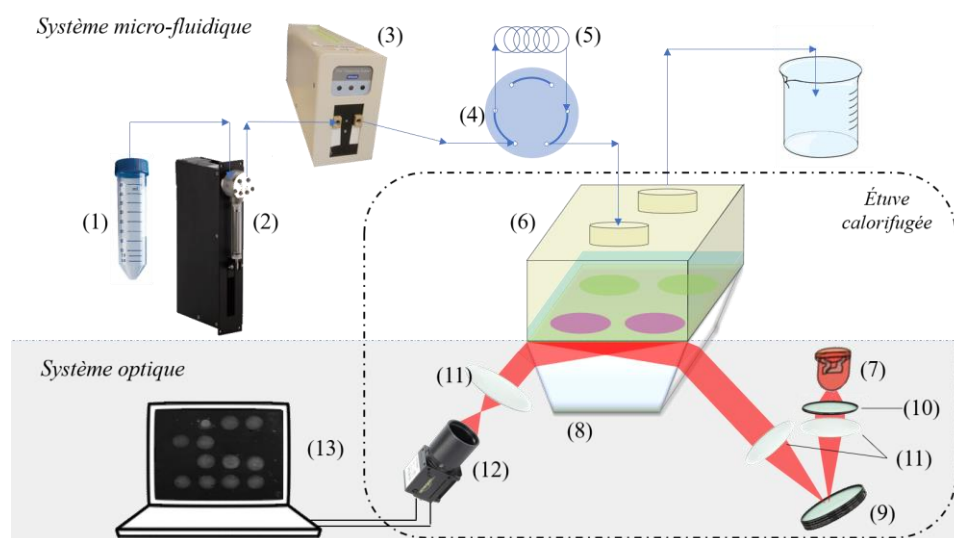


Figure 43 : Représentation schématique du dispositif expérimental de SPRi

Au cours de l'expérience de SPRi, le tampon de course contenu dans un tube Falcon (1) (Corning™) va circuler sous l'action d'une pompe-seringue (2) jusqu'à un dispositif de dégazage (3), constitué d'une enceinte sous vide contenant une tubulure en Teflon. En circulant dans cette tubulure perméable aux gaz, le tampon va ainsi être dégazé afin d'empêcher toute formation de bulles d'air dans la suite du système d'injection. Cette précaution permet d'éviter l'apparition de volumes morts dans le système micro-fluidique ou la formation de bulles à la surface de la biopuce. Lorsque de telles bulles apparaissent, la différence d'indice optique entre le tampon et l'air provoque un changement de réflectivité considérable et il devient alors impossible de poursuivre l'expérience initiée. Une fois dégazé, le tampon est ensuite dirigé vers une vanne 6 voies (4), laquelle permet d'injecter l'échantillon d'enzyme disposé dans la boucle d'injection (5) vers la cellule micro-fluidique (6).

L'interaction avec les récepteurs immobilisés sur la surface de la biopuce est alors suivie en temps réel. La détection est réalisée grâce à un faisceau lumineux issu d'une diode (7), projeté sur le prisme (8) à l'aide d'un miroir pivotant (9) après un passage à travers un réseau de polariseurs (10) et de lentilles (11). Le faisceau réfléchi est alors dirigé vers une caméra CCD (12) dont les images sont transférées à un ordinateur (13). La collection et le traitement des données expérimentales sont ensuite réalisées, comme décrit en Annexe 2. Le phénomène de résonance plasmonique de surface étant particulièrement sensible, le dispositif (**Figure 44**) est disposé dans une étuve à 25 °C, afin d'éviter que des changements de luminosité et de température ne puissent perturber le phénomène de détection.

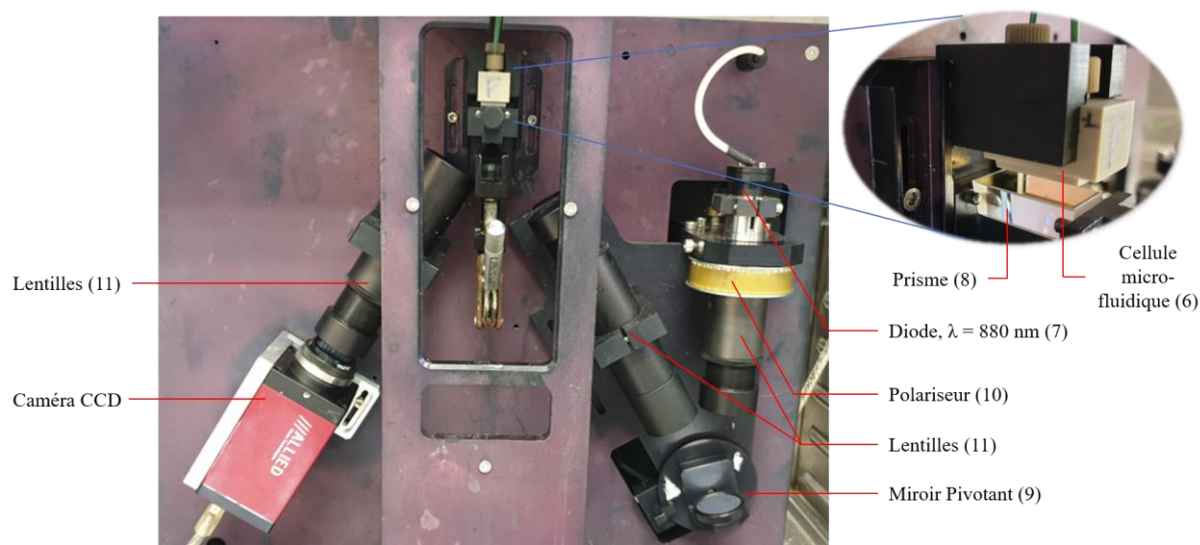


Figure 44 : Dispositif de SPRi utilisé

Types d'expériences réalisées en SPRi

Au cours de ce chapitre de thèse, deux types d'expériences seront mentionnés. Le premier type d'expérience est le suivi cinétique simple, qui consiste à injecter les enzymes cibles à une certaine concentration, puis à enregistrer la réponse pour les différents plots disposés sur la puce. Un sensorgramme tel que celui représenté en **Figure 33** est obtenu à l'issue de ce type d'expérience.

Le deuxième type d'expérience mis en œuvre est appelé expérience de dose-réponse. Une expérience de type dose-réponse est en fait un ensemble de plusieurs suivis cinétiques, réalisés successivement pour des concentrations croissantes d'enzymes sur une même biopuce, et sans régénération intermédiaire. La représentation des différents sensorgrammes sur un même graphique permet de voir l'évolution de la réponse pour chaque concentration, comme représenté ci-dessous (**Figure 45-A**). On peut également représenter les valeurs des plateaux de chaque sensorgramme en fonction de la concentration, afin de visualiser l'accumulation d'enzymes sur la biopuce au fur et à mesure des injections (**Figure 45-B**). Cette seconde représentation a pour inconvénient de ne pas représenter les informations relatives à la cinétique de l'interaction (les phases d'association et de dissociation des enzymes).

En revanche, elle possède l'avantage d'être très « compacte » et de minimiser le nombre de courbes sur un même graphique, elle facilite ainsi la comparaison entre les différents composés et permet d'identifier ceux qui présentent la meilleure affinité pour les enzymes injectées.

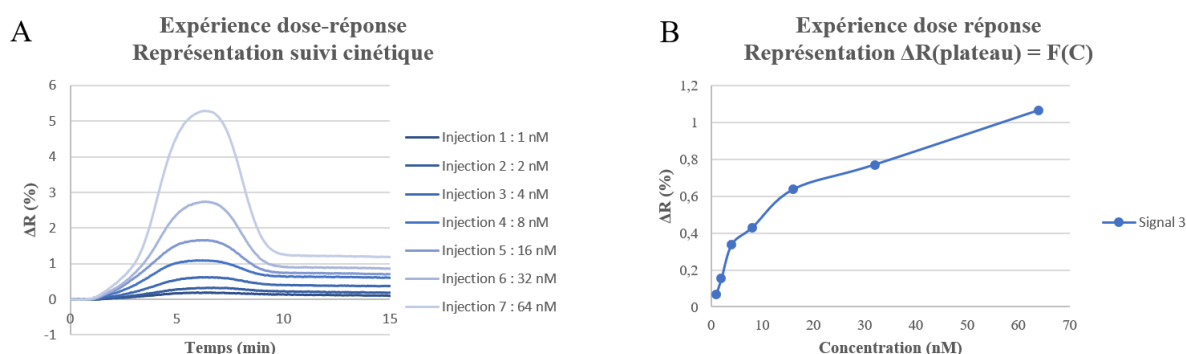


Figure 45 : Présentation des résultats d'une expérience de dose réponse : A) En mode de suivi cinétique B) En représentation $\Delta R(\text{plateau}) = F(C)$

IV.2. Étude d'interaction avec l' α -glucosidase d'*Oryza sativa*

Expériences préliminaires - Détermination des densités de greffage optimales

L'un des premiers paramètres expérimentaux à déterminer est la densité de greffage optimale de sondes à la surface de la biopuce. Si cette densité de greffage est trop faible, il y aura trop peu de sites de liaison pour les enzymes, ce qui entraînera une réponse très faible au cours de la détection. En revanche si cette densité est trop élevée l'accessibilité du site de liaison peut se trouver réduite, empêchant l'interaction avec les enzymes cibles. Il est également primordial de déterminer le débit en tampon de course permettant la bonne détection des α -glucosidases de riz. Tandis qu'un débit trop rapide ne va pas laisser le temps aux enzymes de s'associer aux sondes, un débit trop lent va favoriser leur adsorption non-spécifique sur la surface. Lors d'une première expérience (**Graphique 1**), un seul composé (**DNJ-PEG₅-Pyr**) a été employé. Des solutions de dépôt de 1 μM , 10 μM , et 100 μM de ce composé ont été préparées pour concevoir la puce (**Figure 46**), ce qui correspond à des ratios sondes/pyrrole libre de 1/20 000, 1/2 000, et 1/200. Sur cette première puce, les plots ont été disposés sous forme de triplicas à l'aide du dispositif nommé « polypotter ». Enfin, le débit a été arbitrairement fixé à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, valeur classiquement utilisée dans les expériences de SPRi au laboratoire.

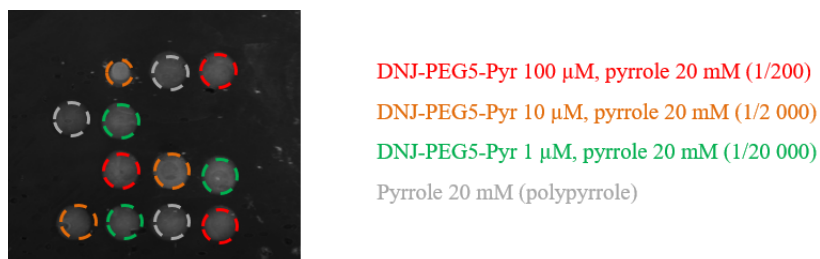
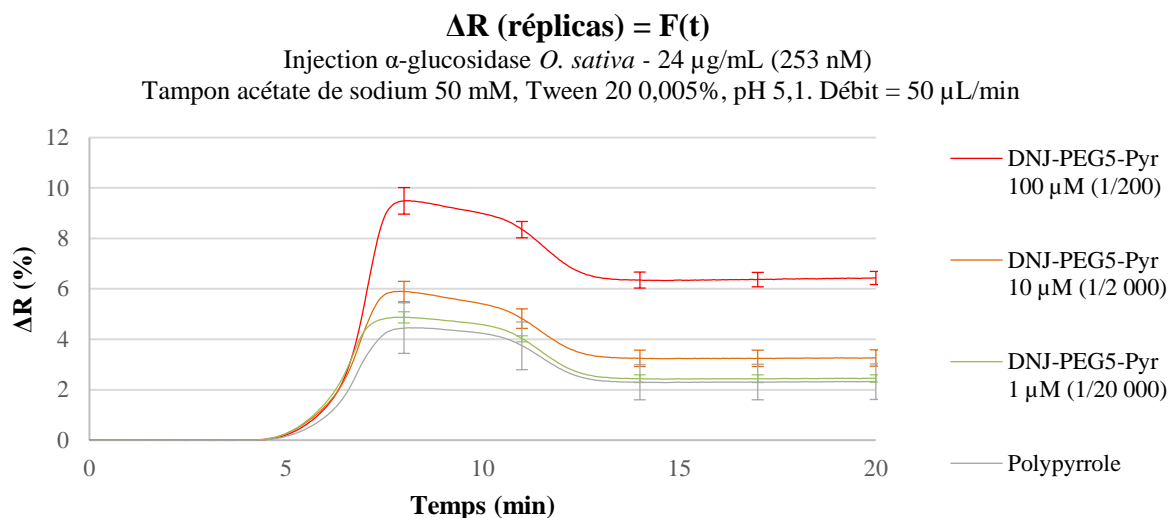
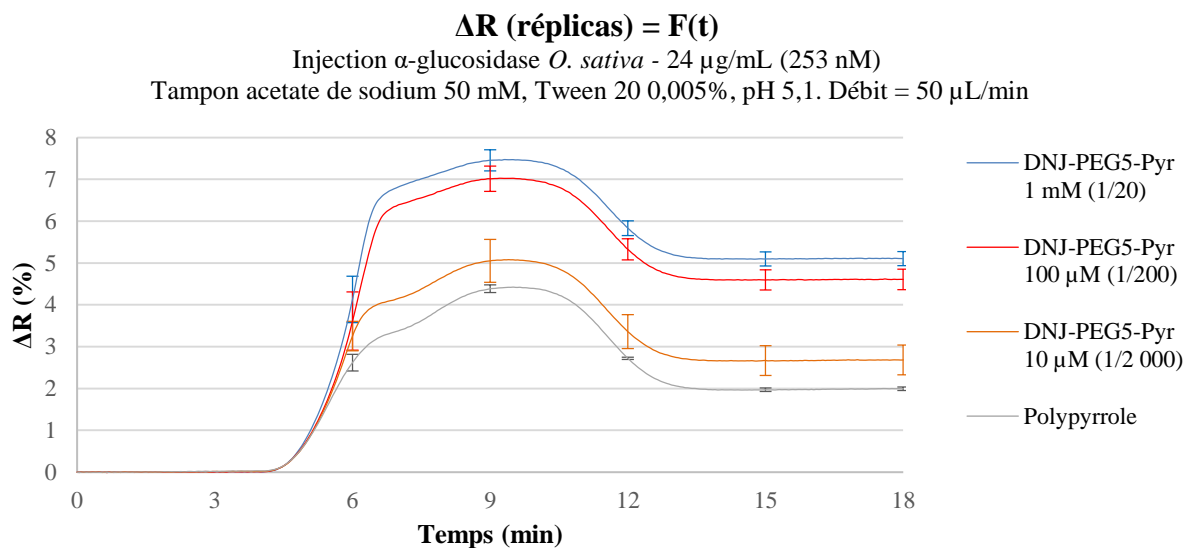


Figure 46 : Détermination des densités de greffage optimales - Fonctionnalisation en triplicas



Graphique 1 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz - Expérience préliminaire : Détermination des densités de greffage optimales (1/200-1/20 000)

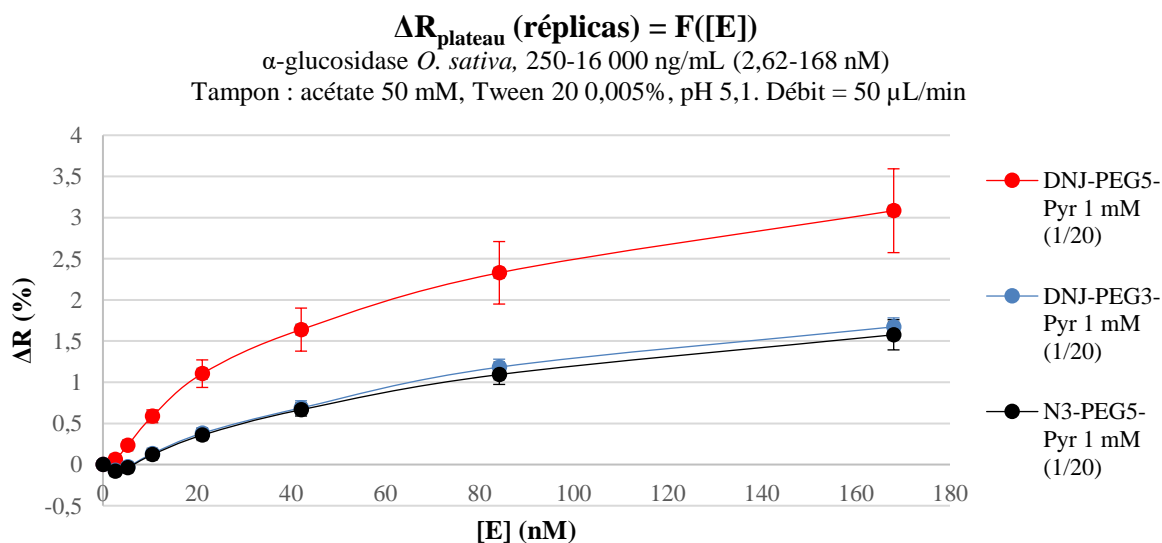
Les résultats de cette expérience montrent que la densité de greffage obtenue à partir de **DNJ-PEG₅-Pyr** à 1 μM est trop faible pour permettre la détection de l' α -glucosidase de riz. La moyenne des trois plots fonctionnalisés avec cette solution reste quasiment confondue avec le signal du polypyrrole, ce qui signifie que la réponse enregistrée sur ces plots correspond exclusivement à des phénomènes d'adsorption non spécifique. À une densité supérieure (**DNJ-PEG₅-Pyr** à 10 μM), l'écart avec la courbe du polypyrrole est plus net, mais les intervalles définis par les barres d'incertitudes restent confondus, il est donc impossible d'affirmer que cette densité de greffage est suffisante pour détecter l' α -glucosidase de riz. C'est seulement avec la densité de greffage la plus importante (**DNJ-PEG₅-Pyr** à 100 μM), que le signal se détache nettement du polypyrrole, ce qui témoigne d'une bonne interaction spécifique. La détection de l' α -glucosidase de riz permet dans ces conditions de valider la valeur de débit fixée à 50 $\mu\text{L/min}$, qui sera réemployée par la suite. Une seconde expérience a été réalisée avec le composé **DNJ-PEG₅-Pyr** afin d'étudier l'effet d'une densité de greffage supérieure (**Graphique 2**, triplicatas pour chaque valeur de concentration). On observe que les résultats sont assez cohérents avec les précédents, un fort écart de ΔR étant toujours observé entre les courbes **DNJ-PEG₅-Pyr** 10 μM et **DNJ-PEG₅-Pyr** 100 μM . En revanche l'écart entre les courbes **DNJ-PEG₅-Pyr** 100 μM et 1 mM est faible, et il ne semble pas pertinent de préparer des solutions de dépôt d'une concentration supérieure à 1 mM puisqu'un plafond semble être atteint. On peut identifier une lacune dans la réalisation de ces deux premières expériences : l'absence de molécule jouant le rôle de contrôle négatif dédié. En effet, les répliques fonctionnalisés par le polypyrrole et les répliques fonctionnalisés par le composé **DNJ-PEG₅-Pyr** peuvent présenter un état de surface et un comportement différent en termes d'adsorption non spécifique. À l'issue de ces expériences préliminaires, le dispositif Omni Grid® Micro a été donc utilisé à la place du polypotter afin d'augmenter le nombre de répliques disposés sur une même puce, et des plots de contrôles seront systématiquement présents dans les expériences suivantes.



Graphique 2 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz - Expérience préliminaire : Détermination des densités de greffage optimales (1/20-1/2 000)

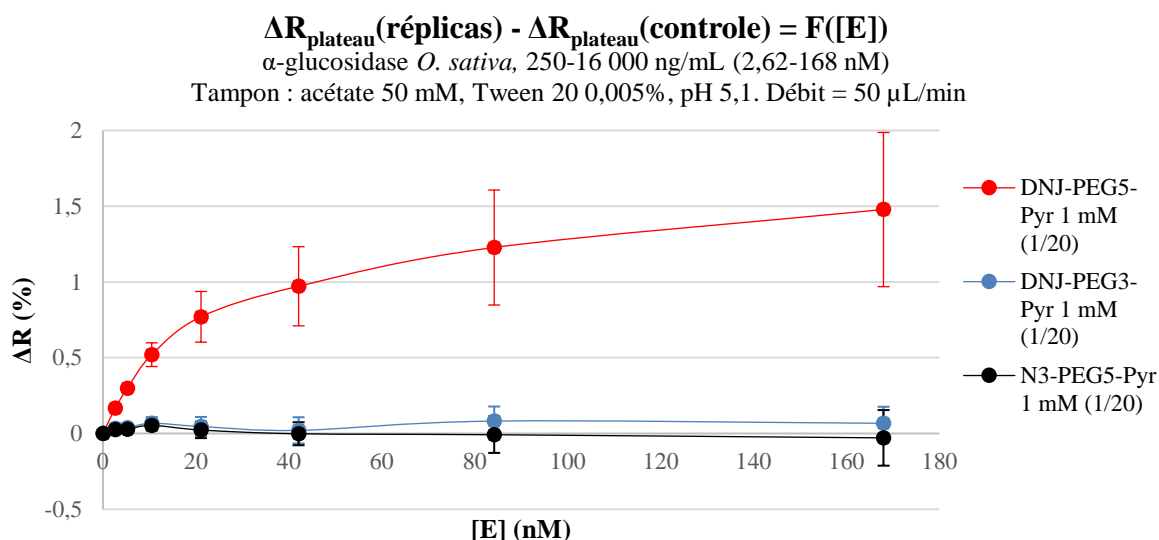
Étude d'interactions - Influence de la longueur du bras espaceur des sondes

La longueur du bras espaceur n'a pas été identifiée comme un paramètre conditionnant l'interaction entre les sondes et l' α -glucosidase de riz au cours des tests d'inhibition en solution. Cependant, après greffage, l'accessibilité du noyau iminosucres pour l' α -glucosidase de riz dépend de ce paramètre. Une puce a donc été fonctionnalisée avec deux composés possédant chacun un bras espaceur de taille différente (**DNJ-PEG₃-Pyr**, **DNJ-PEG₅-Pyr**), et une molécule contrôle **N₃-PEG₅-Pyr**. Chacune de ces espèces a été greffée à partir d'une solution de dépôt à 1 mM (ratio 1/20 avec le pyrrole), 6 répliques étant disposés de façon aléatoire, puis une expérience de type dose-réponse a été réalisée (**Graphique 3**).



Graphique 3 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz - Influence du bras espaceur - Densités de greffage de 1/20 (courbes non normalisées)

La présence d'une réponse positive sur les plots de contrôle négatif permet de mettre en évidence la présence d'un phénomène d'adsorption non spécifique au cours de cette expérience de dose-réponse. Cette contribution non spécifique a donc été soustraite dans le **Graphique 4** représentant les courbes normalisées par rapport au composé **N₃-PEG₅-Pyr**.



Graphique 4 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz – Influence du bras espaceur – Densités de greffage de 1/20 (courbes normalisées)

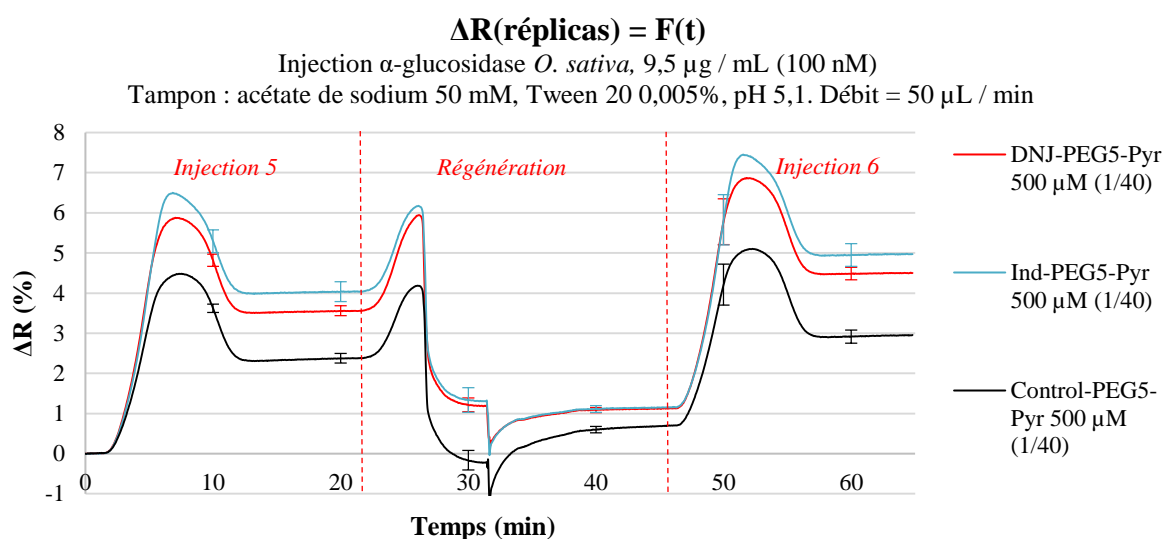
Sur ce second graphique on constate nettement que les composés de type **DNJ-PEG₃-Pyr** n'interagissent pas de façon spécifique avec l' α -glucosidase de riz, à l'inverse des composés de type **DNJ-PEG₅-Pyr**. Ceci indique que le bras espaceur de type PEG₃ est trop court pour permettre l'approche de l'enzyme et son interaction avec le noyau iminosucre.

Pour cette raison, les expériences suivantes impliquant l' α -glucosidase de riz ont été menées exclusivement avec des composés comportant un bras PEG₅. Cette première expérience de dose-réponse nous permet également d'obtenir une première valeur de LOD pour ces biopuces, puisqu'on constate qu'une réponse significative est obtenue dès la première injection (2,6 nM). On peut comparer cette valeur aux résultats rapportés par Sauer *et al.*, lesquels décrivaient des injections de glucoamylase à des concentrations supérieures ou égales à 50 nM.

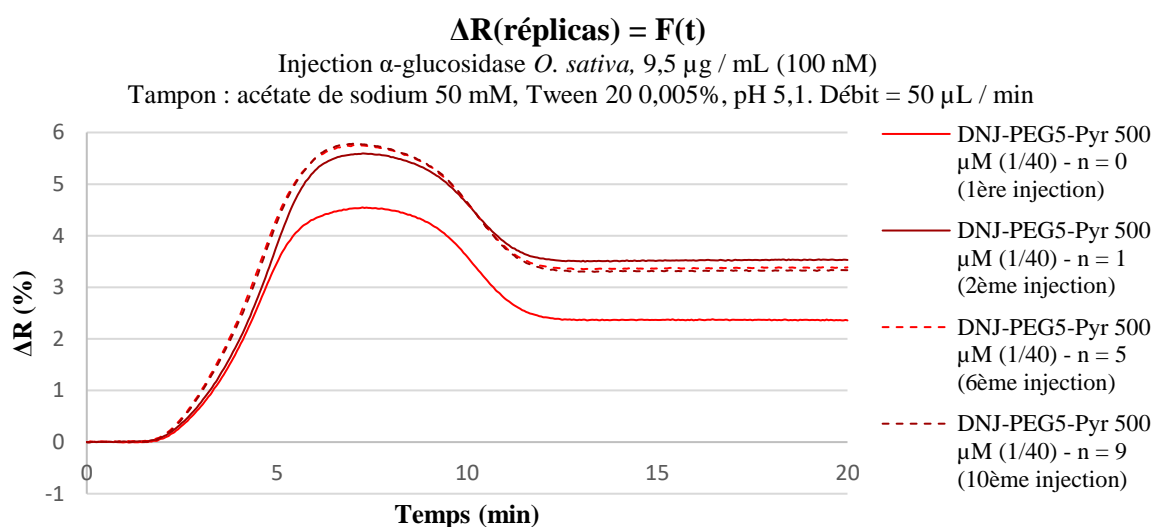
Régénération des puces

Le processus de régénération consiste à retirer les analytes adsorbés sur la biopuce (spécifiquement ou non), afin de pouvoir réutiliser celle-ci. On utilise pour cela un composé chimique permettant de changer la force ionique du milieu, son pH, ou encore la conformation de l'analyte. Cependant le choix du composé chimique doit être pertinent afin de régénérer efficacement la puce sans l'endommager. Nous avons testé plusieurs conditions afin de retirer l' α -glucosidase de riz adsorbée sur la puce à l'issue des expériences de SPRi.

L'utilisation de chlorure de guanidinium (2.0 M et 4.0 M) qui est un agent chaotrope régulièrement employé pour désorber des protéines, a été inefficace, de même que le SDS (0.5% m/v, ou 2% m/v). Le chlorure de sodium à 1.0 et 2.0 M a également été employé, mais la régénération dans ces conditions demeure très incomplète. Une régénération efficace a finalement été obtenue en injectant une solution de NaOH 0.01M à la surface de la puce entre chaque injection d'enzyme. Ce protocole a été validé par une expérience au cours de laquelle dix injections successives d' α -glucosidase de riz à une concentration constante de 100 nM ont été réalisées, chaque injection étant suivie d'une régénération (**Graphique 6**). Le **Graphique 5** montre l'efficacité de cette régénération entre deux injections successives d'enzyme, chaque espèce étant disposée sur la puce sous la forme de 6 réplicats.



Graphique 5 : Injections successives d' α -glucosidase de riz à 100 nM avec régénération intermédiaire (NaOH 0.01M)

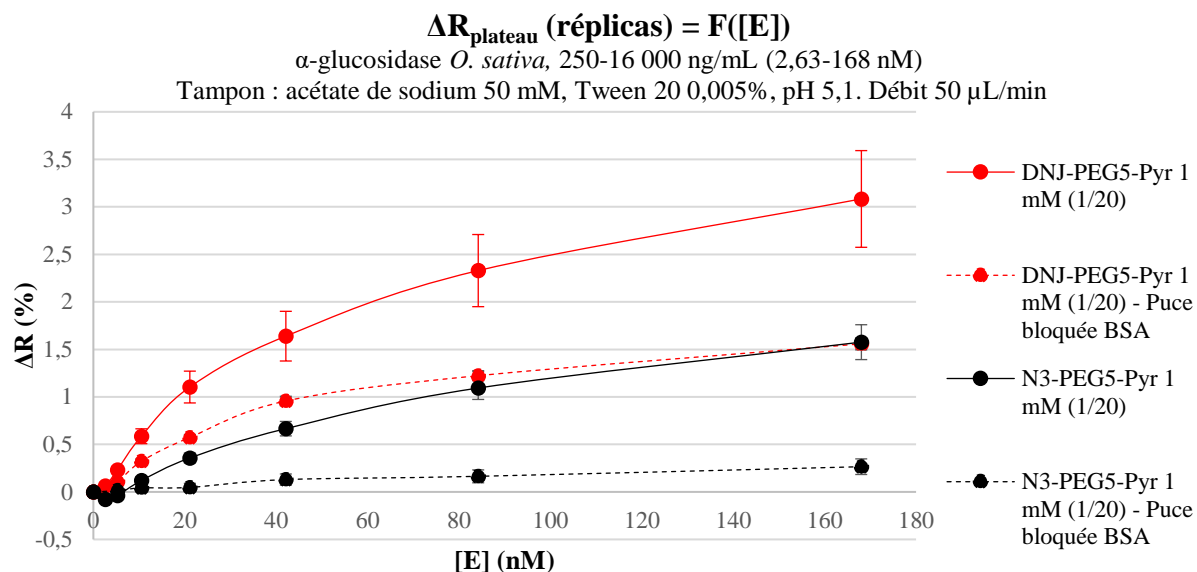


Graphique 6 : Profil cinétique de plusieurs injections d' α -glucosidase de riz à 100 nM après "n" régénérations

Dans le **Graphique 5** la première injection est suivie d'un plateau, puis l'injection de NaOH provoque un saut d'indice, suivi de nombreuses perturbations. Après un certain délai l'indice optique se stabilise à nouveau, à $t = 40$ min, le ΔR étant alors revenu à un niveau proche de sa ligne de base, ce qui signifie que les enzymes adsorbées sur la surface de la puce ont été retirées par l'injection de NaOH. Bien qu'elle soit efficace la régénération n'est pas totale, cependant des sensorgrammes remarquablement similaires ont été obtenus pour les différentes injections réalisées au cours de cette expérience (**Graphique 6**). Seule la toute première injection d'enzyme, pour laquelle aucune régénération n'a été effectuée, diffère des injections suivantes. Ceci montre que la première régénération modifie l'état de surface de la puce, par exemple en retirant des composés adsorbés sur la puce dès le début de l'expérience. Il serait donc pertinent de traiter la puce au NaOH 0.01M en début d'expérience, avant toute injection d'enzyme, afin de s'affranchir de ce changement d'état de la surface de la biopuce.

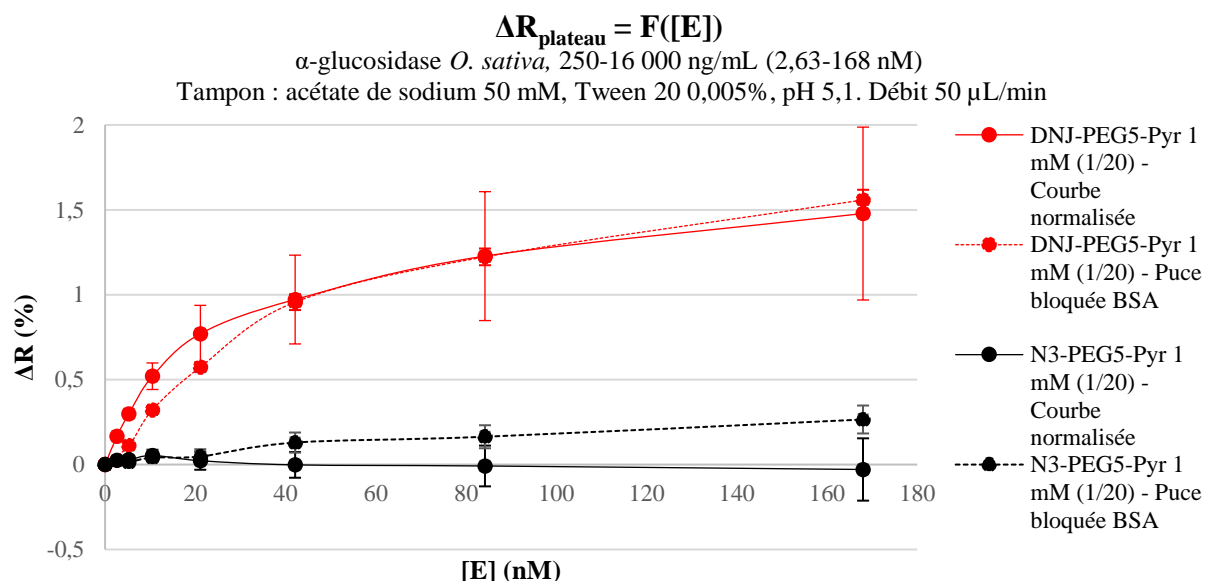
Optimisation des biopuces – Essais de blocage du prisme par la BSA

La présence d'un phénomène d'adsorption non spécifique indésirable a été observée sur les biopuces, notamment dans les premières expériences présentées ci-dessus. Bien que ce phénomène puisse être artificiellement supprimé *via* la normalisation des courbes par les plots de contrôle, il est aussi possible de réaliser un traitement de la surface de la biopuce afin d'atténuer ce phénomène. Une des méthodes les plus simples consiste à provoquer volontairement une forte adsorption non spécifique de protéines sur la puce (on parle de blocage), en début d'expérience et avant toute injection d'enzymes. La protéine adsorbée formant un film sur la surface du prisme, celle-ci est alors moins accessible pour les enzymes en solution. Pour réaliser ce type de blocage, l'albumine de sérum bovin (BSA) est fréquemment utilisée.¹⁹⁶ Le traitement à la BSA n'étant pas toujours suffisant pour éliminer totalement l'adsorption non-spécifique, nous avons réalisé deux expériences afin d'évaluer son effet sur la détection de l' α -glucosidase de riz. Deux expériences de type-dose réponse ont été réalisées avec ou sans traitement par la BSA, en conditions identiques par ailleurs (6 répliques, solutions de dépôts à 1 mM de **DNJ-PEG₅-Pyr** et du contrôle **N₃-PEG₅-Pyr**). Le traitement à la BSA consiste à injecter une solution concentrée à 10 mg / mL de BSA en début d'expérience pendant 10 minutes. Les résultats de ces expériences ont été représentés sur le **Graphique 7** ci-dessous. On remarque que les plots de contrôle négatif délivrent une réponse élevée en l'absence de traitement par la BSA. En revanche, lorsque la puce a été traitée cette réponse (non-spécifique) devient quasiment inexistante. On remarque également que les barres d'incertitude sont beaucoup plus faibles dans l'expérience avec BSA, ce qui témoigne d'une réponse plus homogène des répliques.



Graphique 7 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz – Essais de blocage à la BSA – Densités de greffage de 1/20 (courbes non normalisées)

Il y a donc deux façons de révéler l'interaction spécifique de **DNJ-PEG₅-Pyr** avec l' α -glucosidase de riz : soit en traitant la puce à la BSA afin d'empêcher l'adsorption non-spécifique, soit en quantifiant le phénomène sur des plots de contrôle afin de soustraire cette contribution par normalisation du signal. Ces deux méthodes sont comparées dans le **Graphique 8**, où les courbes non normalisées de l'expérience avec BSA sont comparées aux courbes normalisées de l'expérience sans BSA. On constate que les deux courbes sont remarquablement similaires, ce qui confirme la pertinence d'utiliser les plots de **N₃-PEG₅-Pyr** en tant que plots de contrôle. Malgré une sensibilité légèrement plus faible après le traitement à la BSA, la LOD demeure quasiment inchangée (5-10 nM).



Graphique 8 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz – Essais de blocage à la BSA – Densités de greffage de 1/20

L'utilisation de BSA est donc bénéfique, permettant principalement d'homogénéiser les réponses fournies par les réplicas. Cependant cette protéine peut être affectée par la régénération, et dans les expériences avec des enzymes commerciales elle n'est pas indispensable pour éliminer le phénomène d'adsorption non-spécifique, puisque celui-ci peut être retiré grâce aux plots de contrôle (*Graphique 8*). Pour cette raison, nous n'avons pas développé un nouveau protocole de régénération compatible avec la présence de BSA. Cependant son utilisation pourrait s'avérer bénéfique lors de futures études d'interactions dans des milieux complexes tels que des lysats cellulaires.

