

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE (Matière, Molécules, Matériaux en pays de la Loire, 3MPL)

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Développements d'iminosucres multivalents et étude de leurs affinités sur les glycosidases

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie Organique

Spécialité : Glycochimie

Présentée

et soutenue publiquement par

Yoan BRISSONNET

Le 31 Octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président Charles TELLIER, Professeur des universités, Université de Nantes
Rapporteurs Yves BLERIOT, Professeur des universités, Université de Poitiers
Didier BOTURYN, Directeur de recherche, Université de Grenoble
Examineurs Christine GRAVIER-PELLETIER, Directeur de recherche, Université Paris
Descartes
Charles TELLIER, Professeur des universités, Université de Nantes

Directeur de thèse : Sébastien GOUIN, Chargé de recherche, Université de Nantes

Co-directeur de thèse : David DENIAUD, Professeur des universités, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

Le travail qui est présenté ici a été réalisé à l'université de Nantes, dans le laboratoire de l'unité de recherche CEISAM (Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse et Modélisation) dirigée par Monsieur Bruno Bujoli auquel j'exprime ici toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir aimablement accepté de juger ce travail :

Le Professeur Yves Blériot, responsable de l'équipe synthèse organique de l'IC2MP de l'Université de Poitiers, en qualité de rapporteur de cette thèse.

Le Directeur de recherche Didier Boturyn, responsable de l'équipe I2BM de l'Université de Joseph Fourier, en qualité de rapporteur de cette thèse.

Le directeur de recherche Christine Gravier-Pelletier du laboratoire de chimie et biochimie, pharmacologiques et toxicologique de l'Université Paris Descartes, en qualité d'examineur de cette thèse.

Le Professeur Charles Tellier, directeur de l'unité fonctionnalité et ingénierie des protéines de l'Université de Nantes, en qualité de rapporteur de cette thèse ainsi que de président du jury, et de m'avoir accepté au sein de son laboratoire pour une période de trois mois.

Je remercie très sincèrement et très chaleureusement mes deux encadrants de thèse, le Professeur David Deniaud et le Docteur Sébastien Gouin. Pour avoir accepté ma candidature (malgré un tee-shirt pourri), pour m'avoir permis de m'épanouir scientifiquement, pour la grande autonomie que vous m'avez laissée, et bien plus encore (notamment pour la découverte du ski-nautique, enfin le peu que j'en ai découvert). Et avant tout, pour la qualité exceptionnelle des relations que nous avons entretenues durant ces trois années incroyables. Merci infiniment.

Je tiens également à remercier les personnes suivantes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse :

Virginie sylvestre, pour son rire ravageur sa grande disponibilité pour répondre aux diverses questions relatives aux analyses RMN, et pour tout le temps passé sur les spectromètres à programmer mes tubes, et à discuter de tout et de rien.

Julie Hemez et Isabelle louvet, pour la qualité de leurs analyses et le sourire qu'elles affichent en permanence.

Ainsi qu'à tous les collaborateurs qui ont fortement contribué à ce travail.

J'adresse un merci chaleureux à tous les membres de l'équipe CORAIL, les nouveaux comme les anciens, Vincent Corcé, les David (les trois ou les quatre je ne sais plus), Thibaut Chalopin, Sami Brument (que j'ai traumatisé en stage et qui a été assez fou pour s'engager en thèse dans notre équipe), Dimitri Alvarez-Dorta, Monsieur le Duc D'halluin Martin, et le docteur David Teze pour toute l'aide apportée.

J'adresse également un grand merci à tous les membres de l'unité fonctionnalité et ingénierie des protéines de l'Université de Nantes pour m'avoir aussi chaleureusement accueilli, et m'excuse pour ma consommation excessive de petit consommable, notamment les cônes.

Je tiens à remercier le tenancier du bar « La scène Michelet » qui a fait fortune depuis mon arrivée en thèse, et regrette qu'il n'y ait pas de tarifs préférentiels.

Je tiens à remercier l'ensemble du laboratoire CEISAM dans lequel j'ai passé trois merveilleuses années, en grande partie grâce aux membres du laboratoire, et à m'excuser de mes sautes d'humeur qui ont pu survenir durant la rédaction de ce manuscrit, ou avant toute ingestion de café.

De façon non exhaustive, j'aimerais remercier et saluer mes collègues et amis des différentes équipes du laboratoire : Romy, Ludo, KeKe, Max et Nico, avec qui j'ai passé des moments assez fous que je ne suis pas prêt d'oublier, et leur souhaite sincèrement tout le bonheur possible.

Enfin, je remercie toute ma famille pour avoir toujours encouragé mes choix et m'avoir tout le temps poussé à donner le meilleur de moi-même. Et mes derniers remerciements s'adressent à mon amie, Alix, qui m'a supporté durant la rédaction de ce manuscrit et pour tout l'amour qu'elle me porte.

Liste d'abréviations

AAI	Augmentation d'affinité par unité iminosucre
Ac	Acétyle
AFM	Microscopie de force atomique
AgaB	α -galactosidase de <i>geobacillus stearothermophilus</i>
AIR	Augmentation d'inhibition relative
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Asn	Asparagine
BI_fuc	α -L-fucosidase de <i>bifidobacterium infantis</i>
Bn	Benzyle
BuDNJ	<i>N</i> -buthyldéoxynojirimycine
CAZy	Carbohydate active enzyme
CD4	Cluster de différenciation 4
ConA	Concanavoline A
CRD	Domaine de reconnaissance des sucres
CuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire entre azoture et alcyne catalysée par le cuivre
DAB-1	1,4 didéoxy-1,4-imino-D-arabinitol
DCM	dichlorométhane
DGL	Lectine de <i>Dioclea grandiflora</i>
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMF	Diméthylformamide
DMJ	Déoxymannojirimycine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNJ	Déoxynojirimycine
\overline{DP}_n	Degré de polymérisation moyen
<i>E. Coli</i>	Escherichia coli
ECA	Agglutinine d' <i>Erythrina cristagalli</i>
Et ₃ N	Triéthylamine
GH	Glycoside hydrolase
Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylcéramide
GlcCerS	Glucosylcéramide synthase
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GMIib	Mannosidase recombinante homologue de mannosidase de Golgi de classe II
GSLs	Glycosphingolipides
HLGP	Glycogène phosphorylase de foie humain
ITC	Microcalorimétrie de titration isotherme

Jb α man	α -mannosidase de Jack bean
kDa	kiloDalton
K_i	Constante d'inhibition
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LiAlH ₄	Tétrahydroaluminat de lithium
Lipid raft	Radeau lipidique
LManII	Mannosidase recombinante homologue de mannosidase lysosomale de classe II
Man	Mannose
MeDNJ	<i>N</i> -méthyl-déoxynojirimycine
MeOH	Méthanol
\bar{M}_{ImiDex}	Masse moléculaire moyenne des iminodextranes
\bar{M}_w	Masse moléculaire moyenne
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NJ	Nojirimycine
PA-IL	Lectine I de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROMP	Polymérisation par ouverture de cycle par métathèse
SDS	Laurylsulfate de sodium
Ser	Sérine
SPR	Résonance plasmonique de surface
TEBAC	Chlorure de triéthylbenzylammonium
THF	Tétrahydrofurane
Thr	Thréonine
Tm_ α -fuc	α -L-fucosidase de <i>thermotoga maritima</i>
Tm_ α -gal	α -galactosidase de <i>thermotoga maritima</i>
Tryp	β -tryptase humaine
UDP-Gal	Uridine diphosphate galactose
UDP-Glu	Uridine diphosphate glucose
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
\bar{V}_n	Valence moyenne
β -CD	β -cyclodextrine
β -GCCase	β -glucocérébrosidase
α -CD	α -cyclodextrine
α -gluc	α -glucosidase
β -gluc	β -glucosidase
γ -CD	γ -cyclodextrine

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Introduction	5
I. Les glycosidases	6
I. 1. Généralités	6
I.1. 1). Rôle des glycosidases	7
Dans l'assimilation des nutriments et la réserve d'énergie	7
Dans la maturation des glycoprotéines	8
I.1. 2). Mécanismes d'actions	9
I. 2. Différentes pathologies impliquant les glycosidases	12
I.2. 1). Infections virales et bactériennes	12
I.2. 2). Diabète et obésité	13
I.2. 3). Maladies lysosomales	15
II. Inhibiteurs monovalents de glycosidases	19
II. 1. Les différents types d'inhibiteurs	20
II.1. 1). Les cyclitols insaturés, aminocyclitols et époxydes	20
II.1. 2). Les thiosucres et sélénosucres	22
II.1. 3). Les dérivés non glycosidiques	23
II. 2. Les iminosucres	24
II. 3. Bilan sur les inhibiteurs monovalents	28
III. Inhibiteurs multivalents : des lectines aux glycosidases	28
III. 1. La multivalence et les protéines	29
III.1. 1). Mode de liaison chélate	30
III.1. 2). Mode de diffusion interne ou effet de glissement	31
III.1. 3). Mode de liaison agrégatif	32
III.1. 4). Mode Chélate-agrégatif	34
III.1. 5). Etude sur la densité d'épitope	35
III.1. 6). Conclusion	36
III. 2. Application du concept aux enzymes	37
III.2. 1). Glycogène phosphorylase et β -tryptase	37
III.2. 2). Glycosyltransférases	39
III.2. 3). Glycosidases	41
Iminosucres multivalents à structuration spatiale contrôlée	47
I. Notre approche	48
I. 1. Description du projet	48
I. 2. Stratégie de synthèse	51
I. 3. La cycloaddition alcyne/azoture	52
II. Synthèse organique	53
II. 1. Synthèse de l'iminosucre	53
II. 2. Synthèse des charpentes fonctionnalisées	55
II.2. 1). Les charpentes tétravalentes	56
II.2. 2). Les charpentes octavalentes	58
II. 3. Greffage des iminosucres sur les charpentes	60
II.3. 1). Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysé	60

II.3. 2).	Déprotection des iminosucres	62
III.	Résultats biologiques et discussion	63
III. 1.	Evaluation des propriétés inhibitrices des composés multivalents	63
III.1. 1).	Inhibition de glycosidases commerciales	63
III.1. 2).	Inhibition d' α -mannosidases humaines	66
III. 2.	Discussion	68
III.2. 1).	Limite de la valence	68
III.2. 2).	Quid de l' α -mannosidase de Jack bean	69
III.2. 3).	Proposition de mécanisme	69
Microscopie à force atomique(AFM)		70
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)		74
	Iminosucres ultravalents	77
I.	Notre approche	78
II.	Synthèse organique	79
II. 1.	Synthèse de l'iminosucre	79
II. 2.	Fonctionnalisation des charpentes	81
II.2. 1).	Description des dextrans	81
II.2. 2).	Réaction de propargylation	83
II. 3.	Greffage des iminosucres sur les charpentes	86
II.3. 1).	Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée	86
II.3. 2).	Déprotection des iminosucres	89
III.	Résultats biologiques et discussion	92
III. 1.	Evaluation des propriétés inhibitrices des composés ultravalents	92
III.1. 1).	Cas de J β man	94
III.1. 2).	Cas des galactosidases	98
α -galactosidase de thermotoga maritima		98
α -galactosidase B de geobacillus stearothermophilus		101
III.1. 3).	Cas des fucosidases	103
α -L-fucosidase de bifidobacterium infantis.		103
α -L-fucosidase de thermotoga maritima		104
III.1. 4).	Cas des mannosidases GMIIb et LManII	105
III. 2.	Hypothèse sur l'activation	105
	Conclusion générale	109
	Partie expérimentale	113
I.	Biochemical evaluation	114
I. 1.	Protein expression and purification	114
I. 2.	General procedure for the inhibition assays	114
I. 3.	GMIIb and LManII inhibition	115
I. 4.	Sample preparation for AFM imaging	115
I. 5.	AFM imaging	115
I. 6.	DLS measurements	115
II.	Synthesis	116
II. 1.	General procedures	116
II.1. 1).	General procedure for multivalent derivatives	116
II.1. 2).	General procedure for ultravalent derivatives:	117
II. 2.	Protocols and characterizations	119

Chapitre 1	119
Chapitre 2	142
Bibliographie	169

INTRODUCTION GENERALE

Les glycosidases sont des enzymes qui interviennent dans un grand nombre de phénomènes biologiques allant de la digestion de polysaccharides pour l'alimentation, à la maturation des glycoprotéines. L'inhibition sélective de glycosidases est donc un challenge biologique particulièrement important. Malgré le nombre extrêmement élevé d'inhibiteurs monovalents de glycosidases existant dans la littérature, seulement quelques uns sont à ce jour commercialisés. Ce constat s'explique aisément car une grande partie de ces composés ont un manque de sélectivité.

Les interactions monovalentes entre les sucres et les lectines sont généralement faibles, de l'ordre du millimolaire. Afin de compenser ce manque d'affinité, le vivant utilise de nombreuses interactions monovalentes simultanées. L'augmentation d'affinité résultante peut être très largement supérieure à l'addition des interactions individuelles.

En se basant sur cette stratégie, de nombreuses équipes de recherche ont travaillé sur la conception de structures multivalentes, composés présentant plusieurs fois un même motif inhibiteur, dans le but d'étudier ou d'inhiber certains phénomènes biologiques spécifiques impliquant les lectines. Ainsi, durant les 20 dernières années, un nombre important de charpentes multivalentes ont montré une augmentation significative de l'affinité et/ou de la sélectivité envers certaines lectines.

En contraste avec l'engouement scientifique pour la synthèse de ligands multivalents pour l'inhibition de lectines, un nombre très restreint d'inhibiteurs multivalents d'enzymes a été rapporté. Quelques études ont permis de montrer que la multivalence pouvait engendrer, non seulement un gain d'affinité important, mais aussi un gain de sélectivité pour une glycosidase particulière, l' α -mannosidase de Jack bean (Jb α man).

Nous voulons maintenant comprendre pourquoi Jb α man est sensible aux effets multivalents et déterminer les différents facteurs qui peuvent influencer la force de l'effet observé, notamment la présentation et le nombre d'minosucre sur une même charpente.

Notre travail repose donc sur la synthèse d'architectures multivalentes variées, et sur l'étude de leurs interactions avec différentes glycosidases.

Ce manuscrit, qui tente d'apporter des éléments de réponse à ce problème est organisé de la façon suivante :

Le premier chapitre présente le contexte général du travail à travers une introduction bibliographique sur les glycosidases et leurs implications dans diverses pathologies. Ensuite, nous présentons les différents types d'inhibiteurs monovalents de glycosidases, et les premiers inhibiteurs multivalents.

Le deuxième chapitre présente, dans une première partie, l'approche que nous avons utilisée pour la conception de ligands multivalents inhibiteurs de glycosidases à structuration spatiale contrôlée. Puis, dans une deuxième partie, nous exposons la synthèse organique d'une série de huit iminosucres multivalents dérivés de la déoxynojirimycine (DNJ), connue pour être un inhibiteur d'une large gamme de glycosidases, de valence comprise entre 1 et 8. Les résultats biologiques, présentés dans la dernière partie, obtenus sur huit différentes glycosidases commerciales ainsi que sur deux mannosidases analogue de mannosidases humaines, nous permettrons de discuter de l'influence de la présentation des ligands sur le pouvoir inhibiteur de ces composés.

Enfin, différentes techniques ont été utilisées pour sonder les modes de liaison qui interviennent dans les interactions glycosidases/iminosucres multivalents.

Nous avons aussi étudié l'impact du nombre d'iminosucres présent sur une même charpente envers l'activité inhibitrice. Le troisième chapitre présente donc l'approche utilisée pour la conception de ligands ultravalents polymériques inhibiteurs de glycosidases, dérivés de la déoxynojirimycine, dont la valence est comprise entre 20 et 900. Afin de cibler plus spécifiquement les mannosidases, la déoxymannojirimycine (DMJ) qui est un iminosucre dérivé du mannose, a été synthétisé et greffé sur les plateformes polymériques. Finalement, les résultats biologiques préliminaires obtenus sur des glycosidases aussi bien monomériques que multimériques, avec une série de vingt composés seront examinés dans la dernière partie.

Dans une conclusion générale, nous dressons un bilan des travaux effectués et de leur impact, et discutons des perspectives envisageables par la suite.

INTRODUCTION

I. Les glycosidases

I. 1. Généralités

Les polysaccharides naturels sont essentiels au bon fonctionnement des organismes vivants. Ils sont présents au niveau de la paroi cellulaire des végétaux (cellulose), et sont un constituant essentiel de l'alimentation humaine (amidon). La liaison osidique reliant deux monosaccharides est particulièrement stable, avec des temps de demi-vie pouvant dépasser le million d'années.¹

C'est pourquoi, la dégradation rapide des polysaccharides nécessite des catalyseurs enzymatiques : les glycosidases.^{2,3} Ce sont des enzymes spécifiques d'un motif saccharidique donné en fonction de sa forme furanose ou pyranose, de sa série L ou D ou du type de liaison osidique α ou β . Par exemple, la saccharase intestinale catalyse l'hydrolyse de la liaison entre les deux unités constituant le saccharose pour donner du glucose et du fructose (Figure 1).

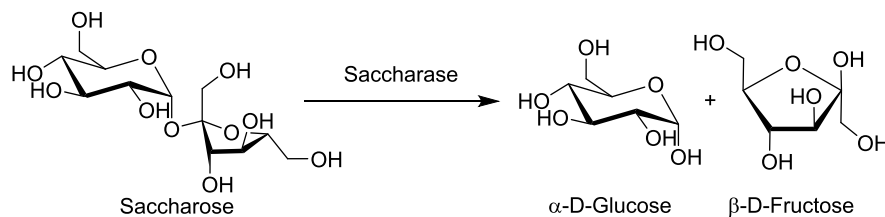


Figure 1 : Rupture d'un lien osidique par une glycosidase

Les glycosidases sont présentes chez tous les organismes vivants : procaryotes et eucaryotes. Elles sont ubiquitaires et exprimées de façon intra et extracellulaire. On les retrouve notamment dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans l'appareil de Golgi où elles participent à la maturation de glycoprotéines ainsi que dans le lysosome où elles interviennent dans la digestion cellulaire.

1. R. Wolfenden, X. Lu, G. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814-6815.
2. G. Davies, B. Henrissat, *Structure* **1995**, *3*, 853-859.
3. C. S. Rye, S. G. Withers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573-580.

I.1. 1). Rôle des glycosidases

Dans l'assimilation des nutriments et la réserve d'énergie

La digestion, par les glycosidases, dans la bouche et l'intestin grêle, permet la dégradation des polysaccharides de l'alimentation en monosaccharides. Ces derniers peuvent ensuite passer la barrière intestinale et être acheminés vers les organes cibles.

L'amidon est un mélange de deux polymères de glucose, l'amylose et l'amylopectine, qui sont digérés essentiellement en motifs maltoses par des α -amylases présentes dans la salive et dans le suc pancréatique. Le maltose est un diose de glucoses reliés par une liaison α -(1,4) qui ne peut être rompue par des α -amylases mais qui est hydrolysée en glucose par des glycosidases intestinales.

Comme pour le saccharose, le lactose qui est un disaccharide présent dans le lait (Figure 2), est hydrolysé en glucose et en galactose sous l'action d'une β -galactosidase.

Le glucose libéré au cours de la digestion passe dans le foie et les muscles où il pourra être stocké en glycogène, par glycogénogenèse.⁴ Le glycogène est un polysaccharide relié par des liaisons α -(1,4) avec des ramifications α -(1,6) environ toutes les dix unités (Figure 2).

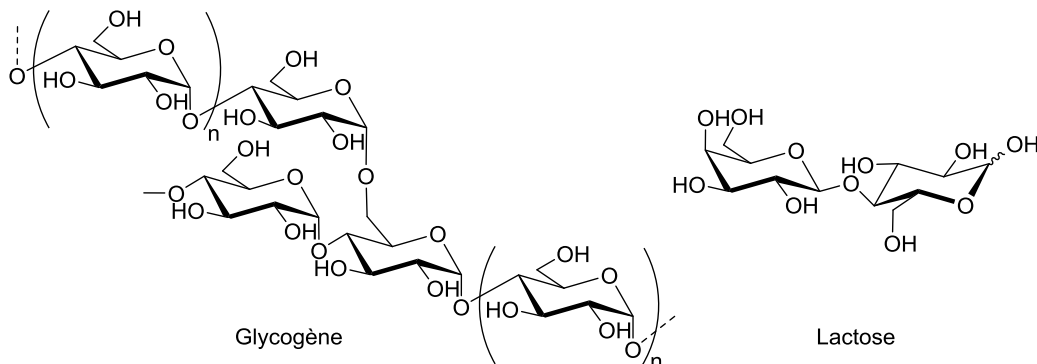


Figure 2 : Structure du glycogène et du lactose

Selon les besoins nutritionnels de l'organisme, le glycogène sera dégradé dans le foie en glucose par une α -glucosidase. Elle permet l'hydrolyse de la chaîne ramifiée,

4. Pour un ouvrage complet sur la glycogénogenèse : J. Kruh, Biochimie-études médicales et biologiques Vol. II 1983, Hermann ed.

rendant alors possible la phosphorolyse de la chaîne linéaire et ainsi l'apport d'énergie sous forme de glucose aux différents organes.

Dans la maturation des glycoprotéines

Les glycosidases sont également impliquées dans le processus de maturation des glycolipides et des glycoprotéines, constituants essentiels du glycocalyx. Le glycocalyx intervient dans de nombreux phénomènes de reconnaissance, et est souvent utilisé par les virus et les bactéries comme point d'ancrage cellulaire.

Une glycoprotéine est l'assemblage covalent d'une protéine et d'un motif oligosaccharidique. Cette liaison peut être effectuée de trois types : *N*-glycosylation, *O*-glycosylation et *C*-glycosylation.

La biosynthèse des *N*-glycoprotéines est initiée par le transfert d'un précurseur commun oligosaccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sur une asparagine du site spécifique de glycosylation (Asn-X-Ser / Thr , X étant n'importe quel acide aminé excepté la proline) d'un polypeptide, durant sa maturation dans le réticulum endoplasmique.⁵

La chaîne saccharidique est ensuite modifiée par une série de réactions, comprenant des glycosylations et des ruptures de liaisons osidiques spécifiques catalysées par des glycosyltransférases et des glycosides hydrolases. Ces réactions peuvent s'effectuer dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans l'appareil de Golgi.⁶ On observe trois catégories de *N*-glycoprotéines : type Haut-Mannose, type Hybride et le type Complexe (Figure 3).

Lorsque la maturation de ces glycoprotéines est achevée, celles-ci sont envoyées vers leurs sites d'activités. Elles sont notamment sécrétées dans le domaine extracellulaire, comme la fibronectine, une des glycoprotéines de la matrice extracellulaire.⁷ Elles peuvent également être insérées dans la membrane cellulaire permettant ainsi l'expression des motifs saccharidiques à la surface des cellules.

5. A. D. Elbein, *FASEB J.* **1991**, 5, 3055-3063.

6. N. Asano, *Glycobiology* **2003**, 13, 93R-104R.

7. J. Rebière-Huët, P. Di Martino, O. Gallet, C. Hulen, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **1999**, 322, 1071-1080.

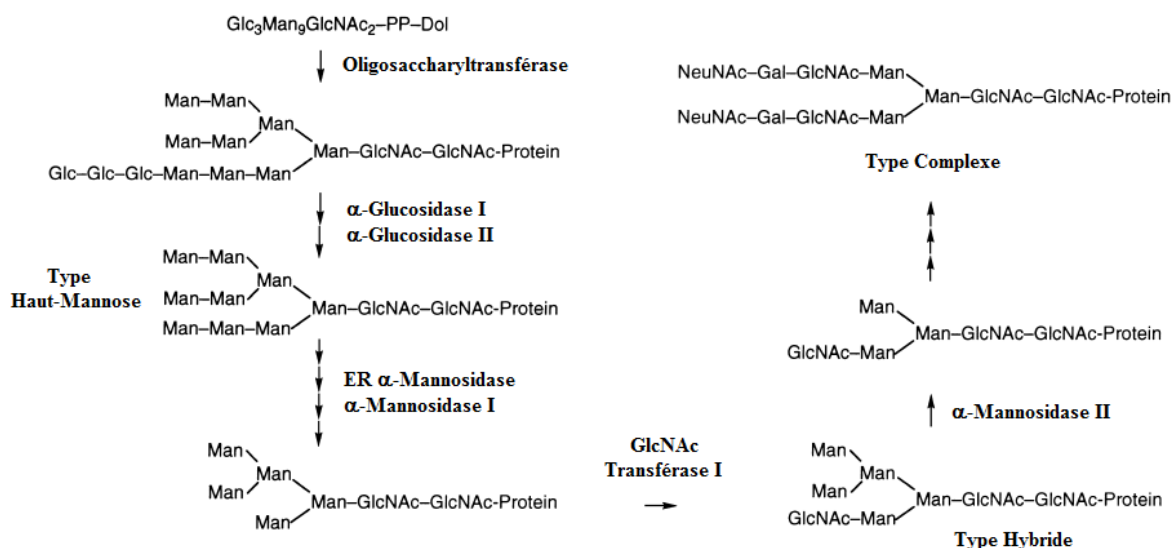


Figure 3 : Biosynthèse des *N*-glycanes-protéines

I.1. 2). Mécanismes d'actions

Les glycosidases peuvent agir selon deux mécanismes principaux pour hydrolyser la liaison osidique^{2,3} : avec rétention ou avec inversion de configuration du carbone anomérique.^{8,9} Les deux mécanismes impliquent un état de transition du substrat de type oxocarbenium et une paire d'acides carboxyliques situés sur l'enzyme (Figure 4).

Dans le cas du mécanisme avec inversion de configuration (Figure 4a), les deux résidus catalytiques (acide carboxylique) de la cavité enzymatique sont séparés d'une distance d'environ 10 Å qui est suffisante pour permettre l'insertion simultanée du substrat et d'une molécule d'eau. Le mécanisme met en jeu de manière concertée, la molécule d'eau, le substrat, et les deux fonctions acides carboxyliques (l'une donne et l'autre accepte des protons) pour former l'état de transition de type oxocarbenium.¹⁰

Dans le mécanisme avec rétention de configuration (Figure 4b), les deux résidus d'acide carboxylique sont plus proches l'un de l'autre (environ 5 Å), et seul le substrat peut s'insérer. Dans un premier temps, l'aglycone est activé comme un groupement partant par coordination de l'atome d'oxygène exocyclique avec une fonction acide carboxylique de l'enzyme. Une attaque d'un groupement carboxylate situé sur le côté opposé du plan du cycle pyranose conduit à un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent

8. D. E. Koshland, *Biol. Rev.* **1953**, 28, 416-436.

9. M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1171-1202.

10. D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 33, 11-18.

avec inversion de configuration du carbone anomérique. L'aglycone diffuse alors hors du site actif et est remplacé par une molécule d'eau. Après déprotonation par le carboxylate, la liaison glycosyl ester est hydrolysée avec une nouvelle inversion de configuration. La double inversion conduit à une configuration identique au produit de départ.¹⁰

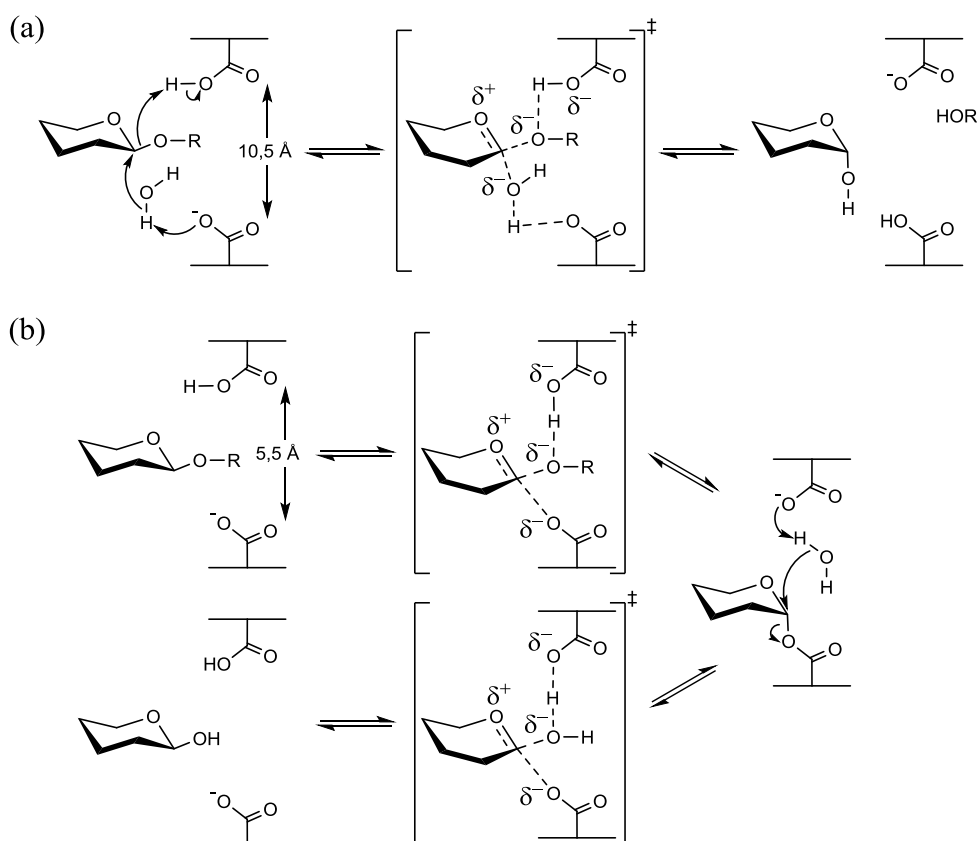


Figure 4 : Mécanisme d'hydrolyse de la liaison osidique par des glycosidases : (a) Avec inversion de configuration, (b) Avec rétention de configuration

Un autre exemple de mécanisme d'hydrolyse, faisant intervenir un cation divalent et un cofacteur d'oxydoréduction (NAD), a été décrit plus récemment pour certaines enzymes des familles GH4 et GH109 de la classification CAZy (Figure 5).^{11,12} Dans un premier temps, le substrat est oxydé en position C3 (complexe **2**) ce qui facilite la bêta élimination de la partie aglycone formant ainsi un sucre insaturé **3**.

11. S. S. Rajan, X. Yang, F. Collart, V. L. Y. Yip, S. G. Withers, A. Varrot, J. Thompson, G. J. Davies, W. F. Anderson, *Structure* **2004**, *12*, 1619-1629.
12. Q. P. Liu, G. Sulzenbacher, H. Yuan, E. P. Bennett, G. Pietz, K. Saunders, J. Spence, E. Nudelman, S. B. Levery, T. White, J. M. Neveu, W. S. Lane, Y. Bourne, M. L. Olsson, B. Henrissat, H. Clausen, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 573-580.

Dans un deuxième temps, cet intermédiaire **3** joue le rôle d'accepteur de Michael et l'attaque d'une molécule d'eau suivie d'une étape de réduction libère le sucre avec rétention de configuration (complexe **5**).

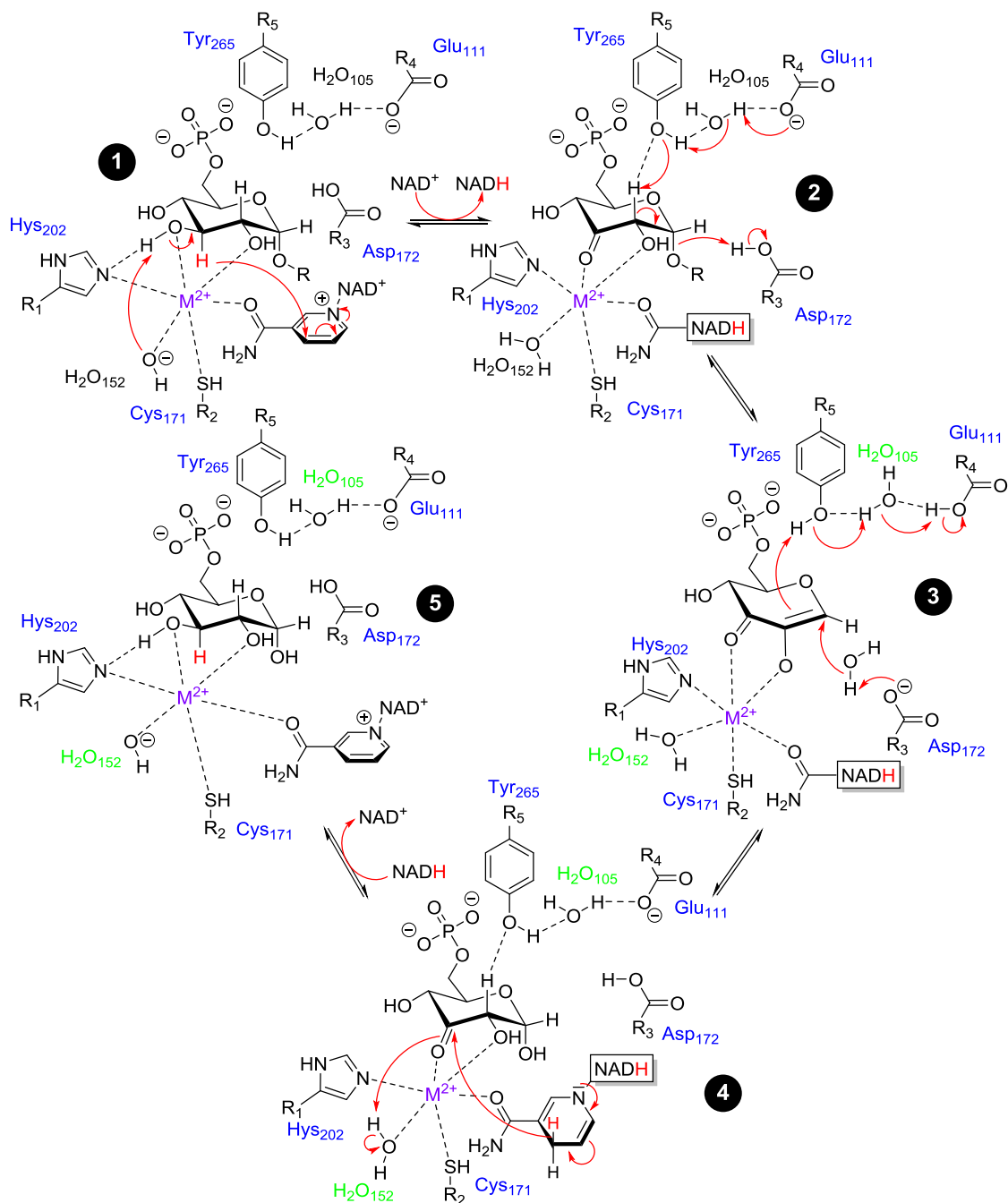


Figure 5 : Mécanisme proposé d'hydrolyse de sucres par des glycosidases de la famille GH4.

I. 2. Différentes pathologies impliquant les glycosidases

I.2. 1). Infections virales et bactériennes

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) fait partie des virus utilisant le glycocalyx comme porte d'accès aux cellules hôtes. En effet, le cluster de différenciation 4 (CD4), glycoprotéine présente à la surface des lymphocytes T et des macrophages, est l'un des co-récepteurs utilisés par le VIH-1 pour infecter les cellules cibles.

Une interaction électrostatique entre la glycoprotéine virale gp120 et le CD4 induit la fixation du virus sur la paroi membranaire (Figure 6). Cette interaction conduit à un changement de conformation de la protéine gp120 ce qui permet au virus de se lier à d'autres co-récepteurs membranaires exprimés par la cellule hôte. La double fixation entraîne la libération d'un peptide viral qui provoquera la fusion des membranes cellulaire et virale, et ainsi l'internalisation du virus dans la cellule.¹³

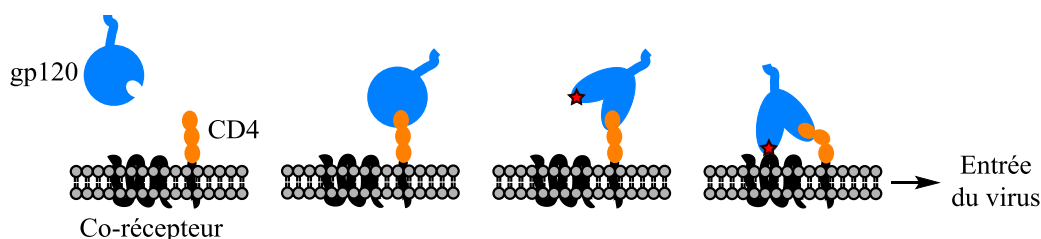


Figure 6 : Illustration du processus d'ancrage du VIH

Certains inhibiteurs de glycosidases de type iminosucre comme la *N*-méthyl-déoxynojirimycine (MeDNJ), la *N*-butyl-déoxynojirimycine (BuDNJ) ou la castanospermine (Figure 7), sont capables de fortement diminuer la réplication du VIH.^{14,15} Ces inhibiteurs peuvent stopper l'activité de certaines glycosidases, en particulier l' α -glucosidase I, indispensable à la maturation de la glycoprotéine virale gp120. Sans celle-ci, le virus ne peut se fixer à la cellule hôte et il ne peut donc pas se répliquer.

13. (a) C. Teixeira, J. R. B. Gomes, P. Gomes, F. Maurel, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 979-992. (b) F. Baleux, L. Loureiro-Morais, Y. Hersant, P. Clayette, F. Arenzana-Seisdedos, D. Bonnaffe, H. Lortat-Jacob, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 743-748.
14. R. A. Gruters, J. J. Neefjes, M. Tersmette, R. E. Y. de Goede, A. Tulp, H. G. Huisman, F. Miedema, H. L. Ploegh, *Nature* **1987**, *330*, 74-77.
15. B. D. Walker, M. Kowalski, W. C. Goh, K. Kozarsky, M. Krieger, C. Rosen, L. Rohrschneider, W. A. Haseltine, J. Sodroski, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 8120-8124.

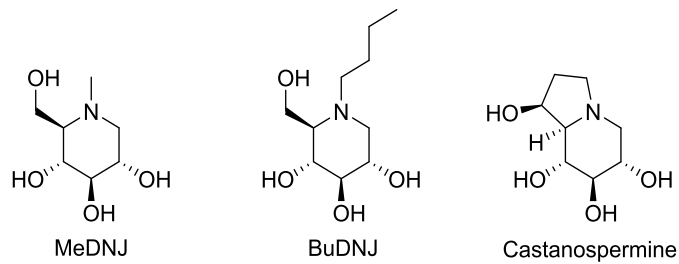


Figure 7 : Structures des différents inhibiteurs actifs sur la réplication du VIH

Walker *et coll.* ont rapporté que lorsqu'ils incubaient une lignée cellulaire humaine CD4⁺ avec une souche virale (HTLV-III_B) en présence de castanospermine, ils observaient une décroissance dans la réplication virale due à une réduction des événements de fusion cellule-cellule. Ce phénomène peut s'expliquer par une diminution du nombre de glycoprotéines fonctionnelles exprimées à la surface cellulaire. Cependant, ces importants effets antiviraux observés *in vitro* n'ont pas été confirmés *in vivo*.

I.2. 2). Diabète et obésité

Le diabète sucré est une maladie qui apparaît lorsque l'organisme ne parvient plus à utiliser convenablement le glucose, les mécanismes de régulation de la glycémie étant défaillants. Il existe deux types de diabète sucré : le premier provenant d'une incapacité, partielle ou totale, du pancréas à fabriquer l'insuline (diabète de type-1), et le second, d'une inaptitude des cellules des tissus musculaires et adipeux à absorber le glucose en réponse à une stimulation par l'insuline (diabète de type-2). Dans les deux cas, le glucose s'accumule dans le sang provoquant une hyperglycémie.

Le diabète de type-1, ou insulino-dépendant, concerne environ 10 % des diabétiques. Il peut se manifester à tout âge, mais apparaît le plus souvent durant l'enfance ou au début de l'âge adulte. La cause principale de ce diabète est une réaction auto-immune qui détruit partiellement ou entièrement les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, sites de production de l'insuline. Les sujets qui en sont atteints produisent très peu ou pas du tout d'insuline, et doivent s'en injecter plusieurs fois par jour tout au long de leur vie.

Le diabète de type-2, ou non insulino-dépendant, apparaît lorsque l'organisme développe une résistance à l'insuline au niveau des tissus musculaires et adipeux, qui perdent ainsi leur capacité à absorber et à métaboliser le glucose (glycolyse). Pour

compenser, les cellules β pancréatiques sécrètent davantage d'insuline. Cependant, elles finissent par s'épuiser et en sécrètent de moins en moins jusqu'à ne plus en produire, conduisant à une production excessive de glucose hépatique.

L'hyperglycémie est considérée comme l'élément initiateur des dommages tissulaires diabétiques. En effet, les cellules qui ne peuvent réguler leur concentration en glucose subiront, en condition d'hyperglycémie, une augmentation importante de la concentration de glucose intracellulaire. Les complications dues à l'hyperglycémie sont nombreuses comme par exemple un risque accru de gangrène, d'insuffisance rénale, d'infarctus, et d'infections diverses.

Il existe différents traitements contre le diabète de type-2, l'un d'eux étant l'ingestion d'inhibiteurs d' α -glucosidases. Puls and Keup¹⁶ ont été les premiers à montrer qu'il était possible de diminuer la glycémie chez des sujets sains, après l'ingestion simultanée d'amidon et d'un inhibiteur d' α -amylase.

A la suite de ces travaux, de nombreuses études ont prouvé que des inhibiteurs d' α -glucosidases intestinales (saccharase, maltase), comme l'acarbose ou le MDL 73945 (Figure 8), possédaient des propriétés similaires de réduction de la glycémie non seulement sur des sujets sains,^{17,18} mais également sur des sujets diabétiques.¹⁹ Actuellement, il existe deux molécules antidiabétiques commerciales basées sur l'inhibition d' α -glucosidases. La première est l'acarbose qui est un pseudotétracosaccharide isolé depuis une souche bactérienne du genre *Actinoplanes*. L'acarbose est composé d'une unité aminocyclitol insaturée liée par l'atome d'azote à un 6-déoxyglucose, lui-même fixé à un résidu maltose. La deuxième molécule est le miglitol, dérivé *N*-hydroxyalkylé de la DNJ (Figure 8). Ils sont tous les deux commercialisés sous les noms respectifs de Glucobay® et Diastabol®.

16. W. Puls, U. Keup, *Diabetologia* **1973**, 9, 97-101.

17. D. A. Jenkins, R. Taylor, R. Nineham, D. Goff, S. Bloom, D. Sarson, K. George, M. M. Alberti, *Lancet* **1979**, 314, 924-927.

18. K. M. Robinson, M. E. Begovic, B. L. Rhinehart, E. W. Heineke, J.-B. Ducep, P. R. Kastner, F. N. Marshall, C. Danzin, *Diabetes* **1991**, 40, 825-830.

19. R. J. Walton, I. T. Sherif, G. A. Noy, K. G. Alberti, *Br. Med. J.* **1979**, 1, 220-221.

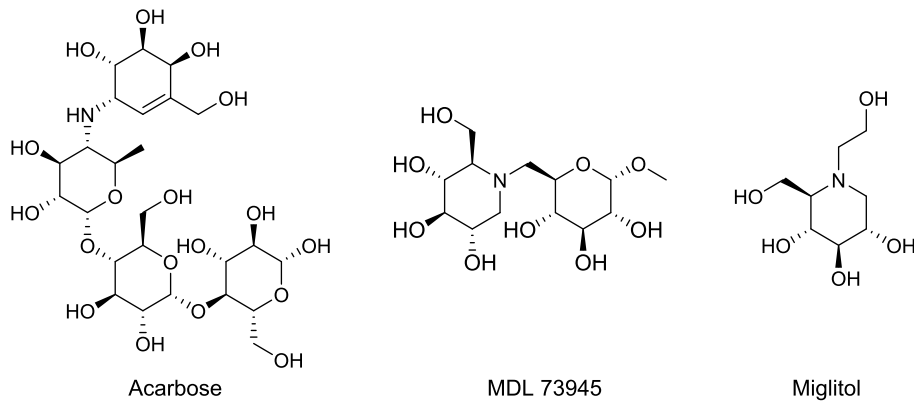


Figure 8 : Structures d'antidiabétiques

I.2. 3). Maladies lysosomales

Le lysosome est une petite structure sphérique, délimitée par une membrane lipidique, contenu dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Figure 9), à l'exception des érythrocytes.

Le lysosome joue le rôle de «poubelle» cellulaire, les molécules qui ne sont plus ou pas fonctionnelles y sont dégradées par des enzymes, comme les lipases, les protéases et les glycosidases.

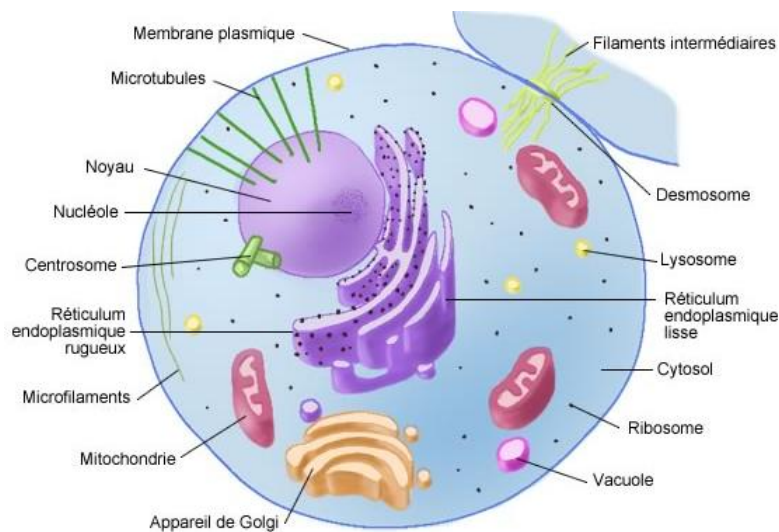


Figure 9 : Représentation d'une cellule eucaryote

Les maladies lysosomales représentent un groupe d'une cinquantaine de pathologies dont le point commun est une déficience génétique induisant un défaut de fonctionnement au niveau du lysosome, notamment des enzymes intervenant dans la dégradation des glycosphingolipides (GSLs, Figure 10). Les GSLs sont des composants essentiels de la membrane cellulaire de toutes les cellules eucaryotes et ont pour fonction de protéger la

membrane des dommages chimiques ou mécaniques.

Lors de la biosynthèse protéique, beaucoup d'étapes peuvent mener au dysfonctionnement d'une enzyme ou de son activateur.²⁰ Par exemple, un défaut génétique induira un mauvais repliement des protéines, celles-ci seront compromises et dégradées par la cellule. Finalement, seule une faible quantité d'enzyme sera acheminée vers le lysosome. Ce défaut retarde le processus catabolique, réduit l'efficacité de dégradation des GSLs et conduit à leur stockage dans les lysosomes.²¹ L'accumulation de GSLs dans les lysosomes entraîne le développement de pathologies dont les symptômes cliniques dépendent du GSL stocké et du tissu touché.

Par exemple, la maladie de Fabry (Figure 10) est caractérisée par une accumulation de substrats comportant un α -galactose terminal, due à une déficience en α -galactosidase A. Les sites de stockage sont des cellules épithéliales de vaisseaux sanguins, des cellules musculaires.²² Ce stockage engendre des maladies cardiovasculaires et/ou des dysfonctionnements rénaux.

Les maladies de Sandhoff et Tay-Sachs²³ surviennent lorsqu'une β -hexosaminidase A ou B est déficiente. Ces pathologies sont caractérisées par une accumulation de substrats au niveau des tissus neuronaux conduisant à une neurodégénérescence et à une mort prématurée.

La maladie de Gaucher résulte de mutations au niveau des gènes codant pour une β -glucosidase spécifique : la β -glucocérébrosidase (β -GCCase). Cette enzyme est responsable de la dégradation du glucosylcéramide (GlcCer) (Figure 10), et un défaut de son activité engendre une accumulation de GlcCer dans les lysosomes des macrophages. Les conséquences biologiques sont nombreuses comme des dysfonctionnements neurologiques, des anémies, des lésions osseuses, des splénomégalies ou des hépatomégalies.²⁴

20. A. Vellodi, *Br. J. Haematol.* **2005**, *128*, 413-431.

21. Y.-H. Xu, S. Barnes, Y. Sun, G. A. Grabowski, *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 1643-1675.

22. T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532-1568.

23. T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Glycobiology* **2005**, *15*, 43R-52R.

24. G. A. Grabowski, *Lancet* **2008**, *372*, 1263-1271.

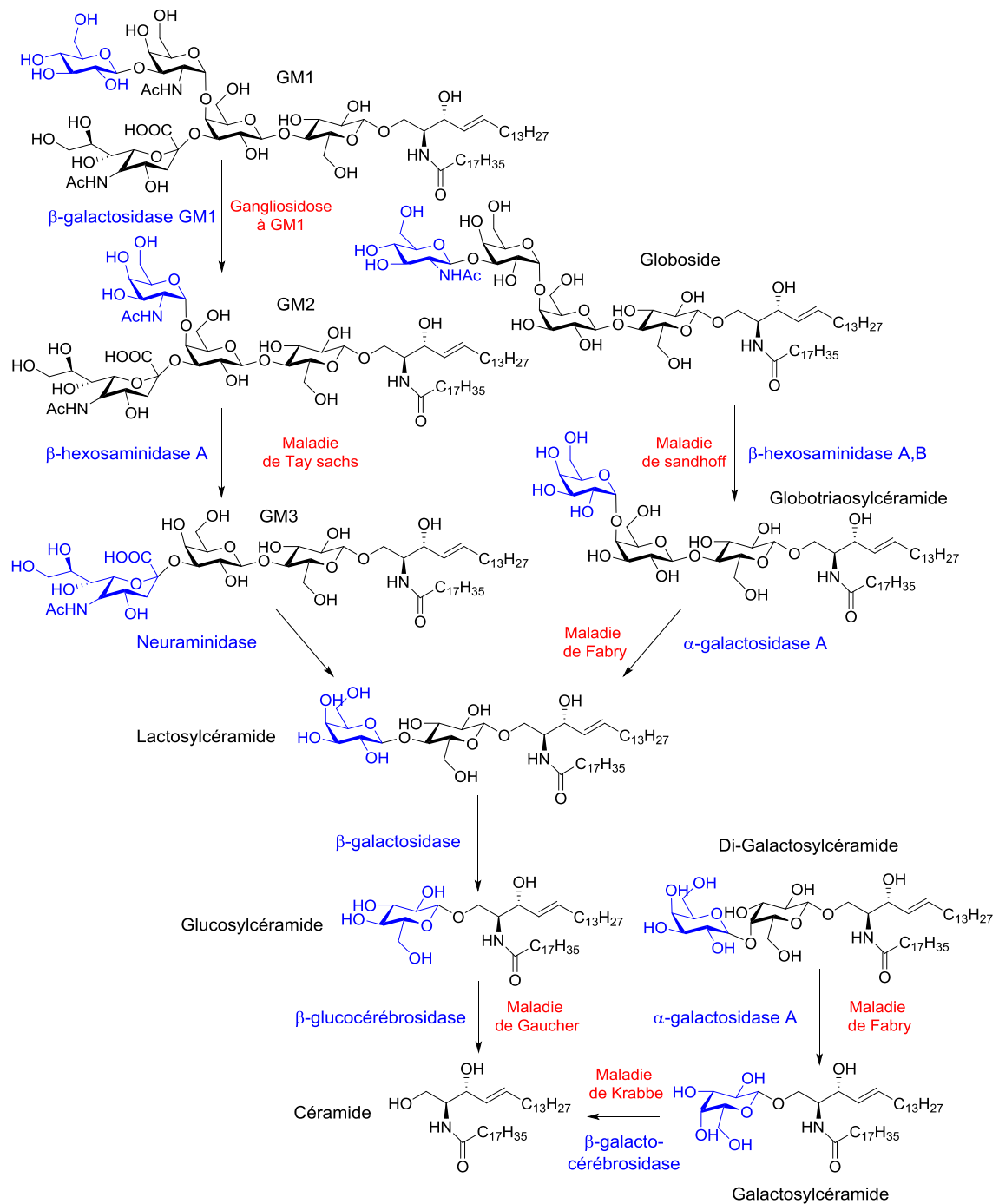


Figure 10 : Cascade de dégradation des GSLs, enzymes impliquées et maladies relatives.

Pour la maladie de Gaucher, il existe actuellement deux voies thérapeutiques permettant de diminuer la quantité de glucosylcéramide dans les macrophages : l'administration d'une glucocérobrosidase recombinante (Cerezyme®, Figure 11) qui compense le déficit en enzyme fonctionnelle et l'inhibition de la biosynthèse du GlcCer avec un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase (GlcCerS) comme la *N*-butyl-DNJ (Zavesca®, Figure 7).

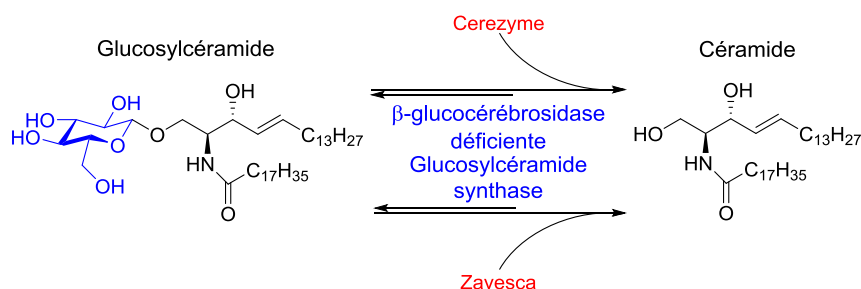


Figure 11 : Thérapie utilisée contre la maladie de Gaucher

L'imiglucérase, ou Cerezyme®, qui se présente sous forme d'une solution injectable, a été le premier traitement efficace pour soigner des patients atteints de la maladie de Gaucher de type I en 1990.²⁵ Après plusieurs semaines, le traitement est capable de réduire la taille des organes ciblés comme le foie et la rate, ainsi que de corriger les anomalies sanguines et de diminuer les lésions osseuses liées à la maladie de Gaucher. Récemment, deux autres enzymes recombinantes, la taliglucérase alfa (ELELYSO®) et la velaglucérase alfa (VPRIV®), ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché par la Food and Drug Administration pour le traitement de la maladie de Gaucher.

Cependant, cette thérapie ne peut être utilisée si le système nerveux central du patient est atteint car les enzymes recombinantes ne peuvent pas passer la barrière hémato-encéphalique.

Une autre voie thérapeutique envisagée est l'inhibition de la biosynthèse du GlcCer. Cette biosynthèse est effectuée grâce à une enzyme, la glucosylcéramide synthase (GlcCerS), qui catalyse le transfert d'un motif glucose à partir de l'UDP-glucose (UDP-Glu) sur l'alcool primaire du céramide (Figure 12).

Butters *et coll.* ont rapporté une importante diminution de l'accumulation de glucosylcéramide dans le lysosome lorsqu'ils incubaient une lignée cellulaire modèle, présentant une déficience en glucocérébrosidase avec un iminosucre.²⁶

Les iminosucres représentent un groupe important d'inhibiteurs de glycosyltransférases.^{27,28} En 2004, la *N*-butyl-DNJ a été commercialisée sous le nom de Zavesca® et constitue à ce jour le seul traitement oral contre la maladie de Gaucher.

25. N. W. Barton, F. S. Furbish, G. J. Murray, M. Garfield, R. O. Brady, *PNAS*. **1990**, 87, 1913-1916.

26. F. M. Platt, G. R. Neises, R. A. Dwek, T. D. Butters, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 8362-8365.