IV.3. Détermination des constantes de dissociation apparentes des iminosucres avec l' α -glucosidase de riz

La constante de dissociation à l'équilibre, plus connue sous le terme de K_D , est une grandeur thermodynamique caractérisant l'affinité entre un ligand L et un récepteur R, en solution et à l'équilibre (*Figure 47*). On constate dans l'équation 5 que la constante K_D est homogène à une concentration, et s'exprime en mol/L. En effet, le K_D exprime la concentration (en ligand ou en récepteur) pour laquelle la moitié de l'espèce complémentaire sera alors sous forme complexée. De plus, on remarque que cette valeur varie de façon inverse à l'affinité : plus l'affinité entre L et R est forte, plus k_{off} est petite (tandis que k_{on} est importante), et donc plus la valeur du K_D est faible.

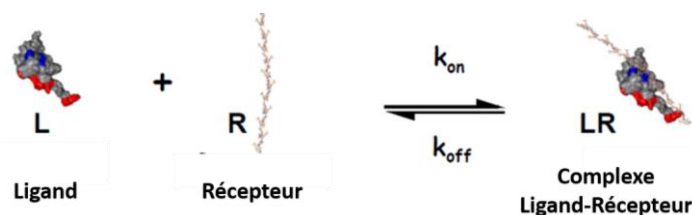


Figure 47 : Interaction ligand-récepteur à l'équilibre thermodynamique

$$K_D = \frac{[L] * [R]}{[LR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (\text{Équation 5})$$

Dans le cas des expériences de SPRi menées dans ce travail, le récepteur est greffé sur une surface tandis que seule l'enzyme se trouve en solution. Dans le cas de ce système, on ne parle alors plus de K_D pour décrire l'équilibre thermodynamique, mais de K_D apparent (K_{Dapp}) afin de tenir compte des potentiels effets de surface.

Le modèle de Langmuir

Le modèle de Langmuir a été nommé d'après Irving Langmuir, qui l'a développé en 1916.²²⁷ Ce modèle permet d'étudier l'interaction entre un analyte en solution et une surface solide, sous certaines conditions. On considère tout d'abord que les molécules adsorbées occupent des sites spécifiques sur la surface, et que la complète occupation de ces sites par l'analyte mène à la saturation de cette surface. Ces sites doivent être de nature homogène, et une seule molécule d'analyte peut s'y adsorber.

²²⁷ Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, 38, 2221–2295.

Enfin aucune interaction ne doit exister entre les molécules d'analytes adsorbées sur surface, celles-ci n'interagissant qu'avec leur site de liaison, qui est unique.²²⁸ Ces prérequis constituent un cas idéal : en effet, on ne peut pas imaginer de surface pour laquelle les sondes sont toutes parfaitement homogènes, et pour lesquelles l'adsorption d'une molécule ne s'accompagnerait d'aucune interaction secondaire avec d'autres molécules d'analyte au voisinage. Cependant, dans le cas de nos expériences de SPRi, on peut considérer se trouver dans le champ d'application du modèle de Langmuir : en effet sur chaque réplica on retrouve des sondes de même nature, représentant chacune un site de liaison unique pour les enzymes en solution. Il est en revanche impossible d'affirmer que les sondes sont parfaitement identiques, puisque leur orientation dans le copolymère peut différer. Il n'est pas non plus possible d'affirmer que les protéines associées aux sondes n'interagissent pas entre elles ou avec d'autres éléments de leur environnement (de façon non spécifique). Cependant, si on fait l'hypothèse que ces phénomènes sont négligeables à côté de l'interaction enzyme-sonde et que l'on considère se trouver dans le champ d'application du modèle de Langmuir, on peut alors définir l'équation cinétique (équation 6) caractérisant l'évolution du taux d'occupation des sites spécifiques φ , (compris entre 0 et 1) en fonction du temps.²²⁹ Dans cette expression, on constate que le taux d'occupation est corrélé d'une part à la probabilité qu'une nouvelle enzyme ne vienne se fixer (en relation avec le k_{on} et la concentration en enzyme) sur la proportion de récepteurs libres ($1 - \varphi$), et d'autre part à la probabilité qu'une enzyme fixée ne se détache de son récepteur (en relation avec le taux de sites occupés φ et le k_{off}).

$$\frac{d\varphi}{dt} = k_{on} * [E] * (1 - \varphi) - k_{off} * \varphi \quad (\text{Équation 6})$$

À l'équilibre le taux d'occupation des sites est constant, ce qui permet d'écrire les équations suivantes :

$$k_{on} * [E] * (1 - \varphi_{eq}) = k_{off} * \varphi_{eq} \quad (\text{Équation 7})$$

$$\frac{1}{K_{Dapp}} * [E] * (1 - \varphi_{eq}) = \varphi_{eq} \quad (\text{Équation 8})$$

$$[E] - [E] * \varphi_{eq} = K_{Dapp} * \varphi_{eq} \quad (\text{Équation 9})$$

$$\varphi_{eq} = \frac{[E]}{K_{Dapp} + [E]} \quad (\text{Équation 10})$$

En SPRi la variation de réflectivité ΔR est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme adsorbée à la surface, et on peut donc exprimer la valeur de ΔR en fonction du taux d'occupation des sites de liaison de cette surface. Pour une injection d'enzyme de concentration infinie, la saturation complète des sites disponibles se caractérisera par un plateau d'intensité maximale ΔR_{max} .

²²⁸ O. Sahu, N. Singh. *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile*. Elsevier, **2019**.

²²⁹ Fiche, J. B.; Buhot, A.; Calemczuk, R.; Livache, T. *Biophys. J.* **2007**, 92, 935–946.

Dans tout autre cas, on peut exprimer la fraction de sites occupés suite à une injection par le rapport entre le ΔR_{eq} observé pour cette injection et le ΔR_{max} , de telle manière que :

$$\varphi_{eq} = \frac{\Delta R_{eq}}{\Delta R_{max}} = \frac{[E]}{K_{Dapp} + [E]} \quad (\text{Équation 11})$$

$$\Delta R_{eq} = \Delta R_{max} * \frac{[E]}{K_{Dapp} + [E]} \quad (\text{Équation 12})$$

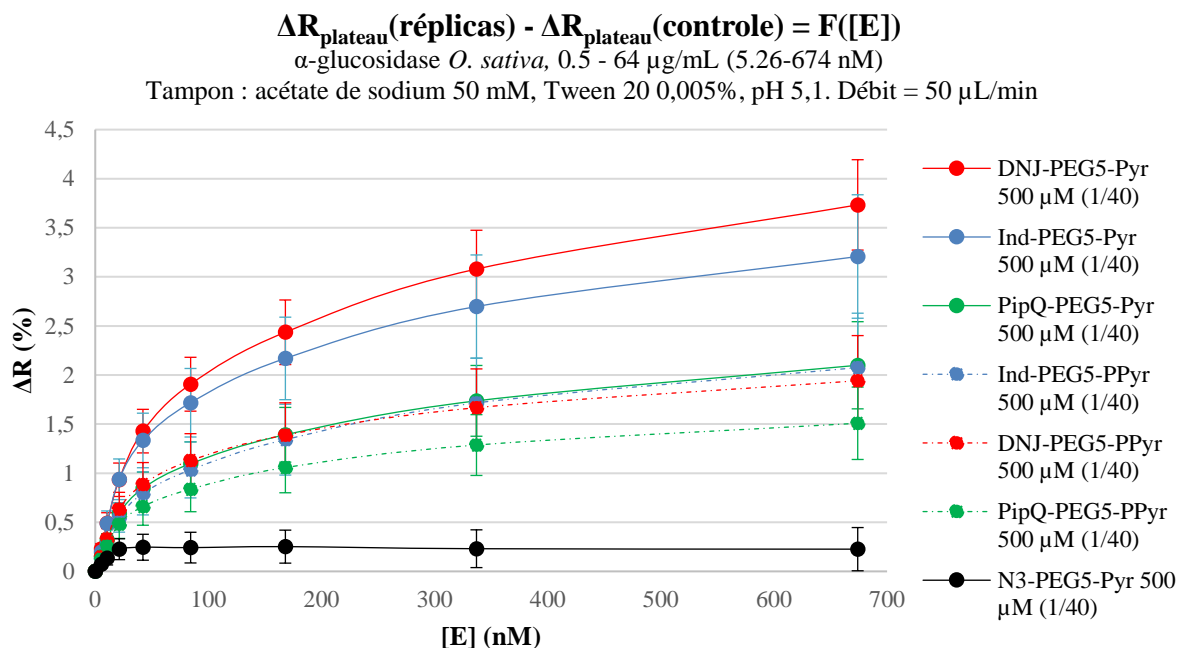
Ainsi, on peut déterminer le K_{Dapp} par SPRi en traçant l'évolution $\Delta R = F([E])$, selon le mode de représentation privilégié jusqu'ici pour les expériences de type dose-réponse. Cependant, la détermination du K_{Dapp} par cette méthode est difficile, puisqu'il est nécessaire de déterminer la concentration en enzyme pour laquelle $\Delta R = \Delta R_{max} / 2$ (or ΔR_{max} représente une valeur qui ne peut être déterminée directement). D'ordinaire on transforme donc l'équation 12 ci-dessus afin de linéariser le modèle de Langmuir (équation 13). On peut ainsi représenter la valeur de $\Delta R/[E]$ en fonction du ΔR , nommée représentation de Scatchard,²³⁰ qui permet d'accéder aux paramètres ΔR_{max} et K_{Dapp} par régression linéaire.

$$\frac{\Delta R}{[E]} = -\frac{1}{K_{Dapp}} * \Delta R + \frac{\Delta R_{max}}{K_{Dapp}} \quad (\text{Équation 13})$$

²³⁰ Scatchard, G. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1949**, 51, 660–672.

Détermination des K_{Dapp}

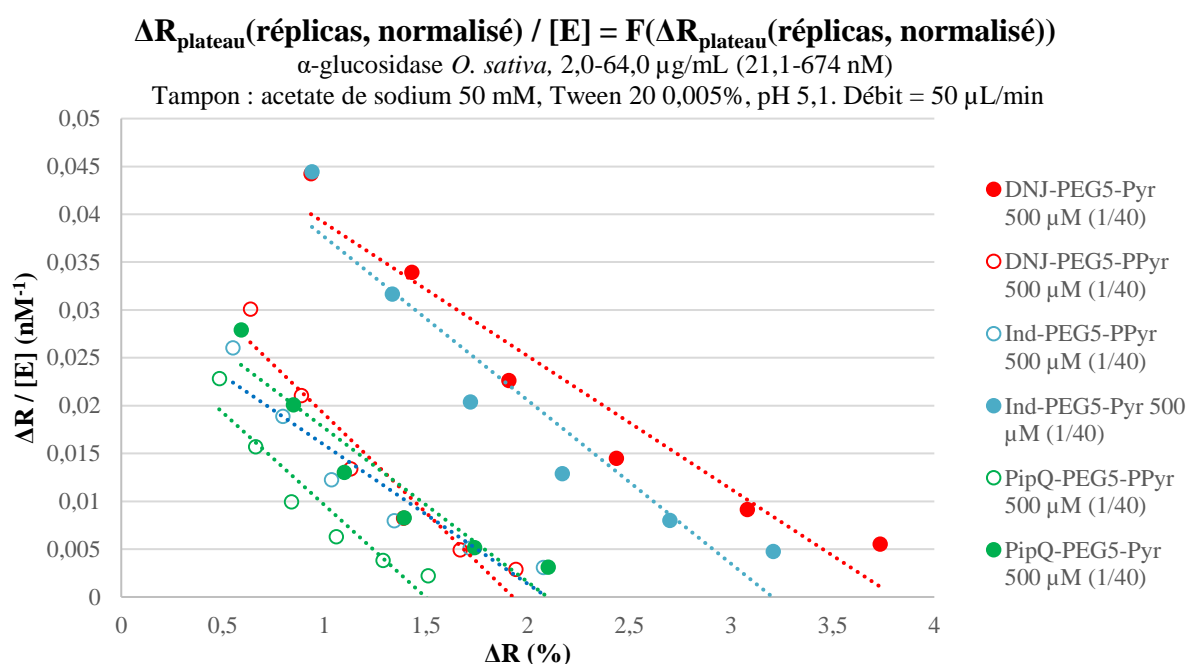
Une expérience dose-réponse a été réalisée en utilisant exclusivement les sondes comportant un espaceur de type PEG₅, et un contrôle adéquat. Chacune de ces sondes a été greffée sous la forme de 6 répliquas à partir d'une solution de dépôt à 500 μM . Les résultats de cette expérience sont représentés dans le graphique ci-dessous (les courbes ont été normalisées par un plot de contrôle N₃-PEG₅-Pyr).



Graphique 9 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz - Détermination des K_{Dapp} – Expérience de type dose réponse ($\Delta R = f([E])$, courbes normalisées)

En étudiant les données de cette expérience de dose réponse, on constate que les valeurs des plateaux associées aux sondes comportant un noyau PPyr (courbes représentées en pointillés) sont systématiquement plus faibles que celles de leur équivalent comportant un noyau Pyr (courbes pleines). La valeur du plateau étant corrélée à la quantité d'enzyme adsorbée à la surface des plots correspondants, ceci semble indiquer que les densités de sites spécifiques accessibles pour l' α -glucosidase de riz sont supérieures avec les composés comportant un noyau Pyr à celles obtenues pour les composés comportant un noyau PPyr (malgré des concentrations identiques dans les solutions de dépôt). L'une des hypothèses permettant d'expliquer cette observation repose sur une vitesse de polymérisation différente de la sonde en fonction de la nature du fragment comportant le noyau pyrrole (Pyr ou PPyr). Ceci mènerait alors à une moins bonne inclusion des sondes de type PPyr dans le copolymère, ce qui expliquerait une densité de greffage plus faible dans les plots fonctionnalisés par ces composés. Une caractérisation de la surface des plots par spectrométrie photo-électronique (XPS pour X-ray Photoelectron Spectroscopy) permettrait d'accréditer ou d'invalider cette hypothèse. Ce type d'expérience n'a pas été réalisé à ce jour.

L'analyse des données numériques de cette expérience montre qu'au deux valeurs d'injections les plus faibles (5.26 et 10.5 nM), les valeurs moyennes de ΔR (obtenues chacune à partir de 6 réplicas) de **DNJ-PEG₅-PPyr** et **PipQ-PEG₅-PPyr** sont caractérisées par un écart-type important, et un important ratio signal/bruit est associé à ces valeurs de ΔR qui ne sont donc pas significatives. Ces deux valeurs ont donc été retirées lors du tracé de Scatchard, pour l'ensemble des composés, afin de déterminer un K_{Dapp} avec le même nombre de points pour toutes les sondes (**Graphique 10**). Pour chacune des séries de données représentées ci-dessus, une régression linéaire a été réalisée et le coefficient directeur de la droite associée ainsi que le coefficient de linéarité ont été déterminés (**Tableau 10**).



Graphique 10 : Étude d'interaction avec l' α -glucosidase de riz – Détermination des K_{Dapp} – Expérience de type dose réponse (méthode de Scatchard)

Composé	DNJ-PEG ₅ -Pyr	DNJ-PEG ₅ -PPyr	Ind-PEG ₅ -Pyr	Ind-PEG ₅ -PPyr	PipQ-PEG ₅ -Pyr	PipQ-PEG ₅ -PPyr
<i>Méthode 1 - Représentation de Scatchard</i>						
$-1/K_{Dapp}$	-0,0139	-0,0206	-0,0171	-0,0145	-0,0161	-0,0193
ΔR_{max}	3.81	1.93	3.20	2.10	2.09	1.50
Coefficient de linéarité	0,9100	0,9331	0,9063	0,927	0,9049	0,8980
K_{Dapp} (nM)	71,9	48,5	58,5	69,0	62,1	51,8
<i>Méthode 2 - Représentation de type 1/ $\Delta R_{eq} = F(1/[E])$</i>						
$K_{Dapp} / \Delta R_{\text{max}}$	16,9	22,3	15,8	28,1	25,6	29,7
ΔR_{max}	3,49	1,79	2,91	1,86	1,89	1,36
Coefficient de linéarité	0,9901	0,9814	0,9791	0,9782	0,9799	0,9729
K_{Dapp}	58,9	39,9	46,0	52,2	48,3	40,5
<i>Comparaison méthodes</i>						
K_{Dapp} (Méthode 1) / K_{Dapp} (Méthode 2)	1,22	1,22	1,27	1,32	1,29	1,28

Tableau 10 - Détermination des K_{Dapp} – Résultats

On remarque visuellement sur le **Graphique 10** que les séries de données représentées ne constituent pas des droites, alors qu'il s'agit normalement d'une condition que devrait vérifier cette projection. Ceci est mis en évidence par la superposition des droites de régression linéaire sur ce même graphique, et également confirmé par le calcul des coefficients de linéarité associés à ces droites de régression, lesquels sont tous inférieurs à 0.95 (**Tableau 10**). Les valeurs de K_{Dapp} étant déterminées *via* les droites de régression, on fait donc ici une approximation en considérant que ces droites représentent la réalité de l'expérience de dose-réponse. Afin de limiter cette approximation, une autre méthode permettant de linéariser le modèle de Langmuir a été adoptée à partir de l'équation 12, afin d'accéder à la valeur de K_{Dapp} .

$$\Delta R_{eq} = \Delta R_{max} * \frac{[E]}{K_{Dapp} + [E]} \quad (\text{Équation 12, rappel})$$

À partir de cette équation, on peut écrire l'équation 15 qui permet alors de déterminer le K_{Dapp} en traçant $1/\Delta R_{eq}$ en fonction de $1/[E]$.

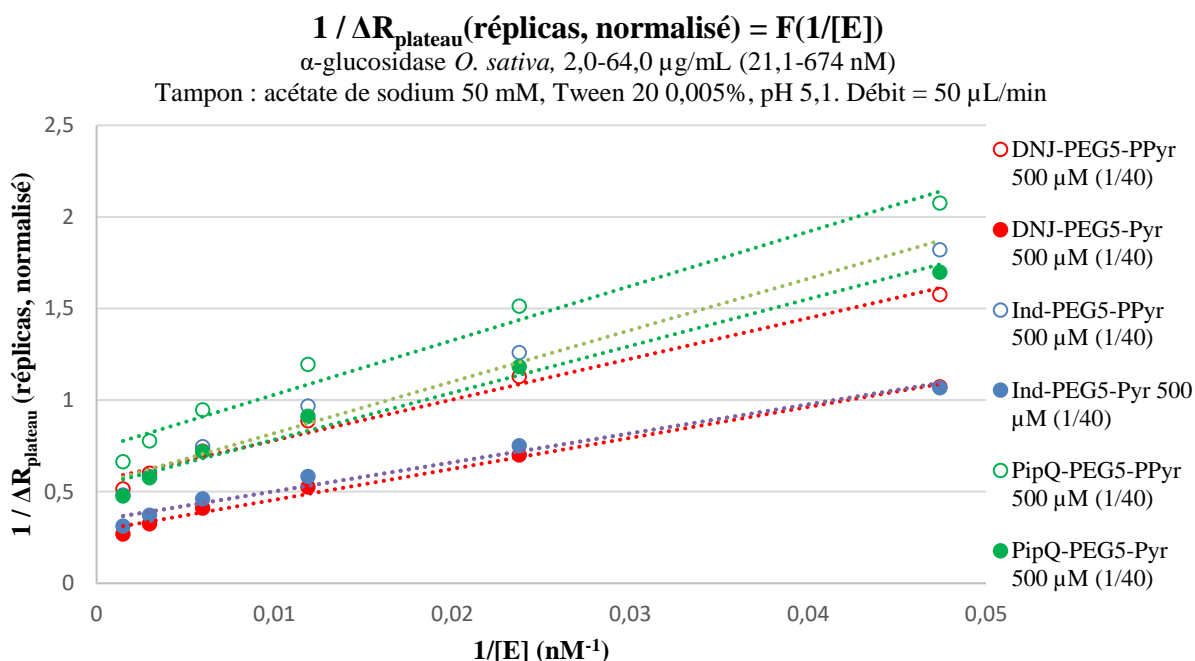
$$\frac{1}{\Delta R_{eq}} = \frac{K_{Dapp} + [E]}{\Delta R_{max} * [E]} \quad (\text{Équation 14})$$

$$\frac{1}{\Delta R_{eq}} = \frac{K_{Dapp}}{\Delta R_{max}} * \frac{1}{[E]} + \frac{1}{\Delta R_{max}} \quad (\text{Équation 15})$$

On peut identifier un inconvénient de cette méthode par rapport à la méthode de Scatchard : la pente ne correspond pas directement au K_{Dapp} mais intègre également le ΔR_{max} . En revanche on détermine le K_{Dapp} en ne projetant le paramètre mesuré (ΔR_{eq}) que sur un seul axe tandis qu'il est projeté sur l'axe des abscisses et des ordonnées dans la méthode de Scatchard. La représentation graphique des résultats de l'expérience selon cette seconde méthode est disponible ci-dessous (Graphique 11). Comme le montrent les résultats numériques (**Tableau 10**) les coefficients de linéarité des droites de régression linéaire obtenus par ce second tracé sont supérieurs à ceux délivrés par la méthode de Scatchard.

Si on observe les valeurs de ΔR_{max} obtenues (quelle que soit la méthode), celles-ci corroborent l'hypothèse réalisée à partir du Graphique 9 : les composés se terminant par un noyau Pyr possèdent systématiquement un ΔR_{max} supérieur à celui obtenu pour les composés PPyr. Ceci confirme donc que le nombre de récepteurs susceptibles d'interagir avec l' α -glucosidase de riz est différent à la surface des plots, malgré une égale proportion des sondes avec le pyrrole libre dans les solutions de dépôt. On peut également s'intéresser aux valeurs de K_{Dapp} , et constater de fortes similitudes entre les résultats fournis par les deux méthodes. Par exemple, le composé **DNJ-PEG₅-PPyr** possède le K_{Dapp} le plus faible quelle que soit la méthode de détermination, puis il est suivi par le composé **PipQ-PEG₅-PPyr**, etc. Ainsi une incertitude subsiste sur la valeur des K_{Dapp} , mais la convergence des deux méthodes suggère qu'elles représentent convenablement les affinités relatives des différents composés pour l' α -glucosidase de riz.

Cette convergence est d'ailleurs également vérifiée pour les valeurs de ΔR_{\max} , seuls les composés **Ind-PEG₅-PPyr** et **PipQ-PEG₅-Pyr** (aux valeurs très similaires) sont inversés entre les deux méthodes.



Graphique 11 : Détermination des K_{Dapp} – Expérience de type dose réponse (représentation $1/\Delta R = F(1/[E])$)

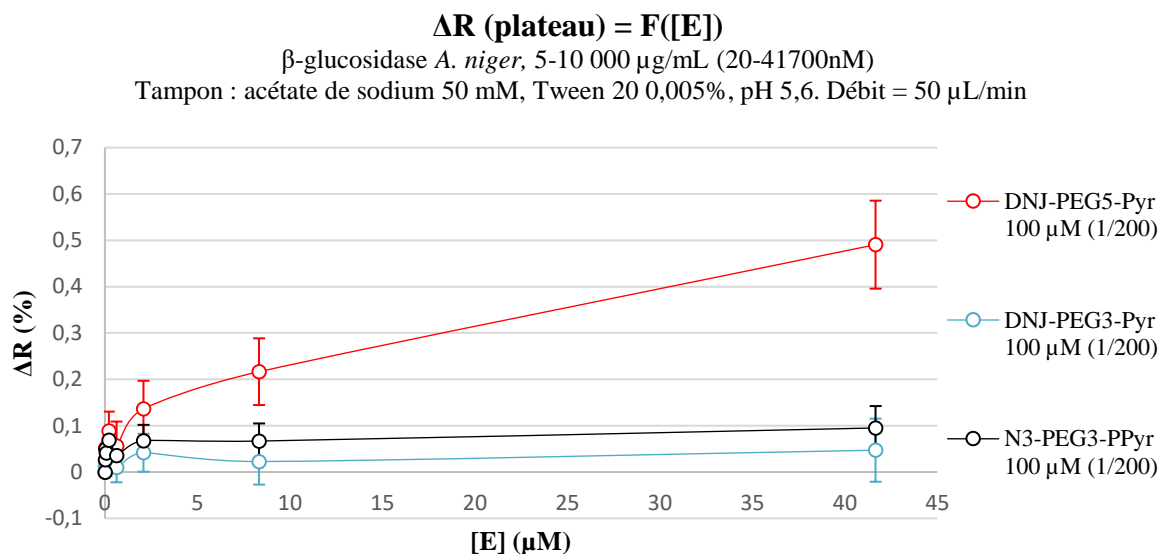
À ce stade, les valeurs de K_{Dapp} (comprises entre 40 et 75 nM) n'ont pas pu être comparées aux valeurs de K_D en solution, celles-ci n'ayant pas été déterminées lors des tests d'inhibition (seuls les IC_{50} ont été déterminés). La détermination de certaines valeurs de K_D est actuellement en cours.

IV.4. Étude d'interactions avec la β -glucosidase d'*Aspergillus niger*

Après avoir utilisé avec succès les différentes sondes synthétisées pour détecter l' α -glucosidase de riz en solution, les biopuces confectionnées ont été utilisées pour réaliser des études d'interaction avec la β -glucosidase d'*A. niger*. Au cours des expériences avec l' α -glucosidase de riz, des concentrations optimales de sondes dans les solutions de dépôt avaient été déterminées, et des concentrations similaires ont été employées pour les expériences avec la β -glucosidase d'*A. niger*.

Étude d'interactions – Influence de la longueur du bras espaceur des sondes

Les expériences menées avec l' α -glucosidase de riz ont montré que la longueur du bras espaceur pouvait être déterminante pour l'association entre les sondes greffées sur surface et l'enzyme en solution. Une expérience de dose-réponse a donc été menée afin d'évaluer l'impact de ce paramètre au cours de l'interaction avec la β -glucosidase d'*A. niger* (**Graphique 12**), 6 réplicas ayant été déposés sur la puce pour chaque espèce.

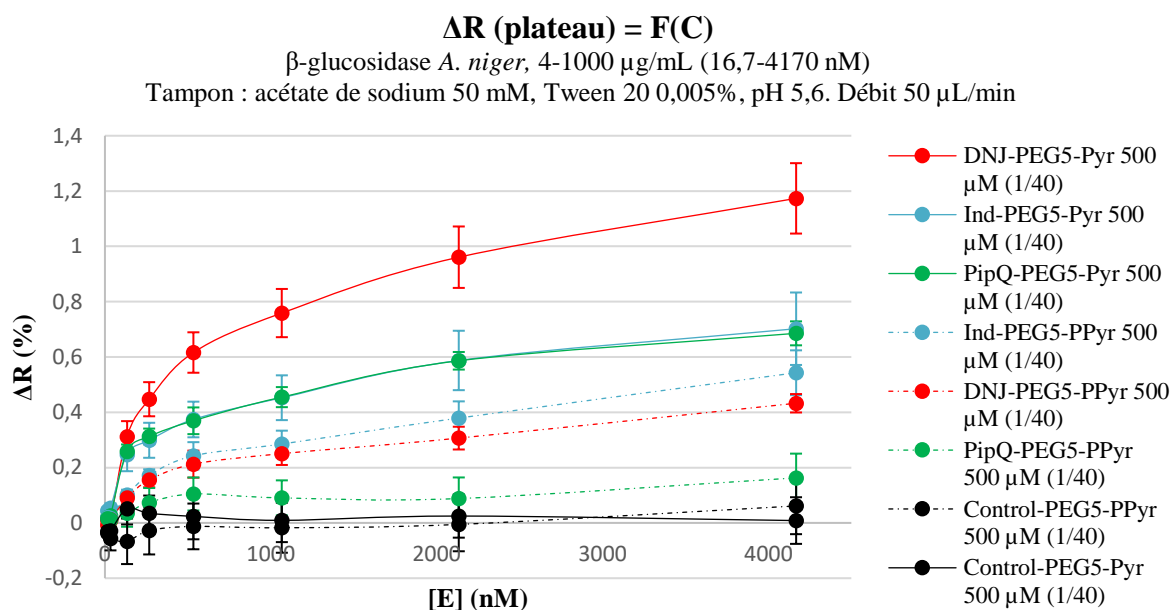


Graphique 12 : Étude d'interaction avec la β -glucosidase d'*A. niger* – Influence du bras espaceur – Densités de greffage de 1/200 (courbes normalisées)

On ne constate aucune interaction spécifique avec la β -glucosidase d'*A. niger* pour le composé de type **DNJ-PEG₃-Pyr**, pour lequel la réponse observée reste similaire à celle du contrôle **N₃-PEG₃-PPyr**. En revanche le composé **DNJ-PEG₅-Pyr** fournit une réponse positive, ce qui suggère fortement que le bras espaceur PEG₃ est également trop court pour permettre l'interaction du noyau iminosucre avec le site catalytique de la β -glucosidase d'*A. niger*. Il n'a pas été possible de déterminer la LOD pour la β -glucosidase d'*A. niger* au cours de cette expérience, car les valeurs de ΔR obtenues pour des concentrations en enzymes inférieures à 625 nM, bien que positives, se sont avérées non significatives à cause d'un fort ratio signal/bruit. Enfin, l'utilisation d'un composé de type PPyr en tant que molécule contrôle vis-à-vis de sondes de type Pyr constitue un choix discutable pour cette expérience, puisque nous avons démontré précédemment que les noyaux Pyr et PPyr induisaient un comportement différent. L'influence de la nature du fragment comportant le noyau pyrrole n'était pas connue lors de la réalisation de cette expérience, et l'utilisation d'un second contrôle négatif comportant un fragment Pyr aurait été préférable ici.

Essai de détermination des K_D apparents

De façon analogue aux travaux menés avec l' α -glucosidase de riz, une expérience de dose-réponse conduite avec l'intégralité des composés comportant un bras de type PEG₅ a été réalisée, afin de déterminer les K_{Dapp} et de déterminer la LOD de la méthode de détection pour la β -glucosidase d'*A. niger*. Cette expérience a été menée sur une puce fonctionnalisée avec des ensembles de 6 répliques. Dans les résultats exposés dans le **Graphique 13**, la contribution non spécifique a été retirée par soustraction de la réponse d'un plot de contrôle.



Graphique 13 : Étude d'interaction avec la β -glucosidase d'*A. niger* - Détermination des K_{Dapp} – Expérience de type dose réponse ($\Delta R = f([E])$) – Courbes normalisées

De façon surprenante, il a été constaté que l'ensemble des plots délivraient une réponse positive lors de l'injection de la β -glucosidase d'*A. niger*. Ce constat était difficile à expliquer en se basant sur les résultats des tests d'inhibition réalisés en solution, puisque que seuls les composés comportant un noyau **DNJ** se sont révélés inhibiteurs de cette enzyme (le composé **PipQ-PEG₅-Pyr** possède un IC_{50} presque 100 fois supérieur à celui des composés **DNJ-PEG₅-Pyr** et **DNJ-PEG₅-PPyr**). Nous avons alors remarqué que l'échantillon de β -glucosidase d'*A. niger* fourni par Sigma-Aldrich comportait une mention précisant que l'échantillon pouvait contenir des α -glucosidases. Cependant, ni la nature, ni la quantité des potentielles α -glucosidases n'est indiquée dans le certificat d'analyse fourni par Sigma-Aldrich. Il n'est donc pas possible d'en déduire la concentration de ces enzymes dans les échantillons injectés au cours de l'expérience de dose-réponse.

Afin d'obtenir de premiers éléments de réponse, les activités enzymatiques des α -glucosidases et des β -glucosidases contenues dans l'échantillon ont été évaluées selon la méthode décrite dans la sous-partie II.1, en employant le *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside et le *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside. Ce test, réalisé à un pH de 5,6 (correspondant au pH optimum de la β -glucosidase d'*A. niger*), nous a permis d'évaluer une activité enzymatique 26 fois inférieure pour les α -glucosidases par rapport aux β -glucosidases dans l'échantillon utilisé lors de l'expérience de dose-réponse ci-dessus. La présence d'une activité α -glucosidase, bien que faible, dans l'échantillon de β -glucosidase d'*A. niger* injecté en SPRi a donc été validée. Néanmoins, les concentrations relatives d' α - et de β -glucosidases dans cet échantillon demeurent indéterminées, d'autant plus que les propriétés catalytiques (et notamment le pH optimal) des α -glucosidases potentiellement présentes sont inconnues.

Afin de compléter ces investigations, il serait donc nécessaire d'analyser l'échantillon enzymatique employé pour ces expériences par différentes techniques (SDS-PAGE, chromatographie), afin de déterminer la nature et les proportions des différentes enzymes. De telles expériences n'ont pas pu être menées pour des raisons de temps, de manque de matériel approprié, et d'expertise. Les résultats de l'expérience de dose-réponse ci-dessus demeurent donc inexploitable et cette expérience ne constitue pas à ce stade un élément suffisant pour valider, ou invalider, la sélectivité des sondes de **type 2** et de **type 3** démontrée par les tests colorimétriques en solution.

V. Résumé du chapitre

Tout d'abord, des tests d'inhibition colorimétriques en solution menés sur cinq glycosidases commerciales ont permis de valider les propriétés inhibitrices de glycosidases des composés synthétisés comme sondes potentielles au cours de ce travail. La sélectivité des sondes de **type 2** et de **type 3** pour les α -glucosidases a pu être vérifiée, tandis que les sondes de **type 1** ont montré une affinité pour plusieurs types de glycosidases. Sur la base de ces tests, deux enzymes ont été sélectionnées pour réaliser de premières études d'interactions par SPRi : l' α -glucosidase de riz et la β -glucosidase d'*A. niger*

Les différents composés testés ont ensuite été greffés sur des prismes d'or par la méthode d'electrospotting développée par l'équipe CREAB. En utilisant un dispositif automatisé, des biopuces multiplexées comportant jusqu'à 60 plots ont ainsi été obtenues.

Dans des premières expériences de SPRi avec l' α -glucosidase de riz comme analyte, nous avons démontré que le bras espaceur de type PEG₃ était de taille insuffisante pour permettre l'interaction spécifique des sondes greffées sur les biopuces avec cette enzyme en solution. Par la suite, un protocole de régénération des biopuces a été établi, permettant de conserver une même réponse au cours d'une dizaine d'injections successives d' α -glucosidase. Enfin, le blocage des puces à la BSA a été réalisé afin de réduire le phénomène d'adsorption non spécifique. La BSA a fourni des résultats encourageants permettant d'envisager une utilisation de ces puces pour la détection d'enzymes en milieux complexes, même si la compatibilité des biopuces traitées à la BSA avec les conditions de régénération établies précédemment n'a pas été évaluée à ce jour.

En appliquant le modèle de Langmuir à une expérience de dose-réponse, il a été possible de déterminer les constantes de dissociation apparentes et les valeurs de ΔR_{\max} associées à chaque composé pour l' α -glucosidase de riz. Si les composés greffés montrent une affinité similaire pour cette enzyme, les résultats suggèrent que la nature chimique du fragment comportant le noyau pyrrole influence la densité de sondes dans le copolymère formé au cours de l'electrospotting.

Une seconde série d'expériences réalisées avec la β -glucosidase d'*A. niger* a confirmé l'absence de reconnaissance de l'enzyme par des composés comportant un bras espaceur de type PEG₃. L'expérience de dose-réponse réalisée ensuite avec des composés de type PEG₅ a fourni des résultats incohérents avec ceux obtenus lors des tests enzymatiques en solution. Nous avons cherché à expliquer ces résultats et mis en évidence une activité α -glucosidase indésirable dans l'échantillon de β -glucosidase utilisé. Cependant, à ce jour, il n'a pas été possible de quantifier précisément les proportions d' α - et de β -glucosidase dans cet échantillon.

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était de concevoir un nouveau type de biocapteur basé sur des iminosucres, afin de détecter des glycosidases en solution en utilisant la résonance plasmonique de surface en tant que méthode de transduction. Pour cela, il était nécessaire de mettre au point la synthèse de sondes comportant différents types d'iminosucres, couplés à un noyau pyrrole pour le greffage sur surface d'or. Ces sondes devaient ensuite être utilisées pour concevoir des biopuces, avant de développer une méthode de détection des α -glucosidases par SPRi.

Une première famille de sondes a été conçue à partir de la 1-déoxynojirimycine, un iminosucre de référence, connu pour s'associer de façon forte et réversible au site catalytique de diverses α - et β -glucosidases. La synthèse de l'intermédiaire **31** à partir du tétra-*O*-benzyl-D-glucopyranose étant décrite dans la littérature, elle a été reproduite sans difficulté et a permis d'accéder *via* une cycloaddition de Huisgen de type CuAAC aux deux amines primaires **38a** et **38b** avec de bons rendements (*Schéma 109*). Ces dernières ont été greffées à un noyau pyrrole selon deux méthodes différentes, et quatre sondes de **type 1** ont ainsi été synthétisées en 8 étapes au total, avec un rendement global compris entre 16 et 18%.