27. L. Qiao, B. W. Murray, M. Shimazaki, J. Schultz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7653-7662.

28. S. Takayama, R. Martin, J. Wu, K. Laslo, G. Siuzdak, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8146-8151.

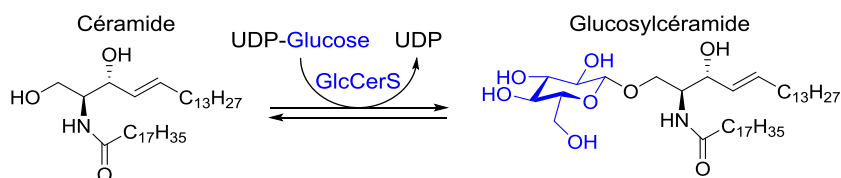


Figure 12 : Biosynthèse du glucosylcéramide

Finale­ment, il y a quel­ques années, un nou­veau concept nommé «thé­ra­pie cha­pe­ron» a é­mergé comme une ap­pro­che thé­ra­peu­ti­que in­no­vante dans le tra­ite­ment de ces ma­la­dies lysoso­males. Le prin­cipe se base sur la res­tauration de l’ac­ti­vi­té d’une en­zyme mu­tante dé­fec­tu­euse grâce à l’ad­mi­nis­tra­tion de molé­cules cibl­ant spé­ci­fi­que­ment cette en­zyme. Eton­nam­ment, un in­hi­bi­teur com­pé­ti­tif, mî­me de l’état de tran­si­tion uti­li­sé à faible con­cen­tra­tion, peut être re­con­nu par l’en­zyme mu­tante et agir comme un mo­dèle pour celle-ci, per­met­tant d’ac­croître sa sta­bi­li­té. L’in­hi­bi­teur per­mettra à l’en­zyme de re­pren­dre sa struc­ture na­tive au cours de sa bio­syn­thèse, au­to­ri­sant ain­si sa ma­tu­ra­tion et son trans­port vers le lysosome.

Cette nou­velle thé­ra­pie pour­rait être ef­fi­cace pour le tra­ite­ment de plu­sieurs ma­la­dies lysoso­males comme les ma­la­dies de Fabry, Gaucher ou Sandhoff.²⁹

II. Inhibiteurs monovalents de glycosidases

Comme nous l’avons vu précé­dem­ment, les deux mé­ca­nismes d’hy­dro­lyse des glyco­si­dases pas­sent par un état de tran­si­tion ap­pelé oxocar­bé­nium. Les straté­gies de syn­thèse usuelles d’in­hi­bi­teurs de glyco­si­dases se sont très lar­ge­ment orien­tées vers la con­struc­tion de molé­cules mimant la con­for­ma­tion et la charge du sub­strat dans cet état de tran­si­tion. Nous allons pré­sen­ter ici de façon non ex­haus­tive, quel­ques familles d’in­hi­bi­teurs de glyco­si­dases.

29. (a) J.-Q. Fan, *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355-360. (b) Z. Yu, A. R. Sawkar, L. J. Whalen, C.-H. Wong, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2006**, *50*, 94-100.

II. 1. Les différents types d'inhibiteurs

II.1. 1). Les cyclitols insaturés, aminocyclitols et époxydes

Les cyclitols sont des cycloalcanes de la famille des carbasucres où l'atome d'oxygène du cycle est remplacé par un atome de carbone. Parmi ceux-ci, le bromoconduritol B (Figure 13) est un inhibiteur d' α -glucosidases qui contribue à l'accumulation de $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, précurseur des Glycoprotéines N-glycosylées (Figure 3).³⁰ Ce composé a montré des propriétés antivirales importantes en inhibant les glucosidases responsables de la biosynthèse de glycoprotéines essentielles à la prolifération virale.³¹

Le bromoconduritol B est considéré comme un inhibiteur enzymatique irréversible. En effet, le mécanisme envisagé propose la formation d'un époxyde intermédiaire résultant de l'attaque intramoléculaire d'un hydroxyle sur le carbone voisin, libérant l'atome de brome (Figure 14a). Finalement, la protonation de l'oxirane par un acide carboxylique du site catalytique accélère l'ouverture nucléophile par un carboxylate de l'enzyme, conduisant ainsi à une espèce covalente enzyme-inhibiteur.

Le (+)-cyclophellitol (Figure 13), analogue carbasucre du D-glucose sous sa forme pyranose, a été isolé en 1990 à partir de champignons du genre *Phellinus*. Le mécanisme d'inhibition est considéré comme étant le même que pour le bromoconduritol B après son passage en époxyde (Figure 14b). C'est un inhibiteur puissant et irréversible de β -glucosidase d'amande (IC_{50} (β -gluc) = 85 nM) mais également de β -glucocérébrosidase de mammifères (inhibition totale à 11 μM de cyclophellitol).³²

Les aminocyclitols, quant à eux, possèdent en plus un atome d'azote exocyclique protonable à pH physiologique. Les travaux de Horii *et coll.* ont permis de mettre en évidence un puissant inhibiteur d' α -glucosidases, le voglibose qui est commercialisé en Asie sous le nom de Basen® pour le traitement du diabète de type II (Figure 13).³³

30. E. Borges de Melo, A. da Silveira Gomes, I. Carvalho, *Tetrahedron* **2006**, 62, 10277-10302.

31. R. Datema, P. A. Romero, G. Legler, R. T. Schwarz, *PNAS*. **1982**, 79, 6787-6791.

32. S. Atsumi, H. Inuma, C. Nosaka, K. Umezawa, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 1579-1585.

33. S. Horii, H. Fukase, T. Matsuo, Y. Kameda, N. Asano, K. Matsui, *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1038-1046.

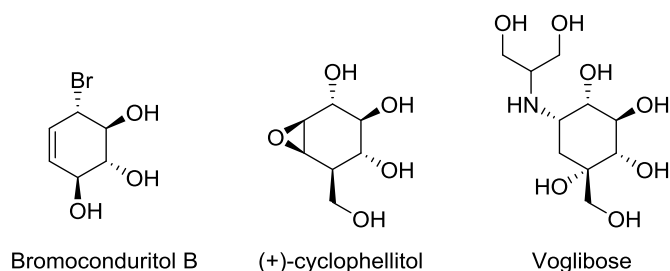


Figure 13 : Exemples de structures de cyclitols à propriétés inhibitrices de glycosidases

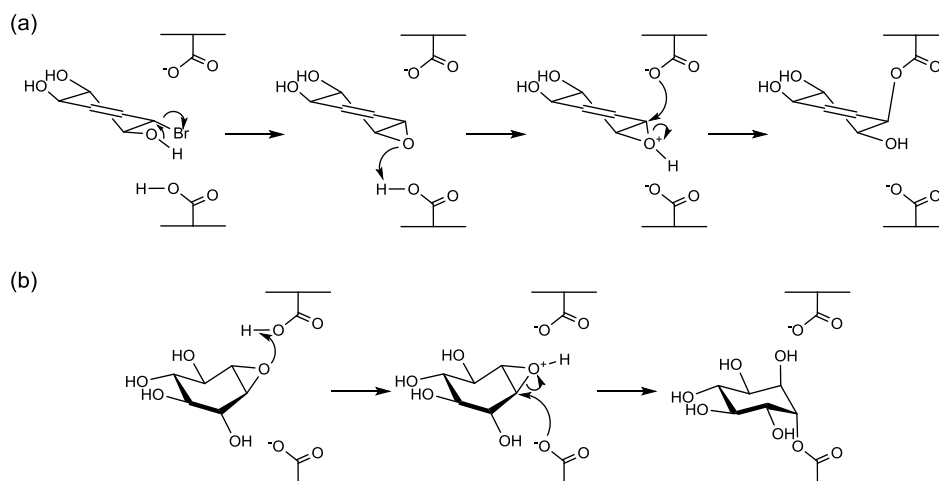


Figure 14 : Mécanismes proposés pour l'inhibition d'une glycosidase avec (a) le bromoconduritol B, (b) le (+)-cyclophellitol

Les cyclitols existent également sous forme condensés à d'autres unités cycliques, comme par exemple l'acarbose que nous avons vu précédemment (Figure 8). C'est un puissant inhibiteur d' α -glucosidases intestinales comme les sucrases, les maltases ou les dextrinases. A ce titre, il est prescrit pour le traitement du diabète de type II.

Un autre pseudotétrасaccharide, le CKD-711 (Figure 15) a été isolé par *Kwon et coll.* depuis une culture bactérienne de *Streptomyces sp.* Il est composé d'une unité aminocyclitol-époxyde connectée à trois glucoses linéaires. Cette structure lui confère des propriétés inhibitrices aussi efficaces que celles de l'acarbose envers les sucrases et les maltases mais avec une IC_{50} deux fois moins bonne pour les α -amylases (respectivement $IC_{50}(\text{CKD-711}) = 115 \mu\text{M}$, $IC_{50}(\text{acarbose}) = 56 \mu\text{M}$).³⁴

34. Y.-I. Kwon, H.-J. Son, K. S. Moon, J. K. Kim, J.-G. Kim, H.-S. Chun, S. K. Ahn, C. I. Hong, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 462-471.

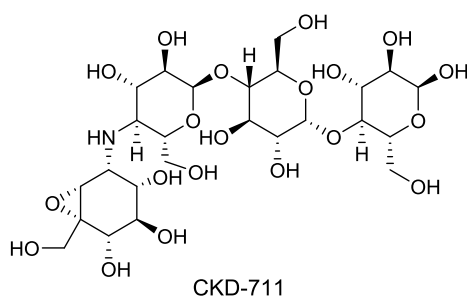


Figure 15 : Structure du CKD-711, pseudotétraccharide inhibiteur de glycosidases.

II.1. 2). Les thiosucres et sélénosucres

De nombreux inhibiteurs de glycosidases sont considérés comme étant des inhibiteurs de par leur aptitude à mimer la charge partielle portée par l'oxygène endocyclique de l'état de transition du substrat.

Parmi cette classe d'inhibiteurs, la famille des thiosucres, analogues de sucres dont l'oxygène endocyclique est remplacé par un soufre, a montré une activité inhibitrice puissante envers les α -glucosidases avec la découverte du salacinol (Figure 16). Le salacinol est un sulfate de sulfonium, qui a été isolé à partir de la plante *Salacia Reticulata* utilisée en infusion dans la médecine traditionnelle asiatique pour le traitement de diverses maladies dont le diabète. Ce n'est qu'en 1997 que Yoshikawa *et coll.* ont pu relier l'activité antidiabétique à la présence du salacinol qui a montré une inhibition compétitive d' α -glucosidases intestinales (IC_{50} [maltase] = 9,5 μ M, IC_{50} [sucrase] = 2,5 μ M, IC_{50} [isomaltase] = 1,7 μ M).³⁵

Plusieurs équipes ont alors entrepris de synthétiser le salacinol mais également des dérivés de thiosucres. L'équipe du professeur Pinto a notamment évalué l'influence de la nature de l'hétéroatome endocyclique sur l'activité inhibitrice de quelques glycosidases.

Ainsi, l'analogue sélénié du salacinol, le blintol (Figure 16) a montré une meilleure inhibition envers une glucoamylase du champignon *Aspergillus Niger*, mais aucune activité inhibitrice envers des α -amylases d'orge ou de pancréas de porc contrairement au dérivé soufré.³⁶ Le blintol pourrait donc être un candidat prometteur pour l'inhibition sélective de glycosidases contrairement au salacinol.

35. M. Yoshikawa, T. Murakami, H. Shimada, H. Matsuda, J. Yamahara, G. Tanabe, O. Muraoka, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8367-8370.

36. B. D. Johnston, A. Ghavami, M. T. Jensen, B. Svensson, B. M. Pinto, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8245-8250.

D'autres équipes se sont penchées sur l'influence de la charge afin de vérifier si l'activité inhibitrice des thiosucres était réellement due au mimétisme de la charge de l'état de transition. Ainsi, Bols *et coll.* ont effectué la synthèse de divers dérivés soufrés de l'isofucofagomine, dont les activités inhibitrices ont été déterminées sur deux fucosidases.³⁷ Certains de ces composés se trouvent sous forme neutre et d'autres sous forme d'ion sulfonium (Figure 16). La forme sulfonium montre une constante d'inhibition (K_i) 715 fois inférieure par rapport à la forme neutre sur l' α -L-fucosidase de rein de bœuf, indiquant l'importance de la charge sur l'activité inhibitrice de ces composés.

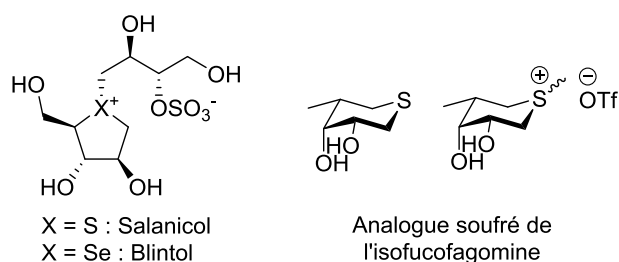


Figure 16 : Structures de thio et sélénosucres inhibiteurs de glycosidases

II.1. 3). Les dérivés non glycosidiques

S'il existe de nombreux inhibiteurs mimes de l'état de transition, il y a également une large gamme de produits naturels ou synthétiques inhibiteurs de glycosidases qui ne sont pas basés sur des analogues de sucre.

Sou *et coll.* ont montré que des dérivés synthétiques de type tétrachlorophthalimide (Figure 17, IC_{50} (α -gluc) = 47,6 μ M) pouvaient être des inhibiteurs d' α -glucosidases plus puissants que la déoxynojirimycine (Figure 19, page 25).³⁸ Ils ont également rapporté que le groupement porté par l'atome d'azote endocyclique pouvait modifier le mode d'inhibition. En effet, lorsque le groupement R est un phényle (IC_{50} (α -gluc) = 2,6 μ M), l'inhibiteur est non-compétitif, mais lorsque R est un *n*-butylbenzène (IC_{50} (α -gluc) = 2,0 μ M), l'inhibiteur est compétitif. Ceci indique la possibilité d'interactions entre l'inhibiteur et certains acides aminés aussi bien dans le site actif que dans un site de fixation secondaire.

D'autres produits naturels, de type bisamides, ont également montré des propriétés inhibitrices de glycosidases. Par exemple, la *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (Figure

37. V. Ulgar, J. G. Fernandez-Bolanos, M. Bols, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1242-1246.

38. S. Sou, S. Mayumi, H. Takahashi, R. Yamasaki, S. Kadoya, M. Sodeoka, Y. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 1081-1084.

17), isolée à partir du fractionnement du gluten de maïs, a montré une activité inhibitrice d' α -glucosidase de levure de boulanger.³⁹ Les auteurs relient la faible glycémie postprandiale, observée après ingestion de légumineuses (fèves, lentilles), sur des sujets sains ou diabétiques,⁴⁰ à la présence dans ces graines de composés inhibiteurs d' α -glucosidases intestinales.

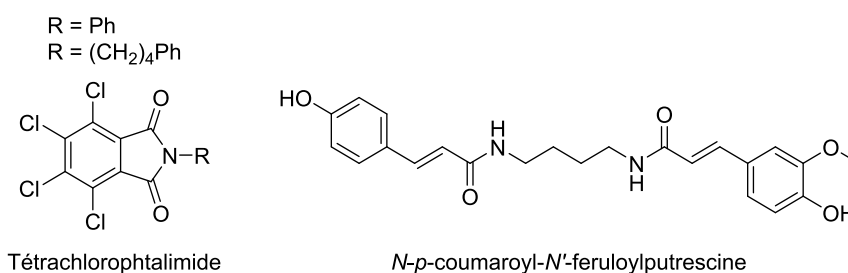


Figure 17 : Exemples de dérivés non glycosidiques inhibiteurs de glycosidases.

II. 2. Les iminosucres

Parmi les inhibiteurs de glycosidases les plus largement étudiés, on trouve les iminosucres qui sont des sucres dans lesquels l'oxygène endocyclique est remplacé par un atome d'azote.

Ils font partie de la classe d'inhibiteurs considérés comme mime de la charge de l'état de transition du substrat, car l'atome d'azote endocyclique peut être protoné à pH physiologique (pKa = 6,35) et ainsi interagir avec le groupement carboxylate du site catalytique (Figure 18).⁴¹

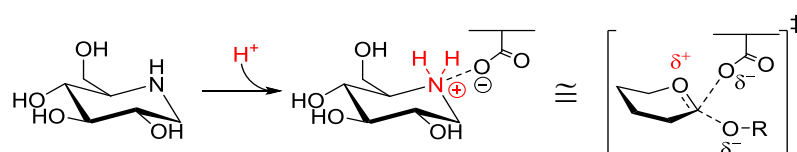


Figure 18 : Mime de la charge de l'état de transition par la déoxyxojirimycine

39. T. Niwa, U. Doi, T. Osawa, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *51*, 90-94.

40. (a) D. J. Jenkins, T. M. Wolever, R. H. Taylor, H. Barker, H. Fielden, J. M. Baldwin, A. C. Bowling, H. C. Newman, A. L. Jenkins, D. V. Goff, *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, *34*, 362-366. b) D. J. Jenkins, T. M. Wolever, G. S. Wong, A. Kenshole, R. G. Josse, L. U. Thompson, K. Y. Lam, *Am. J. Clin. Nutr.* **1984**, *40*, 971-981.

41. V. H. Lillielund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-554.

La première synthèse d'un tel analogue de sucre, la déoxynojirimycine (DNJ, Figure 18), a été faite par Paulsen en 1966,⁴² et a été suivie par la découverte de la nojirimycine (NJ) par Inouye *et coll.* quelques mois plus tard, dans des extraits bactériens.⁴³ Ces chercheurs japonais ont montré que la DNJ possédait de modestes propriétés antibiotiques.

Par la suite, les propriétés antibiotiques des iminosucres ont pu être reliées à une activité inhibitrice de glycosidases.

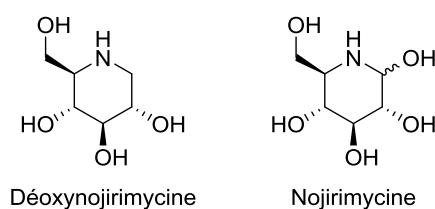


Figure 19 : Structure de la NJ et DNJ

Depuis, les iminosucres ont fait l'objet d'un grand nombre d'études et d'autres activités biologiques, comme l'inhibition de glycosyltransférases⁴⁴ ou de glycogène phosphorylases ont été découvertes.⁴⁵

A la suite de ces différents travaux, cinq classes structurales d'iminosucres d'origine naturelle ont été établies : les pyrrolidines, les pyrrolizidines, les indolizidines, les nortropanes et les pipéridines polyhydroxylées.

Comme exemple de pyrrolidine, le 1,4 didéoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB-1, Figure 20), qui a été isolé pour la première fois depuis la légumineuse *angylocalyx boutiquenus*, a montré une forte inhibition pour une large gamme de glycosidases de mammifères incluant par exemple l' α -glucosidase II, les α -mannosidases I et II et certaines maltases intestinales.⁴⁶

42. (a) H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 495-510. (b) Paulsen, H.; Todt, K. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3385-3407

43. (a) Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Niida, T. *J. Antibiot. Ser. A19* **1966**, *19*, 288-292. (b) S. Inouye, T. Tsuruoka, T. Ito, T. Niida, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2125-2144.

44. (a) C. H. Wong, D. P. Dumas, Y. Ichikawa, K. Koseki, S. J. Danishefsky, B. W. Weston, J. B. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7321-7322. (b) P. Compain, O. R. Martin, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3077-3092.

45. P. Jakobsen, J. M. Lundbeck, M. Kristiansen, J. Breinholt, H. Demuth, J. Pawlas, M. P. Torres Candela, B. Andersen, N. Westergaard, K. Lundgren, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 733-744.

46. N. Asano, K. Oseki, H. Kizu, K. Matsui, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3701-3706.

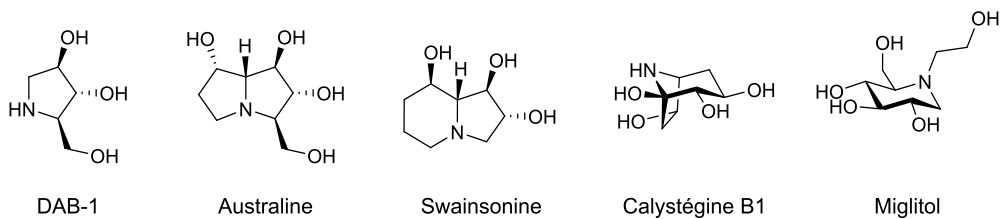


Figure 20 : Les différentes familles d'inhibiteurs naturels de glycosidases

L'australine (Figure 20), qui est une pyrrolizidine, doit son nom au châtaignier d'Australie ou *castanospermum australe* à partir duquel elle a été isolée. L'australine a montré une forte activité inhibitrice envers certaines exoglucosidases et amyloglucosidases, et est rapportée comme étant le premier inhibiteur sélectif d' α -glucosidase I, non inhibiteur d' α -glucosidase II.⁴⁷

La famille des indolizidines a également été découverte depuis *castanospermum australe*, avec l'extraction de la castanospermine (Figure 7) qui s'est révélée être un inhibiteur d' α - et de β -glucosidases. La swainsonine (Figure 20), qui est un inhibiteur très sélectif de mannosidases en est la meilleure représentante.⁴⁸ Elle inhibe fortement l' α -mannosidase de classe II de Golgi, et est à ce titre considérée comme un médicament potentiel pour le traitement de certains cancers par chimiothérapie. Cependant, elle est aussi responsable de pertes économiques importantes dans l'industrie du bétail, car elle provoque chez les animaux qui ingèrent des plantes contenant la swainsonine de nombreux troubles neurologiques.

La calystégine B1 (Figure 20) fait partie de la famille des nortropanes. La particularité des calystéginés est qu'elles possèdent toujours un groupement hydroxyle en position α de l'azote, générant ainsi une forme hémiaminal. La forme B1 de ces calystéginés a montré une inhibition assez sélective de β -glucosidases.⁴⁸

Finalement, la dernière famille d'iminosucres est celle des pipéridines polyhydroxylées comme le miglitol (Figure 20, cf page 14) qui est un inhibiteur d' α -glucosidases intestinales utilisé dans le traitement du diabète de type 2.

47. J. E. Tropea, R. J. Molyneux, G. P. Kaushal, Y. T. Pan, M. Mitchell, A. D. Elbein, *Biochemistry* **1989**, 28, 2027-2034.

48. M. Haraguchi, S. L. Gorniak, K. Ikeda, Y. Minami, A. Kato, A. A. Watson, R. J. Nash, R. J. Molyneux, N. Asano, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4995-5000.

Depuis la découverte de ces iminosucres naturels, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent à la synthèse d'analogues ou de dérivés de ces composés. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer des iminosucres à 5, 6, 7 ou 8 chaînons diversement fonctionnalisés, des pseudo-oligosaccharides constitués d'un iminosucre et d'une chaîne linéaire de sucres, mais aussi des mimes de l'état de transition de glycosyltransférases (Figure 21).

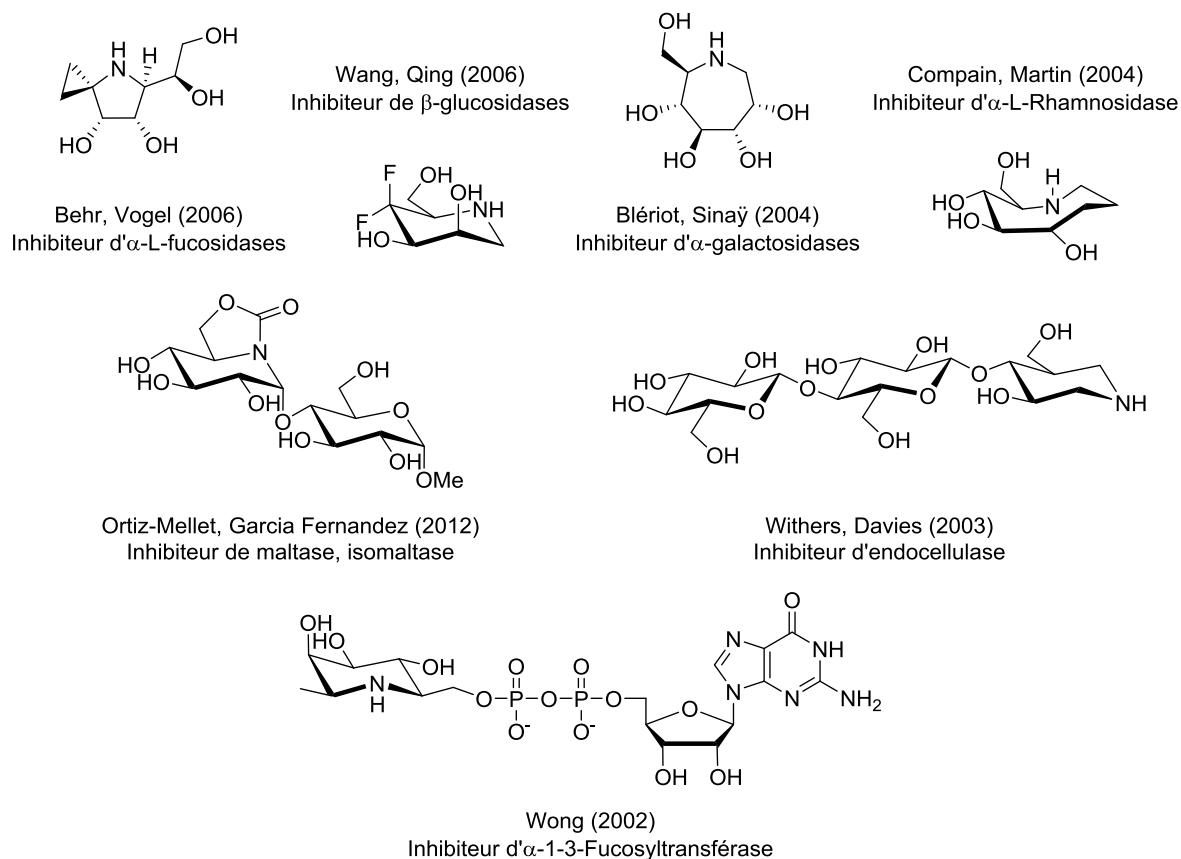


Figure 21 : Exemples d'iminosucres de synthèse

II. 3. Bilan sur les inhibiteurs monovalents

L'implication des glycosidases dans une vaste gamme de phénomènes biologiques, allant de l'assimilation de sucres à la maturation de glycoprotéines, en font des cibles thérapeutiques intéressantes. Il existe de nombreux inhibiteurs de glycosidases qui varient selon leurs structures, leurs modes d'action et leurs cibles. Depuis que la nojirimycine a été isolée et que ses activités inhibitrices ont été découvertes, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la synthèse de dérivés mimes de l'état de transition du substrat, en particulier des iminosucres.

La majorité de ces inhibiteurs manque de sélectivité et d'affinité envers leurs cibles, ce qui peut entraîner des effets secondaires indésirables, et expliquer ainsi la faible quantité d'inhibiteurs de glycosidases ayant actuellement obtenus une AMM. Par exemple, le Zavesca® (Figure 7), inhibiteur de la glucosylcéramide synthase, est utilisé comme traitement dans certains cas de la maladie de Gaucher. Malheureusement, il inhibe également certaines α -glucosidases digestives, pouvant entraîner des douleurs abdominales, des diarrhées et des pertes de poids.

III. Inhibiteurs multivalents : des lectines aux glycosidases

Comme vu précédemment, les polysaccharides qui tapissent la surface des cellules interviennent dans de nombreux phénomènes biologiques. Ils permettent notamment aux cellules de s'associer entre elles grâce aux interactions qu'ils peuvent faire avec des protéines appelées lectines.⁴⁹ Ces protéines sont également utilisées par des agents pathogènes, tels que des toxines, des virus ou des bactéries, pour se fixer aux parois cellulaires (Figure 22).

49. (a) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674. (b) M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1593-1608.

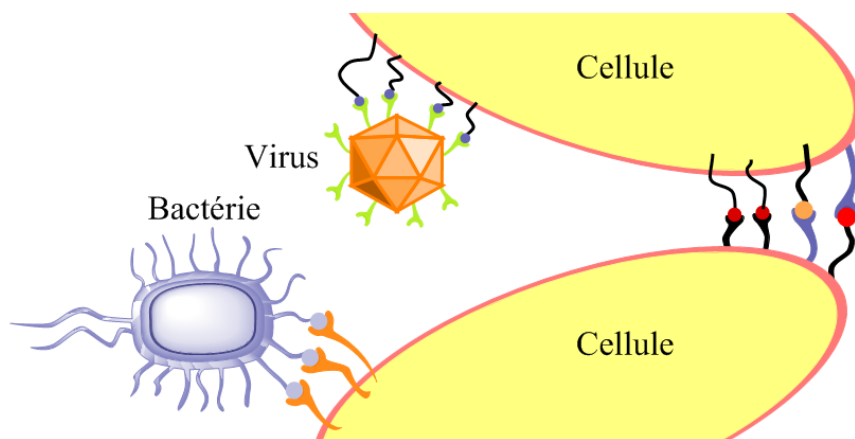


Figure 22 : Exemples d'interactions multivalentes

Les lectines possèdent un domaine de reconnaissance des sucres (Carbohydrate Recognition Domain, CRD) à partir duquel ils sont reconnus et peuvent se lier de façon non covalente et réversible. L'interaction entre une lectine et un motif saccharidique spécifique est faible, avec des constantes d'affinité comprises entre le micro et le millimolaire.⁵⁰ Afin de contourner cette faible affinité, le milieu cellulaire fait appel à de nombreuses interactions simultanées entre les sucres et les lectines. Suivant l'adage attribué à Aristote « *le tout est plus grand que la somme de ses parties* », le gain d'affinité observé peut être très largement supérieur à l'addition des interactions individuelles. Cet effet a été observé pour la première fois par Lee *et coll.* et fut appelé «effet cluster ou effet multivalent».⁵¹

III. 1. La multivalence et les protéines

De nombreux groupes de recherche ont travaillé sur la conception de ligands multivalents afin d'étudier ou d'inhiber certains processus biologiques comme l'adhésion cellulaire. Un composé multivalent sera défini comme étant une charpente présentant plusieurs fois un même motif inhibiteur.⁵² La conception rationnelle d'inhibiteurs et la prédiction d'efficacité de ceux-ci reste cependant un challenge. En effet, la nature du glycoconjugué utilisé et celle de la lectine peuvent entraîner différents modes de liaison et la puissance de l'interaction en sera dépendante.

50. T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-430.

51. Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngrén, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199-202.

52. M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.

III.1. 1). Mode de liaison chélate

L'effet chélate correspond à la fixation d'au moins deux ligands d'une même structure avec deux sites de reconnaissance d'une lectine multimérique (Figure 23). Les forts effets multivalents rencontrés sont généralement expliqués par le faible coût entropique (qu'il soit rotationnel ou conformationnel) lors de la fixation du deuxième ligand.

En effet, une partie importante du coût entropique est absorbée lors de la première interaction, les autres ligands sont alors spatialement organisés, et l'interaction intramoléculaire avec un deuxième site de la lectine est favorisée. Cet effet est également expliqué avec la concentration efficace en ligand à proximité du site de reconnaissance. Après la première fixation, la concentration au voisinage d'un deuxième site protéique s'en trouve très largement augmentée favorisant ainsi la nouvelle interaction.

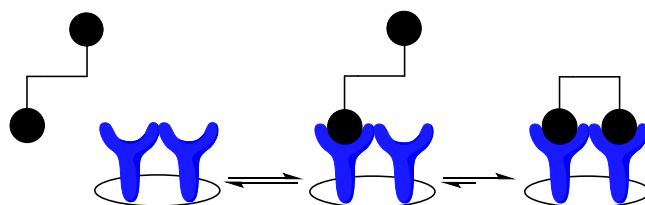


Figure 23 : Représentation de l'effet chélate

L'un des exemples de gain d'affinité par effet chélate le plus marquant est celui d'un composé synthétisé par Fan *et coll.* inhibiteur d'une entérotoxine produite par *escherichia coli*.⁵³ Cette toxine appartient à la famille des toxines de type AB₅ et possède un arrangement pentagonal d'une sous-unité A et de cinq sous-unités B qui présentent chacune un site de reconnaissance de sucre. Ce groupe de recherche a effectué la synthèse de différents composés avec des dérivés de galactoses terminaux reliés par des bras espaceurs flexibles de différentes tailles sur une même charpente de type pentacyclène. Ils ont montré que les galactoses étaient capables d'occuper les cinq sites de reconnaissance de la toxine simultanément (Figure 24). Les auteurs ont ainsi mis en évidence l'importance capitale de la longueur des espaceurs dans les effets chélates, et ont obtenu des constantes d'affinité améliorées d'un facteur 10⁴ par rapport au ligand seul (10⁵ par rapport au galactose seul).

53. E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.

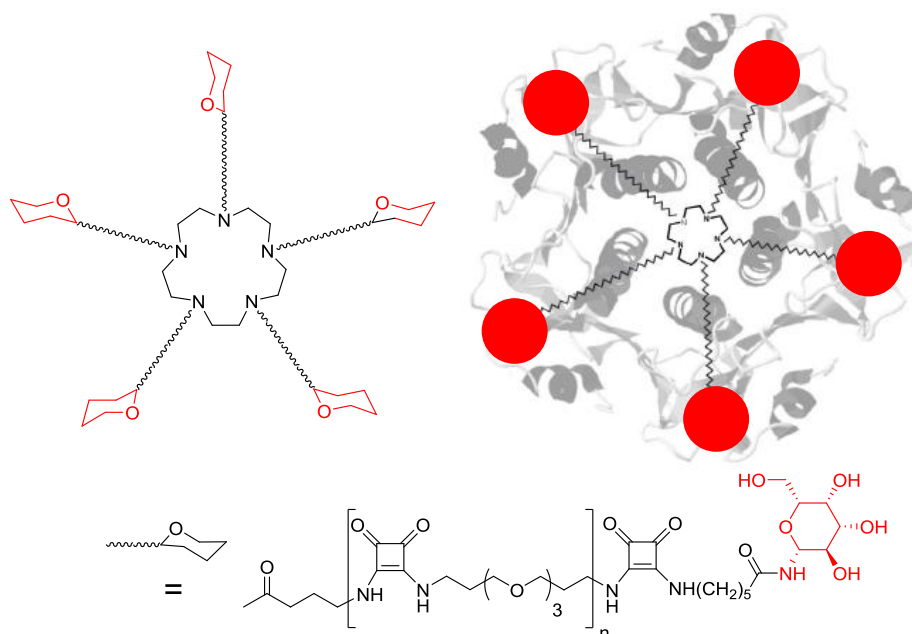


Figure 24 : Galactosides pentavalents pour l'inhibition d'une entérotoxine

III.1. 2). Mode de diffusion interne ou effet de glissement

L'effet de diffusion interne est un mécanisme dans lequel un site de reconnaissance d'une lectine glisse d'un ligand à un autre s'ils sont sur une même charpente. Ce phénomène de glissement est favorisé par la forte concentration locale en ligand à proximité du récepteur. Après le relargage d'un ligand d'une charpente multimérique du site actif, la proximité des épitopes additionnels peut engendrer des mécanismes de recapture (Figure 25).

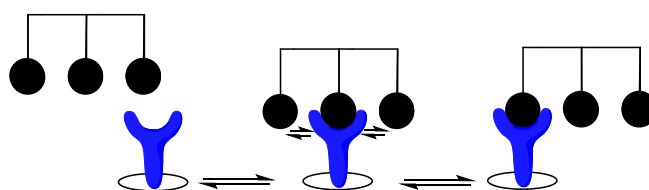


Figure 25 : Représentation des modes de diffusion interne

Cet effet est modéré lorsque le ligand est de type oligomérique avec de faibles gains d'affinité.⁵⁴ En revanche, Brewer *et coll.* ont montré des augmentations d'affinité très importantes entre des glycoconjugués de type polymériques et des glycoprotéines.⁵⁵

54. M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, D. Rodriguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. Garcia Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7970-7971.

55. T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 28256-28263.

III.1. 3). Mode de liaison agrégatif

La formation d'agrégats entre un composé multivalent et une lectine multimérique peut être observée si la distance entre les ligands est suffisante pour permettre à plusieurs récepteurs de se lier sans contraintes stériques (Figure 26).

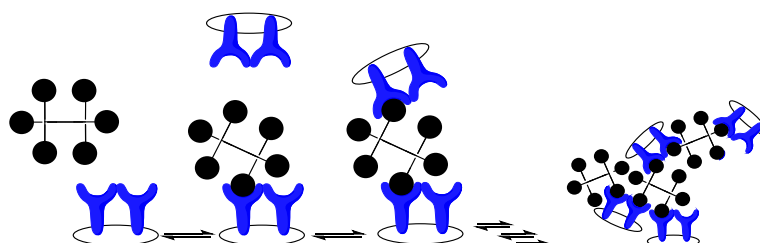


Figure 26 : Représentation du mode de liaison agrégatif

La formation de réseaux uniformes et ordonnés a pu être observée avec différentes lectines multimériques, en particulier avec les galectines, qui reconnaissent spécifiquement des β -galactosides. Les réseaux formés peuvent être soit linéaires (type I) soit bidimensionnels (type II) et vont dépendre de la nature de la galectine et du ligand multimérique (Figure 27).⁵⁶

Type I



Type II

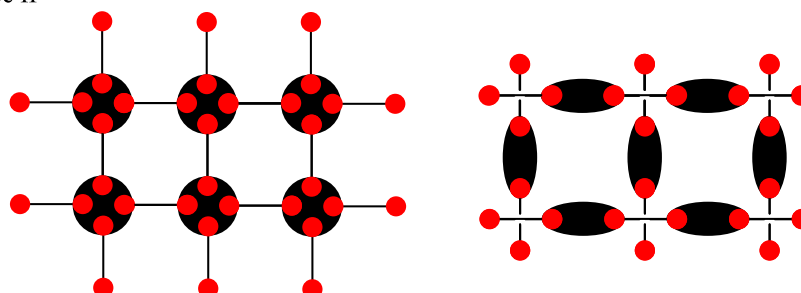


Figure 27 : Représentation des deux types de réseaux possibles entre une galectine divalente et un glycoconjugué di ou tétravalent

56. C. F. Brewer, M. C. Miceli, L. G. Baum, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2002**, 12, 616-623.

Pieters *et coll.* ont rapporté l'importance de la rigidité de la charpente sur l'augmentation de la sélectivité.⁵⁷ Ainsi, des glycodendrimères composés de plusieurs lactoses et d'un squelette rigide ont montré un bon effet cluster sur la galectine-3 par rapport au lactose seul (Figure 28). En effet, une augmentation d'affinité d'un facteur de 4286 en comparant les IC₅₀ du lactose et du ligand tétravalent est observée (1500 avec le divalent). Le gain réel est donc de 1070 pour chaque unité de lactose présente sur le tétravalent (750 pour le divalent). De plus, ces composés multivalents ont montré une sélectivité importante envers la galectine-3 par rapport aux galectines-1 et -2, pour lesquelles les gains d'affinités sont inférieurs à 150.

Cette forte sélectivité peut être expliquée par un arrangement spatial différent entre les sites de reconnaissance des différentes lectines. L'augmentation d'affinité peut quant à elle être due à la formation d'agrégats de protéines.

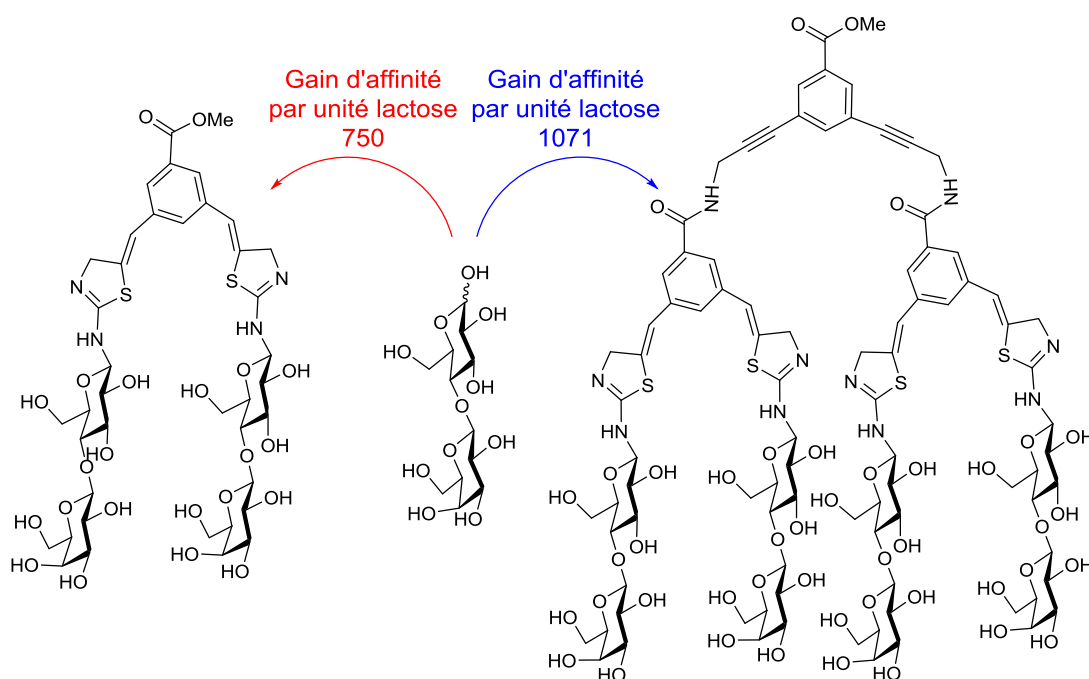


Figure 28 : Représentation des gains d'affinité obtenus avec les composés multivalents sur la galectine-3

57. I. Vrasidas, S. Andre, P. Valentini, C. Bock, M. Lensch, H. Kaltner, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius, R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 803-810.

III.1. 4). Mode Chélate-agrégatif

Le dernier mode de liaison qui peut être observé est un mélange du mode chélate et du mode agrégatif. Il correspond à l'agrégation de plusieurs lectines sur un même ligand multimérique, et où chacune des lectines se fixent plusieurs fois sur ce ligand (Figure 29).

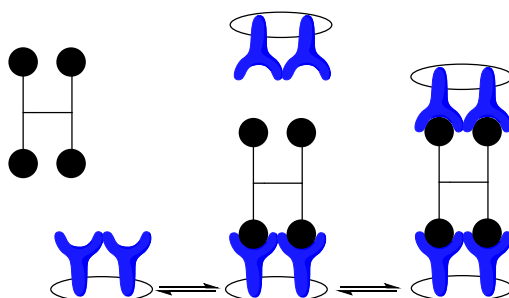


Figure 29 : Représentation du mode de liaison chélate-agrégat

Les travaux de Vidal et *coll.* sur PA-IL, qui est une lectine tétramérique ciblant spécifiquement les résidus galactosides, illustrent ce phénomène.⁵⁸ Les auteurs ont constaté une très bonne affinité entre la lectine et une structure tétravalente basée sur une charpente de type calix[4]arène 1,3 alterné qui présente quatre galactoses (Figure 30a). Des tests de microscopie de force atomique (AFM) ont permis de mettre en évidence la formation de réseaux monodimensionnels attribués à un auto-assemblage entre des lectines et des charpentes tétramériques, pouvant expliquer la forte inhibition obtenue (Figure 30 b, c).

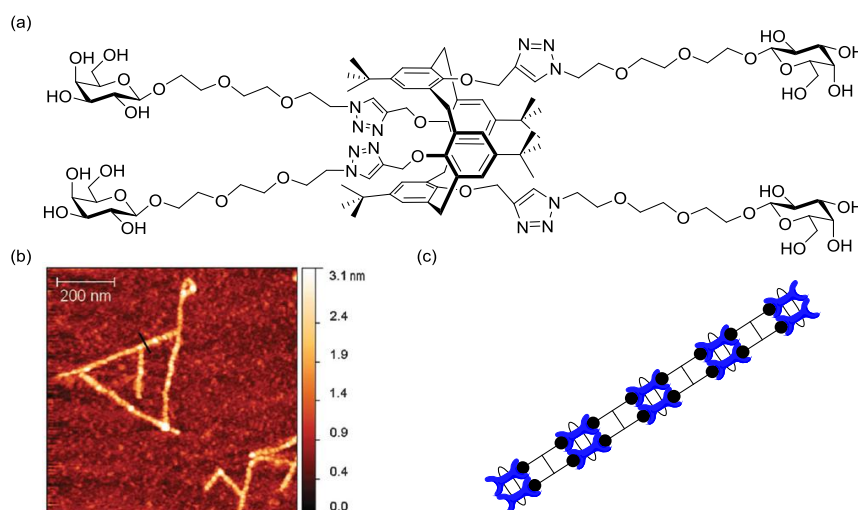


Figure 30 : (a) Calix[4]arène 1,3 alterné galactosylé, (b) Image AFM des réseaux lectine-calix[4]arène, (c) Représentation de l'assemblage lectines-ligands.

58. D. Sicard, S. Cecioni, M. Iazykov, Y. Chevolut, S. E. Matthews, J.-P. Praly, E. Souteyrand, A. Imbert, S. Vidal, M. Phaner-Goutorbe, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9483-9485.

III.1. 5). Etude sur la densité d'épitope

Si la structuration spatiale du ligand a un rôle crucial dans les modes de liaison adoptés dans les interactions lectines/sucres, l'augmentation de la densité d'épitope sur une même charpente a aussi une influence importante dans l'avidité des interactions multivalentes.⁵⁹

Kiessling *et coll.* ont notamment montré que la valence pouvait induire des changements importants dans les paramètres cinétiques et structuraux durant la formation de clusters.⁶⁰ La polymérisation par ouverture de cycle par métathèse (ROMP) (Figure 31) leur a permis la synthèse de sept copolymères qui comportent différentes densités en motif mannoside (Tableau 1), qu'ils ont ensuite testés sur ConA. Ils ont notamment déterminé la stœchiométrie de liaison dans les clusters formés ainsi que leur vitesse de formation.

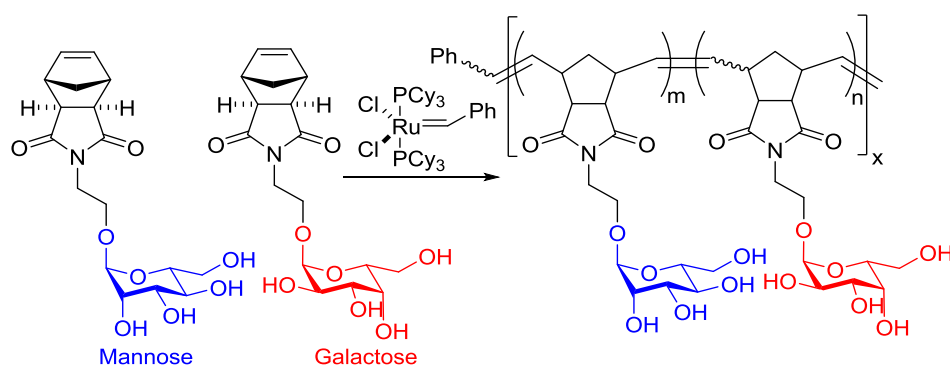


Figure 31 : Structure des copolymères

La vitesse d'agrégation croît avec l'augmentation de la densité de ligands présents sur le polymère, avec un gain d'un facteur 10 entre les composés qui bornent la série (valence de 2 et 143).

59. N. V. Bovin, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 431-446.

60. C. W. Cairo, J. E. Gestwicki, M. Kanai, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1615-1619.

% Mannose	Valence estimée (m)	Stœchiométrie (ConA par unité de polymère)	ConA par motif mannose	Vitesse d'agrégation estimée (AU/min)
2	2	1	0.5	–
10	12	3	0.25	0.025
18	18	6	0.33	0.03
31	27	7	0.26	0.06
45	52	9	0.17	0.075
71	103	15	0.14	0.14
100	143	16	0.11	0.26

Tableau 1 : Valence des différents polymères et stœchiométrie déterminée par précipitation quantitative

Bien qu'une diminution de la densité d'épitope (de 100% à 70 % de mannose) entraîne une chute de la vitesse de complexation d'un facteur deux, cela ne produit presque aucun changement dans la stœchiométrie d'interaction (respectivement 16 et 15 ConA par unité de polymère). La densité de ligand a donc un effet important sur la vitesse de formation des clusters.

En revanche, si l'on se base sur le nombre de ConA liée à un résidu mannose, ce sont les composés de plus faible densité (2 à 31 %) qui interagissent avec un plus grand nombre de ConA (entre 0.25 et 0.5). Les polymères de plus hautes densités forment de plus gros agrégats, avec des IC_{50} plus faibles ($IC_{50}[100\% \text{ Mann}] = 0.34 \mu\text{M}$, soit AIR = 680 par rapport à l' α -methyl-D-mannoside).⁶¹

Ces résultats montrent que la densité de ligand sur le polymère a une importance évidente pour la formation de clusters.

III.1. 6). Conclusion

De nombreuses équipes ont travaillé à la conception de ligands multivalents synthétiques afin d'inhiber la fixation de bactéries, de virus ou de toxines. Il a pu être observé dans plusieurs cas des gains d'affinité importants qui peuvent résulter de différents modes de liaison entre les ligands et les protéines. De plus, avec certaines structures multivalentes, non seulement un gain d'affinité a été rapporté mais également un gain de sélectivité.

61. J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.

La conception de charpentes multivalentes pour l'inhibition d'enzymes pourrait être une stratégie intéressante permettant, comme pour les lectines, d'augmenter la sélectivité et l'affinité d'un inhibiteur pour sa cible sans changer la nature de celui-ci.

III. 2. Application du concept aux enzymes

Nous avons vu que les effets multivalents ont largement été étudiés dans des interactions de type lectine-ligand. Depuis ces quinze dernières années, seules quelques équipes se sont intéressées aux effets multivalents dans des interactions du type enzyme-inhibiteur.

III.2. 1). Glycogène phosphorylase et β -tryptase

La glycogène phosphorylase, qui est une nouvelle cible pour le traitement du diabète de type-2, catalyse la dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate par transfert d'un ion phosphate. Il peut ainsi, soit générer de l'énergie au niveau des muscles en participant à la glycolyse, soit être relargué dans le sang et augmenter la glycémie.

Hoover *et coll.* ont découvert un nouvel inhibiteur allostérique de la glycogène phosphorylase de foie humain (HLGP), basé sur un dérivé d'indole-2-carboxamide (Figure 32a) qui permet de stabiliser l'enzyme dans une conformation où elle n'est plus active. Un fort effet multivalent a été observé avec une version dimérique de cet indole.⁶²

Les IC₅₀ pour ces deux composés sont de 12,5 μ M pour le monovalent et 6 nM pour le divalent, soit une augmentation d'un facteur de plus de 2000, ou une augmentation de 1000 rapporté à chaque unité indolique. Le ligand divalent a pu être co-cristallisé avec la HLGP ce qui a permis de confirmer un mode d'interaction chélate où les deux noyaux indoliques interagissent avec deux sites de l'enzyme (Figure 32b).

62. V. L. Rath, M. Ammirati, D. E. Danley, J. L. Ekstrom, E. M. Gibbs, T. R. Hynes, A. M. Mathiowetz, R. K. McPherson, T. V. Olson, J. L. Treadway, D. J. Hoover, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 677-682.

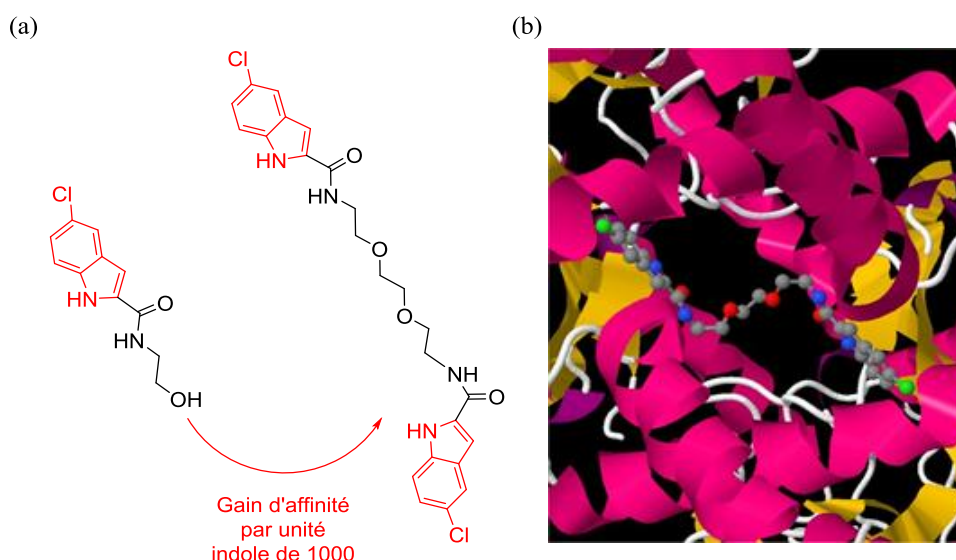


Figure 32 : (a) Représentation des structures inhibitrices allostériques de HLGP, (b) Structure co-cristallisée de HLGP et du ligand divalent (Image de la référence 62)

Moroder *et coll.* ont développé de puissants inhibiteurs bivalents de β -tryptase humaine (Tryp) qui permet la dégradation de protéines en clivant leurs liaisons peptidiques. Cette enzyme est impliquée dans divers troubles allergiques et inflammatoires. Tryp est composée de quatre sous-unités identiques, chacune composée de quatre sites actifs entourant une cavité centrale.⁶³

Les auteurs ont synthétisé des inhibiteurs bivalents avec des espaceurs flexibles de type oligoéthylènes glycols ou rigides de type β -cyclodextrines (β -CD, Figure 33a). Par rapport à la β -CD monovalente de référence, le ligand bivalent s'est révélé être un inhibiteur beaucoup plus puissant avec une valeur de K_i (constante d'inhibition) 68000 fois inférieure. Une structure par Diffraction des Rayons X a pu mettre en évidence un mode de liaison chélate entre deux sous unités de l'enzyme et les deux motifs benzylamine (Figure 33b).

63. N. Schaschke, G. Matschiner, F. Zettl, U. Marquardt, A. Bergner, W. Bode, C. P. Sommerhoff, L. Moroder, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 313-327.

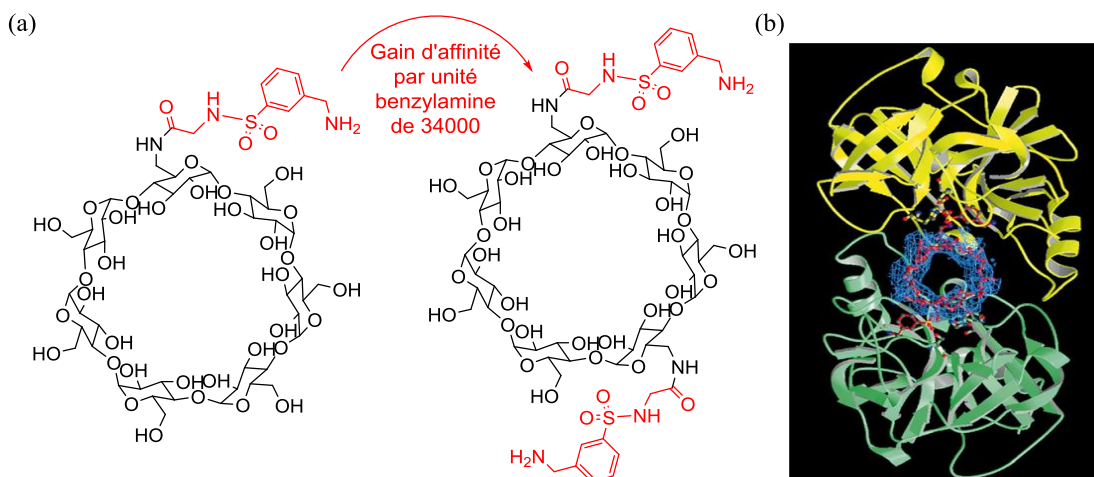


Figure 33 : (a) Structure des inhibiteurs mono et divalent β -tryptase, (b) Structure cristallographique du ligand divalent dans la β -tryptase (Image de la référence 63)

III.2. 2). Glycosyltransférases

Des effets multivalents ont également pu être observés sur des glycosyltransférases, enzymes qui effectuent le transfert d'un monosaccharide sur un accepteur.

Webb *et coll.* ont développé des modèles de radeaux lipidiques (lipid raft) qui sont des microdomaines de la membrane plasmique. Ces chercheurs ont lié de façon covalente une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) sur un motif perfluoroalkylpyrène et observé que ce pseudo lipide peut, en fonction des conditions de formation, s'arranger soit en domaine ordonné, soit en domaine désordonné (Figure 34).⁶⁴

Les auteurs ont voulu déterminer si la vitesse de transformation enzymatique, c'est à dire de galactosylation de GlcNAc en Gal(β 1-4)GlcNAc par une galactosyltransférase (β 4Gal-T1), pouvait être affectée par la différence de densité de glycolipide dans les membranes cellulaires. Un gain d'un facteur 9 pour la vitesse de conversion a été observé dans un milieu ordonné par rapport au milieu désordonné. Cette augmentation de vitesse peut s'expliquer par une influence de la concentration en ligand à proximité du site catalytique, pouvant entraîner un phénomène de diffusion interne.