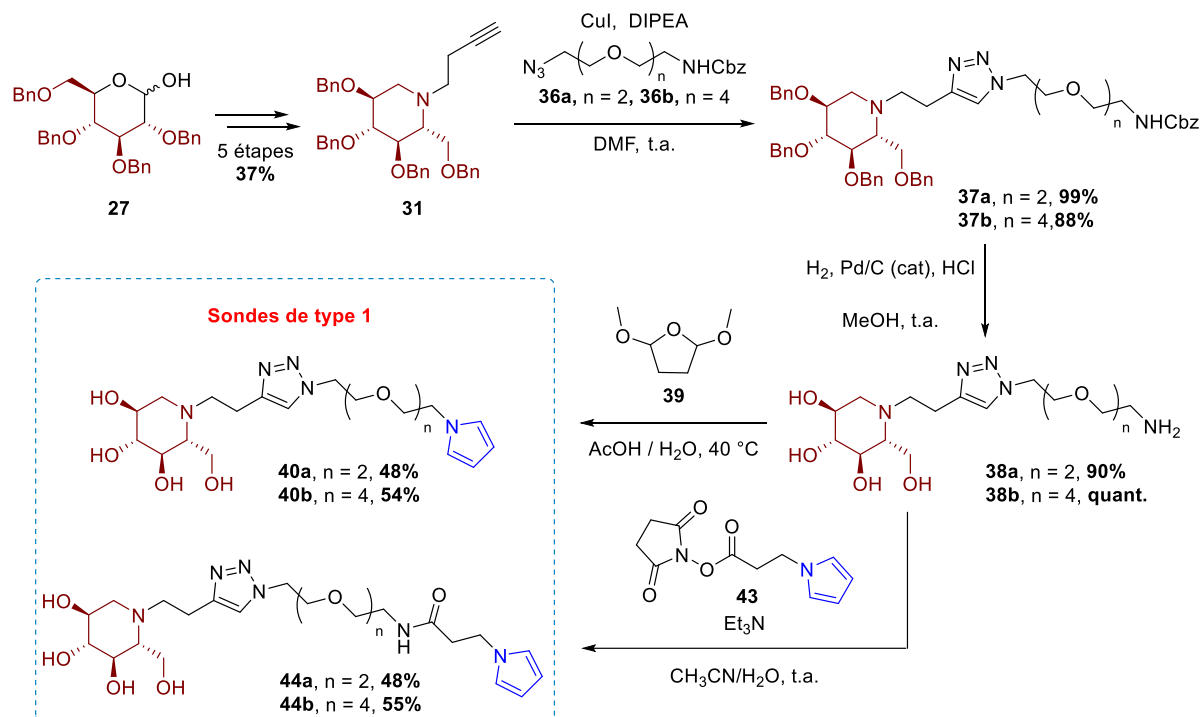


Schéma 109

Ces premiers résultats ont confirmé que la cycloaddition de Huisgen CuAAC constitue une méthode efficace permettant l'association de bras espaceurs au noyau iminosucre. L'importance d'introduire le noyau pyrrole, sensible aux conditions d'hydrogénolyse, en fin de synthèse a également été démontrée.

La formation de ce noyau par la méthode de Paal-Knorr conduisant à un mélange de produits difficile à purifier, une seconde voie d'accès basée sur l'emploi de l'ester de *N*-hydrosuccinimide **43** a également été mise en œuvre.

Un deuxième type de sondes a été synthétisé en un nombre limité d'étapes, cette fois-ci sur la base d'un noyau iminosucre comportant un centre quaternaire en α de l'atome d'azote endocyclique. Ce deuxième type de sondes devait présenter une meilleure sélectivité vis-à-vis des α -glucosidases que celles de **type 1**. Ces sondes ont été préparées par une alcynylation diastéréosélective de la cétonitrone **3** en utilisant du diéthylzinc et des bras espaceurs comportant une chaîne polyéthylène glycol alcynylée, et un azoture terminal (**Schéma 110**).

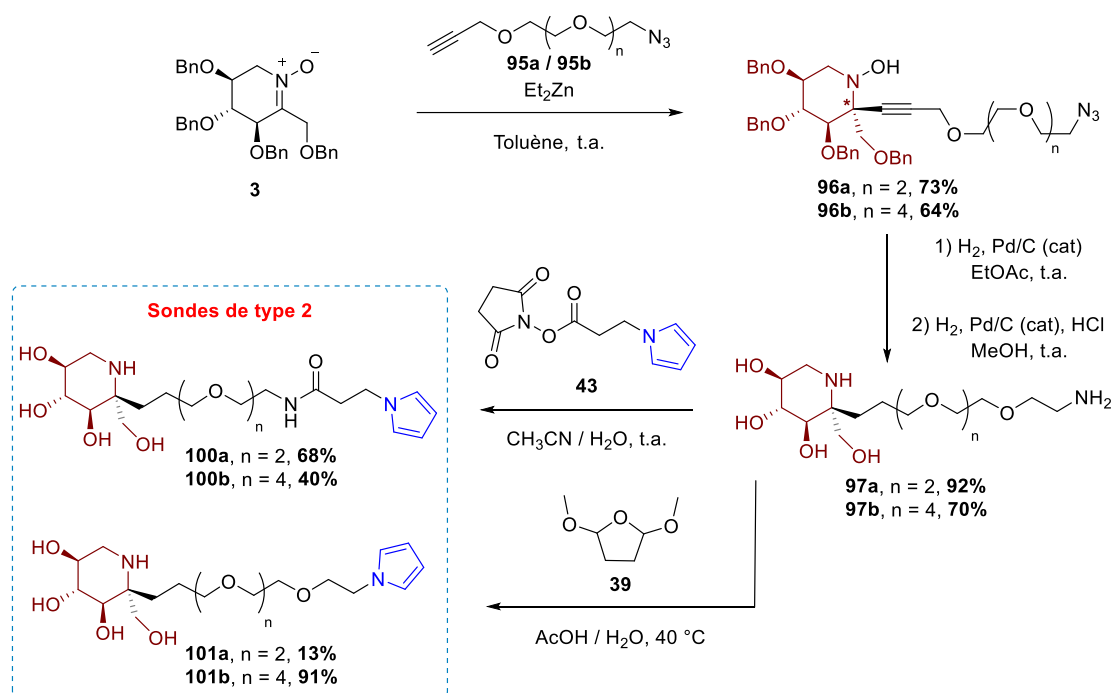


Schéma 110

La principale difficulté de ces synthèses a été rencontrée lors de l'étape visant à convertir les hydroxylamines **96** en amines **97**, l'éther propargylique ne résistant pas sous certaines conditions de débenzylation. La solution trouvée a consisté à réaliser cette transformation en deux étapes, avec dans un premier temps une hydrogénation ménagée de la triple liaison C-C sans acide, et dans l'acétate d'éthyle. Puis l'hydrogénolyse pallado-catalysée des groupements benzyles en présence d'acide chlorhydrique a été réalisée dans le méthanol, ces conditions réactionnelles permettant également la réduction complète de l'hydroxylamine et de la fonction azoture. La synthèse a été complétée en introduisant un noyau pyrrole dans des conditions identiques à celles utilisées lors de la synthèse des sondes de **type 1**. Cette voie de synthèse en 4 étapes (9 étapes à partir du L-sorbose) a permis l'obtention de 4 sondes de **type 2**, avec des rendements allant de 9 à 46% à partir de la cétonitrone **3** (soit 5 à 23% à partir du L-sorbose).

Un troisième type de sondes basées sur un noyau iminosucre bicyclique (indolizidine polyhydroxylée) a aussi été ciblé pendant ce travail, avec une sélectivité attendue pour les α -glucosidases. L'alcynylation diastéréosélective de la cétonitronne **3** a de nouveau été exploitée comme étape clé, afin de préparer l'ényne **26** qui a été engagé dans une réaction de cycloisomérisation-1,6, permettant de former le noyau iminosucre visé avec la configuration *D*-gluco souhaitée (**Schéma 111**). Le diène **25** a ainsi été obtenu de façon efficace en employant le complexe de ruthénium **GII** en tant que catalyseur, sous atmosphère d'éthylène, la formation exclusive du produit *exo* ayant été observée au cours de cette étape. La fonctionalisation de l'intermédiaire **25** s'est avérée complexe, mais une solution a été trouvée pour obtenir l'alcool **157** par hydroboration-oxydation, de façon totalement régiosélective et avec un très bon rendement de 92%. L'introduction directe d'un bras espaceur sur cet alcool par substitution nucléophile n'ayant pas pu être réalisée de façon efficace, une cycloaddition de Huisgen CuAAC a été utilisée pour conjuguer le dérivé **172** avec des bras espaceurs comportant un azoture terminal. Les composés obtenus (**173a** et **173b**) ont été déprotégés par hydrogénolyse pallado-catalysée en milieu acide pour aboutir à la formation des amines primaires **174a** et **174b**, qui ont été transformées en sondes de **type 3** par réaction avec **43**. Les deux sondes **176a** et **176b** ont été synthétisées en 11 étapes, avec des rendements de 10 et 16% respectivement à partir de de la cétonitronne **3** (soit 5% et 8% à partir du L-sorbose).

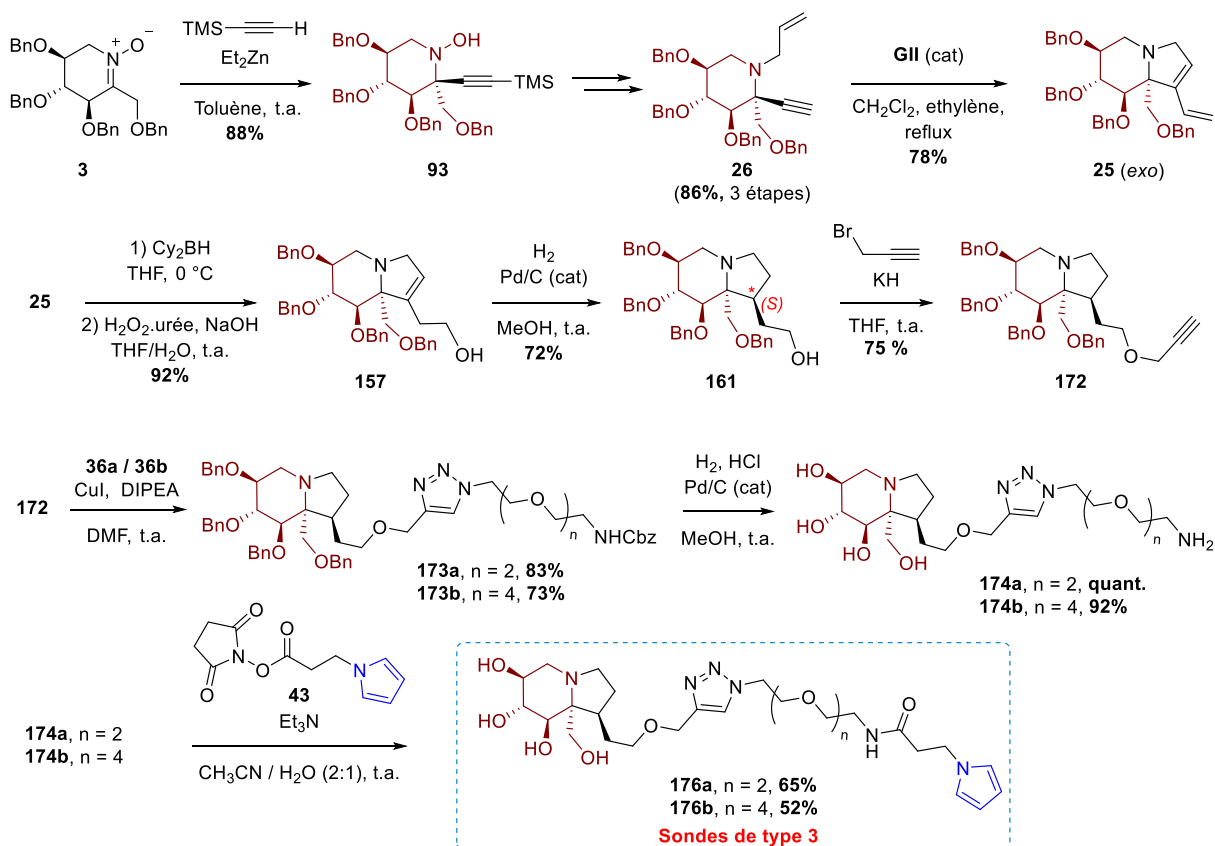


Schéma 111

Les différentes sondes synthétisées ont toutes été testées en tant qu'inhibiteurs, en solution, sur un panel de glycosidases commerciales (α -glucosidases de riz et de levure, β -glucosidases d'amande et d'*A. niger*, et β -galactosidase d'*A. oryzae*) de façon à évaluer leur affinité pour ces enzymes, ainsi que leur sélectivité. Ces tests ont permis de vérifier que les sondes de **type 1** dérivées de la **DNJ** gardaient des propriétés similaires à celles de la **DNJ**, et se comportaient comme inhibiteurs non sélectifs inhibant à la fois les α - et les β -glucosidases. Les sondes de **type 2** et de **type 3** ont confirmé leur sélectivité pour les α -glucosidases, même si une légère activité inhibitrice de β -glucosidases a aussi été mise en évidence. L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase de riz demeure cependant plus de 100 fois supérieure à l'activité inhibitrice de la β -glucosidase d'*A. niger* pour ces sondes de **type 2** et de **type 3**.

À l'issue de ces tests, la conception de biopuces multiplexées a été réalisée par electrosporting, une méthode reposant sur l'électro-copolymérisation du pyrrole, développée au sein de l'équipe CREAB au SyMMES. En utilisant deux dispositifs différents, jusqu'à 60 plots fonctionnalisés chacun avec une sonde spécifique ont pu être déposés à la surface d'un prisme de SPRi. Il a été possible de démontrer qu'après leur greffage sur surface, les sondes comportant un bras espaceur court (dérivé du triéthylène glycol) n'interagissaient pas de manière spécifique avec l' α -glucosidase de riz en solution, tandis qu'une telle interaction était observée pour les sondes dérivées du pentaéthylène glycol. La légère différence de longueur entre les deux bras espaceurs employés est donc apparue comme un élément de structure déterminant, qui devra être pris en considération lors de la synthèse de nouvelles sondes de glycosidases. À l'aide des composés dérivés du pentaéthylène glycol, il a été possible de détecter de manière spécifique l' α -glucosidase de riz à des concentrations de seulement 3 nM, ce qui constitue un résultat très encourageant.

Le phénomène d'adsorption non spécifique observé au cours des expériences de SPRi avec l' α -glucosidase de riz comme analyte en solution a pu être efficacement contrôlé. Le blocage préliminaire de la puce par une protéine, la BSA, s'est notamment avéré très efficace pour éliminer complètement ce phénomène d'adsorption non spécifique. Nous avons également démontré que des plots de contrôle négatif pertinents permettaient de soustraire la proportion de réponse non-spécifique lors d'une injection d' α -glucosidase de riz, et d'obtenir des courbes de dose-réponse tout à fait conformes à celles obtenues en traitant la puce par la BSA. Enfin, après avoir testé plusieurs conditions de régénération (NaCl, SDS, chlorure de guanidinium...), nous avons démontré que la régénération par une solution d'hydroxyde de sodium 0.01M permettait de réutiliser les biopuces au cours d'une dizaine d'injections successives, réduisant ainsi le coût d'utilisation de ces biopuces.

Le modèle de Langmuir a été utilisé pour déterminer les valeurs de K_{Dapp} et de ΔR_{max} associées à l'interaction entre chacun des composés greffés sur un même prisme de SPRi, et l' α -glucosidase de riz en solution. À la concentration de dépôt testée, les valeurs de K_{Dapp} (reflétant l'affinité entre l'analyte et les récepteurs disposés sur une surface solide) ont été très proches pour les différents types de sondes.

Ainsi, bien que les sondes de **type 2** possèdent une meilleure affinité pour l' α -glucosidase de riz en solution que les sondes de **type 1 et 3**, aucun type de sonde ne se démarque par une meilleure affinité pour cette enzyme après greffage sur surface. L'analyse des valeurs de ΔR_{\max} (associées au nombre de récepteurs disposés sur la surface) nous indique que pour un même type de sonde, l'efficacité du greffage sur surface d'or est influencée par l'environnement chimique du noyau pyrrole *via* lequel les sondes ont été greffées. Ce phénomène pourrait être dû à des vitesses d'électro-polymérisation différentes au cours de la formation des plots de copolymère durant la conception des biopuces. Cependant, des expériences complémentaires doivent être menées afin de valider cette hypothèse, telle une analyse de la surface des copolymères par microscopie XPS.

Après ces premières études focalisées sur l' α -glucosidase de riz en solution, des expériences similaires ont été conduites avec la β -glucosidase d'*A. niger*. Avec cette enzyme, comme dans le cas de l' α -glucosidase de riz, les sondes comportant un bras espaceur de type PEG₃ n'ont pas interagi, ce qui semble confirmer que celui-ci est trop court pour que le noyau iminosucre s'associe au site catalytique de l'enzyme cible. La sélectivité des sondes de **type 2** et de **type 3** vis-à-vis de la β -glucosidase d'*A. niger* a ensuite été évaluée, en les comparant aux sondes de **type 1**. De façon surprenante, les plots fonctionnalisés par les sondes de **type 2** et de **type 3** ont délivré de fortes réponses spécifiques au cours de cette expérience, alors que ces sondes ne possèdent qu'une faible affinité pour les β -glucosidases en solution. À postériori, il a été constaté *via* des tests d'activité du lot d'enzyme utilisé pour cette étude qu'en plus de l'activité β -glucosidase attendue, une activité α -glucosidase était observée. Il n'a cependant pas été possible de déterminer avec précision la composition de cet échantillon, susceptible de contenir des α - et des β -glucosidases.

À ce stade, nous avons donc réussi à montrer que des sondes comportant un noyau iminosucre, un bras espaceur et une fonction d'ancrage sur support solide peuvent être synthétisées puis greffées sur des prismes dédiés à des analyses par SPR. Nous avons ensuite utilisé ces biopuces pour détecter par SPRi des glycosidases en solution, à des concentrations de l'ordre du nM. Cependant des difficultés inattendues ont été rencontrées au cours de ce travail, dont l'utilisation d'échantillons d'enzymes commerciales à la composition incertaine qui a pu affecter le comportement des biopuces. De plus, les enzymes constituent des entités biologiques particulièrement sensibles, dont la manipulation et la conservation requièrent une expérience spécifique, qui a dû être acquise au cours de ces travaux.

À court terme, des études complémentaires demeurent nécessaires pour démontrer la sélectivité de la méthode de détection afin d'envisager l'analyse de solutions plus complexes pouvant comporter plusieurs enzymes. Des expériences complémentaires devront notamment être réalisées afin d'enrichir les interprétations des résultats déjà obtenus au cours de cette thèse au cours des études d'interaction avec la β -glucosidase d'*A. niger*. De telles analyses devront permettre de déterminer avec précision la composition et la nature des glycosidases présentes dans l'échantillon de β -glucosidase d'*A. niger* utilisé au cours de ces travaux, et pourront reposer sur différentes méthodes (SDS-PAGE, HPLC).

Par ailleurs, les propriétés inhibitrices de glycosidases des sondes de **type 1, 2, et 3** pourraient être déterminées pour un plus large ensemble de glycosidases. Ceci permettrait d'identifier une enzyme ayant une très forte affinité pour les sondes de **type 1**, et une affinité plus faible ou inexistante pour les sondes de **type 2** et de **type 3**. Une glycosidase avec un tel « profil de sélectivité » constituerait alors une bonne candidate pour valider la sélectivité de la détection par SPRi, ce qui permettrait de parachever la preuve de concept.

À plus long terme, une optimisation des sondes est envisageable, en leur incorporant de nouveaux bras espaceurs de tailles et de natures différentes. Ceci permettrait d'accéder à des sondes possédant de nouvelles propriétés en termes de rigidité et de polarité. Étant donné leurs voies de synthèse plus courtes, les sondes de **type 1** et de **type 2** constitueraient les premières familles sur lesquelles un tel changement structural pourrait être réalisé. De même, des fonctions d'ancrage sur support solide de nature différente (autres que le noyau pyrrole) pourraient être envisagées. Enfin, l'un des intérêts d'utiliser des sondes dérivées d'minosucres résidait dans la nature de leur interaction avec les glycosidases, laquelle est forte et réversible. Ceci suggérait la possibilité de détecter et isoler des enzymes structurellement intactes et fonctionnelles. La validation de cette hypothèse nécessiterait d'utiliser les biopuces conçues au cours de ce travail pour analyser un lysat cellulaire contenant de nombreuses glycosidases, et d'autres biomolécules, afin d'étudier celles qui se seraient associées aux biopuces. Une telle expérience pourrait donc être entreprise avec les biopuces utilisées dans le dernier chapitre, puisqu'un protocole permettant de réduire efficacement le phénomène d'adsorption non spécifique a déjà été testé au cours de ces travaux. Par exemple, plusieurs α -glucosidases de la famille des GH31 ont été identifiées dans le génome de l'ananas (*Ananas comosus*), mais les structures associées demeurent inconnues à ce jour. La détection et l'isolement d' α -glucosidases d'ananas représenterait une expérience susceptible de démontrer la validité de la démarche adoptée au cours de cette thèse, et permettrait de valoriser considérablement les biopuces conçues au cours de nos travaux.

Partie Expérimentale

Experimental part for chapters 2 and 3

Material and Instrumentation

All the reactions were performed under argon pressure and magnetic stirring, in glassware previously dried in an oven. The standard handling techniques for manipulation under inert atmosphere were used for air and moisture-sensitive reagents. THF was freshly distilled from sodium (in the presence of benzophenone); toluene was used after filtration through an Inert PureSolv purification system; dichloromethane, acetonitrile, DMF, DMSO and triethylamine were distilled over CaH₂. Purchased reagents were used without further purification.

Reactions were monitored by TLC using commercial aluminium-backed silica gel plates (Merck, Kieselgel 60 F254). TLC spots were viewed under ultraviolet light and by heating the plate after treatment with 3% solution of potassium permanganate in 10% aqueous potassium hydroxide (w/v). Products were purified either by flash column chromatography using Macherey–Nagel silica 60 (40–63 μm) or by dry column vacuum chromatography (DCVC)²³¹ using Macherey–Nagel silica 60 (15–40 μm). Alternatively, deprotected iminosugars were purified using ion-exchange resin (Dowex 50W-X2) and eluted with 1M aqueous NH₄OH.

Reverse phase HPLC (RP-HPLC) purifications were achieved by using a prepacked C18 column (length 250 mm, diam 10 mm; particle size 7 μm, porosity 100 Å) at 4 mL/min flow rate. Eluent A was a 50 mM TEAA solution pH = 7 in water/MeCN (95:5, v/v) and eluent B a MeCN/water (9:1, v/v) solution. The analyses were monitored at 210 nm. Gradient was isocratic for 2 min using 10% eluent B, then 10 to 60% B in 20 min. Fractions of interest were then gathered, thawed and subjected to at least three successive lyophilisations.

Optical rotations were measured on a PerkinElmer 341 polarimeter. Infrared spectra were obtained from neat compounds, on a Nicolet “Magna 550” spectrometer using an ATR (Attenuated Total Reflection) module. Data are reported in reciprocal centimeters (cm⁻¹). ¹H NMR and ¹³C NMR (DEPTQ) spectra were recorded on a Bruker Avance 400 (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz) or a Bruker Avance 500 (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz) spectrometer. Chemical shifts for ¹H spectra are values from tetramethylsilane in CDCl₃ (δ 0.00 ppm) or from residual non-deuterated solvents (CHCl₃ in CDCl₃: δ 7.26 ppm; CH₃OH in CD₃OD: δ 3.31 ppm; H₂O in D₂O: δ 4.79 ppm, (CH₃)₂SO in (CD₃)₂SO: δ 2.50 ppm).²³² Chemical shifts for ¹³C spectra are values from CDCl₃ (δ 77.16 ppm),

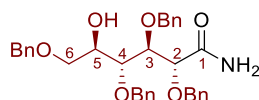
²³¹ Pedersen, D.; Rosenbohm, C. *Synthesis* **2001**, *16*, 2431–2434.

²³² Babij, N. R.; McCusker, E. O.; Whiteker, G. T.; Canturk, B.; Choy, N.; Creemer, L. C.; Amicis, C. V. D.; Hewlett, N. M.; Johnson, P. L.; Knobelsdorf, J. A.; Li, F.; Lorsbach, B. A.; Nugent, B. M.; Ryan, S. J.; Smith, M. R.; Yang, Q. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 661–667.

CD₃OD (δ 49.00 ppm). ¹H NMR spectra are reported as following: chemical shift (ppm), multiplicity (s: singlet, *br s*: broad singlet; d: doublet, dd: doublet of doublets, dt: doublet of triplets; t: triplet, td: triplet of doublets; *ps s*: pseudo singlet, *ps d*: pseudo doublet, *ps dd*: pseudo doublet of doublets, *ps t*: pseudo triplet; m: multiplet), coupling constants (Hz), integration and assignment. Proton and carbon signal assignments were established using COSY, HSQC, and HMBC experiments. In some cases, configuration has been determined using NOESY experiment. High-Resolution Mass Spectra were recorded on a Waters G2-S Q-TOF mass spectrometer or an ESI/LTQ Orbitrap XL Thermo Scientific mass spectrometer.

Synthesis

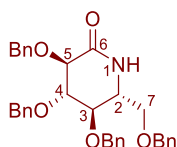
(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,6-Tetrakis(benzyloxy)-5-hydroxyhexanamide (**28**)



In a round bottom flask, 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose (3.35 g, 6.20 mmol) was dissolved in THF (17 mL) under argon atmosphere. Ammonia (25% in aqueous solution, 50 mL) was added, followed by iodine (2.36 g, 9.3 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature during 4 hours, then an aqueous Na₂S₂O₃ solution was added and aqueous phase was extracted three times with EtOAc. The organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to afford a pale yellow oil. Purification by DCVC (Cyclohexane/EtOAc 1:0 to 0:1) afforded pure **28** as a white solid (3.285 g, 95%). R_f = 0.26 in Pentane/EtOAc 1:1.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41-7.22 (m, 20H, ^{Ar}CH), 6.61 (s, 1H, NH₂), 5.43 (s, 1H, NH₂), 4.77-4.70 (m, 2H, ^{Bn}CH₂), 4.70-4.49 (m, 6H, ^{Bn}CH₂), 4.28 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, ²CH), 4.10 (*ps t*, *J* = 4.0 Hz, 1H, ³CH), 3.98-3.87 (m, 2H, ⁵CH, ⁴CH), 3.68 (dd, *J* = 9.6 Hz, 2.4 Hz, 1H, ⁶CH₂), 3.61 (dd, *J* = 10.0, 5.3 Hz), 2.83 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, OH), in accordance with literature data.²³³

(3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-Tris(benzyloxy)-6-((benzyloxy)methyl)piperidin-2-one (**29b**)



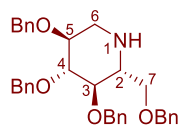
Amide **28** (200 mg, 360 μ mol) was dissolved in dry DMSO (1.12 mL, 15.8 mmol) under argon atmosphere. Acetic anhydride (0.76 mL, 7.9 mmol) was added dropwise and the mixture was reacted during 17 hours at room temperature. Water was added, stirring was continued during 10 minutes then

²³³ Stauffert, F.; Lepage, M.; Pichon, M.; Hazelard, D.; Bodlenner, A.; Compain, P. *Synthesis* **2016**, *48*, 1177–1180.

diethyl ether was added. The organic layer was washed with saturated aqueous solution of NaHCO_3 (3 times), with brine (2 times), then it was dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure to afford an oil that was used in a second step without further purification. This crude oil was dissolved in dry acetonitrile (8 mL), formic acid (1.36 mL, 36.0 mmol) was added, followed by NaBH_3CN (72 mg, 1.2 mmol). The reaction mixture was refluxed during 3.5 hours. After cooling at room temperature, the reaction mixture was quenched with HCl (1M), concentrated under reduced pressure, and diluted with an aqueous saturated solution of NaHCO_3 . The aqueous phase was extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure to afford a diastereoisomeric mixture (d.r. 85:15 from NMR analysis) as a colourless oil. Purification by DCVC (Cyclohexane/EtOAc 1:0 to 0:1) afforded **29b** (99 mg, **51%** over two steps). $R_f = 0.58$ in Pentane/EtOAc 1:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.07 (m, 20H, ArCH), 5.97 (s, 1H, NH), 5.09 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, BnCH_2), 4.82-4.72 (m, 2H, BnCH_2), 4.72-4.61 (m, 2H, BnCH_2), 4.45-4.32 (m, 3H, BnCH_2), 3.92 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, ^5CH), 3.82 (ps t, $J = 7.8$ Hz, 1H, ^4CH), 3.56-3.42 (m, 3H, $^7\text{CH}_2$, ^2CH), 3.19 (ps t, $J = 8.1$ Hz, 1H, ^3CH), in accordance with literature data.²³⁴

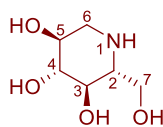
(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-Tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidine (30)



To a solution of δ -lactam **29b** (880 mg, 1.6 mmol) in freshly distilled THF (12 mL) was carefully added LiAlH_4 powder (186 mg, 4.8 mmol) at room temperature. The resulting suspension was stirred at room temperature during 10 minutes and then refluxed during 2.5 hours. After cooling to 0°C using an ice bath, an aqueous NaOH solution (15% wt, 172 μL) and water (172 μL) were added and the resulting mixture was filtered over celite (rinsed with Et_2O). The solvents were removed by evaporation and the resulting oil was purified by DCVC (Cyclohexane/EtOAc 1:0 to 0:1) affording **30** as a pale yellow oil (763 mg, **91%**). $R_f = 0.33$ in Pentane/EtOAc 1:1.

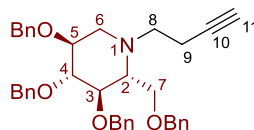
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.44-7.18 (m, 20H, ArCH), 5.00 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, BnCH_2), 4.89 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, BnCH_2), 4.86 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, BnCH_2), 4.77-4.66 (m, 2H, BnCH_2), 4.57-4.42 (m, 3H, BnCH_2), 3.69 (br d, $J = 8.8$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.62-3.46 (m, 3H, ^5CH , ^4CH , $^7\text{CH}_2$), 3.37 (ps t, $J = 9.2$ Hz, 1H, ^3CH), 3.27 (dd, $J = 12.0$ Hz, 4.5 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.74 (br t, $J = 7.7$ Hz, ^2CH), 2.53 (ps t, $J = 11.2$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), in accordance with literature data.⁶⁸

²³⁴ Li, T.; Guo, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhang, Z.; Li, J.; Zhang, W.; Lin, J.; Zhao, W.; Wang, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2136–2144.

(2R,3R,4R,5S)-2-(Hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (DNJ)

A solution of piperidine **30** (120 mg, 229 μmol) in methanol (2.0 mL) was treated with HCl (230 μL , 2.0M solution in diethyl ether, 460 μmol), then Pd/C (25 mg, 10% wt, 22.9 μmol) was added and the mixture was placed under dihydrogen (1 atm). The mixture was stirred 4 days at room temperature, then it was filtered on celite[®] (rinsed with MeOH), and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by ion exchange resin (Dowex 50W-X8, H⁺ form), eluting with H₂O and 1.0 M aqueous solution of NH₄OH to afford **DNJ** as a yellowish solid (33 mg, **89%**).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.75 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.62-3.52 (m, 1H, ⁷CH₂), 3.47-3.37 (m, 1H, ⁵CH), 3.25 (*ps t*, $J = 9.0$ Hz, 1H, ⁴CH), 3.17 (*ps t*, $J = 9.4$ Hz, 1H, ³CH), 3.06 (dd, $J = 12.1, 4.6$ Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.55-2.46 (m, 1H, ²CH), 2.41 (*ps t*, $J = 11.5$ Hz, 1H, ⁶CH₂), in accordance with literature data.²³⁵

(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-Tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-1-(but-3-yn-1-yl)piperidine(31)

To a stirred solution of **30** (183 mg, 349 μmol) in dry acetonitrile (2 mL) were added potassium carbonate (289 mg, 2.09 mmol), potassium iodide (30 mg, 175 μmol), and 4-bromobut-1-yne (131 μL , 1.40 mmol). After heating this mixture at reflux for 5 hours, another portion of 4-bromobut-1-yne (100 μL , 1.07 mmol) was added. After 17 hours (22 hours from the beginning) the reaction was still not completed, potassium iodide (40 mg, 241 μmol) and 4-bromobut-1-yne (100 μL , 1.07 mmol) were added again. After 4 hours (26 hours from the beginning), the solvent was removed under reduced pressure, then the residue was diluted in EtOAc/H₂O mixture, extracted with EtOAc (3 times), washed with brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification by DCVC (Cyclohexane/EtOAc 1:0 to 1:1) afforded **31** as a colourless oil (166 mg, **83%**) which solidified at room temperature. R_f = 0.89 in Pentane/EtOAc 3:1.

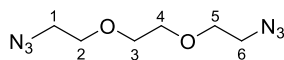
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.24 (m, 18H, ^{Ar}CH), 7.19-7.09 (m, 2H, ^{Ar}CH), 4.98 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.89 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.71 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.67 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.55 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.48 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.41 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 3.71 (dd, $J = 10.4, 2.6$ Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.69-3.61 (m,

²³⁵ Wenckes, T.; Meijer, A. J.; Groen, A. K.; Boot, R. G.; Groener, J. E.; van Eijk, M.; Ottenhoff, R.; Bijl, N.; Ghauharali, K.; Song, H.; O'Shea, T. J.; Liu, H.; Yew, N.; Copeland, D.; van den Berg, R. J.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 689–698.

Partie expérimentale

2H, ^5CH , $^7\text{CH}_2$), 3.55 (*ps t*, $J = 9.2$ Hz, 1H, ^3CH), 3.47 (*ps t*, $J = 8.9$ Hz, 1H, ^4CH), 3.10 (*dd*, $J = 11.1$, 4.9 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 3.06-2.93 (*m*, 2H, $^8\text{CH}_2$), 2.43 (*dt*, $J = 9.0$, 2.3 Hz, 1H, ^2CH), 2.37 (*ps t*, $J = 10.9$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.34-2.28 (*m*, 2H, $^9\text{CH}_2$), 1.98 (*t*, $J = 2.5$ Hz, 1H, ^{11}CH) in accordance with literature.^{80b}

1,2-bis(2-Azidoethoxy)ethane (32a)

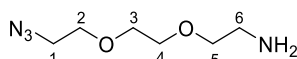


To a solution of triethylene glycol (2.65 g, 17.6 mmol) in dry dichloromethane (18 mL) was added triethylamine (8.55 mL, 61.6 mmol). Methanesulfonyl chloride (4.1 mL, 52.8 mmol) was added dropwise. After being reacted for further 2.5 hours, the mixture was diluted in H₂O and extracted three times with EtOAc. Organic layers were combined, washed with brine, and concentrated under reduced pressure to afford a yellow oil which was used without further purification.

After having been dissolved in ethanol (32 mL) and DMF (8 mL), the latter was treated with sodium azide (4.58 g, 70.5 mmol), and the resulting mixture was refluxed during 24 hours. The mixture was concentrated under vacuum, diluted in Et₂O/H₂O mixture, extracted three times with Et₂O, washed three times with aqueous LiCl (5% w/w) and dried over anhydrous magnesium sulfate. As azides are strongly explosive, **32a** was not concentrated to dryness but obtained as a concentrated solution in Et₂O. Yield was estimated by NMR as **85%** from triethylene glycol. $R_f = 0.26$ in EtOAc / Cyclohexane 1:1.

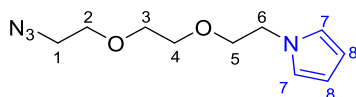
^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.71-3.66 (*m*, 8H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$), 3.39 (*t*, $J = 5.0$ Hz, 4H, $^1\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (33a)



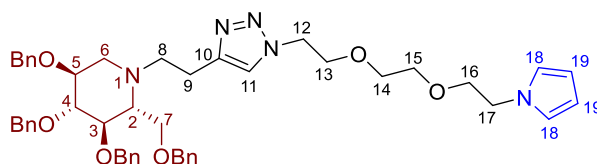
To a stirred solution of **32a** (3.00 g, 15 mmol) in aqueous HCl (5% w/w, 62.5 ml) was added dropwise triphenylphosphine (0.2 M in Et₂O, 75 mL, 15.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature during 16 h, then aqueous phase was washed with dichloromethane (3 times). After having neutralized remaining HCl and set the pH to 12 by adding NaOH pellets, the aqueous phase was extracted with dichloromethane (5 times). Combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to afford **33a** (1.88 g, **72%**) as product. $R_f = 0.20$ in EtOAc/MeOH 9:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.71-3.61 (*m*, 6H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, ^4CH), 3.51 (*t*, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^5\text{CH}_2$), 3.39 (*t*, $J = 4.5$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 2.87 (*t*, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^6\text{CH}_2$), 1.26 (*br s*, 2H, NH₂). In accordance with literature.^{83,121}

1-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-pyrrole (34a)

To a stirred solution of **33a** (115 mg, 660 μmol) in H_2O (0.75 mL) was added acetic acid (0.5 mL) and 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (86 μL , 660 μmol). The mixture was insulated from light using aluminium paper and warmed to 70 $^\circ\text{C}$ during 4 hours. After cooling down to room temperature, the mixture was diluted in aqueous NaHCO_3 , extracted 3 times with EtOAc, washed with brine and dried over anhydrous magnesium sulfate. Concentration to dryness afforded **34a** quantitatively. $R_f = 0.61$ in Cyclohexane/EtOAc 1:1.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.62 (*ps t*, $J = 2.0$ Hz, 2H, ^7CH), 6.05 (*ps t*, $J = 2.0$ Hz, 2H, ^8CH), 3.97 (*t*, $J = 5.6$ Hz, 2H, $^6\text{CH}_2$), 3.67 (*t*, $J = 5.6$ Hz, 2H, $^5\text{CH}_2$), 3.58-3.47 (*m*, 6H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$), 3.28 (*t*, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$).