64. G. T. Noble, F. L. Craven, J. Voglmeir, R. Sardzik, S. L. Flitsch, S. J. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13010-13017.

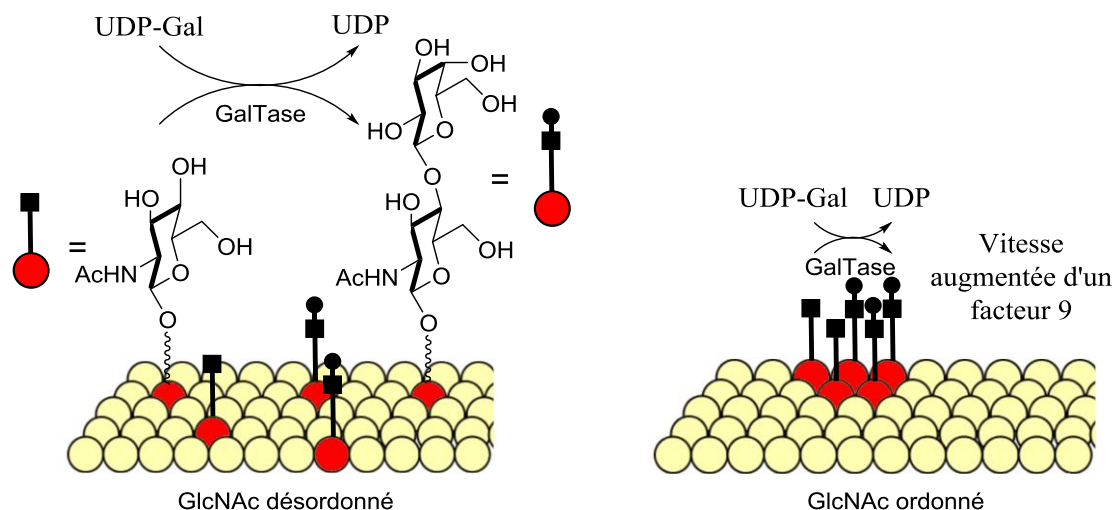


Figure 34 : Effet de la dispersion de motifs glycolipidiques dans les membranes cellulaires sur la vitesse de transglycosylation

Cependant, Houseman et Mrksich ont rapporté l'influence négative d'une trop grande densité d'accepteur sur l'activité d'une glycosyltransférase.⁶⁵ En plaçant des monocouches qui présentent divers taux de greffage de GlcNAc en surface, en présence d'une glycosyltransférase et d'un donneur uridine diphosphate galactose (UDP-Gal) marqué au carbone 14, ils ont pu observer l'évolution du rendement de transglycosylation pour différentes densités en GlcNAc (Figure 35a)..

Un maximum de transglycosylation est visible pour un taux de greffage de 70 % de GlcNAc. En revanche, lorsque la monocouche ne présente que l'accepteur, le rendement chute drastiquement (Figure 35b). Les auteurs expliquent ce phénomène par des problèmes d'encombrement stérique.

65. B. T. Houseman, M. Mrksich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 782-785.

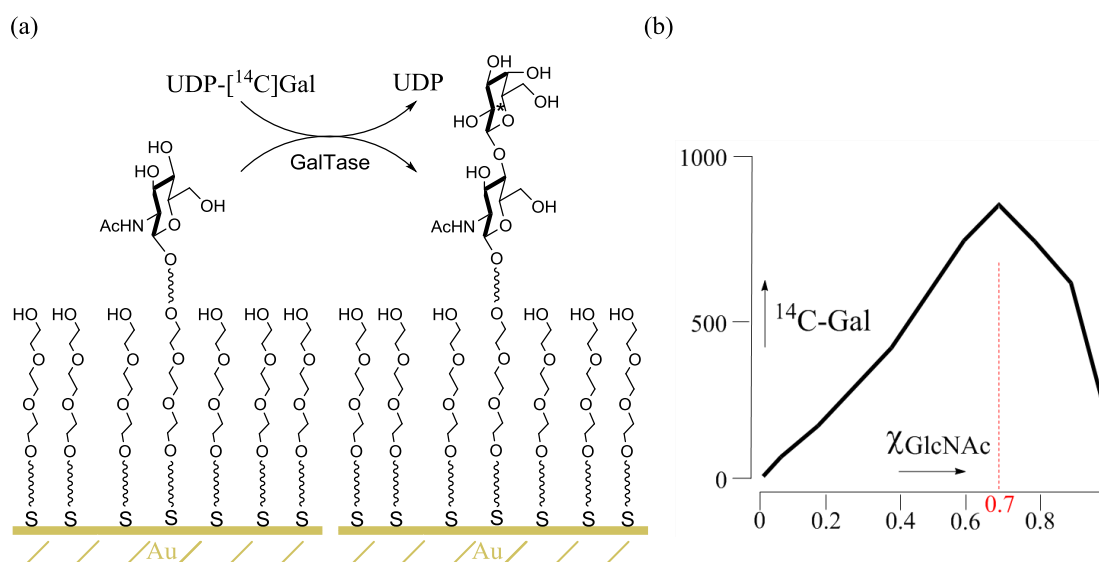


Figure 35 : (a) Représentation d'une monocouche présentant des GlcNAc sensible aux phénomènes de transglycosylation par une glycosyltransférase, (b) Quantité de ^{14}C mesurée en fonction de GlcNAc greffé

III.2. 3). Glycosidases

Peu d'études ont pour le moment été effectuées sur les interactions multivalentes avec des glycosidases. Ce constat peut s'expliquer par le fait que la synthèse de charpentes multivalentes d'inhibiteurs de glycosidases peut être assez complexe. Contrairement aux ligands multivalents de lectines, où les motifs de reconnaissance sont généralement des mono ou des disaccharides commerciaux, les inhibiteurs de glycosidases peuvent être nettement plus compliqués avec des étapes de synthèses délicates.

Le premier exemple de composés multivalents inhibiteurs de glycosidases a été décrit par Johnson *et coll.* en 1998. Les auteurs ont synthétisé des ligands divalents de la déoxymannojirimycine (Figure 36).⁶⁶ Un composé a été testé sur sept glycosidases commerciales et a montré une activité envers une α -mannosidase ($\text{IC}_{50} = 49 \mu\text{M}$) et une amyloglucosidase ($\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$). Cependant, l'absence de référence monovalente ne permet pas de déterminer l'intérêt potentiel de la conception d'un dimère.

En 1999, Bols *et coll.* ont effectué par chimie combinatoire la synthèse de plus de 120 composés monovalents dérivés de l'azafagomine, et d'un tétravalent basé sur une charpente peptidique et présentant les mêmes motifs inhibiteurs (Figure 36).⁶⁷ Ce

66. B. A. Johns, C. R. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 749-752.

67. A. Lohse, K. B. Jensen, K. Lundgren, M. Bols, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1965-1971.

composé a été testé sur une α -glucosidase de levure de boulanger et sur une β -glucosidase d'amande douce mais ne montre une activité que pour la β -glucosidase ($IC_{50} = 70 \mu M$) avec une perte d'inhibition importante par rapport à l'azafagomine ($IC_{50} = 0,65 \mu M$).

En 2003, l'équipe de Le Merrer a décrit la synthèse d'un pseudo-trisaccharide présentant deux manno-azépanes (Figure 36).⁶⁸ Le caractère divalent s'est avéré néfaste sur une α -D-glucosidase, une β -D-glucosidase et sur Jb α man, le composé étant inactif à 1 mM sur les trois glycosidases testées. En revanche, pour une α -L-fucosidase, une valeur de K_i de 15 μM a pu être déterminée, valeur du même ordre de grandeur que la référence monovalente azépane. Contrairement à cette référence, le composé divalent n'inhibe qu'une seule enzyme testée, la sélectivité pour cette enzyme a donc été augmentée.

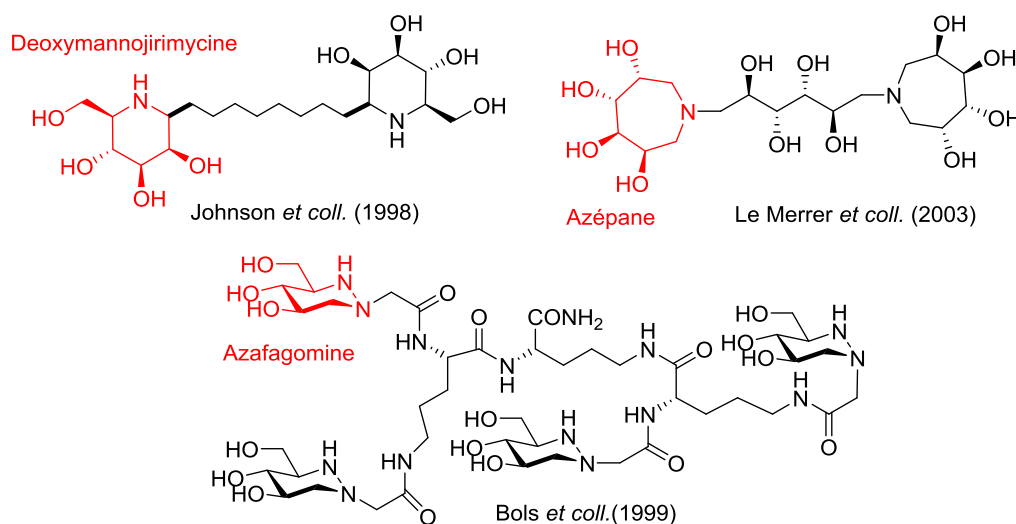


Figure 36 : Premier exemples d'iminosucres multivalents

Dans ces différents travaux, qui n'avaient pas pour premier objectif d'étudier les effets multivalents, l'absence de références monovalentes adéquates limite l'interprétation des résultats. Des travaux au sein de notre équipe ont permis de déterminer l'intérêt de la multivalence pour l'inhibition des glycosidases, grâce à une étude sur un panel de neuf glycosidases commerciales.⁶⁹ Nous avons synthétisé des composés mono-, di- et trivalents (Figure 37) comportant une charpente de même nature. Le choix du ligand s'est porté sur la DNJ qui inhibe une large gamme de glycosidases.

68. I. McCort, M. Sanière, Y. Le Merrer, *Tetrahedron* **2003**, 59, 2693-2700.

69. J. Diot, M. I. Garcia-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 357-363.

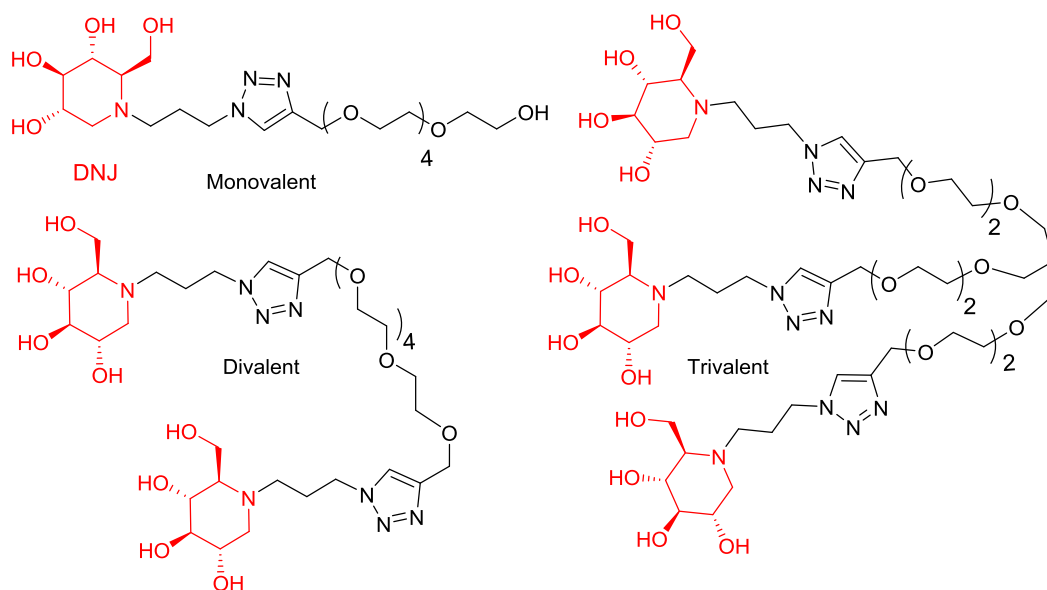


Figure 37 : Structure des trois ligands multivalents

D'une manière générale, les trois composés n'ont pas montré d'effet multivalent positif sur les glycosidases testées. Il a même été montré pour l'isomaltase de levure de boulanger, que l'augmentation de la valence induisait une augmentation de la constante d'inhibition (K_i), donc une diminution d'affinité entre les ligands et l'enzyme. En revanche, pour une autre enzyme, Jbaman, nous avons observé un effet multivalent positif. En effet, la valeur de K_i du ligand trivalent ($K_i = 35 \mu\text{M}$) est plus de sept fois inférieure à celle du monovalent ($K_i = 265 \mu\text{M}$). Le gain rapporté par iminosucre de la structure trivalente est d'environ 2,5 (Tableau 2).

Bien que l'effet multivalent rapporté soit modeste, ces travaux constituent une première preuve de l'intérêt potentiel d'iminosucres multivalents pour gagner en affinité et surtout en sélectivité avec des glycosidases spécifiques.

Enzyme \ Valence	Monovalent	Divalent	Trivalent	
Isomaltase (bakers'yeast)	480 ± 15	770 ± 15	1440 ± 20	Diminution de l'affinité $K_i (\mu\text{M}) \nearrow$
α -Mannosidase (Jack Bean)	265 ± 10	90 ± 3	35 ± 2	

Tableau 2 : Premier effet cluster rapporté sur une glycosidase, Jbaman, avec des iminosucres multivalents

Cette preuve de concept a été ensuite confirmée avec le développement de ligands multi-DNJ de plus haute valence avec comme charpentes des fullerènes C₆₀ et des β-cyclodextrines (Figure 38).⁷⁰ Ces composés ont montré des augmentations d'affinité de plusieurs ordres de grandeurs sur la Jbøman (gains respectifs par unité DNJ de 179 [C₆₀] et 610 [β-CD]).

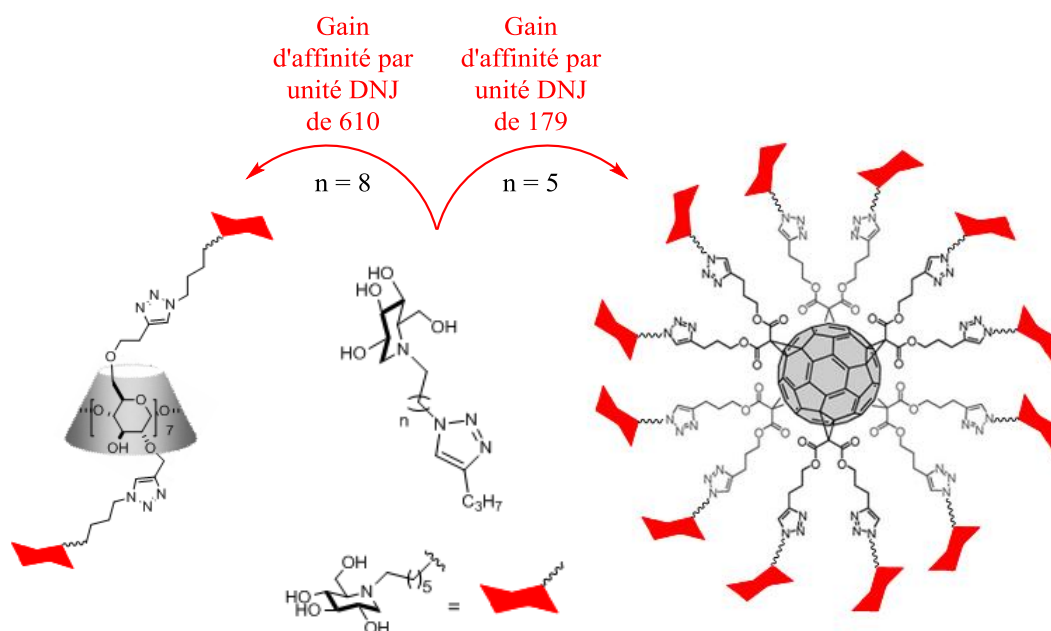


Figure 38 : Structure des ligands multivalents de type fullerène ou cyclodextrine

Très récemment, une étude effectuée par l'équipe du professeur Compain a également permis de montrer la limite de la densité d'minosucre, présent sur une nanoparticule, sur la force de l'effet multivalent observé sur Jbøman.⁷¹ La synthèse de deux polypeptides fonctionnalisés leur a permis le greffage soit d'*N*-(6-azido-hexyl)-DNJ (brun jaune et rouge) soit d'un produit commercial, dérivé azoture du galactose (brun jaune et bleu) (Figure 39).

70. (a) P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756. (b) C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. M. Barragán, Carmen Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.
71. C. Bonduelle, J. Huang, T. Mena-Barragan, C. Ortiz Mellet, C. Decroocq, E. Etame, A. Heise, P. Compain, S. Lecommandoux, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3350-3352.

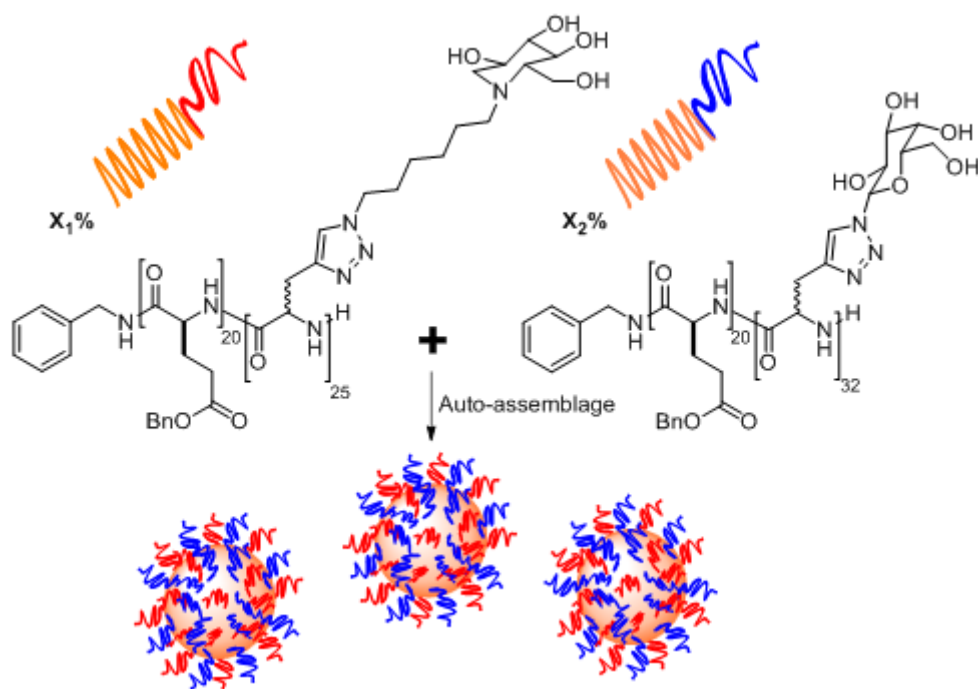


Figure 39 : Copolymères utilisés pour effectuer l'auto-assemblage des micelles

Ainsi, en faisant varier la proportion $X_1\%$ et $X_2\%$ de chaque glycopeptide, Compain *et coll.* ont pu obtenir après auto-assemblage, des micelles contenant différentes proportions d'iminosucres. Par exemple, une micelle où $X_1 = 100\%$ ne contient que le glycopeptide de 25 unités iminosucre.

Des tests prospectifs d'affinité, avec la glyconanoparticule de 100% d'iminosucre, ont montré seulement deux réponses positives sur douze glycosidases testées. Toutefois, seule Jbo_{man} présentait un effet multivalent. Tous les composés ont alors été testés et les résultats sont répertoriés dans le Tableau 3. La notion p.i signifie qu'aucune inhibition n'a été observée.

Composés	Monovalent	$X_1 =$	$X_1 =$	$X_1 =$	$X_1 =$	$X_1 =$	$X_1 =$
		0%	10%	33%	50%	66%	100%
K_i en μM	516	p.i.	7,0	1,2	0,6	0,15	0,15
Gain d'affinité par iminosucre	–	–	30	52	69	206	138

Tableau 3 : Augmentation d'affinité observée entre Jbo_{man} et les différentes glyconanoparticules

Les données reflètent une augmentation de la puissance d'inhibition sur Jbo_{man} variant avec la densité d'iminosucre jusqu'à la valeur $X_1 = 66\%$ ($K_i = 0.15 \mu\text{M}$). La même valeur de constante d'inhibition a été observée lorsque la glycoparticule contient 100% de DNJ, cependant ce composé exprime plus d'iminosucres en surface, le gain

d'affinité pour chaque iminosucre est donc plus faible. Les auteurs expliquent cette baisse de gain d'affinité par une disponibilité moins importante des motifs DNJ à proximité de la surface de la nanoparticule, ils seraient alors inertes au niveau de l'inhibition en raison de facteurs stériques.

**IMINOSUCRES
MULTIVALENTS A
STRUCTURATION
SPATIALE CONTROLEE**

I. Notre approche

I. 1. Description du projet

Dans cette étude, nous avons voulu comprendre pourquoi Jb α man est sensible aux effets multivalents et déterminer les facteurs et les mécanismes influençant la force de l'effet observé. Plus précisément, nous souhaitons évaluer si la topologie des ligands permettrait comme avec certaines lectines, de moduler l'affinité et la sélectivité pour la Jb α man.

Brewer *et coll.* ont notamment montré l'importance de la topologie sur l'inhibition de ConA, mais aussi sur une lectine extraite de la graine de la légumineuse *Dioclea grandiflora*, la lectine nommé DGL.⁷² Ils ont ainsi examiné les interactions d'une série de treize composés divalents synthétiques, possédant des groupements espaceurs plus ou moins longs et flexibles entre deux résidus mannosides, sur ces deux lectines.

Leurs résultats montrent clairement que les ligands divalents de structure flexible ont une affinité plus élevée pour ConA et DGL que leurs homologues rigides. Les auteurs ont alors déterminé les paramètres thermodynamiques et cinétiques de ces interactions. Une étude de microscopie électronique a aussi été réalisée afin d'étudier les réseaux formés entre les lectines et les mannosides divalents. Ils ont observé avec la majorité des composés, des motifs différents au sein de réseaux organisés (Figure 40), pour ConA et DGL. Cependant, aucun réseau n'a été constaté pour les ligands dont la distance et la flexibilité entre les résidus mannosides sont accrues, confirmant ainsi que la topologie des ligands influence le mode de liaison.

72. T. K. Dam, S. Oscarson, R. Roy, S. K. Das, D. Pagé, F. Macaluso, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8640-8646.

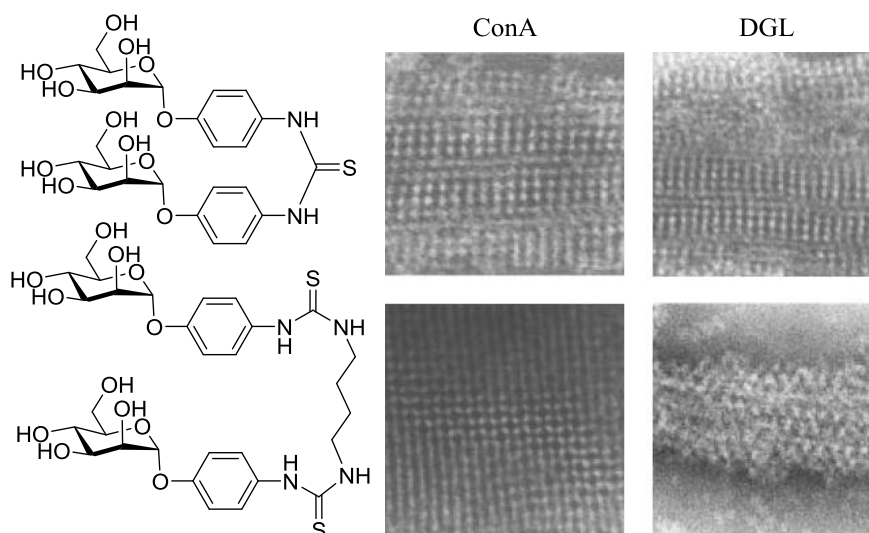


Figure 40 : Différents réseaux observés avec deux composés divalents sur ConA et DGL

Plus récemment, Vidal *et coll.* ont effectué la synthèse d'une série de composés multivalents galactosylés, de charpentes variées mais de valence contrôlée, afin de déterminer une potentielle inhibition sélective entre deux lectines homologues, PA-IL et ECA.⁷³ L'étude des interactions ligand/lectine a été accomplie par des tests d'affinité par hémagglutination, par résonance plasmonique de surface (SPR) et titration calorimétrique (ITC). Malgré des différences qui peuvent être observées en comparant les résultats entre chaque expérience, deux composés sont dans chaque cas les inhibiteurs les plus puissants et montrent une forte sélectivité envers PA-IL (Figure 41). Cela révèle une fois de plus le rôle fondamental de la topologie des ligands dans l'inhibition.

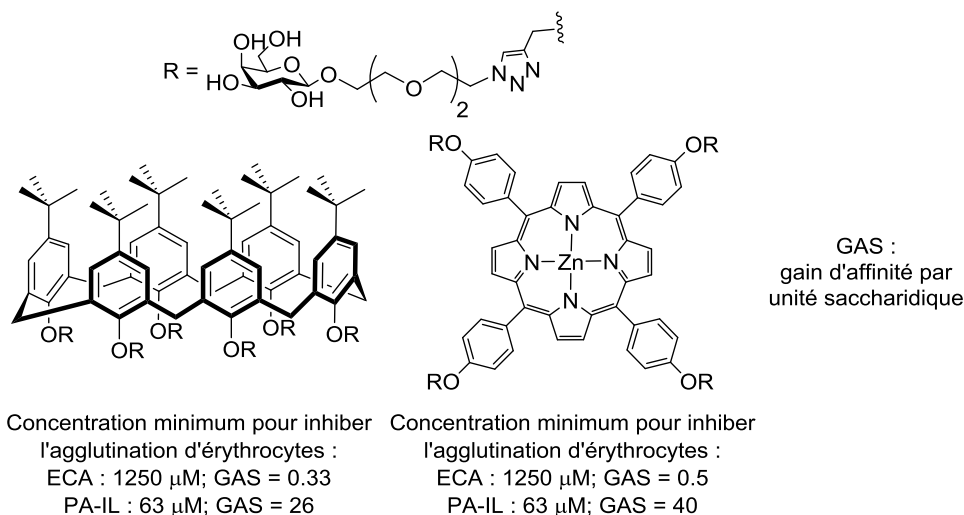


Figure 41 : Structures et activités des deux meilleurs inhibiteurs sur PA-IL

73. S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J.-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2146-2159.

Afin d'évaluer si la disposition spatiale des ligands influe sur l'affinité et la sélectivité envers les glycosidases, nous avons entrepris la synthèse d'une série de huit composés multivalents présentant des motifs dérivés de la DNJ, dont la topologie et la valence sont contrôlées par la charpente (Figure 42).

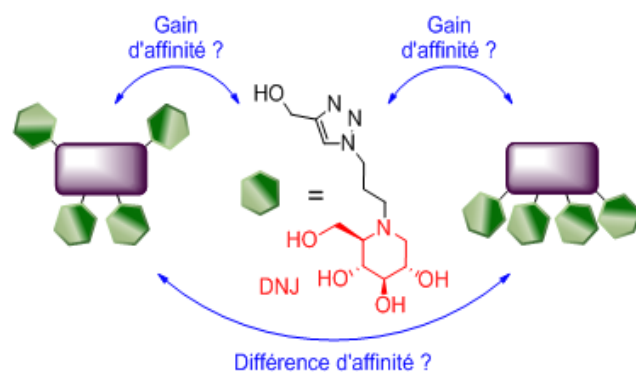


Figure 42 : Concept général du projet

L'activité inhibitrice de ces composés a été déterminée dans l'équipe du Professeur Carmen Ortiz-Mellet de l'Université de Séville sur une série de glycosidases commerciales, incluant Jbøman.

Cette dernière fait partie de la famille GH38 de la classification CAZy, famille regroupant les α -mannosidases de classe II. Elle est souvent utilisée comme modèle d'inhibition pour d'autres enzymes de la même famille de par l'excellente similarité du site catalytique entre ces enzymes.⁷⁴

Ainsi, dans le but d'observer d'éventuels gains d'affinité et de sélectivité sur d'autres mannosidases à implication biologique mais de la même famille, quelques composés ont été testés sur deux mannosidases recombinantes (GMIIb et LManII), analogues de glycosidases humaines, par le docteur Sergej Sestak, à l'Académie des Sciences de Slovaquie.

Pour déterminer les modes de liaison avec Jbøman, nous avons utilisé différentes méthodes d'analyse incluant la titration calorimétrique, la microscopie de force atomique (AFM) ainsi que de la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Les tests AFM et DLS ont été effectués par le docteur Karim El-Kirat de l'Université de Compiègne.

74. S. Howard, S. He, S. G. Withers, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2067-2072.

I. 2. Stratégie de synthèse

Notre stratégie de synthèse était basée sur le greffage de dérivés de la DNJ sur une charpente multi-fonctionnalisée. Si la conception des ligands multivalents peut être réalisée par plusieurs méthodes, toutes les réactions qui permettent le couplage entre deux motifs ne sont pas applicables à ces composés. Des réactions rapides, à hauts rendements, générant peu de sous-produits et réalisables en présence de plusieurs groupements fonctionnels sont nécessaires aussi bien pour la synthèse que pour la purification des structures finales.

Un concept suggéré pour la première fois par Sharpless *et coll.* est la notion de « Click chemistry » qui regroupe de nombreuses réactions permettant la création de liaisons Carbone-Hétéroatome-Carbone par des processus efficaces, sélectifs et applicables aussi bien sur petite ou grande échelle.⁷⁵ On peut citer les réactions nucléophiles d'ouverture de cycles sur les époxydes ou les aziridines, les réactions radicalaires photochimiques (réactions de thiol-ène click),⁷⁶ les réactions de Diels-Alder,⁷⁷ ou des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire⁷⁸ comme la cycloaddition entre un alcène et un oxyde de nitrile ou la cycloaddition entre un alcyne et un azoture (Figure 43). Cette dernière est de loin celle qui a connu le plus gros essor durant ces dernières années, et nous l'avons choisie comme réaction de couplage entre nos deux motifs.

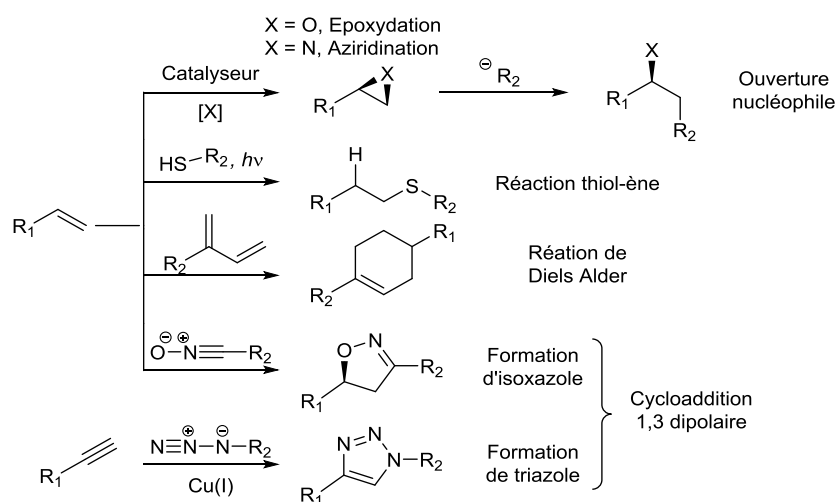


Figure 43 : Exemples de réactions de «chimie click»

75. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

76. K. L. Killops, L. M. Campos, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062-5064.

77. J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 1249-1262.

78. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 210-216.

I. 3. La cycloaddition alcyne/azoture

La réaction de cycloaddition alcyne/azoture est une réaction découverte à la fin du 19^{ème} siècle,⁷⁹ mais étudiée et approfondie à partir de la seconde moitié du 20^{ème} siècle par Huisgen.⁸⁰ Malgré la tolérance de cette réaction à de nombreuses fonctions chimiques (orthogonalité), elle a deux inconvénients majeurs, la forte température utilisée pour la cycloaddition et la formation des deux régioisomères du triazole.

En 2002, les équipes de Sharpless⁸¹ et Meldal⁸² ont rapporté la possibilité d'effectuer cette réaction à température ambiante avec l'obtention exclusive de régioisomère 1,4, grâce à une catalyse au cuivre (CuAAC, Figure 44). Meldal *et coll.* ont directement employé du cuivre I (CuI), alors que l'équipe de Sharpless a décrit cette réaction en utilisant une source de cuivre (II) qui est réduit *in situ* en cuivre (I) par l'ascorbate de sodium.

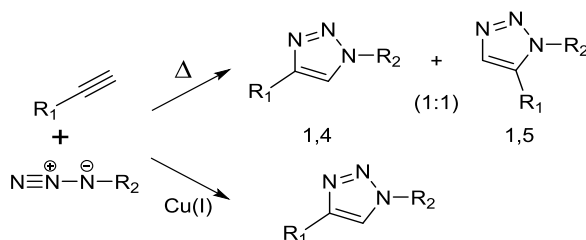


Figure 44 : Cycloaddition de Huisgen thermique et cupro-catalysée

Même si le mécanisme de la CuAAC n'est pas déterminé avec certitude, de la modélisation moléculaire ainsi que des observations expérimentales semblent indiquer la formation de complexes oligomériques cuivre-alcyne.⁸³

Afin de coupler les dérivés de la DNJ sur une charpente multi-fonctionnalisée par la réaction CuAAC, nous avons dans un premier temps fonctionnalisé l'épitope DNJ par un azoture et les charpentes par des alcynes. Les synthèses organiques sont présentées dans la partie suivante.

79. A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, 48, 94-95.

80. R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.

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

82. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.

83. M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952-3015.

II. Synthèse organique

II. 1. Synthèse de l'iminosucre

La première étape de notre travail a été de synthétiser un inhibiteur monovalent fonctionnalisé permettant le couplage avec la charpente.

Parmi les stratégies possibles, la plus courte est la voie développée par Lopes *et coll.* qui ont synthétisé la DNJ et la *N*-butyl-DNJ en partant du 2,3,4,6,-tétra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranose.⁸⁴ L'ouverture de ce cycle est obtenue par réduction de la fonction hémiacétal à l'aide de LiAlH_4 dans le THF. La forme 1,5 diol ainsi obtenue est engagée dans une double oxydation, dérivée de la réaction de Pfitzner-Moffat, dans laquelle le DMSO est activé par de l'anhydride trifluoroacétique.

Le composé dicarbonylé formé étant instable, il est directement engagé dans une réaction de double amination réductrice, par traitement avec différentes amines primaires et du cyanoborohydrure de sodium comme agent réducteur. La dernière étape est une réduction de Birch qui permet de déprotéger les hydroxyles (Figure 45).

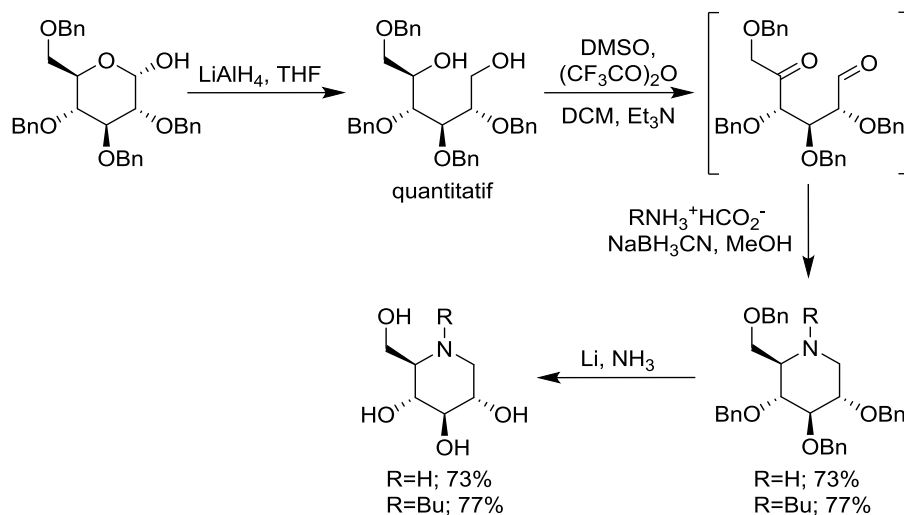


Figure 45 : Voie de synthèse d'analogues de la DNJ développée par Lopes *et coll.*⁸⁴

Nous avons envisagé d'utiliser les grandes étapes de cette synthèse pour obtenir notre ligand fonctionnalisé. L'iminosucre **5** a été obtenu en deux étapes à partir du composé commercial **1**. Le 1,5 diol est synthétisé selon les mêmes conditions que celles

84. C. R. R. Matos, R. S. C. Lopes, C. C. Lopes, *Synthesis* **1999**, 1999, 571-573.

de Lopes avec un rendement de 94%. En parallèle, le bras espaceur **4** a été préparé par une réaction de substitution nucléophile entre la chloropropylamine et l'azoture de sodium. Une double oxydation de Swern de **2** suivie d'une double amination réductrice sous activation micro-ondes avec l'amine primaire **4**, fournissent l'iminosucre **5** avec un rendement de 43% sur les trois étapes (Figure 46).

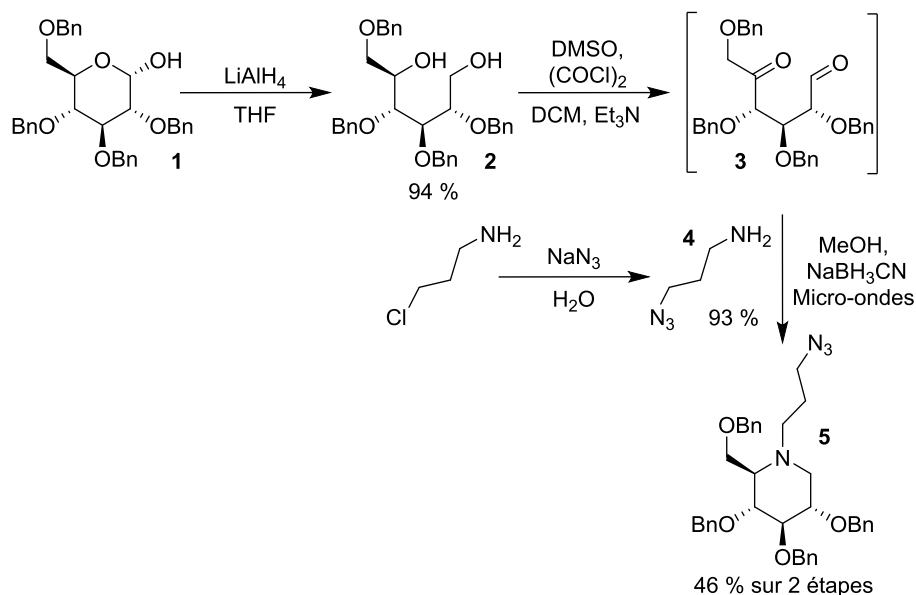


Figure 46 : Synthèse de l'iminosucre **5**

L'iminosucre **5** sera ensuite greffé sur les charpentes puis lors de la dernière étape les groupements hydroxyles seront débenzylés. Pour cela, nous avons envisagé une hydrogénolyse pallado-catalysée en conditions acides. En effet, cette stratégie a été précédemment utilisée dans le groupe pour protoner des atomes d'azotes de polyamines, et éviter ainsi l'empoisonnement du catalyseur.⁸⁵

L'une des charpentes retenues étant incompatible avec ces conditions acides, la synthèse d'un iminosucre protégé par des groupements acétates (composé **8**), qui ne nécessitent pas de conditions de déprotection acide, a également été effectuée en partant de l'iminosucre **5**.

85. S. G. Gouin, J.-F. Gestin, K. Joly, A. Loussouarn, A. Reliquet, J. Claude Meslin, D. Deniaud, *Tetrahedron* **2002**, 58, 1131-1136.

La déprotection des groupements benzyles en présence de trichlorure de bore ne nous a pas permis d'obtenir directement le composé **8** (Figure 47), comme il a déjà pu être observé pour certains iminosucres,⁸⁶ mais uniquement un mélange complexe.

Nous avons alors engagé **5** dans une réaction d'hydrogénolyse avec le catalyseur de Pearlman sous atmosphère d'hydrogène en milieu acide. Dans ces conditions, l'azoture est réduit en sel d'ammonium primaire. Afin de le régénérer, une réaction de diazo-transfert catalysée par du cuivre a été effectuée en utilisant les conditions de Goddard-Borger et Stick.⁸⁷

Pour cela, l'azoture **7** a été préparé au préalable en traitant du chlorure de sulfuryle en présence d'azoture de sodium et d'imidazole. Le réactif obtenu est une alternative à l'azoture de triflyle, composé qui possède un caractère explosif.

La dernière étape est la protection des groupements hydroxyles en présence de pyridine et d'anhydride acétique, qui permet d'avoir l'iminosucre per-acétylé **9** (Figure 47).

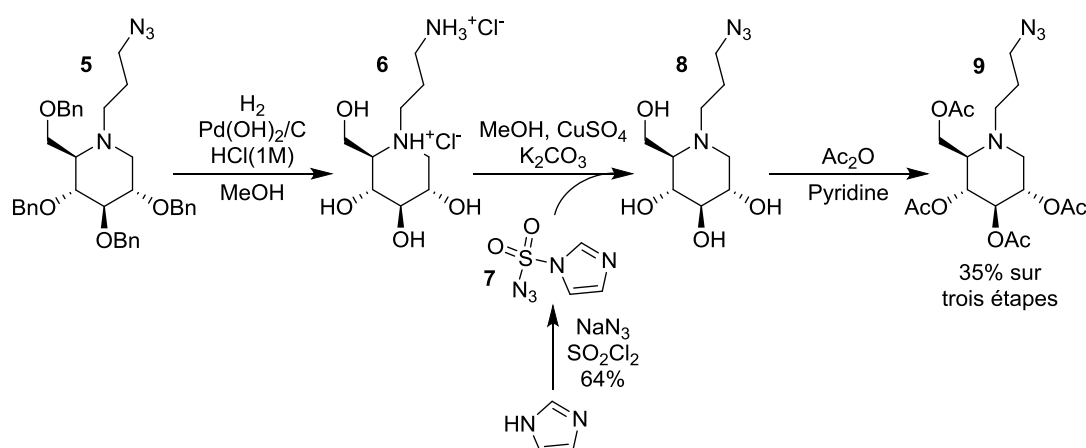


Figure 47 : Synthèse de l'iminosucre **9**

II. 2.Synthèse des charpentes fonctionnalisées

En l'absence d'un composé monovalent de référence adéquat, il est difficile de statuer sur la force de l'effet multivalent. Nous avons donc synthétisé un composé de référence approprié qui correspond au couplage entre l'iminosucre et l'alcool propargylique et qui contient ainsi l'épitope et le bras espaceur (cf composé **32**, Figure 56).

86. V. Liautard, A. E. Christina, V. r. Desvergnès, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7337-7345.

87. E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800.

Les charpentes multivalentes retenues peuvent être classées suivant deux catégories (Tableau 4), les tétravalentes et les octavalentes.

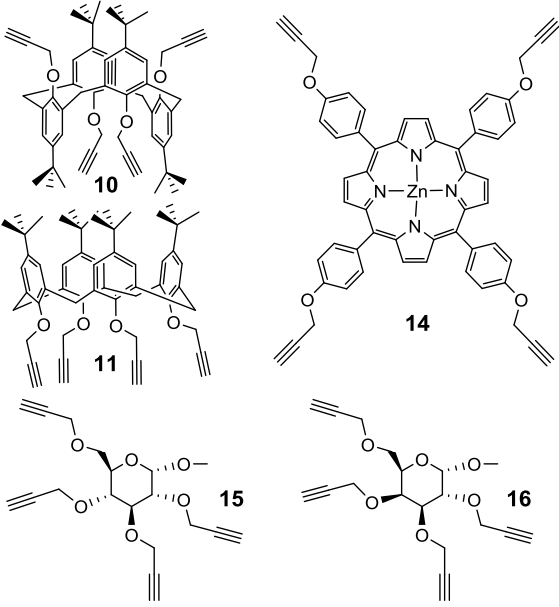
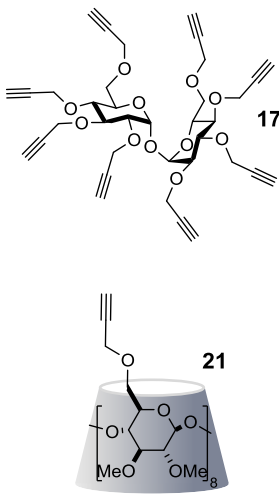
Composés tétravalents	Composés octavalents
	

Tableau 4 : Représentation des différentes charpentes multivalentes

II.2. 1). Les charpentes tétravalentes

Les structures calix[4]arène 1,3 alterné **10** et calix[4]arène 1,3 cône **11**, ont été fournies par le Docteur Suzanne Matthews de l'Université d'East Anglia. Ce type de composés a déjà été utilisé pour la détermination de mode de liaison par diverses équipes de recherche.

Notamment, Vidal *et coll.* ont montré l'importance de la topologie d'épitope sur l'inhibition de la lectine PA-IL grâce à différents conformères de calix[4]arènes.⁸⁸ Ils ont pu mettre en évidence, à la lecture des clichés AFM, un mode de liaison de type chélate agrégatif avec une structure de type calix[4]arène 1,3 alterné (cf Figure 30).

Nous avons également choisi comme charpente une porphyrine qui est un composé macrocyclique plan à quatre unités pyrrole dont les positions méso sont aisément fonctionnalisables. Ainsi, le greffage d'iminosucres sur ces positions permet *a priori* d'augmenter leur disponibilité en limitant les contraintes stériques avec les glycosidases.

88. S. Cecioni, R. Lator, B. Blanchard, J.-P. Praly, A. Imberty, S. E. Matthews, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 13232-13240.

Pour la synthèse du noyau porphyrinique, nous nous sommes basés sur les travaux de Liu *et coll.*⁸⁹ Dans un premier temps, nous avons synthétisé le composé **12** par alkylation du 4-hydroxybenzaldéhyde par du bromure de propargyle. La condensation de **12** avec le pyrrole dans l'acide propionique au reflux a conduit à la tétraphénylporphyrine tétrapropargylée **13** avec un rendement de 19 %.

Le cœur de la porphyrine possède d'excellentes propriétés de complexation des métaux. C'est pourquoi, afin d'éviter une chélation par le cuivre lors de la réaction de couplage, il est nécessaire de métaller au préalable la porphyrine par un atome de zinc. Nous avons synthétisé le complexe **14** avec un rendement de 95 % en mettant la porphyrine libre **13** en présence d'acétate de zinc dans un mélange dichlorométhane-méthanol (Figure 48).

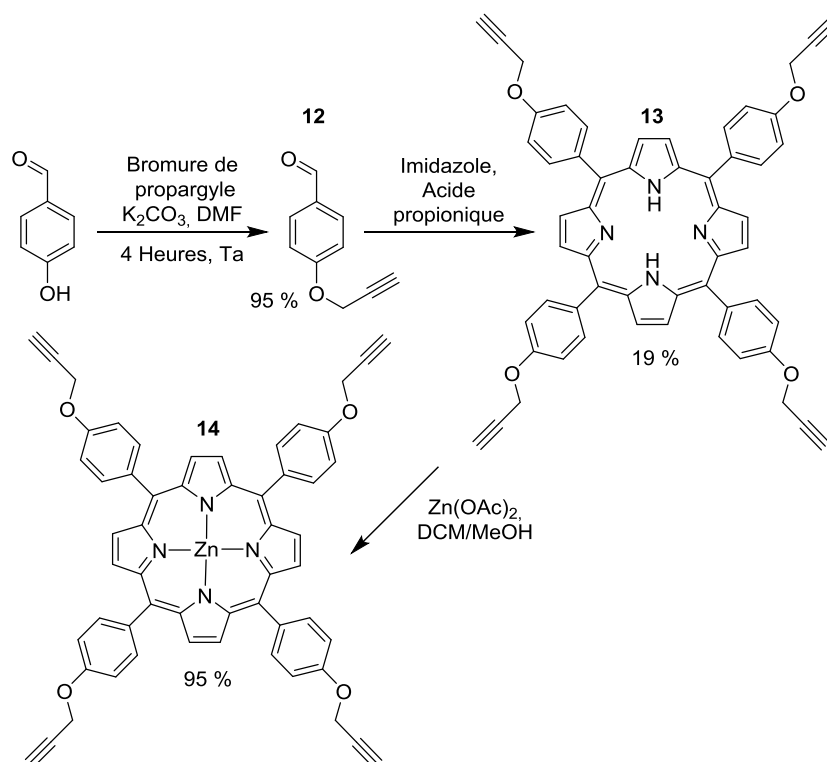


Figure 48 : Synthèse du cœur porphyrine

Les trois charpentes décrites précédemment possèdent un cœur hydrophobe insaturé. Afin de s'assurer que les inhibitions potentielles observées ne soient pas dues uniquement à des interactions secondaires de type π -stacking, nous avons opté pour la synthèse de deux charpentes monosaccharidiques.

89. Y. Liu, C.-F. Ke, H.-Y. Zhang, J. Cui, F. Ding, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *130*, 600-605.

Les charpentes **15** et **16** correspondent à la propargylation de l' α -D-glucopyranoside de méthyle et de l' α -D-galactopyranoside de méthyle. Ces deux produits commerciaux ont été choisis car ils possèdent la même charpente et la même valence. L'unique différence réside dans la configuration du carbone C4. Le traitement de ces monosaccharides par du bromure de propargyle dans du diméthylformamide en présence d'hydrure de sodium (Figure 49) permet ainsi l'obtention des structures **15** et **16**.

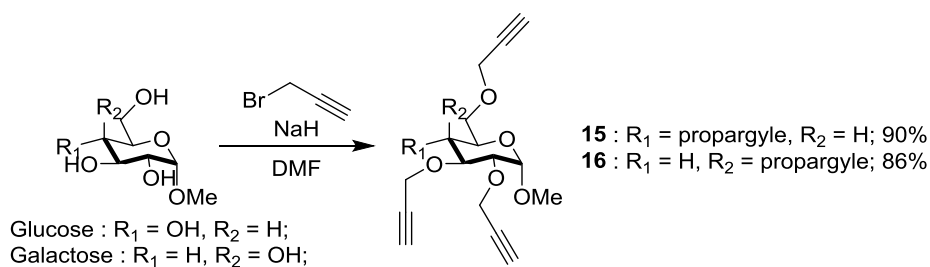


Figure 49 : Synthèse des charpentes tétravalentes de type monosaccharidique

II.2. 2). Les charpentes octavalentes

Afin d'évaluer le rôle potentiel de la valence sur l'inhibition de glucosidases, deux composés octavalents basés sur des charpentes di- et octasaccharidiques ont également été synthétisés.

Le composé **17** a été obtenu par propargylation d'un disaccharide commercial, le tréhalose, avec un rendement de 46%, en utilisant les mêmes conditions opératoires que pour les dérivés monosaccharidiques (Figure 50). Toutefois, ce rendement moyen peut s'expliquer par une difficulté à purifier le composé perpropargylé.

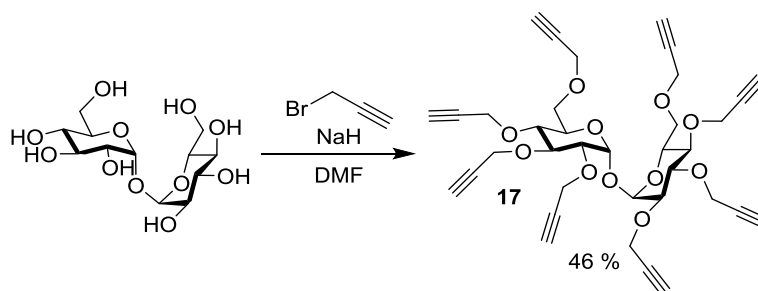


Figure 50 : Synthèse du ligand **17**

Enfin, le ligand octavalent **21** a été obtenu en quatre étapes à partir d'une γ -cyclodextrine commerciale suivant une voie de synthèse largement décrite dans la littérature pour les α et β -cyclodextrines.⁹⁰

La première étape de la synthèse est la protection sélective des alcools primaires en C6, des motifs saccharidiques constituant la cyclodextrine sous forme d'éthers silylés. Nous avons par la suite protégé les hydroxyles en C2 et C3 avec de l'hydrure de sodium et de l'iodométhane.

L'action du fluorure d'ammonium permet alors de cliver les groupements silylés pour retrouver les hydroxyles primaires libres qui sont ensuite propargylés dans les mêmes conditions opératoires que précédemment.

Nous obtenons ainsi le composé **21** avec un rendement global de 32% sur les quatre étapes (Figure 51).

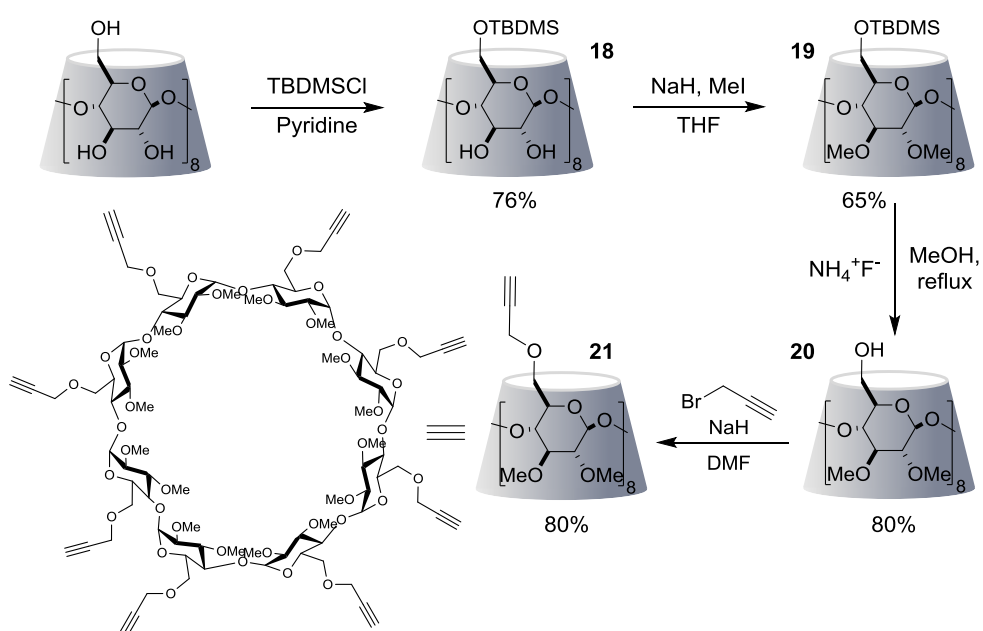


Figure 51 : Synthèse du ligand multivalent de type cyclodextrine

90. (a) A. Joshi, S. Kate, V. Poon, D. Mondal, *et al.*, *Biomacromolecules*, **12**, 791-796. (b) T. Carofiglio, M. Cordioli, R. Fornasier, L. Jicsinszky, U. Tonellato, *Carbohydr. Res.* **2004**, **339**, 1361-1366.

II. 3. Greffage des iminosucres sur les charpentes

II.3. 1). Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée

Fokin *et coll.* ont rapporté qu'une activation de la CuAAC par irradiation micro-ondes permet de réduire significativement les temps de réaction.⁹¹ Nous avons donc utilisé cette activation micro-ondes.

Les meilleurs résultats ont été obtenus dans un mélange eau/dioxane en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium à 80°C et avec des temps de réaction compris entre 30 minutes et 1 heure (Figure 52).