(2R,3R,4R,5S)-1-(2-(1-(2-(2-(2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidine (35)

To a stirred solution of **34** (21 mg, 94 μmol) in DMF (1.0 mL) were added successively **31** (27 mg, 47 μmol), copper iodide (3 mg, 16 μmol) and diisopropylethylamine (78 μL , 470 μmol). The resulting mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ during 6 hours, then it was diluted with EtOAc, washed with brine (5 times), dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Purification of the residue by flash chromatography (Pentane/EtOAc 1:1 to 0:1) afforded **35** as a colourless oil (29 mg, **76%**). $R_f = 0.49$ in EtOAc. $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +2.24$ (c 0.49, CHCl_3). IR ν 3088 (w), 3062 (w), 3029 (m), 2869 (s), 2103 (w), 1954 (w), 1550 (w), 1497 (m), 1454 (m), 1361 (m), 1287 (m), 1209 (m), 1174 (m), 1100 (s), 1028 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.29-7.14 (*m*, 19H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$, ^{11}CH), 7.09-7.04 (*m*, 2H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 6.60 (*ps t*, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{18}CH), 6.05 (*ps t*, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{19}CH), 4.89 (*d*, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.81 (*d*, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.74 (*d*, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.60 (*d*, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.57 (*d*, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.41 (*d*, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.37 (*d*, $J = 11.5$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.34 (*d*, $J = 10.6$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.31 (*t*, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 3.94 (*t*, $J = 5.5$ Hz, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.69 (*t*, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.64 (*dd*, $J = 10.5, 2.4$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.63-3.54 (*m*, 4H, $^7\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, ^5CH), 3.51 (*ps t*, $J = 9.2$ Hz, 1H, ^3CH), 3.48-3.39 (*m*, 5H, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, ^4CH), 3.10 (*dd*, $J = 11.1, 4.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$),

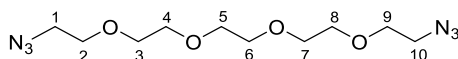
Partie expérimentale

3.04-2.86 (m, 2H, $^8\text{CH}_2$), 2.84-2.68 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$), 2.37 (dt, $J = 9.3, 2.6$ Hz, 1H, ^2CH), 2.28 (ps t, $J = 10.8$ Hz, $^6\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 145.8 ($^{10}\text{C}_q$), 139.1 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.6 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.6 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.0 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 122.3 (^{11}CH), 121.1 (^{18}CH), 108.3 (^{19}CH), 87.4 (^4CH), 78.7 (^3CH), 78.6 (^5CH), 75.5 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 75.3 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.5 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 71.4 ($^{16}\text{CH}_2$), 70.7 ($^{15}\text{CH}_2$), 70.6 ($^{14}\text{CH}_2$), 69.7 ($^{13}\text{CH}_2$), 66.0 ($^7\text{CH}_2$), 63.6 (^2CH), 54.4 ($^6\text{CH}_2$), 52.0 ($^8\text{CH}_2$), 50.2 ($^{12}\text{CH}_2$), 49.6 ($^{17}\text{CH}_2$), 20.7 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 800.43816, found 800.43729.

1,14-Diazido-3,6,9,12-tetraoxatetradecane (32b)

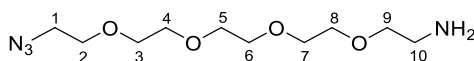


To a stirred solution of pentaethylene glycol (1.51 g, 6.36 mmol) and triethylamine (3.10 mL, 22.3 mmol) in dichloromethane (10 mL) was slowly added methanesulfonyl chloride (1.48 mL, 19.1 mmol). Reaction was stirred during 2 hours at room temperature, then solvent was removed by evaporation under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc/ H_2O mixture and aqueous phase was extracted with EtOAc (3 times), then combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness under reduced pressure to afford a yellow oil which was used without further purification.

The latter was dissolved in ethanol (20 mL) then sodium azide (1.65 g, 25.4 mmol) was added and the mixture was refluxed during 18 hours. After having been cooled down to room temperature, solvent was removed by evaporation under reduced pressure, and the residue was dissolved in an $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ mixture. Aqueous layer was extracted with Et_2O (3 times) and combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, and evaporated under reduced pressure. As azides are strongly explosives, **32b** was not concentrated to dryness but obtained as concentrated solution in Et_2O . Yield was estimated by NMR as **86%** from pentaethylene glycol. $R_f = 0.27$ in Cyclohexane/EtOAc 1:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.74-3.64 (m, 16H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 3.46-3.35 (m, 4H, $^1\text{CH}_2$, $^{10}\text{CH}_2$).

14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amine (33b)



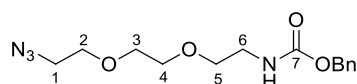
To a stirred solution of **32b** (1.58 g, 5.47 mmol) in aqueous HCl (5% w/w, 22 mL) was added dropwise triphenylphosphine (0.2 M in Et_2O , 27 mL, 5.47 mmol). The mixture was stirred at room temperature during 16 h, then aqueous phase was washed with dichloromethane (3 times). After

Partie expérimentale

having neutralized remaining HCl and set pH to 12 using NaOH pellets, the aqueous phase was extracted with dichloromethane (5 times). Combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to afford **33b** (1.16 g, **81%**) as product. Rf = 0.58 in EtOAc.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.72-3.61 (m, 14H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 3.52 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^9\text{CH}_2$), 3.40 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 2.87 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^{10}\text{CH}_2$), 1.43 (br s, 2H, NH_2).

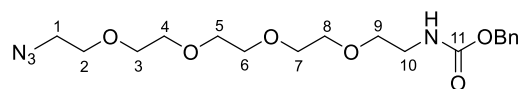
Benzyl (2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (**36a**)



To a stirred solution of **33a** (510 mg, 2.93 mmol) in dichloromethane (6 mL) was added triethylamine (0.61 mL, 4.37 mmol). Benzyl chloroformate (500 μL , 3.51 mmol) was added dropwise and the resulting mixture was reacted at room temperature. After 18 hours, the starting material was still detected by TLC and another portion of benzyl chloroformate was added (100 μL , 700 μmol). After 1 day (almost 2 days from the beginning) the reaction was stopped. The solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting mixture was diluted in a EtOAc/ H_2O mixture, washed with H_2O (3 times), then with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated to dryness to afford the crude product. Purification by DCVC (Cyclohexane to EtOAc) afforded **36a** (869 mg, **73%**) as colourless oil. Rf = 0.38 in EtOAc / Cyclohexane 1:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45-7.30 (m, 5H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.28 (br s, 1H, NH), 5.13 (s, 2H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 3.73-3.62 (m, 6H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$), 3.59 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^6\text{CH}_2$), 3.47-3.33 (m, 4H, $^1\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$).

Benzyl (14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamate (**36b**)

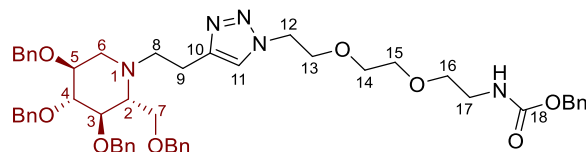


To a stirred solution of **33b** (160 mg, 610 μmol) in dichloromethane (1.5 mL) was added triethylamine (170 μL , 1.22 mmol). Benzyl chloroformate (130 μL , 915 μmol) was added dropwise and the resulting mixture was reacted at room temperature. After almost 2 hours, reaction was not completed (TLC analysis revealed with ninhydrin) and another portion of benzyl chloroformate was added (87 μL , 610 μmol). After 2 other hours (4 hours from the beginning), reaction was completed and stopped. Dichloromethane was removed by evaporation under reduced pressure, then resulting mixture was dissolved in EtOAc/ H_2O mixture and extracted with EtOAc (3 times). Organic layers were combined, washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness to afford crude product.

Purification by DCVC (Cyclohexane to EtOAc) afforded **36b** (152 mg, **63%**) as colourless oil. Rf = 0.15 in Cyclohexane/EtOAc 1:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.42-7.31 (m, 5H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.36 (*br s*, 1H, NH), 5.13 (s, 2H, $^{\text{CBz}}\text{CH}_2$), 3.72-3.61 (m, 14H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 3.59 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 3.46-3.34 (m, 4H, $^9\text{CH}_2$, $^{10}\text{CH}_2$).

Benzyl (2-(2-(2-(4-(2-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (37a)



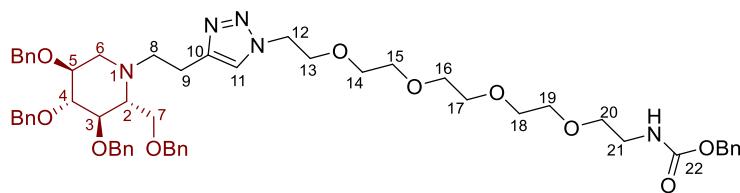
To a stirred solution of **36a** (38 mg, 123 μmol) in DMF (1.0 mL) were added successively **31** (48 mg, 83 μmol), copper iodide (5 mg, 26 μmol), and diisopropylethylamine (137 μL , 830 μmol). The resulting mixture was stirred during 3 hours at room temperature, then it was diluted with EtOAc, washed with brine (5 times), dried over magnesium sulfate, and concentrated under reduced pressure. Purification of the residue by flash chromatography (Pentane/EtOAc 1:1 to EtOAc/MeOH 9:1) afforded **37a** as a colourless oil (72 mg, **99%**). Rf = 0.62 in EtOAc. $[\alpha]_D^{20} +5.86$ (c 0.70, CHCl_3). IR ν 3339 (m), 3088 (w), 3062 (w), 3030 (m), 2870 (s), 2107 (m), 1950 (w), 1716 (s), 1605 (w), 1520 (m), 1497 (m), 1454 (m), 1361 (m), 1254 (s), 1101 (s), 1028 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.32-7.10 (m, 24H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$, ^{11}CH), 7.10-7.03 (m, 2H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.22 (*br s*, 1H, NH), 4.99 (s, 2H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.88 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.80 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.73 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.59 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.56 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.39 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.34 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.34 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.28 (*br t*, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 3.69 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.63 (dd, $J = 10.3, 2.5$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.60 (dd, $J = 11.0, 2.4$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.58-3.36 (m, 9H, ^5CH , ^3CH , $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, ^4CH), 3.29-3.22 (m, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.09 (dd, $J = 11.1, 4.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 3.02-2.93 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 2.93-2.84 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 2.82-2.66 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$), 2.36 (dt, $J = 9.4, 2.3$ Hz, 1H, ^2CH), 2.26 (*ps t*, $J = 10.7$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 156.4 ($^{18}\text{C}_q$), 145.7 ($^{10}\text{C}_q$), 138.9 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.4 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 137.8 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 136.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 122.2 (^{11}CH), 87.2 (^4CH), 78.6 (^3CH), 78.4 (^5CH), 75.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 75.2 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 70.4, 70.1, 70.0, ($^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$), 69.5 ($^{13}\text{CH}_2$), 66.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 65.9 ($^7\text{CH}_2$), 63.5 (^2CH), 54.2 ($^6\text{CH}_2$), 51.9 ($^8\text{CH}_2$), 49.9 ($^{12}\text{CH}_2$), 40.8 ($^{17}\text{CH}_2$), 20.5 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{62}\text{O}_8\text{N}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 884.45929, found 884.45860.

Benzyl (14-(4-(2-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamate (37b)



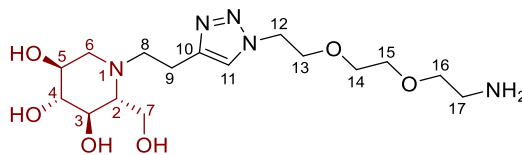
To a stirred solution of **36b** (36 mg, 91 μmol) in DMF (1.0 mL) were added successively **31** (35 mg, 61 μmol), copper iodide (3 mg, 16 μmol), and diisopropylethylamine (101 μL , 610 μmol). The resulting mixture was stirred at room temperature during 18 hours, then it was diluted with EtOAc, washed with brine (5 times), dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Purification of the residue by flash chromatography (Pentane/EtOAc 2:1 to EtOAc/MeOH 95:5) afforded **37b** as a colourless oil (52 mg, **88%**). $R_f = 0.24$ in EtOAc. $[\alpha]_D^{20} + 3.05$ (c 1.18, CHCl_3). IR ν 3339 (w), 3087 (w) 3062 (w), 3030 (m), 2870 (s), 1720 (s), 1525 (m), 1497 (m), 1454 (m), 1361(m), 1251 (s), 1101 (s), 1028 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.31-7.13 (m, 24H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$, ^{11}CH), 7.08-7.03 (m, 2H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.43 (*br s*, 1H, NH), 5.00 (s, 2H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.89 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.80 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.74 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.60 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.57 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.41 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.36 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.34 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.30 (*br t*, $J = 4.7$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 3.69 (*br t*, $J = 4.7$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.67-3.60 (m, 2H, $^7\text{CH}_2$), 3.55-3.43 (m, 16H, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$, ^3CH , ^5CH), 3.42 (*ps t*, $J = 8.9$ Hz, 1H, ^4CH), 3.29 (m, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 3.10 (*br dd*, $J = 10.9, 4.3$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 3.04-2.85 (m, 2H, $^8\text{CH}_2$), 2.84-2.66 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$), 2.37 (*br d*, $J = 8.6$ Hz, 1H, ^2CH), 2.28 (*ps t*, $J = 10.6$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 156.5 ($^{22}\text{C}_q$), 145.7 ($^{10}\text{C}_q$), 139.0 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 137.9 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 136.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.2 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 122.3 (^{11}CH), 87.3 (^4CH), 78.6 (^3CH), 78.5 (^5CH), 75.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 75.3 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.5 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 70.6, 70.5, 70.5, 70.5, 70.5, 70.3, 70.1 ($^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$), 69.6 ($^{13}\text{CH}_2$), 66.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 65.9 ($^7\text{CH}_2$), 63.5 (^2CH), 54.3 ($^6\text{CH}_2$), 52.0 ($^8\text{CH}_2$), 50.0 ($^{12}\text{CH}_2$), 40.9 ($^{21}\text{CH}_2$), 20.5 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{56}\text{H}_{70}\text{N}_5\text{O}_{10}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 972.51172, found 972.50970.

(2R,3R,4R,5S)-1-(2-(1-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (38a)



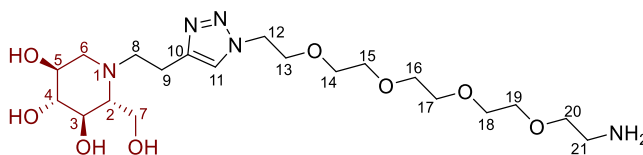
To a solution of **37a** (47 mg, 53 μmol) in methanol (1.0 mL) was added palladium on charcoal (10% wt, 11 mg, 10 μmol). The flask was purged with argon and filled with dihydrogen (1 atm) then hydrochloric acid (2.0 M in Et₂O, 212 μL , 424 μmol) was added. The mixture was stirred at room temperature during 5 days, then it was filtered on celite (rinsed with MeOH), and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by ion exchange resin (Dowex 50W-X8, H⁺ form), eluting with H₂O and 1.0 M aqueous solution of NH₄OH to afford **38a** as a colourless oil (19 mg, **90%**). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -8.59$ (*c* 0.75, CH₃OH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.85 (s, 1H, ¹¹CH), 4.56 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, ¹²CH₂), 3.95 (dd, *J* = 12.0, 2.4 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.90 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, ¹³CH₂), 3.85 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.69-3.57 (m, 4H, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂), 3.54 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, ¹⁶CH₂), 3.51-3.44 (m, 1H, ⁵CH), 3.35 (*ps* t, *J* = 9.2 Hz, 1H, ³CH), 3.21-3.13 (m, 2H, ⁴CH, ⁸CH₂), 3.07 (dd, *J* = 11.1, 4.8 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.95-2.85 (m, 5H, ⁸CH₂, ⁹CH₂, ¹⁷CH₂), 2.28 (*ps* t, *J* = 10.8 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.21 (dt, *J* = 9.4, 2.6 Hz, 1H, ²CH).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 147.0 (¹⁰C_q), 124.3 (¹¹CH), 80.6 (⁴CH), 72.0 (³CH), 71.6, 71.4 (¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂), 71.3 (¹⁶CH₂), 70.8 (⁵CH), 70.4 (¹³CH₂), 67.2 (²CH), 59.5 (⁷CH₂), 57.7 (⁶CH₂), 53.0 (⁸CH₂), 51.3 (¹²CH₂), 41.6 (¹⁷CH₂), 22.0 (⁹CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₁₆H₃₂O₆N₅ [M + H]⁺: *m/z* : 390.23471, found 390.23406.

(2R,3R,4R,5S)-1-(2-(1-(14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (38b)



To a solution of **37b** (22 mg, 23 μmol) in methanol (1.0 mL) was added palladium on charcoal (10% wt, 7 mg, 7 μmol). The flask was purged with argon and filled with dihydrogen (1 atm) then hydrochloric acid (2.0 M in Et₂O, 90 μL , 180 μmol) was added. The mixture was stirred at room temperature during 3 days, then it was filtered on celite (rinsed with MeOH), and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by ion exchange resin (Dowex 50W-X8, H⁺ form), eluting with H₂O and 1.0 M aqueous solution of NH₄OH to afford **38b** as a colourless oil (12 mg, **quantitative**). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -9.43$ (*c* 0.70, CH₃OH).

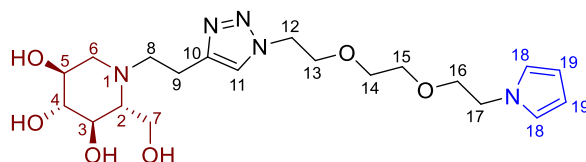
Partie expérimentale

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.87 (s, 1H, ^{11}CH), 4.56 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 3.96 (dd, $J = 12.0$, 2.4 Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.90 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.87 (dd, $J = 12.0$, 2.9 Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.73-3.57 (m, 14H, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$), 3.52-3.45 (m, 1H, ^5CH), 3.37 (*ps* t, $J = 9.5$ Hz, 1H, ^3CH), 3.20-3.14 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.17 (*ps* t, $J = 9.0$ Hz, 1H, ^4CH), 3.08 (dd, $J = 11.0$, 4.8 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.96 (t, 5.2 Hz, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 2.94-2.88 (m, 3H, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 2.29 (*ps* t, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.22 (dt, $J = 9.4$, 2.6 Hz, 1H, ^2CH).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 147.0 ($^{10}\text{C}_q$), 124.4 (^{11}CH), 80.6 (^4CH), 72.0 (^3CH), 71.5, 71.5, 71.5, 71.4, 71.4, 71.2, 70.9 ($^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$), 70.8 (^5CH), 70.4 ($^{13}\text{CH}_2$), 67.2 (^2CH), 59.5 ($^7\text{CH}_2$), 57.7 ($^6\text{CH}_2$), 53.0 ($^8\text{CH}_2$), 51.3 ($^{12}\text{CH}_2$), 41.4 ($^{21}\text{CH}_2$), 22.0 ($^9\text{CH}_2$)

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_8$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 478.28714, found 478.28614.

(2R,3R,4R,5S)-1-(2-(1-(2-(2-(2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (40a)

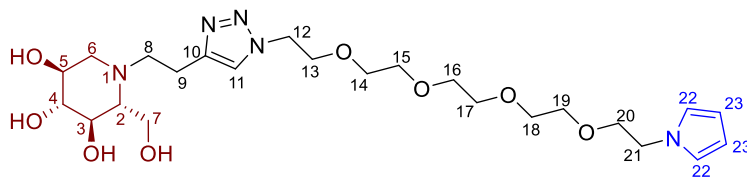


38a (22 mg, 56 μmol) was dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (2:1, 900 μL), the resulting solution was flushed with argon by argon/vacuum sequences, then 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (7.3 μL , 56 μmol) was added. The resulting solution was heated to 30 $^\circ\text{C}$ and stirred at this temperature, and reaction was monitored by TLC (revealed with ninhydrin). After 3 hours, another portion of 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (2.5 μL , 19 μmol) was added. After 45 minutes reaction was found completed by TLC. The brown reaction mixture was then diluted with water, washed with EtOAc, and concentrated to dryness under reduced pressure to afford 24 mg of a dark thick oil as crude product. Purification of 7 mg of this oil by RP-HPLC afforded pure **40a** (3.5 mg), leading to an estimated yield of **48%**.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.76 (s, 1H, ^{11}CH), 6.72 (*ps* t, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{18}CH), 6.04 (*ps* t, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{19}CH), 4.49 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 4.04 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.95 (dd, $J = 12.0$, 2.5 Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.86 (dd, $J = 12.0$, 2.9 Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.83 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.70 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $^{16}\text{CH}_2$), 3.59-3.55 (m, 2H, $^{14}\text{CH}_2$), 3.54-3.51 (m, 2H, $^{15}\text{CH}_2$), 3.51-3.45 (m, 1H, ^5CH), 3.37 (*ps* t, $J = 9.2$ Hz, 1H, ^3CH), 3.18-3.11 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.17 (*ps* t, $J = 9.0$ Hz, 1H, ^4CH), 3.07 (dd, $J = 11.1$, 4.8 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.96-2.85 (m, 3H, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 2.29 (*ps* t, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.11 (dt, $J = 9.4$, 2.7 Hz, 1H, ^2CH).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 146.9 ($^{10}\text{C}_q$), 124.4 (^{11}CH), 121.9 (^{18}CH), 108.8 (^{19}CH), 80.6 (^4CH), 72.4 ($^{16}\text{CH}_2$), 72.0 (^3CH), 71.6 ($^{15}\text{CH}_2$), 71.4 ($^{14}\text{CH}_2$), 70.8 (^5CH), 70.4 ($^{13}\text{CH}_2$), 67.1 (^2CH), 59.5 ($^7\text{CH}_2$), 57.7 ($^6\text{CH}_2$), 53.1 ($^8\text{CH}_2$), 51.4 ($^{12}\text{CH}_2$), 50.3 ($^{17}\text{CH}_2$), 21.9 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 440.25036, found 440.24951.

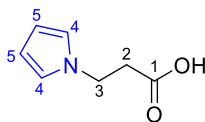
(2R,3R,4R,5S)-1-(2-(1-(14-(1H-Pyrrol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (40b)

38b (28 mg, 59 μmol) was dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (2:1, 900 μL), the resulting solution was flushed with argon by argon/vacuum sequences, then 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (7.5 μL , 59 μmol) was added. The resulting solution was heated to 40 $^\circ\text{C}$ and stirred at this temperature during 3 hours. The brown reaction mixture was diluted with water, washed with Et_2O , and concentrated to dryness under reduced pressure. The obtained residue was purified by RP-HPLC to afford pure **40b** (16 mg, **54%**).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.85 (s, 1H, ^{11}CH), 6.73 (*ps t*, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{22}CH), 6.03 (*ps t*, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{23}CH), 4.53 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 4.06 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 3.96 (dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.88 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.88-3.84 (m, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.73 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $^{20}\text{CH}_2$), 3.65-3.54 (m, 12H, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$), 3.52-3.45 (m, 1H, ^5CH), 3.41-3.35 (m, 1H, ^3CH), 3.23-3.12 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.17 (*ps t*, $J = 9.1$ Hz, 1H, ^4CH), 3.08 (dd, $J = 11.1, 4.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.96-2.87 (m, 3H, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 2.30 (*ps t*, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.24 (dt, $J = 9.3, 2.6$ Hz, 1H, ^2CH).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 147.0 ($^{10}\text{C}_q$), 124.6 (^{11}CH), 122.0 (^{22}CH), 108.8 (^{23}CH), 80.6 (^4CH), 72.5 ($^{20}\text{CH}_2$), 72.0 (^3CH), 71.6, 71.6, 71.5, 71.5, 71.5, 71.5 ($^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$), 70.8 (^5CH), 70.5 ($^{13}\text{CH}_2$), 67.2 (^2CH), 59.5 ($^7\text{CH}_2$), 57.7 ($^6\text{CH}_2$), 53.1 ($^8\text{CH}_2$), 51.4 ($^{12}\text{CH}_2$), 50.3 ($^{21}\text{CH}_2$), 22.0 ($^9\text{CH}_2$).

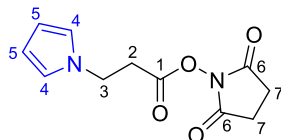
HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 528.30279, found 528.30153.

3-(1H-Pyrrol-1-yl)propanoic acid (42)

2,5-dimethoxytetrahydrofuran (3.1 mL, 23.7 mmol) was added to a stirred solution of 3-aminopropanoic acid (2.0 g, 22.4 mmol) in $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ mixture (3:2, 50 mL), then the latter was warmed to 70 $^\circ\text{C}$ and reacted overnight. After having been cooled down to room temperature, resulting mixture was extracted 3 times with EtOAc , washed with brine, and dried over magnesium sulfate. Evaporation under reduced pressure afforded a dark brown oil as crude product. The latter was purified by DCVC (Cyclohexane to EtOAc) to afford pure **42** (1.82 g, **58%**) as white solid. $R_f = 0.16$ in Cyclohexane/ EtOAc 2:1.

^1H NMR (500 MHz, (DMSO- d_6) δ 6.73 (*ps* t, J = 2.0 Hz, 2H, ^4CH), 5.95 (*ps* t, J = 1.9 Hz, 2H, ^5CH), 4.08 (t, J = 6.9 Hz, 2H, ^3CH), 2.67 (t, J = 6.9 Hz, 2H, ^2CH).

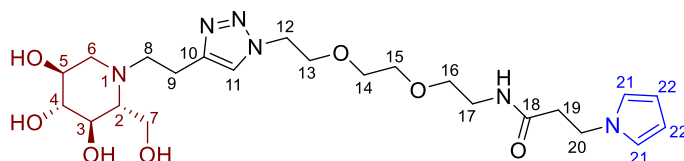
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(1H-pyrrol-1-yl)propanoate (43)



According to cited procedure,⁹⁴ **42** (454 mg, 3.26 mmol) was dissolved in water. *N*-hydroxysuccinimide (575 mg, 5.00 mmol) was added to the resulting solution, followed by EDC (1.25 g, 6.52 mmol). After 17 h, the white precipitate was recovered by filtration under vacuum and rinsed with water to afford **43** (657 mg, **85%**) as a white powder which was used in the next steps without further purification. Rf = 0.45 in Cyclohexane/EtOAc 1:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.70 (*ps* t, J = 2.1 Hz, 2H, ^4CH), 6.17 (*ps* t, J = 2.1 Hz, 2H, ^5CH), 4.31 (t, J = 7.1 Hz, 2H, ^3CH), 3.08 (t, J = 7.1 Hz, 2H, ^2CH), 2.85 (s, 4H, $^7\text{CH}_2$).

3-(1H-Pyrrol-1-yl)-N-(2-(2-(2-(4-(2-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidin-1-yl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethyl)propanamide (44a)



To a solution of **38a** (19 mg, 49 μmol) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 1.5 mL) was added **43** (13 mg, 55 μmol), and 3 drops of triethylamine. This solution was stirred during 20 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by RP-HPLC to afford pure **44a** (12 mg, **48%**). $[\alpha]_D^{20}$ -6.67 (0.60, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.82 (s, 1H, ^{11}CH), 6.67 (*ps* t, J = 2.0 Hz, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 6.01 (*ps* t, J = 2.0 Hz, 2H, $^{22}\text{CH}_2$), 4.54 (t, J = 5.0 Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 4.20 (t, J = 6.5 Hz, 2H, $^{20}\text{CH}_2$), 3.96 (dd, J = 12.0, 2.4 Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.88 (t, J = 5.0 Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.88-3.83 (m, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.64-3.52 (m, 4H, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$), 3.52-3.43 (m, 1H, ^5CH), 3.44 (t, J = 5.5 Hz, 2H, $^{16}\text{CH}_2$), 3.37 (*ps* t, J = 9.2 Hz, 1H, ^3CH), 3.33-3.28 (m, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.21-3.13 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.17 (*ps* t, J = 9.0 Hz, 1H, ^4CH), 3.08 (dd, J = 11.1, 4.8 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.96-2.86 (m, 3H, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 2.62 (t, J = 6.6 Hz, 2H, $^{19}\text{CH}_2$), 2.29 (*ps* t, J = 10.8 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.23 (dt, J = 9.4, 2.5 Hz, 1H, ^2CH).

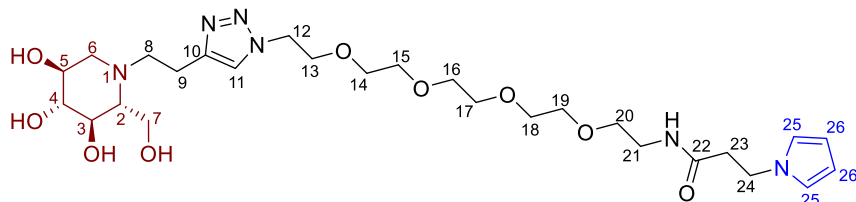
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.4 ($^{18}\text{C}_q$), 146.4 ($^{10}\text{C}_q$), 124.5 (^{11}CH), 121.5 (^{21}CH), 108.9 (^{22}CH), 80.1 (^4CH), 71.4 (^3CH), 71.4, 71.2 ($^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$), 70.5, 70.4 ($^{13}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$), 70.3 (^5CH), 67.2 (^2CH), 58.7 ($^7\text{CH}_2$), 57.2 ($^6\text{CH}_2$), 53.1 ($^8\text{CH}_2$), 51.3 ($^{12}\text{CH}_2$), 46.5 ($^{20}\text{CH}_2$), 40.4 ($^{17}\text{CH}_2$), 39.3 ($^{19}\text{CH}_2$), 21.8

Partie expérimentale

($^9\text{CH}_2$). NOESY correlation between ^{11}CH (δ 7.82 ppm) and $^{12}\text{CH}_2$ (δ 4.54 ppm), ^{11}CH (δ 7.82 ppm) and $^{13}\text{CH}_2$ (δ 3.88 ppm).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{N}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 511.28747, found 511.28573.

3-(1*H*-Pyrrol-1-yl)-*N*-(14-(4-(2-((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4,5-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidin-1-yl)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)propanamide (44b)



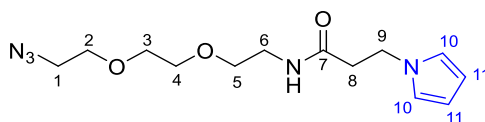
To a solution of **38b** (32 mg, 67 μmol) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 1.0 mL) was added **43** (18 mg, 76 μmol), and 3 drops of triethylamine. This solution was stirred during 19 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by RP-HPLC to afford pure **44b** (21 mg, **52%**). $[\alpha]_D^{20}$ -7.24 (c 1.05, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.83 (s, 1H, ^{11}CH), 6.65 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, $^{25}\text{CH}_2$), 6.00 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, $^{26}\text{CH}_2$), 4.52 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 4.18 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $^{24}\text{CH}_2$), 3.94 (dd, $J = 12.0$, 2.3 Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.86 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.88-3.82 (m, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.63-3.53 (m, 13H, ^5CH , $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$), 3.46 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $^{20}\text{CH}_2$), 3.35 (*ps* t, $J = 9.2$ Hz, 1H, ^3CH), 3.33-3.28 (m, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 3.15 (*ps* t, $J = 9.0$ Hz, 1H, ^4CH), 3.20-3.10 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.06 (dd, $J = 11.1$, 4.8 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.93-2.85 (m, 3H, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 2.60 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $^{23}\text{CH}_2$), 2.28 (*ps* t, $J = 10.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.21 (dt, $J = 9.3$, 2.7 Hz, 1H, ^2CH).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.4 ($^{22}\text{C}_q$), 146.9 ($^{10}\text{C}_q$), 124.4 (^{11}CH), 121.5 (^{25}CH), 108.9 (^{26}CH), 80.6 (^4CH), 72.0 (^3CH), 71.5, 71.5, 71.5, 71.5, 71.5, 71.3, ($^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$), 70.8 (^5CH), 70.5 ($^{20}\text{CH}_2$), 70.4, ($^{13}\text{CH}_2$), 67.2 (^2CH), 59.5 ($^7\text{CH}_2$), 57.7 ($^6\text{CH}_2$), 53.1 ($^8\text{CH}_2$), 51.4 ($^{12}\text{CH}_2$), 46.6 ($^{24}\text{CH}_2$), 40.4 ($^{21}\text{CH}_2$), 39.4 ($^{23}\text{CH}_2$), 22.0 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}_9\text{N}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 599.33990, found 599.33837.

N-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(1*H*-pyrrol-1-yl)propanamide (45a)



To a solution of **33a** (71 mg, 408 μmol) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 2.25 mL) was added **43** (96 mg, 406 μmol), and 3 drops of triethylamine. The mixture was stirred for 19 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure to afford the crude product. The residue was purified by DCVC (Cyclohexane/EtOAc 1:1 to EtOAc / MeOH 9:1) to afford pure **45a** (100 mg, **83%**).

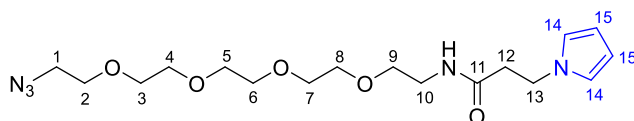
Partie expérimentale

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.61 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, ^{10}CH), 6.16 (*br* s, 1H, NH), 6.07 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, ^{11}CH), 4.18 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $^9\text{CH}_2$), 3.63 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, $^2\text{CH}_2$), 3.60-3.52 (m, 4H, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$), 3.46 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^5\text{CH}_2$), 3.37 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^6\text{CH}_2$), 3.34 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 2.55 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $^8\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.4 ($^7\text{C}_q$), 120.5 (^{10}CH), 108.2 (^{11}CH), 70.3, 70.0, 69.9 ($^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$), 69.5 ($^5\text{CH}_2$), 50.5 ($^1\text{CH}_2$), 45.5 ($^8\text{CH}_2$), 39.2 ($^6\text{CH}_2$), 38.6 ($^8\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 296.17172 found 296.17114.

N-(14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-3-(1*H*-pyrrol-1-yl)propenamide (**45b**)



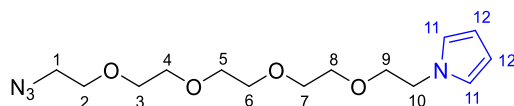
To a solution of **33b** (25 mg, 95 μmol) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 1.5 mL) was added **43** (24 mg, 102 μmol), and 3 drops of triethylamine. The mixture was stirred during 19 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure to afford crude product. The residue was purified by DCVC (EtoAc to EtOAc / MeOH 9:1) to afford pure **45b** (23 mg, **64%**). $R_f = 0.61$ in EtOAc/MeOH 9:1.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.64 (*ps* t, $J = 1.9$ Hz, 2H, ^{14}CH), 6.33 (*br* s, 1H, NH), 6.09 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, ^{15}CH), 4.21 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 3.69-3.52 (m, 14H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 3.48 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^9\text{CH}_2$), 3.43-3.37 (m, 2H, $^{10}\text{CH}_2$), 3.35 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 2.59 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $^{12}\text{CH}_2$),

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.2 ($^{11}\text{C}_q$), 120.6 (^{14}CH), 108.3 (^{15}CH), 70.7, 70.7, 70.6, 70.5, 70.5, 70.2, 70.0, 69.8 ($^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 50.7 ($^1\text{CH}_2$), 45.7 ($^{13}\text{CH}_2$), 39.4 ($^{10}\text{CH}_2$), 38.8 ($^{12}\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 384.22415 found 384.22389.

1-(14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-1*H*-pyrrole (**34b**)

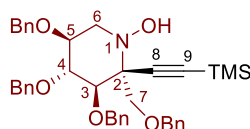


To a stirred solution of **33b** (74 mg, 282 μmol) in acetic acid (1.0 mL) was added 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (40 μL , 310 μmol). The mixture was warmed to 40 $^\circ\text{C}$ then 0.2 mL of H_2O were added. After 1 h 10, reaction was monitored by TLC (revealed with ninhydrin) and remaining amine **33b** was evidenced. Because of a deep dark stain, reaction was stopped despite being not completed. Solvents were removed by evaporation under reduced pressure to afford the crude. Purification by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc 1:1 to EtOAc) afforded **34b** (17.5 mg, **20%**).

Partie expérimentale

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.70 (*ps* t, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{11}CH), 6.13 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, ^{12}CH), 4.06 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, $^{10}\text{CH}_2$), 3.74 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, $^9\text{CH}_2$), 3.70-3.54 (m, 16H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$), 3.42-3.35 (m, 2H, $^1\text{CH}_2$).

(2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4,5-Tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-2-((trimethylsilyl)ethynyl)piperidin-1-ol (93)



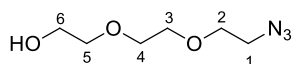
A solution of freshly distilled ethynyltrimethylsilane (630 μL , 4.55 mmol) in dry toluene (3 mL) was cooled to 0 $^\circ\text{C}$ before addition of diethylzinc (1.0 M in hexane, 2.30 mL, 2.30 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 30 min. A solution of nitrone **3** (600 mg, 1.12 mmol) in dry toluene (7 mL) was then added, and the resulting mixture was stirred from 0 $^\circ\text{C}$ to room temperature for 5 hours. Diethyl ether and a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate were then added, and the resulting mixture was extracted (3 times) with Et_2O . The combined organic layers were washed with brine and dried with MgSO_4 , filtered and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification of crude product by flash chromatography (Pentane/ EtOAc , 9:1 to 4:1) gave hydroxylamine **93** (626 mg, **88%**) as a clear oil. $R_f = 0.44$ in Pentane/ EtOAc 3:1. One fraction (232 mg, 33%) was isolated as white crystals. $[\alpha]_D^{20} -49.5$ (c 0.60; CHCl_3). IR ν 3381 (m), 3088 (m), 3064 (m), 3030 (m), 2954 (m), 2858 (s), 1497 (m), 1453 (m), 1363 (m), 1250 (m), 1204 (m), 1097 (s), 1063 (s), 1028 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.03 (m, 20H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.32 (*br* s, 1H, OH), 4.80 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.78 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.67 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.59 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.56 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.44 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.31 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 3.78-3.69 (m, 1H, ^4CH), 3.72 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.65 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, ^3CH), 3.61 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.63-3.53 (m, 1H, ^5CH), 3.36 (dd, $J = 10.2, 5.0$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 3.00 (*ps* t, $J = 10.0$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 0.12 (s, 9H, $^{\text{TMS}}\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 139.1 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.2 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 137.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 126.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 99.1 ($^8\text{C}_q$), 95.3 ($^9\text{C}_q$), 83.9 (^4CH), 77.2 (^3CH), 75.9 (^5CH), 75.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 74.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.0 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 70.4 ($^2\text{C}_q$), 68.7 ($^7\text{CH}_2$), 56.6 ($^6\text{CH}_2$), 0.2 ($^{\text{TMS}}\text{CH}_3$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{NSi}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 636.3140, found 636.3140.