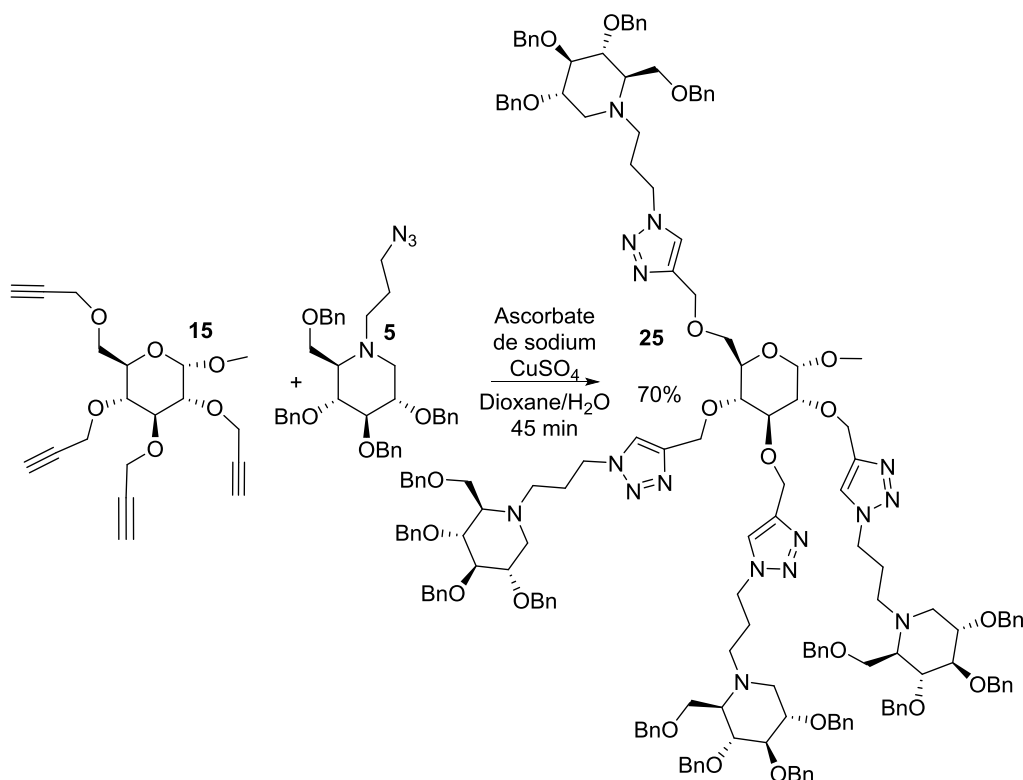


Figure 52 : Exemple pour la réaction de couplage CuAAC entre l'iminosucre **5** et la charpente glucose **15**

La Figure 53 présente l'ensemble des composés qui ont été synthétisés dans ces conditions à partir de l'iminosucre **5** et des charpentes alcynes correspondantes (cf Tableau 4).

La Figure 54 présente quant à elle la structure porphyrinique multivalente qui a été synthétisée par « chimie click » avec le synthon **9**.

91. P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin, E. Van der Eycken, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4223-4225.

L'analyse des spectres RMN de carbone de ces cycloadduits permet de confirmer la formation exclusive du régioisomère 1,4. En effet, nous avons observé un large écart positif d'environ 20 ppm entre les déplacements chimiques pour les carbones (4) et (5) des triazoles, ce qui est caractéristique du régioisomère 1,4. Les régioisomères 1,5-disubstitués ayant des écarts plus petits, et même parfois négatifs.⁹²

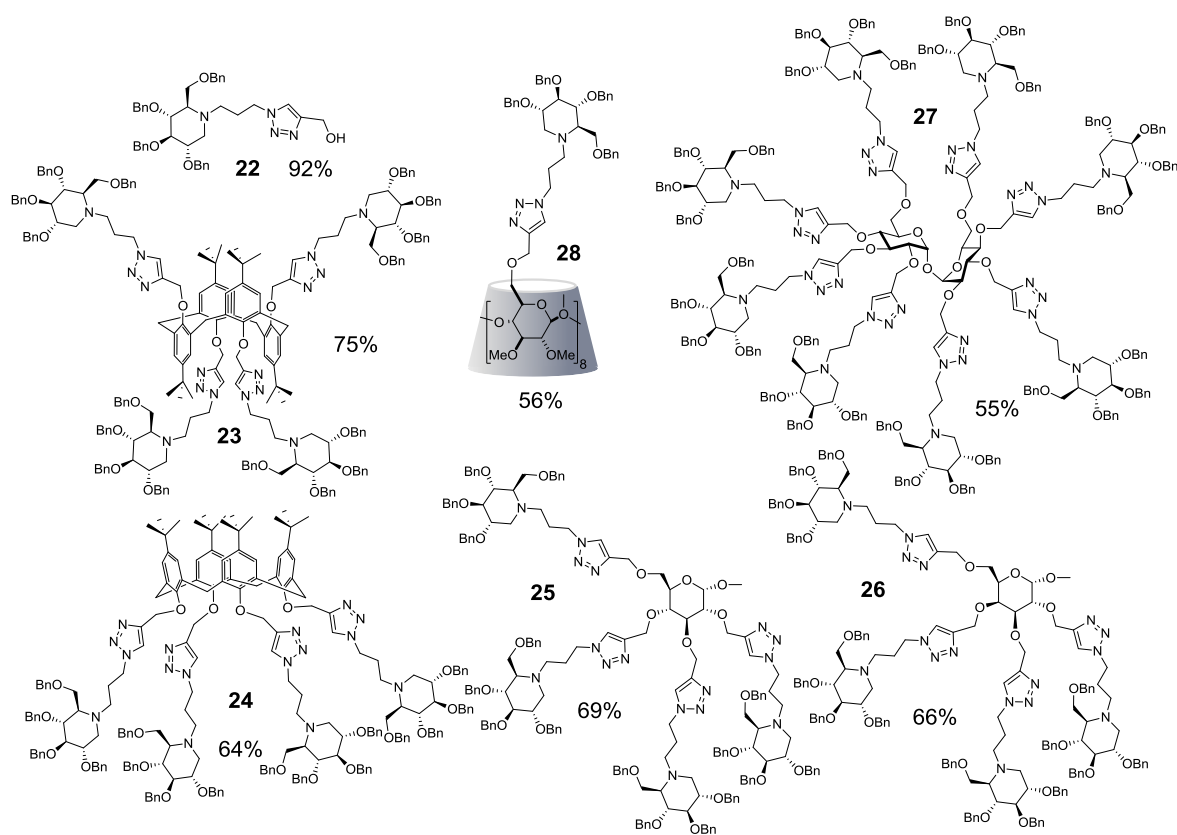


Figure 53 : Structures et rendements des ligands multivalents synthétisés par chimie click entre les alcynes et le synthon 5

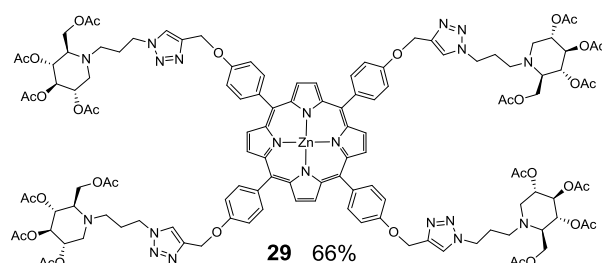


Figure 54 : Structure et rendement du ligand porphyrinique synthétisé par chimie click avec le synthon 9

92. (a) N. A. Rodios, *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, *21*, 1169-1173. (b) A. Marra, A. Vecchi, C. Chiappe, B. Melai, A. Dondoni, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2458-2461.

II.3. 2). Déprotection des iminosucres

Les composés benzylés **22-28** ont été engagés dans une réaction d'hydrogénolyse sous atmosphère d'hydrogène en présence du catalyseur de Pearlman en condition acide.

L'hydrogénolyse des groupements benzyles dans ces conditions s'est montrée efficace pour les entités à faible valence (**22** à **26**), ce qui nous a permis d'obtenir les composés finaux **32** à **36** de façon quantitative (Figure 56). En revanche, nous n'avons pas pu trouver de conditions permettant la déprotection des ligands de valence supérieure (**27, 28**). Quelques soient les conditions opératoires nous obtenons un mélange complexe de produits partiellement déprotégés.

Afin de contourner ce problème, nous avons réalisé la réaction de couplage avec l'iminosucre acétylé **9**, comme pour la porphyrine. Les composés **30** et **31** ont alors été obtenus avec un rendement identique de 57% (Figure 55).

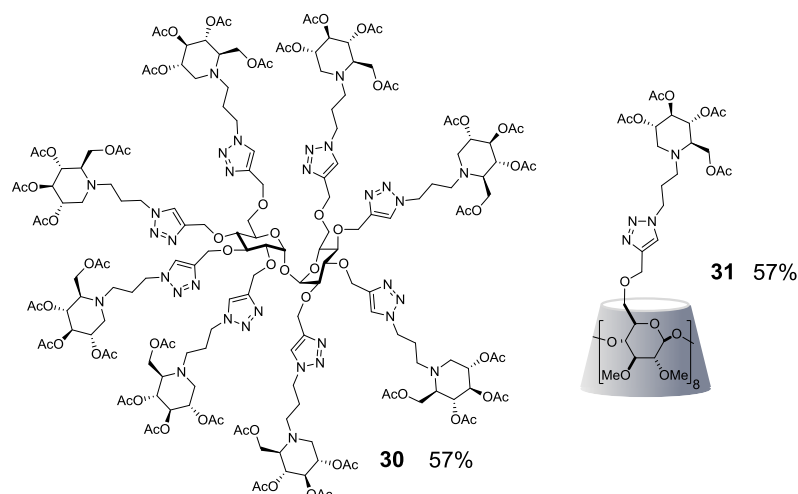


Figure 55 : Structure et rendement des ligands octavalents synthétisés par click chemistry avec le synthon **9**

La déprotection des groupements hydroxyles des iminosucres présents sur les ligands octavalents et sur la porphyrine a pu être effectuée à l'aide d'une résine basique (Amberlite IRN 78 OH⁻) dans un mélange MeOH/H₂O (Figure 56).

Finalement, huit ligands multivalents ont été synthétisés avec des rendements compris entre 52 et 92 % pour la séquence cycloaddition-déprotection.⁹³ Ces différences

93. Y. Brissonnet, C. Ortiz Mellet, S. Morandat, M. I. Garcia Moreno, D. Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Sestak, K. El Kirat, S. G. Gouin, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18427-18435.

de rendements sont essentiellement dues à la difficulté de purification sur gel de silice de ces composés.

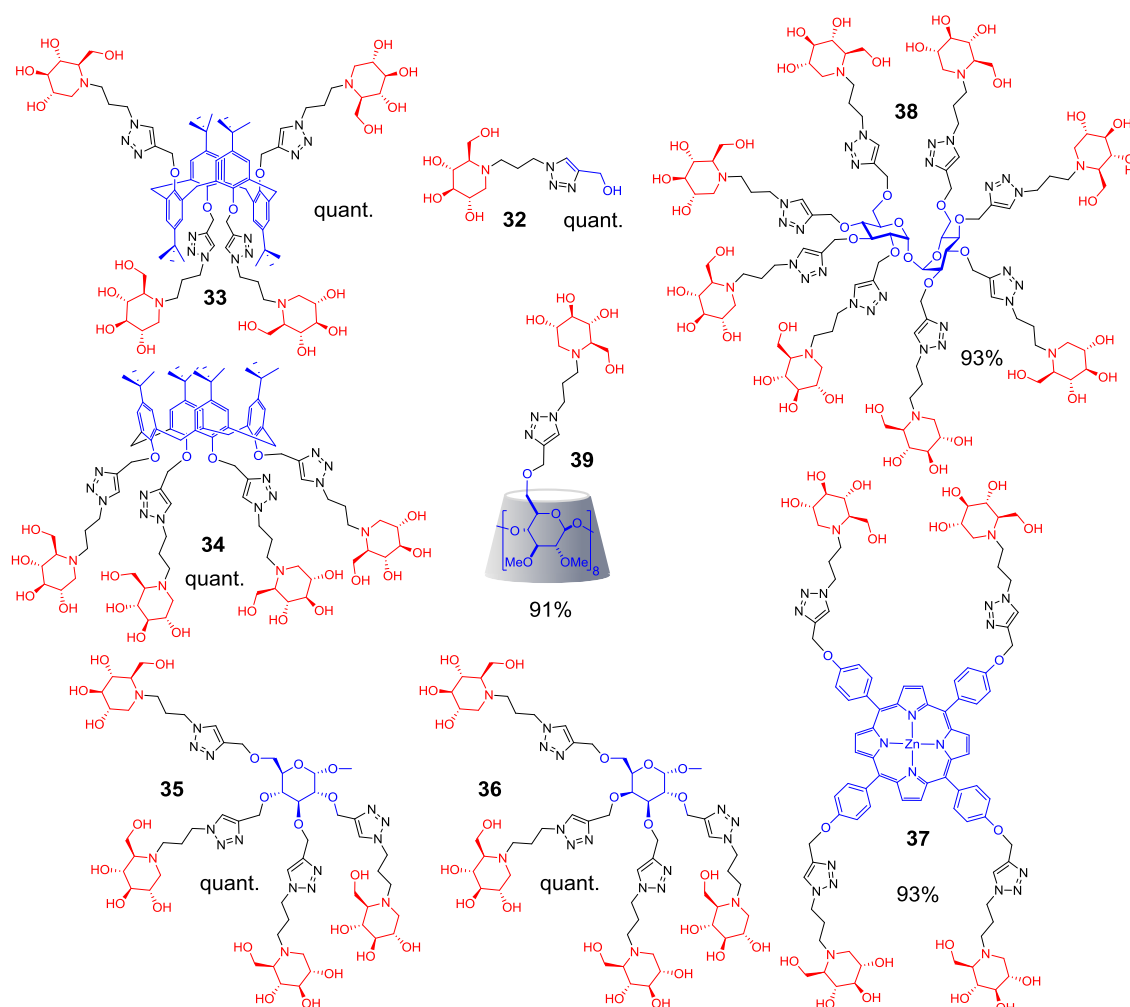


Figure 56 : Structures et rendements de déprotection des composés finaux obtenus

III. Résultats biologiques et discussion

III. 1. Evaluation des propriétés inhibitrices des composés multivalents

III.1. 1). Inhibition de glycosidases commerciales

Les composés multivalents ont été testés sur un panel de huit glycosidases dans le laboratoire du Professeur Carmen Ortiz-Mellet à l'Université de Séville. La détermination des K_i a été effectuée par spectrophotométrie en mesurant l'activité d'hydrolyse résiduelle des glycosidases envers leurs substrats respectifs *o*- ou *p*-nitrophényl-glycoside. A partir des données obtenues, nous pouvons tracer les droites des doubles inverses $1/v$ en fonction de $1/S$ (Lineweaver-Burk) pour chaque concentration en inhibiteur utilisée.

La pente de chacune de ces droites, en fonction de la concentration en inhibiteur, donne une nouvelle droite et la pente de cette dernière correspond au K_i (Figure 57).

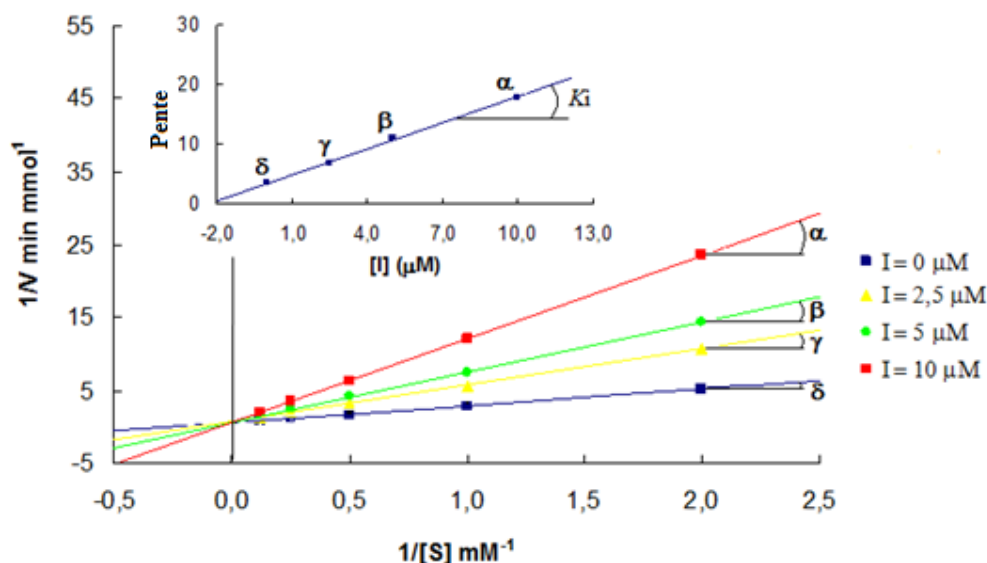


Figure 57 : Représentation des droites des doubles inverses et détermination du K_i

Les résultats de ces tests sont répertoriés dans le Tableau 5. Les valeurs de K_i ainsi que les écarts relatifs sont donnés en μM . La notion p.i signifie qu'aucune inhibition n'a été observée à une concentration de 2 mM.










									
Enzymes	32	33	34	35	36	37	38	39	
β -galactosidase (foie de boeuf)	p.i.	58 ± 6	38 ± 4	p.i.	64 ± 6	52 ± 5	71 ± 9	191 ± 19	
β -galactosidase (<i>E. coli</i>)	85 ± 9	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	
α -galactosidase (café vert)	55 ± 6	36 ± 4	24 ± 2	228 ± 23	24 ± 2	18 ± 1	1.7 ± 0.2	40 ± 4	
β -glucosidase (amande douce)	233 ± 24	729 ± 87	p.i.	311 ± 36	283 ± 28	p.i.	281 ± 27	177 ± 18	
α -glucosidase (levure de boulanger)	p.i.	45 ± 4	585 ± 59	p.i.	p.i.	p.i.	243	p.i.	
α -mannosidase (jack bean)	400 ± 48	20 ± 2	1.5 ± 0.2	76 ± 8	41 ± 4	0.5 ± 0.05	21 ± 2	23 ± 2	
β -mannosidase (<i>helix pomatia</i>)	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	
amyloglucosidase (<i>Aspergillus niger</i>)	45 ± 4	11	43 ± 5	11 ± 1	2.3 ± 0.2	24 ± 2	4.6 ± 0.5	8 ± 0.8	

Tableau 5 : Evaluation des propriétés inhibitrices des composés multivalents 32-39

D'une manière générale, afin de caractériser un effet multivalent, il faut déterminer l'augmentation d'affinité par unité d'iminosucre (AAI) présente sur le ligand. Lorsque cette valeur d'AAI est supérieure à 1, il y a un effet multivalent positif.

Elle est directement obtenue en divisant l'augmentation d'inhibition relative (AIR), par la valence du ligand. La valeur AIR est quant à elle calculée en divisant le K_i du monovalent par celui d'un multivalent et donne l'augmentation d'affinité par molécule.

En accord avec les études précédentes,^{69,94} différents profils d'inhibition ont pu être observés sur les glycosidases testées. En outre, excepté pour la β -galactosidase d'*E. Coli* et le β -mannosidase d'*helix pomatia*, toutes les enzymes ont été inhibées par les composés multivalents.

A la lecture des constantes d'inhibition obtenues avec la β -glucosidase d'amande douce, nous pouvons constater que l'augmentation de la valence induit pour la majorité des composés une perte d'affinité. En effet, le K_i du composé monovalent est de 233 μM alors que celui du composé tétravalent **33** est de 729 μM .

Concernant l'amyloglucosidase et l' α -galactosidase, si l'on compare les valeurs d'AAI des structures multivalentes avec celle du composé de référence, il n'y a pas d'effet multivalent dans la plupart des cas (Tableau 5). En revanche, les composés **36** et **38** ont montré une augmentation d'affinité envers l'amyloglucosidase (AAI = 5) et envers l' α -galactosidase (AAI = 4)

Certains composés inhibent assez fortement l' α -glucosidase de levure et la β -galactosidase du foie de bœuf, comme le dérivé tétravalent **33**. Pour ces deux glycosidases, la multivalence entraîne donc un gain d'affinité. Malheureusement, le monovalent n'ayant pas montré d'activité inhibitrice envers ces enzymes à forte concentration, aucun effet multivalent ne peut être quantifié.

Il n'y a vraiment qu'avec Jb α man que des gains d'affinité significatifs ont été observés. Les valeurs AIR et AAI sont rapportées dans le Tableau 6.

94. P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.









								
Composés	32	33	34	35	36	37	38	39
Valence	1	4	4	4	4	4	8	8
AIR	1	20	267	5	10	800	19	17
AAI	1	5	67	1,2	2,5	200	2,4	2,1

Tableau 6 : Augmentation d'affinité observée entre Jbaman et les multivalents **30-37**

Si l'on compare les valeurs AAI, nous remarquons que tous les composés multivalents montrent un effet cluster positif avec cette enzyme. Deux composés se distinguent véritablement, le calix[4]arène cône **34** (AIR = 267) et la porphyrine **37** (AIR = 800) pour lesquels les gains d'affinité par motif DNJ sont respectivement de 67 et 200.

Paradoxalement, les deux composés de plus haute valence **38** et **39** révèlent des effets multivalents très modérés (AAI respectives 2,4 et 2,1), bien moins puissants que les deux composés tétravalents **34** et **37**. La valence n'est donc pas le seul phénomène régissant l'effet multivalent.

De façon remarquable, nous avons une nette disparité dans les K_i des composés tétravalents (valeurs d'AAI comprises entre 1,2 et 200) indiquant l'influence de la topologie sur l'inhibition. Cet effet est le plus visible avec les composés isomères calix[4]arènes **33** et **34** qui montrent deux valeurs d'AAI significativement différentes, respectivement de 5 et 67.

Ces résultats montrent clairement l'importance du choix de la charpente afin d'augmenter la sélectivité et l'affinité envers une glycosidase donnée.

III.1. 2). Inhibition d' α -mannosidases humaines

Les α -mannosidases intracellulaires se situent principalement au sein du lysosome et de l'appareil de Golgi. L'inhibition sélective des α -mannosidases de classe II (GMIIB) est un challenge des plus intéressants car ces enzymes sont directement impliquées dans la biosynthèse de *N*-glycoprotéines impliquées dans certains phénomènes métastatiques.⁹⁵ Toutefois, le développement et l'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs de GMIIB comme la swainsonine (Figure 20) sont fortement entravés à cause d'une inhibition non sélective

95. D. R. Tulsiani, T. M. Harris, O. Touster, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 7936-7939.

d' α -mannosidase de classe II lysosomales (LManII). Cette inhibition entraîne des symptômes d' α -mannosidose, maladie lysosomale pouvant conduire à des anomalies squelettiques et faciales, une immunodéficiences et un déficit intellectuel.⁹⁶

Nous avons donc voulu évaluer si la multivalence pouvait induire une augmentation d'affinité et de sélectivité sur les α -mannosidases de Golgi et lysosomales humaines. Les composés **32**, **34** et **37** ont été testés sur deux α -mannosidases recombinantes, homologues de mannosidases humaines obtenues depuis *Pichia pastoris*, dans le laboratoire du Professeur Sergej Sestak, à l'Académie des Sciences de Slovaquie.

Les résultats de ces tests sont répertoriés dans le Tableau 7. Les valeurs de K_i ainsi que les écarts relatifs sont donnés en μM . La notion p.i signifie qu'aucune inhibition n'a été observée à une concentration de 1 mM.


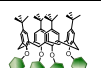
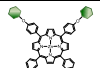
			
Composés	32	34	37
Valence	1	4	4
GMIib	362 \pm 88	p.i.	24 \pm 10
LManII	p.i.	p.i.	p.i.

Tableau 7 : Evaluation des propriétés inhibitrices des composés **30**, **32** et **35** envers GMIib et LManII

Nous remarquons que le dérivé monovalent inhibe GMIib avec un K_i modéré de 362 μM et que le K_i pour LManII est supérieur à 1 mM. De façon intéressante, le dérivé **37** inhibe exclusivement la mannosidase de golgi avec un K_i de 24 μM . La multivalence pourrait donc être une voie à explorer pour obtenir des inhibiteurs sélectifs de GMIib, objectif qui n'a pas été atteint pour le moment avec les inhibiteurs monovalents décrits dans la littérature.

Le composé **37** a entraîné un gain d'affinité pour cette enzyme, et un effet multivalent modéré a pu être observé (AAI = 4). Étonnamment, le calix[4]arène **34** qui inhibait Jbaman, n'a montré aucun caractère d'inhibition ni sur GMIib ni sur LManII. La multivalence peut donc induire des inhibitions discriminantes au sein d'une même famille enzymatique.

96. (a) M. S. Kang, A. D. Elbein, *Plant Physiology* **1983**, 71, 551-554. (b) D. R. P. Tulsiani, H. P. Broquist, O. Touster, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1985**, 236, 427-434.

Ces constats renforcent l'hypothèse que la topologie est d'une importance capitale aussi bien sur l'affinité que sur la sélectivité pour l'inhibition de glycosidases humaines.

III. 2. Discussion

III.2. 1). Limite de la valence

Nous avons vu que les composés de plus haute valence **37** et **39**, n'étaient pas les meilleurs inhibiteurs. De façon surprenante, le motif γ -CD **39** présente des valeurs d'AAI assez faibles en comparaison avec des structures extrêmement proches déjà décrites dans la littérature (Figure 58) et testées sur la même enzyme.⁷⁰

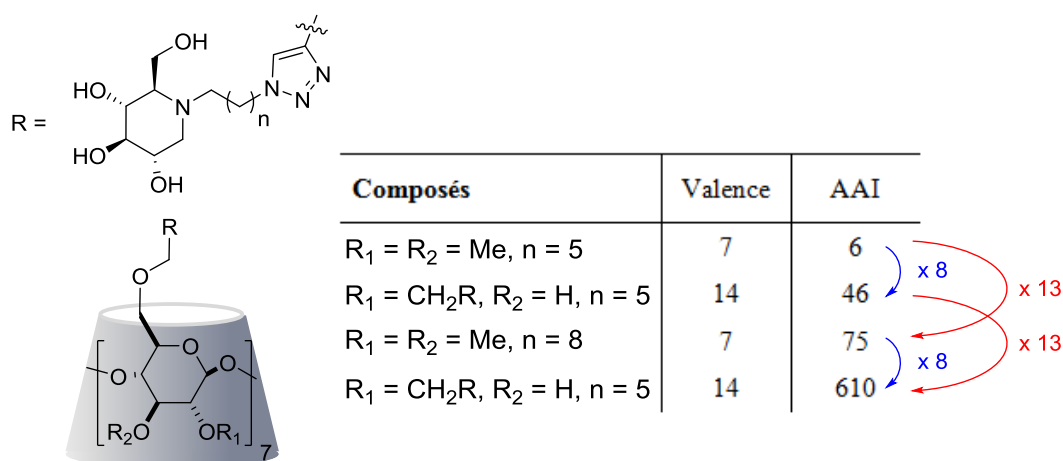


Figure 58 : Structure et augmentation d'affinité observée entre Jbaman et quatre ligands multivalents de type β -cyclodextrine

Dans cette étude, l'équipe du professeur Compain a synthétisé des β -cyclodextrines sur lesquelles ont été greffé sept ou quatorze dérivés, soit de la *N*-hexyl-DNJ ($n = 5$ carbones), soit de la *N*-nonyl-DNJ ($n = 8$ carbones). Ce travail leur a permis d'évaluer aussi bien l'influence de la valence que la taille de l'espaceur entre la charpente et l'épitope.

Les deux ligands tétradécavalents ont montré la même augmentation d'affinité d'un facteur 8 par rapport à leur homologue héptavalent. De plus, un gain identique d'un facteur 13 a été observé entre les ligands de même valence, présentant 6 ou 9 carbones. Les auteurs attribuent cette hausse d'affinité à un accroissement de l'accessibilité et à une diminution de la gêne stérique lorsque l'espaceur est le plus long.

Dans notre cas, la taille de l'espaceur n'est que de 3 carbones, la disponibilité de chaque épitope pourrait donc être encore diminuée. Cette hypothèse permettrait alors d'expliquer les faibles valeurs obtenues avec les composés octavalents.

III.2. 2). Quid de l' α -mannosidase de Jack bean

Afin d'approfondir notre étude et de comprendre pourquoi seule Jb α man montre un effet multivalent, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques de cette enzyme. Jb α man est une métalloenzyme de zinc qui est un dimère de 220 kDa. Chaque monomère est composé de deux sous unités ; l'une de 44 kDa et l'autre de 66 kDa qui comprend le site catalytique.⁷⁴ Une étude récente suggère que chacune des unités de 110 kDa (66+44) de Jb α man possède un site catalytique actif.⁹⁷

Il a été montré que cette enzyme pouvait être inactivée par du cuivre.⁹⁸ Afin de vérifier que les fortes augmentations d'affinité observées n'étaient pas dues à la présence de cuivre résiduel provenant de la réaction de CuAAC, la concentration de cuivre a été estimée par colorimétrie grâce à des bandes de dosages Quantofix®, excepté pour le composé porphyrinique **37**. Ce composé étant naturellement de couleur pourpre foncé, la quantification du cuivre résiduel par colorimétrie n'est pas envisageable.

Pour tous les composés testés, la quantité de cuivre résiduel varie entre 50 et 150 ppm. Il en résulte que pendant les tests d'inhibition, les concentrations en cuivre sont trop faibles pour influencer sur l'inhibition de la Jb α man. A titre d'exemple, cela correspond à une concentration maximale en cuivre pour le composé **34** inférieure à 10 nM, alors que les concentrations inhibitrices en cuivre limites sont de l'ordre du micromolaire.⁹⁸

III.2. 3). Proposition de mécanisme

Comme Jb α man est une enzyme dimérique, il est possible d'envisager les quatre modes de liaison principaux pour expliquer les effets cluster observés (Cf chapitre Introduction partie III.1.).

Afin de mettre en lumière le ou les modes de liaison impliqués dans les interactions entre les iminosucres multivalents et Jb α man, différentes analyses ont été effectuées. Nous avons envisagé d'étudier nos interactions enzyme/iminosucre par de la

97. (a) A. Kumar, S. M. Gaikwad, *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49*, 1066-1071. (b) Y. Kimura, D. Hess, A. Sturm, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 168-175.

98. S. M. Snaith, *Biochem. J.* **1975**, *147*, 83-90.

microcalorimétrie de titration isotherme. Des résultats préliminaires prometteurs ont été obtenus sur les composés **32** et **34**. Cependant, malgré la modification de nombreux paramètres, comme la température, le rapport de concentration [enzyme]/[composé], ou bien le renouvellement de stock d'enzyme, il nous a été impossible de reproduire ces résultats.

Ces résultats n'étant pas reproductibles, ils ne seront pas présentés dans cette étude.

Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie de force atomique permet d'avoir une vision concrète, avec une résolution nanométrique, de molécules individuelles adsorbées sur une surface. Grâce à cet outil, il est possible de dresser la topographie d'un échantillon. Elle peut donc être utile dans l'observation des interactions enzyme/ligands multivalents. Ainsi, des expériences de microscopie de force atomique (AFM) ont été effectuées par le docteur Karim El Kirat de l'Université de Compiègne (Figure 59). Des mélanges enzyme/iminosucre ont été déposés en solution sur une surface de mica, puis cartographiés après séchage à température ambiante.

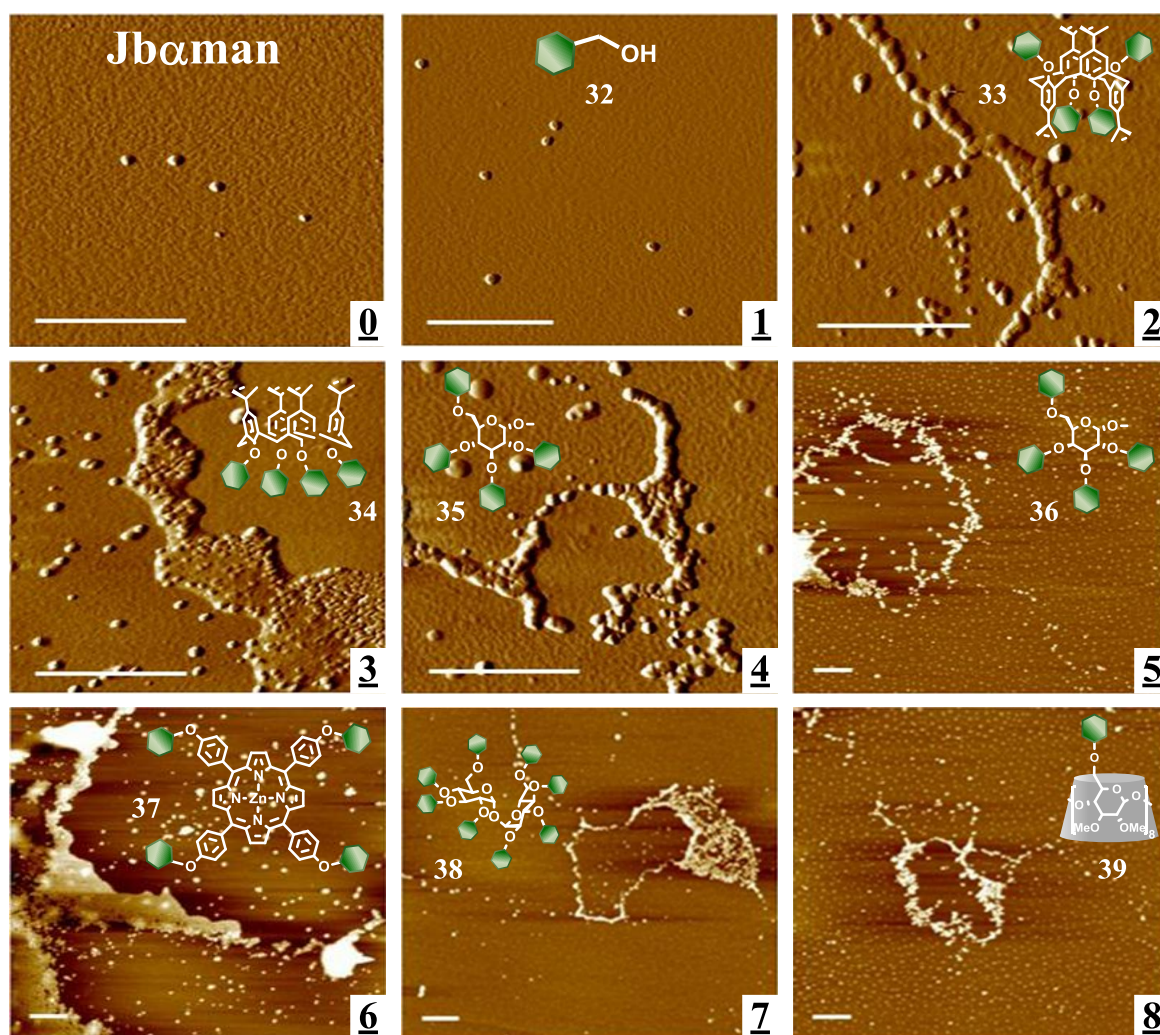


Figure 59 : Clichés AFM présentant les agrégats observés entre Jb α man et les composés multivalents **32-39**, en quantité 1/1, barre d'échelle équivalente à 500 nm

Nous constatons sur les clichés **0** et **1**, représentant respectivement l'enzyme seule et une incubation d'un mélange enzyme/monovalent (**32**), des points isolés qui correspondent à une seule et même enzyme, comme suggéré par la taille des objets. En revanche, les clichés **2** à **8** correspondants aux mélanges enzyme-ligand multivalent, ont tous montré des structures nanométriques complexes, illustrant ainsi la capacité des iminosucres multivalents à former des agrégats avec Jb α man. Les différences d'activité inhibitrice observées pourraient alors être expliquées par la formation de réseaux supramoléculaires organisés comme il a déjà pu être rapporté dans le cas de réseaux lectines-sucres.⁹⁹

99. T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256-28263.

Les agrégats observés dans les clichés **2** à **8** possèdent des tailles et des formes différentes et dépendantes de la nature des composés multivalents. Le composé **33** forme avec Jb α man des réseaux curvilignes qui sont probablement dus à la présentation de deux iminosucres, sur chaque côté de la charpente rigide. Nous avons vu que des réseaux organisés monodimensionnels avaient déjà été observés entre la lectine PA-IL et un glycoconjugué tétragalactosylé de même charpente calix[4]arène 1,3 alterné (cf Figure 30).⁵⁸ Les composés **35**, **36**, **37** et **39** ont quant à eux montré des réseaux organisés en larges anneaux dont la circonférence ainsi que la distance entre les cercles intérieurs et extérieurs varient d'une structure multivalente à une autre. En revanche, il est assez difficile d'expliquer la forme adoptée par ces agrégats au niveau moléculaire.

Finalement, les structures de type calix[4]arène cône ou porphyrine (respectivement **34** et **37**), qui ont montré les meilleures activités inhibitrices, présentent de très larges agrégats. Il est connu que les porphyrines ont une tendance à s'agréger dans les milieux aqueux grâce à des interactions intermoléculaires soit de type π stacking, soit par coordination entre un triazole et un atome de zinc.¹⁰⁰ Ainsi, la formation préalable par auto-assemblage, de ligands de valence nettement supérieure, pourrait faciliter la formation des très larges agrégats observés entre Jb α man et le composé **37**.

Cette hypothèse a pu être confirmée par des clichés AFM du composé **37** seul, ainsi que par des expériences DLS qui ont mis en lumière de petites structures supramoléculaires de tailles comprises entre 0,8 et 1 nm. Les ligands multivalents auto-assemblés ont déjà été rapportés comme des outils puissants dans l'inhibition de lectine bactérienne.¹⁰¹

Des analyses AFM ont également été réalisées avec différents ratio molaires de composé **37** par rapport à Jb α man (Figure 60).

100. (a) T. Kiba, H. Suzuki, K. Hosokawa, H. Kobayashi, S. Baba, T. Kakuchi, S.-i. Sato, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11560-11563. (b) S. Perrier, P. Takolpuckdee, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 5347-5393.

101. M. K. Müller, L. Brunsveld, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2921-2924.

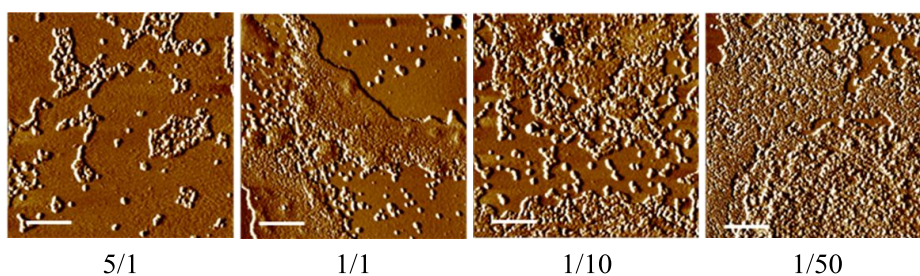


Figure 60 : Clichés AFM représentant les interactions de Jb α man avec différents ratio molaires de composé **37** (enzyme/ligand), barre d'échelle équivalente à 500 nm

Nous constatons que la taille des agrégats augmente lorsque le ratio enzyme/ligand diminue. La taille des agrégats étant directement liée à la concentration du composé **37** présent dans le milieu. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle la formation des agrégats provient essentiellement de la présence de ligands multivalents.

Nous avons ensuite vérifié que les phénomènes d'agrégation observés avec Jb α man, ne le sont pas avec des glycosidases qui n'ont pas montré d'effet multivalent. Nous avons pour cela sélectionné l' α -glucosidase de levure de boulanger (α Glu) ainsi que la β -galactosidase d'*escherichia coli*. (β Gal), avec lesquelles nous avons effectué d'autres analyses AFM en présence ou non des ligands multivalents **34** ou **37** (Figure 61).

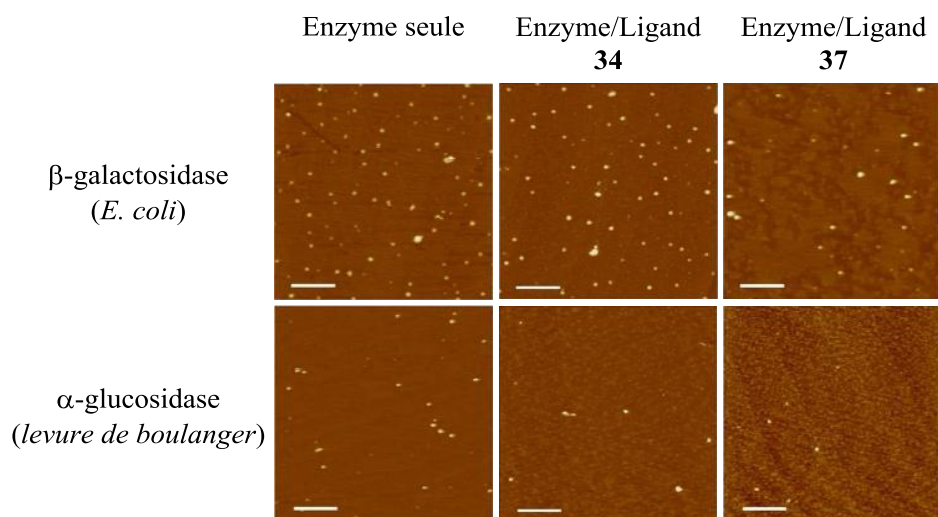


Figure 61 : Clichés AFM montrant la β -galactosidase et l' α -glucosidase seules ou avec les composés tétravalents **34** et **37**, barre d'échelle équivalente à 500 nm

Nous pouvons remarquer que les clichés présentent tous le même profil. En effet, que les enzymes soient seules ou en présence des composés tétravalents, il n'y a pas de formation d'agrégat.

La β -galactosidase d'*escherichia coli*. est une enzyme tétramérique de 465 kDa, avec deux sillons de chaque coté de la protéine et contenant chacune deux sites actifs.¹⁰² Pourtant, seul le ligand monovalent **32** a montré un caractère inhibiteur envers cette enzyme. La construction de ligands multivalents a eu en général un effet défavorable sur l'inhibition de cette enzyme, contrairement aux effets observés sur l'enzyme dimérique Jb α man. Toutes les glycosidases multimériques ne répondent donc pas à la multivalence, et une possibilité de sélectivité est également envisageable sur ce type de glycosidases.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Au cours des analyses AFM, les échantillons ont été séchés sur une surface de mica avant mesure. Afin de nous rapprocher des conditions expérimentales des tests d'inhibition, il nous faut maintenant vérifier la présence de ces agrégats en solution.

La diffusion dynamique de la lumière, est une technique d'analyse spectroscopique qui permet d'accéder à la taille de nanoparticules en solution. Ainsi, la formation des agrégats observés par AFM a été explorée en solution grâce à cette technique (Tableau 8). Ces expériences nous ont permis de déterminer les diamètres hydrodynamiques de l'enzyme seule ou en mélange avec le composé **32**, mais aussi ceux des structures complexes formés entre Jb α man et les composés **34** ou **37**.

Enzyme/Ligand (ratio 1/10)	Diamètre hydrodynamique (en nm)
Jb α man seule	10,4 \pm 2,2
Jb α man / 32	9,9 \pm 2,5
Jb α man / 34	663,3 \pm 128,9
Jb α man / 37	731,9 \pm 161,9
β -galactosidase (<i>E. coli</i>)/ 37	7,4 \pm 1,4
α -glucosidase (<i>baker's yeast</i>)/ 37	3,3 \pm 0,7

Tableau 8 : Diamètres hydrodynamiques de glycosidases seules ou en mélange avec les composés **32**, **34** ou **37**

102. R. H. Jacobson, X. J. Zhang, R. F. DuBose, B. W. Matthews, *Nature* **1994**, 369, 761-766.

Un diamètre hydrodynamique d'environ 10 nm a été observé pour Jb α man, ou bien en co-incubation avec le composé de référence **32**. En revanche, des mélanges enzyme/composé tétravalent (**34** et **37**) ont montré des diamètres hydrodynamiques supérieurs à 600 nm.

Les expériences de DLS nous ont permis d'accéder à la distribution typique de taille pour un mélange de Jb α man et du composé **37** dans un ratio molaire 1/10 (Figure 62). Cette distribution montre la coexistence simultanée de larges complexes (731.9 ± 161.9 nm), de la protéine seule (10.4 ± 2.2 nm), ainsi que d'une espèce de taille inférieure à 1 nm qui pourrait correspondre à l'auto agrégation spontanée du ligand **37**.

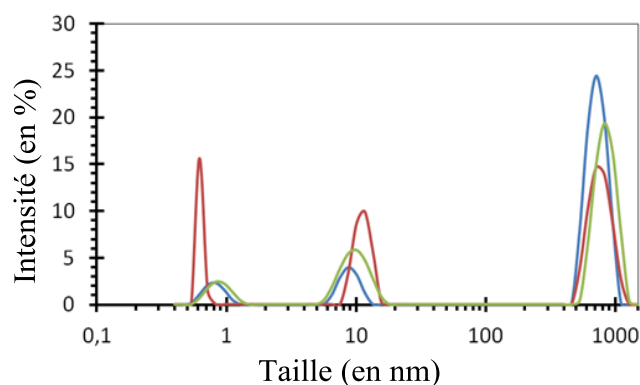


Figure 62 : Distribution typique de taille des agrégats en solution d'un mélange Jb α man /**37**

En revanche, la valeur de 10.4 nm obtenue pour la taille de la protéine n'est pas tout à fait similaire à une étude précédente. En effet, Kumar *et coll.* ont déterminé le diamètre hydrodynamique à 22.9 nm pour l'enzyme native grâce à des analyses DLS. Cependant, la différence de tampon et de température ainsi que la présence de détergent SDS durant cette analyse pourraient expliquer la différence de diamètre observée.

Toutefois, ces résultats sont en accord avec les études AFM et confirment la possibilité de former des structures complexes en solution entre des enzymes et des structures multivalentes.

ÍMINOSUCRES ULTRAVALENTS

I. Notre approche

Cette deuxième partie est consacrée à l'étude de l'influence de la valence sur l'inhibition de certaines glycosidases. Plus précisément, nous avons voulu déterminer si l'augmentation de la valence induisait une augmentation constante de l'inhibition des glycosidases, ou si au contraire un plateau était atteint à partir d'une certaine limite.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la disposition spatiale des ligands a un rôle prédominant dans l'inhibition des glycosidases. Afin d'étudier l'influence de la valence, nous devons limiter au maximum l'action de la topologie sur l'inhibition car elle pourrait perturber l'interprétation des résultats. Une méthode efficace serait de répéter plusieurs fois une même unité de base. La topologie globale du composé peut alors être différente mais reste identique au niveau du motif de répétition (Figure 63). Les polymères s'imposent comme une plateforme idéale pour l'étude la valence.

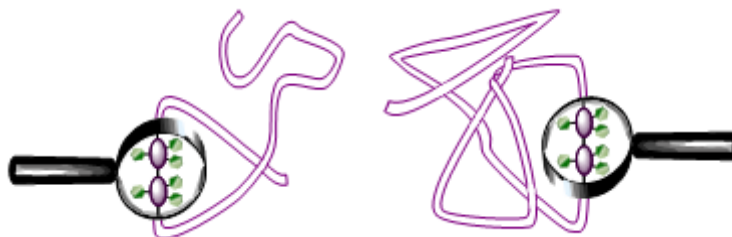


Figure 63 : Représentation de la topologie d'un polymère

Nous avons choisi d'utiliser des dextrans commerciaux, polymères de glucose liés en α -(1,6), dont le degré de polymérisation définira la valence. Une collaboration avec l'équipe du Professeur Gabrielle Potocki-Véronèse et le docteur Emeline Fabre nous a permis d'avoir également accès à des dextrans qui possèdent une ramification contrôlée en α -(1,2). Sept charpentes fonctionnalisées ont ainsi pu être obtenues.

Nous avons effectué la synthèse d'un iminosucre fonctionnalisé dérivé de la déoxymannojirimycine, car celui-ci est un inhibiteur plus sélectif et affin que la DNJ envers les α -mannosidases. La multi-présentation de ce genre de composé pourrait induire une augmentation de sélectivité et d'affinité envers les mannosidases de classe II, comme Jb α man, GMIIb et LManII.

Nous avons synthétisé quatorze néoglycoconjugués présentant des dérivés soit de la DNJ soit de la DMJ.

La nature multimérique d'une enzyme n'explique pas à elle seule les importants gains d'affinité observés. En effet, dans l'étude précédente, la β -galactosidase d'*escherichia coli.*, qui est pourtant une enzyme tétramérique, ne s'est pas révélée sensible à la multivalence. Nous avons donc voulu sonder l'influence de l'état oligomérique des enzymes sur les effets multivalents. Pour cela, nous avons déterminé l'activité inhibitrice des composés dans le laboratoire UFIP du Professeur Charles Tellier de l'Université de Nantes sur cinq glycosidases, monomériques ou multimériques, incluant Jbøman. Ces ligands ultravalents ont aussi fait l'objet de tests sur les deux enzymes recombinantes GMIIb et LManII, par le docteur Sergej Sestak de l'Académie des Sciences de Slovaquie.

II. Synthèse organique

II. 1.Synthèse de l'iminosucre

En utilisant la même stratégie de synthèse que pour le dérivé DNJ, nous avons pu obtenir l'iminosucre **44** en cinq étapes à partir du D-mannose (Figure 64). La protection de la position anomérique avec le système alcool allylique-éthérate de trifluorure de bore suivie d'une perbenzylation dans du diméthylformamide nous donne accès au composé **40** avec un rendement de 62% sur les deux étapes. La déprotection sélective de la position anomérique par le chlorure de palladium nous conduit à la forme hémiacétal **41**. Une étape de réduction complétée par une réaction monotope d'oxydation-amination réductrice, fournissent l'iminosucre **44** attendu avec un rendement de 36 % sur ces deux étapes.

Afin d'éviter tous problème de déprotection, déjà observé pour des composés de haute valence (cf Chapitre 1 pg 59,60), nous avons effectué directement la réaction de couplage avec des dérivés iminosucre acétylés. Le composé **44** est alors entraîné dans trois réactions successives suivant les mêmes conditions que pour le composé **5** (cf Figure 47) pour former le composé **47** (Figure 64).

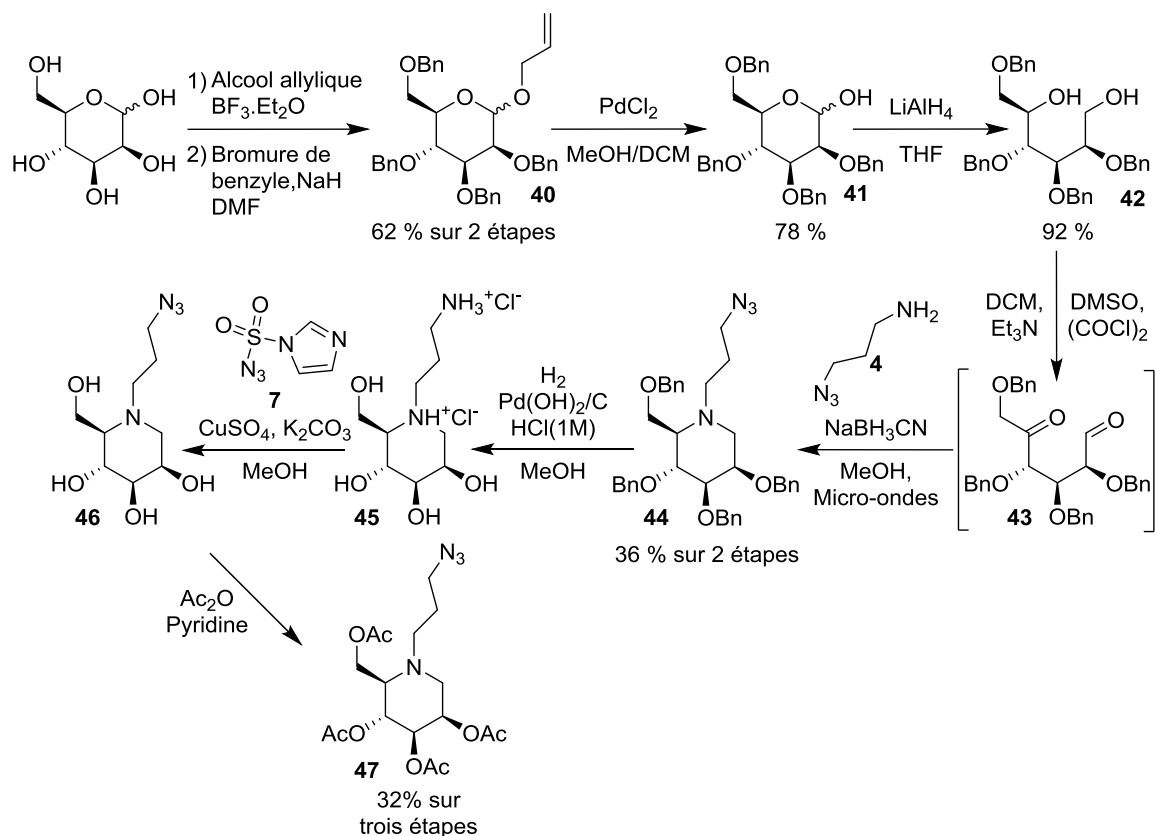


Figure 64 : Synthèse de l'iminosucre **47**

Nous avons obtenu les précurseurs tétrabenzylés de la déoxynojirimycine **48** et de la déoxymannojirimycine **49** par la même voie de synthèse (Figure 65). Ces deux nouveaux composés monovalents nous permettront d'estimer l'impact positif ou négatif de l'alkylation de l'atome d'azote.

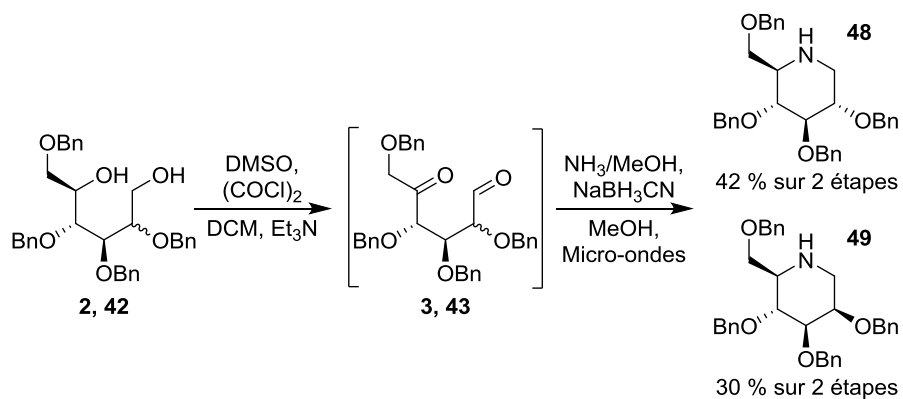


Figure 65 : Synthèse des précurseurs de la DNJ et de la DMJ

II. 2.Fonctionnalisation des charpentes

Afin de quantifier les effets multivalents des glycoclusters à base de DMJ, nous avons employé une référence similaire à celle utilisée dans la première partie, correspondant au couplage CuAAC entre l'iminosucre **47** et l'alcool propargylique.

II.2. 1). Description des dextranses

Les dextrans commerciaux sont composés approximativement de 95% de liaison α -(1,6), le reste étant principalement des ramifications de liaison α -(1,3) et une faible quantité d' α -(1,4).¹⁰³ Il a été montré que les chaînes ramifiées avaient une taille n'excédant pas trois glucoses.¹⁰⁴ Comme les dextrans commerciaux présentent un faible taux de ramifications nous pouvons les assimiler à des polymères linéaires. Par exemple, le dextrane de plus grande taille que nous avons utilisé possède une masse moléculaire moyenne (\bar{M}_w) de 48600 Da, il est donc constitué de 300 unités glucosidiques ($\bar{M}_w/162$ [masse approximative d'une unité saccharidique dans un polymère]). Ainsi, seulement quinze glucoses sur 300 sont ramifiés dans ce polymère (Figure 66a). Ils sont synthétisés grâce à des glucane-saccharases, enzymes bactériennes qui catalysent le clivage du saccharose, puis entraînent l'auto-condensation des motifs glucoses.

Pour les dextrans présentant des ramifications α -(1,2) (Figure 66b), la transglucosidase α -(1,2), GBD-CD2, a été utilisée sur des dextrans linéaires. GDB-CD2 est une enzyme qui possède la capacité d'effectuer la rupture de liaison d'un motif saccharidique et de transférer le résidu glucosyl sur un accepteur.¹⁰⁵

103. (a) J. C. Rankin, A. Jeanes, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 4435-4441.(b) J. W. Van Cleve, W. C. Schaefer, C. E. Rist, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 4435-4438.