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (94a)

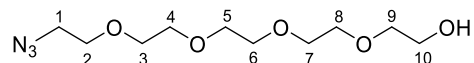


Partie expérimentale

In a round bottom flask, triethylene glycol (2.49 g, 16.5 mmol) was dissolved in dry DCM and the solution was cooled to 0 °C. Triethylamine (0.86 mL, 6.19 mmol) was first injected, then methanesulfonyl chloride (326 μ L, 4.12 mmol) was injected dropwise under vigorous stirring. After addition of methanesulfonyl chloride, the reaction mixture was allowed to warm up at room temperature and stirred for 1.5 hour. The reaction mixture was concentrated by evaporation of the solvent under reduced pressure, dissolved in EtOAc and filtered under vacuum to remove mesylate salts. The filtrate was concentrated by evaporation under reduced pressure and the crude product was used in the next step without further purification. The latter was diluted in EtOH (20 mL) and after addition of sodium azide (540 mg, 8.31 mmol) the resulting mixture was refluxed during 4 hours. Then it was cooled down, concentrated under vacuum, diluted in water, and extracted with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, and evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 3:1 to EtOAc) afforded **94a** (m = 530 mg, **73%**). Rf = 0.18 in Pentane/EtOAc 1:1.

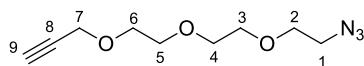
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.80-3.73 (m, 2H, $^6\text{CH}_2$), 3.73-3.67 (m, 6H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$), 3.64 (t, $J = 4.2$ Hz, 2H, $^5\text{CH}_2$), 3.42 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 2.30 (s, 1H, OH), in accordance with literature.¹²¹

14-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-ol (**94b**)



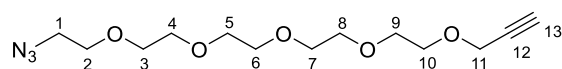
In a round bottom flask, pentaethylene glycol (1.37 g, 5.75 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (18 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C. Triethylamine (400 μ L, 2.87 mmol) was added, then methanesulfonyl chloride (148 μ L, 1.91 mmol) was injected dropwise under vigorous stirring. After complete addition of methanesulfonyl chloride, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1.5 hour. The obtained mixture was diluted in EtOAc, filtered under vacuum and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford an oil which was used without further purification. The latter was diluted in EtOH (20 mL) and after addition of sodium azide (186 mg, 2.86 mmol) the mixture was refluxed. After 17 hours it was cooled to room temperature, concentrated under vacuum, diluted in water, and extracted with EtOAc. The organic layers were combined, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, and evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 2:1 to EtOAc) afforded **94b** (m = 370 mg, **74%**). Rf = 0.27 in EtOAc/Cyclohexane 1:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.77-3.70 (m, 2H, $^{10}\text{CH}_2$), 3.70-3.63 (m, 14H, $^2\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^4\text{CH}_2$, $^5\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 3.61 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H, $^9\text{CH}_2$), 3.38 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 2.54 (br s, 1H, OH).

3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-yne (95a)

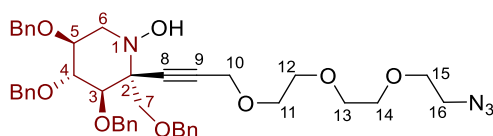
According to cited reference,¹²² into a solution of **94a** (127 mg, 725 μ mol) in toluene (2.1 mL) was added saturated aqueous solution of sodium hydroxide (1.75 mL). Then tetra-*n*-butylammonium bromide (5 mg, 15 μ mol) was added, followed by propargyl bromide (80% wt in toluene, 242 μ L, 2.18 mmol). After 5 days, the reaction mixture was diluted in EtOAc/H₂O mixture, extracted with EtOAc (3 times), washed with brine and dried over magnesium sulfate. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by DCVC (Cyclohexane to EtOAc/Cyclohexane 1:1) to afford **95a** (153 mg, **85%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.21 (d, J = 2.3 Hz, 2H, ⁷CH₂), 3.74-3.64 (m, 10H, ²CH₂, ³CH₂, ⁴CH₂, ⁵CH₂, ⁶CH₂), 3.39 (t, J = 5.1 Hz, 2H, ¹CH₂), 2.42 (t, J = 2.3 Hz, 1H, ⁹CH). In accordance with the cited literature.¹²²

1-Azido-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadec-17-yne (95b)

According to the cited procedure,¹²² into a solution of **94b** (180 mg, 684 μ mol) in toluene (1.5 mL) was added a saturated aqueous solution of sodium hydroxide (1.0 mL) and tetra-*n*-butylammonium bromide (10 mg, 31 μ mol). Under vigorous stirring, propargyl bromide (80% wt in toluene, 230 μ L, 2.07 mmol) was added dropwise and the resulting mixture was reacted at room temperature. After 17 hours the reaction mixture was diluted in EtOAc/H₂O, extracted with EtOAc (3 times) and washed with brine. Drying over anhydrous magnesium sulfate and evaporation under reduced pressure afforded the crude product as an oil. Purification by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc 2:1 to EtOAc) afforded **95b** (153 mg, **85%**). R_f = 0.23 in EtOAc / Cyclohexane 1:1.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.19 (d, J = 4.25 Hz, 2H, ¹¹CH₂), 3.76-3.59 (m, 18H, ²CH₂, ³CH₂, ⁴CH₂, ⁵CH₂, ⁶CH₂, ⁷CH₂, ⁸CH₂, ⁹CH₂, ¹⁰CH₂), 3.37 (t, J = 5.0 Hz, 2H, ¹CH₂), 2.42 (t, J = 2.3 Hz, 1H, ¹³CH).

(2R,3R,4R,5S)-2-(3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-yn-1-yl)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidin-1-ol (96a)

A solution of **95a** (150 mg, 703 μ mol) in dry toluene (1.0 mL) was cooled to 0 °C before addition of diethylzinc (1.0 M in hexane, 350 μ L, 350 μ mol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 45 min.

Partie expérimentale

A solution of nitron **3** (132 mg, 246 μmol) in dry toluene (1.5 mL) was then added, and the resulting mixture was stirred from 0 °C to room temperature during 3 hours.

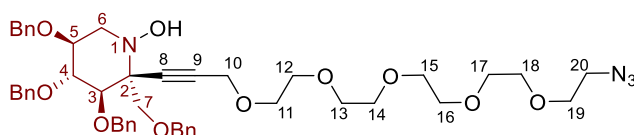
The reactional mixture was diluted in EtOAc/H₂O mixture and the latter was extracted (3 times) with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification of crude product by DCVC (Cyclohexane to Cyclohexane/EtOAc 1:1) afforded hydroxylamine **96a** (135 mg, **73%**) as a clear oil. $R_f = 0.40$ in Cyclohexane/EtOAc 1:1. $[\alpha]_D^{20} -31.2$ (c 1.05; CHCl₃). IR ν 3377 (m), 3063 (w), 3030 (w), 2867 (s), 2103 (m), 1497 (w) 1454 (m), 1362(m), 1297 (w), 1209 (w), 1071 (s), 1028 (m) cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.13 (m, 18H, ^{Ar}CH), 7.13-7.08 (m, 2H, ^{Ar}CH), 5.28 (s, 1H, OH), 4.82 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.79 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.70 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.61 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.58 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.46 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.44 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.35 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.19 (s, 2H, ¹⁰CH₂), 3.78-3.71 (m, 2H, ⁴CH, ⁷CH₂), 3.70-3.64 (m, 2H, ³CH, ⁷CH₂), 3.63-3.57 (m, 3H, ¹¹CH₂, ⁵CH), 3.56-3.50 (m, 8H, ¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂), 3.38 (dd, $J = 10.2, 5.1$ Hz, 1H, ⁶CH₂), 3.24 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, ¹⁶CH₂), 3.01 (*ps t*, $J = 10.4$ Hz, 1H, ⁶CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 138.7 (^{Ar}C_q), 138.6 (^{Ar}C_q), 138.1 (^{Ar}C_q), 137.5 (^{Ar}C_q), 128.5 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.2 (^{Ar}CH), 128.1 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.4 (^{Ar}CH), 127.4 (^{Ar}CH), 85.8 (⁸C_q), 84.2 (⁴CH), 80.1 (⁹C_q), 77.3 (³CH), 76.0 (⁵CH), 75.6 (^{Bn}CH₂), 75.4 (^{Bn}CH₂), 73.5 (^{Bn}CH₂), 73.1 (^{Bn}CH₂), 70.7, 70.6, 70.5, 70.0 (¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂), 69.7 (²C_q), 68.8 (¹¹CH₂), 68.7 (⁷CH₂), 58.7 (¹⁰CH₂), 56.5 (⁶CH₂), 50.7 (¹⁶CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₄₃H₅₁O₈N₄ [M + H]⁺: m/z : 751.37014, found 751.36948.

(2R,3R,4R,5S)-2-(1-Azido-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadec-17-yn-18-yl)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)piperidin-1-ol (**96b**)



A solution of **95b** (120 mg, 398 μmol) in dry toluene (600 μL) was cooled to 0 °C before addition of diethylzinc (1.0 M in hexane, 200 μL , 200 μmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 35 min. A solution of nitron **3** (105 mg, 195 μmol) in dry toluene (1.2 mL) was then added, and the resulting mixture was stirred from 0 °C to room temperature during 4.5 hours, before being quenched with aqueous saturated solution of NH₄Cl. The reactional mixture was diluted in EtOAc/H₂O mixture and the latter was extracted (3 times) with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification of crude product by flash chromatography (Et₂O/MeOH/Et₃N 99.4:0.3:0.3) afforded

hydroxylamine **96b** (105 mg, **64%**) as a clear oil. Rf = 0.18 in Et₂O/MeOH/Et₃N (99.4:0.3:0.3). $[\alpha]_D^{20}$ -24.9 (*c* 2.70; CHCl₃).

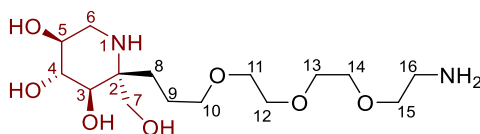
IR ν 3378 (m), 3088 (w), 3063 (m), 3031 (m), 3030 (w), 2869 (s), 2105 (m), 1956 (w), 1880 (w), 1813 (w), 1738 (w), 1586 (w), 1497 (m), 1454 (m), 1361 (m), 1301 (m), 1249 (w), 1104 (s), 1028 (m) cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.14 (m, 18H, ^{Ar}CH), 7.14-7.10 (m, 2H, ^{Ar}CH), 5.00 (s, 1H, OH), 4.82 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.80 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.70 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.62 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.59 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.47 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.46 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.38 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.19 (s, 2H, ¹⁰CH₂), 3.79-3.71 (m, 2H, ⁴CH, ⁷CH₂), 3.70-3.64 (m, 2H, ³CH, ⁷CH₂), 3.63-3.57 (m, 19H, ⁵CH, ¹¹CH₂, ¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂, ¹⁶CH₂, ¹⁷CH₂, ¹⁸CH₂, ¹⁹CH₂), 3.38 (dd, *J* = 10.2, 5.1 Hz, 1H, ⁶CH₂), 3.24 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, ²⁰CH₂), 2.99 (*ps* t, *J* = 10.3 Hz, 1H, ⁶CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 138.8 (^{Ar}C_q), 138.7 (^{Ar}C_q), 138.2 (^{Ar}C_q), 137.7 (^{Ar}C_q), 128.5 (^{Ar}CH), 128.5 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.3 (^{Ar}CH), 128.2 (^{Ar}CH), 128.0 (^{Ar}CH), 128.0 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 85.9 (⁸C_q), 84.2 (⁴CH), 80.1 (⁹C_q), 77.3 (³CH), 76.0 (⁵CH), 75.7 (^{Bn}CH₂), 75.4 (^{Bn}CH₂), 73.5 (^{Bn}CH₂), 73.1 (^{Bn}CH₂), 70.8, 70.7, 70.7, 70.7, 70.6, 70.6, 70.5, (¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂, ¹⁶CH₂, ¹⁷CH₂, ¹⁸CH₂), 70.1 (¹⁹CH₂), 69.8 (²C_q), 68.9 (¹¹CH₂), 68.7 (⁷CH₂), 58.7 (¹⁰CH₂), 56.5 (⁶CH₂), 50.8 (²⁰CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₄₇H₅₉O₁₀N₄ [M + H]⁺: *m/z* : 839.42257, found 839.42186.

(2R,3R,4R,5S)-2-(3-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (97a)



To a solution of **96a** (117 mg, 156 μ mol) in EtOAc (4.0 mL) was added palladium on charcoal (10% wt, 17.0 mg, 16 μ mol). Flash was purged with argon, then it was filled with hydrogen (atmospheric pressure) and reaction was proceeded at room temperature. After 2 days, EtOAc was evaporated under vacuum, and replaced by methanol (4.0 mL). The flask was filled with hydrogen (atmospheric pressure), then hydrogen chloride was injected (2.0 M in Et₂O, 468 μ L, 936 μ mol) and the resulting mixture was reacted at room temperature. After 3 days, it was filtered on celite (rinsed with MeOH), and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by ion exchange resin (Dowex 50W-X8, H⁺ form), eluting with H₂O and 1.0 M aqueous solution of NH₄OH to afford **97a** as a colourless oil (53 mg, **96%**).

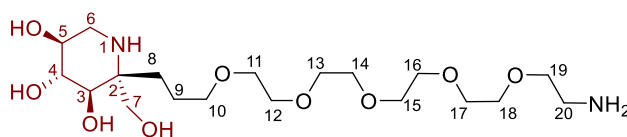
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 3.73-3.55 (m, 11H, ⁷CH₂, ¹¹CH₂, ¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂), 3.52-3.44 (m, 4H, ³CH, ⁴CH, ¹⁰CH₂), 3.41 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.39-3.32 (m, 1H, ⁵CH), 2.91 (t, *J* =

5.2 Hz, 2H, $^{16}\text{CH}_2$), 2.86 (dd, $J = 12.6, 5.9$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.51 (dd, $J = 12.8, 10.9$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 1.72-1.46 (m, 4H, $^8\text{CH}_2, ^9\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 76.5 (^4CH), 75.3 (^3CH), 73.9 (^5CH), 72.8 ($^{10}\text{CH}_2$), 71.6, 71.5, 71.5, 71.2, 71.1 ($^{11}\text{CH}_2, ^{12}\text{CH}_2, ^{13}\text{CH}_2, ^{14}\text{CH}_2, ^{15}\text{CH}_2$), 65.7 ($^7\text{CH}_2$), 60.0 ($^2\text{C}_q$), 45.9 ($^6\text{CH}_2$), 41.6 ($^{16}\text{CH}_2$), 24.4 ($^8\text{CH}_2$), 23.7 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{33}\text{O}_7\text{N}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 353.22823, found 353.22883.

(2R,3R,4R,5S)-2-(1-Amino-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecan-18-yl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (97b)



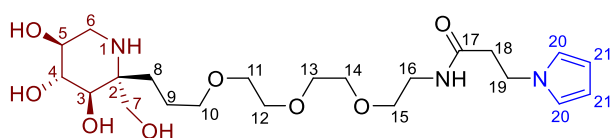
To a solution of **96b** (104 mg, 124 μmol) in EtOAc (3.0 mL) was added palladium on charcoal (10% wt, 13.0 mg, 12.4 μmol). Flash was purged with argon, then it was filled with hydrogen (atmospheric pressure) and reaction was proceeded at room temperature. After 2 days, EtOAc was evaporated under vacuum, and replaced by methanol (3.0 mL). The flask was filled with hydrogen (atmospheric pressure), then hydrogen chloride was injected (2.0 M in Et_2O , 372 μL , 744 μmol) and the resulting mixture was reacted at room temperature. After 3 days, it was filtered on celite (rinsed with MeOH), and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by ion exchange resin (Dowex 50W-X8, H^+ form), eluting with H_2O and 1.0 M aqueous solution of NH_4OH to afford **97b** as a colourless oil (38 mg, 70%).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 3.72-3.52 (m, 19H, $^7\text{CH}_2, ^{11}\text{CH}_2, ^{12}\text{CH}_2, ^{13}\text{CH}_2, ^{14}\text{CH}_2, ^{15}\text{CH}_2, ^{16}\text{CH}_2, ^{17}\text{CH}_2, ^{18}\text{CH}_2, ^{19}\text{CH}_2$), 3.52-3.44 (m, 4H, $^3\text{CH}, ^4\text{CH}, ^{10}\text{CH}_2$), 3.41 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.39-3.32 (m, 1H, ^5CH), 2.94-2.79 (m, 3H, $^6\text{CH}_2, ^{20}\text{CH}_2$), 2.51 (dd, $J = 12.9, 10.9$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 1.70-1.46 (m, 4H, $^8\text{CH}_2, ^9\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 76.6 (^4CH), 75.3 (^3CH), 73.9 (^5CH), 72.9 ($^{10}\text{CH}_2$), 72.4, 71.5, 71.5, 71.5, 71.5, 71.5, 71.2, 71.1 ($^{11}\text{CH}_2, ^{12}\text{CH}_2, ^{13}\text{CH}_2, ^{14}\text{CH}_2, ^{15}\text{CH}_2, ^{16}\text{CH}_2, ^{17}\text{CH}_2, ^{18}\text{CH}_2, ^{19}\text{CH}_2$), 65.8 ($^7\text{CH}_2$), 60.0 ($^2\text{C}_q$), 45.9 ($^6\text{CH}_2$), 41.8 ($^{20}\text{CH}_2$), 24.4 ($^8\text{CH}_2$), 23.7 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{41}\text{O}_9\text{N}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 441.28066, found 441.27991.

3-(1H-Pyrrol-1-yl)-N-(2-(2-(2-(3-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidin-2-yl)propoxy)ethoxy)ethyl)propanamide (100a)



Partie expérimentale

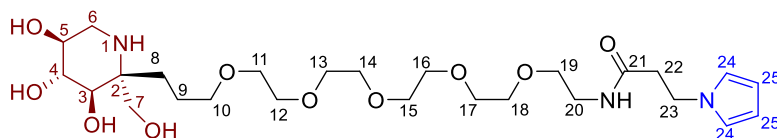
To a solution of **97a** (52 mg, 148 μmol) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 4.0 mL) was added **43** (35 mg, 148 μmol), and 3 drops of triethylamine. This solution was stirred during 19 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by RP-HPLC to afford pure **100a** (48 mg, **68%**). $[\alpha]_D^{20} +0.17$ (2.40, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 6.65 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, $^{20}\text{CH}_2$), 6.01 (*ps* t, $J = 2.0$ Hz, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 4.19 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $^{19}\text{CH}_2$), 3.71 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.67-3.40 (m, 16H, $^{10}\text{CH}_2$, $^{11}\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{13}\text{CH}_2$, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, ^3CH , ^4CH , ^5CH), 3.36-3.31 (m, 2H, $^{16}\text{CH}_2$), 2.99 (dd, $J = 13.0$, 5.2 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.66 (dd, $J = 12.9$, 10.5 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.61 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $^{18}\text{CH}_2$), 1.81-1.66 (m, 2H, $^8\text{CH}_2$), 1.66-1.55 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.4 ($^{17}\text{C}_q$), 121.5 (^{20}CH), 108.9 (^{21}CH), 75.7 (^4CH), 73.9 (^3CH), 72.6 ($^{10}\text{CH}_2$), 72.4 (^5CH), 71.6, 71.5, 71.3, 71.2 ($^{11}\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{13}\text{CH}_2$, $^{14}\text{CH}_2$), 70.5 ($^{15}\text{CH}_2$), 64.3 ($^7\text{CH}_2$), 61.8 ($^2\text{C}_q$), 46.5 ($^{19}\text{CH}_2$), 45.0 ($^6\text{CH}_2$), 40.4 ($^{16}\text{CH}_2$), 39.4 ($^{18}\text{CH}_2$), 24.7 ($^8\text{CH}_2$), 23.7 ($^9\text{CH}_2$). NOESY correlation between $^6\text{CH}_2$ (δ 2.66 ppm) and $^8\text{CH}_2$ (δ 1.81-1.66 ppm).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{N}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 474.28099, found 474.27945.

3-(1H-Pyrrol-1-yl)-N-(18-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihydroxy-2-(hydroxymethyl)piperidin-2-yl)-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecyl)propanamide (100b)



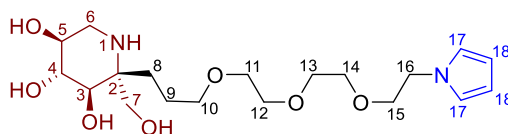
To a solution of **97b** (37 mg, 84 μmol) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, 2.3 mL) was added **43** (20 mg, 85 μmol), and 3 drops of triethylamine. This solution was stirred during 17 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by RP-HPLC to afford pure **100b** (19 mg, **40%**). $[\alpha]_D^{20} +0.32$ (c 0.93, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 6.66 (*ps* t, $J = 2.1$ Hz, 2H, $^{24}\text{CH}_2$), 6.01 (*ps* t, $J = 2.1$ Hz, 2H, $^{25}\text{CH}_2$), 4.19 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $^{23}\text{CH}_2$), 3.71-3.54 (m, 17H, $^{11}\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{13}\text{CH}_2$, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$), 3.54-3.43 (m, 7H, $^{10}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^7\text{CH}_2$, ^3CH , ^4CH), 3.43-3.36 (m, 1H, ^5CH), 3.35-3.30 (m, 2H, $^{20}\text{CH}_2$), 2.92 (dd, $J = 13.0$, 5.5 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.62 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $^{22}\text{CH}_2$), 2.58 (dd, $J = 12.9$, 10.7 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 1.73-1.50 (m, 4H, $^8\text{CH}_2$, $^9\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.4 ($^{21}\text{C}_q$), 121.5 (^{24}CH), 108.9 (^{25}CH), 76.2 (^4CH), 74.8 (^3CH), 73.3 (^5CH), 72.8 ($^{10}\text{CH}_2$), 71.6, 71.5, 71.5, 71.5, 71.5, 71.5, 71.2, 71.2 ($^{11}\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{13}\text{CH}_2$, $^{14}\text{CH}_2$, $^{15}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$, $^{17}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$), 70.5 ($^{19}\text{CH}_2$), 65.2 ($^7\text{CH}_2$), 60.7 ($^2\text{C}_q$), 46.5 ($^{23}\text{CH}_2$), 45.5 ($^6\text{CH}_2$), 40.4 ($^{20}\text{CH}_2$), 39.3 ($^{22}\text{CH}_2$), 24.5 ($^8\text{CH}_2$), 23.7 ($^9\text{CH}_2$). NOESY correlation between $^6\text{CH}_2$ (δ 2.58 ppm) and $^8\text{CH}_2$ (δ 1.73-1.50 ppm).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{N}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 562.33342, found 562.33185.

(2R,3R,4R,5S)-2-(3-(2-(2-(2-(1H-Pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (101a)



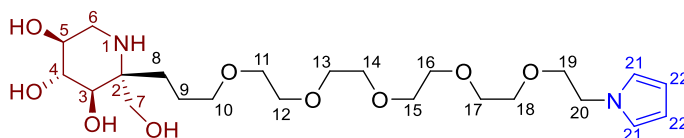
To a solution of **97a** (30 mg, 85 μ mol) in acetic acid (0.25 mL) and water (0.5 mL) was added 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (11 μ L, 85 μ mol), and resulting mixture was warmed to 50 °C. After 3 hours, LC-MS showed an uncompleted reaction and another portion of 2,5-dimethoxytetrahydrofuran was added (5.5 μ L, 42 μ mol). After 2 hours (5 hours from the beginning) reaction was found completed by LC-MS and reaction was stopped. The reaction medium was diluted with water and washed with Et₂O (3 times) then solvents were removed by evaporation under reduced pressure to afford a dark oil as crude product (63 mg). The latter was purified by RP-HPLC to afford pure **101a** (4.3 mg, 13%).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 6.71 (*ps* t, *J* = 2.1 Hz, 2H, ¹⁷CH), 6.02 (*ps* t, *J* = 2.1 Hz, 2H, ¹⁸CH), 4.05 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, ¹⁶CH₂), 3.73 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, ¹⁵CH₂), 3.66 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.66-3.53 (m, 8H, ¹¹CH₂, ¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂), 3.52-3.44 (m, 4H, ³CH, ⁴CH, ¹⁰CH₂), 3.44-3.37 (m, 1H, ⁵CH), 2.93 (dd, *J* = 13.0, 5.4 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.60 (dd, *J* = 13.0, 10.7 Hz, 1H, ⁶CH₂), 1.74-1.65 (m, 2H, ⁸CH₂), 1.65-1.51 (m, 2H, ⁹CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 121.9 (¹⁷CH), 108.7 (¹⁸CH), 76.1 (⁴CH), 74.5 (³CH), 73.0 (⁵CH), 72.7 (¹⁰CH₂), 72.5 (¹⁵CH₂), 71.6, 71.6, 71.5, 71.2 (¹¹CH₂, ¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂), 64.9 (⁷CH₂), 61.0 (²C_q), 50.3 (¹⁶CH₂), 45.4 (⁶CH₂), 24.6 (⁸CH₂), 23.7 (⁹CH₂). NOESY correlation between ⁶CH₂ (δ 2.60 ppm) and ⁸CH₂ (δ 1.74-1.65 ppm).

HRMS (ESI): calculated for C₁₉H₃₅O₇N₂ [M + H]⁺: *m/z* : 403.24388, found 403.24322.

(2R,3R,4R,5S)-2-(1-(1H-Pyrrol-1-yl)-3,6,9,12,15-pentaoxaoctadecan-18-yl)-2-(hydroxymethyl)piperidine-3,4,5-triol (101b)



97b (81 mg, 183 μ mol) was dissolved in AcOH (1.5 mL) and the resulting solution was flushed with argon by argon/vacuum sequences. Then 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (26 μ L, 197 μ mol) was added, followed by milliQ grade water (100 μ L). After 1.5 hour at room temperature, a TLC analysis (revealed with ninhydrin) showed no progression. Another portion of 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (13 μ L, 99 μ mol) was added, followed by milliQ grade water (100 μ L) and the mixture was warmed to 40 °C. After 45 minutes (2 h 15 from the beginning) mixture turned very dark, and a TLC showed

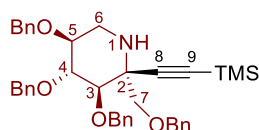
only few traces of remaining **97b**. Reaction was cooled down, and evaporated under reduced pressure to afford a dark oil as crude. The latter was purified by chromatography over silica gel (MeOH / NH₄OH (1.0 M, aq.) 9.5 : 0.5 to 8 : 2) to afford **101b** as an oil with a residual brown stain (82 mg, **91%**). R_f = 0.6 in MeOH/NH₄OH (1.0 M, aq.) 9:1. [α]_D²⁰ -3.1 (*c* 1.00, CH₃OH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.72 (*ps* t, *J* = 2.0 Hz, 2H, ²¹CH), 6.02 (*ps* t, *J* = 2.0 Hz, 2H, ²²CH), 4.06 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, ²⁰CH₂), 3.89 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, ¹⁹CH₂), 3.72-3.68 (m, 2H, ⁵CH, ⁷CH₂), 3.68-3.47 (m, 25H, ³CH, ⁴CH, ¹⁰CH₂, ¹¹CH₂, ¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂, ¹⁶CH₂, ¹⁷CH₂, ¹⁸CH₂), 3.28 (dd, *J* = 12.9, 5.1 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.99 (dd, *J* = 12.8, 10.3 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.10-2.01 (m, 1H, ⁸CH₂), 1.90-1.63 (m, 3H, ⁸CH₂, ⁹CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 121.9 (²¹CH), 108.7 (²⁰CH), 74.0 (⁴CH), 72.4 (¹⁹CH₂), 72.1, 71.6, 71.6, 71.5, 71.5, 71.4, 71.4, 71.3, 71.2 (¹⁰CH₂, ¹¹CH₂, ¹²CH₂, ¹³CH₂, ¹⁴CH₂, ¹⁵CH₂, ¹⁶CH₂, ¹⁷CH₂, ¹⁸CH₂), 70.8 (³CH), 69.2 (⁵CH), 65.1 (²C_q), 61.2 (⁷CH₂), 50.3 (²⁰CH₂), 43.14 (⁶CH₂), 25.3 (⁸CH₂), 23.9 (⁹CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₂₃H₄₃O₅N₂ [M + H]⁺: *m/z* : 491.29631, found 491.29499.

(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-2-((trimethylsilyl)ethynyl)piperidine
(131)



To a stirred solution of hydroxylamine **93** (1.48 g, 2.33 mmol) in EtOH/AcOH (4:1, 40 mL) was added Zinc dust (762 mg, 11.6 mmol). The mixture was placed under ultrasonic irradiation and warmed to 65 °C during 2h30. Reaction mixture was filtered through Celite® to get rid of remaining Zinc and solvents were removed by evaporation under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in EtOAc, a saturated NaHCO₃ aqueous solution was added and the aqueous phase was extracted (3 times) with EtOAc. The organic phases were combined, washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification by DCVC (Cyclohexane to Cyclohexane/EtOAc 2:1) afforded **131** as a colourless oil (1.34 g, **93%**). R_f = 0.36 in Pentane/EtOAc 3:1. [α]_D²⁰ -57.9 (*c* 2.40; CHCl₃). IR ν 3090 (m), 3064 (w), 3028 (m), 2956 (m), 2914 (m), 2864 (m), 2156 (w), 1497 (m) 1453 (m), 1361(m), 1250 (m), 1207 (w), 1096 (s), 1071 (s), 1028 (m) cm⁻¹.

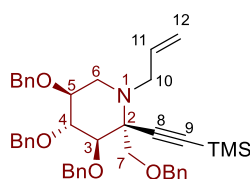
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.29-7.11 (m, 20H, ^{Ar}CH), 4.84 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.82 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.71 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.63 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H ^{Bn}CH₂), 4.59 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.48 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.38 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.34 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 3.78 (*ps* t, *J* = 9.1 Hz, 1H, ⁴CH), 3.46 (s, 2H, ⁷CH₂), 3.42-3.34 (m, 1H, ⁵CH), 3.36 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, ³CH), 3.02 (dd, *J* = 12.1, 5.5 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.90 (dd, *J* = 12.1, 10.9 Hz, 1H, ⁶CH₂), 0.12 (s, 9H, ^{TMS}CH₃).

Partie expérimentale

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 139.1 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.9 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 137.8 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.2 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.2 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.2 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 104.1 ($^8\text{C}_q$), 91.3 ($^9\text{C}_q$), 84.7 (^4CH), 80.5 (^5CH), 80.4 (^3CH), 75.6 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 74.6 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.7 ($^7\text{CH}_2$), 73.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.9 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 60.4 ($^2\text{C}_q$), 44.7 ($^6\text{CH}_2$), 0.2 ($^{\text{TMS}}\text{CH}_3$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{NSi}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 620.3191, found 620.3181.

(2R,3R,4R,5S)-1-Allyl-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-2-(trimethylsilyl)ethynylpiperidine (**132**)

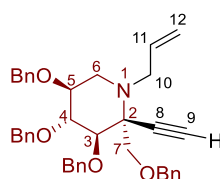


To a stirred solution of piperidine **131** (2.02 g, 3.26 mmol) in dry acetonitrile (32 mL) were successively added potassium carbonate (2.93 g, 21.2 mmol), potassium iodide (54 mg, 325 μmol) and allyl bromide (1.97g, 16,3 mmol). The reaction mixture was refluxed during 14 hours, cooled down to room temperature, and concentrated under reduced pressure. Then it was diluted in EtOAc/ H_2O mixture, the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 times) and the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness. Product **132** was found pure by NMR and not further purified (2.09 g, **97%**). $R_f = 0.85$ in Pentane/EtOAc 4:1. $[\alpha]_D^{20} -57.3$ (c 2.13; CHCl_3). IR ν 3088 (m), 3065 (w), 3031 (m), 2957 (m), 2903 (m), 2865 (m), 2157 (w), 1737 (s), 1497 (m) 1453 (m), 1362 (m), 1250 (m), 1206 (w), 1091 (s), 1070 (s), 1028 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.09 (m, 20H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.90-5.80 (m, 1H, ^{11}CH), 5.08 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H, $^{12}\text{CH}_2$), 5.04 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H, $^{12}\text{CH}_2$), 4.88 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.82 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.72 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.63 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.59 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.45 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.40 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.28 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 3.74 (*ps t*, $J = 9.3$ Hz, 1H, ^4CH), 3.64 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.64 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, ^3CH), 3.58-3.51 (m, 1H, ^5CH), 3.47 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.32 (dd, $J = 13.7, 5.0$ Hz, 1H, $^{10}\text{CH}_2$), 3.00 (dd, $J = 11.5, 5.2$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.75 (dd, $J = 13.7, 8.4$ Hz, 1H, $^{10}\text{CH}_2$), 2.39 (*ps t*, $J = 11.1$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 0.12 (s, 9H, $^{\text{TMS}}\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 139.4 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 139.2 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.8 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 137.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 135.8 (^{11}CH), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.2 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 117.5 ($^{12}\text{CH}_2$), 100.9 ($^8\text{C}_q$), 93.7 ($^9\text{C}_q$), 84.8 (^4CH), 79.5 (^3CH), 78.4 (^5CH), 75.3 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 74.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.3 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.9 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 68.2 ($^7\text{CH}_2$), 65.5 ($^2\text{C}_q$), 53.5 ($^{10}\text{CH}_2$), 50.5 ($^6\text{CH}_2$), 0.3 ($^{\text{TMS}}\text{CH}_3$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{NSi}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 660.3504, found 660.3494.

(2R,3R,4R,5S)-1-Allyl-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-2-ethynylpiperidine (26)**Method A**

To a solution of **132** (192 mg, 0.29 mmol) in MeOH (5 mL) was added K₂CO₃ (65 mg, 0.47 mmol) at room temperature and the mixture was stirred during 3.3 hours. Methanol was removed by evaporation under reduced pressure and the residue was dissolved in water and then extracted with Et₂O (3 times). Organic layers were combined, washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford crude product. Purification by flash chromatography (pentane/ EtOAc 9:1) gave the enyne **26** (167 mg, **95%**), as a colourless oil.

Method B

To a solution of piperidine **131** (1.34 g, 2.16 mmol) in dry acetonitrile (21 mL) were added potassium carbonate (1.93 g, 14.0 mmol) and potassium iodide (72 mg, 432 μmol, 20 mol%). Allyl bromide (1.31 g, 10.8 mmol) was then added and the mixture was refluxed during 3 hours. After cooling to room temperature, methanol (11 mL) was added and stirring was continued during 50 min. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was diluted in EtOAc/H₂O mixture. The aqueous phase was extracted (3 times) with EtOAc, the organic phases were washed with water and brine, dried over magnesium sulfate, and concentrated to dryness under reduced. Purification by DCVC (Cyclohexane to Cyclohexane/EtOAc 3:2 afforded enyne **26** as a colourless oil (1.17 g, **92%** over two steps). R_f = 0.73 in Pentane/EtOAc 4:1. [α]_D²⁰ -16.5 (c 2.05; CHCl₃). IR ν 3293 (m), 3088 (m), 3065 (m), 3031 (m), 2917 (s), 2863 (s), 1497 (m), 1453 (m), 1361 (m), 1091 (s), 1068 (s) cm⁻¹.

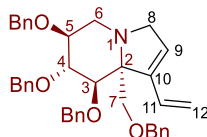
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.09 (m, 20H, ^{Ar}CH), 5.85-5.75 (m, 1H, ¹¹CH), 5.06 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H, ¹²CH₂), 5.02 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, ¹²CH₂), 4.86-4.81 (m, 2H, ^{Bn}CH₂), 4.72 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.60 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.56 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.46 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.37 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.22 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 3.74 (*ps t*, *J* = 9.3 Hz, 1H, ⁴CH), 3.65 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.65 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, ³CH), 3.57-3.50 (m, 1H, ⁵CH), 3.46 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.31 (dd, *J* = 13.6, 4.3 Hz, 1H, ¹⁰CH₂), 3.01 (dd, *J* = 11.6, 5.3 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.71 (dd, *J* = 13.6, 8.5 Hz, 1H, ¹⁰CH₂), 2.36 (*ps t*, *J* = 11.1 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.30 (s, 1H, ⁹CH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 139.2 (^{Ar}C_q), 138.8 (^{Ar}C_q), 138.6 (^{Ar}C_q), 137.4 (^{Ar}C_q), 135.6 (¹¹CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.3 (^{Ar}CH), 128.3 (^{Ar}CH), 128.0 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.4 (^{Ar}CH), 117.6 (¹²CH₂), 85.0 (⁴CH), 79.4 (³CH), 78.6 (⁸C_q), 78.3 (⁵CH), 76.9 (⁹CH), 75.4 (^{Bn}CH₂), 75.4 (^{Bn}CH₂), 73.3 (^{Bn}CH₂), 72.9 (^{Bn}CH₂), 68.0 (⁷CH₂), 64.8 (²C_q), 53.3 (¹⁰CH₂), 50.3 (⁶CH₂).

Partie expérimentale

HRMS (ESI): calculated for $C_{39}H_{42}O_4N$ $[M + H]^+$: m/z : 588.3108, found 588.3081.

(6S,7R,8R,8aR)-6,7,8-Tris(benzyloxy)-8a-((benzyloxy)methyl)-1-vinyl-3,5,6,7,8,8a-exahydroindolizine (25)



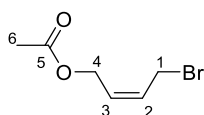
In a round bottom flask, compound **26** (495 mg, 842 μ mol) was dissolved in dry dichloromethane (85 mL). The solution was degassed with argon, then it was bubbled with ethylene during 5 min. Grubbs II catalyst (107 mg, 126 μ mol, 15 mol%) was added and the solution was refluxed during 24 hours. After cooling to room temperature, the reaction mixture was bubbled with ethylene during 5 min and concentrated under reduced pressure. Purification was achieved by DCVC (Cyclohexane to Cyclohexane/EtOAc 1:1) to afford compound **25** as a pink oil (388 mg, **78%**). R_f = 0.25 in Pentane/EtOAc 4:1. $[\alpha]_D^{20}$ +5.60 (c 0.75; $CHCl_3$). IR ν 3089 (m), 3065 (m), 3029 (m), 2918 (s), 2850 (s), 1496 (m), 1453 (m), 1363 (m), 1206 (m), 1087 (s), 1070 (s), 1028 (s) cm^{-1} .

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.28-7.11 (m, 20H, ^{Ar}CH), 6.29 (dd, J = 17.8, 11.1 Hz, 1H, ^{11}CH), 5.90 (s, 1H, 9CH), 5.33 (d, J = 17.6 Hz, 1H, $^{12}CH_2$), 4.91 (d, J = 11.2 Hz, 1H, $^{12}CH_2$), 4.62-4.55 (m, 2H, $^{Bn}CH_2$), 4.56 (d, J = 11.1 Hz, 1H, $^{Bn}CH_2$), 4.52 (d, J = 11.6 Hz, 2H, $^{Bn}CH_2$), 4.37 (s, 2H, $^{Bn}CH_2$), 4.31 (d, J = 11.4 Hz, 1H, $^{Bn}CH_2$), 3.94 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 8CH_2), 3.93 (d, J = 4.7 Hz, 1H, 3CH), 3.91-3.85 (m, 1H, 5CH), 3.73 (dd, J = 5.5, 4.4 Hz, 1H, 4CH), 3.56 (d, J = 15.4 Hz, 1H, 8CH_2), 3.42 (s, 2H, 7CH_2), 3.20 (dd, J = 11.3, 4.4 Hz, 1H, 6CH_2), 2.86 (dd, J = 11.1, 9.1 Hz, 1H, 6CH_2).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 141.3 ($^{10}C_q$), 138.7 ($^{Ar}C_q$), 138.7 ($^{Ar}C_q$), 138.7 ($^{Ar}C_q$), 138.6 ($^{Ar}C_q$), 131.7 (^{11}CH), 128.5 (^{Ar}CH), 128.5 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.2 (^{Ar}CH), 128.1 (^{Ar}CH), 128.0 (^{Ar}CH), 128.0 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 127.4 (^{Ar}CH), 127.4 (^{Ar}CH), 124.7 (9CH), 114.7 ($^{12}CH_2$), 82.2 (4CH), 81.2 (5CH), 78.2 (3CH), 75.3 (7CH_2), 74.5 (2C_q), 73.4 ($^{Bn}CH_2$), 73.2 ($^{Bn}CH_2$), 72.5 ($^{Bn}CH_2$), 71.8 ($^{Bn}CH_2$), 61.4 (8CH_2), 50.4 (6CH_2).

HRMS (ESI): calculated for $C_{39}H_{42}NO_4$ $[M+H]^+$: m/z : 588.3108, found 588.3085.

(Z)-4-Bromobut-2-en-1-yl acetate (135)

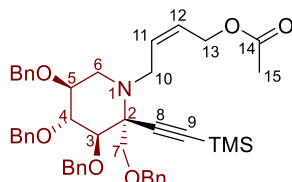


In a round bottom flask equipped with a magnetic bar 2,5-dihydrofuran (10.8 mL, 143 mmol) was cooled to 0 $^{\circ}C$ using an ice bath. Freshly distilled acetyl bromide (10.6 mL, 143 mmol) was added dropwise at 0 $^{\circ}C$. After 30 min, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature and

stirred during 17 hours. Distillation under vacuum (10 mBar) afforded **135** as a colourless liquid (14.07 g, **51%**).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.99-5.86 (m, 1H, ^2CH), 5.74-5.63 (m, 1H, ^3CH), 4.69 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, $^4\text{CH}_2$), 4.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 2.07 (s, 3H, $^6\text{CH}_3$), in accordance with literature.²³⁶

4-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-Tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-2-((trimethylsilyl)ethynyl)piperidin-1-yl)but-2-en-1-yl acetate (134)



To a stirred solution of piperidine **129** (160 mg, 258 μmol) in dry acetonitrile (15 mL) were added successively potassium carbonate (232 mg, 1.68 mmol), potassium iodide (10 mg, 60 μmol) and bromide **133** (178 μL , 1.29 mmol). The reaction mixture was refluxed during 2.5 hours, and then cooled down to room temperature. A saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added, and the mixture was extracted (3 times) with dichloromethane. The organic layers were washed with brine and dried over magnesium sulfate before concentration under reduced pressure. Flash column chromatography (Pentane/EtOAc 9:1 to 4:1) afforded the pure product **134** as a colourless oil (166 mg, **87%**). $R_f = 0.22$ in Pentane/EtOAc 9:1. $[\alpha]_D^{20} -38.6$ (c 1.09; CHCl_3). IR ν 3064 (w), 3031 (m), 2957 (m), 2862 (m), 1740 (s), 1497 (m), 1454 (m), 1372 (m), 1249 (m), 1226 (m), 1169 (m), 1094 (m), 1070 (m), 1028 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.26-7.12 (m, 20H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.72-5.67 (m, 1H, ^{11}CH), 5.55-5.59 (m, 1H, ^{12}CH), 4.86 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.81 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.71 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.63 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.57 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.60-4.55 (m, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.51 (dd, $J = 13.1$ Hz, 6.3 Hz, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.42 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.37 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.28 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 3.72 (*ps t*, $J = 9.3$ Hz, 1H, ^4CH), 3.65 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.61 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, ^3CH), 3.54-3.49 (m, 1H, ^5CH), 3.44 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.23 (dd, $J = 14.2$ Hz, 3.9 Hz, 1H, $^{10}\text{CH}_2$), 2.98-2.90 (m, 2H, $^6\text{CH}_2$, $^{10}\text{CH}_2$), 2.39 (*ps t*, $J = 11.2$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 1.96 (s, 3H, $^{15}\text{CH}_3$), 0.12 (s, 9H, $^{\text{TMS}}\text{CH}_3$).

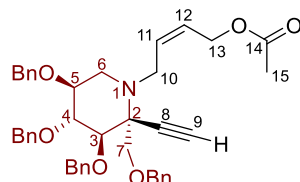
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.7 ($^{14}\text{C}_q$), 139.2 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 139.1 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 137.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 131.6 (^{11}CH), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.2 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 126.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 126.5 (^{12}CH), 100.5 ($^8\text{C}_q$), 94.0 ($^9\text{C}_q$), 84.6 (^4CH), 79.4 (^3CH), 78.2 (^5CH), 75.3 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 74.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.2 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.9 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$),

²³⁶ Kabbaj, Y.; Lazrek, H. B.; Barascut, J. L.; Imbach, J. L. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2005**, *24*, 161–172.

Partie expérimentale

68.2 ($^7\text{CH}_2$), 65.6 ($^2\text{C}_q$), 60.3 ($^{13}\text{CH}_2$), 50.6 ($^6\text{CH}_2$), 46.8 ($^{10}\text{CH}_2$), 21.0 ($^{15}\text{CH}_3$), 0.3 ($^{\text{TMS}}\text{CH}_3$). HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{45}\text{H}_{53}\text{NO}_6\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z : 732.3715, found 732.3710.

4-((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-2-ethynylpiperidin-1-yl)but-2-en-1-yl acetate (**131**)

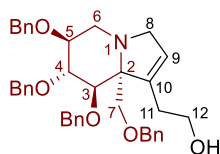


In a round bottom flask, compound **134** (182 mg, 249 μmol) was dissolved in THF (7.5 mL). The solution was cooled to -78 $^\circ\text{C}$, then a solution of TBAF (1.0 M in THF, 274 μL , 274 μmol) was added. The reaction mixture was stirred during 30 min, then it was diluted with aqueous NaHCO_3 and extracted (3 times) with Et_2O . The organic layers were combined, washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Purification was achieved by flash chromatography (Pentane/ EtOAc 4:1) to afford compound **131** as a colourless oil (157 mg, **96%**). $R_f = 0.54$ in Pentane/ EtOAc 4:1. $[\alpha]_D^{20} -8.8$ (c 0.95; CHCl_3). IR ν 3291 (m), 3061 (w), 3031 (m), 2916 (m), 2873 (m), 1737 (s), 1497 (m) 1453 (m), 1371(m), 1227 (s), 1168 (m), 1096 (s), 1068 (s), 1027 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.24-7.12 (m, 20H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.67-5.62 (m, 1H, ^{11}CH), 5.58-5.54 (m, 1H, ^{12}CH), 4.84 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.83 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.72 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.61 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.55 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.58-4.54 (m, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.49 (dd, $J = 13.1$ Hz, 6.2 Hz, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.44 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.34 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.23 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 3.74 (*ps t*, $J = 9.3$ Hz, 1H, ^4CH), 3.67 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.63 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, ^3CH), 3.54-3.49 (m, 1H, ^5CH), 3.45 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.22 (dd, $J = 14.1$ Hz, 3.3Hz, 1H, $^{10}\text{CH}_2$), 2.96-2.89 (m, 2H, $^{10}\text{CH}_2$, $^6\text{CH}_2$), 2.38 (*ps t*, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.33 (s, 1H, ^9CH), 1.95 (s, 3H, $^{15}\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.8 ($^{14}\text{C}_q$), 139.1 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.6 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 137.4 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 131.5 (^{11}CH), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 126.6 (^{12}CH), 84.9 (^4CH), 79.3 (^3CH), 78.2 (^5CH), 77.4 (^9CH), 77.1 ($^8\text{C}_q$), 75.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 75.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.2 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.9 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 68.1 ($^7\text{CH}_2$), 64.9 ($^2\text{C}_q$), 60.4 ($^{13}\text{CH}_2$), 50.4 ($^6\text{CH}_2$), 46.7 ($^{10}\text{CH}_2$), 21.0 ($^{15}\text{CH}_3$). HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z : 660.3320, found 660.3313.

2-((6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6,7,8-Tris(benzyloxy)-8a-((benzyloxy)methyl)-3,5,6,7,8,8a-hexahydroindolizin-1-yl)ethan-1-ol (157)



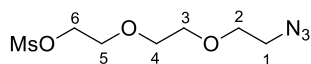
In a round bottom flask, $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$ (2.0 M in THF, 3.40 mL, 6.77 mmol) was diluted in dry THF (3 mL). Cyclohexene (1.37 mL, 13.54 mmol) was added at 0 °C and the mixture was stirred during 2.5 hours at 0 °C. Diene **25** (391 mg, 665 μmol) dissolved in THF (1.5 mL) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at 0 °C during 5.5 hours. After warming to room temperature, 2 mL of distilled water, NaOH (3.0 M aqueous solution, 2.25 mL, 6.77 mmol), and $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{urea}$ (3M aqueous solution, 6.77 mL, 20.31 mmol) were added. The reaction was vigorously stirred during 15 hours at room temperature. Then reaction was quenched with sodium thiosulfate and dissolved in an EtOAc/ H_2O mixture, extracted (3 times) with EtOAc, washed with brine and dried over magnesium sulfate. Removal of solvents under reduced pressure afforded the crude product which was purified by flash chromatography on silica gel (Pentane/EtOAc 2:1 to 1:1). Alcohol **157** was obtained as a colourless oil (368 mg, **92%**). $R_f = 0.21$ in Pentane/EtOAc 1:1. $[\alpha]_D^{20} +20.6$ (c 0.47; CHCl_3). IR ν 3444 (m), 3088 (m), 3063 (m), 3031 (m), 2917 (s), 2859 (s), 1952 (w), 1876 (w), 1811 (w), 1733 (w), 1605 (w), 1586 (w), 1496 (m), 1454 (m), 1364 (m), 1307 (m), 1265 (m), 1207 (m), 1070 (s), 1028 (s) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.25 (m, 18H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 7.25-7.20 (m, 2H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.67 (s, 1H, ^9CH), 4.79-4.67 (m, 4H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.63 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.48 (s, 2H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.36 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.02-3.94 (m, 2H, ^5CH , $^8\text{CH}_2$), 3.92 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, ^3CH), 3.76 (dd, $J = 5.7$, 4.6 Hz, 1H, ^4CH), 3.77-3.70 (m, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 3.53 (dd, $J = 14.2$ Hz, 2.0 Hz, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.48 (s, 2H, $^7\text{CH}_2$), 3.17 (dd, $J = 11.7$ Hz, 4.7 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.86 (dd, $J = 11.7$ Hz, 8.4 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.38-2.26 (m, 2H, $^{11}\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 139.4 ($^{10}\text{C}_q$), 138.6 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.4 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.2 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 124.0 (^9CH), 81.6 (^5CH), 81.4 (^4CH), 78.7 (^3CH), 75.3 ($^2\text{C}_q$), 74.9 ($^7\text{CH}_2$), 73.5 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 71.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 61.6 ($^{12}\text{CH}_2$), 61.4 ($^8\text{CH}_2$), 50.0 ($^6\text{CH}_2$), 31.2 ($^{11}\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{N}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 606.3214, found 606.3215.

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl methanesulfonate (158a)

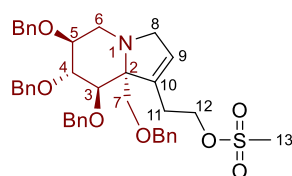


Partie expérimentale

In a round bottom flask azide **94a** (335 mg, 1.91 mmol) was dissolved in dry dichloromethane, then triethylamine (800 μ L, 5.73 mmol) and methanesulfonyl chloride (222 μ L, 2.86 mmol) were added at room temperature. After stirring 24 hours at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified on silica gel (Pentane/EtOAc 1:1 to EtOAc) to afford mesylate **158a** as a colourless oil (473 mg, **98%**). Rf = 0.18 in Pentane/EtOAc 2:1.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.43-4.38 (m, 2H, $^6\text{CH}_2$), 3.83-3.78 (m, 2H, $^5\text{CH}_2$), 3.74-3.66 (m, 6H, $^4\text{CH}_2$, $^3\text{CH}_2$, $^2\text{CH}_2$), 3.41 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^1\text{CH}_2$), 3.09 (s, 3H, $^{\text{Ms}}\text{CH}_3$), in accordance with literature.^{121,237}

2-((6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6,7,8-Tris(benzyloxy)-8a-((benzyloxy)methyl)-3,5,6,7,8,8a-hexahydroindolizin-1-yl)ethyl methanesulfonate (**160**)



To a stirred solution of **157** (90 mg, 149 μ mol) in dry dichloromethane (1.5 mL) triethylamine (46 μ L, 328 μ mol) and methanesulfonyl chloride (23 μ L, 298 μ mol) were added successively. The solution was stirred during 3 hours at room temperature, diluted in EtOAc and washed with brine. The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification of the residue by DCVC (Cyclohexane to EtOAc) afforded **160** as a colourless oil (81 mg, **80%**). Rf = 0.53 in Pentane/EtOAc 1:1. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +20.2$ (c 0.5; CHCl_3). IR ν 3026 (w), 2855 (m), 1497 (w), 1454 (m), 1354 (m), 1207 (w), 1172 (m), 1088 (s), 1068 (s), 1028 (m) cm^{-1} .

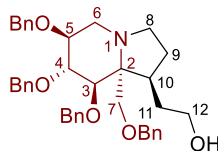
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.30-7.07 (m, 20H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.53 (s, 1H, ^9CH), 4.66 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.64 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.60 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.58 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.52 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.35 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.32 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.24 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.21-4.11 (m, 2H, $^{12}\text{CH}_2$), 3.91-3.81 (m, 3H, $^8\text{CH}_2$, ^5CH , ^3CH), 3.73 (*ps* t, $J = 5.2$ Hz, 1H, ^4CH), 3.54 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.35 (s, 2H, $^7\text{CH}_2$), 3.14 (dd, $J = 11.8, 4.4$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.85 (dd, $J = 11.7, 8.2$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.65 (s, 3H, $^{13}\text{CH}_3$), 2.48-2.38 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$), 2.25-2.36 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 138.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.4 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.3 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.2 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.0 ($^{10}\text{C}_q$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 124.1 (^9CH), 81.6 (^5CH), 81.4 (^4CH), 78.1 (^3CH), 75.1 ($^7\text{CH}_2$), 75.0 ($^2\text{C}_q$), 73.3 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 73.0 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 71.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 68.6 ($^{12}\text{CH}_2$), 61.2 ($^8\text{CH}_2$), 49.9 ($^6\text{CH}_2$), 37.2 ($^{13}\text{CH}_3$), 27.7 ($^{11}\text{CH}_2$).

²³⁷ Sakamoto, J.-I.; Takita, C.; Koyama, T.; Hatano, K.; Terunuma, D.; Matsuoka, K. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2735–2739.

HRMS (ESI): calculated for C₄₀H₄₆O₇NS [M + H]⁺: *m/z* : 684.2989, found 684.2985.

2-((1*S*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6,7,8-Tris(benzyloxy)-8a-((benzyloxy)methyl)octahydroindolizin-1-yl)ethan-1-ol (161)



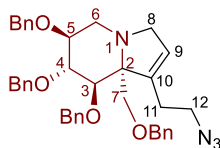
In a round bottom flask, alcohol **157** (31 mg, 51 μ mol) was dissolved in MeOH (1 mL). Palladium on charcoal (10% wt, 5.4 mg, 5.1 μ mol) was added and the flask was placed under dihydrogen atmosphere ($P_{H_2} = 9$ bars). After 3.5 days, the reaction mixture was filtered over Celite[®], which was rinsed several times with MeOH. Removal of the solvent by evaporation under reduced pressure afforded a yellow oil which was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc) to afford pure **161** as a colourless oil (22.3 mg, **72%**). *R_f* = 0.27 in EtOAc. $[\alpha]_D^{20} +12.6$ (*c* 0.42; CHCl₃). IR ν 3410 (w) 3030 (w) 2863 (m) 1667 (w) 1496 (w) 1453 (m) 1365 (w) 1210 (w) 1087 (s) 1067 (s) 1027 (m) cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.07 (m, 20H, ^{Ar}CH), 4.67 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.63 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.59 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.58 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.54 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.40 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.29 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.25 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 3.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ³CH), 3.81-3.74 (m, 2H, ⁵CH, ⁴CH), 3.63-3.56 (m, 1H, ¹²CH₂), 3.50 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.50-3.44 (m, 1H, ¹²CH₂), 3.15 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.11-3.06 (m, 1H, ⁶CH₂), 3.07-3.00 (m, 1H, ⁸CH₂), 2.88 (*ps* t, *J* = 10.0 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.87-2.81 (m, 1H, ⁸CH₂), 2.21-2.13 (m, 1H, ¹¹CH₂), 2.07-1.97 (m, 1H, ¹⁰CH), 1.76-1.63 (m, 2H, ⁹CH₂), 1.62-1.53 (m, 1H, ¹¹CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 138.7 (^{Ar}C_q), 138.5 (^{Ar}C_q), 138.5 (^{Ar}C_q), 138.4 (^{Ar}C_q), 128.6 (^{Ar}CH), 128.5 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.0 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.4 (^{Ar}CH), 127.0 (^{Ar}CH), 80.8 (⁴CH), 79.8 (⁵CH), 78.6 (³CH), 76.8 (⁷CH₂), 73.4 (^{Bn}CH₂), 72.4 (^{Bn}CH₂), 72.0 (^{Bn}CH₂), 71.5 (^{Bn}CH₂), 68.5 (²C_q), 63.1 (¹²CH₂), 54.0 (⁸CH₂), 50.7 (⁶CH₂), 46.6 (¹⁰CH), 35.2 (¹¹CH₂), 31.5 (⁹CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₃₉H₄₆NO₅ [M+H]⁺: *m/z* : 608.3370, found 608.3361.

NOESY correlation between ⁷CH₂ (δ 3.50 ppm) and ¹⁰CH (δ 2.07-1.97 ppm), ³CH (δ 3.93 ppm) and ¹⁰CH (δ 2.07-1.97 ppm).

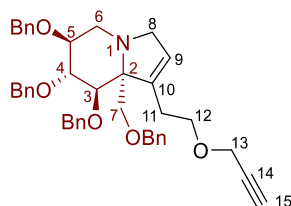
(6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-1-(2-Azidoethyl)-6,7,8-tris(benzyloxy)-8*a*-((benzyloxy)methyl)-3,5,6,7,8,8*a*-hexahydroindolizine (162)

To a stirred solution of **160** (31 mg, 45 μmol) in freshly distilled DMF (0.5 mL) sodium azide (12 mg, 185 μmol) was added and the solution was stirred at room temperature during 20 hours, then at 60 °C during 4 hours. The mixture was allowed to cool to room temperature, then it was diluted in Et₂O and the organic phase was washed (3 times) with an aqueous solution of LiCl (5% wt), washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification of the residue by DCVC (Cyclohexane to Cyclohexane/EtOAc 2:3) afforded azide **162** (24 mg, **85%**). *R*_f = 0.77 in Pentane/EtOAc 1:1. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +21.2$ (*c* 0.86; CHCl₃). IR ν 3085 (w), 3061 (w), 3031 (w), 2921 (m), 2855 (m), 2089 (s), 1497 (w), 1449 (m), 1363 (m), 1210 (m), 1067 (s), 1028 (m) cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.08 (m, 20H, ^{Ar}CH), 5.47 (s, 1H, ⁹CH), 4.67 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.64 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.61-4.56 (m, 2H, ^{Bn}CH₂), 4.53 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.36 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.32 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.25 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 3.88 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, ³CH), 3.87-3.81 (m, 2H, ⁵CH, ⁸CH₂), 3.73 (*ps t*, *J* = 5.4 Hz, 1H, ⁴CH), 3.53 (dd, *J* = 14.3, 2.0 Hz, 1H, ⁸CH₂), 3.36 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.33 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.31-3.18 (m, 2H, ¹²CH₂), 3.15 (dd, *J* = 11.9, 4.7 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.84 (dd, *J* = 11.8, 8.1 Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.33-2.23 (m, 1H, ¹¹CH₂), 2.21-2.11 (m, 1H, ¹¹CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 139.7 (¹⁰C_q), 138.6 (^{Ar}C_q), 138.5 (^{Ar}C_q), 138.4 (^{Ar}C_q), 138.3 (^{Ar}C_q), 128.5 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 123.3 (⁹CH), 81.7 (⁵CH), 81.6 (⁴CH), 78.3 (³CH), 75.1 (⁷CH₂), 75.1 (²C_q), 73.4 (^{Bn}CH₂), 73.2 (^{Bn}CH₂), 72.8 (^{Bn}CH₂), 71.8 (^{Bn}CH₂), 61.3 (⁸CH₂), 50.1 (⁶CH₂), 49.9 (¹²CH₂), 27.4 (¹¹CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₃₉H₄₃O₄N₄ [M + H]⁺: *m/z* : 631.3279, found 631.3257.

(6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6,7,8-Tris(benzyloxy)-8*a*-((benzyloxy)methyl)-1-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethyl)-3,5,6,7,8,8*a*-hexahydroindolizine (168)

Partie expérimentale

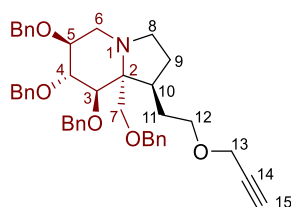
To a stirred solution of **157** (40 mg, 66 μmol) in freshly distilled THF (1.0 mL). After having been reacted 5 min at room temperature, propargyl bromide (80% wt in toluene, 8 μL , 72 μmol) was added and resulting mixture was reacted at room temperature during 1 hour, then a new portion of propargyl bromide (80% wt in toluene, 8 μL , 72 μmol) was added. After having been reacted 17 hours (18 hours from the beginning) reaction was quenched by dropwise addition of water. The resulting mixture was diluted in EtOAc/H₂O mixture, extracted with EtOAc (3 times), washed with brine and dried over magnesium sulfate. Concentration to dryness under reduced pressure afforded crude product which was purified by flash chromatography on silica gel (Pentane/EtOAc 3:1 to EtOAc) to afford **168** as pale yellow oil (31 mg, **74%**). R_f = 0.63 in Pentane/EtOAc 2:1. $[\alpha]_D^{20} +12.1$ (c 0.24; CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.10 (m, 20H, ^{Ar}CH), 5.52 (s, 1H, ⁹CH), 4.66 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.62 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.59 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.58 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.53 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.37 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.33 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.29 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 3.98 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H, ¹³CH₂), 3.91 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, ³CH), 3.90-3.82 (m, 2H, ⁴CH, ⁸CH₂), 3.73 (dd, $J = 5.8, 4.7$ Hz, 1H, ⁵CH), 3.63-3.53 (m, 2H, ¹²CH₂), 3.50 (dd, $J = 14.1, 2.1$ Hz, 1H, ⁸CH₂), 3.39 (d, $J = 9.3$, Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.34 (d, $J = 9.3$, Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.17 (dd, $J = 11.7, 4.7$ Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.84 (dd, $J = 11.6, 8.6$ Hz, 1H, ⁶CH₂), 2.39-2.30 (m, 1H, ¹¹CH₂), 2.29 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, ¹⁵CH), 2.27-2.17 (m, 1H, ¹¹CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 139.9 (¹⁰C_q), 138.7 (^{Ar}C_q), 138.7 (^{Ar}C_q), 138.6 (^{Ar}C_q), 138.6 (^{Ar}C_q), 128.5 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.3 (^{Ar}CH), 128.3 (^{Ar}CH), 128.3 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 122.7 (⁹CH), 81.8 (⁴CH), 81.6 (⁵CH), 80.1 (¹⁵CH), 78.3 (³CH), 75.3 (²C_q), 75.3 (⁷CH₂), 74.3 (¹⁴C_q), 73.3 (^{Bn}CH₂), 73.1 (^{Bn}CH₂), 72.7 (^{Bn}CH₂), 71.9 (^{Bn}CH₂), 69.0 (¹²CH₂), 61.5 (⁸CH₂), 58.0 (¹³CH₂), 50.4 (⁶CH₂), 28.1 (¹¹CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₄₂H₄₆O₅N [M + H]⁺: m/z : 644.33705, found 644.33561.

(1*S*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6,7,8-Tris(benzyloxy)-8*a*-((benzyloxy)methyl)-1-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethyl)octahydroindolizine (172)



To a stirred solution of alcohol **161** (10 mg, 16.4 μmol) in freshly distilled THF (0.4 mL) was added potassium hydride (30% wt in mineral oil, 7 mg, 52 μmol). After having been reacted 5 min, propargyl bromide (80% wt in toluene, 3 μL , 27 μmol) was injected and the mixture was reacted at room temperature. After 8 hours, starting material was still visible on TLC, and supplementary propargyl bromide (80% wt in toluene, 2.0 μL , 16.0 μmol) was added. After 28 hours (36 hours from the

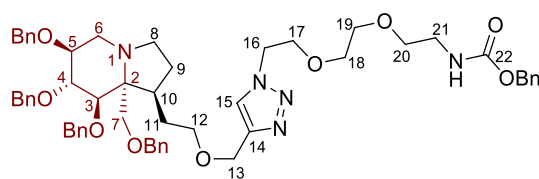
beginning) reaction was quenched by dropwise addition of water. The reaction mixture was diluted in H₂O/EtOAc, extracted with EtOAc (3 times), washed with brine, and dried over magnesium sulfate. Evaporation of solvent under reduced pressure afforded crude product which was purified by flash chromatography on silica gel (Pentane/EtOAc 4:1 to 1:1) to afford **172** (8 mg, **75%**). R_f = 0.52 in Pentane/EtOAc 1:1. [α]²⁰_D +18.6 (c 0.35, CHCl₃). IR ν 3288 (m), 3088 (w), 3064 (m), 3030 (m), 3029 (m), 2927 (s), 2858 (s), 1497 (m), 1454 (m), 1363 (m), 1259 (w), 1094 (s), 1070 (s), 1028 (w) cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.10 (m, 20H, ^{Ar}CH), 4.65 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.61 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.60-4.53 (m, 3H, ^{Bn}CH₂), 4.40 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.31 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.26 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, ^{Bn}CH₂), 4.01-3.97 (m, 2H, ¹³CH₂), 3.93 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, ³CH), 3.81-3.72 (m, 2H, ⁴CH, ⁵CH₂), 3.52-3.37 (m, 3H, ¹²CH₂, ⁷CH₂), 3.17-3.01 (m, 3H, ⁶CH₂, ⁷CH₂, ⁸CH₂), 2.91-2.81 (m, 2H, ⁶CH₂, ⁸CH₂), 2.38-2.31 (m, 1H, ¹¹CH₂), 2.30 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, ¹⁵CH), 2.04-1.94 (m, 1H, ¹⁰CH), 1.78-1.49 (m, 3H, ⁹CH₂, ¹¹CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 138.7 (^{Ar}C_q), 138.7 (^{Ar}C_q), 138.6 (^{Ar}C_q), 138.5 (^{Ar}C_q), 128.5 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.4 (^{Ar}CH), 128.3 (^{Ar}CH), 128.0 (^{Ar}CH), 127.9 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.8 (^{Ar}CH), 127.7 (^{Ar}CH), 127.6 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 127.5 (^{Ar}CH), 127.3 (^{Ar}CH), 127.0 (^{Ar}CH), 127.0 (^{Ar}CH), 81.1 (⁴CH), 80.1 (¹⁵CH), 79.7 (⁵CH), 78.6 (³CH), 76.3 (⁷CH₂), 74.1 (¹⁴C_q), 73.3 (^{Bn}CH₂), 72.5 (^{Bn}CH₂), 72.1 (^{Bn}CH₂), 71.7 (^{Bn}CH₂), 70.2 (¹²CH₂), 68.9 (²C_q), 57.8 (¹³CH₂), 54.1 (⁸CH₂), 51.0 (⁶CH₂), 46.4 (¹⁰CH), 31.5 (¹¹CH₂), 30.9 (⁹CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₄₂H₄₈O₅N [M + H]⁺: *m/z* : 646.35270, found 646.35162.

Benzyl(2-(2-(2-(5-((2-((1S,6S,7R,8R,8aR)-6,7,8-tris(benzyloxy)-8a-((benzyloxy)methyl)octahydroindolizin-1-yl)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (173a)



To a stirred solution of **172** (19 mg, 29 μmol) in DMF (0.7 mL) under argon was added **36a** (28 mg, 91 μmol) and copper iodide (2 mg, 11 μmol). Then diisopropylethylamine 48 μL, 290 μmol) was added and mixture was reacted at room temperature. After 17 hours, reaction mixture was diluted in EtOAc and washed with brine (5 times), dried over magnesium sulfate, and evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (EtOAc to EtOAc/MeOH 9:1) afforded **173a** as an oil (43 mg, **83%**). R_f = 0.55 in EtOAc/MeOH (9:1). [α]²⁰_D +11.2 (c 1.50, CHCl₃). IR ν 3337 (m), 3062 (w), 3030 (w), 2866 (s), 2106 (w), 1719 (s), 1522 (m), 1497 (w), 1454 (m), 1364 (m), 1255 (m), 1095 (s), 1028 (m) cm⁻¹.

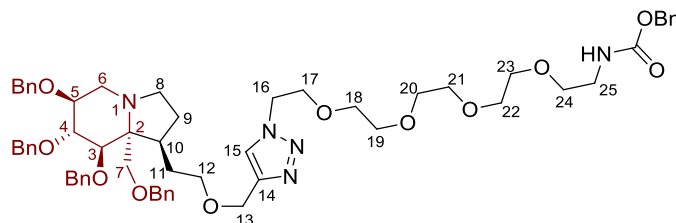
Partie expérimentale

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.50 (s, 1H, ^{15}CH), 7.34-7.08 (m, 25H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.26 (s, 1H, NH), 5.01 (ps s, 2H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.64 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.60 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.58 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.57 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.53 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.49 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.46 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.39 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.37 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H, $^{16}\text{CH}_2$), 4.30 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.26 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 3.91 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, ^3CH), 3.80-3.70 (m, 4H, ^5CH , ^4CH , $^{17}\text{CH}_2$), 3.51-3.36 (m, 9H, $^7\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$), 3.30-3.22 (m, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 3.14 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.12-2.98 (m, 2H, $^6\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 2.85 (m, 2H, $^6\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 2.40-2.28 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$), 2.05-1.90 (m, 1H, ^{10}CH), 1.76-1.62 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$), 1.62-1.51 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 156.5 ($^{22}\text{C}_q$), 145.5 ($^{14}\text{C}_q$), 138.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.6 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 136.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.0 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.5 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 126.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 126.8 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 123.6 (^{15}CH), 81.0 (^4CH), 79.6 (^5CH), 78.5 (^3CH), 76.1 ($^7\text{CH}_2$), 73.3 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.5 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.0 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 71.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 70.9 ($^{12}\text{CH}_2$), 70.6, 70.2, 70.1 ($^{18}\text{CH}_2 + ^{19}\text{CH}_2 + ^{20}\text{CH}_2$), 69.5 ($^{17}\text{CH}_2$), 68.7 ($^{22}\text{C}_q$), 66.8 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 64.3 ($^{13}\text{CH}_2$), 54.0 ($^8\text{CH}_2$), 50.8 ($^6\text{CH}_2$), 50.2 ($^{16}\text{CH}_2$), 46.4 (^{10}CH), 41.0 ($^{21}\text{CH}_2$), 31.7 ($^{11}\text{CH}_2$), 30.8 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{56}\text{H}_{68}\text{O}_9\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 954.50116, found 954.50085.

Benzyl (14-(5-((2-((1S,6S,7R,8R,8aR)-6,7,8-tris(benzyloxy)-8a-((benzyloxy)methyl)octahydroindolizin-1-yl)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamate(173b)



To a stirred solution of **172** (40 mg, 62 μmol) in DMF (1.0 mL) under argon was added **36b** (57 mg, 144 μmol) and copper iodide (3.5 mg, 19 μmol). Then diisopropylethylamine (102 μL , 620 μmol) was added and mixture was reacted at room temperature. After 18 hours, reaction mixture was diluted in EtOAc and washed with brine (5 times), dried over magnesium sulfate, and evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (EtOAc to EtOAc/MeOH 9:1) afforded **173b** as oil (47 mg, **73%**). $R_f = 0.28$ in EtOAc/MeOH (95:5). $[\alpha]_D^{20} +3.21$. (c 0.28, CHCl_3). IR ν 3344 (w), 3062 (w), 3030 (m), 2867 (s), 1717 (s), 1523 (m), 1497 (m), 1454 (s), 1352 (m), 1251 (s), 1101 (s), 1028 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (s, 1H, ^{15}CH), 7.32-7.06 (m, 25H, $^{\text{Ar}}\text{CH}$), 5.45 (s, 1H, NH), 5.00 (s, 2H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.64 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.62-4.55 (m, 3H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.53 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H,

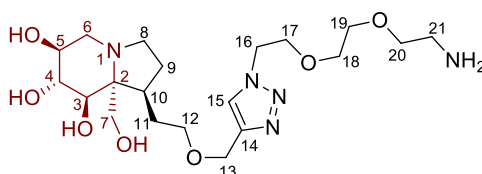
Partie expérimentale

$^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.49 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.46 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.39 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.38-4.35 (m, 2H, $^{16}\text{CH}_2$), 4.30 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 4.26 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 3.92 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, ^3CH), 3.80-3.73 (m, 2H, ^5CH , ^4CH), 3.71 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.57-3.38 (m, 17H, $^7\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$, $^{21}\text{CH}_2$, $^{22}\text{CH}_2$, $^{23}\text{CH}_2$, $^{24}\text{CH}_2$), 3.34-3.26 (m, 2H, $^{25}\text{CH}_2$), 3.14 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.09 (dd, $J = 11.0, 3.6$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 3.06-2.99 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 2.90-2.78 (m, 2H, $^6\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 2.40-2.30 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$), 2.03-1.91 (m, 1H, ^{10}CH), 1.75-1.63 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$), 1.63-1.52 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 156.6 ($^{26}\text{C}_q$), 145.3 ($^{14}\text{C}_q$), 138.6 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.6 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.5 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 138.4 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 136.7 ($^{\text{Ar}}\text{C}_q$), 128.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.2 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 128.1 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.7 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.6 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.4 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 127.3 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 126.9 ($^{\text{Ar}}\text{CH}$), 123.6 (^{15}CH), 80.9 (^4CH), 79.5 (^5CH), 78.5 (^3CH), 76.0 ($^7\text{CH}_2$), 73.2 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.4 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 72.0 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 71.6 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 70.8 ($^{12}\text{CH}_2$), 70.6, 70.6, 70.5, 70.5, 70.3, 70.1, 70.1 ($^{18}\text{CH}_2 + ^{19}\text{CH}_2 + ^{20}\text{CH}_2 + ^{21}\text{CH}_2 + ^{22}\text{CH}_2 + ^{23}\text{CH}_2 + ^{24}\text{CH}_2$), 69.5 ($^{17}\text{CH}_2$), 68.8 ($^2\text{C}_q$), 66.7 ($^{\text{Bn}}\text{CH}_2$), 64.1 ($^{13}\text{CH}_2$), 54.0 ($^8\text{CH}_2$), 50.8 ($^6\text{CH}_2$), 50.2 ($^{16}\text{CH}_2$), 46.3 (^{10}CH), 40.9 ($^{25}\text{CH}_2$), 31.6 ($^{11}\text{CH}_2$), 30.8 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{60}\text{H}_{76}\text{O}_{11}\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 1042.55358, found 1042.55254.

(1*S*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-1-(2-((1-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-5-yl)methoxy)ethyl)-8*a*-(hydroxymethyl)octahydroindolizine-6,7,8-triol (174a)



To a solution of **173a** (39 mg, 41 μmol) in methanol (1.0 mL) was added palladium on charcoal (10%wt, 13 mg, 12 μmol). Flask was purged with argon and filled with dihydrogen (atmospheric pressure) then hydrochloric acid (2.0 M in Et_2O , 170 μL , 340 μmol) was added. The mixture was reacted during 2.5 days at room temperature, filtered on celite (rinsed with MeOH), and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford crude product. The residue was purified by ion exchange resin (Dowex 50W-X8, H^+ form), eluting with H_2O and 1.0 M aqueous solution of NH_4OH to afford **174a** as a colourless oil (20 mg, **quantitative**). $[\alpha]_D^{20} +1.92$ (c 1.30, CH_3OH).

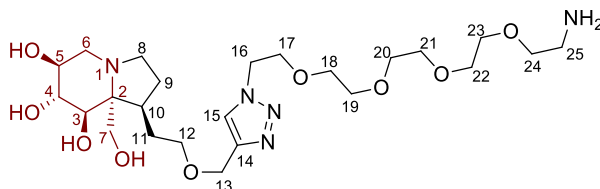
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.02 (s, 1H, ^{15}CH), 4.65-4.57 (m, 4H, $^{13}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$), 3.93 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.83 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, ^3CH), 3.76-3.69 (m, 2H, ^4CH , $^7\text{CH}_2$), 3.69-3.56 (m, 8H, $^{12}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$), 3.56-3.47 (m, 1H, ^5CH), 3.29 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.26-3.20 (m, 2H, $^8\text{CH}_2$), 3.06 (dd, $J = 11.9, 4.0$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 3.02 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 2.88 (dd, $J = 11.9, 8.9$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.50-2.40 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$), 2.17-1.85 (m, 3H, $^9\text{CH}_2$, ^{10}CH), 1.76-1.65 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$).