104. (a) B. Lindberg, S. Svensson, *acta.chem.scand.* **1968**, 22, 1907-1912. (b) O. Larm, B. Lindberg, S. Svensson, *Carbohydr. Res.* **1971**, 20, 39-48.

105. (a) Y. Brison, E. Fabre, C. Moulis, J. C. Portais, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 86, 545-554. (b) S. R. Sarbini, S. Kolida, T. Naeye, A. Einerhand, Y. Brison, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, G. R. Gibson, R. A. Rastall, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 77, 5307-5315.

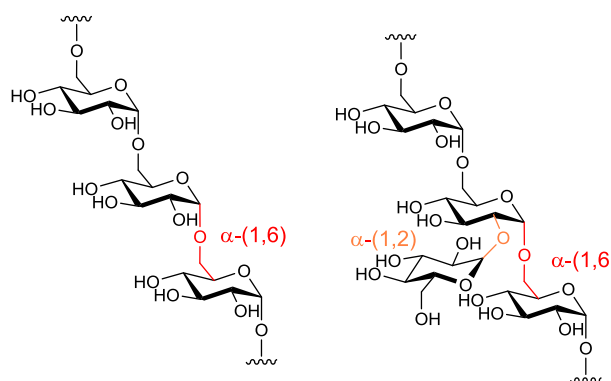


Figure 66 : Représentation d'un dextrane (a) commercial, (b) ramifié en α -(1,2)

Par la suite, nous approximerons le nombre de groupement hydroxyle à trois pour chaque motif de répétition du polymère. En effet, un sucre de la chaîne linéaire non ramifié aura trois hydroxyles libres, contrairement à un sucre ramifié qui n'en aura que deux. Cette différence est compensée par les quatre hydroxyles fonctionnalisables du sucre terminal de la ramification (Figure 66a). Ainsi, la valence moyenne de la charpente reste inchangée.

Dans le Tableau 9 sont présentés les masses moléculaires moyennes, le degré de polymérisation moyen (\overline{DP}_n), ainsi que le nombre de ramification moyen α -(1,2) des dextranses de départ que nous avons sélectionnés comme charpentes pour évaluer le rôle de la valence.

Polymère de départ	Masse moléculaire moyenne (\overline{M}_w en Da)	\overline{DP}_n	Nombre de ramification α -(1,2)
Dextrane 1 kDa	1225	7	-
Dextrane 1 kDa + 32 % α -(1,2)	1 493	6	3
Dextrane 5 kDa	5220	32	-
Dextrane 6 kDa + 33 % α -(1,2)	8 955	37	18
Dextrane 12 kDa	11600	72	-
Dextrane 25 kDa	23800	147	-
Dextrane 50kDa	48600	300	-

Tableau 9 : Présentation des caractéristiques des différents dextranses de départ

II.2. 2). Réaction de propargylation

Pour fonctionnaliser les charpentes, nous avons utilisé une méthode d'alkylation biphasique déjà décrite pour la fonctionnalisation d'arabinogalactane par Grischenko *et coll.*¹⁰⁶ Le polymère est solubilisé dans une solution aqueuse basique, à laquelle est ajoutée une solution de bromure de propargyle dans du toluène (Figure 67). Les auteurs ont montré que lorsque ces réactions sont effectuées en présence d'un catalyseur de transfert de phase, le degré de substitution ainsi que le rendement de la réaction étaient fortement augmentés. Nous avons donc rajouté une quantité catalytique de chlorure de triéthylbenzylammonium (TEBAC) dans toutes les synthèses.

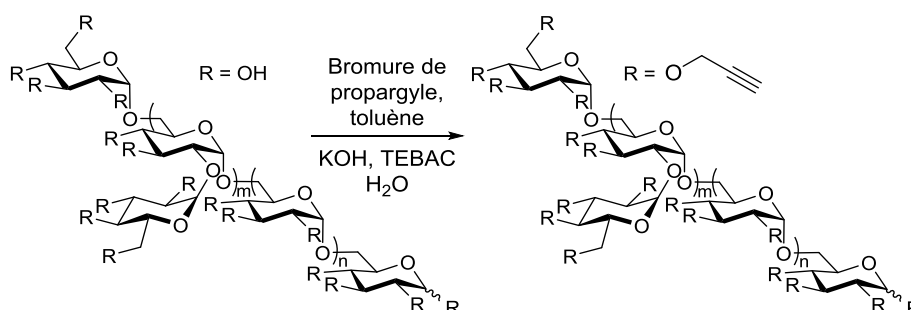


Figure 67 : Protocole général de fonctionnalisation des dextranses

Il est ensuite possible de contrôler la réaction par RMN en intégrant les signaux caractéristiques des protons anomériques et ceux des protons acétyléniques (Figure 68). Prenons comme exemple le composé **55** qui est l'équivalent propargylé du dextrane 1kDa 30% de ramification α -(1,2). Celui-ci est composé de neuf sucres, dont deux terminaux (soit 4 hydroxyles par sucre), et sept internes (soit 3 hydroxyles par sucre), il aura alors 29 groupements propargyliques une fois la réaction effectuée. Le spectre proton obtenu à une fréquence de 400 MHz nous montre que pour une intégration de 9 protons anomériques, nous trouvons 29 protons acétyléniques soit une complète alkylation.

106. L. A. Grischenko, L. N. Parshina, L. V. Kanitskaya, L. I. Larina, L. N. Novikova, B. A. Trofimov, *Carbohydr. Res.* **2013**, 376, 7-14.

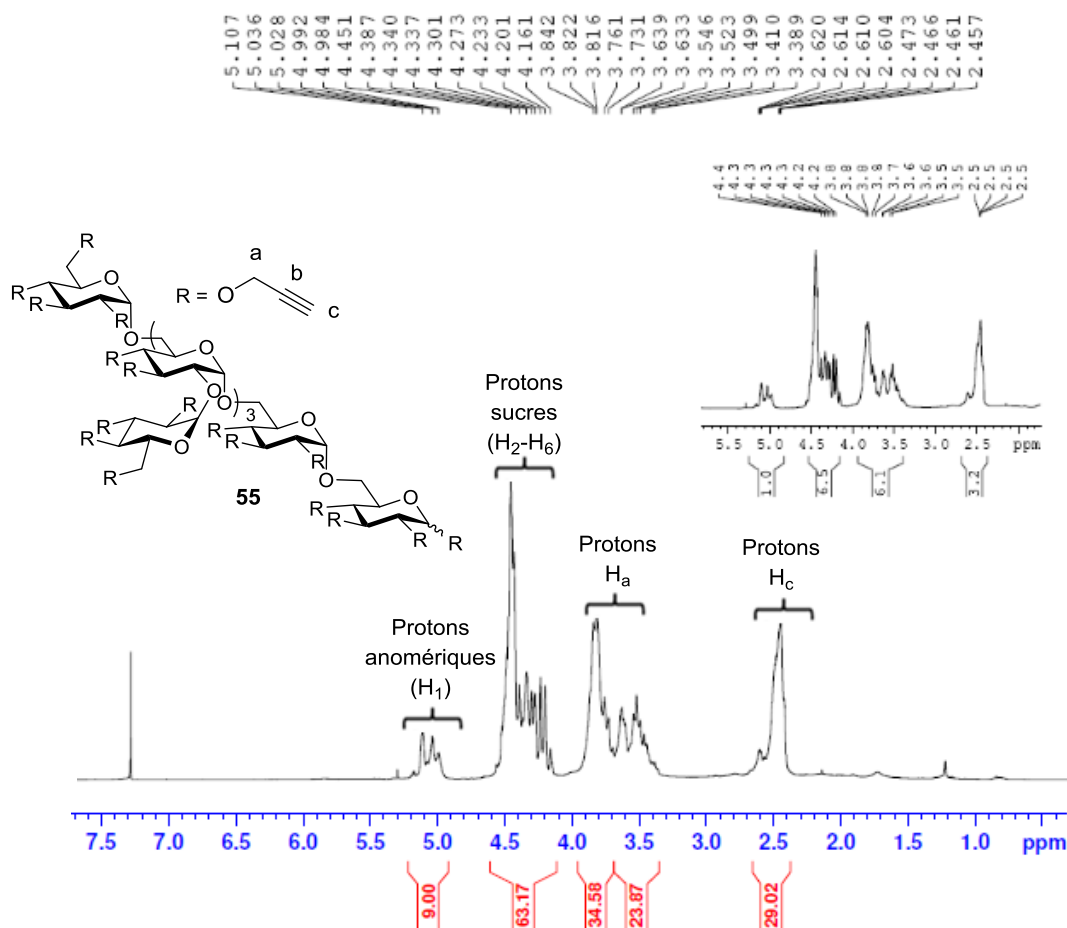


Figure 68 : Spectre RMN d'un dextrane fonctionnalisé

De la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a également confirmé la présence de groupements propargyles sur les dextrans (Figure 69a). Des pastilles de KBr, qui n'absorbent pas dans l'infrarouge moyen, en mélange avec le produit donnent les bandes d'absorption caractéristiques à 3293 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$) et à 2118 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$).

Toutefois, il est difficile de dire si la bande de vibration enregistrée aux environs de 3400 cm^{-1} est due à des alcools libres restant sur le dextrane ou si elle est due à des absorptions parasites provenant de traces d'eau contenue dans le KBr.

Pour contourner ce problème, des spectres IR ont été enregistrés en solution dans du CCl_4 anhydre dans des cuves en fluorine (CaF_2). Un premier spectre de solvant est d'abord effectué puis soustrait aux spectres des échantillons, pour limiter l'absorption du solvant. La compensation n'étant pas toujours parfaite, nous avons choisi le CCl_4 comme solvant puisqu'il n'absorbe pas dans la zone qui nous intéresse, à savoir $2700\text{-}3600$.

Le spectre obtenu ne montre que le pic aux environs de 3300 cm^{-1} sans pic parasite (Figure 69b).

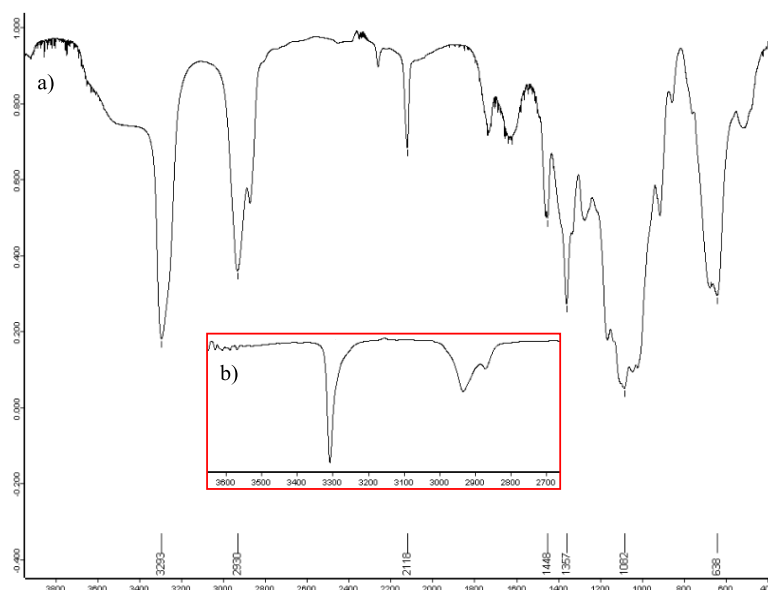


Figure 69 : Spectre infrarouge du composé **55** (a) pastille KBr, (b) en solution dans le CCl_4

Le Tableau 10 présente les charpentes dextrans alkyles avec les différents rendements de réaction.

Dextrans ultravalents linéaires	Dextrans ultravalents ramifiés en α -(1,2)
<p> 50 : $n = 5$; 63% 51 : $n = 30$; 68% 52 : $n = 70$; 67% 53 : $n = 145$; 78% 54 : $n = 298$; 79% </p>	<p> 55 : $n = 1, m = 3$; 65% 56 : $n = 17, m = 18$; 77% </p>

Tableau 10 : Représentation des différentes charpentes ultravalentes

Les rendements déterminés ne prennent pas en compte les différents degrés de substitution moyens. Le degré de substitution moyen correspond au nombre de propargyles greffés par unité saccharidique, ainsi plus il se rapproche de la valeur 3, plus le degré de substitution est important.

Les rendements d'alkylation présentés sont déterminés en estimant que l'alkylation est totale, $\overline{DS} = 3$. Nous pouvons constater sur la Figure 13 que cette approximation est

assez juste même pour les polymères de haute densité. En effet, le composé **53** ($\overline{DP}_n = 147$) a un pic caractéristique de protons acétyléniques intégrant pour 2.9 en fixant la valeur d'intégration des pics des protons anomériques à 1.

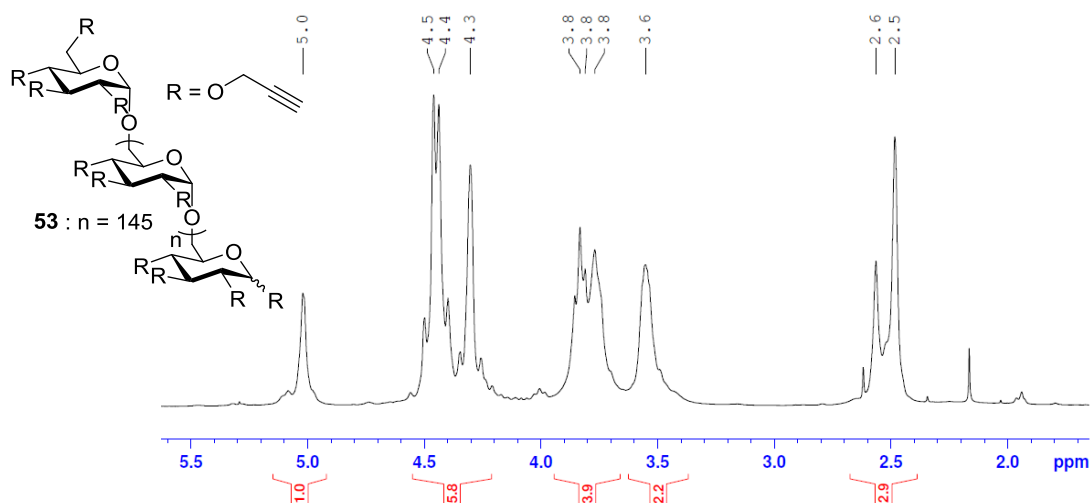


Figure 70 : Spectre RMN du dextrane **53**

II. 3. Greffage des iminosucres sur les charpentes

II.3. 1). Cycloaddition 1,3 dipolaire cupro-catalysée

Toutes les réactions de chimie click ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, à savoir dans un mélange eau/dioxane en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium à 80 °C. Ainsi, la cycloaddition entre l'iminosucre **47** et l'alcool propargylique permet l'obtention du composé **57** précurseur protégé de la référence monovalente en version DMJ (Figure 71).

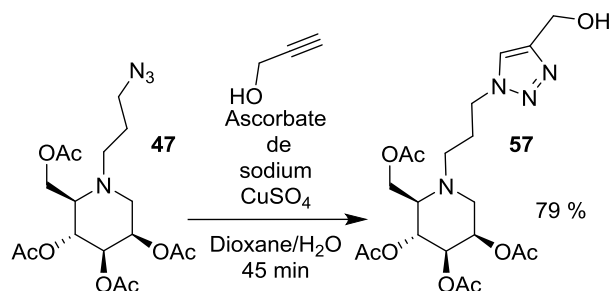


Figure 71 : Réaction de couplage CuAAC entre l'iminosucre **45** et l'alcool propargylique

Un composé tétravalent a également été synthétisé avec l'iminosucre **47** afin d'augmenter la gamme d'étude sur la valence. Le composé **47** est alors engagé avec la charpente galactoside **16**, fournissant ainsi le cycloadduit **58**.

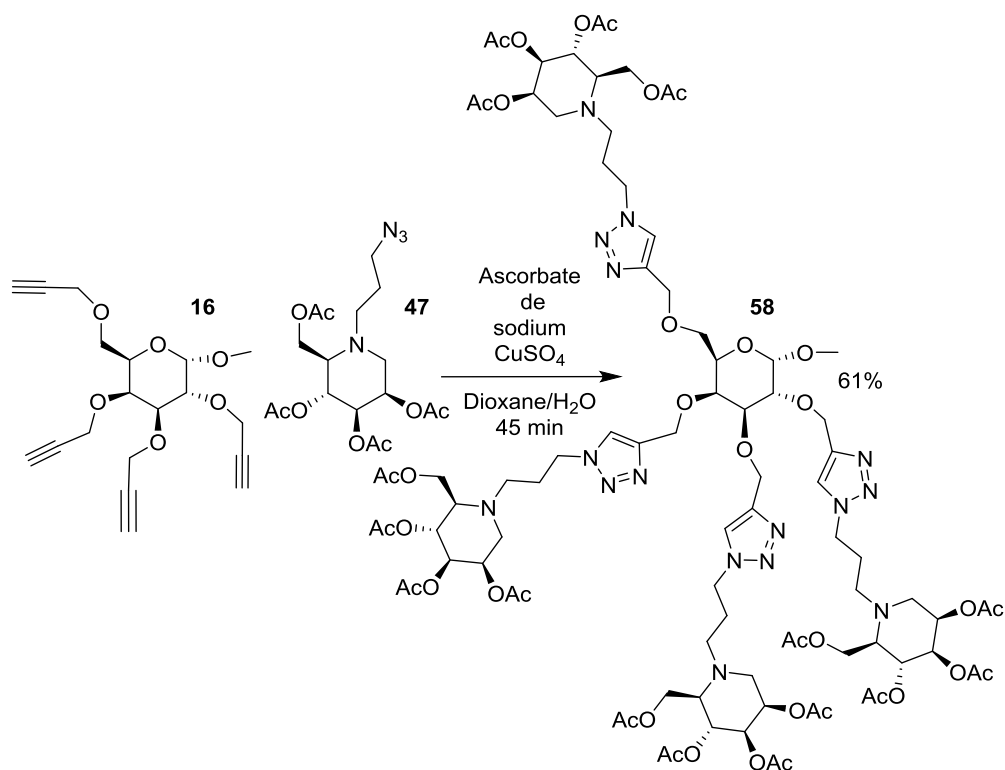


Figure 72 : Réaction de couplage CuAAC entre l'iminosucre **47** et la charpente galactoside **16**

Finalement, tous les composés polymériques ont été engagés dans deux CuAAC successives de 45 minutes avec les iminosucres fonctionnalisés **9** ou **47**. Le Tableau 11 présente les différents composés obtenus ainsi que les rendements de réaction.

Dextranes ultravalents linéaires	Dextranes ultravalents ramifiés en α -(1,2)
<p>R = </p> <p>59 : n = 5 ; 58% 60 : n = 30 ; 55% 61 : n = 70 ; 66% 62 : n = 145 ; 64% 63 : n = 298 ; 50%</p>	<p>R = </p> <p>64 : n = 1, m = 3 ; 55% 65 : n = 17, m = 18 ; 52%</p>

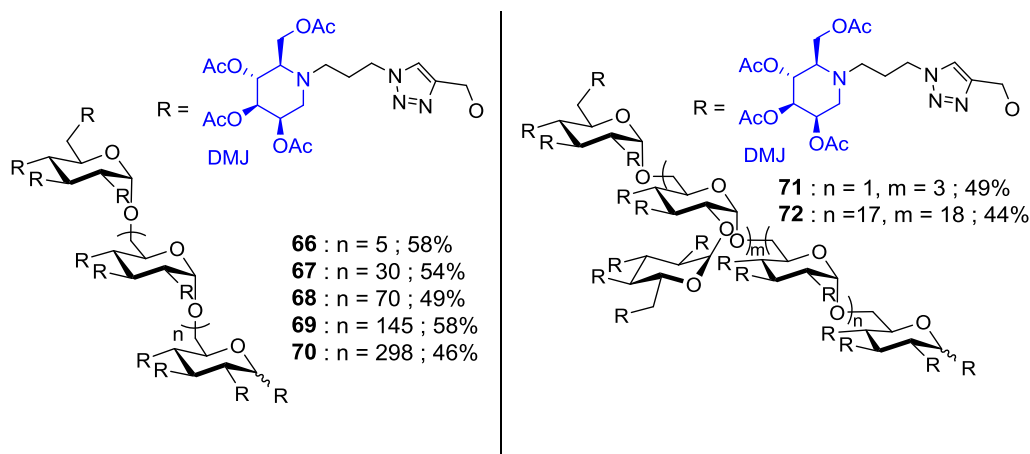


Tableau 11 : Représentation des différents glycoconjugués ultravalents obtenus par chimie click avec les composés **9** et **47**

Comme pour les dextrans propargylés, il est possible de vérifier que le greffage est total par RMN. En effet, les spectres RMN obtenus sur un spectromètre 500 MHz montrent bien une complète disparition du pic acétylénique aux environs de 2,5 ppm, en faveur de pics caractéristiques, comme ceux des triazoles, résultant de la cycloaddition, et ceux correspondant aux iminosucres (Figure 73).

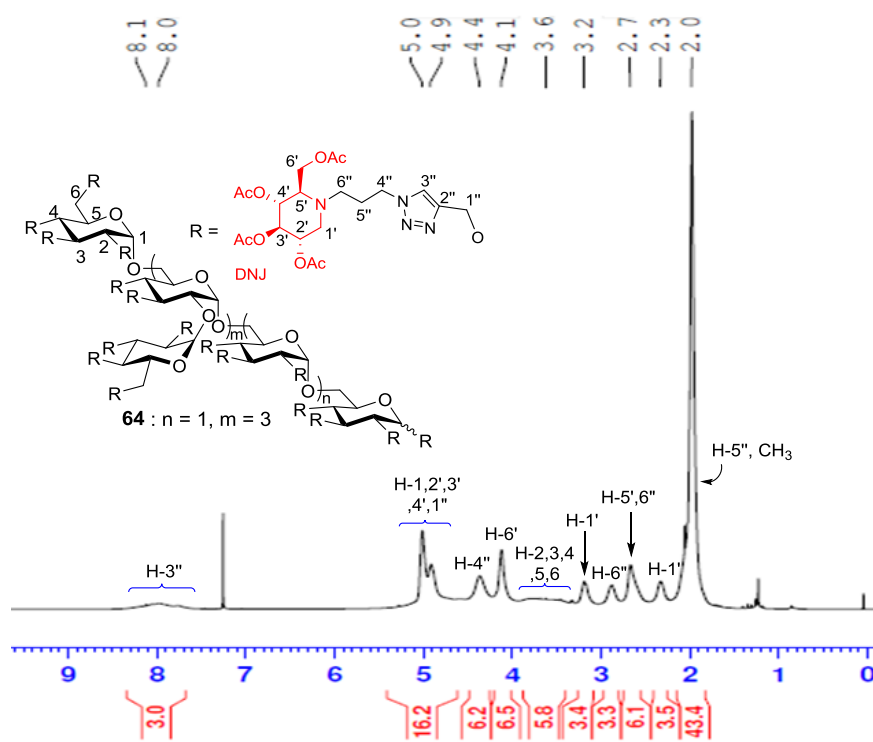


Figure 73 : Spectre RMN proton du cycloadduit **64**

Bien sûr, la taille et la masse de ces composés en font des structures difficiles à analyser, d'où la faible résolution des pics, et la quasi-disparition des protons du squelette

dextrane. Cependant, en accumulant le nombre de scans, nous avons pu obtenir des spectres RMN carbone, qui comme pour le spectre proton, ne montrent plus de pics caractéristiques des carbones d'un groupement propargylique (Figure 74).

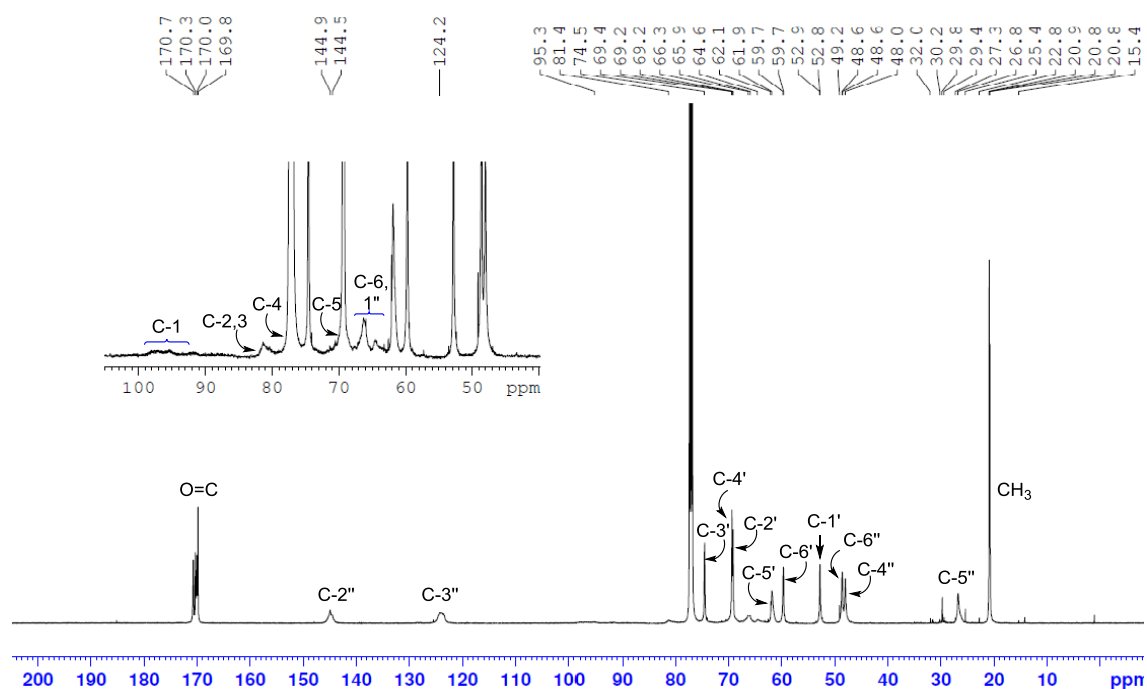


Figure 74 : Spectre RMN carbone du cycloadduit **64**

Des analyses IR en solution dans du CCl_4 ont également montré la disparition de la bande caractéristique du propargyle aux environs de 3300 cm^{-1} .

II.3. 2). Déprotection des iminosucres

Les composés benzylés **48** et **49** ont été engagés dans une réaction d'hydrogénolyse pallado-catalysée, en condition acide, sous atmosphère d'hydrogène, ce qui nous a permis d'obtenir les composés 1-déoxynojirimycine **73** et 1-déoxymannojirimycine **74** (Figure 75).

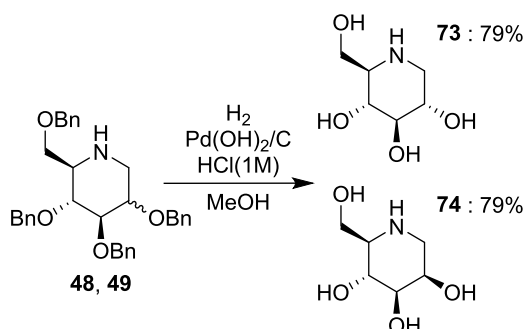


Figure 75 : Structures et rendements de déprotection des composés finaux **73** et **74**

La déprotection des hydroxyles des iminosucres présents sur les ligands **57** et **58** a pu être effectué à l'aide de la même résine basique (Amberlite IRN 78 OH⁻) que pour la déprotection des molécules **29-31**, fournissant ainsi les composés **75** et **76** (Figure 76).

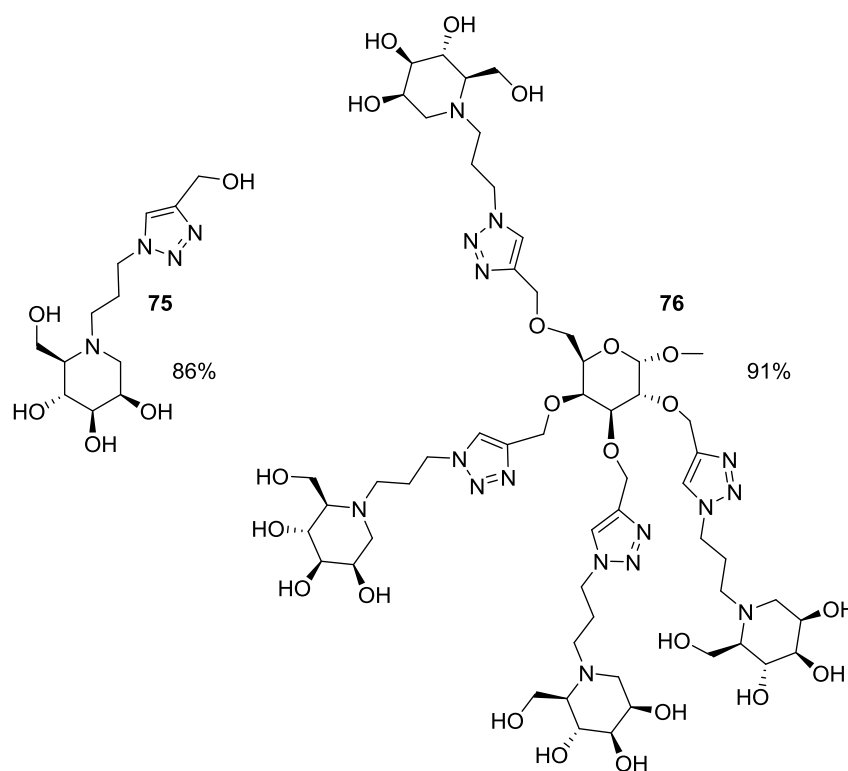


Figure 76 : Structures et rendements de déprotection des composés finaux **75** et **76**

La déprotection des groupements hydroxyles des cycloadduits **59** à **72** selon les mêmes conditions a conduit aux composés **77** à **90**. Ces derniers ont été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique avec une colonne Sephadex G100. Le Tableau 12 présente les structures, les rendements de déprotection obtenus après purification des molécules, ainsi que la valence moyenne de chaque composé (\bar{V}_n).

Dextranes ultravalents linéaires	Dextranes ultravalents ramifiés en α -(1,2)
<p> $R =$ </p> <p> 77 : $n = 5$; 55%, $V_n = 23$ 78 : $n = 30$; 53%, $V_n = 98$ 79 : $n = 70$; 60%, $V_n = 218$ 80 : $n = 145$; 50%, $V_n = 443$ 81 : $n = 298$; 62%, $V_n = 902$ </p>	<p> $R =$ </p> <p> 82 : $n = 1, m = 3$; 45%, $V_n = 29$ 83 : $n = 17, m = 18$; 46%, $V_n = 167$ </p>

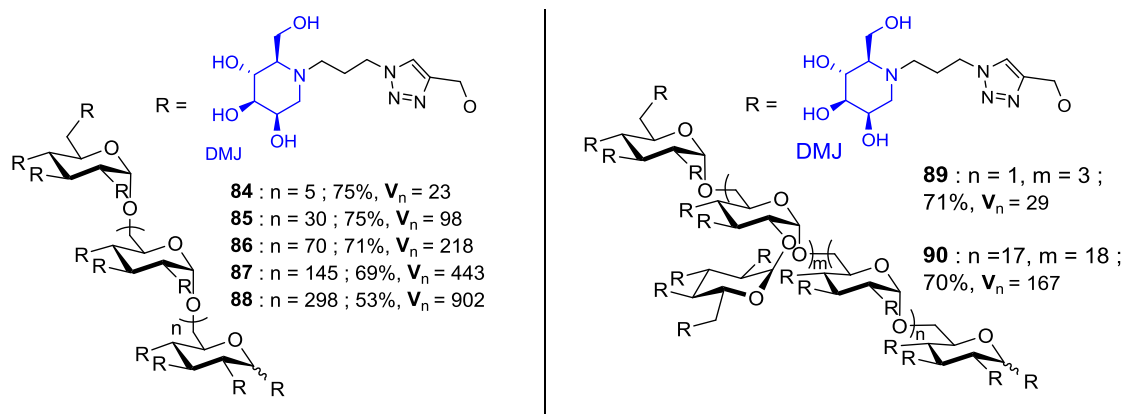


Tableau 12 : Structures et rendements de déprotection des composés ultravalents finaux

Comme le montre la Figure 77, qui correspond au spectre RMN carbone ^{13}C composé **82** obtenu sur un spectromètre 500 MHz, il y a une disparition totale des pics caractéristiques des acétates aux environs de 170 et 21 ppm.

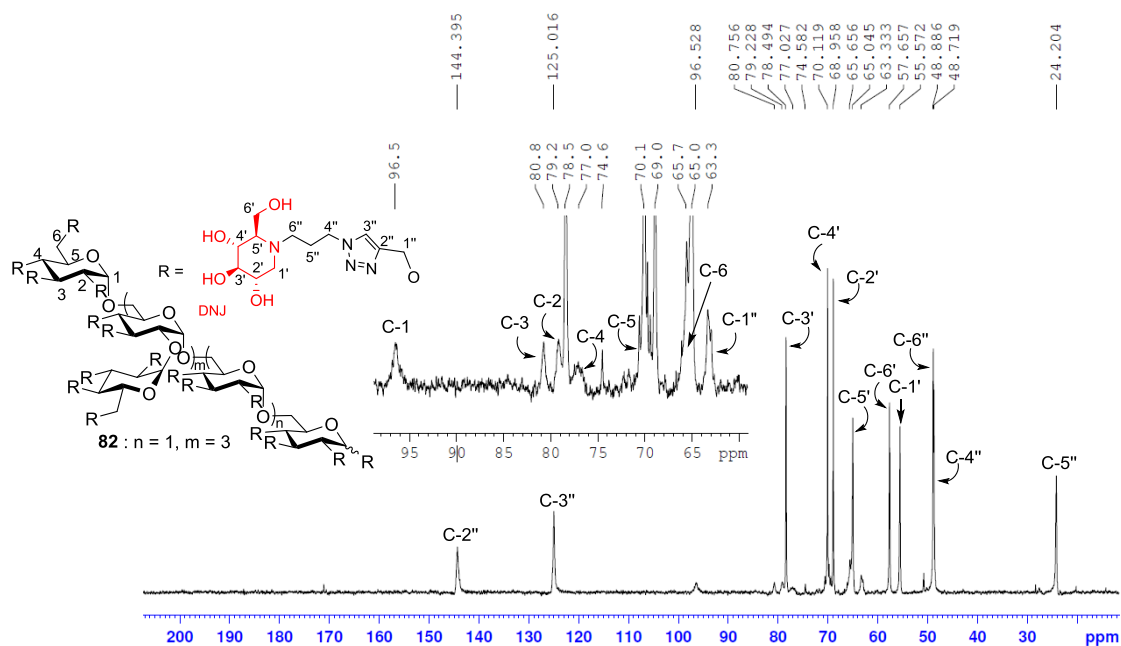


Figure 77 : Spectre RMN ^{13}C du composé ultravalent **82**

Même dans le cas de polymère plus important, comme le composé **80** (Figure 78), il n'y a plus ces pics caractéristiques.

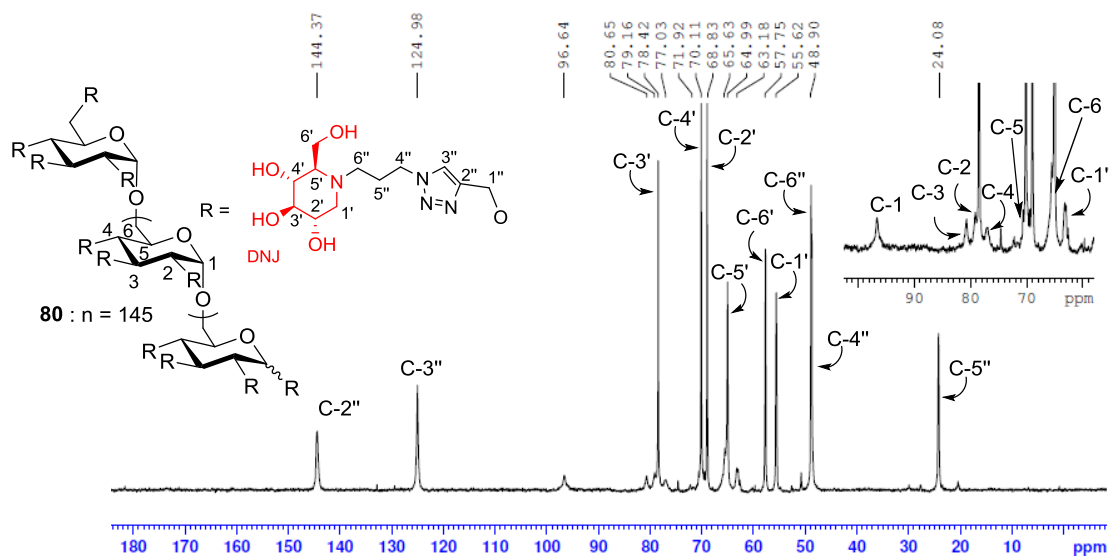


Figure 78 : Spectre RMN ^{13}C du composé ultravalent **80**

III. Résultats biologiques et discussion

III. 1. Evaluation des propriétés inhibitrices des composés ultravalents

Afin d'étudier l'influence de la valence sur l'activité inhibitrice des glycosidases, nous avons testé une série de vingt composés, comportant les quatre références monovalentes (**73**, **74**, **32** et **75**), les deux structures tétravalentes (**36** et **76**) ainsi que les quatorze composés ultravalents (**77** à **90**). Nous disposons ainsi de dix néoglycoconjugués à base de DNJ et de leurs homologues en version DMJ, dont la valence varie de 4 à 900.

L'activité de ces composés a été déterminée sur cinq glycosidases comprenant Jb α man, deux galactosidases recombinantes de la famille GH36 (Tm_ α -gal et AgaB), deux fucosidases recombinantes de la famille GH 29 (Tm_ α -fuc et BI_fuc), ainsi que sur les deux mannosidases recombinantes GMIIb et LManII. Les gènes de ces quatre dernières ont été exprimés dans la bactérie *E.Coli*.

Tm_ α -gal et Tm_ α -fuc sont toutes les deux produites naturellement par la bactérie *Thermotoga maritima*. AgaB et BI_fuc proviennent respectivement des bactéries *geobacillus stearothermophilus* et *bifidobacterium infantis*.

Contrairement à Tm_α-gal¹⁰⁷ et BI_fuc¹⁰⁸ qui sont de nature monomérique, AgaB¹⁰⁹ se présente sous forme d'homotétramère et Tm_α-fuc¹¹⁰ est un hexamère de deux trimères identiques (Figure 79). De plus, chacun des monomères de ces deux glycosidases possède un site catalytique actif.

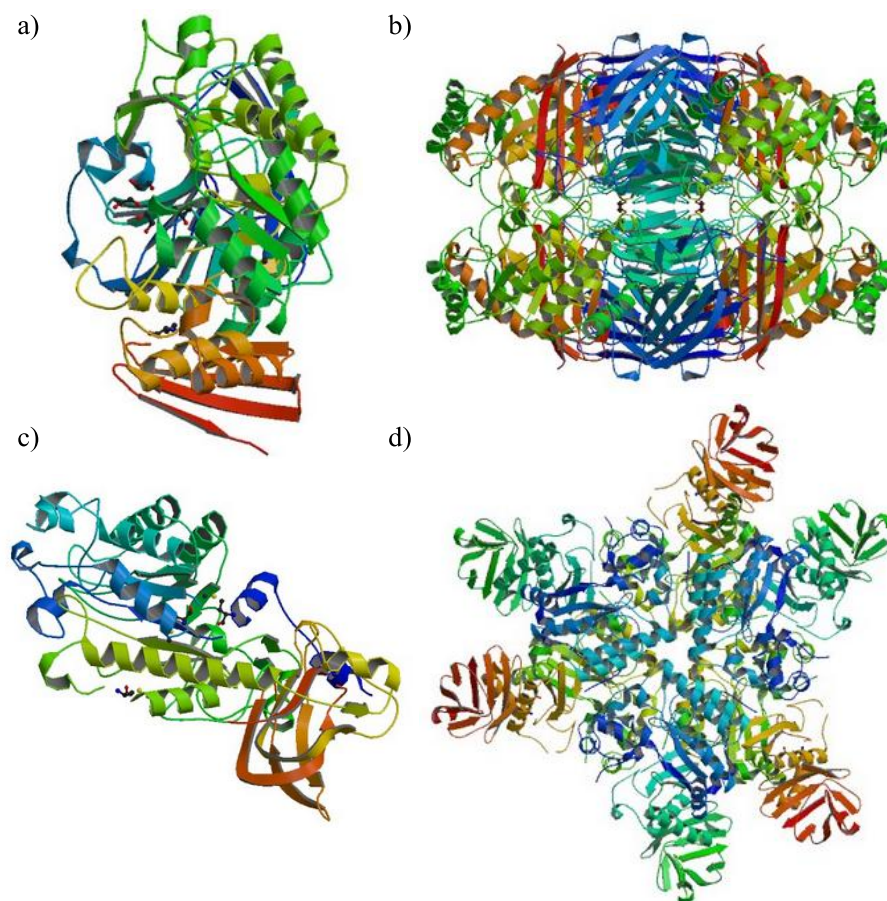


Figure 79 : Structures cristallines des quatre enzymes recombinantes obtenue depuis <http://www.rcsb.org/pdb.org> (a) Tm_α-gal, (b) AgaB, (c) Tm_α-fuc, (d) BI_α-fuc

L'étude de l'activité inhibitrice de nos composés sur ces enzymes, permettra de fournir des renseignements sur l'influence de l'état oligomérique des glycosidases sur l'effet multivalent, que l'on pourra aussi relier à la valence des ligands.

-
107. D. A. Comfort, K. S. Bobrov, D. R. Ivanen, K. A. Shabalin, J. M. Harris, A. A. Kulminskaya, H. Brumer, R. M. Kelly, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3319-3330.
 108. D. A. Sela, D. Garrido, L. Lerno, S. Wu, K. Tan, H.-J. Eom, A. Joachimiak, C. B. Lebrilla, D. A. Mills, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *78*, 795-803.
 109. R. Merceron, M. Foucault, R. Haser, R. Mattes, H. Watzlawick, P. Gouet, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39642-39652.
 110. G. Sulzenbacher, C. Bignon, T. Nishimura, C. A. Tarling, S. G. Withers, B. Henrissat, Y. Bourne, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13119-13128.

La détermination des K_i a été effectuée par spectrophotométrie en mesurant l'activité d'hydrolyse résiduelle des glycosidases envers leur substrat respectif *o*- ou *p*-nitrophényl-glycoside, ou avec le 2-chloro-*p*-nitrophényl- α -L-fucose pour BI_fuc.

Pour déterminer les concentrations des inhibiteurs durant les tests d'inhibition, la masse molaire moyenne d'une unité saccharidique ($\bar{M}_{\text{ImiDex}} = 1015 \text{g.mol}^{-1}$) a été prise comme référence. Les K_i obtenus correspondent donc au K_i d'un motif de répétition du polymère sur lequel sont greffés trois iminosucres. Ainsi, pour déterminer l'augmentation d'affinité par iminosucre, la valeur AIR est obtenue en divisant le K_i d'une unité par celui du monovalent de référence, puis en divisant de nouveau par trois.

Afin de déterminer si les composés monomériques et ultramériques avaient une activité inhibitrice envers les cinq glycosidases, un test préliminaire Go/No-go a été effectué avec les composés **32**, **36**, **83**, **75**, **76** et **90** sur chacune des enzymes.

III.1. 1). Cas de Jboaman

Les résultats des tests pour Jboaman sont répertoriés dans le Tableau 13. Les composés représentés en rouge sont les dérivés de la DNJ et ceux dérivés de la DMJ sont en bleu. Les valeurs de K_i ainsi que les écarts relatifs sont donnés en μM . Ils ont été déterminé en utilisant la même méthode que dans le chapitre précédent (Figure 57), et correspondent à la moyenne des K_i obtenus sur trois expériences. Tous les composés montrent une inhibition compétitive.

Composé	Nature	$\bar{D}\bar{P}_n$	\bar{V}_n	K_i	AIR	AAI
73	Monovalent	-	1	531 ± 32	-	-
32		-	1	394 ± 28	-	-
36	Multivalent	-	4	49 ± 16	8	2
77		7	23	$2 \pm 0,5$	197	66
82		6	29	$8,3 \pm 0,6$	47	16
78		32	98	$1,89 \pm 0,11$	208	69
83	Ultravalent	37	167	$10,7 \pm 0,6$	37	12
79		72	218	$3,9 \pm 0,8$	101	34
80		147	443	$8,7 \pm 1,2$	45	15
81		300	902	$3,6 \pm 0,88$	109	36

74	Monovalent	-	1	220 ± 29	-	-
75		-	1	167 ± 17	-	-
76	Multivalent	-	4	33 ± 12	5	1
84		7	23	0,7 ± 0,18	239	79
89		6	29	1,4 ± 0,4	119	40
85		32	98	0,75 ± 0,04	223	74
90	Ultravalent	37	167	1,14 ± 0,04	146	49
86		72	218	0,67 ± 0,15	249	83
87		147	443	0,78 ± 0,11	214	71
88		300	902	0,46 ± 0,03	363	121

Tableau 13 : Evaluation des propriétés inhibitrices des composés ultravalents **77-90** avec Jb α man

Tout d'abord, nous pouvons remarquer l'influence positive de l'alkylation de l'atome d'azote endocyclique sur l'inhibition. En effet, les composés **32** et **75** ont des K_i respectifs de 394 et 167 μ M, qui sont inférieurs à leurs homologues non alkylés DNJ et DMJ.

En accord avec les résultats obtenus dans le chapitre précédent, nous constatons que la valeur AAI de tous les composés multivalents est supérieure à 1. Tous les ligands multivalents testés sur Jb α man ont donc montré un effet cluster positif.

Nous observons un gain d'affinité par iminosucre plus important lorsque l'on multi-présente un inhibiteur monovalent possédant une plus faible affinité pour la cible. Le dérivé monovalent de la DNJ **32** à un K_i plus élevé que sa version épimérique **75**, cependant lorsque ces composés sont greffés sur la charpente tétravalente le gain d'affinité par iminosucre reste positif pour les deux composés mais est moins importante dans le cas de la DMJ (AAI(**36**) = 2.0 contre AAI(**76**) = 1.3). Par contre, les composés ultravalents de **84** à **90** ont des valeurs AAI supérieures à leurs analogues DNJ **77** à **83**.

Ces résultats montrent bien la difficulté de dresser des conclusions générales quant aux différents types de charpentes sur l'effet multivalent. Pour les polymères, le greffage d'un ligand plus puissant ne diminue pas l'effet multivalent.

Pour plus de clarté, les valeurs AAI pour tous les composés ont été rapportées dans le Tableau 14.

\bar{V}_n	Polymère	Nature	AAI DNJ	AAI DMJ
4	-	Multivalent	36 : 2	76 : 1
23	Linéaire	Ultravalent	77 : 66	84 : 79
29	Ramifié		82 : 16	89 : 40
98	Linéaire	Ultravalent	78 : 69	85 : 74
167	Ramifié		83 : 12	90 : 49
218	Linéaire	Ultravalent	79 : 34	86 : 83
443	Linéaire		80 : 15	87 : 71
902	Linéaire		81 : 36	88 : 121

Tableau 14 : Augmentation d'affinité par iminosucre observée entre Jb α man et les composés ultravalents

Nous constatons également l'impact négatif de la ramification de la chaîne en α -(1,2) sur l'activité inhibitrice. En effet, les gains d'affinité pour tous les composés ramifiés, qu'ils soient dérivés de la DNJ ou de la DMJ, sont les moins forts de tous ceux observés avec les ligands ultravalents. Des encombrements stériques pourraient expliquer ces phénomènes, diminuant la disponibilité des iminosucres greffés sur ces dextrans. Nous pouvons aussi envisager que la topologie globale des dextrans linéaires et ramifiés soit différente, bloquant dans le cas des ramifiés l'accès à certains iminosucres.

Pour mieux se représenter l'influence de la valence sur l'inhibition, les courbes représentant les gains d'affinité par iminosucre pour les dextrans linéaires en fonction de la valence sont représentées dans la Figure 80. La courbe rouge représente les valeurs AAI pour les composés dérivés de la DNJ, et ceux dérivés de la DMJ sont représentés en bleu.

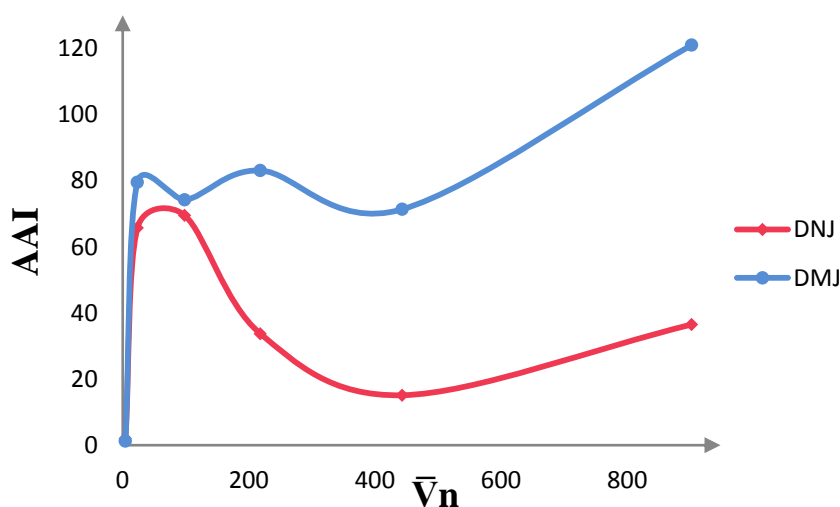


Figure 80 : Courbes représentant les valeurs de gains d'affinité par iminosucre en fonction de la valence des composés ultravalents linéaires

Pour les dérivés DNJ, nous constatons une affinité maximale pour des faibles valences comprises entre 25 et 100. En outre, les gains d'affinité pour les composés **79** et **81** qui ont des valences très éloignées, respectivement de 218 et 902, ont des gains d'affinité relativement proches ($AAI(79) = 34$, $AAI(81) = 36$).

Pour les dérivés DMJ, il semble que pour les dextrans linéaires de **84** à **87** le gain d'affinité soit plus ou moins identique aux alentours d'une valeur AAI de 80. En revanche, une hausse importante d'inhibition a été observée pour le composé **88** de valence 902.

Ce comportement met en lumière l'atteinte rapide d'un pallier dans la valence à partir duquel les composés ont une efficacité identique. Cependant, l'affinité maximale étant observée pour le composé **88**, la synthèse d'inhibiteurs de valence supérieure à 900 pourrait permettre d'accroître encore cet effet multivalent.

Toutefois, dans les deux modèles étudiés (DNJ et DMJ), il semble que les composés à valence modérée constituent un bon compromis, et qu'il est inutile d'envisager des composés polymériques qui induisent au mieux un effet multivalent supérieur modéré.

Comme nous savons que $Jb\alpha$ man est sensible à la présence de cuivre, la concentration de cuivre résiduel a été estimée comme précédemment à l'aide de bandes de dosages Quantofix®, sur cinq composés polymériques linéaires et ramifiés. Malgré des concentrations en cuivre résiduel supérieures aux précédentes, les concentrations restent inférieures au seuil micromolaire nécessaire à l'inhibition de la $Jb\alpha$ man (Tableau 15).⁹⁸

Composé	Polymère	\overline{DP}_n	Ki	ppm de Cu	[Cu] en nM
78	Linéaire	32	1,89	< 300	9,1
83	Ramifié	37	10,7	< 500	85,5
81	Linéaire	300	3,6	< 500	28,8
85	Linéaire	32	0,75	< 300	3,6
90	Ramifié	37	1,14	< 500	9,1

Tableau 15 : Détermination de la quantité de cuivre résiduel

III.1. 2). Cas des galactosidases

α-galactosidase de thermotoga maritima

Tout d'abord le test préliminaire Go/No-go a montré que les composés **75**, **76** et **90** dérivés de la DMJ n'avaient aucune activité inhibitrice pour les galactosidases à une concentration de 1 mM. Ainsi, seuls les composés à base de DNJ ont fait l'objet d'une étude approfondie sur Tm_α-gal. Les résultats de ces tests sont présentés dans le Tableau 16.

Composé	Nature	$\bar{D}\bar{P}n$	\bar{V}_n	K_i	AIR	AAI
73	Monovalent	-	1	$8,1 \pm 0,7$	-	-
32		-	1	960 ± 150	-	-
36	Multivalent	-	4	69 ± 11	14	3
77	Ultravalent	7	23	$7,7 \pm 0,5$	125	42
82		6	29	$15 \pm 1,2$	64	21
78		32	98	$11,4 \pm 0,6$	84	28
83		37	167	53 ± 9	18	6,0
79		72	218	$12,7 \pm 0,7$	76	25
80		147	443	$14,7 \pm 1$	65	22
81		300	902	$14,4 \pm 0,9$	66	22

Tableau 16 : Evaluation des propriétés inhibitrices des composés ultravalents **77-90** avec Tm_α-gal

En premier lieu, nous pouvons remarquer l'impact négatif de l'alkylation de l'atome d'azote endocyclique et de la présence du triazole sur l'inhibition. Avec une constante d'inhibition de 960 μM, le composé **32** est un inhibiteur bien moins puissant que la DNJ **73** ($K_i = 8.1 \mu\text{M}$).

Il est à noter comme le montre la représentation de lineweaver-Burk (Figure 81), que ces inhibiteurs ont un mode d'action incompétitif envers Tm_α-gal, c'est-à-dire que l'inhibiteur ne peut se fixer sur un site secondaire de l'enzyme qu'à partir du moment où celle-ci est complexée au substrat. Nous pouvons alors envisager que l'alkylation de l'atome d'azote empêche ces interactions avec un site secondaire enzymatique. Il est à noter que ce mode d'inhibition reste inchangé pour le composé multivalent.

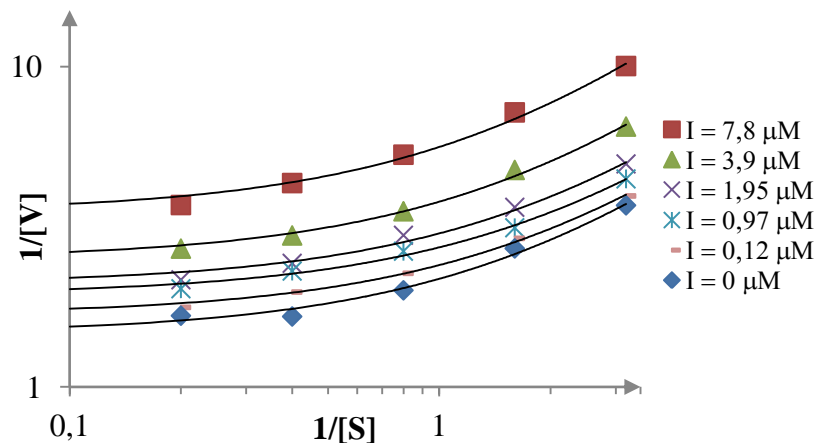


Figure 81 : Représentation de Lineweaver-Burk en échelle logarithmique pour le composé **73** avec Tm_α-gal

Cet effet négatif peut être fortement diminué par la multivalence car tous les composés multivalents montrent des gains d'affinité par iminosucre supérieurs à 1, soit un effet multivalent positif. Cette alpha-galactosidase constitue donc un nouvel exemple d'enzyme sensible à la multivalence.

De plus, comme avec Jb α man, nous constatons que la ramification des dextrans en α -(1,2) diminue fortement l'affinité des composés pour l'enzyme. Là encore, un encombrement stérique pourrait expliquer cette baisse d'affinité.

Les courbes représentant les gains d'affinité par iminosucre pour les dextrans linéaires en fonction de la valence sont représentées dans la Figure 82.