Partie expérimentale

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ .146.0 ($^{14}\text{C}_q$), 125.6 (^{15}CH), 75.9 (^4CH), 73.5 (2C_q), 72.8 (^3CH), 71.0 (^5CH), 71.4, 71.4, 71.2, ($^{12}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$), 69.4 ($^{20}\text{CH}_2$), 70.3 ($^{17}\text{CH}_2$), 64.6 ($^{13}\text{CH}_2$), 62.6 ($^7\text{CH}_2$), 53.7 ($^8\text{CH}_2$), 53.7 ($^6\text{CH}_2$), 51.3 ($^{16}\text{CH}_2$), 41.9 (^{10}CH), 41.0 ($^{21}\text{CH}_2$), 34.4 ($^{11}\text{CH}_2$), 30.1 ($^9\text{CH}_2$)

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 460.27657, found 460.27546.

(1*S*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-1-(2-((1-(14-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)ethyl)-8*a*-(hydroxymethyl)octahydroindolizine-6,7,8-triol (174*b*)



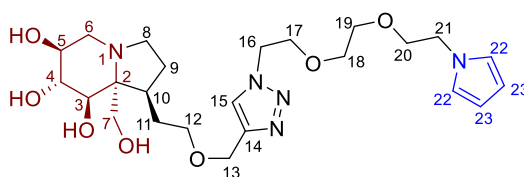
To a solution of **173b** (46 mg, 44 μmol) in methanol (1.5 mL) was added palladium on charcoal (10%wt, 16 mg, 15 μmol). Flask was purged with argon and filled with dihydrogen (atmospheric pressure) then hydrochloric acid (2.0 M in Et_2O , 130 μL , 260 μmol) was added. The mixture was reacted during 2.5 days at room temperature, filtered on celite (rinsed with MeOH), and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford crude product. The residue was purified by ion exchange resin (Dowex 50W-X8, H^+ form), eluting with H_2O and 1.0 M aqueous solution of NH_4OH to afford **174b** as a colourless oil (22 mg, **92%**). $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +1.71$ (c 0.70, CH_3OH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.02 (s, 1H, ^{15}CH), 4.62-4.53 (m, 4H, $^{13}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$), 3.90 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.81 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ^3CH), 3.70-3.45 (m, 19H, ^4CH , ^5CH , $^7\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$, $^{21}\text{CH}_2$, $^{22}\text{CH}_2$, $^{23}\text{CH}_2$, $^{24}\text{CH}_2$), 3.21 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.14-3.04 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 3.04-2.96 (m, 1H, $^8\text{CH}_2$), 2.93 (dd, $J = 11.6, 4.2$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.87 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, $^{25}\text{CH}_2$), 2.72 (dd, $J = 11.5, 9.4$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.59-2.50 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$), 2.03-1.80 (m, 3H, $^9\text{CH}_2$, ^{10}CH), 1.64-1.54 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 146.0 ($^{14}\text{C}_q$), 125.8 (^{15}CH), 76.5 (^4CH), 73.4 (^3CH), 72.8 (2C_q), 71.9 ($^{24}\text{CH}_2$), 71.6 (^5CH), 71.5, 71.5, 71.5, 71.4, 71.4, 71.2 ($^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$, $^{21}\text{CH}_2$, $^{22}\text{CH}_2$, $^{23}\text{CH}_2$), 71.3 ($^{12}\text{CH}_2$), 70.4 ($^{17}\text{CH}_2$), 64.5 ($^{13}\text{CH}_2$), 63.9 ($^7\text{CH}_2$), 54.9 ($^6\text{CH}_2$), 53.3 ($^8\text{CH}_2$), 51.4 ($^{16}\text{CH}_2$), 42.3 (^{10}CH), 41.7 ($^{25}\text{CH}_2$), 35.6 ($^{11}\text{CH}_2$), 30.5 ($^9\text{CH}_2$).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 548.32900, found 548.32774.

(1*S*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-1-(2-((1-(2-(2-(2-(1*H*-Pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)ethyl)-8*a*-(hydroxymethyl)octahydroindolizine-6,7,8-triol (175*a*)



Partie expérimentale

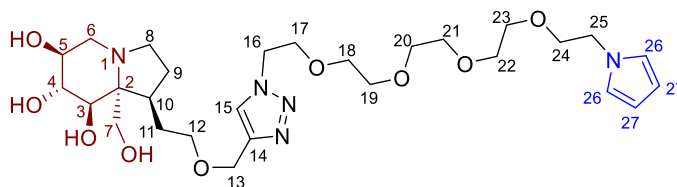
To a solution of **174a** (15 mg, 33 μmol) in acetic acid (0.3 mL) and water (0.6 mL) was added 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (6 μL , 46 μmol). Resulting mixture was warmed to 40 $^{\circ}\text{C}$, and reaction was found completed by LC-MS after 5 hours. The reaction medium was washed with EtOAc (3 times) then solvent were removed by evaporation under reduced pressure to afford a dark oil as crude product (18 mg). The latter was purified by RP-HPLC to afford pure **175a** (traces only, yield was not calculated).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.92 (s, 1H, ^{15}CH), 6.70 (*ps* t, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{22}CH), 6.02 (*ps* t, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{23}CH), 4.61-4.54 (m, 2H, $^{13}\text{CH}_2$), 4.53 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{16}\text{CH}_2$), 4.03 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $^{21}\text{CH}_2$), 3.86-3.80 (m, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.82 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.78 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, ^3CH), 3.74 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, ^4CH), 3.70-3.65 (m, 1H, ^5CH), 3.68 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $^{20}\text{CH}_2$), 3.61-3.46 (m, 6H, $^{12}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$), 3.33-3.27 (m, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.13 (dd, $J = 12.3, 3.8$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.98 (dd, $J = 12.4, 8.1$ Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.40-2.29 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$), 2.25-2.14 (m, 1H, ^{10}CH), 2.06-1.92 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$), 1.82-1.69 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 145.8 ($^{14}\text{C}_q$), 125.8 (^{15}CH), 121.9 (^{22}CH), 108.8 (^{23}CH), 75.5 (^4CH), 72.4 ($^{20}\text{CH}_2$), 72.3 (^3CH), 71.5, 71.4 ($^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$), 70.7 ($^{12}\text{CH}_2$), 70.4 (^5CH), 70.3 ($^{17}\text{CH}_2$), 64.5 ($^{13}\text{CH}_2$), 61.4 ($^7\text{CH}_2$), 54.1 ($^8\text{CH}_2$), 52.5 ($^6\text{CH}_2$), 51.4 ($^{16}\text{CH}_2$), 50.3 ($^{21}\text{CH}_2$), 41.8 (^{10}CH), 33.2 ($^{11}\text{CH}_2$), 29.7 ($^9\text{CH}_2$). $^{29}\text{C}_q$ is not observed.

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 510.29222, found 510.29091.

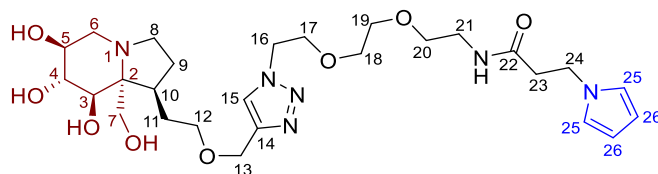
(1S,6S,7R,8R,8aR)-1-(2-((1-(14-(1H-Pyrrol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)ethyl)-8a-(hydroxymethyl)octahydroindolizine-6,7,8-triol (175b)



To a solution of **174b** (12 mg, 22 μmol) in acetic acid (0.2 mL) and water (0.4 mL) was added 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (4 μL , 31 μmol). Resulting mixture was warmed to 40 $^{\circ}\text{C}$, and reaction was found completed by LC-MS after 4.5 hours. The reaction medium was washed with EtOAc (3 times) then solvents were removed by evaporation under reduced pressure to afford a dark oil as crude product (18 mg). The latter was purified by RP-HPLC to afford pure **175b** (traces only, yield was not determined).

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_9\text{N}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: m/z : 598.34465, found 598.34429.

3-(1*H*-Pyrrol-1-yl)-*N*-(2-(2-(2-(4-((2-((1*S*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6,7,8-trihydroxy-8*a*-(hydroxymethyl)octahydroindolizin-1-yl)ethoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)propanamide (176*a*)



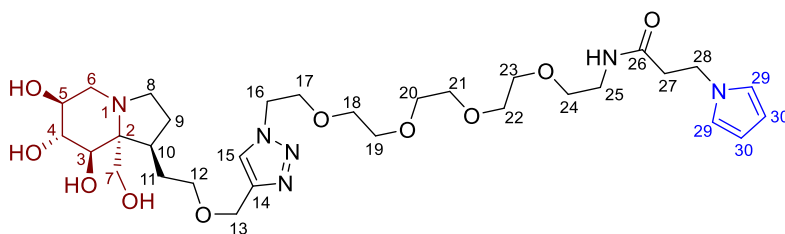
To a solution of **174a** (25 mg, 54 μ mol) in CH₃CN/H₂O (2:1, 1.5 mL) was added **43** (14 mg, 59 μ mol), and 3 drops of triethylamine. This solution was stirred during 24 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by RP-HPLC to afford pure **176a** (20 mg, **65%**). $[\alpha]_D^{20} +1.90$ (*c* 1.00, CH₃OH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.01 (s, 1H, ¹⁵CH), 6.67 (*ps* t, *J* = 2.1 Hz, 2H, ²⁵CH₂), 6.02 (*ps* t, *J* = 2.1 Hz, 2H, ²⁶CH₂), 4.62-4.54 (m, 4H, ¹³CH₂, ¹⁶CH₂), 4.20 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, ²⁴CH₂), 4.04 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, ⁷CH₂), 3.90 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, ¹⁷CH₂), 3.86-3.76 (m, 3H, ³CH, ⁴CH, ⁵CH), 3.71-3.51 (m, 7H, ⁸CH₂, ¹²CH₂, ¹⁸CH₂, ¹⁹CH₂), 3.46-3.36 (m, 1H, ⁷CH₂, ⁸CH₂, ²⁰CH₂), 3.32-3.25 (m, 3H, ⁶CH₂, ²¹CH₂), 3.21-3.14 (m, 1H, ⁶CH₂), 2.62 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, ²³CH₂), 2.45-2.35 (m, 1H, ¹⁰CH), 2.31-2.20 (m, 1H, ¹¹CH₂), 2.14-2.00 (m, 2H, ⁹CH₂), 1.93-1.83 (m, 1H, ¹¹CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 173.4 (²²C_q), 145.8 (¹⁴C_q), 125.8 (¹⁵CH), 121.5 (²⁵CH), 108.9 (²⁶CH), 75.1 (²C_q), 75.0 (⁴CH), 71.7 (³CH), 71.4, 71.2 (¹⁸CH₂, ¹⁹CH₂), 70.5 (²⁰CH₂), 70.4 (¹²CH₂), 70.3 (¹⁷CH₂), 69.7 (⁵CH), 64.5 (¹³CH₂), 60.0 (⁷CH₂), 54.6 (⁸CH₂), 51.4 (¹⁶CH₂), 51.2 (⁶CH₂), 46.5 (²⁴CH₂), 41.5 (¹⁰CH), 40.4 (²¹CH₂), 39.3 (²³CH₂), 31.9 (¹¹CH₂), 29.3 (⁹CH₂).

HRMS (ESI): calculated for C₂₇H₄₅O₈N₆ [M + H]⁺: *m/z* : 581.32934, found 581.32767.

3-(1*H*-Pyrrol-1-yl)-*N*-(14-(4-((2-((1*S*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-6,7,8-trihydroxy-8*a*-(hydroxymethyl)octahydroindolizin-1-yl)ethoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)propanamide (176*b*)



To a solution of **174b** (11 mg, 20 μ mol) in CH₃CN/H₂O (2:1, 1.5 mL) was added **43** (6 mg, 25 μ mol), and 3 drops of triethylamine. This solution was stirred during 17 hours at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by RP-HPLC to afford pure **176b** (7 mg, **52%**). $[\alpha]_D^{20} +3.43$ (*c* 0.35, CH₃OH).

Partie expérimentale

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.01 (s, 1H, ^{15}CH), 6.65 (ps t, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{29}CH), 6.00 (ps t, $J = 2.1$ Hz, 2H, ^{30}CH), 4.62-4.53 (m, 4H, $^{13}\text{CH}_2$, $^{16}\text{CH}_2$), 4.18 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $^{28}\text{CH}_2$), 3.91 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $^7\text{CH}_2$), 3.88 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $^{17}\text{CH}_2$), 3.81-3.75 (m, 2H, ^3CH , ^4CH), 3.74-3.68 (m, 1H, ^5CH), 3.64-3.48 (m, 15H, $^8\text{CH}_2$, $^{12}\text{CH}_2$, $^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$, $^{21}\text{CH}_2$, $^{22}\text{CH}_2$, $^{23}\text{CH}_2$), 3.46 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $^{24}\text{CH}_2$), 3.39-3.33 (m, 2H, $^7\text{CH}_2$, $^8\text{CH}_2$), 3.32-3.29 (m, 2H, $^{25}\text{CH}_2$), 3.18 (dd, $J = 12.5$, 3.8 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 3.25 (dd, $J = 12.4$, 7.7 Hz, 1H, $^6\text{CH}_2$), 2.60 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $^{27}\text{CH}_2$), 2.35-2.22 (m, 2H, ^{10}CH , $^{11}\text{CH}_2$), 2.09-1.94 (m, 2H, $^9\text{CH}_2$), 1.86-1.75 (m, 1H, $^{11}\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.4 ($^{26}\text{C}_q$), 145.8 ($^{14}\text{C}_q$), 125.8 (^{15}CH), 121.5 (^{29}CH), 108.9 (^{30}CH), 75.2 (^4CH), 74.5 ($^2\text{C}_q$), 72.1 (^3CH), 71.5, 71.5, 71.5, 71.5, 71.4, 71.2 ($^{18}\text{CH}_2$, $^{19}\text{CH}_2$, $^{20}\text{CH}_2$, $^{21}\text{CH}_2$, $^{22}\text{CH}_2$, $^{23}\text{CH}_2$), 70.5 ($^{24}\text{CH}_2$), 70.4 ($^{12}\text{CH}_2$), 70.3 ($^{17}\text{CH}_2$), 70.2 (^5CH), 64.5 ($^{13}\text{CH}_2$), 60.8 ($^7\text{CH}_2$), 54.3 ($^8\text{CH}_2$), 51.9 ($^6\text{CH}_2$), 51.4 ($^{16}\text{CH}_2$), 46.5 ($^{28}\text{CH}_2$), 41.7 (^{10}CH), 40.4 ($^{25}\text{CH}_2$), 39.3 ($^{27}\text{CH}_2$), 32.7 ($^{11}\text{CH}_2$), 29.6 ($^9\text{CH}_2$)

HRMS (ESI): calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{O}_{10}\text{N}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: m/z : 669.38177, found 669.38108.

Experimental part for chapter 4

Material and Instrumentation

All the chemical reagents (BSA, sodium carbonate, Tween20, glycerol, sodium acetate, sodium hydroxide, hydrogen chloride, sodium chloride, *p*-nitrophenyl glycoside, guanidinium chloride and sodium dodecyl sulfate) were purchased from Sigma Aldrich. Rice α -glucosidases, and *Aspergillus Niger* β -glucosidases were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water was obtained from an ELGA (Veolia) purification system (18,2 M Ω .cm) and purified by filtration using 0.22 μ m filters.

SPRi biochips were purchased from Horiba Scientific (Chilly Mazarin, France) and are made of a high-index glass prism (60°) covered with a 50 nm thick gold layer. A plasma cleaner Femto (Diener Electronic, Germany) was used to clean the SPRi biochip surfaces before electrospotting. Electrospotting of pyrrole and pyrrole–iminosugar conjugates on the biochips was carried out using a non-commercial semi-automated device composed of a potentiostat (SP-200, Bio-Logic Science Instruments) and a mobile plate controlled by a motor ESP300 (Newport, France) controlled with a non-commercial software, or with an automated OmniGrid® Micro (Digilab®) using a X-Tend microarray pin (LabNext) controlled with the AxSys software (Cartesian Technologies).

Signal measurements were performed using a SPRi Lab+™ system (Horiba Scientific, Chilly-Mazarin, France) which was contained in a laboratory oven (Memmert oven) maintained at 25 °C. Running buffers were injected with a Cavro pump (Tecan, USA) and degassed using a dedicated degassing unit (Alltech, France). Region of interest (ROI) corresponding to the individual spots were defined using commercial software SPRiViewIt (from Horiba-Scientific Genoptics). Changes in the optical thickness on the ROI were interpreted by a 8-bit CCD Dolphin camera (Allied technologies) as gray-level contrasts in the plasmon reflected beam.

Inhibition of commercial glycosidases

α -glucosidases (from rice and yeast), β -glucosidase (from *Aspergillus niger*), β -galactosidase (from *Aspergillus oryzae*), and *p*-nitrophenyl glycosides used for the bioassays were purchased from Sigma Chemical Co. In a typical experiment, the glycosidase (0.013 U/mL) was pre-incubated at 33 °C for 5 min in the presence of 1 mM of the inhibitor in 50 mM acetate buffer (pH 5.6 for all enzymes except for α -glucosidases from rice and from yeast, respectively pH 5.1 and pH 6.2). The reaction was started by addition of the appropriate *p*-nitrophenyl glycoside substrate (1 mM) to a final volume of 250 μ l. The reaction was stopped after 15 min by addition of 350 μ L of 0.4 M Na₂CO₃. The released *p*-nitrophenolate was quantified spectrophotometrically at 410 nm and the net absorbance of the sample (A_{sample}) was obtained after subtracting the blank. The blank was measured in an additional experiment, conducted in the absence of enzyme. The control experiment contained no inhibitor.

Percentage of inhibition was calculated as follows:

Partie expérimentale

$$\%I = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) * 100$$

In cases where inhibition was greater than 95%, IC₅₀ values were determined after assaying decreasing concentrations of inhibitor. The inhibitory constant IC₅₀ is the concentration of iminosugar causing half-maximal enzyme activity. All the assays were done in duplicate (less than 10% variability in each case).

Preparation of SPRi biochips by electrospeoting

The SPRi biochips surface was cleaned using a plasma cleaner using following parameters: pressure 0.6 mBar, argon 75%, oxygen 25%, power: 40 w during 3 min. Prism was conserved at room temperature under normal atmosphere, and the electrospeoting was achieved between 24 hours and 48 hours after this treatment. The preparation of SPRi biochip was achieved by electrochemical copolymerization according to a method derived from the “electrospeoting” method already described in the literature.^{221,222} Aliquots of pyrrole–iminosugar conjugates were dissolved (1 μM to 1mM) in spotting buffer (50 mM phosphate buffer, pH 6.8, 50 mM NaCl, and 10% glycerol) containing 20 mM pyrrole. Using the non-commercial electrochemical device called “polypotter”, the electrocopolymerization was carried out in a pipet tip (500 μm diameter) containing a platinum wire as counter-electrode. The polymerization step was carried out by applying the following sequence: 0.4 V during 1 s, 2.4 V during 100 ms, 0.4 V during 1 s between the platinum wire (counter -electrode) and the gold surface (work electrode). The pipette tip was successively rinsed with water, filled with the solution containing the pyrrole-iminosugar conjugates and the process was repeated on the different locations on the gold surface. Using the OmniGrid® Micro (Digilab®) the electropolymerization was carried out with a X-Tend microarray pin (LabNext) made of a microporous ceramic head (200 μm diameter) containing a platinum wire as counter electrode. The polymerization step was carried out by applying the following sequence: 0.4 V during 1 s, 2.4 V during 100 ms, 0.4 V during 1 s between the platinum wire (counter -electrode) and the gold surface (work electrode). The pipette tip was successively rinsed 3 times with water, filled with the solution containing the pyrrole-iminosugar conjugates and the process was repeated on the different locations on the gold surface defined on the AxSys software (Cartesian Technologies). The obtained biochips were extensively rinsed with water after electrospeoting, stored in water at 4 °C, and used within 7 days.

SPRi Kinetic Experiment for the Detection of enzymes

The whole experiment was performed at 25 °C. SPRi biochip was mounted in microfluidic cell, then running buffer was flowed during at least 1 hour (running buffers were used as follow: sodium acetate 50 mM, pH 5.1, Tween 20 0.005% was used for experiment with α -glucosidases from *Oriza Sativa*, and sodium acetate 50 mM, pH 5.6, Tween 20 0.005% was used for *Aspergillus Niger* β -glucosidases). ROIs were defined using SPRiViewIt software (from Horiba-Scientific Genoptics) and plasmon curves were plotted for each in order to define working angle.

Biochips were either saturated or not with BSA. When applied, saturation with BSA was performed as follow: a 10 mg/mL BSA solution in running buffer was flowed during 10 minutes at 50 μ L/min. Enzymes solutions in running buffer were freshly prepared just before SPRi experiment, kept as aliquots over ice, and warmed to room temperature 5 minutes before being injected. A typical injection was carried as following: the 300 μ L injection loop was loaded with the enzymatic sample, and injected using a 6-way analytical valve at a 50 μ L/min flow rate during 4 minutes. After 4 minutes, injection was switched back to running buffer and flow was maintained during 14 to 25 minutes. In case of successive injections, injection loop was extensively rinsed with water (3 times) and then with running buffer (3 times). Regeneration of the biochip was performed using aqueous sodium hydroxide (0.01M) which was injected at 50 μ L/min flow rate over 4 min.

Partie expérimentale

Références bibliographiques

- ¹ Brás, N. F.; Cerqueira, N. M.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. *Expert Opin. Ther. Patents* **2014**, *24*, 857–874.
- ² Figure issue de A. E. Stütz, T. M. Wrodnigg in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier, **2016**, 225–302. Reproduite avec la permission de Elsevier, License n°5405850551415, 11 Octobre 2022.
- ³ Stanley, D.; Rejzek, M.; Naested, H.; Smedley, M.; Otero, S.; Fahy, B.; Thorpe, F.; Nash, R. J.; Harwood, W.; Svensson, B.; Denyer, K.; Field, R. A.; Smith, A. M. *Plant Physiology* **2011**, *155*, 932–943.
- ⁴ Herscovics, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 96–107.
- ⁵ von Itzstein, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 967–974.
- ⁶ King, S. J. *Mol. Oral Microbiol.* **2010**, *25*, 15–24.
- ⁷ Wehmeier, U. F.; Piepersberg, W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 613–625.
- ⁸ Rahfeld, P.; Sim, L.; Moon, H.; Constantinescu, I.; Morgan-Lang, C.; Hallam, S. J.; Kizhakkedathu, J. N.; Withers, S. G. *Nat Microbiol* **2019**, *4*, 1475–1485.
- ⁹ Shrivastata, S. *Industrial applications of glycoside hydrolases*, Springer, **2020**.
- ¹⁰ Sørensen, J. F.; Kragh, K. M.; Sibbesen, O.; Delcour, J.; Goesaert, H.; Svensson, B.; Tahir, T. A.; Brufau, J.; Perez-Vendrell, A. M.; Bellincampi, D.; D'Ovidio, R.; Camardella, L.; Giovane, A.; Bonnin, E.; Juge, N. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2004**, *1696*, 275–287.
- ¹¹ Wolfenden, R.; Lu, X.; Young, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814–6815.
- ¹² Lopezcasado, G.; Urbanowicz, B.; Damasceno, C.; Rose, J. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **2008**, *11*, 329–337.
- ¹³ Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Pandey, A.; Ganansounou, E. *Bioresour. Technol.* **2017**, *245*, 1352–1361.
- ¹⁴ Ernst, B., Hart, G. W., & Sinay, P. *Carbohydrates in chemistry and biology*. Wiley Blackwell, **2000**, Vol 3, 497–511.
- ¹⁵ Davies, G.; Henrissat, B. *Structure* **1995**, *3*, 853–859.
- ¹⁶ a) <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb>; b) McDonald, A. G.; Boyce, S.; Tipton, K. F. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D593–D597.
- ¹⁷ <https://www.enzyme-database.org/>
- ¹⁸ Henrissat, B. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 309–316.
- ¹⁹ a) <http://www.cazy.org>; b) Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D490–D495.
- ²⁰ Drula, E.; Garron, M.-L.; Dogan, S.; Lombard, V.; Henrissat, B.; Terrapon, N. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D571–D577.
- ²¹ a) McCarter, J. D.; Stephen Withers, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885–892. b) Zechel, D. L.; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11–18.
- ²² Koshland, D. E. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416–436.
- ²³ Compain, P.; Martin, O.R. *Iminosugars: From synthesis to therapeutic applications* Wiley, **2007**.
- ²⁴ a) Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Nida, T. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1966**, *19*, 288–292. b) Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Ito, T.; Niida T. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2125–2144.
- ²⁵ Paulsen, H.; Sangster, I.; Heyns, K. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 802–815.
- ²⁶ Yagi, M.; Kouno T.; Aoyagi, Y.; Murai, H. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *50*, 571–572.
- ²⁷ Stütz, A. E. *Iminosugars as glycosidase inhibitors: nojirimycin and beyond*; Wiley, Weinheim, **1999**.
- ²⁸ Colegate, S.; Dorling, P.; Huxtable, C. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2257–2264.
- ²⁹ Legler, G. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 319–384.
- ³⁰ Hohenschutz, L. D.; Bell, E. A.; Jewess, P. J.; Leworthy, D. P.; Pryce, R. J.; Arnold, E.; Clardy, J. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 811–814.
- ³¹ Bernotas, R. C.; Ganem, B. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 165–168.
- ³² a) Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645–1680. b) Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265–295. c) Asano, N. *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R – 104R. d) Nash, R. J.; Kato, A.; Yu, C.-Y.; Fleet, G. W. *Fut. Med. Chem.* **2011**, *3*, 1513–1521.

- ³³ Schweden, J.; Borgmann, C.; Legler, G.; Bause, E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *248*, 335–340.
- ³⁴ Yoshikuni, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 121–128.
- ³⁵ a) Asano, N.; Kizu, H.; Oseki, K.; Tomioka, E.; Matsui, K.; Okamoto, M.; Baba, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2349–2356. b) Asano, N.; Nishida, M.; Kato, A.; Kizu, H.; Matsui, K.; Shimada, Y.; Itoh, T.; Baba, M.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Lilley, P. M. de Q.; Watkin, D. J.; Fleet, G. W. J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2565–2571.
- ³⁶ Godin, G.; Compain, P.; Martin, O. R.; Ikeda, K.; Yu, L.; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5991–5995.
- ³⁷ Hettkamp, H.; Legler, G.; Bause, E. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 85–90.
- ³⁸ Kato, A.; Hayashi, E.; Miyauchi, S.; Adachi, I.; Imahori, T.; Natori, Y.; Yoshimura, Y.; Nash, R. J.; Shimaoka, H.; Nakagome, I.; Koseki, J.; Hirono, S.; Takahata, H. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10347–10362.
- ³⁹ Scott, L. J.; Spencer, C. M. *Drugs* **2000**, *59*, 521–549.
- ⁴⁰ Ficicioglu, C. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 425–431.
- ⁴¹ Pineda, M.; Walterfang, M.; Patterson, M. C. *Orphanet J. Rare Dis.* **2018**, *13*, 140.
- ⁴² Olden, K.; Breton, P.; Grzegorzewski, K.; Yasuda, Y.; Gause, B. L.; Oredipe, O. A.; Newton, S. A.; White, S. L. *Pharmacol. Ther.* **1991**, *50*, 285–290.
- ⁴³ Pauling, L. *Chem. Eng. News Archive* **1946**, *24*, 1375–1377.
- ⁴⁴ Wolfenden, R. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 10–18.
- ⁴⁵ Asano, N.; Ikeda, K.; Yu, L.; Kato, A.; Takebayashi, K.; Adachi, I.; Kato, I.; Ouchi, H.; Takahata, H.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 223–229.
- ⁴⁶ Boisson, J.; Thomasset, A.; Racine, E.; Cividino, P.; Banchelin Sainte-Luce, T.; Poisson, J.-F.; Behr, J.-B.; Py, S. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3662–3665.
- ⁴⁷ Vieira Da Cruz, A.; Kanazawa, A.; Poisson, J.-F.; Behr, J.-B.; Py, S. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9866–9872.
- ⁴⁸ Lu, T.-T.; Shimadate, Y.; Cheng, B.; Kanekiyo, U.; Kato, A.; Wang, J.-Z.; Li, Y.-X.; Jia, Y.-M.; Fleet, G. W. J.; Yu, C.-Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *224*, 113716.
- ⁴⁹ Larsbrink, J.; Izumi, A.; Hemsworth, G. R.; Davies, G. J.; Brumer, H. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43288–43299.
- ⁵⁰ Burke, H. M.; Gunnlaugsson, T.; Scanlan, E. M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10576–10588.
- ⁵¹ Tangkuaram, T.; Gerlach, J. Q.; Xiang, Y.; Kawde, A.-N.; Dai, Z.; Bhavanandan, V. P.; La Belle, J. T.; Veerasai, W.; Joshi, L.; Wang, J. *Analyst* **2006**, *131*, 889–891.
- ⁵² Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888–4894.
- ⁵³ Stubbs, K. A. *Carbohydr. Res.* **2014**, *390*, 9–19.
- ⁵⁴ a) Willems, L. I.; Jiang, J.; Li, K.-Y.; Witte, M. D.; Kallemeijn, W. W.; Beenakker, T. J. N.; Schröder, S. P.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Overkleeft, H. S. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 10864–10872. b) Wu, L.; Armstrong, Z.; Schröder, S. P.; de Boer, C.; Artola, M.; Aerts, J. M.; Overkleeft, H. S.; Davies, G. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *53*, 25–36.
- ⁵⁵ Withers, S. G.; Street, I. P.; Bird, P.; Dolphin, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7530–7531.
- ⁵⁶ Phenix, C. P.; Rempel, B. P.; Colobong, K.; Doudet, D. J.; Adam, M. J.; Clarke, L. A.; Withers, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 10842–10847.
- ⁵⁷ Witte, M. D.; Kallemeijn, W. W.; Aten, J.; Li, K.-Y.; Strijland, A.; Donker-Koopman, W. E.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; Bleijlevens, B.; Kramer, G.; Florea, B. I.; Hooibrink, B.; Hollak, C. E. M.; Ottenhoff, R.; Boot, R. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 907–913.
- ⁵⁸ Arribas, J. C. D.; Herrero, A. G.; Martín-Lomas, M.; Cañada, F. J.; He, S.; Withers, S. G. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6996–7005.
- ⁵⁹ Figure issue de la référence 57. Reproduite avec la permission de **Springer Nature**, License n° 5397541015549, 28 Septembre 2022.
- ⁶⁰ Kallemeijn, W. W.; Li, K.-Y.; Witte, M. D.; Marques, A. R. A.; Aten, J.; Scheij, S.; Jiang, J.; Willems, L. I.; Voorn-Brouwer, T. M.; Van Roomen, C. P. A. A.; Ottenhoff, R.; Boot, R. G.; Van den Elst, H.; Walvoort, M. T. C.; Florea, B. I.; Codée, J. D. C.; Van der Marel, G. A.; Aerts, J. M. F. G.; Overkleeft, H. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12529–12533.
- ⁶¹ Jiang, J.; Kuo, C.-L.; Wu, L.; Franke, C.; Kallemeijn, W. W.; Florea, B. I.; van Meel, E.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Boot, R. G.; Davies, G. J.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 351–358.

- ⁶² Rowland, R. J.; Chen, Y.; Breen, I.; Wu, L.; Offen, W. A.; Beenakker, T. J.; Su, Q.; Nieuwendijk, A. M. C. H.; Aerts, J. M. F. G.; Artola, M.; Overkleeft, H. S.; Davies, G. J. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 16377–16388.
- ⁶³ Chen, Y.; Armstrong, Z.; Artola, M.; Florea, B. I.; Kuo, C.-L.; de Boer, C.; Rasmussen, M. S.; Abou Hachem, M.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Aerts, J. M. F. G.; Davies, G. J.; Overkleeft, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 2423–2432.
- ⁶⁴ a) Willems, L. I.; Beenakker, T. J. M.; Murray, B.; Scheij, S.; Kallemeijn, W. W.; Boot, R. G.; Verhoek, M.; Donker-Koopman, W. E.; Ferraz, M. J.; van Rijssel, E. R.; Florea, B. I.; Codée, J. D. C.; van der Marel, G. A.; Aerts, J. M. F. G.; Overkleeft, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11622–11625. b) Willems, L. I.; Beenakker, T. J. M.; Murray, B.; Gagestein, B.; van den Elst, H.; van Rijssel, E. R.; Codée, J. D. C.; Kallemeijn, W. W.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 6044–6056. c) Marques, A. R. A.; Willems, L. I.; Herrera Moro, D.; Florea, B. I.; Scheij, S.; Ottenhoff, R.; van Roomen, C. P. A. A.; Verhoek, M.; Nelson, J. K.; Kallemeijn, W. W.; Biela-Banas, A.; Martin, O. R.; Cachón-González, M. B.; Kim, N. N.; Cox, T. M.; Boot, R. G.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 402–412.
- ⁶⁵ a) Schröder, S. P.; Kallemeijn, W. W.; Debets, M. F.; Hansen, T.; Sobala, L. F.; Hakki, Z.; Williams, S. J.; Beenakker, T. J. M.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Davies, G. J.; Overkleeft, H. S. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 9983–9992. b) Armstrong, Z.; Kuo, C.-L.; Lahav, D.; Liu, B.; Johnson, R.; Beenakker, T. J. M.; de Boer, C.; Wong, C.-S.; van Rijssel, E. R.; Debets, M. F.; Florea, B. I.; Hissink, C.; Boot, R. G.; Geurink, P. P.; Ovaa, H.; van der Stelt, M.; van der Marel, G. M.; Codée, J. D. C.; Aerts, J. M. F. G.; Wu, L.; Overkleeft, H. S.; Davies, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 13021–13029.
- ⁶⁶ Gandy, M. N.; Debowski, A. W.; Stubbs, K. A. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5037–5039.
- ⁶⁷ a) Matos, C. R. R.; Lopes, R. S. C.; Lopes, C. C. *Synthesis* **1999**, *4*, 571–573. b) Setoi, H.; Takeno, H.; Hashimoto, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2642–2645. c) Fleet, G. W. J.; Carpenter, N. M.; Petursson, S.; Ramsden, N. G. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 409–412. d) Bagal, S. K.; Davies, S. G.; Lee, J. A.; Roberts, P. M.; Russell, A. J.; Scott, P. M.; Thomson, J. E. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 136–139. e) Danoun, G.; Cecon, J.; Greene, A. E.; Poisson, J.-F. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4221–4224. (exemples choisis, liste non exhaustive).
- ⁶⁸ Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena-Barragán, T.; Ortiz-Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753–5756.
- ⁶⁹ Kiguchi, T.; Tajiri, K.; Ninomiya, I.; Naito, T. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5819–5833.
- ⁷⁰ Breugst, M.; Reissig, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12293–12307.
- ⁷¹ Michael, A., *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94–95.
- ⁷² Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- ⁷³ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- ⁷⁴ Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2250–2255.
- ⁷⁵ Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216–2230.
- ⁷⁶ Özen, C.; Tüzün, N. Ş., *J. Mol. Graph. Model.* **2012**, *34*, 101–107.
- ⁷⁷ Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715–2750.
- ⁷⁸ Ziegler, M. S.; Lakshmi, K. V.; Tilley, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5378–5386.
- ⁷⁹ a) Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825–13831. b) Decroocq, C.; Stauffert, F.; Pamlard, O.; Oulaïdi, F.; Gallienne, E.; Martin, O. R.; Guillou, C.; Compain, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 830–833.
- ⁸⁰ a) Ardes-Guisot, N.; Alonzi, D. S.; Reinkensmeier, G.; Butters, T. D.; Norez, C.; Becq, F.; Shimada, Y.; Nakagawa, S.; Kato, A.; Blériot, Y.; Sollogoub, M.; Vauzeilles, B. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5373. b) Cendret, V.; Legigan, T.; Mingot, A.; Thibaudeau, S.; Adachi, I.; Forcella, M.; Parenti, P.; Bertrand, J.; Becq, F.; Norez, C.; Désiré, J.; Kato, A.; Blériot, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10734–10744.
- ⁸¹ Marra, A.; Zelli, R.; D’Orazio, G.; La Ferla, B.; Dondoni, A. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 9387–9393.
- ⁸² a) Diot, J.; García-Moreno, M. I.; Gouin, S. G.; Ortiz Mellet, C.; Haupt, K.; Kovensky, J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357–363. b) Brissonnet, Y.; Ortiz Mellet, C.; Morandat, S.; Garcia Moreno, M. I.; Deniaud, D.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Šesták, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18427–18435. c) Hurtaux, T.; Sfihi-Loualia, G.; Brissonnet, Y.; Bouckaert, J.; Mallet, J.-M.; Sendid, B.; Delplace, F.; Fabre, E.; Gouin, S. G.; Guéardel, Y. *Carbohydr. Res.* **2016**, *429*, 123–127.
- ⁸³ Klein, E.; DeBonis, S.; Thiede, B.; Skoufias, D. A.; Kozielski, F.; Lebeau, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6474–6488.