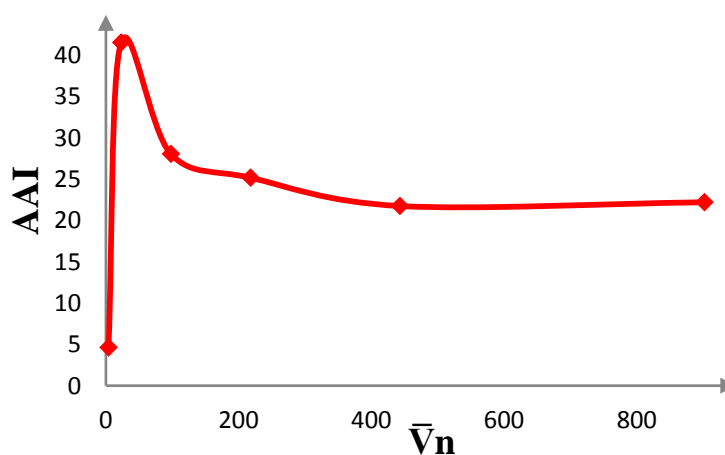


Figure 82 : Courbe représentant les valeurs de gains d'affinité par iminosucre en fonction de la valence des composés ultravalents linéaires

La courbe montre une affinité maximale pour le composé **77** ($\bar{V}_n = 23$) avec une valeur AAI de 42. Ensuite, les composés de valence supérieure diminuent l'activité inhibitrice jusqu'à atteindre un palier d'inhibition, avec une valeur AAI aux environs de 22.

Ce comportement met en lumière que l'inhibition de Tm α -gal par des composés multivalents est envisageable, permettant ainsi d'étendre le concept de l'effet multivalent à d'autres glycosidases que Jb α man. La conception d'inhibiteurs multivalents sélectifs de faible valence pourrait alors être une stratégie intéressante pour l'inhibition de ce type d'enzyme.

Lors des évaluations biologiques, nous avons également observé un comportement particulièrement intéressant des composés multivalents. En effet, à partir d'une certaine concentration, le composé n'inhibe plus l'activité de l'enzyme mais a plutôt tendance à l'activer. La Figure 83a représente les régressions non linéaires de la vitesse de libération du PNP-gal en fonction de la concentration en substrat pour différentes concentrations en inhibiteur. Elle montre que pour des concentrations en composé tétravalent **36** comprises entre 500 et 30 μ M, la vitesse maximale est toujours inférieure à la vitesse sans inhibiteur. Toutefois, pour une concentration de 8 μ M en inhibiteur, la vitesse n'atteint pas l'asymptote attendue et est supérieure à la courbe sans inhibiteur. Pour confirmer ses résultats, d'autres tests ont été effectués en abaissant la concentration du ligand tétravalent **36**. Nous constatons que pour toutes les concentrations en composé **36**, la vitesse maximale est supérieure à la vitesse obtenue sans inhibiteur, sauf pour une concentration de 30 μ M qui était une concentration inhibitrice dans la Figure 83a.

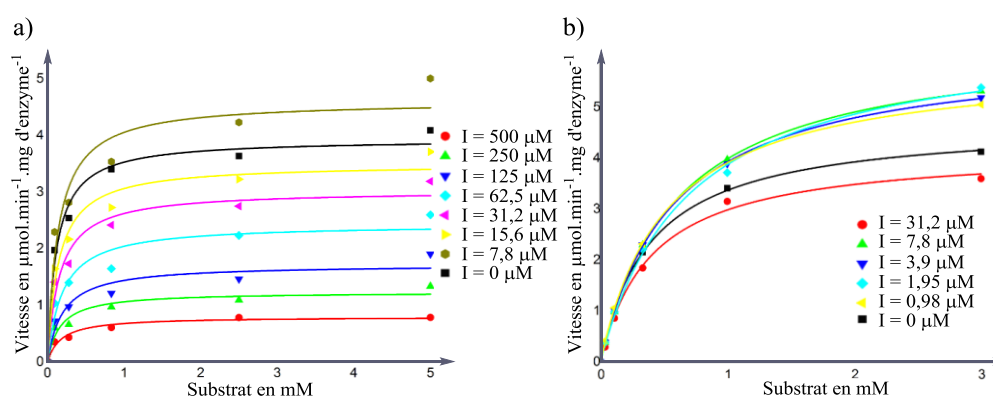


Figure 83 : Courbes de la vitesse de libération du PNP-gal en fonction de la concentration en substrat en présence de l'inhibiteur **36** (a) Concentration élevée en inhibiteur, (b) faible concentration en inhibiteur

De plus, comme le montre la Figure 84, des tests d'inhibition sur les composés monovalents avec une gamme de concentration encore plus faible ont uniquement révélé un caractère d'inhibition.

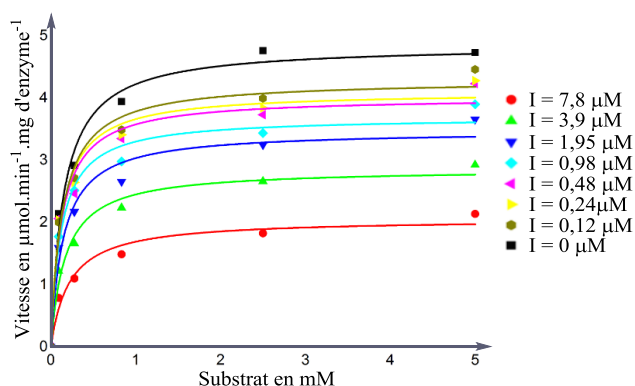


Figure 84 : Courbes de la vitesse de libération du PNP-gal en fonction de la concentration en substrat pour Tm_α-gal en présence de l'inhibiteur **73**

Ce constat nous indique que les inhibiteurs multivalents peuvent être, en fonction de la concentration utilisée, soit des inhibiteurs, soit des activateurs de la catalyse enzymatique. Cet effet, qui n'avait pas été rapporté auparavant est particulièrement intéressant, puisqu'il permet de moduler l'activité enzymatique.

α-galactosidase B de geobacillus stearothermophilus

Le cas de l'AgaB est également complexe, car les tests préliminaires Go/No-go ont aussi révélé les mêmes caractères que pour la Tm-α-gal. Ainsi, l'évaluation des comportements activateur/inhibiteur sur cette enzyme a été étudiée que pour quelques composés sur cette enzyme. Comme le montre le Tableau 17, les composés monovalents **73** et **32** à base de DNJ n'ont pas eu d'effet inhibiteur à une concentration de 2 mM.

Composé	Nature	\overline{DP}_n	\overline{V}_n	Comportement
73	Monovalent	-	1	p.i.
32		-	1	p.i.
74		-	1	Activation
75		-	1	Activation
36	Multivalent	-	4	Activation
76		-	4	Activation
80	Ultravalent	147	443	Activation
82		6	29	Activation
83		37	167	Activation
87		147	443	Activation
89		6	29	Activation
90		37	167	Activation

Tableau 17 : Evaluation des comportements inhibiteur/activateur de quelques composés ultravalents sur AgaB

En revanche, leurs homologues DMJ **74** et **75**, ont montré une activation non négligeable qui semble dépendre de la concentration. En effet, plus la concentration de l'inhibiteur est importante plus l'activation paraît importante.

De façon intéressante, les deux composés tétravalents **36** et **76** ont aussi montré ce caractère activateur envers l'AgaB. Afin de mieux appréhender ce phénomène, la vitesse de transformation du substrat (k_{cat}) a été déterminée pour différentes valeurs de concentrations en inhibiteur. Ensuite, cette valeur a été divisée par la valeur k_{cat} sans inhibiteur, ce qui permet de voir aisément le comportement activateur/inhibiteur des composés tétravalents, car toute valeur supérieure à 1 indique une activation (Figure 85a). Nous constatons que le composé **36** a le même comportement envers AgaB que pour Tm_α-gal, avec une inhibition pour les fortes concentrations et une activation pour les faibles. En revanche, le composé à base de DMJ **76** montre uniquement une activité, qui croît avec l'augmentation de la concentration.

Cette augmentation de vitesse est compréhensible pour le composé **76**, qui n'est autre qu'une version tétravalente du composé monovalent activateur **75**. Toutefois, le ligand **36**, qui multi-présente le composé monovalent **32** qui n'est ni activateur ni inhibiteur, est également activateur. La multivalence est donc directement responsable de cet effet.

Cela conforte notre hypothèse précédente qui suppose que les inhibiteurs multivalents peuvent être des activateurs de la catalyse enzymatique à une concentration limite.

Tous les composés ultravalents testés ont montré le même caractère activateur envers AgaB qui dépend de la concentration. Nous avons tracé la même courbe que précédemment pour les composés **83** et **90** et nous constatons bien une activation dépendante de la concentration (Figure 85b). Dans le cas du composé **83**, nous remarquons que la vitesse de transformation du substrat atteint un pallier, qui est plus de 2 fois supérieure à la vitesse obtenue sans inhibiteur.

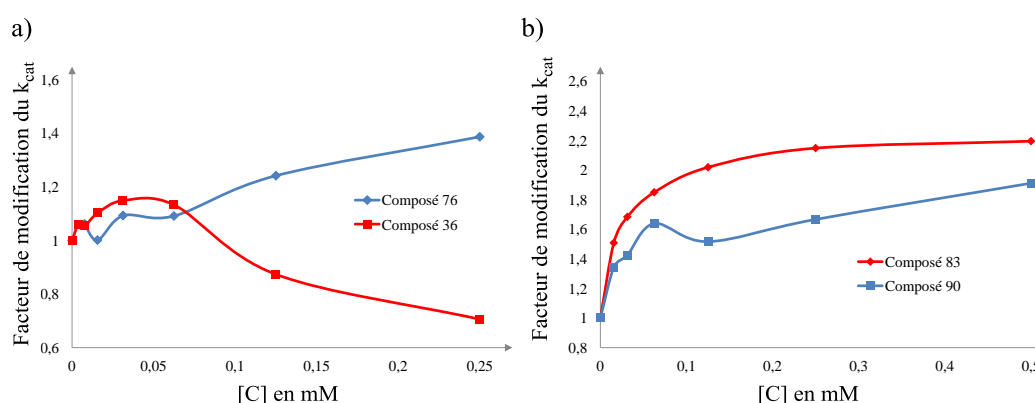


Figure 85 : Modulation du k_{cat} en fonction de la concentration en composé, (a) **73** et **36**, (b) **83** et **90**

III.1. 3). Cas des fucosidases

α -L-fucosidase de bifidobacterium infantis.

Sur cette enzyme les activités inhibitrices de tous les composés se sont révélées mauvaises. Comme le montre le Tableau 18, les deux composés monovalents **32** et **75** n'offrent pas une inhibition suffisante pour pouvoir être déterminée. Pour les composés tétravalents, seule la version DNJ a montré un caractère d'inhibition intéressant qui s'efface totalement avec les composés de plus haute valence.

En effet, aucun des composés ultravalents n'était effecteur de l'activité enzymatique.

Composé	Nature	$\bar{D}\bar{P}_n$	\bar{V}_n	Comportement
32	Monovalent	-	1	n.d.
75		-	1	n.d.
36	Multivalent	-	4	129 ± 9
76		-	4	p.i.
80	Ultravalent	147	443	p.i.
82		6	29	p.i.
83		37	167	p.i.
87		147	443	p.i.
89		6	29	p.i.
90		37	167	p.i.

Tableau 18 : Evaluation des comportements inhibiteur/activateur de quelques composés ultravalents sur BI_fuc

*α -L-fucosidase de *thermotoga maritima**

L'évaluation du comportement activateur/inhibiteur sur Tm_α-fuc a été effectuée avec les mêmes composés que ceux utilisés avec BI_fuc. Au cours des tests, un problème récurrent avec les faibles concentrations en substrat ne nous a pas permis de déterminer avec précision les K_i des composés **32**, **75** et **36**, ne nous donnant qu'une tendance de leurs comportements (Tableau 19).

Composé	Nature	$\bar{D}\bar{P}_n$	\bar{V}_n	Comportement
32	Monovalent	-	1	inhibition
75		-	1	inhibition
36	Multivalent	-	4	inhibition
76		-	4	p.i.
80	Ultravalent	147	443	Activation
82		6	29	Activation
83		37	167	Activation
87		147	443	Activation
89		6	29	Activation
90		37	167	Activation

Tableau 19 : Evaluation des comportements inhibiteur/activateur de quelques composés ultravalents sur Tm_a-fuc

Toutefois, nous pouvons quand même dire que les ligands monovalents **32** et **75** sont des inhibiteurs qui ne montrent aucun caractère activateur. La version tétravalente **76**

du composé **75** n'a révélé ni activation ni inhibition, mais comme avec la Tm_α-gal le glycoconjugué **36** est inhibiteur pour des concentrations supérieures à 30 μM et est activateur pour des concentrations plus basses (Figure 86a). Finalement, tous les composés ultravalents ont révélé une augmentation de la vitesse de libération du PNP-galactose (Figure 86b).

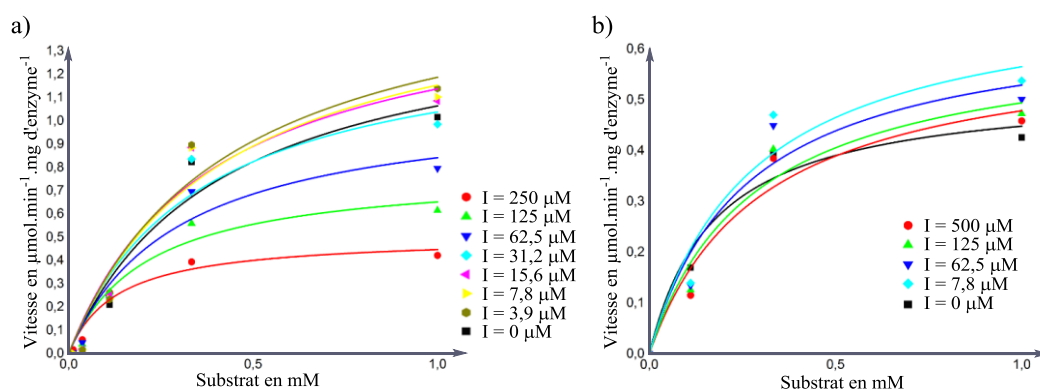


Figure 86 : Courbes de la vitesse de libération du PNP-gal en fonction de la concentration en substrat pour Tm_α-fuc en présence de l'inhibiteur (a) **36**, (b) **83**

III.1. 4). Cas des mannosidases GMIib et LManII

Suite à des problèmes durant la synthèse de ces protéines, l'évaluation des activités de nos composés n'a pas encore pu avoir lieu. Les futurs résultats nous permettront de statuer sur l'influence de la valence envers des homologues de mannosidases humaines.

III. 2. Hypothèse sur l'activation

Pour résumer les différents caractères inhibiteur/activateur observés pour chacune des enzymes, excepté BI_fuc, nous avons tracé la vitesse de libération du PNP en fonction de la concentration en composé ultravalent **83** pour une concentration fixe en substrat (Figure 87). Nous remarquons le caractère exclusivement inhibiteur de nos composés vis-à-vis de Jbαman, car plus la concentration en composé est élevée plus l'activité enzymatique diminue. En revanche, il se comporte comme un activateur de l'activité enzymatique envers AgaB. Cette activité est plus importante pour les concentrations les plus élevées en composé. Dans le cas de Tm_α-fuc, il y a aussi une activation de la catalyse enzymatique, mais contrairement à AgaB, cette activité décroît avec l'augmentation de la concentration. Enfin, nous avons remarqué sur Tm_α-gal qu'en

fonction de la concentration en composé, les deux phénomènes d'activation et d'inhibition peuvent être visibles.

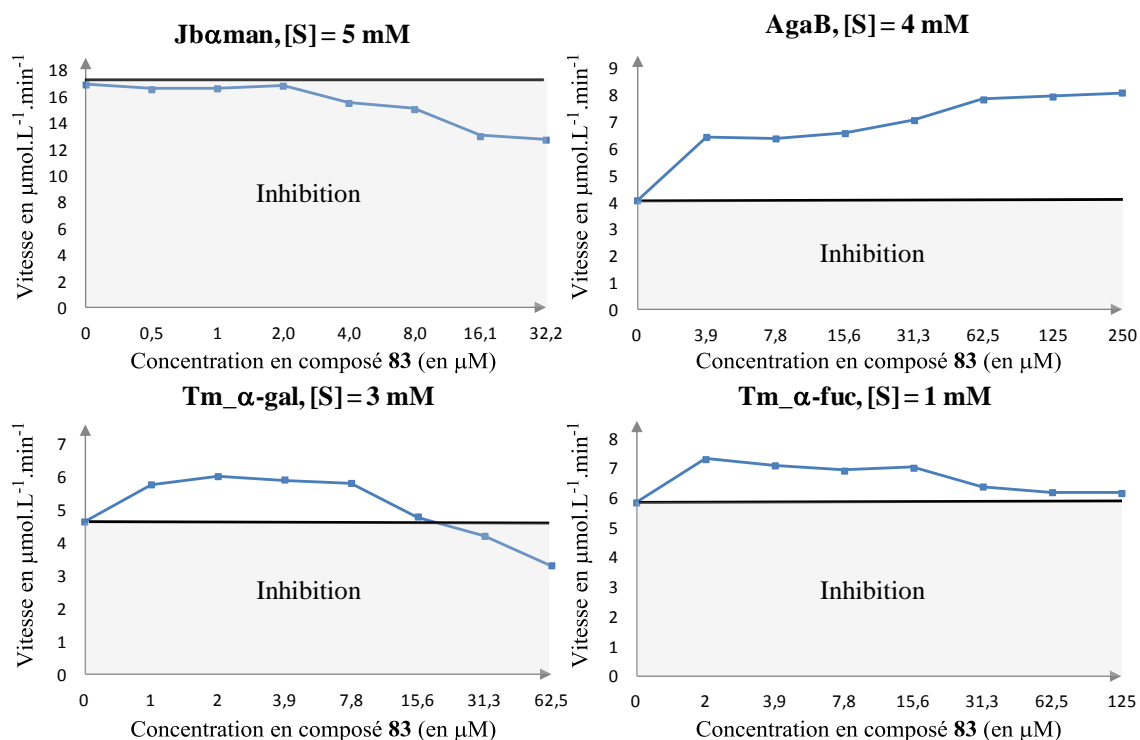


Figure 87 : Différents comportements inhibiteur/activateur observés sur les quatre enzymes avec le composé 83

Nous envisageons plusieurs hypothèses pour décrire les phénomènes d'activations que nous avons observés.

La première est que les composés de taille importante se comporteraient comme des effecteurs allostériques. Dans ce cas, la fixation du ligand pourrait entraîner une modification de l'arrangement spatiale des glycosidases facilitant alors l'accès aux autres sites catalytiques pour le substrat. Il s'en suivrait une diminution de temps du processus catalytique et donc une augmentation de vitesse de libération de l'aglycone.

Récemment, les travaux de Ling *et coll.* ont mis en évidence des augmentations d'affinité, grâce à l'immobilisation de nombreuses protéases possédant une étiquette polyhistidine (tag-histidine) à la surface d'une nanoparticule de Nickel.¹¹¹ Les auteurs ont constaté une activité catalytique augmentée de 60% par rapport aux protéases libres en solution, qu'ils attribuent à un effet de concentration locale.

111. D. Ling, L. Gao, J. Wang, M. Shokouhimehr, J. Liu, Y. Yu, M. J. Hackett, P.-K. So, B. Zheng, Z. Yao, J. Xia, T. Hyeon, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 7916-7921.

Nous pouvons envisager pour les glycosidases multimériques la formation de clusters enzymatiques, dans lesquels l'attache simultanée de plusieurs enzymes sur un même composé permettrait d'accroître la vitesse de catalyse.

Une autre hypothèse se base sur le fait que les trois enzymes qui ont montré une hausse d'activité enzymatique possèdent à la fois la capacité d'hydrolyser un lien osidique mais aussi de transférer un monosaccharide vers un accepteur. Il serait donc possible que les hydroxyles des iminosucres de composés jouent le rôle de ces accepteurs. Dans le cas de l'AgaB qui possède un fort taux de transfert, la dépendance en concentration observée est assez caractéristique d'un phénomène de transglycosylation. En effet plus la concentration en ligand est importante plus l'activation est élevée. Nous pouvons envisager que nos ligands se fixent dans un site enzymatique +1 après le départ de l'aglycone PNP du site catalytique, favorisant ainsi le processus de transglycosylation.

112

De plus, ces enzymes peuvent aussi effectuer l'auto-condensation du substrat. C'est-à-dire que l'enzyme transfère un monosaccharide, libéré durant la réaction, sur un autre en formant le disaccharide correspondant. Nous pouvons alors envisager qu'une interaction ligand/enzyme favorise ces phénomènes d'auto-condensation. Toutefois, il a déjà été rapporté dans la littérature, que Jb α man avait aussi la capacité d'effectuer l'auto-condensation d'un substrat de type *p*NP- α -L-rhamnose sur l'accepteur 1-thioethyl- α -D-rhamnose.¹¹³ Pourtant, avec cette enzyme nous avons uniquement observé un comportement d'hydrolyse.

Finalement, une compétition entre l'inhibition et la transglycosylation sur nos ligands pourrait expliquer les différents effets dose-réponses observés sur Tm- α -gal.

Afin de vérifier si cette activation est due à des phénomènes de transglycosylation, un suivi cinétique par électrophorèse capillaire va être effectué. Ce suivi nous permettra d'observer l'apparition de glycoside résultant de la rupture avec le PNP, nous pourrons aussi voir la formation d'espèces disaccharidiques résultant de phénomène d'auto-condensation, mais aussi d'autres espèces provenant de la transglycosylation des

112. G. J. Davies, K. S. Wilson, B. Henrissat, *Biochem. J.* **1997**, *321*, 557-559.

113. T. Nishio, S. Hoshino, A. Kondo, M. Ogawa, Y. Matsuishi, M. Kitagawa, R. Kawachi, T. Oku, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1389-1393.

iminosucre multivalents. Cette analyse nous permettra de statuer sur les différents mécanismes influençant les activations observées.

CONCLUSION GENERALE

Après les premières réponses multivalentes positives rapportées dans la littérature sur l'inhibition de Jb α man, nous voulions comprendre les mécanismes qui régissent les interactions avec cette enzyme. Pour cela, nous avons entrepris d'étudier les aspects fondamentaux qui régissent les interactions multivalentes pour l'inhibition de glycosidases.

Dans un premier temps, la conception de ligands multivalents à géométrie tridimensionnelle contrôlée nous a permis de montrer des comportements différents d'affinité avec des composés de même valence. Ces différences mettent ainsi en évidence le rôle fondamental de la présentation spatiale des iminosucres sur la force des effets multivalents dans le cas de la Jb α man. L'exemple le plus frappant reste celui des deux structures isomériques tétravalentes calix[4]arènes **33** et **34**, qui possèdent des valeurs d'AAI respectives de 5 et 67.

De plus, la notion de disponibilité des épitopes a également été mise à jour lors de cette étude. Les ligands octavalents ont montré des valeurs d'AAI inférieures à la majorité des composés tétravalents. Cela suggère que la synthèse de ligands multivalents avec une distribution spatiale adéquate, peut s'avérer être une stratégie beaucoup plus pertinente que l'augmentation de la valence.

Parmi tous les composés que nous avons synthétisés, le ligand tétravalent à noyau porphyrinique **37** a montré le plus fort gain d'affinité, avec une AAI de 200 par rapport au composé de référence **32**. Sans précédent pour un composé de si petite valence, cette augmentation importante peut être expliquée à la fois par une plus grande disponibilité de chaque iminosucre, mais également par un auto-assemblage spontané des charpentes qui donnerait accès à des complexes de valence bien supérieure.

Des images AFM ainsi que des mesures DLS ont clairement montré que les composés multivalents formaient des agrégats avec cette enzyme dimérique, contrairement au composé de référence monovalent. De surcroît, aucun agrégat n'a été observé avec deux enzymes (α Glu et β Gal) qui n'avaient pas montré d'effet multivalent au cours des tests d'inhibition. Enfin, les images AFM ont mis en évidence différentes tailles et formes d'agrégats qui dépendent de la nature des composés multivalents.

Tout cela nous permet de penser que la formation des agrégats, uniquement observés avec Jb α man, est liée aux effets multivalents importants et donne un fondement rationnel à la sélectivité obtenue envers cette enzyme.

D'autre part, Jb α man est une mannosidase de classe II et fait, à ce titre partie, de la famille des GH38 qui regroupe quelques enzymes ayant un intérêt biologique considérable, comme GMIIb ou LManII. En testant l'activité inhibitrice de la porphyrine **37** sur deux α -mannosidases recombinantes, homologues de mannosidases de Golgi et lysosomales humaines, nous avons non seulement observé un effet multivalent modéré (AAI = 4), mais également une importante sélectivité envers la mannosidase de Golgi.

Ainsi, il est possible d'avoir un effet multivalent sur un analogue d'une glycosidase humaine, mais aussi d'obtenir une inhibition sélective au sein d'une même famille enzymatique.

Ce constat est d'un intérêt particulier compte tenu de l'importance de l'inhibition sélective pour GMIIb par rapport à LManII dans le traitement du cancer par chimiothérapie.

Une deuxième partie du projet portait sur l'influence de la valence dans l'inhibition de glycosidases. Notre travail a consisté en la synthèse d'une série d'iminosucres de valence comprise entre 20 et 900. Nous avons préparé vingt cycloadduits à base de DNJ ou de DMJ en utilisant une même stratégie convergente de synthèse.

L'activité inhibitrice de ces composés a été déterminée sur une série de cinq glycosidases mono- et oligomériques comprenant Jb α man. Les évaluations biologiques ont permis de mettre en évidence un effet multivalent important sur Jb α man mais également d'identifier une nouvelle glycosidase sensible à la multivalence, Tm_ α -gal.

Ces deux enzymes ont montré un profil d'inhibition relativement similaire avec l'augmentation de la valence. Un effet multivalent important est très vite atteint pour les composés de valence modérée, puis cet effet diminue fortement pour les ligands de valence supérieure. Cette constatation est en accord avec les résultats de la première partie, et met en évidence l'influence limitée de la valence au profit d'autres facteurs fondamentaux qui sont à prendre en compte lors la conception de ligands multivalents, comme la présentation spatiale.

Les composés ultravalents à base de DMJ présentent une activité inhibitrice exclusivement envers Jb α man. La multi-présentation du dérivé DMJ a donc entraîné un gain de sélectivité conséquent pour cette mannosidase de classe II.

Dans certains cas, les iminosucres multivalents sont capables d'activer la catalyse enzymatique. Cet effet a pu être observé sur les trois enzymes AgaB, Tm_α-fuc et Tm_α-gal, il ne s'agit donc pas d'un effet isolé. D'autre part, ce phénomène a été récemment mis en évidence par nos collaborateurs sur trois autres enzymes : Uhgb_MP, rBmt1 et rBmt3, ce qui étend encore le champ d'application potentiel des iminosucres ultravalents.

L'étape suivante de notre travail, en collaboration étroite avec nos partenaires, va consister à essayer de rationaliser ce phénomène d'activation.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Biochemical evaluation

I. 1. Protein expression and purification

Recombinant strains expressing Tm_α-fuc or Tm_α-gal genes were grown in 1 L of LB medium at 37°C overnight, centrifuged and resuspended in 35 mL of lysis buffer (0.1 M phosphate, pH 8, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, 10 μg.mL⁻¹ DNase I). After sonication and centrifugation, 6xHis-tagged proteins were purified by immobilized ion metal-affinity chromatography (IMAC): 250 μL of Ni-NTA Superflow (Qiagen) was added to the supernatant and stirred for 1 h at 4°C, then loaded onto a 10 mL column. The column was washed with 25 mL of buffer (0.1 M phosphate, pH 8, 0.5 M NaCl, 25 mM imidazole), then 5 mL of elution buffer was added (0.1 M phosphate, pH 8, 0.5 M NaCl, 250 mM imidazole). Purity of the final product was checked by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Enzyme concentrations were determined by UV absorbance at 280 nm using NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). AgaB and BI_fuc were provided by the host lab UFIP, and were produced with similar protocols.

I. 2. General procedure for the inhibition assays

Inhibition constant (K_i) values were determined spectrophotometrically, by measuring the residual hydrolytic activities of the glycosidases against *o*- (for β-gluco/β-galactosidase from bovine liver), *p*-nitrophenyl α- or β-D-glycopyranoside (for other glycosidases), α,α'-trehalose (for trehalase) or 2-chloro-4-nitrophenyl-α-L-fucopyranoside (for BI_fuc). Each assay was performed in phosphate buffer or phosphate-citrate buffer (for α- or β-mannosidase and amyloglucosidase) at the optimal pH for the enzymes. The reactions were initiated by addition of enzyme to a solution of the substrate in the absence or presence of various concentrations of inhibitors. The mixture was incubated for 10-30 min at 37 °C or 55 °C (for amyloglucosidase) and the reaction was quenched by addition of 1 M Na₂CO₃. Reaction times were appropriate to obtain 10-20% conversion of the substrate in order to achieve linear rates. The absorbance of the resulting mixture was determined at 405 nm. Note that for AgaB and BI_fuc, the absorbance was directly monitored throughout the reaction each 30 secondes during 45 min at 30°C. Then initial reaction rates were calculated from the slope of the first-order plot of product concentration (*p*NP) against reaction time. Approximate values of K_i were determined using a fixed concentration of substrate (around the K_M value for the different glycosidases) and various concentrations of inhibitors. All measurements were made in triplicate. Full K_i determinations and enzyme inhibition mode were determined from the slope of Lineweaver-Burk plots and double reciprocal analysis. AgaB, Tm_fuc, Tm_gal and BI_fuc were fitted to the competitive or uncompetitive equations using the nls package for R 2.15.0 (www.r-project.org).

I. 3. GMIIB and LManII inhibition

GMIIB and LMANII inhibition were measured as previously described (I. Nemčovičová, S. Šesták, D. Rendić, M. Plšková, J. Mucha, I. B. H. Wilson, *Glycoconj. J.* 2013, *in press*). Briefly, mannosidase activities were measured with p-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside (pNP-Man; Sigma) as substrate at a concentration of 2 mM (diluted from a 100 mM stock solution in dimethylsulfoxide) in 100 mM of acetate buffer at pH 6.0 or at pH 5.2 for GMIIB and LMANII, respectively. 0.5-2 μ l of enzyme and 10 μ l of the inhibitor in 50% DMSO (or the same volume of 50% DMSO in a control reaction) were incubated for 3 h at 37 °C (total volume of 50 μ l). In case of GMIIB, the reaction was supplemented with 0.2 mM CoCl₂ (final concentration). The reactions were terminated with ten volumes (0.5 ml) of a 100 mM sodium carbonate solution. The formation of p-nitrophenol was measured at 410 nm with a spectrophotometer.

I. 4. Sample preparation for AFM imaging

Jb α man was suspended in 20 mM citrate buffer pH 5.5. The multivalent iminosugars were suspended either in citrate or citrate/DMSO (or methanol) mixtures. Mixtures of Jb α man /DNJ 1:1 (mol/mol) in 20 mM citrate buffer pH 5.5 (final concentration of Jb α man and DNJ 4.54 nM) and incubated for 1h at rt. Freshly cleaved mica squares (16 mm²) were glued onto steel sample discs (Agar Scientific, England) using Epotek 377 (Polytec, France). A 150 μ L portion of the Jb α man/DNJ suspensions were then deposited onto the mica samples, and were allowed to adsorb on the solid surface for 20 h at rt. Subsequently, samples were rinsed 3 times with ultrapure water and they were dried in a dessicator under vacuum for 1 h. The samples were then left overnight under ambient conditions before AFM imaging.

I. 5. AFM imaging

The samples were investigated using a commercial AFM (NanoScope III MultiMode AFM, Veeco Metrology LLC, Santa Barbara, CA) equipped with a 125 μ m \times 125 μ m \times 5 μ m scanner (J-scanner). Topographic images were recorded in air in TappingTM mode using RTESP cantilevers (Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA) with a nominal spring constant of 40 N/m (manufacturer specified), with a minimal applied force (<200 pN), at a scan rate of 2 Hz and a drive amplitude of ~300 kHz. The curvature radius of silicon nitride tips was ~10 nm. Images were obtained at rt (21–22°C) in air. All images (512 \times 512 pixels) shown in this paper are flattened raw data.

I. 6. DLS measurements

Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the hydrodynamic diameter of protein/ligands complexes in solution (20 mM citrate buffer pH 5.5). Samples were prepared by incubating the protein with the different ligands (1:10, molar ratio) at 4.54 μ M during one h at ambient temperature under gentle agitation. The measurements were

performed with the Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). The mean hydrodynamic diameter was determined from the autocorrelation function of the intensity of light scattered from the particles. The software used was DTS Nano version 5.03, supplied by the manufacturer (Malvern Instruments Ltd.).

II. Synthesis

II. 1. General procedures

Analytical TLC was carried out on DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck). Column chromatography was conducted on silica gel Kieselgel SI60 (40-63 μm) from Merck using distilled solvents. ^1H , and ^{13}C NMR spectra were recorded at 300 and 75.5 MHz with a Bruker Avance 300 UltraShield spectrometer, 400 and 100 MHz with a Bruker Avance III 400 spectrometer, 500 and 125 MHz, 700 and 175 MHz with respectively a Bruker 500 Avance III Cryosonde Dual, and a Bruker 700 Avance IIIHD cryosonde QXI spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to TMS or the residual solvent peak (CHCl_3 : ^1H : $\delta=7.26$, ^{13}C : $\delta=77.2$; DMSO-d_6 : ^1H : $\delta=2.54$, ^{13}C : $\delta=40.4$). Peak multiplicity is reported as: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), multiplet (m), and broad (br). High resolution mass spectra HRMS were obtained by Electrospray Ionisation (ESI) on a Micromass-Waters Q-TOF Ultima Global or with a Bruker Autoflex III SmartBeam spectrometer (MALDI). Low-resolution mass spectra (MS) were recorded with a Thermo electron DSQ spectrometer. All reagents were purchased from Acros Organics, Aldrich or Carbosynth and were used without further purification. Reactions requiring anhydrous conditions were performed under argon. Dichloromethane was distilled from calcium hydride under nitrogen prior to use. Microwave experiments were conducted in sealed vials in commercial microwave reactors especially designed for synthetic chemistry. (MultiSYNTH, Milestone). The instrument features a special shaking system that ensures homogeneity of the reaction mixtures. Optical rotations were measured on a 343 PERKIN ELMER at 20°C in a 1 cm cell in the stated solvent; $[\alpha]_D$ values are given in $10^{-1} \text{ deg.cm}^2 \text{ g}^{-1}$ (concentration c given as g/100 mL).

II.1. 1). General procedure for multivalent derivatives

- 1,3-dipolar cycloadditions (Method A):

Copper sulfate (0.75 eq per alkyne function) and sodium ascorbate (1.5 eq per alkyne function) were added to a solution of the alkyne (1 eq) and the azido-derivative (1.1 eq per alkyne function) in dioxane- H_2O (5 mL, 4-1) and the mixture was irradiated at 80°C for 45 min in a sealed vessel. Residual copper was removed with EDTA (1.5 eq per alkyne function), and the mixture was poured into a NH_4Cl satd. solution (20 mL) and extracted with ethyl acetate (20mL). The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel.

Exemple:

Copper sulfate (65 mg, 0.26 mmol) and sodium ascorbate (103 mg, 0.52 mmol) were added to a solution of **16** (30 mg, 86.6 μ mol) and azido-derivative (230 mg, 0.38 mmol) in dioxane-H₂O (5 mL, 4–1) and the mixture was irradiated at 80 °C for 45 min in a sealed vessel. Residual copper was removed with EDTA (152 mg, 0.519 mmol), and the mixture was poured into a NH₄Cl satd. solution (20 mL) and extracted with ethyl acetate (20mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (AcOEt/MeOH: 99/1), affording **26** (158 mg, 66%) as a colorless oil.

- Benzyle ethers deprotection (Method B):

Exemple:

Conventional catalytic hydrogenation of protect compound **26** (80 mg, 28.8 μ mol) was carried out with Pd(OH)₂ (73 mg) in MeOH-HCl (1M) (10 mL, 8:2) at 1 atmosphere for 48 h. Then, the catalyst was filtered over celite and the solvent removed under reduced pressure affording **36** (38 mg, quant) as a sticky solid.

- Acetates deprotection for (Method C):

Exemple:

Compound **31** (30 mg, 5,8 μ mol) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 5 mL). Amberlite resin IRN 78 OH⁻ 1.25 meq/mL (780 mg) was added, and the mixture was stirred overnight at rt. The resin was filtered off and washed with methanol and water. The solvent was evaporated under reduced pressure affording **39** (20 mg, 91%) as a pale yellow solid.

II.1. 2). General procedure for ultravalent derivatives:

- Propargylation of dextrans (Method D):

A solution of propargyl bromide (0.76 g, 4.92 mmol) in toluene (0.6 mL) was added dropwise to a stirred solution of dextran (0.1 g, 0.615 mmol) in 0.3 mL water, KOH-0.5H₂O (0.56 g, 8.6 mmol) and TEBAC (8.4 mg, 36.9 μ mol) were added and the mixture was stirred for 20 min at 10–15 °C. The reaction was further carried out for 48 h at rt. Then acetone (1 mL) was added, the organic layer was separated and precipitated in ethanol (75 mL). The precipitate was filtered on millipore, sequentially washed with water (25 mL) and ethanol (25 mL) then dried under vacuum.

- 1,3-dipolar cycloadditions (Method E):

Copper sulfate (0.75 eq per alkyne function) and sodium ascorbate (1.5 eq per alkyne function) were added to a solution of the alkyne dextran (mmol of monosaccharide unit) and the azido-derivative (1.4 eq per alkyne function) in dioxane-H₂O (5 mL, 4–1). The mixture was irradiated at 80 °C for 2 x 45 min in a sealed vessel, with addition of 0.25 eq of copper sulfate and 0.5 eq of sodium ascorbate for the second run. Residual copper was removed with EDTA (1.5 eq per alkyne function) for two h, and the mixture was poured into a NH₄Cl satd. solution (20 mL) and extracted with ethyl acetate (20 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in a small amount of CH₂Cl₂ and the product was precipitated with Et₂O (50mL). The precipitate was collected by filtration, washed with Et₂O (50mL) and precipitate twice from Et₂O.

Exemple:

Copper sulfate (40 mg, 0.16 mmol) and sodium ascorbate (65mg, 0.32mmol) were added to a solution of **50** (20mg, 72.4 μmol of monosaccharide unit) and **9** (126mg, 0.30 mmol) in dioxane-H₂O (5 mL, 4–1). The mixture was irradiated at 80 °C for 2 x 45 min in a sealed vessel. Residual copper was removed with EDTA (94 mg, 0.32 mmol) for two h, and the mixture was poured into a NH₄Cl satd. solution (20 mL) and extracted with ethyl acetate (20 mL). The organic layer was dried (MgSO₄), filtered and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in a small amount of CH₂Cl₂ and the product was precipitated with Et₂O (30mL). The precipitate was collected by filtration, washed with Et₂O (50mL) and precipitate twice from Et₂O, to afford **59** (64 mg, 58%) as a yellow solid.

- Acetates deprotection (Method F):

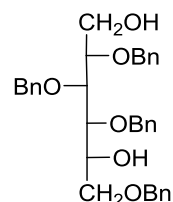
Compound **59** (60 mg, 39.5 μmol of monosaccharide unit) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 5 mL). Amberlite resin IRN 78 OH- 1.25 meq/mL (4 g) was added to the solution, and the mixture was stirred for 48 h at rt. The resin was filtered off and washed with methanol and water. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by Sephadex G100 gel filtration, affording **77** (22 mg, 55%) as a pale yellow solid.

II. 2. Protocols and characterizations

Chapitre 1

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-sorbitol (2):

To a solution of 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-glucopyranose **1** (20.0 g, 37.0 mmol) in anhydrous THF (300 mL) at 0°C, was carefully added LiAlH₄ (5.9 g, 155.4 mmol) in small portions, and the mixture stirred overnight at rt.



Chemical Formula:
C₃₄H₃₈O₆
Molecular Weight:
542,7

Excess of LiAlH₄ was quenched by a careful addition of MeOH (25 mL) and H₂O (25 mL). EtOAc (150 mL) was added, and the resulting mixture was washed with HCl (2 x 100 mL, 1M). The organic layer was separated, washed successively with sat. aq NaHCO₃ (3 x 80 mL), dried over MgSO₄, and evaporated under reduced pressure to afford **2** (18.9 g, 94%) as a colorless viscous oil.

Rf= 0.33 (Cyclohexane/EtOAc: 60 / 40).

[α]_D²⁰ = +15 (c=1, CHCl₃).

ES-HRMS [M+Na]⁺ m/z 565.2561 requires for C₃₄H₃₈O₆Na; found 565.2556.

FT-IR: (ATR, cm⁻¹) 3414 (ν_{OH}), 3030 (ν_{C-H}), 2866 (ν_{C-H}), 1497 (ν_{C=C}), 1454 (ν_{C=C}), 1207 (ν_{C-OH}), 1086 (ν_{C-O-C}), 1065 (ν_{CH-O-H}), 1026 (ν_{CH-O-H}), 912, 733 (ν_{C-H}), 696 (ν_{C-H}).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.37-7.23 (20H, m, 20 × Har), 4.72-4.54 (8H, m, 4 × CH₂Ph), 4.13-4.10 (1H, m, H-5), 3.97 (1H, dd, J 3.7 Hz, 6.2 Hz, H-3), 3.89-3.82 (2H, m, H-2, H-4), 3.78 (1H, d, J_{1a,1b}=J_{1a,2} 11.6 Hz, H-1a), 3.70 (2H, m, 2 × H-6), 3.64 (1H, dd, J_{1b,2} 4.7 Hz, H-1b).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 138.4, 138.3, 138.2 (Car), 128.9, 128.7, 128.4, 128.2, 128.1 (CHar), 79.8 (C-2), 79.4 (C-3), 77.8 (C-4), 74.8, 74.5, 73.7, 73.3 (CH₂Ph), 71.4 (C-6), 71.0 (C-5), 62.1 (C-1).

3-azido-1-propylamine (4):

1-chloro-3-aminopropane hydrochloride (40.0 g, 308 mmol) and sodium azide (25.6 g, 922 mmol) in water (400 mL) was heated at 80 °C for 20 h. The reaction mixture was cooled in an



Chemical Formula:
C₃H₈N₄
Molecular Weight:
100,1

ice bath, KOH (40.0 g) was added, and the mixture was stirred for 1 h. Diethyl ether (3 x 150 mL) was added, and the organic layer was washed with H₂O (250 mL), dried over

MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure at 0 °C, to afford **4** (28.6 g, 93%) as a pale yellow oil.

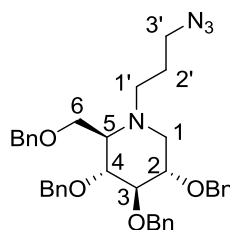
FT-IR: (ATR, cm⁻¹) 3273 (ν_{NH2}), 2097 (ν_{N3}), 1231 (ν_{C-C-N}), 1207 (ν_{C-C-N}), 1038 (ν_{C-NH2}).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3.30 (2H, t, *J* 6.7 Hz, CH₂NH₂), 2.73 (2H, t, *J* 6.7 Hz, CH₂N₃), 1.66 (2H, q, *J* 6.7 Hz, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 49.1 (CH₂N₃), 39.3 (CH₂NH₂), 32.3 (CH₂).

N-(3-azidopropyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (5):

To a solution of DMSO (1.3 mL, 14.8 mmol) in CH₂Cl₂ (16 mL) at -78 °C was added dropwise under N₂, a solution of oxalyle chloride at 2M in CH₂Cl₂ (9.0 mL, 18.5 mmol) and the mixture was stirred for 45 min at -78 °C. Then a solution of diol



Chemical Formula:
C₃₇H₄₂N₄O₄
Molecular Weight:
606,8

2 (2.0 g, 3.68 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise; with the temperature of the mixture below -78 °C during the addition. The mixture was stirred for 2 h at -78 °C. A solution of Et₃N (6.2 mL, 44.3 mmol) in CH₂Cl₂ (8.0 mL) was then added dropwise and the mixture was allowed to warm to rt. After 30 min, the solvent was removed under vacuum, and the crude residue was dissolved in MeOH (25 mL) and 3-azido-1-propylamine **4** (1.47 g, 14.72 mmol) was added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for 30 min. Then, sodium cyanoborohydride (937.0 mg, 14.8 mmol) was added and the mixture was irradiated for 1 h at 50 °C (300 W) in a sealed vessel. After evaporation of the organic solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in DCM (50 mL) and the organic layer was washed with NaHCO₃ satd. (2 x 50 mL), dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the dry residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 95/5) to afford **5** (1.0 g, 46%) as a colorless oil.

R_f = 0.43 (Cyclohexane/EtOAc: 90 / 10).

[α]_D²⁰ = +2.5 (c = 1, CHCl₃).

ES-HRMS [M+Na]⁺ **m/z** 629.3104 requires for C₃₇H₄₂N₄O₄Na; found 629.3110.

FT-IR: (ATR en cm⁻¹) 3088 (ν_{C-H}), 3063 (ν_{C-H}), 3030 (ν_{C-H}), 2926 (ν_{C-H}), 2868 (ν_{C-H}), 2094 (ν_{N3}), 1639 (ν_{C=C}), 1549 (ν_{C=C}), 1452 (ν_{C=C}), 1201 (ν_{C-C-N}), 1097 (ν_{C-O-C}), 1070,

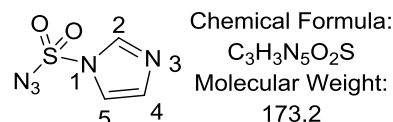
1028, 733 (ν_{C-H}), 696 (ν_{C-H}), 669 (ν_{C-H}), 648.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.36-7.29 (20H, m, $20 \times \text{Har}$), 4.97-4.83 (3H, 3d, $J = 11.0$ Hz, 11.1 Hz, 10.9 Hz, CH_2Ph , CHHPh), 4.71-4.69 (2H, m, CH_2Ph), 4.50 (3H, m, CH_2Ph , CHHPh), 3.67-3.50 (4H, m, H-2, H-4, $2 \times \text{H-6}$), 3.51 (1H, t, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, H-3), 3.25 (1H, dd, $J_{3'a,3'b} = 12.3$ Hz, $J_{3'a,2'} = 5.9$ Hz, H-3'a), 3.19 (1H, dd, $J_{3'b,2'} = 6.4$ Hz, H-3'b), 3.07 (1H, dd, $J_{1a,1b} = 11.0$ Hz, $J_{1a,2} = 4.8$ Hz, H-1a), 2.81 (1H, ddd, $J_{1'a,1'b} = 9.4$ Hz, 6.3 Hz, 4.3 Hz, H-1'a), 2.65 (1H, ddd, H-1'b), 2.35 (1H, d, $J_{4,5} = J_{5,6} = 9.2$ Hz, H-5), 2.23 (1H, t, $J_{1a,1b} = J_{1b,2} = 11.0$ Hz, H-1b), 1.68 (2H, m, $2 \times \text{H-2'}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 139.1, 138.6, 137.8 (Car), 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6 (CHar), 87.4 (C-3), 78.7, 78.5 (C-2, C-4), 75.4, 75.3, 73.5, 72.9 (CH_2Ph), 66.1 (C-6), 64.2 (C-5), 54.7 (C-1), 49.8 (C-3'), 49.5 (C-1'), 24.2 (C-2').

Imidazole-1-sulfonyl azide (7):

Sulfonyl chloride (0.80 mL, 10.0 mmol) was added drop-wise to an ice-cooled suspension of NaN_3 (0.64 g, 10.0 mmol) in MeCN (10 mL) and the mixture was



stirred overnight at rt. Imidazole (1.36 g, 20 mmol) was added to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3 h. at rt. The mixture was diluted with EtOAc (20 mL) and H_2O (20 mL) and the organic layer was washed with H_2O (20 mL), saturated aqueous NaHCO_3 (2×30 mL), dried over MgSO_4 and filtered. After concentration of the filtrate, the crude residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/ EtOAc: 75/25) to afford **7** as a yellow liquid (1.08 g, 64%).

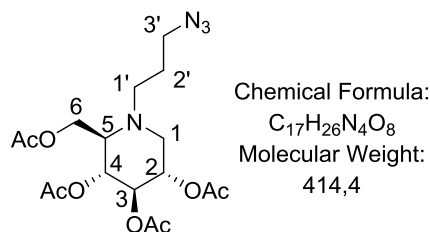
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3273 (ν_{NH_2}), 2097 (ν_{N_3}), 1231 ($\nu_{\text{C-C-N}}$), 1207 ($\nu_{\text{C-C-N}}$), 1038 ($\nu_{\text{C-NH}_2}$).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.17 (dd, 1 H, $J = 0.8, 1.7$ Hz, H-4), 7.35 (dd, 1 H, $J = 1.4, 1.7$ Hz, H-5), 7.96 (dd, 1 H, $J = 0.8, 1.4$ Hz, H-2).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 117.7 (C-5), 131.9 (C-4), 136.7 (C-2).

N-(3-azidopropyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (9):

Conventional catalytic hydrogenation of **5** (730 mg, 1.25 mmol) was carried out with $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (875 mg, 1.25 mmol) in MeOH-1M aq. HCl solution (8 mL, 3:1) at 1 atm for 15 h. Then, the catalyst was filtered over celite, the solvent were removed under reduced



pressure. Imidazole-1-sulfonyl azide **7** (326 mg, 1.25 mmol) was added to a crude mixture of **6** (275 mg, 1.25 mmol) with K_2CO_3 (690 mg, 5.0 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.2

mg, 12.5 μmol) in MeOH (15 mL) and the mixture was stirred overnight at rt. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude mixture was dissolved in pyridine-acetic anhydride (1:1, 14 mL) and stirred for 24 h. Water (9 mL) was slowly added at 0°C to quench the reaction. The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 15 mL). The combined organic layers were washed with an aqueous solution of HCl (1M, 2 x 10 mL) and a saturated aqueous NaHCO_3 solution (1 x 15 mL). The mixture was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 8/2) to afford **9** as a yellow oil (180 mg, 35% for three steps).

Rf = 0.45 (Cyclohexane/EtOAc: 6/4).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.8$ ($c = 1$, CHCl_3).

MALDI, TOF-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ **m/z** 415.1823 requires for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$; found 415.1816.

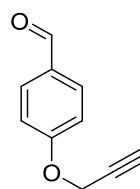
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 2948 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2821 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2099 (ν_{N_3}), 1751 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1539 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1437 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1238 ($\nu_{\text{C-C-N}}$), 1052 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 737 ($\nu_{\text{C-H}}$), 668 ($\nu_{\text{C-H}}$).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.04-4.92 (m, 2H, H-3 and H-4), 4.92-4.80 (m, 1H, H-2), 4.10 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H, H-6), 3.28 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-3'), 3.12 (dd, $J = 11.4$ and 5 Hz, 1H, H-1_a), 2.89-2.75 (m, 1H, H-1'), 2.63-2.43 (m, 2H, H-1'_b, 5), 2.22 (dd, $J = 1.2$, $J = 11.4$, 1H, H-1_b), 2.00, 1.95, 1.93 (3s, 12H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 1.71-1.53 (m, 2H, H-2').

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.7, 170.2, 170.0, 169.6 ($\text{C}=\text{O}$), 74.4 (C-4), 69.2 (C-2), 69.1 (C-3), 61.9 (C-5), 59.5 (C-6), 52.7 (C-1), 49.0 (C-3'), 48.4 (C-1'), 25.2 (C-2'), 20.7 (CH_3).

4-(prop-2-ynoxy)benzaldehyde (12):

K_2CO_3 (3.39 g, 24.5 mmol) was added to a solution of 4-hydroxybenzaldehyde (1 g, 8.2 mmol) in anhydrous DMF (20 mL). The solution was magnetically stirred for one h at rt. Propargyl bromide (1.09 mL, 9.0 mmol, 80% dispersed



Chemical Formula:
 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_2$
Molecular Weight:
160,2

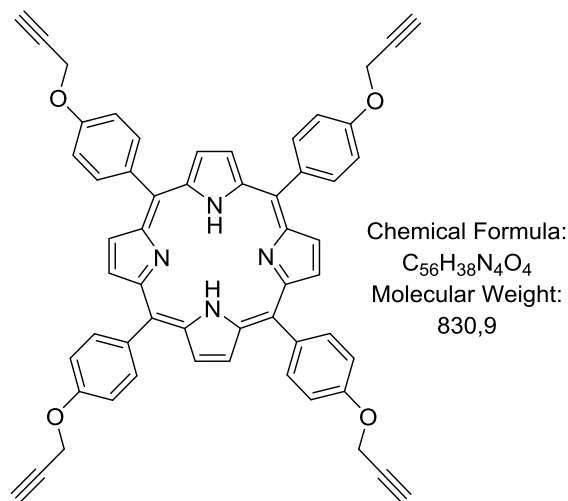
in toluene) was then added dropwise, and the reaction mixture was maintained for 4 h. The mixture was filtered, the solid was separated and dried under vacuum to afford **12** (1.25 mg, 95%) as a white solid.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.90 (s, 1H, CHO), 7.86 (d, $J = 8.79$ Hz, 2H, CHar), 7.09 (d, $J = 8.79$ Hz, 2H, CHar), 4.76 (s, 2H, CH_2), 2.57 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz, $\text{HC}\equiv\text{C}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 191.0 (C=O), 132.0 (Car), 115.3 (Car), 76.5 (HC \equiv C), 56.1 (CH_2).

Tetra-*p*-O-propargylphenyl porphyrine 2H (13):

4-(Prop-2-ynyloxy)benzaldehyde **12** (1.25 g, 7.8 mmol) was added to 35 mL of propionic acid. The mixture was heated at 120°C upon vigorous stirring and a mixture of pyrrole (0.55 μL , 7.8 mmol) in 2.5 mL of propionic acid was added dropwise. After 1 h, the mixture was cooled to rt. For 2 h. The crude product was precipitated by cooling the mixture with an ice-bath and adding MeOH (250 mL). Filtration afforded a purple gum which was dissolved in CH_2Cl_2 . After evaporation, the residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 6/4) to afford **13** as a purple solid (250 mg, 16%).

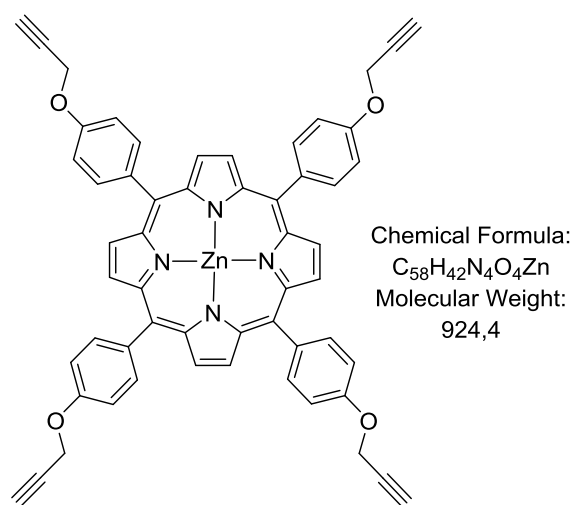


Rf = 0.30 (Cyclohexane/EtOAc: 6/4).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.88 (s, 8H, H-porph), 8.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 8H, H-ar), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 8H, H-ar), 4.96 (d, $J = 2.4$ Hz, 8H, OCH_2CCH), 2.70 (t, $J = 2.4$ Hz, 4H, OCH_2CCH), -2.75 (s, 2H, NH).

Tetra *p*-O-propargylphenyl porphyrine Zn (14):

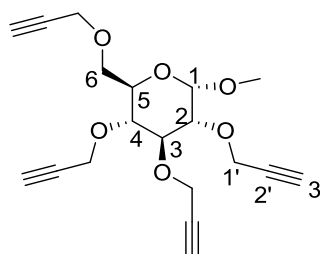
$\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (132 mg, 0.6 mmol) was added to a solution of tetra-*p*-O-propargylphenyl porphyrine 2H **13** (100 mg, 0.12 mmol) in a solution 12.5 mL of DCM/MeOH (4/1, 12.5 mL). The solution was magnetically stirred in the dark for one night at rt. The solution was evaporated, and the crude mixture was diluted with EtOAc (25 mL). The organic layer was washed with water (3×15 mL) and brine (15 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude product was crystallized ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) to afford the pure zinc-porphyrin **14** (102 mg, 92%). as a purple solid



$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.96 (s, 8H, H-porph), 8.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 8H, H-ar), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 8H, H-ar), 4.98 (d, $J = 2.3$ Hz, 8H, OCH_2CCH), 2.69 (t, $J = 2.3$ Hz, 4H, OCH_2CCH).

Methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-propargyl- α -D-glucopyranoside (15):

NaH (1.03 g, 25.7 mmol) was added in a small portion to a solution of methyl α -D-glucopyranoside (500 mg, 2.57 mmol) in anhydrous DMF (25 mL) at 0°C . The suspension was magnetically stirred for one h



Chemical Formula:
 $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$
Molecular Weight:
346,4

at rt. Propargyl bromide (1.72 mL, 15.4 mmol) was then added dropwise, and the reaction mixture was stirred for 3 h. The mixture was cooled and MeOH (25 mL) were added to quench the excess of NaH. After 30 min of stirring at rt the solvent was removed. H_2O (30 mL) was added to the resulting mixture and the crude material was extracted with diethyl ether (2 x 50 mL). The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered, and the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 8/2) to afford **15** (802 mg, 90%) as a yellow oil.

$\text{Rf} = 0.40$ (Cyclohexane/EtOAc: 7/3).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +71$ ($c = 0.5$, CHCl_3).

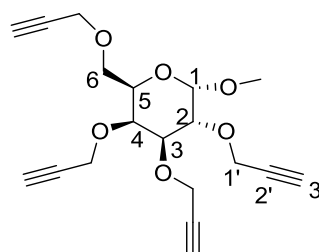
MALDI, TOF-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 369.1309 requires for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$; found 369.1292.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.90 (d, $J = 3.5$ Hz, 1 H, H-1), 4.36 (several m, 8 H, H-1'), 3.84 (t, $J = 9.2$ Hz, 1 H, H-3), 3.82 (m, 2 H, H-6,6), 3.71 (m, 1 H, H-5), 3.62 (dd, $J = 9.6, 3.6$ Hz, 1 H, H-2), 3.51 (m, 1 H, H-4), 3.41 (s, 1 H, OMe), 2.47 (m, 4 H, H-3').

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 97.9 (C-1), 81.2 (C-3), 80.0, 79.7, 79.3 (C-2'), 79.1 (C-2), 76.5 (C-4), 75.0, 74.3, 74.2 (C-3'), 69.4 (C-5), 68.0 (C-6), 60.3, 60.1, 58.6 (C-1'), 55.2 (CH3).

Methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-propargyl- α -D-galactopyranoside (16):

NaH (412 mg, 10.3 mmol) was added in a small portion to a solution of methyl α -D-galactopyranoside (200 mg, 1.03 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) at 0°C. The suspension was magnetically stirred for one h



Chemical Formula:
C₁₉H₂₂O₆
Molecular Weight:
346,4

at rt. Propargyl bromide (690 μ L, 6.18 mmol) was then added dropwise, and the reaction mixture was stirred for 3 h. The mixture was cooled and MeOH (15 mL) were added to quench the excess of NaH. After 30 min of stirring at rt the solvent was removed. H₂O (10 mL) was added to the resulting mixture and the crude material was extracted with diethyl ether (2 x 20 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 8/2) to afford **16** (306 mg, 86%) as a yellow oil.

Rf = 0.35 (Cyclohexane/EtOAc: 7/3).

$[\alpha]_D^{20} = +31$ ($c = 0.5$, CHCl₃).

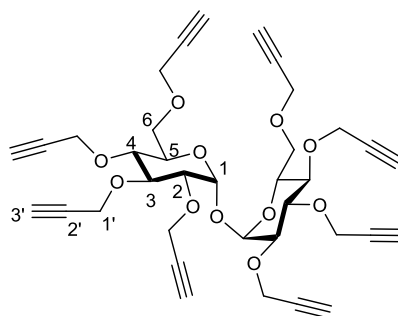
MALDI, TOF-HRMS [M+Na]⁺ **m/z** 369.1309 requires for C₁₉H₂₂O₆Na; found 369.1305.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.94 (1 H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 4.49 (2 H, d, $J = 2.3$ Hz, CH₂CCH), 4.41 (4 H, m, CH₂CCH), 4.24-4.18 (2 H, dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 7.9$ Hz, CH₂CCH), 4.12-4.07 (1 H, m, H-4), 4.03-3.88 (3 H, m, H-2,3,5), 3.78 (1 H, dd, $J = 5.7$ Hz, $J = 9.6$ Hz, H-6_A), 3.66 (1 H, dd, $J = 6.6$ Hz, H-6_B), 3.42 (3 H, s, OMe), 2.44 (4 H, m, CCH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 98.8 (C-1), 80.4, 80.2, 79.7 (C-2'), 78.6 (C-3), 76.2 (C-2), 74.7 (C-3'), 74.6 (C-4), 69.3 (C-6), 69.1 (C-5), 59.9, 59.1, 58.9, 58.8 (C-1'), 55.5 (OMe)

2,2',3,3',4,4',6,6' propargyl- α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside (17):

NaH (280 mg, 7.01 mmol) was added in a small portion to a solution of trehalose (150 mg, 0.44 mmol) in anhydrous DMF (10 mL) at 0°C. The suspension was magnetically stirred for one h at rt.



Chemical Formula:
C₃₆H₃₈O₁₁
Molecular Weight:
646,7

Propargyl bromide (490 μ L, 4.38 mmol) was then added dropwise, and the reaction

mixture was stirred for 6 h. The mixture was cooled and MeOH (10 mL) were added to quench the excess of NaH. After 30 min of stirring at rt the solvent was removed. H₂O (10 mL) was added to the resulting mixture and the crude material was extracted with diethyl ether (2 x 20 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 8/2) to afford **17** (131 mg, 46%) as a yellow oil.

Rf = 0.30 (Cyclohexane/EtOAc: 6/4).

$[\alpha]_D^{20} = +125$ ($c = 0.3$, CHCl₃).

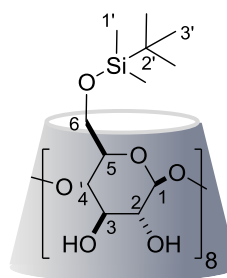
MALDI, TOF-HRMS [M+Na]⁺ **m/z** 669.2306 requires for C₃₆H₃₈O₁₁Na; found 669.2317.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.18 (2 H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 4.56-4.35 (8 H, br, H-1'), 4.35-4.10 (8 H, br, H-1''), 4.13-4.01 (2 H, m, H-5), 3.83 (2 H, dd, $J = 3.5$ Hz, 10.5 Hz, H-6_A), 3.75 (2 H, t, $J = 9.3$ Hz, H-3-3'), 3.70 (2 H, dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 10.5$ Hz, H-6_B), 3.56 (2 H, dd, $J = 9.5$, 3.6 Hz, H-2), 3.48 (2 H, m, H-4), 2.49-2.38 (8 H, m, H-1').

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 94.0 (C-1), 81.3 (C-3), 80.2-80.1-79.7-79.5 (C-3'), 78.9 (C-2), 76.6 (C-4), 75.0 (C-2'), 74.3 (C-3'), 69.9 (C-5), 67.8 (C-6), 60.5, 60.3, 58.6, 58.4 (C-1').

Octakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltooctaose (18**):**

Freshly dried γ CD (2 g, 1.54 mmol) was dissolved in dry pyridine (230 mL) at rt. Then, *tert*-butyldimethylsilyl chloride (3.3 g, 22.2 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 24 h at 0°C. The reaction mixture was poured onto water (2.5 L) and the precipitate was filtered off



Chemical Formula:
C₉₆H₁₉₂O₄₀Si₈
Molecular Weight:
2211.2

and washed with water (2 x 200 mL) and acetone (200mL). The crude product (3.77 g) was recrystallized from a mixture of CH₂Cl₂/MeOH (2/8, 400 mL) and once from CH₂Cl₂/acetone (1/9, 250mL) leading to **18** (2.51 g, 76% yield) as a white solid.

Rf = 0.5 (CHCl₃/MeOH/H₂O: 40/10/1).

$[\alpha]_D^{20} = +117$ ($c = 0.5$, in CHCl₃).

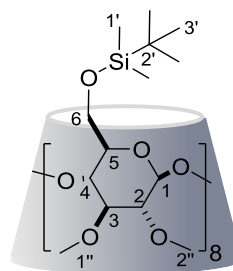
MALDI, TOF-HRMS [M+Na]⁺ **m/z** 2232.1037 requires for C₉₆H₁₉₂O₄₀Si₈Na; found 2232.1129.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.85, 5.3 (sbr, 8 H, OH), 4.91 (d, *J* = 3.6 Hz, 8 H, H-1), 4.0 (t, *J* = 9.3 Hz, 8 H, H-3), 3.94 (dd *J* = 10.9 Hz, *J* = 3.2 Hz, 8 H, H-6), 3.74 (t, *J* = 10.7 Hz, 8 H, H-6'), 3.68-3.6 (m, 16 H, H-2,5), 3.51 (t, *J* = 9.4 Hz, 8 H, H-4), 0.87 (s, 72 H, H-3'), 0.04 (d, *J* = 4.6 Hz, 48 H, H-1').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 02.6 (C-1), 82.4 (C-4), 74.2 (C-2), 73 (C-3), 72.9 (C-5), 62 (C-6), 26.1 (C-3'), 18.4 (C-2'), -5.2 (C-1').

Octakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltooctaose (19):

To a solution of **18** (1.7 g, 0.769 mmol) in THF (50mL), was added NaH in small portion (1.23 g, 30.8 mmol). After one h, iodomethane (1.99mL, 30.8 mmol) was added in portions within a 15–30 min period. After 30 min at rt, more sodium



Chemical Formula:
C₁₁₂H₂₂₄O₄₀Si₈
Molecular Weight:
2435,7

hydride (308 mg, 7.69 mmol) and iodomethane (498 mL, 7.69 mmol) were added and the reaction mixture was further stirred overnight at rt. The excess of sodium hydride and iodomethane was quenched with MeOH (50 mL). Volatile compounds were removed by evaporation under reduced pressure. The crude product was dissolved in CH₂Cl₂ (200 mL), washed with H₂O (2 x 200mL) and brine (2 x 150 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 7/3) to afford **19** (1.22 g, 65% yield) as a white solid.

R_f = 0.54 (Cyclohexane/EtOAc: 5/5).

[α]_D²⁰ = +122 (*c* = 0.5, CHCl₃).

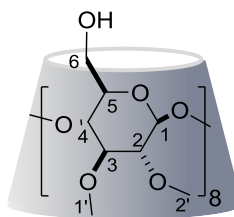
MALDI, TOF-HRMS [M+Na]⁺ **m/z** 2456.3540 requires for C₁₁₂H₂₂₄O₄₀Si₈Na; found 2456.3516.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 5.3 (d, *J* = 3.6 Hz, 8 H, H-1), 4.12 (d, *J* = 11.2 Hz, 8 H, H-6), 3.8-3.61 (m, 40 H, H-6',5,1''), 3.61-3.46 (m, 40 H, H-3,4,2''), 3.08 (dd, *J* = 3.5, *J* = 9.8, H-2), 0.87 (s, 72 H, H-3'), 0.04 (s, 48 H, H-1').

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 97.8 (C-1), 82.1 (C-2,3), 78 (C-5), 72.5 (C-4), 62.4 (C-6), 61.7 (C-1''), 58.9 (C-2''), 26.0 (C3'), 18.4 (C-2'), -5.1 (C-1').

Octakis(2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltooctaose (20):

To a solution of **19** (1.6 g, 0.657 mmol) in MeOH (50 mL), was added ammoniumfluoride (608 mg, 16.4 mmol) at reflux. Desilylation was completed after 16 h at reflux as confirmed by TLC (CHCl₃/MeOH/H₂O: 40/10/1). MeOH was



Chemical Formula:
C₆₄H₁₁₂O₄₀
Molecular Weight:
1521,6

removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (CHCl₃/MeOH/H₂O: 50/10/1), affording **20** (800 mg, 80% yield) as a white solid.

R_f = 0.42 (CHCl₃/MeOH/H₂O: 50:25:1).

[α]_D²⁰ = +110 (c = 0.5, CHCl₃).

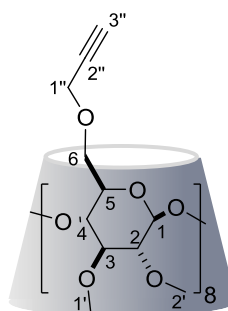
MALDI, TOF-HRMS [M+Na]⁺ m/z 1543.6622 requires for C₆₄H₁₁₂O₄₀Na; found 1543.6632.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 5.1 (d, J = 2.7 Hz, 8 H, H-1), 4.82-4.15 (sbr, 8 H, OH), 3.95-3.76 (m, 16 H, H-6), 3.75-3.66 (m, 8 H, H-5), 3.62 (s, 24 H, H-1'), 3.59-3.44 (m, 40H, H-3,4,2'), 3.2(dd, J = 3.5 Hz, J = 8.8 Hz, 8 H, H-2).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 98.4 (C-1), 82.4 (C-3), 81.7 (C-2), 78.7(C-4), 72.3 (C-5), 61.2 (C-6,1'), 59.2 (C-2').

Octakis(6-*O*-propargyl-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltooctaose (21):

NaH (105 mg, 2.62 mmol) was added in small portions to a solution of compound **20** (200 mg, 0.131 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) at 0°C. The suspension was magnetically stirred for one h at rt. Propargyl bromide (180 μL, 1.57 mmol) was then added dropwise, and the reaction mixture was



Chemical Formula:
C₈₈H₁₂₈O₄₀
Molecular Weight:
1826

stirred for 6 h at rt. The mixture was cooled and MeOH (5 mL) were added to quench the excess of NaH. After 30 min of stirring at rt, the solvent was removed. H₂O was added to the resulting mixture and the crude material was extracted with diethyl ether (2 x 20 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 4/96) to afford **21** (192 mg, 80%) as a brown gum.

Rf = 0.45 (Cyclohexane/EtOAc: 1/99).

$[\alpha]_D^{20} = +101$ ($c = 0.5$, CHCl_3).

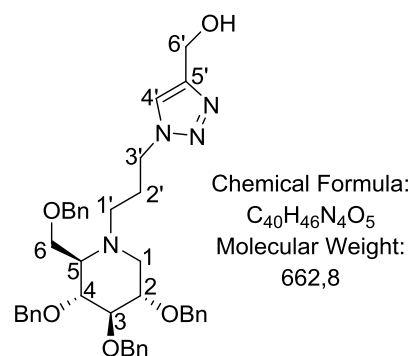
MALDI, TOF-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1847.7874 requires for $\text{C}_{88}\text{H}_{128}\text{O}_{40}\text{Na}$; found 1847.7832.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.23 (8 H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 4.22 (16 H, dq, $J = 2.61$ Hz, $J = 15.6$ Hz, H1'), 3.96-3.78 (24 H, m, H-5,-6), 3.75-3.66 (8 H, m, H-5), 3.72-3.58 (32 H, m, H-1',-4), 3.58-3.46 (32 H, m, H-2', -3), 3.20 (8 H, dd, $J = 3.4$ Hz, $J = 9.66$ Hz, H-2.), 2.49 (8 H, t, $J = 2.3$ Hz, H-3'').

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 98.3 (C-1), 82.2 (C-3), 82.0 (C-2), 79.8 (C-2''), 79.0 (C-4), 75.1 (C-3''), 70.9 (C-5), 68.7 (C-6), 61.6 (C-1'), 58.9 (C-2'), 58.6 (C-1'').

***N*-(3-(4-hydroxymethyl-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (22):**

To a solution of the propargyl alcohol (12 μL , 0.214 mmol) and **5** (120 mg, 0.198 mmol) in dioxane- H_2O (3 mL, 2-1) copper sulfate (8.7 mg, 34.7 μmol) and sodium ascorbate (13.7 mg, 69.4 μmol) were added and the mixture was irradiated at 80 $^\circ\text{C}$ for 45 min in a sealed vessel. The crude product was quenched with EDTA under agitation. The mixture was poured into an NH_4Cl satd. solution (10 mL) and extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried (MgSO_4), filtered and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **22** (126 mg, 92%) as a colorless oil.



Rf = 0.44 (DCM/MeOH: 95/5).

$[\alpha]_D^{20} = +1$ ($c = 0.3$, CHCl_3).

MALDI, TOF-HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 663.3541 requires for $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_5$; found 663.3533.

FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3360 (ν_{OH}), 3032 (ν_{CH}), 2949, 2866 (ν_{CH_2}), 2869 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1495 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1452 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1361, 1264 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1208 ($\nu_{\text{C-C-N}}$), 1172, 1139 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1101 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1062, 1027, 1014, 800 ($\nu_{\text{C-H}}$), 737 ($\nu_{\text{C-H}}$), 699 ($\nu_{\text{C-H}}$).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.33 (1 H, s, H-4'), 7.31-7.05 (20 H, m, 20 \times Har), 4.95-4.71 (3 H, m, CHHPh), 4.71-4.55 (4 H, m, 2 \times CH_2Ph , 2 \times H-6'), 4.45-4.28 (3 H, m, CHHPh), 4.25-4.05 (2 H, m, H-3'), 3.61 (1 H, dd, $J = 3.7$ Hz, $J = 10.8$ Hz, H-6_A), 3.55-

3.37 (4 H, m, H-2, -3, -4, -6_B), 2.93 (1 H, dd, $J = 4.14$ Hz, $J = 11.5$ Hz, H-1_A), 2.83-2.65 (1 H, m, H-1'_A), 2.52-2.35 (1 H, m, H-1'_B), 2.35-2.25 (1 H, m, H-5), 2.08 (t, $J = 10.5$ Hz, 1 H, H-1_B), 2.01-1.85 (m, 2H, H-2').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 147.7 (C-5'), 139.0, 138.5, 137.9 (Car), 128.6-127.5 (CHar), 122.1 (C-4'), 87.1 (C-3), 78.6 (C-2), 78.4 (C-4), 75.4, 75.3, 73.3, 72.9 (CH₂Ph), 66.6 (C-6), 64.7 (C-5), 56.5 (C-6'), 54.4 (C-1), 49.3 (C-1'), 48.5 (C-3'), 26.2 (C-2').

Compound 23:

Obtained following method A. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **23** (75% yield) as a colorless oil.

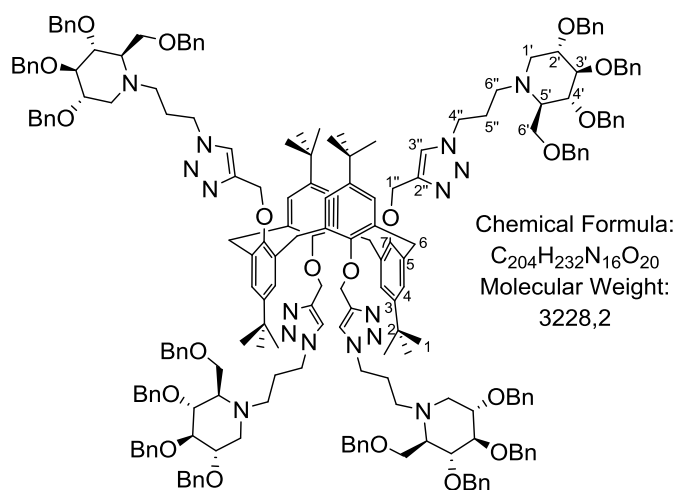
R_f = 0.51 (DCM/MeOH: 95/5).

$[\alpha]_D^{20} = +4$ ($c = 0.5$, CHCl₃).

ES-HRMS [M+3H]³⁺ m/z 1076.2614 requires for C₂₀₄H₂₃₅N₁₆O₂₀; found 1076.2616.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.33-7.05 (80 H, m, Har), 6.92-6.84 (12 H, m, 8 x H-4, 4 x H-3''), 5.02-4.77 (12 H, m, CH₂Ph), 4.72-4.60 (8 H, m, CH₂Ph), 4.54-4.37 (20 H, m, 12 x CH₂Ph, 4 x H-1''), 4.33-4.11 (8 H, m, H-4''), 3.74-3.41 (28 H, m, 4 x H-2', 3', 4', 6', 8 x H-6), 3.08 (4 H, dd, $J = 3.7$ Hz, $J = 10.8$ Hz, H-1'_A), 2.93-2.79 (4 H, m, H-6'_A), 2.70-2.58 (4 H, m, H-6'_B), 2.40-2.30 (4 H, m, H-5'), 2.22 (4 H, t, $J = 10.5$ Hz, H-1'_B), 2.09-1.90 (8 H, m, H-5''), 1.09 (36 H, s, H-1).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 153.5 (C_{IV}), 144.8, 144.7 (C-2''), 139.0, 138.6, 137.9 (Car), 133.6 (C_{IV}), 128.8-127.3 (CHar), 126.8 (C-4), 123.0 (C-3''), 87.2 (C-3'), 78.7 (C-2'), 78.5 (C-4'), 75.4, 75.3, 73.3, 72.8 (CH₂Ph), 66.4 (C-6'), 64.5 (C-1''), 64.4 (C-5'), 54.7 (C-1'), 49.5 (C-6''), 48.3 (C-4''), 38.6 (C-6), 33.9 (C-2), 31.6 (C-1), 25.9 (C-5'').



Compound 24:

Obtained following method A.

The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **24** (64% yield) as a yellow oil.

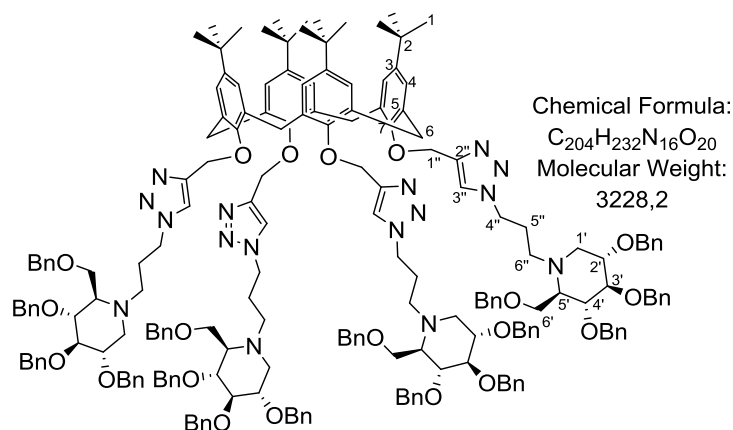
Rf = 0.51 (95/5 DCM/MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +4.7$ ($c = 1$, CHCl_3).

ES-HRMS $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 1613.8854 requires for $\text{C}_{204}\text{H}_{234}\text{N}_{16}\text{O}_{20}$; found 1613.8887.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.67 (4 H, m, 4 x H-3''), 7.31-7.05 (80 H, m, Har), 6.72 (8 H, s, H-4), 5.05 (8 H, m, H-1''), 4.97-4.67 (12 H, m, CH_2Ph), 4.69-4.59 (8 H, m, CH_2Ph), 4.45-4.31 (12 H, m, CH_2Ph), 4.29-4.09 (12 H, m, 4 x H-6_B, 8 x H-4''), 3.68-3.41 (20 H, m, H-2', 3', 4', 6'), 3.04 (4 H, dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 11.1$ Hz, H-1'_A), 2.87 (4 H, d, $J = 12.7$ Hz, 4 x H-6_B), 2.82-2.69 (4 H, m, H-6''_A), 2.61-2.46 (4 H, m, H-6''_B), 2.36-2.27 (4 H, m, H-5'), 2.16 (4 H, t, $J = 10.8$ Hz, H-1'_B), 2.04-1.87 (8 H, m, H-5''), 1.06 (36 H, s, H-1).

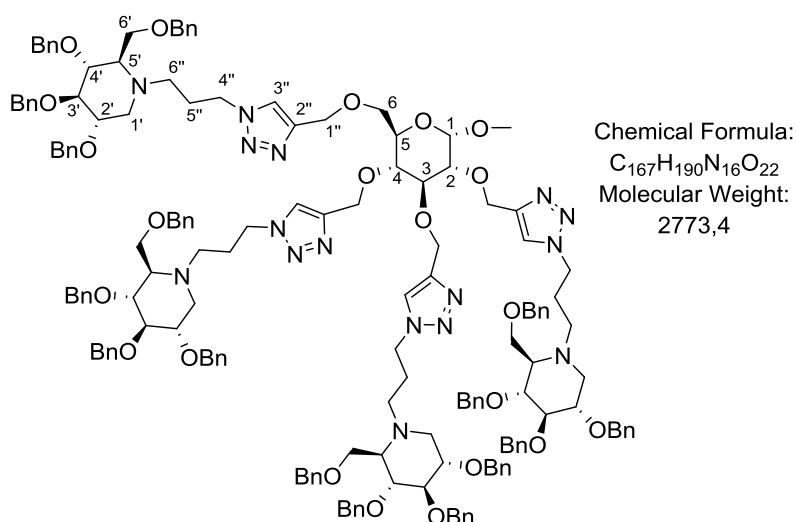
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 152.2 (C_{IV}), 145.1, 144.6 ($\text{C}-2''$), 139.1, 138.7, 137.9 (Car), 134.2 (C_{IV}), 128.4-127.3 (CHar), 125.1 ($\text{C}-4$), 124.5 ($\text{C}-3''$), 87.3 ($\text{C}-3'$), 78.7 ($\text{C}-2'$), 78.5 ($\text{C}-4'$), 75.4, 75.2, 73.3, 72.8 (CH_2Ph), 66.5 ($\text{C}-6'$, $\text{C}-1''$), 64.4 ($\text{C}-5'$), 54.6 ($\text{C}-1'$), 49.4 ($\text{C}-6''$), 48.4 ($\text{C}-4''$), 34.0 ($\text{C}-2$), 31.6 ($\text{C}-6$), 31.4 ($\text{C}-1$), 26.1 ($\text{C}-5''$).



Compound 25:

Obtained following method A. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 99/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **25** (69% yield) as a yellow oil.

Rf = 0.43 (DCM/MeOH: 95/5).



$[\alpha]_D^{20} = +28$ ($c = 0.5$, CHCl_3).

MALDI, TOF-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 2794.4133 requires for $\text{C}_{167}\text{H}_{190}\text{N}_{16}\text{O}_{22}\text{Na}$; found 2794.4184.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.96, 7.78, 7.76, 7.54 (4 H, s, 4 x H-3''), 7.45-7.12 (80 H, m, Har), 5.1-4.75 (18 H, m, 12 x CHHPH, 5 x H-1'', H-1), 4.78-4.63 (11 H, m, 4 x CH_2Ph , 3 x H-1''), 4.50-4.32 (12 H, m, CHHPH), 4.34-4.13 (8 H, m, H-4''), 3.92 (1 H, t, $J = 9.2$ Hz, H-3), 3.84 (1 H, dd, $J = 3.7$ Hz, $J = 10.5$ Hz, H-6_A), 3.78-3.45 (24 H, m, H-2', 3', 4', 6', H-2, 4, 5, 6_B), 3.38 (3 H, s, OCH_3), 2.93-2.78 (4 H, m, H-1'_A), 2.69-2.59 (4 H, m, H-6''_A), 2.46-2.29 (4 H, m, H-6''_B), 2.20-2.09 (4 H, m, H-5'), 2.05-1.92 (4 H, m, H-1'_B), 1.89-1.71 (8 H, m, H-5'').

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 145.0, 144.8, 144.7, 144.6 (C-2''), 139.0, 138.5, 137.8 (Car), 128.7-127.5 (CHar), 123.8, 123.5, 123.0 (C-3''), 97.8 (C-1), 87.2 (C-3'), 81.6 (C-3), 79.8 (C-2), 78.6 (C-2'), 78.4 (C-4'), 77.5 (C-4), 75.3, 75.2, 73.3, 72.8 (CH_2Ph), 70.0 (C-5), 68.8 (C-6), 66.4 (C-1''), 64.8 (C-6'), 64.4 (C-5'), 55.2 (OCH_3), 54.4 (C-1'), 49.2 (C-6''), 48.4 (C-4''), 25.9 (C-5'').

Compound 26:

Obtained following method A. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 99/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **26** (66% yield) as a yellow oil.

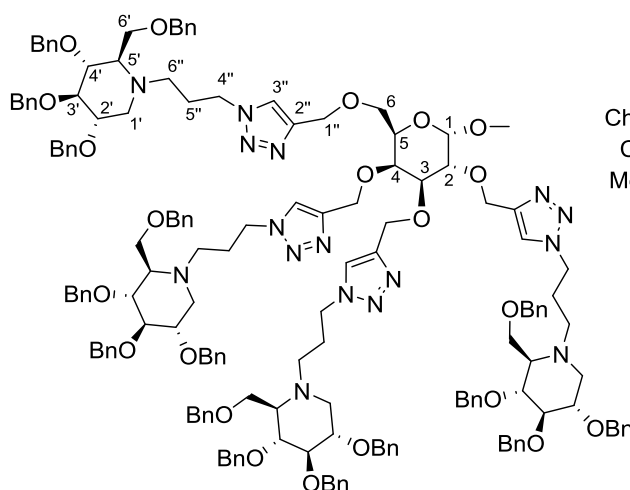
$R_f = 0.40$ (DCM/MeOH: 95/5).

$[\alpha]_D^{20} = +14$ ($c = 0.5$, CHCl_3).

ES-HRMS $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 1386.7167 requires for $\text{C}_{167}\text{H}_{192}\text{N}_{16}\text{O}_{22}$; found 1386.7193.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.75, 7.61, 7.58, 7.48 (4 H, s, H-3''), 7.40-7.08 (80 H, m, Har), 5.02-4.72 (18 H, m, 12 x CHHPH, 5 x H-1'', H-1), 4.72-4.50 (11 H, m, 4 x CH_2Ph , 3 x H-1''), 4.49-4.32 (12 H, m, CH_2Ph), 4.32-4.08 (8 H, m, H-4''), 4.04-4.96 (2 H, m, H-2, -3), 4.93-4.83 (2 H, m, H-4, -5), 3.70-3.40 (22 H, m, 4 x H-2', 3', 4', 6', H-6), 3.34 (3 H, s, OCH_3), 3.12-2.98 (4 H, m, H-1'_A), 2.83-2.71 (4 H, m, H-6''_A), 2.64-2.46 (4 H, m, H-6''_B), 2.39-2.28 (4 H, m, H-5'), 2.23-2.10 (4 H, m, H-1'_B), 2.07-1.90 (8 H, m, H-5'').

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 145.0, 144.9, 144.5 (C-2''), 139.0, 138.5, 137.8



Chemical Formula:
 $\text{C}_{167}\text{H}_{190}\text{N}_{16}\text{O}_{22}$
Molecular Weight:
2773,4

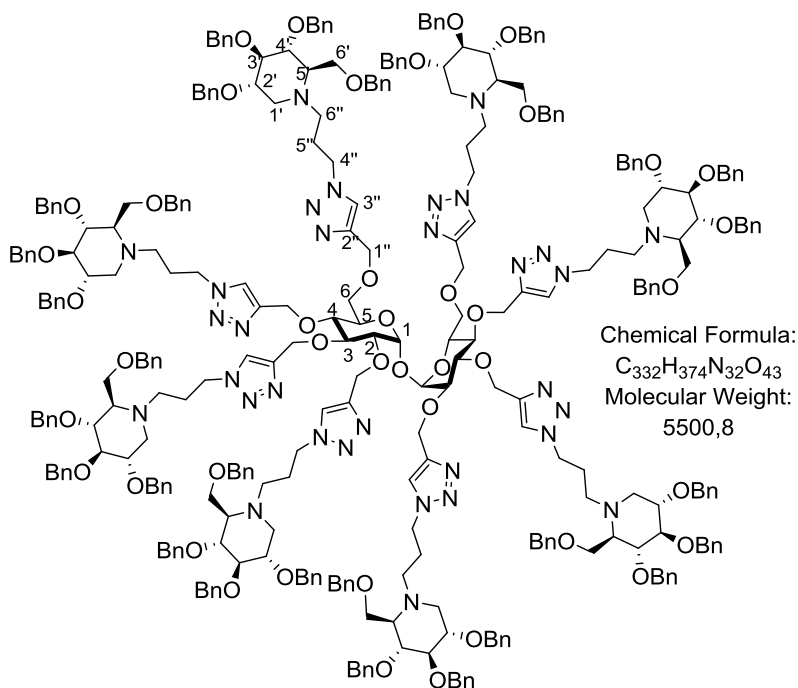
(Car), 128.7-127.5 (CHar), 123.2-122.9 (C-3''), 98.5 (C-1), 87.1 (C-3'), 79.3 (C-3), 78.9 (C-2), 78.6 (C-2'), 78.4 (C-4'), 77.4 (C-4), 75.3, 75.0, 73.3, 72.8 (CH₂Ph), 69.2 (C-5), 69.0 (C-6), 66.2 (C-1''), 65.0 (C-6'), 64.5 (C-5'), 55.3 (OCH₃), 54.4 (C-1'), 49.2 (C-6''), 48.3 (C-4''), 25.9 (C-5'').

Compound 27:

Obtained following method A. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **27** (55% yield) as a yellow oil.

R_f = 0.52 (DCM/MeOH: 95/5).

[α]_D²⁰ = +18 (*c* = 0.3, CHCl₃).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.98, 7.95, 7.80, 7.53 (4s, 4*2H, 8*H-3''), 7.4-7.05 (160H, m, 8*20 × Har), 5.22 (d, 2 H, *J* = 3.4 Hz, 2*H-1), 5.07-4.75 (m, 32H, 8*3H×CH₂Ph, 8H-1''), 4.75-4.58 (m, 24 H, 8*2H×CH₂Ph, 8H-1''), 4.49-4.32 (m, 24 H, 8*3H×CH₂Ph), 4.31-4.05 (m, 18 H, 8*H-4'', 2H-5), 3.90 (t, *J* = 9.3 Hz, 2 H, H-3), 3.83-3.74 (m, 4 H, H-6), 3.70-3.41 (m, 44H, 8*[H-2', 3', 4', 6'], 2*H-2,4), 3.15-2.99 (m, 8 H, H-1'_A), 2.9-2.72 (m, 8 H, H-6''_A), 2.69-2.48 (m, 8 H, H-6''_B), 2.40-2.27 (m, 8 H, H-5'), 2.25-2.1 (m, 8 H, H-1'_B), 2.09-1.91 (m, 16 H, H-5'')

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 145.1, 144.6, 144.5(C-2''), 139.0, 138.5, 137.8 (Car), 128.7-127.5 (CHar), 124.1, 123.8, 123.3 (C-3''), 93.8 (C-1), 87.2 (C-3'), 81.4 (C-3), 79.2 (C-2), 78.6 (C-2'), 78.4 (C-4'), 77.5 (C-4), 75.4, 75.2, 73.3, 72.8 (CH₂Ph), 70.7 (C-5), 69.1 (C-6), 66.5 (C-1''), 66.4 (C-6'), 66.0(C-1''), 64.9(C-1''), 64.3 (C-5', 1''), 54.5 (C-1'), 49.4 (C-6''), 48.6 (C-4''), 25.9 (C-5''),

Compound 28:

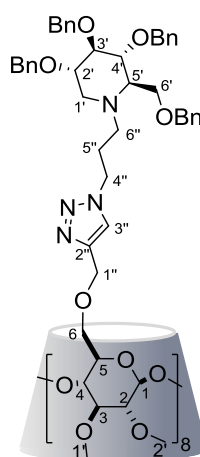
Obtained following method A. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 98/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **28** (56% yield) as a yellow oil.

R_f = 0.50 (DCM/MeOH: 95/5).

[α]_D²⁰ = +44 (*c* = 1, CHCl₃).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.46 (s, 8H, 8*H-3''), 7.25-6.99 (160H, m, 8*20 × Har), 5.15 (d, 2 H, *J* = 3.25 Hz, 8*H-1), 4.89-4.65 (m, 24H, 8*3H×CH₂Ph), 4.63-4.44 (m, 32 H, 8*2H×CH₂Ph, 16 H-1''), 4.38-4.23 (m, 24 H, 8*3H×CH₂Ph), 4.20-4.0 (m, 16 H, 8*H-4''), 3.96 (d, *J* = 9.3 Hz, 8 H, H-6_A), 3.80-3.62 (m, 24 H, H_{4,5,6}_B), 3.60-3.32 (m, 96H, 8*[H-2',3',4',6']), 8*H-3, 8*H-A,B), 3.21-3.04 (dd, *J* = 3.2 Hz, *J* = 9.6 Hz, 8 H, H-2), 3.0-2.9 (dd, *J* = 4.4 Hz, *J* = 11 Hz, 8 H, H-1'), 2.77-2.6 (m, 8 H, H-6''_A), 2.54-2.38 (m, 8 H, H-6''_B), 2.3-2.16 (m, 8 H, H-5'), 2.07 (t, *J* = 10.7 Hz, 8 H, H-1'_B), 1.95-1.8 (m, 16 H, H-5'').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 145.1 (C-2''), 139.1, 138.6, 137.9 (Car), 129-127.5 (CHar), 123 (C-3''), 98.5 (C-1), 87.3 (C-3'), 82.3 (C-3,2), 78.6 (C-2',C-4'), 78.4 (C-4), 75.4, 75.2, 73.6, 72.8 (CH₂Ph), 71.4 (C-5), 69.5 (C-6), 66.4 (C-6'), 65.2 (C-1''), 64.4 (C-5'), 61.5 (C-A), 59 (C-A), 54.6 (C-1'), 49.4 (C-6''), 48.6 (C-4''), 26.1 (C-5'').



Chemical Formula:

C₃₈₄H₄₆₄N₃₂O₇₂

Molecular Weight:

6680.1

Compound 29:

Obtained following method A. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **29** (66% yield) as a purple solid.

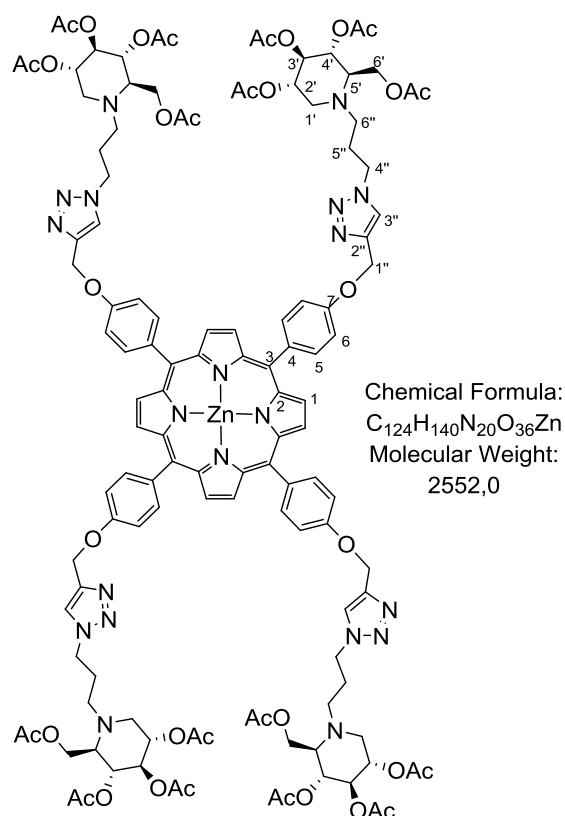
R_f = 0.48 (DCM/MeOH: 95/5).

[α]_D²⁰ = N/A (Sample too dark for analysis at c = 0.01, CHCl₃).

ES-HRMS [M+2H]²⁺ m/z 1275.4577 requires for C₁₂₄H₁₄₂N₂₀O₃₆Zn; found 1275.4588.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.93 (8 H, s, H-1), 8.11 (8 H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5), 7.43 (4 H, s, H-3''), 7.22 (8 H, d, *J* = 8.3 Hz, H-6), 5.09-4.97 (8 H, m, H-3', -4'), 4.97-4.83 (4 H, m, H-2'), 4.67 (8 H, s, H-1''), 4.22-3.99 (16 H, m, H-6', -4''), 3.11 (4 H, dd, *J* = 4.9 Hz, *J* = 11.8 Hz, H-1'_A), 2.77-2.65 (4 H, m, H-6''_B), 2.61-2.51 (4 H, m, H-5'), 2.42-2.28 (4 H, m, H-6''_A), 2.25-2.15 (4 H, m, H-1'_B), 2.06-1.96 (48 H, m, CH₃), 1.94-1.84 (8 H, m, H-5'').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.7-169.8 (C=O), 157.9, 150.5, 143.9, 136.5 (C_{IV}), 135.9 (C-5), 131.8 (C1), 122.5 (C-2''), 120.4 (C_{IV}), 112.9 (C-6), 74.4 (C-4'), 69.4 (C-3'), 69.2 (C-2'), 62.4 (C-5'), 61.9 (C-1''), 59.6 (C-6'), 52.7 (C-1'), 48.4 (C-6''), 47.9 (C-4''), 27.1 (C-5''), 20.9 (CH₃).

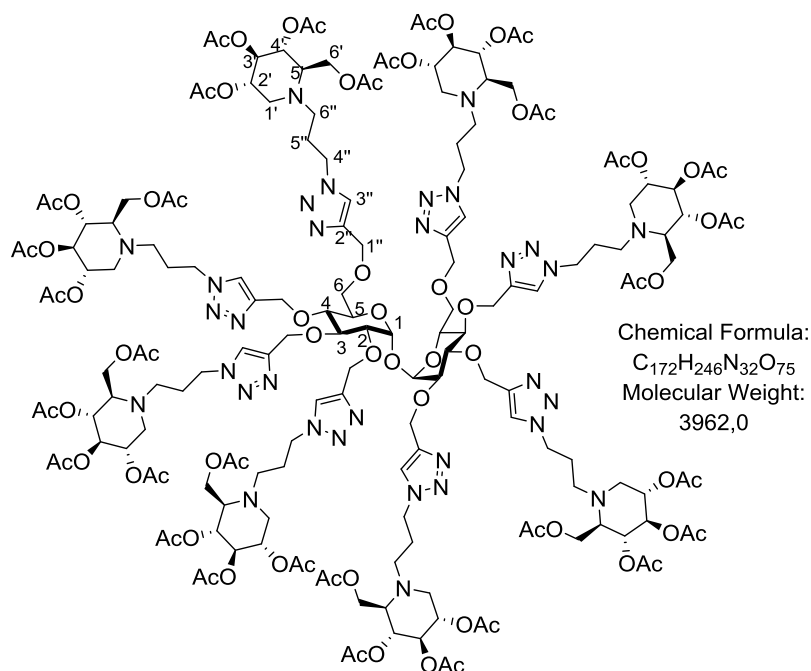


Compound 30:

Obtained following method A. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 98/3 (DCM/MeOH) as eluent to afford **30** (57% yield) as a yellow oil.

$R_f = 0.49$
(DCM/MeOH: 95/5).

$[\alpha]_D^{20} = +24$ ($c = 1$, CHCl_3).



ES-HRMS $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ m/z 990.9216 requires for $\text{C}_{172}\text{H}_{250}\text{N}_{32}\text{O}_{75}$; found 990.9178.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.07, 8.04, 7.98, 7.74 (8 H, s, H-3''), 5.18 (2 H, d, $J = 3.46$ Hz, H-1), 5.08-4.98 (16 H, m, H-3', -4'), 4.98-4.74 (16 H, m, 8 x H-2', 8 x H-1''), 4.73-4.57 (8 H, m, H-1'), 4.50-4.28 (16 H, m, H-4''), 4.19-4.01 (18 H, m, 16 x H-6'', 2 x H-5), 3.80 (2 H, t, $J = 9.3$ Hz, H-3), 3.75-3.65 (4 H, m, H-6), 3.56-3.41 (4 H, m, H-2, -4), 3.26-3.13 (8 H, m, H-1'A), 2.97-2.79 (8 H, m, H-6''), 2.72-2.47 (16 H, m, H-5', -6''), 2.41-2.22 (8 H, m, H-1'B), 2.18-1.89 (112 H, m, H-5'', CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.3-169.7 (C=O), 145.2-144.3 (C-2''), 124.3-123 (C-3''), 93.6 (C-1), 81.1 (C-3), 79.4 (C-2), 77.3 (C-4), 74.5 (C-4'), 70.7 (C-5), 69.4 (C-6,2',3'), 66.4, 66.0, 64.8, 64.4 (C-1''), 62.1 (C-5'), 59.8 (C-6'), 52.8 (C-1'), 48.6 (C-6''), 48.0 (C-4''), 26.9 (C-5''), 20.9 (CH_3).

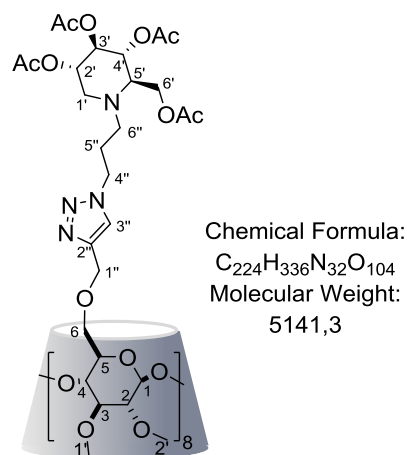
Compound 31:

Obtained following method A. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with 98/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **31** (57% yield) as a yellow oil.

$R_f = 0.50$ (DCM/MeOH: 95/5).

$[\alpha]_D^{20} = +57$ ($c = 1$, CHCl_3).

ES-HRMS $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ m/z 1028.6488 requires for



C₂₂₄H₃₄₁N₃₂O₁₀₄; found 1028.6470.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.70 (8 H, s, H-3''), 5.19 (8 H, d, *J* = 3.43 Hz, H-1), 5.08-4.99 (16 H, m, H-3', -4'), 4.98-4.87 (8 H, m, H-2'), 4.64-4.50 (16 H, m, H-1''), 4.45-4.30 (16 H, m, H-4''), 4.14 (16 H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6'), 4.01-3.90 (8 H, m, H-6_A), 3.82-3.44 (80 H, m, H-3, -4, -5, -6_B, A, B), 3.25-3.08 (16 H, m, H-2, -1'_A), 2.94-2.83 (8 H, m, H-6''_A), 2.71-2.53 (16 H, m, H-5', -6''_B), 2.36-2.26 (8 H, m, H-1'_B), 2.08-1.97 (112 H, m, H-5'', CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.6-169.7 (C=O), 145.0 (C-2''), 123.0 (C-3''), 98.2 (C-1), 82.1 (C-2,-3), 78.6 (C-4), 74.4 (C-4'), 71.2 (C-5), 69.2 (C-6, -2', -3'), 64.9 (C-1''), 61.9 (C-5'), 61.4 (C-A), 59.6 (C-6'), 58.8 (C-B), 52.7 (C-1'), 48.6 (C-6''), 47.9 (C-4''), 26.8 (C-5''), 20.7 (CH₃).

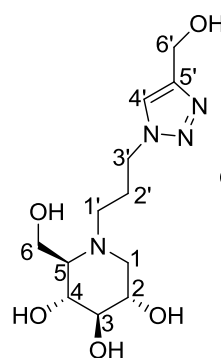
***N*-(3-(4-hydroxymethyl-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (32):**

Obtained following method B. This reaction afforded the compound **32** (quant) as a colorless oil.

MALDI, TOF-HRMS [M+H]⁺ **m/z** 303.1663 requires for C₁₂H₂₃N₄O₅; found 303.1655.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ(ppm): 8.05 (1 H, s, H-4'), 4.79 [under solvent peak] (2 H, H-6'), 4.57-4.47 (2 H, m, H-3'), 3.82 (2 H, d, *J* = 2.57 Hz, H-6), 3.62-3.54 (1 H, m, H-2), 3.42 (1 H, t, *J* = 9.4 Hz, H-4), 3.31 (1 H, t, *J* = 9.2 Hz, H-3), 3.02 (1 H, dd, *J* = 4.96 Hz, *J* = 11.3 Hz, H-1_A), 2.87-2.77 (1 H, m, H-1'_A), 2.75-2.55 (1 H, m, H-1'_B), 2.39-2.27 (2 H, m, H-1_B, -5), 2.24-2.14 (2 H, m, H-2').

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ(ppm): 147.0 (C-5'), 124.1 (C-4'), 78.3 (C-3), 70.0 (C-4), 68.9 (C-2), 64.8 (C-5), 57.6 (C-6), 55.3 (C-1), 54.7 (C-6'), 49.3 (C-3'), 48.6 (C-1'), 23.2 (C-2').



Chemical Formula:
C₁₂H₂₂N₄O₅
Molecular Weight:
302,3

Compound 33:

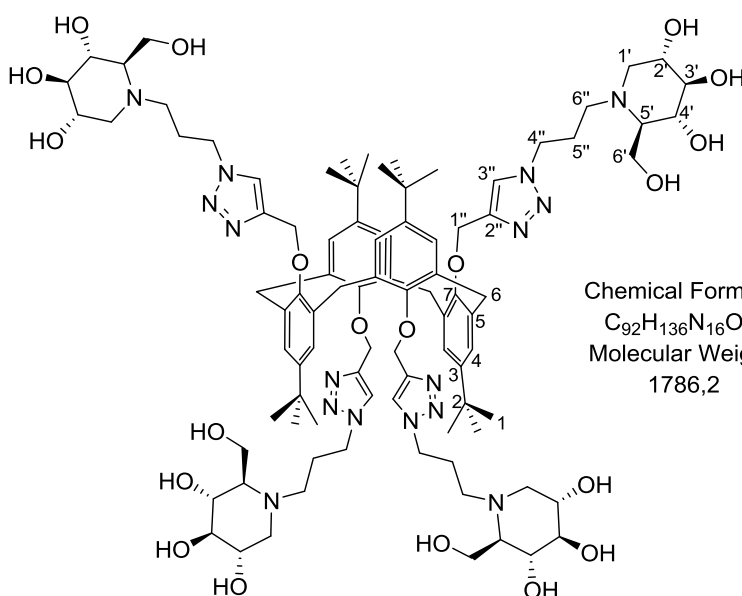
Obtained following method B. This reaction afforded the compound **33** (quant) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = -4$ ($c = 0.3$, H_2O).

ES-HRMS $[M+2Na]^{2+}$
 m/z 915.4968 requires for $C_{92}H_{136}N_{16}O_{20} Na_2$; found 915.4951.

1H NMR (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.99 (4 H, s, H-3''), 7.03 (8 H, m, H-4), 4.75-4.72 (8 H, m, H-1''), 4.70-4.59 (8 H, m, H-4''), 4.08 (4 H, d, $J = 13$ Hz, H-6''_A), 4.02-3.94 (4 H, m, H-6''_B), 3.93-3.85 (4 H, m, H-2'), 3.77-3.70 (4 H, m, H-4'), 3.70-3.52 (20 H, m, H-6, -1''_A, -3', -6''_A), 3.49-3.37 (4 H, m, H-6''_B), 3.29 (4 H, d, H-5'), 3.19 (4 H, t, $J = 11.8$ Hz, H-1''_B), 2.62-2.45 (8 H, m, H-5''), 1.06 (36 H, s, H-1).

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 153.6 (C_{IV}), 145.0, 144.4 ($C-2''$), 133.4 (C_{IV}), 127.1 ($C-4$), 125.9 ($C-3''$), 75.8 ($C-3'$), 67.1 ($C-4'$), 65.9 ($C-2'$), 65.7 ($C-5'$), 63.8 ($C-1''$), 53.9 ($C-6'$), 53.3 ($C-1'$), 50.1 ($C-6''$), 47.3 ($C-4''$), 36.8 ($C-6$), 33.4 ($C-2$), 30.8 ($C-1$), 23.6 ($C-5''$).



Chemical Formula:
 $C_{92}H_{136}N_{16}O_{20}$
Molecular Weight:
1786,2

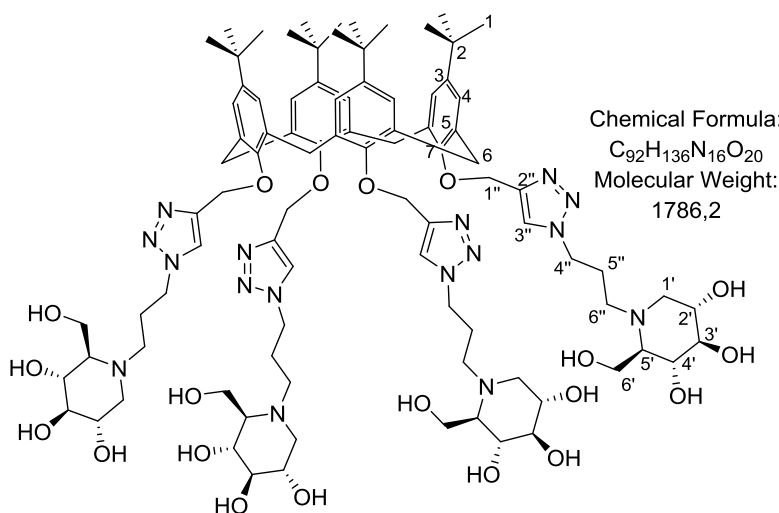
Compound 34:

Obtained following method B. This reaction afforded the compound **34** (quant) as a yellow solid.

$[\alpha]_D^{20} = -8$ ($c = 0.1$, MeOH).

ES-HRMS $[M+2Na]^{2+}$
 m/z 915.4949 requires for $C_{92}H_{136}N_{16}O_{20} Na_2$; found 915.4951.

1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): (4 H, s, H-3''), 6.79 (8 H, s, H-4), 5.05 (8 H, s, H-1''), 4.51-4.43 (8 H, m, H-4''), 4.22 (4 H, d, H-6''_A), 3.86-3.75 (8 H, m, H-6'), 3.50-3.42 (4 H, m, H-2'), 3.36 (4



Chemical Formula:
 $C_{92}H_{136}N_{16}O_{20}$
Molecular Weight:
1786,2

H, t, $J = 9.2$ Hz, H-4'), 3.15 (4 H, t, $J = 9$ Hz, H-3'), 3.03-2.94 (8 H, m, H-6_B, -1'_A), 2.91-2.78 (4 H, m, H-6''_A), 2.53-2.43 (4 H, m, H-6''_B), 2.15-2.00 (16 H, m, H-1'_B, -5', -5''), 0.97 (36 H, s, H-1).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ (ppm): 153.4, 146.5, 145.7, 135.5 (C_{IV}), 126.6 (C-3''), 126.3 (C-4), 80.5 (C-3'), 72.1 (C-4'), 70.8 (C-2'), 67.9 (C-5'), 67.4 (C-1'') 59.6 (C-6'), 57.8 (C-1'), 50.3 (C-6''), 49.5 (C-4''), 34.8 (C-2), 32.9 (C-6), 32.0 (C-1), 27.3 (C-5'').

Compound 35:

Obtained following method

B. This reaction afforded the compound **35** (quant) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = -15$ ($c = 1$, H₂O).

MALDI, TOF-HRMS

[M+Na]⁺ m/z 1353.6621
requires for C₅₅H₉₄N₁₆O₂₂
Na; found 1353.6590.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.17 (3 H, s, H-3''), 8.12 (1 H, s, H-3''), 4.91-4.55 (17 H, m, H-1'', -4'', -1), 4.05 (4 H, d, $J = 12.9$ Hz, H-6'_A), 3.93-3.69 (12 H, m, H-2, -5, -6, -H-4', -6'_B), 3.69-3.42 (18 H, m, H-3, -4, -1', -2', -3', -6''_A), 3.36 (3 H, s, OCH₃), 3.35-3.18 (8 H, m, H-5', -6''_B), 3.12 (4 H, t, $J = 11.6$ Hz, H-1'), 2.56-2.35 (8 H, m, H-5'').

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 143.6-143.4 (C-2''), 125.8-125.4 (C-3''), 97.0 (C-1), 80.4 (C-2), 78.9 (C-3), 76.7 (C-4), 75.7 (C-3'), 69.1 (C-5), 68.0 (C-6), 67.0 (C-2'), 66.0 (C-4'), 65.5 (C-5'), 64.9, 64.7, 62.9, 62.8 (C-1''), 55.1 (OCH₃), 53.8 (C-6'), 53.3 (C-1'), 50.1 (C-6''), 47.6 (C-4''), 23.3 (C-5'').