- ⁸⁴ Wang, C.; Abegg, D.; Hoch, D. G.; Adibekian, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2911–2915.
- ⁸⁵ Balakrishna, A.; Aguiar, A.; Sobral, P. J. M.; Wani, M. Y.; Almeida e Silva, J.; Sobral, A. J. F. N. *Catal. Rev.* **2019**, *61*, 84–110.
- ⁸⁶ Kumar, S.; Krishnakanth, S.; Mathew, J.; Pomerantz, Z.; Lellouche, J.-P.; Ghosh, S. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 2570–2579.
- ⁸⁷ a) Marra, A.; Vecchi, A.; Chiappe, C.; Melai, B.; Dondoni, A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2458–2461. b) Dondoni, A.; Marra, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7546–7557.
- ⁸⁸ Czech, B. P.; Bartsch, R. A. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4076–4078.
- ⁸⁹ Szcześniak, P.; Stecko, S.; Staszewska-Krajewska, O.; Furman, B. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1880–1888.
- ⁹⁰ Pabba, J.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 2006–2019.
- ⁹¹ Ye, X.-S.; Sun, F.; Liu, M.; Li, Q.; Wang, Y.; Zhang, G.; Zhang, L.-H.; Zhang, X.-L. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3688–3691.
- ⁹² Murata, H.; Cummings, C. S.; Koepsel, R. R.; Russell, A. J. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1919–1926.
- ⁹³ Hendrick, C. E.; Jorgensen, J. R.; Chaudhry, C.; Strambeanu, I. I.; Brazeau, J.-F.; Schiffer, J.; Shi, Z.; Venable, J. D.; Wolkenberg, S. E. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 1182–1190.
- ⁹⁴ Azioune, A.; Ben Slimane, A.; Ait Hamou, L.; Pleuvy, A.; Chehimi, M. M.; Perruchot, C.; Armes, S. P. *Langmuir* **2004**, *20*, 3350–3356.
- ⁹⁵ Wahsner, J.; Désogère, P.; Abston, E.; Graham-O'Regan, K. A.; Wang, J.; Rotile, N. J.; Schirmer, M. D.; Santos Ferreira, D. D.; Sui, J.; Fuchs, B. C.; Lanuti, M.; Caravan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5593–5596.
- ⁹⁶ Tronchet, J. M. J.; Balkadjian, M.; Zosimo-Landolfo, G.; Barbalat-Rey, F.; Lichtle, P.; Ricca, A.; Komaromi, I.; Bernardinelli, G.; Geoffroy, M. *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 17–34.
- ⁹⁷ Merino, P.; Anoro, S.; Castillo, E.; Merchan, F.; Tejero, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1887–1890.
- ⁹⁸ Ohtake, H.; Imada, Y.; Murahashi, S.-I. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1999**, *72*, 2737–2754.
- ⁹⁹ Goti, A.; Cicchi, S.; Mannucci, V.; Cardona, F.; Guarna, F.; Merino, P.; Tejero, T. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4235–4238.
- ¹⁰⁰ García-Viñuales, S.; Delso, I.; Merino, P.; Tejero, T. *Synthesis* **2016**, *48*, 3339–3351.
- ¹⁰¹ Lin, C.-K.; Cheng, L.-W.; Li, H.-Y.; Yun, W.-Y.; Cheng, W.-C. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2100–2107.
- ¹⁰² Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Hausler, H.; Larsen, J. S.; Tyler, P. C. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2217–2220.
- ¹⁰³ Archibald, G.; Lin, C.-P.; Boyd, P.; Barker, D.; Caprio, V. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7968–7980.
- ¹⁰⁴ (a) Frantz, D. E.; Fässler, R.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11245–11246. (b) Fässler, R.; Frantz, D. E.; Oetiker, J.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *41*, 3054–3056.
- ¹⁰⁵ Topić, D.; Aschwanden, P.; Fässler, R.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5329–5330.
- ¹⁰⁶ Pinet, S.; Pandya, S. U.; Chavant, P. Y.; Ayling, A.; Vallée, Y. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1463–1466.
- ¹⁰⁷ Liu, C.; Kang, H.; Wightman, R. H.; Jiang, S. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1192–1194.
- ¹⁰⁸ Yamashita, Y.; Saito, Y.; Imaizumi, T.; Kobayashi, S. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3958–3962.
- ¹⁰⁹ Saito, Y.; Yamashita, Y.; Kobayashi, S. *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 976–977.
- ¹¹⁰ Ji, D.-M.; Xu, M.-H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2952–2955.
- ¹¹¹ Bunlaksananusorn, T.; Lecourt, T.; Micouin, L. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1457–1459.
- ¹¹² Pillard, C.; Desvergnès, V.; Py, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6209–6213.
- ¹¹³ Woźniak, Ł.; Staszewska-Krajewska, O.; Michalak, M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1933–1936.
- ¹¹⁴ (a) Bárász, N. M.; Hankovszky, O. H.; Sár, G. P.; Jerkovich, K.; Hideg, K. *Synthesis* **1996**, *2*, 204–208. (b) Sár, C. P.; Jekő, J.; Fajer, P.; Hideg, K. *Synthesis* **1999**, *6*, 1039–1045. (c) Sár, C. P.; Ósz, E.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2005**, *2*, 255–259. (d) Balog, M.; Abé, C.; Kálai, T.; Steinhoff, H.-J.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2007**, *11*, 1663–1670.
- ¹¹⁵ Sár, C. P.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Arkivoc* **2012**, *5*, 47–59.
- ¹¹⁶ Cantagrel, F.; Pinet, S.; Gimbert, Y.; Chavant, P. Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2694–2701.
- ¹¹⁷ Marco, J. A.; Carda, M.; Murga, J.; Portolés, R.; Falomir, E.; Lex, J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3237–3240.
- ¹¹⁸ Tangara, S.; Aupic, C.; Kanazawa, A.; Poisson, J.-F.; Py, S. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4842–4845.
- ¹¹⁹ Tangara, S.; Kanazawa, A.; Fayolle, M.; Philouze, C.; Poisson, J.-F.; Behr, J.-B.; Py, S. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 16735–16743.
- ¹²⁰ Maughan, M. A. T.; Davies, I. G.; Claridge, T. D. W.; Courtney, S.; Hay, P.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3788–3792.

- ¹²¹ Simonin, J.; Vernekar, S. K. V.; Thompson, A. J.; Hothersall, J. D.; Connolly, C. N.; Lummis, S. C. R.; Lochner, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1151–1155.
- ¹²² Loska, R.; Janiga, A.; Gryko, D. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2013**, *17*, 104–117.
- ¹²³ Py, S.; Kanazawa, A.; Vieira Da Cruz, A.; Tangara, S. (2020) *Brevet FR3109523*. Courbevoie – France. Institut national de la propriété industrielle.
- ¹²⁴ Rambabu, D.; Bhavani, S.; Swamy, N. K.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 1169–1173.
- ¹²⁵ Fraňová, P.; Marchalín, Š. *Recent Eur J Org Chem* **2022**, *35*, 1–17.
- ¹²⁶ Voir notamment : (a) Fürstner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3012–3043. (b) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4490–4527. (c) Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A. R. *Nature* **2007**, *450*, 243–251. (d) C. Majumdar, K.; Muhuri, S.; Ul Islam, R.; Chattopadhyay, B. *Heterocycles* **2009**, *78*, 1109–1169.
- ¹²⁷ (a) Grubbs, R. H.; Brunck, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2538–2540. (b) Grubbs, R. H.; Burk, P. L.; Carr, D. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3265–3267.
- ¹²⁸ Hérisson, J.-L.; Chauvin, Y. *Makromol. Chem.* **1971**, *141*, 161–176.
- ¹²⁹ Seyferth, K.; Taube, R. *J. Mol. Catal.* **1985**, *28*, 53–69.
- ¹³⁰ Schrock, R.; Rocklage, S.; Wengrovius, J.; Rupprecht, G.; Fellmann, J. *J. Mol. Catal.* **1980**, *8*, 73–83.
- ¹³¹ (a) Nguyen, S. T.; Johnson, L. K.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974–3975. (b) Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9858–9859.
- ¹³² Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18–29.
- ¹³³ Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953–956.
- ¹³⁴ Fürstner, A.; Ackermann, L.; Gabor, B.; Goddard, R.; Lehmann, C. W.; Mynott, R.; Stelzer, F.; Thiel, O. R. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3236–3253.
- ¹³⁵ (a) Pandit, U. K.; Overkleeft, H. S.; Borer, B. C.; Bieräugel, H. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 959–968. (b) Compain, Philippe. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1829–1846. (c) Dragutan, I.; Dragutan, V.; Démonceau, A. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 719–736. (d) Dragutan, V.; Dragutan, I.; Démonceau, A.; Vosloo, H. C.M. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 2721–2739. (e) Ratmanova, N. K.; Andreev, I. A.; Leontiev, A. V.; Momotova, D.; Novoselov, A. M.; Ivanova, O. A.; Trushkov, I. V. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 131031.
- ¹³⁶ Singh, O. V.; Han, H. *Tetrahedron. Lett.* **2003**, *44*, 2387–2391.
- ¹³⁷ Chagnault, V.; Compain, P.; Lewinski, K.; Ikeda, K.; Asano, N.; Martin, O. R. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3179–3182.
- ¹³⁸ Ansari, A. A.; Vankar, Y. D. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9383–9395.
- ¹³⁹ Michalik, A.; Hollinshead, J.; Jones, L.; Fleet, G. W. J.; Yu, C.-Y.; Hu, X.-G.; van Well, R.; Horne, G.; Wilson, F. X.; Kato, A.; Jenkinson, S. F.; Nash, R. J. *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 136–138.
- ¹⁴⁰ Verhelst, S. H. L.; Paez Martinez, B.; Timmer, M. S. M.; Lodder, G.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9598–9603.
- ¹⁴¹ Wright, D. L.; Schulte, J. P.; Page, M. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1847–1850.
- ¹⁴² Yang, Q.; Xiao, W.-J.; Yu, Z. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 871–874.
- ¹⁴³ Gonda, J.; Elečko, J.; Martinková, M.; Fábian, M. *Tetrahedron. Lett.* **2016**, *57*, 2895–2897.
- ¹⁴⁴ Ayad, T.; Génisson, Y.; Baltas, M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2626–2631.
- ¹⁴⁵ Pradal, A. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, **2012**.
- ¹⁴⁶ (a) Hu, Y.; Bai, M.; Yang, Y.; Zhou, Q. *Org. Chem. Front.* **2017**, *4*, 2256–2275. (b) Li, J.; Lee, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 4269–4287.
- ¹⁴⁷ Katz, T. J.; Sivavec, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 737–738.
- ¹⁴⁸ Trost, B. M.; Lautens, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1781–1783.
- ¹⁴⁹ Kinoshita, A.; Mori, M. *Synlett* **1994**, *12*, 1020–1022.
- ¹⁵⁰ Kitamura, T.; Sato, Y.; Mori, M. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 678–693.
- ¹⁵¹ Lee, Y.-J.; Schrock, R. R.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10652–10661.
- ¹⁵² Zhao, Y.; Hoveyda, A. H.; Schrock, R. R. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 784–787.
- ¹⁵³ Mori, M.; Sakakibara, N.; Kinoshita, A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6082–6083.
- ¹⁵⁴ Yang, Q.; Alper, H.; Xiao, W.-J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 769–771.

- ¹⁵⁵ Grotevendt, A. G. D.; Lummiss, J. A. M.; Mastronardi, M. L.; Fogg, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15918–15921.
- ¹⁵⁶ Kinoshita, A.; Mori, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8356–8357.
- ¹⁵⁷ Trost, B. M.; Doherty, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3801–3810.
- ¹⁵⁸ Brenneman, J. B.; Martin, S. F. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1329–1331.
- ¹⁵⁹ Fukumoto, H.; Takahashi, K.; Ishihara, J.; Hatakeyama, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2731–2734.
- ¹⁶⁰ Zuercher, W. J.; Scholl, M.; Grubbs, R. H. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4291–4298.
- ¹⁶¹ Sayyad, A. A.; Kaliappan, K. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 5055–5065.
- ¹⁶² Gracias, V.; Gasielki, A. F.; Djuric, S. W. *Tetrahedron. Lett.* **2005**, *46*, 9049–9052.
- ¹⁶³ Mori, M.; Wakamatsu, H.; Saito, N.; Sato, Y.; Narita, R.; Sato, Y.; Fujita, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3872–3881.
- ¹⁶⁴ Binder, J. B.; Blank, J. J.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4885–4888.
- ¹⁶⁵ (a) Kitamura, T.; Sato, Y.; Mori, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9649–9657. (b) Stewart, I. C.; Douglas, C. J.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 441–444. (c) Hoveyda, A. H.; Gillingham, D. G.; Veldhuizen, J. J. V.; Kataoka, O.; Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Harrity, J. P. A. *Org. Biomol. Chem* **2004**, *2*, 8–23.
- ¹⁶⁶ Mladena Glavas, Rudler Boskovic Institute, Rapport de stage, **2018**.
- ¹⁶⁷ Clark, J. S.; Elustondo, F.; Kimber, M. C. *Chem. Commun.* **2004**, 2470–2471.
- ¹⁶⁸ Blackwell, H. E.; O’Leary, D. J.; Chatterjee, A. K.; Washenfelder, R. A.; Bussmann, D. A.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 58–71.
- ¹⁶⁹ Criegee, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 745–752.
- ¹⁷⁰ Veyzoglu, T.; Mitscher, L. A.; Swayze, J. K. *Synthesis* **1980**, 807–810.
- ¹⁷¹ Łukasik, B.; Mikołajczyk, M.; Bujacz, G.; Żurawiński, R. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 807–816.
- ¹⁷² Tanaka, M.; Norimine, Y.; Fujita, T.; Suemune, H.; Sakai, K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6952–6957.
- ¹⁷³ Chandra, G.; Majik, M. S.; Lee, J. Y.; Jeong, L. S. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2134–2137.
- ¹⁷⁴ (a) Harada, K.; Kato, H.; Fukuyama, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7407–7410. (b) Takahashi, A.; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1227–1231.
- ¹⁷⁵ Trost, B. M.; Rudd, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4763–4776.
- ¹⁷⁶ Hayakawa, I.; Niida, K.; Kigoshi, H. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 11568–11571.
- ¹⁷⁷ Yagai, S.; Tamiaki, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, *23*, 3135–3144.
- ¹⁷⁸ Gautier de Lahaut, G. Rapport de stage de Master 2; Université Paris-Sorbonne, **2018**.
- ¹⁷⁹ Pelter, A.; Smith, K.; Brown, H. C. *Best synthetic methods - Borane reagents*, Academic Press, New York, **1988**.
- ¹⁸⁰ Table des pKa de D. Evans, (disponible : <https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/pka/>)
- ¹⁸¹ (a) Garcia, J.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4841–4844. (b) Urpí, F.; Vilarrasa, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4623–4624.
- ¹⁸² Griffet, R. Rapport de stage de Master 1 ; Université Grenoble Alpes, **2020**.
- ¹⁸³ Huang, Y.; Hayashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12340–12343.
- ¹⁸⁴ Kojima, R.; Akiyama, S.; Ito, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7196–7199.
- ¹⁸⁵ Clark Jr., L. C.; Lyons, C. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, *102*, 29–45.
- ¹⁸⁶ Nguyen, H.; Park, J.; Kang, S.; Kim, M. *Sensors* **2015**, *15*, 10481–10510.
- ¹⁸⁷ Wood, R. W. *Proc. Phys. Soc. London* **1902**, *18*, 269–275.
- ¹⁸⁸ Fano, U. *J. Opt. Soc. Am.* **1941**, *31*, 213–222.
- ¹⁸⁹ Otto, A. *Z. Physik* **1968**, *216*, 398–410.
- ¹⁹⁰ Kretschmann, E.; Raether, H. *Z. Naturforschung A* **1968**, *23*, 2135–2136.
- ¹⁹¹ Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I. *Sensors and Actuators* **1983**, *4*, 299–304.
- ¹⁹² Maillard, E. Thèse de doctorat, *Imagerie par résonance des plasmons de surface pour l’analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel*, Université Paris XI, **2004**.
- ¹⁹³ Lecaruyer, P.; Canva, M. *Techniques de l’Ingenieur*, Techniques de l’ingénieur, **2008**, R6718, 1–10.
- ¹⁹⁴ Kunz, U.; Katerkamp, A.; Renneberg, R.; Spener, F.; Cammann, K. *Sens. Actuators B Chem.* **1996**, *32*, 149–155.
- ¹⁹⁵ El Kazzy, M.; Weerakkody, J. S.; Hurot, C.; Mathey, R.; Buhot, A.; Scaramozzino, N.; Hou, Y. *Biosensors* **2021**, *11*, 244.

- ¹⁹⁶ Lichtenberg, J. Y.; Ling, Y.; Kim, S. *Sensors* **2019**, *19*, 1–17.
- ¹⁹⁷ Haseley, S. R.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *Top. Curr. Chem.* **2002**; *218*, 93–114.
- ¹⁹⁸ Dong, Q.; Hu, N.; Yue, H.; Wang, H.; Ku, J. *J. Chromatogr. B* **2021**, *1181*, 122919.
- ¹⁹⁹ Nanduri, V.; Balasubramanian, S.; Sista, S.; Vodyanoy, V. J.; Simonian, A. L. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *589*, 166–172.
- ²⁰⁰ Sauer, J.; Abou Hachem, M.; Svensson, B.; Jensen, K. J.; Thygesen, M. B. *Carbohydr. Res.* **2013**, *375*, 21–28.
- ²⁰¹ Figure issue de la référence 200. Reproduite avec la permission de Elsevier, License n°5392540065926, 19 Septembre 2022.
- ²⁰² Gossan, D. P. A.; Alabdul Magid, A.; Kouassi-Yao, P. A.; Behr, J.-B.; Ahibo, A. C.; Djakouré, L. A.; Harakat, D.; Voutquenne-Nazabadioko, L. *Phytochemistry* **2015**, *109*, 76–83.
- ²⁰³ Saul, R.; Molyneux, R. J.; Elbein, A. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *230*, 668–675.
- ²⁰⁴ Dixon, M. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170–171.
- ²⁰⁵ Szunerits, S.; Maalouli, N.; Wijaya, E.; Vilcot, J.-P.; Boukherroub, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 1435–1443.
- ²⁰⁶ Oliverio, M.; Perotto, S.; Messina, G. C.; Lovato, L.; De Angelis, F. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 29394–29411.
- ²⁰⁷ Newton, L.; Slater, T.; Clark, N.; Vijayaraghavan, A. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 376–393.
- ²⁰⁸ Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170.
- ²⁰⁹ Figure reproduite à partir de O’Connell, L.; Marcoux, P. R.; Roupioz, Y. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 1987–2014. Copyright {2022} American Chemical Society.)
- ²¹⁰ A. Dall’olio, Y. Dascola, V. Varacca, V. C. R. Bocchi: *Acad. Sci. Ser. C* **1968**, *267*, 433–435.
- ²¹¹ Diaz, A. F.; Kanazawa, K. K.; Gardini, G. P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, *14*, 635–636.
- ²¹² Genies, E. M.; Bidan, G.; Diaz, A. F. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1983**, *149*, 101–113.
- ²¹³ Foulds, N. C.; Lowe, C. R. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1986**, *82*, 1259–1264.
- ²¹⁴ Umana, Mirtha.; Waller, Jess. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2979–2983.
- ²¹⁵ Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 443–456.
- ²¹⁶ Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 345–359.
- ²¹⁷ Malhotra, B. D.; Chaubey, A.; Singh, S. P. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *578*, 59–74.
- ²¹⁸ Livache, T.; Roget, A.; Dejean, E.; Barthet, C.; Bidan, G.; Teoule, R. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2915–2921.
- ²¹⁹ Bidan, G.; Billon, M.; Galasso, K.; Livache, T.; Mathis, G.; Roget, A.; Torres-Rodriguez, L. M.; Vieil, E. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *89*, 183–194.
- ²²⁰ Sabouraud, G.; Sadki, S.; Brodie, N. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 283–293.
- ²²¹ Guedon, P.; Livache, T.; Martin, F.; Lesbre, F.; Roget, A.; Bidan, G.; Levy, Y. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 6003–6009.
- ²²² Grosjean, L.; Cherif, B.; Mercey, E.; Roget, A.; Levy, Y.; Marche, P. N.; Villiers, M.-B.; Livache, T. *Anal. Biochem.* **2005**, *347*, 193–200.
- ²²³ Villiers, M.-B.; Cortès, S.; Brakha, C.; Lavergne, J.-P.; Marquette, C. A.; Deny, P.; Livache, T.; Marche, P. N. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1554–1559.
- ²²⁴ Mercey, E.; Sadir, R.; Maillart, E.; Roget, A.; Baleux, F.; Lortat-Jacob, H.; Livache, T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3476–3482.
- ²²⁵ Bulard, E.; Bouchet-Spinelli, A.; Chaud, P.; Roget, A.; Calemczuk, R.; Fort, S.; Livache, T. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1804–1811.
- ²²⁶ Figure issue de la référence 222, modifiée avec la permission de Elsevier, License n°5380281250454, 1^{er} Septembre 2022.
- ²²⁷ Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 2221–2295.
- ²²⁸ O. Sahu, N. Singh. *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile*. Elsevier, **2019**.
- ²²⁹ Fiche, J. B.; Buhot, A.; Calemczuk, R.; Livache, T. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 935–946.
- ²³⁰ Scatchard, G. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1949**, *51*, 660–672.
- ²³¹ Pedersen, D.; Rosenbohm, C. *Synthesis* **2001**, *16*, 2431–2434.

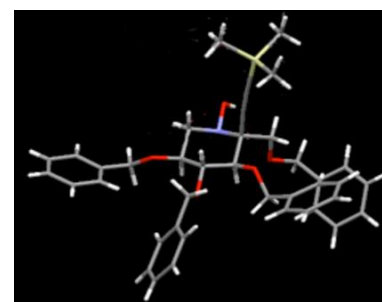
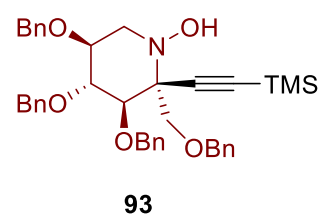
- ²³² Babij, N. R.; McCusker, E. O.; Whiteker, G. T.; Canturk, B.; Choy, N.; Creemer, L. C.; Amicis, C. V. D.; Hewlett, N. M.; Johnson, P. L.; Knobelsdorf, J. A.; Li, F.; Lorsbach, B. A.; Nugent, B. M.; Ryan, S. J.; Smith, M. R.; Yang, Q. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 661–667.
- ²³³ Stauffert, F.; Lepage, M.; Pichon, M.; Hazelard, D.; Bodlenner, A.; Compain, P. *Synthesis* **2016**, *48*, 1177–1180.
- ²³⁴ Li, T.; Guo, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhang, Z.; Li, J.; Zhang, W.; Lin, J.; Zhao, W.; Wang, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2136–2144.
- ²³⁵ Wennekes, T.; Meijer, A. J.; Groen, A. K.; Boot, R. G.; Groener, J. E.; van Eijk, M.; Ottenhoff, R.; Bijl, N.; Ghauharali, K.; Song, H.; O’Shea, T. J.; Liu, H.; Yew, N.; Copeland, D.; van den Berg, R. J.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 689–698.
- ²³⁶ Kabbaj, Y.; Lazrek, H. B.; Barascut, J. L.; Imbach, J. L. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2005**, *24*, 161–172.
- ²³⁷ Sakamoto, J.-I.; Takita, C.; Koyama, T.; Hatano, K.; Terunuma, D.; Matsuoka, K. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2735–2739.

Annexes

Appendix 1: X-ray diffraction data for hydroxylamine **93**

Single crystals of the compound were used for data collection on a Bruker-Enraf-Nonius CCD diffractometer using Cu K α graphite monochromated radiation ($\lambda = 0.154178 \text{ \AA}$). Intensity data were integrated and corrected for Lorentz and polarization effects using EVAL 14 then corrected for absorption using SADABS and finally merged using XPREP. Structure was solved by charge flipping method implement by SUPERFLIP. Refinements were performed with SHELX implemented via OLEX2. A summary of the crystallographic data and structure refinement is given in the Table below. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The hydrogen atoms were generated in idealized positions, riding on the carrier atoms with isotropic thermal parameters and re-idealized before every refinement cycle.

Crystal colour	Colourless
Crystal habit	Block
Crystal size, mm	0.20x0.50x0.52
Empirical formula	C ₃₉ H ₄₅ NO ₅ Si
<i>a</i> , Å	13.092(3)
<i>b</i> , Å	25.478(5)
<i>c</i> , Å	32.940(7)
α , deg	90
β , deg	96.13(3)
γ , deg	90
<i>V</i> , Å ³	10924(4)
λ , Å	1.54178
Crystal system	monoclinic
Space group	<i>P2</i> ₁
<i>Z</i>	12
Type of diffractometer	Bruker-Enraf-Nonius kappa CCD
Method of data collection	phi and omega scans
Reflections collected	85039
Independent reflections [<i>I</i> >2 σ (<i>I</i>)]	25056 [R(int) = 0.1158]
Completeness of data, deg	2.70 to 2 Θ = 131.98
Absorption correction	multi-scan
R [<i>I</i> >2 σ (<i>I</i>)]	R ₁ = 0.0856
$w = 1/[\sigma^2(F_o)^2 + (0.1550P)^2 + 7.3988P]$ where $P = ((F_o)^2 + 2(F_c)^2)/3$	wR ₂ = 0.2297
Number of parameters	2509
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Hydrogen atoms	Were set geometrically, constrained to ride on the carrier atom and re-idealized before every refinement cycle



Appendix 2: Data acquisition and signal processing

SPRi data were captured as images by a CCD camera. The SPRiViewIt software was used to translate grayscale level of some optical regions of interest (ORIs), corresponding to the different spots of the chip into ΔR values which were plotted over time to give proper sensorgrams, as schematically represented in **Figure 48** (see experimental part for details).

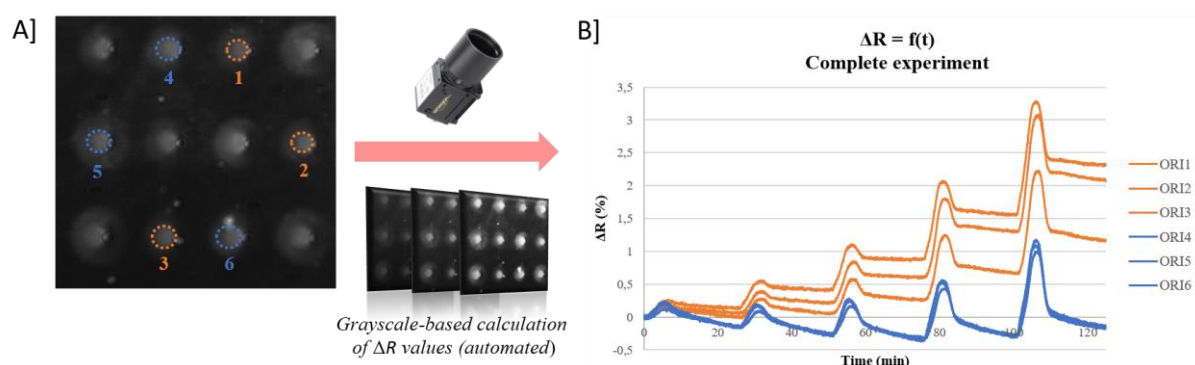


Figure 48 : Data recording – ORIs determination and curves plotting

While the sensorgrams can be visualized directly using the SPRiViewIt software to control the running of the experiment, such a display mode is not a relevant mode to achieve a fine analysis of the results. Therefore, data were exported for treatment (either as original images, or as text files containing ΔR values), in order to compare the properties of the different probes and of control plots. Different softwares are available to achieve such analysis (Matlab, Origin, and others). In our case, Excel (Microsoft Office) was used.

Since all the probes were always spotted several times on a chip (N replicates), the sensorgrams shown in this thesis are average representations (**Figure 49-B**) of the sum of sensorgrams obtained from each replicate of a same probe (**Figure 49-A**).

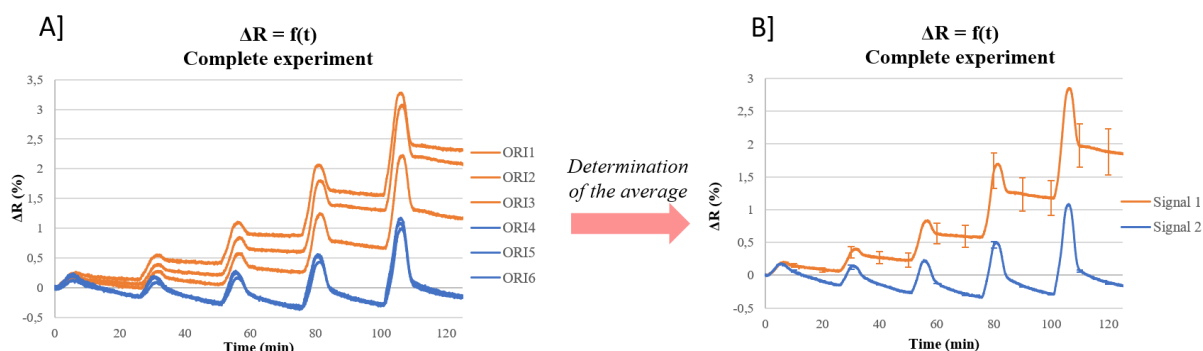


Figure 49 : Data treatment – Representation of average from a series of sensorgrams and statistical uncertainty bars

The statistical uncertainty of average sensorgrams (ε) is related to the standard deviation (σ) of the values measured in the initial series of datas for each probe and to the number of replicates N according to **Equation A2**. Such an uncertainty ε was represented on the corresponding average sensorgrams as error bars (**Figure 49-B**).

$$\Delta R_{average} = \frac{1}{N} \sum_i^N \Delta R_i \quad (\text{Equation A1})$$

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (\text{Equation A2})$$

Hence, similar ΔR values for the replicates will result in a minimized standard deviation, and uncertainty will be reduced, as represented in **Figure 49**. Indeed the orange sensorgrams result in strong bars of uncertainty, while the set of blue sensorgrams gives an average for which uncertainty bars are almost imperceptible. Another way to reduce the uncertainty bars is to increase the number of replicates of a series, while keeping a same value for the standard deviation (**Equation A2**).

As successive injections of analytes were achieved on a single chip during SPRi experiments, successive increases in ΔR values are observed (**Figure 50-A**). In order to study the influence of the analyte concentration on results, each injection has to be isolated as represented in **Figure 50-B**. However, such a treatment provides sensorgrams with different values for the initial ΔR (**Figure 51-A**), which can not be compared directly. After having substracted the initial value of ΔR to each value of the curves, the calibrated sensorgrams are obtained (**Figure 51-B**) and can be properly analyzed.

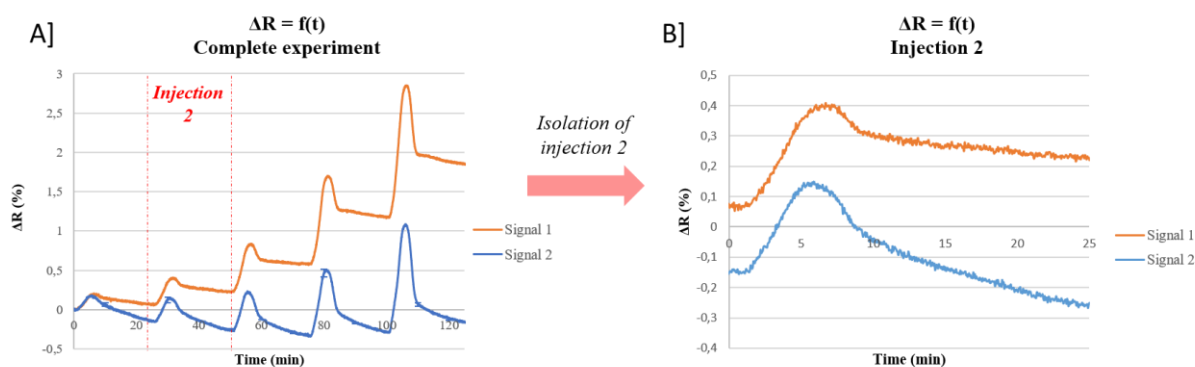


Figure 50 : Data treatment - Isolation of a single injection among a whole SPRi experiment

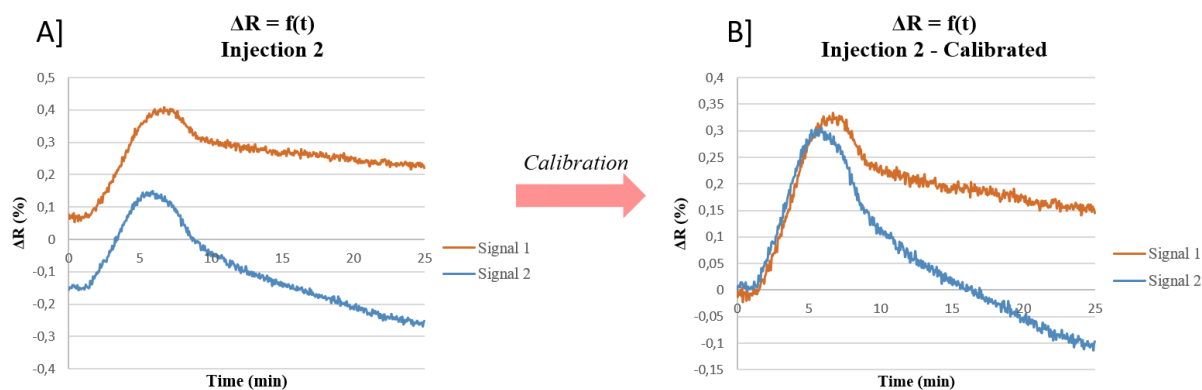


Figure 51 : Data treatment – Calibration of the curves

Then, in order to facilitate the analysis of the results, some signals were subtracted to other ones. Such a treatment was used to reveal the specific binding of an analyte to its receptor, subtracting unspecific binding due to the adsorption of the analyte on the polypyrrole matrix. As schematically represented in **Figure 52-A**, the blue signal of the control plots is not zero, showing a non-specific binding of the analyte on the chip. The subtraction of the blue curve to the orange one gives a new green signal (**Figure 52-B**), corresponding to the so-called normalized signal 1. Such treatment resulting in a “normalized injection” was not always applied, and has been mentioned when required.

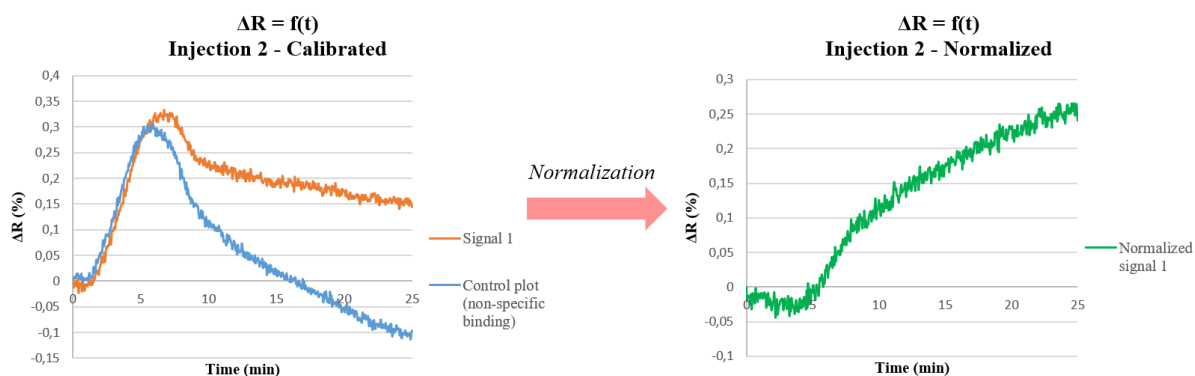


Figure 52 : Data treatment – Substraction of a signal

Résumé de thèse en français :

Les glycoside hydrolases (glycosidases) constituent une grande famille d'enzymes catalysant l'hydrolyse de liaisons osidiques. Quasiment ubiquitaires dans la Nature, elles sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, et leur dysfonctionnement peut conduire à diverses pathologies. Ces enzymes suscitent par ailleurs un grand intérêt parce qu'elles représentent des biocatalyseurs valorisables dans l'industrie agroalimentaire ou encore la production d'énergie à partir de biomasse.

Ces dernières décennies, l'analyse génomique a permis l'identification de nouvelles glycosidases chez de nombreux organismes vivants. Cependant, la structure et la fonction d'un très grand nombre de ces glycosidases restent méconnues, ce qui limite le développement d'application(s) potentielle(s). Ainsi, la conception de nouveaux outils pour l'analyse fonctionnelle et structurale des glycosidases est aujourd'hui primordiale pour une meilleure connaissance de cette vaste famille d'enzymes. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à des molécules de la famille des iminosucres pour concevoir des sondes de glycosidases, en vue de la mise au point de biopuces permettant de détecter et d'isoler certaines de ces enzymes sans altérer leur structure.

Trois familles de sondes basées sur des iminosucres de structures différentes ont été synthétisées, notamment en mettant en œuvre des réactions d'alcynylation diastéréosélective de nitrones, et de cycloisomérisation d'énynes-1,6. L'affinité de ces sondes pour différentes glycosidases commerciales a ensuite été déterminée par des mesures d'inhibition de l'activité de ces enzymes. Des biopuces ont ensuite été conçues en greffant ces sondes sur surface d'or par électro-copolymérisation du pyrrole, et utilisées pour détecter par SPRi une enzyme modèle en solution, l' α -glucosidases de riz.

Mots-clés : Glycosidases, iminosucres, inhibiteurs sélectifs, SPRi, biopuces multiplexées.

Summary in English

Glycoside hydrolases (glycosidases) belong to a vast family of enzymes which catalyse the hydrolysis of glycosidic bonds. As ubiquitous enzymes, they are involved in a wide range of biological processes and can be related to several diseases. Besides, such enzymes are of great interest as valuable biocatalysts for food industry and for developing energy supply from biomass.

In the last decades, genomic analysis made possible the identification of new glycosidases in a large variety of living organisms. However, the structure and the function of most of these glycosidases remains unknown to date, which is a limitation to the growth of new potential applications. Accordingly, there is a current need for new tools to characterize both function and structure of glycosidases, in order to improve the understanding of this vast family of enzymes. During this thesis we have harnessed molecules from the class of iminosugars to conceive new probes for glycosidases, with the aim to design biochips that could be used to detect and isolate such enzymes without damaging their structures.

Three families of probes based on different iminosugar cores were synthesized through different pathways, including diastereoselective nitron alkynylation and 1,6-enyne-cycloisomerisation. The affinity of these probes for glycosidases was determined by inhibition assays on several commercial enzymes. The different probes were then grafted on a gold surface by pyrrole electrocopolymerization to access biochips, and the latter were used to detect a model enzyme in solution (rice α -glucosidase).

Keywords: Glycosidases, iminosugars, selective inhibitors, SPRi, multiplexed biochips