Compound 36:

Obtained following method

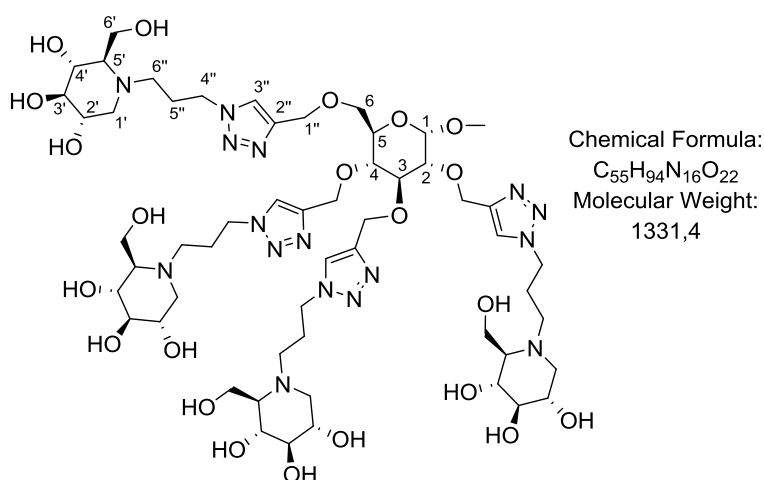
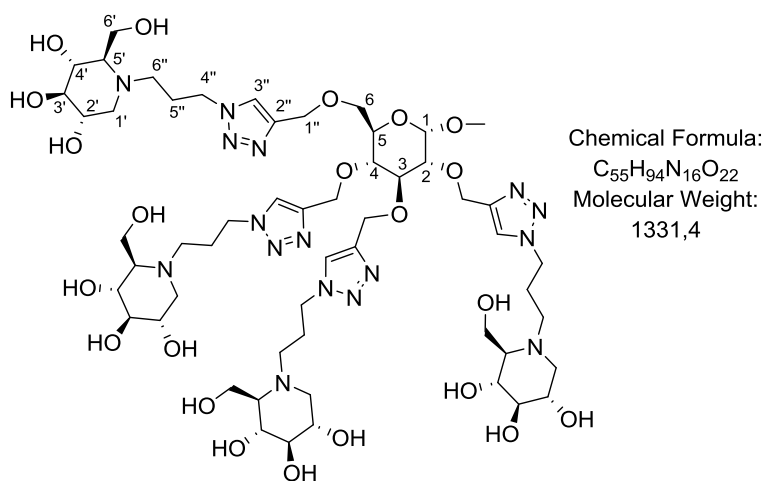
B. This reaction afforded the compound **36** (quant) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = +32.1$ ($c = 1$, H₂O).

MALDI, TOF-HRMS

[M+Na]⁺ m/z 1353.6621
requires for C₅₅H₉₄N₁₆O₂₂
Na; found 1353.6659.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.15, 8.12 (4 H, 2 s, H-3''), 4.93-4.66 (9 H, m, H-1'', H-1), 4.64-4.61 (8 H, m, H-4''), 4.23-4.18 (1 H, m, H-3), 4.10-4.04 (1 H, m, H-5), 4.00-



3.82 (10 H, m, H-2, -4, -6'), 3.76-3.61 (5 H, m, H-6_A, -2'), 3.59-3.49 (5 H, m, H-6_B, -4'), 3.47-3.35 (7-H, m, H-3', OMe), 3.32-3.22 (4 H, m, H-1'_A), 3.17-3.05 (4 H, m, H-6''_A), 3.03-2.87 (4 H, m, H-6''_B), 2.75-2.06 (8 H, m, H-1'_B, -5'), 2.41-2.24 (8 H, m, H-5'').

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ(ppm): 144.1 (C-2''), 125.3 (C-3''), 97.7 (C-1), 77.5 (C-3), 77.3 (C-3'), 75.7 (C-2), 74.8 (C-4), 68.9 (C-6, 2'), 68.5 (C-5), 67.7 (C-4'), 65.1 (C-5'), 65.0, 63.5, 63.4, 63.0 (C-1''), 56.1 (OCH₃), 55.1 (C-6'), 54.5 (C-1'), 49.2 (C-6''), 48.2 (C-4''), 23.8 (C-5'').

Compound 37:

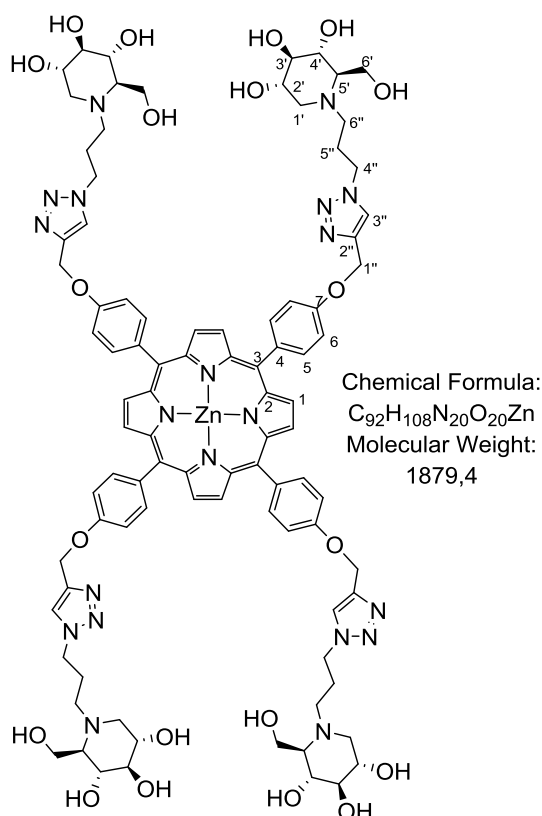
Obtained following method C. This reaction afforded the compound **37** (93%) as a purple solid.

[α]_D²⁰ = N/A (Sample too dark for analysis at *c* = 0.01, CHCl₃).

ES-HRMS [M+2H]²⁺ *m/z* 939.3767 requires for C₉₂H₁₁₀N₂₀O₂₀Zn; found 939.3743.

¹H NMR (400 MHz, DMSO+εD₂O) δ(ppm): 8.73 (8 H, s, H-1), 8.26 (4 H, s, H-3''), 7.95 (8 H, s, H-5), 7.30 (8 H, s, H-6), 5.26 (8 H, s, H-1''), 4.55-4.30 (8 H, m, H-4''), 3.80-3.58 (8 H, m, H-6'), 3.38-3.31 (4 H, m, H-2'), 3.19 (4 H, t, *J* = 9.4 Hz, H-4'), 3.04 (4 H, t, *J* = 9 Hz, H-3'), 3.00-2.84 (8 H, m, H-1'_A, H-6''_A), 2.71-2.58 (4 H, m, H-6''_B), 2.30-2.18 (8 H, m, H-1'_B, -5'), 2.17-2.03 (8 H, m, H-5'').

¹³C NMR (100 MHz, DMSO+εD₂O) δ(ppm): 158.2, 150.4, 143.7 (C_{IV}), 136.1 (C-5), 132.3 (C1), 125.7 (C-3''), 120.8 (C_{IV}), 113.6 (C-6), 78.3 (C-3'), 69.8 (C-4'), 68.5 (C-2'), 66.7 (C-5'), 61.8 (C-1''), 57.4 (C-6'), 55.9 (C-1'), 49.8 (C-6''), 48.5 (C-4''), 25.4 (C-5'').



Compound 38:

Obtained following method C. This reaction afforded the compound **38** (93%) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_D^{20} = +15$ ($c = 0.5$, H_2O).

ES-HRMS $[M+2Na]^{2+}$ m/z 1330.6445 requires for $C_{108}H_{182}N_{32}O_{43}$ Na_2 ; found 1330.6411.

1H NMR (400 MHz, D_2O)

δ (ppm): 8.10-8.04 (8 H, s, H-3''), 5.26 (2 H, d, $J = 3.3$ Hz, H-1), 4.99-4.58 (16 H, m, H-1''), 4.57-4.35 (16 H, m, H-4''), 4.07-3.89 (4 H, m, H-3, -5), 3.88-3.74 (16 H, m, H-6'), 3.73-3.52 (16 H, m, H-2, -4, -6, -2'), 3.46-3.36 (8 H, m, H-4'), 3.34-3.25 (8 H, m, H-3'), 3.07-2.95 (8 H, m, H-1'A), 2.90-2.57 (16 H, m, H-6''), 2.38-2.21 (16 H, m, H-1'B, -5'), 2.21-2.04 (16 H, m, H-5'').

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.3-143.7 (C-2''), 125.2-124.8 (C-3''), 92.4 (C-1), 80.4 (C-3), 78.5 (C-2), 78.3 (C-3'), 76.7 (C-4), 70.2 (C-5), 70.1 (C-4'), 68.9 (C-2'), 67.8 (C-6), 65.5 (C-1'), 64.9 (C-5'), 63.6, 63.3 (C-1''), 57.6 (C-6'), 55.4 (C-1'), 48.6 (C-4'', 6''), 24.0 (C-5'').

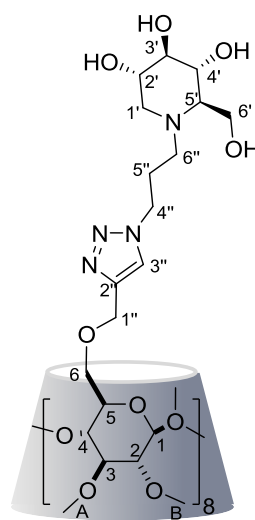
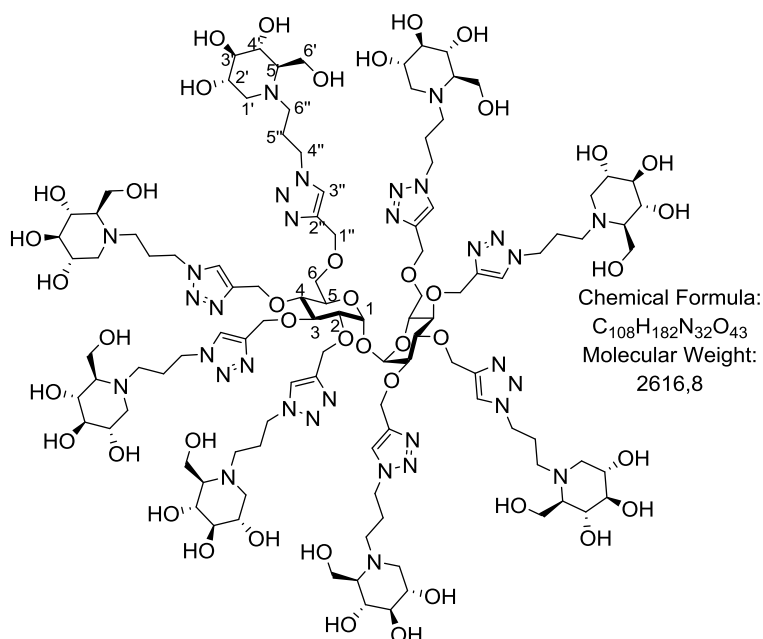
Compound 39:

Obtained following method B. This reaction afforded the compound **39** (91%) as a pale yellow solid.

$[\alpha]_D^{20} = +36.8$ ($c = 0.5$, H_2O).

MALDI, TOF-HRMS (This compound cannot be analyzed by mass spectrometry).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.11 (8 H, s, H-3''), 5.29 (8 H, s, H-1), 4.75-4.54 (16 H, m, H-1''), 4.54-4.38 (16 H, m, H-4''), 4.09-3.51 (112 H, m, H-3, -4, -5, -6, -2', -6', -7'A, -7'B), 3.48-3.37 (8 H, m, H-4'), 3.37-3.25 (16 H, m, H-2, -3'), 3.02 (8 H, dd, $J = 4.75$ Hz, $J = 11$ Hz, H-1'A), 2.94-2.78 (8 H, m, H-6''A), 2.77-2.64 (8 H, m, H-6''B), 2.42-2.26 (m, 16 H, H-1'B, 5'), 2.22-2.07 (16 H, m, H-5'').



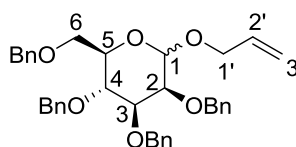
^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.0 (C-2''), 125.0 (C-3''), 96.6 (C-1), 81.4-79.8 (C-3,2), 78.4 (C-3'), 75.8 (C-4), 70.0 (C-5,4'), 68.8 (C-6,2'), 65.0 (C-5'), 63.6 (C-1''), 59.8-58.8 (C-A), 58.4 (C-B), 57.7 (C-6'), 55.5 (C-1'), 48.8 (C-6''), 48.6 (C-4''), 24.2 (C-5'').

Chapitre 2

2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-allyl-D-mannopyranoside (40):

A solution of D-mannose (4.1 g, 22.8 mmol)

in allyl alcohol (75 mL, stored over molecular sieve 3 Å) was refluxed for 4 h in the presence of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (324 μL , 2.28 mmol). After



Chemical Formula:
 $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_6$
Molecular Weight:
580,7

neutralization with Et_3N , excess of allyl alcohol was removed under reduced pressure, by co-evaporation with toluene. The crude product was dissolved in anhydrous DMF (150 mL), and NaH (7.27 g, 181.8 mmol, dispersed in oil, 60%) was added in a small portion at 0°C . The suspension was stirred for one h at rt. Benzyl bromide (22.2 mL, 181.8 mmol) was added dropwise, and the reaction mixture was stirred for one night at rt. The mixture was cooled at 0°C , MeOH (30 mL) was added to quench the excess of NaH. After 30 min of stirring at rt the solvent was removed. H_2O (150 mL) was added to the resulting mixture and the crude material was extracted with diethyl ether (2 x 250 mL). The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered, and the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 95/5) affording **40** (8.16 g, 62% on two steps, mixture of α - β).

R_f = 0.3 (Cyclohexane/EtOAc: 90/10).

ES-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 603.2717 requires for $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Na}$; found 603.2721.

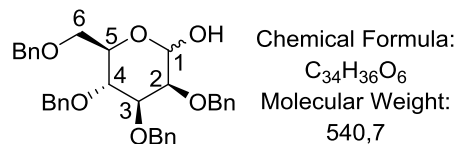
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3031 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2914 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2860 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1630 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1495 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1454 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1363 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1136 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1098 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1052 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), , 911, 855, 832 ($\nu_{\text{C-H}}$), 736 ($\nu_{\text{C-H}}$), 698 ($\nu_{\text{C-H}}$).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.49-7.17 (m, 20H, H_{Ar}), 5.98-5.82 (m, 1H, H-2'), 5.32-5.15 (m, 2H, H-3'), 4.99 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-1), 4.94 (d, J = 10.7 Hz, 1H, CH2Ph), 4.82-4.53 (m, 7H, CH2Ph), 4.22 (dtd, 1H, J = 1.5 Hz, J = 5.0 Hz, J = 13.9 Hz, H-1'), 4.10-3.94 (m, 3H, H-3, 4, 1'), 3.89-3.76 (m, 4H, H-2, 5, 6).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 138.7, 138.6, 138.5 (C_{Ar}), 133.9 (C-2'), 128.6-127.4 (C-H_{Ar}), 117.3 (C-3'), 97.2 (C-1), 80.4 (C-3), 75.3 (CH_2Ph), 71.5 (C-4), 74.8 (C-2), 73.5, 72.7, 72.3 (CH_2Ph), 70.0 (C-5), 69.4 (C-6), 67.9 (C-1').

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-mannopyranose (41):

To a solution of compound **40** (1.65g, 2.85 mmol) in 15 mL of MeOH/DCM (2/1) was added PdCl_2 (100mg, 0.568 mmol) under Argon. The reaction



was stirred overnight, and the catalyst was filtered over celite. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 75/25) affording **41** (1.2 mg, 78%, mixture of α - β /75-25) as a colorless syrup.

Rf = 0.3 (Cyclohexane/EtOAc: 70 / 30).

ES-HRMS [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ **m/z** 563.2404 requires for $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Na}$; found 563.2396.

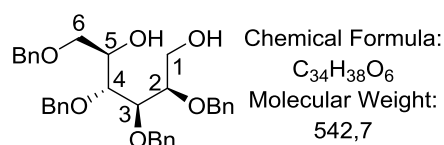
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3422 (ν_{OH}), 3064 (ν_{OH}), 3031 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2922 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2860 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1496 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1454 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1363 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1135 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1097 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1028 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 911, 858, 830 ($\nu_{\text{C-H}}$), 736 ($\nu_{\text{C-H}}$), 697 ($\nu_{\text{C-H}}$).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.41-7.14 (m, 27H, H_{Ar}), 5.26 (d, $J = 1.62$ Hz, 1H, H-1_α), 5.11-5.07 (2s, 0.35H), 4.96-4.84 (m, 1.55H, CH_2Ph), 4.80-4.48 (m, 9.6H, CH_2Ph , H-1_β), 5.09-4.01 (m, 1H, H-5_α), 3.97 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 9.2$ Hz, 1.35 H, H-3_α , 4_β) 3.93-3.83 (m, 1.35 H, H-4_α , 2_β), 3.82-3.78 (m, 1H, H-2_α), 3.76-3.73 (m, 0.7 H, H-6_β), 3.73-3.64 (m, 2H, H-6_α), 3.60 (dd, 0.35 H, $J = 2.8$ Hz $J = 9.4$ Hz, H-3_β), 3.50-3.42 (m, 0.3H, H-5_β).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 138.7-138.0 (C_{Ar}), 128.5-127.5 (C-H_{Ar}), 93.9 (C-1 $_\beta$), 92.9 (C-1 $_\alpha$), 83.2 (C-3 $_\beta$), 79.9(C-3 $_\alpha$), 76.2 (C-2 $_\beta$), 75.3 (C-4 $_\alpha$, 5 $_\beta$), 75.2 ($\text{CH}_2\text{Ph}_\alpha$), 74.9 (C-2 $_\alpha$), 74.8 ($\text{CH}_2\text{Ph}_\beta$), 74.7 (C-4 $_\beta$), 73.7 ($\text{CH}_2\text{Ph}_\beta$), 73.4 ($\text{CH}_2\text{Ph}_\alpha$), 73.0 ($\text{CH}_2\text{Ph}_\beta$), 72.8, 72.3 ($\text{CH}_2\text{Ph}_\alpha$), 71.7 (C-5 $_\alpha$), 69.8 (C-6 $_\alpha$), 69.2 (C-6 $_\alpha$).

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-mannitol (42):

To a solution of compound **42** (1.2 g, 2.2 mmol) in anhydrous THF (20mL) at 0 °C, was carefully added LiAlH_4 (337 mg, 8.9 mmol) in small portions, and



the mixture stirred overnight at rt. Excess of LiAlH_4 was quenched by the careful addition of MeOH (10 mL). EtOAc (50 mL) was added, and the resulting mixture was washed with HCl (3 x 30 mL, 1M); the organic layer phase was separated, washed successively

with sat. aq NaHCO₃ (2 x 30 mL), dried (MgSO₄), and evaporated under reduced pressure to afford **42** (1.1g, 92%) as a colorless viscous syrup.

R_f = 0.4 (Cyclohexane/EtOAc: 60 / 40)

[α]_D²⁰ = +8 (c = 1, CHCl₃).

ES-HRMS [M+Na]⁺ m/z 565.2561 requires for C₃₄H₃₈O₆Na; found 565.2553.

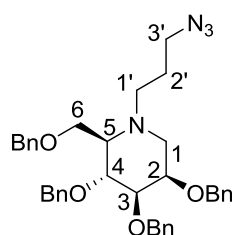
FT-IR: (ATR, cm⁻¹) 3447 (ν_{OH}), 3088 (ν_{C-H}), 2869 (ν_{C-H}), 1497 (ν_{C=C}), 1454 (ν_{C=C}), 1207 (ν_{C-OH}), 1095 (ν_{C-O-C}), 1065 (ν_{CH-O-H}), 1028 (ν_{CH-O-H}), 911, 735 (ν_{C-H}), 697 (ν_{C-H}).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.42-7.18 (m, 20H, H_{Ar}), 4.76 (s, 2H, CH₂Ph), 4.68-4.42 (m, 6H, CH₂Ph), 4.10-4.02 (m, 2H, H-3, 5), 3.95 (dd, J = 3.9 Hz, J = 12.0 Hz, 1H, H-1_A), 3.87-3.73 (m, 3H, H-2, 4, 1_B), 3.73-3.60 (m, 2H, H-6), 2.38 (b, 2H, -OH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 138.3, 138.2, 138.1, 138.0 (C_{Ar}), 128.9-127.4 (C-H_{Ar}), 79.6 (C-4), 78.7 (C-2), 78.4 (C-3), 74.5, 73.8, 73.5, 71.6 (CH₂Ph), 71.3 (C-6), 70.4 (C-5), 60.5 (C-1).

N-(3-azidopropyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol (44):

To a solution of DMSO (196 μL, 2.8 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) at -78 °C was added dropwise under N₂, a solution of oxalyle chloride at 2M in CH₂Cl₂ (1.1 mL, 2.2 mmol) and the mixture was stirred for 45 min at -78 °C. Then a solution of diol



Chemical Formula:
C₃₇H₄₂N₄O₄
Molecular Weight:
606,8

42 (300 mg, 0.55 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added dropwise; with the temperature of the mixture below -78 °C during the addition. The mixture was stirred for 2 h at -78 °C. A solution of Et₃N (0.9 mL, 6.62 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) was then added dropwise and the mixture was allowed to warm to rt. After 30 min, the solvent was removed under vacuum, and the crude residue was dissolved in MeOH (3 mL) and 3-azido-1-propylamine **4** (220 mg, 2.2 mmol) was added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for 30 min. Then, sodium cyanoborohydride (114 mg, 2.2 mmol) was added and the mixture was irradiated for 1 h at 50 °C (300 W) in a sealed vessel. After evaporation of the organic solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in DCM (15 mL) and the organic layer was washed with NaHCO₃ satd. (2 x 20 mL), dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 95/5) to afford **44** (120 mg, 36% on two steps) as a colorless oil.

Rf = 0.4 (Cyclohexane/EtOAc: 8/2).

$[\alpha]_D^{20} = -12$ ($c = 1$, CHCl_3).

ES-HRMS $[M+H]^+$ m/z 607.3279 requires for $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$; found 607.3277.

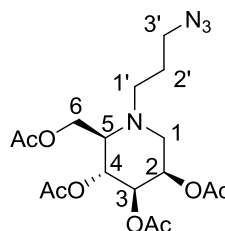
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3088 ($\nu_{\text{C-H}}$), 3063 ($\nu_{\text{C-H}}$), 3030 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2923 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2866 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2094 (ν_{N_3}), 1636 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1453 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1207 ($\nu_{\text{C-C-N}}$), 1097 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1070, 1028, 736 ($\nu_{\text{C-H}}$), 698 ($\nu_{\text{C-H}}$), 669 ($\nu_{\text{C-H}}$).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.37-7.18 (m, 20H, $20 \times \text{Har}$), 4.73 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, CH_2Ph), 4.68-4.38 (m, 7H, CH_2Ph), 3.84-3.76 (m, 2H, H-2, H-4), 3.74-3.65 (m, 2H, $2 \times \text{H-6}$), 3.58 (dd, 2H, $J_{2,3} = 3.2$ Hz $J_{3,4} = 6.8$ Hz, H-3), 3.25 (2H, t, $J_{3',2'} = 6.8$ Hz, H-3'), 2.97 (1H, dd, $J_{1a,1b} = 12.2$ Hz, $J_{1a,2} = 6.2$ Hz, H-1a), 2.88-2.77 (m, 1H, H-1'a), 2.75-2.69 (m, 1H, H-5), 2.69-2.60 (m, 1H, H-1'b), 2.34 (dd, 1H, $J_{1a,1b} = 12.2$, $J_{1b,2} = 2.2$ Hz, H-1b), 1.76-1.59 (m, 2H, $2 \times \text{H-2'}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 138.9, 138.8, 138.7, 138.5 (Car), 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 (CHar), 80.2 (C-3), 76.2 (C-4), 73.8, 73.2 (CH_2Ph), 72.4 (C-2), 72.2, 71.3 (CH_2Ph), 68.2 (C-6), 62.8 (C-5), 50.8 (C-1'), 50.3 (C-1), 49.7 (C-3'), 26.0 (C-2').

N-(3-azidopropyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol (47):

Conventional catalytic hydrogenation of **44** (2.8 g, 4.66 mmol) was carried out with $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (3.3 g, 4.66 mmol) in MeOH-1M aq. HCl solution (50 mL, 3:1) at 1 atm for 15 h. Then, the catalyst was filtered over celite, the solvent was removed under



Chemical Formula:
 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8$
Molecular Weight:
414.4

reduced pressure. Imidazole-1-sulfonyl azide **7** (1.21 mg, 7.00 mmol) was added to a crude mixture of **45** (1.2 g, 4.66 mmol) with K_2CO_3 (2.57 g, 18.64 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (12 mg, 46.6 μmol) in MeOH (45 mL) and the mixture was stirred overnight at rt. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude mixture was dissolved in pyridine-acetic anhydride (1:1, 50 mL) and stirred for 24 h. Water (25 mL) was slowly added at 0°C to quench the reaction. The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 25 mL). The combined organic layers were washed with an aqueous solution of HCl (1M, 2 x 25 mL) and a saturated aqueous NaHCO_3 solution (1 x 25 mL). The mixture was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 7/3) affording **47** as a yellow oil (620 mg, 32 % for three steps).

Rf = 0.4 (Cyclohexane/EtOAc: 6/4).

$[\alpha]_D^{20} = -42$ (c = 1, CHCl₃).

ES-HRMS [M+H]⁺ m/z 415.1823 requires for C₁₇H₂₇N₄O₈; found 415.1823.

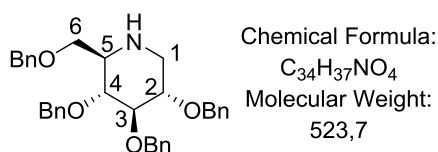
FT-IR: (ATR, cm⁻¹) 2940 (ν_{C-H}), 2821 (ν_{C-H}), 2099 (ν_{N3}), 1743 (ν_{C=O}), 1457, 1372 (ν_{C=C}), 1231 (ν_{C-C-N}), 1050 (ν_{C-O-C}), 737, 668 (ν_{C-H}).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 5.27-5.23 (m, 1H, H-2), 5.20 (t, 1H, H-4), 5.02 (dd, J = 3.5 Hz, J = 7.8 Hz, 1H, H-3), 4.32-4.18 (m, 2H, H-6), 3.40-3.27 (m, 2H, H-3'), 3.05 (dd, J = 5.9 Hz, J = 13.1 Hz, 1H, H-1_a), 2.92-2.82 (m, 1H, H-1'_a), 2.71-2.63 (m, 1H, H-1'_b), 2.60 (dd, J = 2.4 Hz, J = 13.1 Hz, 1H, H-1_b), 2.09, 2.08, 2.06, 2.03 (4s, 12H, C=OCH₃), 1.74-1.65 (m, 2H, H-2').

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.9, 170.5, 170.0, 169.8 (C=O), 71.1 (C-3), 68.3 (C-4), 67.0 (C-2), 61.5 (C-5), 60.2 (C-6), 49.9 (C-1), 49.8 (C-1'), 49.1 (C-3'), 25.9 (C-2'), 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (CH₃).

2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (48):

To a solution of DMSO (645 μL, 9.2 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) at -78 °C was added dropwise under N₂, a solution of oxalyle chloride at 2M in CH₂Cl₂ (3.68 mL, 7.36 mmol) and the mixture was stirred



for 45 min at -78 °C. Then a solution of diol **2** (1g, 1.84 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise; with the temperature of the mixture below -78 °C during the addition. The mixture was stirred for 2 h at -78 °C. A solution of Et₃N (3 mL, 22 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was then added dropwise and the mixture was allowed to warm to rt. After 30 min, the solvent was removed under vacuum, and the crude residue was dissolved in MeOH (25 mL). Ammonia in MeOH (1.05 mL, 7.36 mmol) was added dropwise at 0°C and the mixture was stirred at 0°C for 30 min. Then, sodium cyanoborohydride (380 mg, 7.36 mmol) was added and the mixture was irradiated for 1 h at 50 °C (300 W) in a sealed vessel. After evaporation of the organic solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in DCM (25 mL) and the organic layer was washed with NaHCO₃ satd. (2 x 25 mL), dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (DCM/Et₃N: 99/1) affording **48** (400 mg, 42%) as a yellow oil.

Rf = 0.4 (DCM/Et₃N: 99 / 1).

$[\alpha]_D^{20} = +33.6$ ($c = 1$, CHCl_3).

ES-HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 524.2801 requires for $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{NO}_4$; found 524.2794.

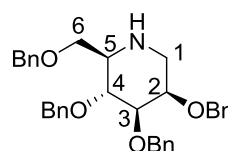
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 1628 (ν_{NH}), 1452 ($\nu_{\text{C-N}}$), 1082 ($\nu_{\text{CH-OH}}$), 1046 ($\nu_{\text{CH-OH}}$), 960, 893.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.40-7.12 (m, 20H, H_{Ar}), 4.96 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.83 (t, $J = 11$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.67-4.58 (m, 2H, CH_2Ph), 4.50-4.35 (m, 3H, CH_2Ph), 3.67-3.59 (m, 1H, H-2), 3.56-3.41 (m, 3H, H-4, 6), 3.33 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 3.20 (dd, $J = 12.2$ and 4.9 Hz, 1H, H-1a), 2.73-2.65 (m, 1H, H-5), 2.46 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-1b), 1.91 (br s, 1H, N-H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 138.9, 138.5, 138.4 138.0 (C_{ar}), 139.3-127.1 ($\text{C}_{\text{H}_{\text{Ar}}}$), 87.3 (C-3), 80.6 (C-4), 80.1 (C-2), 75.5, 75.1, 73.3, 72.6 (CH_2Ph), 70.2 (C-5), 59.7 (C-6), 48.1 (C-1).

2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol (49):

To a solution of DMSO (500 μL , 6.44 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) at -78 $^\circ\text{C}$ was added dropwise under N_2 , a solution of oxalyle chloride at 2M in CH_2Cl_2 (2.5 mL, 5.2 mmol) and the mixture was



Chemical Formula:
 $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{NO}_4$
Molecular Weight:
523,7

stirred for 45 min at -78 $^\circ\text{C}$. Then a solution of diol **42** (700 mg, 1.3 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added dropwise; with the temperature of the mixture below -78 $^\circ\text{C}$ during the addition. The mixture was stirred for 2 h at -78 $^\circ\text{C}$. A solution of Et_3N (2.2 mL, 15.5 mmol) in CH_2Cl_2 (4 mL) was then added dropwise and the mixture was allowed to warm to rt. After 30 min, the solvent was removed under vacuum, and the crude residue was dissolved in MeOH (15 mL). Ammonia in MeOH (738 μL , 5.5 mmol) was added dropwise at 0°C , and the mixture was stirred at 0°C for 30 min. Then, sodium cyanoborohydride (380 mg, 7.36 mmol) was added and the mixture was irradiated for 1 h at 50 $^\circ\text{C}$ (300 W) in a sealed vessel. After evaporation of the organic solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in DCM (10 mL) and the organic layer was washed with NaHCO_3 satd. (2 x 15 mL), dried over MgSO_4 and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/ $\text{EtOAc}/\text{Et}_3\text{N}$: 5/5/0.05 \Rightarrow 3/7/0.05) to afford **49** (206 mg, 30%) as a yellow oil.

Rf = 0.3 (Cyclohexane/ $\text{EtOAc}/\text{Et}_3\text{N}$: 3/7/0.05).

$[\alpha]_D^{20} = -5.0$ ($c = 1$, CHCl_3).

MALDI, TOF-HRMS $[M+H]^+$ m/z 524.2795 requires for $C_{34}H_{38}NO_4$; found 524.2773.

FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 1630 (ν_{NH}), 1450 (ν_{C-N}), 1081 (ν_{CH-OH}), 1046 (ν_{CH-OH}), 954, 894.

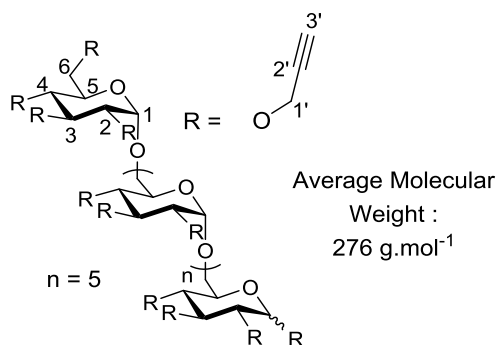
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.44-7.20 (m, 20H, H_{Ar}), 4.96 (d, $J = 10.8.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.79-4.6 (m, 4H, CH_2Ph), 4.58-4.45 (m, 3H, CH_2Ph), 3.96 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-4), 3.82-3.79 (m, 1H, H-2), 3.76 (dd, $J = 3.9$ and 9.0 Hz, 1H, H-6a), 3.64 (dd, $J = 2.5$ and 9.0 Hz, 1H, H-6b), 3.52 (dd, $J = 2.9$ and 9.4 Hz, 1H, H-3), 3.16 (dd, $J = 2.9$ and 14.4 Hz, 1H, H-1a), 2.63 (ddd, $J = 2.9, 3.7$ and 9.7 Hz 1H, H-2), 2.51 (dd, $J = 0.8$ and 14.4 Hz 1H, H-1b), 2.16 (br s, 1H, N-H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 138.9, 138.8, 138.5 (C_{Ar}), 128.8-127.3($C-H_{Ar}$), 84.6 (C-3), 77.0 (C-4), 75.4(CH_2Ph), 74.0 (C-2), 73.4, 71.9, 71.4 (CH_2Ph), 69.7(C-6), 60.4 (C-5), 47.0 (C-1).

Compound 50:

Obtained following method D. This reaction afforded the compound **50** (107 mg, 63%) as a yellow solid.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5.15-4.93 (m broad, 1H, H-1), 4.54-4.19 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.94-3.65 (m broad, 4H, H-1'), 3.62-3.44 (m broad, 2H, H-1'), 2.70-2.35 (m broad, 3.2H, H-3').

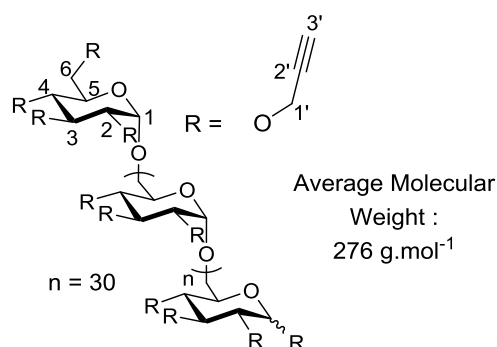


FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3307 (ν_{C-H}), 2932 (ν_{CH_2}), 2120 ($\nu_{C\equiv C}$), 1355 (ν_{C-O}), 1085 (ν_{C-O-C}).

Compound 51:

Obtained following method D. This reaction afforded the compound **51** (116 mg, 68%) as a yellow solid.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5.17-4.94 (m broad, 1H, H-1), 4.58-4.14 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.96-3.67 (m broad, 4H, H-1'), 3.64-3.42 (m broad, 2H, H-1'), 2.71-2.42 (m broad, 2.8H, H-3').



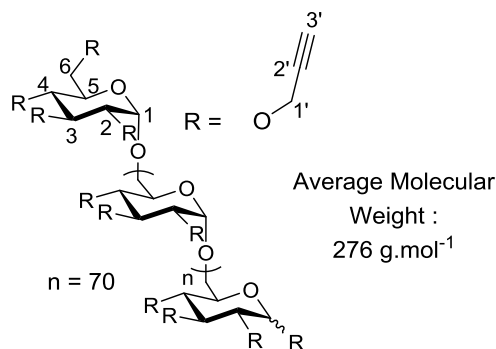
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3306 (ν_{C-H}), 2927, 2856 (ν_{CH_2}), 2120 ($\nu_{C\equiv C}$), 1358 (ν_{C-O}), 1084 (ν_{C-O-C}).

Compound 52:

Obtained following method D. This reaction afforded the compound **52** (114 mg, 67%) as a yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.22-4.90 (m broad, 1H, H-1), 4.66-4.12 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 4.00-3.64 (m broad, 4H, H-1'), 3.64-3.3.37 (m broad, 2H, H-1'), 2.77-2.41 (m broad, 2.94H, H-3').

FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3290 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2929 (ν_{CH_2}), 2118 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1358 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1084 ($\nu_{\text{C-O-C}}$).

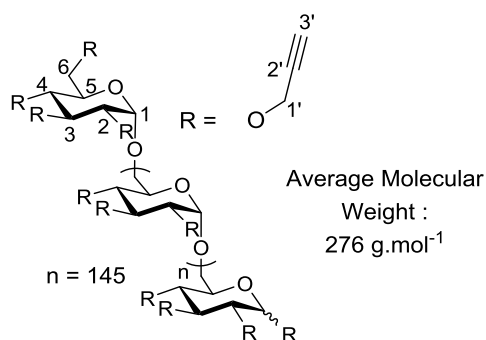


Compound 53:

Obtained following method D. This reaction afforded the compound **53** (133 mg, 78%) as a yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.14-4.92 (m broad, 1H, H-1), 4.55-4.19 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.94-3.64 (m broad, 4H, H-1'), 3.63-3.37 (m broad, 2H, H-1'), 2.63-2.40 (m broad, 2.92H, H-3').

FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3291 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2932 (ν_{CH_2}), 2118 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1357 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1085 ($\nu_{\text{C-O-C}}$).

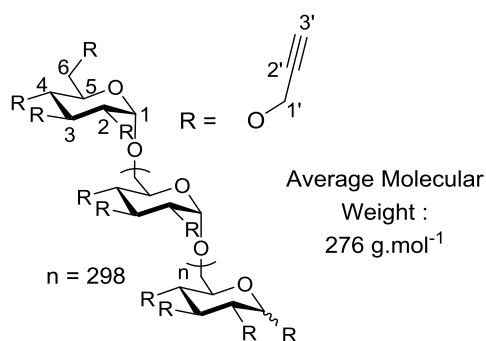


Compound 54:

Obtained following method D. This reaction afforded the compound **54** (135 mg, 79%) as a yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.13-4.97 (m broad, 1H, H-1), 4.62-4.16 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.97-3.67 (m broad, 4H, H-1'), 3.65.94-3.43 (m broad, 2H, H-1'), 2.65-2.40 (m broad, 2.92H, H-3').

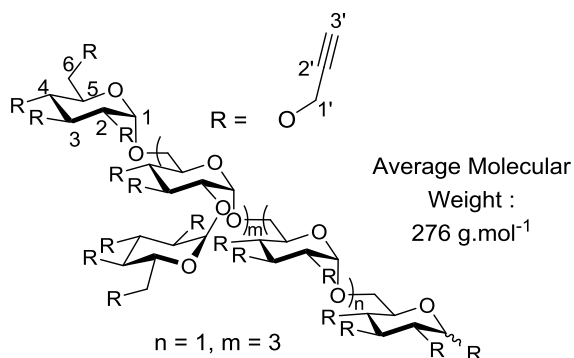
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3290 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2930 (ν_{CH_2}), 2118 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1361 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1085 ($\nu_{\text{C-O-C}}$).



Compound 55:

Obtained following method D. This reaction afforded the compound **55** (111 mg, 65%) as a yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.22-4.93 (m broad, 1H, H-1), 4.60-4.11 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.94-3.31 (m broad, 6H, H-1'), 2.70-2.35 (m broad, 3H, H-3').

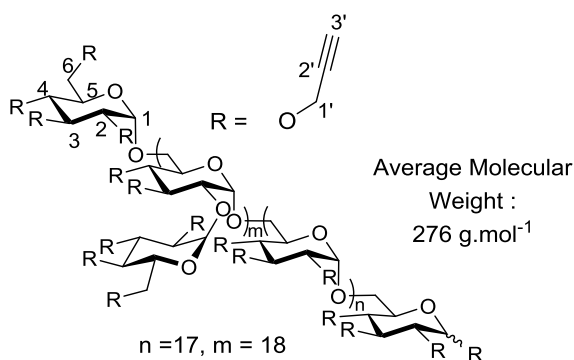


FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3293 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2930 (ν_{CH_2}), 2857 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2118 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1357 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1082 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 638 ($\nu_{\text{C-H}}$).

Compound 56:

Obtained following method D. This reaction afforded the compound **56** (131 mg, 77%) as a yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.22-4.91 (m broad, 1H, H-1), 4.60-4.09 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.99-3.37 (m broad, 6H, H-1'), 2.73-2.37 (m broad, 3.2H, H-3').



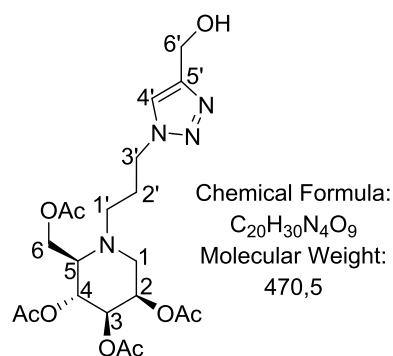
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3293 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2932 (ν_{CH_2}), 2119 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1358 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1083 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 668 ($\nu_{\text{C-H}}$).

N-(3-(4-hydroxymethyl-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol (**57**):

Obtained following method D. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **57** (22 mg, 79% of yield) as a colorless oil.

$R_f = 0.4$ (96/4 DCM/MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -37.5$ ($c = 1, \text{CHCl}_3$).



MALDI, TOF-HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 471.2086 requires for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_9$; found 471.2085.

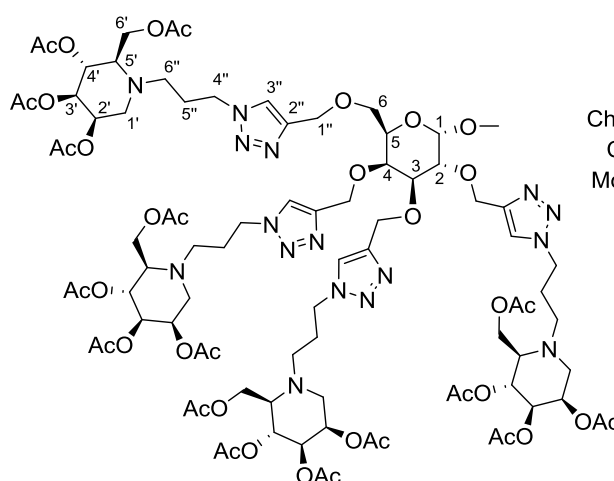
FT-IR: (ATR, cm^{-1}) 3396 (ν_{OH}), 3029 (ν_{CH}), 2951, 2869 (ν_{CH_2}), 2868 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1496 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1452 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1363, 1266 ($\nu_{\text{C-O}}$), 1208 ($\nu_{\text{C-C-N}}$), 1174, 1140 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1101 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 1063, 1028, 1014, 737, 699 ($\nu_{\text{C-H}}$).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.55 (s, 1H, H-4'), 5.26-5.20 (m, 1H, H-2), 5.17 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz, H-4), 5.05 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-3), 4.79 (s, 1H, H-6'), 4.51-4.41 (m, 1H, H-3'A), 4.41-4.31 (m, 1H, H-3'B), 4.26-4.13 (m, 2H, H-6), 3.04 (dd, $J = 6.6$ Hz, $J = 12.9$ Hz, 1H, H-1A), 2.87-2.79 (m, 1H, H-5), 2.79-2.70 (m, 1H, H-1'A), 2.66-2.55 (m, 2H, H-1B, 1'B), 2.09, 2.07, 2.06, 2.04 (4s, 14H, H-2', C=OCH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.0, 170.5, 169.9, 169.7 (C=O), 148.1 (C-5'), 122.0 (C-4'), 70.6 (C-3), 68.4 (C-4), 66.8 (C-2), 61.2 (C-5), 60.3 (C-6), 56.9 (C-6'), 49.5 (C-1'), 49.1 (C-1), 47.6 (C-3'), 27.4 (C-2'), 21.1, 21.0, 20.8 (CH₃).

Compound 58:

Obtained following method A. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 97/3 (DCM/MeOH) as eluent to afford the compound **58** (61% yield) as a colorless oil.



Chemical Formula:
C₈₇H₁₂₆N₁₆O₃₈
Molecular Weight:
2004.0

R_f = 0.55 (DCM/MeOH: 95/5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -19.6 ($c = 1$, CHCl_3).

MALDI, TOF-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 2025.8311 requires for C₈₇H₁₂₆N₁₆O₃₈Na; found 2025.8234.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.87, 7.74, 7.73, 7.64 (4 H, s, H-3''), 5.27-5.22 (m, 4H, H-2'), 5.22-5.15 (m, 4H, H-4'), 5.07-4.99 (m, 4H, H-3'), 4.93 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-1''), 4.86-4.71 (m, 6 H, H-1, 1''), 4.60 (q, $J = 12.3$ Hz, $J = 28.2$ Hz, 2H, H-1''), 4.51-4.39 (m, 4H, H-4''A), 4.39-4.30 (m, 4H, H-4''B), 4.30-4.17 (m, 8H, H-6'), 4.02-3.99 (m, 1H, H-4), 3.97 (dd, $J = 3.5$ Hz, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-2), 3.90-3.84 (m, 2H, H-3, 5), 3.54 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-6), 3.35 (s, 3H, CH₃), 3.13-3.02 (m, 4H, H-1'A), 2.91-2.77 (m, 8H, H-5', 6''A), 2.74-2.58 (m, 8H, H-1'B, 6''B), 2.12-1.99 (m, 56H, H-5'', C=OCH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.8, 170.4, 169.9, 169.7 (C=O), 145.4, 145.3, 145.2 144.8 (C-2''), 123.5, 123.3, 123.0 (C-3''), 98.5 (C-1), 78.8 (C-3), 78.5 (C-2), 74.8 (C-4), 71.0, 70.9, 70.8 (C-3'), 69.1 (C-5), 69.0 (C-6), 68.3 (C-4'), 66.8 (C-2'), 66.1, 65.1, 64.8, 64.7 (C-1''), 61.3 (C-5'), 56.9 (C-6'), 60.1 (C-1'), 55.4 (CH₃), 49.7, 49.6, 49.4, 49.3

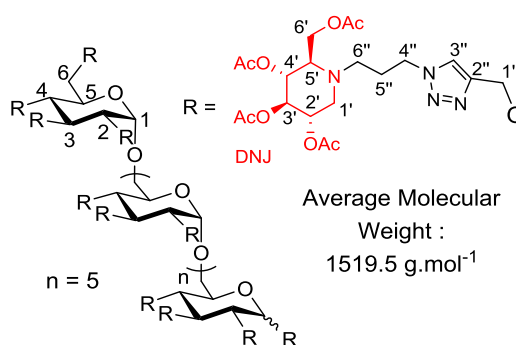
(C-1', 6''), 47.8, 47.7 (C-4''), 27.5, 27.3 (C-5''), 21.1, 21.0, 20.9, 20.8 (CH₃).

Compound 59:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **59** (64 mg, 58%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.38-7.56 (m broad, 3H, H-3''), 5.20-4.51 (m broad, 16H, H-1,2',3',4',1''), 4.48-4.26 (m broad, 6H, H-4''), 4.21-4.04 (m broad, 6H, H-6'), 3.89-3.48 (m broad, 6H, H-2,3,4,5,6), 3.28-3.11 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.98-2.78 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.75-2.48 (m broad, 6H, H-5',6''_B), 2.39-2.23 (m broad, 3H, H-1'_B), 2.18-1.80 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 171.7, 170.3, 170.0, 169.8 (C=O), 145.1 (C-2''), 123.9 (C-3''), 97.1 (C-1), 81.3 (C-3), 80.1 (C-2), 76.4 (C-4), 74.6 (C-3'), 71.3 (C-5), 69.5 (C-4'), 69.2 (C-2'), 66.0-64.0 (C-6,1''), 62.0 (C-5'), 59.8 (C-6'), 52.9 (C-1'), 48.7 (C-6''), 48.1 (C-4''), 26.9 (C-5''), 21.0, 20.8 (CH₃).

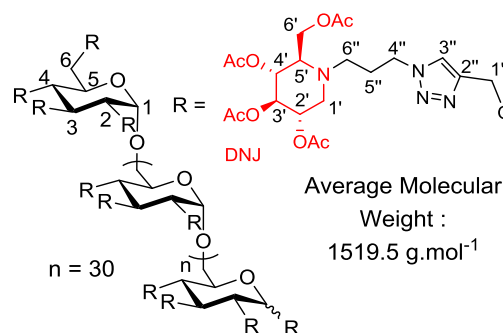


Compound 60:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **60** (61 mg, 55%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.20-7.56 (m broad, 3H, H-3''), 5.13-4.59 (m broad, 16H, H-1,2',3',4',1''), 4.50-4.27 (m broad, 6H, H-4''), 4.17-4.06 (m broad, 6H, H-6'), 3.91-3.55 (m broad, 6H, H-2,3,4,5,6), 3.27-3.11 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.95-2.79 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.75-2.49 (m broad, 6H, H-5',6''_B), 2.41-2.24 (m broad, 3H, H-1'_B), 2.19-1.83 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 171.6, 170.2, 170.0, 169.7 (C=O), 145.1 (C-2''), 123.7 (C-3''), 96.7 (C-1), 79.9 (C-3), 79.0 (C-2), 76.4 (C-4), 74.4 (C-3'), 70.6 (C-5), 69.4 (C-4'), 69.2 (C-2'), 66.1-64.1 (C-6,1''), 62.0 (C-5'), 59.8 (C-6'), 52.8 (C-1'), 48.6 (C-6''), 48.0 (C-4''), 27.0 (C-5''), 21.1, 20.9, 20.8 (CH₃).

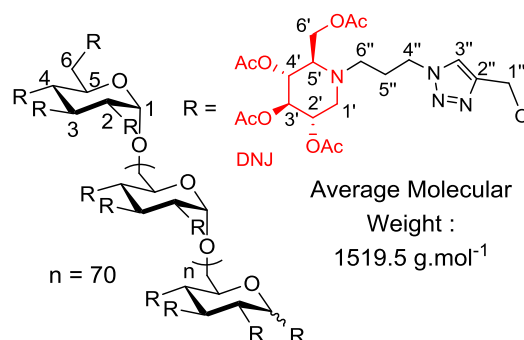


Compound 61:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **61** (73 mg, 66%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.30-7.51 (m broad, 3H, H-3''), 5.08-4.56 (m broad, 16H, H-1,2',3',4',1''), 4.45-4.27 (m broad, 6H, H-4''), 4.18-4.04 (m broad, 6H, H-6'), 3.86-3.30 (m broad, 6H, H-2,3,4,5,6), 3.26-3.10 (m broad, 3H, H-1'A), 2.96-2.81 (m broad, 3H, H-6''A), 2.75-2.49 (m broad, 6H, H-5',6''B), 2.41-2.23 (m broad, 3H, H-1'B), 2.16-1.86 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 171.7, 170.3, 170.0, 169.8 (C=O), 145.1 (C-2''), 123.9 (C-3''), 97.1 (C-1), 81.3 (C-3), 79.9 (C-2), 76.4 (C-4), 74.6 (C-3'), 70.9 (C-5), 69.4 (C-4'), 69.2 (C-2'), 66.0-64.0 (C-6,1''), 62.0 (C-5'), 59.8 (C-6'), 52.8 (C-1'), 48.7 (C-6''), 48.0 (C-4''), 26.9 (C-5''), 20.9, 20.8 (CH₃).

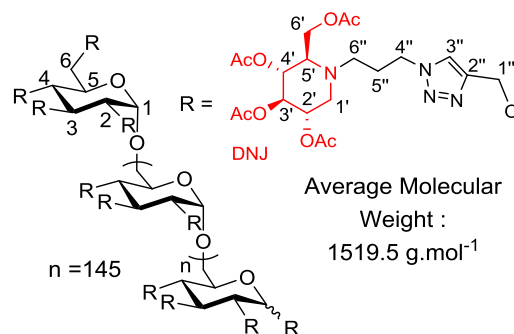


Compound 62:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **62** (71 mg, 64%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.27-7.68 (m broad, 3H, H-3''), 5.16-4.55 (m broad, 16H, H-1,2',3',4',1''), 4.53-4.22 (m broad, 6H, H-4''), 4.20-3.96 (m broad, 6H, H-6'), 3.85-3.29 (m broad, 6H, H-2,3,4,5,6), 3.27-3.07 (m broad, 3H, H-1'A), 2.98-2.77 (m broad, 3H, H-6''A), 2.75-2.48 (m broad, 6H, H-5',6''B), 2.40-2.22 (m broad, 3H, H-1'B), 2.16-1.60 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 171.7, 170.3, 170.0, 169.8 (C=O), 145.0 (C-2''), 125.4 (C-3''), 97.6 (C-1), 81.3 (C-3), 79.9 (C-2), 76.4 (C-4), 74.6 (C-3'), 70.6 (C-5), 69.5 (C-4'), 69.2 (C-2'), 66.3-64.8 (C-6,1''), 62.0 (C-5'), 59.8 (C-6'), 52.8 (C-1'), 48.7 (C-6''), 48.0 (C-4''), 26.9 (C-5''), 20.9, 20.8 (CH₃).

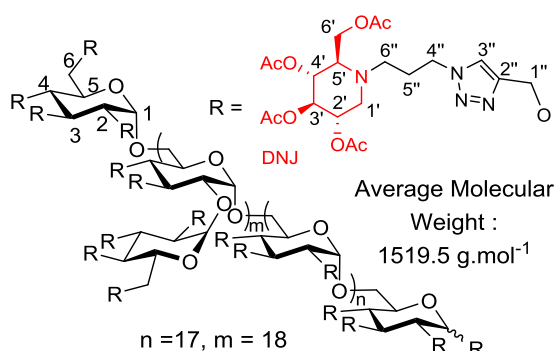


Compound 65:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **65** (57 mg, 52%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.33-7.67 (m broad, 3H, H-3''), 5.20-4.59 (m broad, 16H, H-1,2',3',4',1''), 4.52-4.25 (m broad, 6H, H-4''), 4.22-4.01 (m broad, 6H, H-6'), 3.88-3.39 (m broad, 6H, H-2,3,4,5,6), 3.25-3.12 (m broad, 3H, H-1'A), 3.01-2.97 (m broad, 3H, H-6''A), 2.74-2.55 (m broad, 6H, H-5',6''B), 2.41-2.25 (m broad, 3H, H-1'B), 2.14-1.86 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.7, 170.3, 170.0, 169.8 (C=O), 144.9 (C-2''), 124.2 (C-3''), 95.2 (C-1), 81.3-80.0 (C-3,2), 76.3 (C-4), 74.5 (C-3'), 69.4 (C-5, 4'), 69.2 (C-2'), 66.3-66.0 (C-6,1''), 62.1 (C-5'), 59.8 (C-6'), 52.9 (C-1'), 48.6 (C-6''), 48.0 (C-4''), 26.8 (C-5''), 20.9, 20.8, (CH₃).

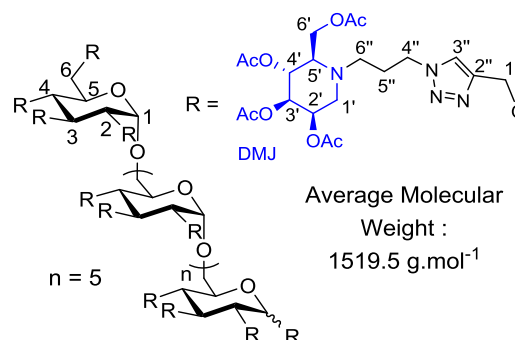


Compound 66:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **66** (32 mg, 58%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.25-7.70 (m broad, 3H, H-3''), 5.35-5.10 (m broad, 7H, H-1,2',4'), 5.07-4.94 (m broad, 3H, H-3'), 4.94-4.60 (m broad, 6H, H-1''), 4.52-4.29 (m broad, 6H, H-4''), 4.29-4.14 (m broad, 6H, H-6'), 3.87-3.41 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.15-3.00 (m broad, 3H, H-1'A), 2.95-2.77 (m broad, 6H, H-1'B,5'), 2.76-2.55 (m broad, 6H, H-6''), 2.23-1.76 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.8, 170.4, 170.0, 169.8 (C=O), 145.1 (C-2''), 123.8 (C-3''), 97.1 (C-1), 81.5 (C-3), 80.2 (C-2), 76.7 (C-4), 71.4 (C-3'), 70.5 (C-5,6), 68.2 (C-4'), 67.0 (C-2'), 66.5-65.2 (C-1''), 61.3 (C-5'), 60.1 (C-6'), 50.0 (C-1',6''), 47.9 (C-4''), 27.3 (C-5''), 21.2, 21.0, 20.9 (CH₃).

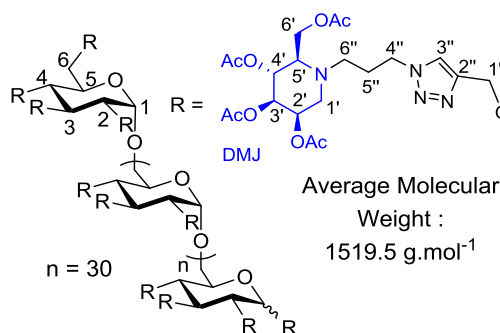


Compound 67:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **67** (30 mg, 54%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.26-7.65 (m broad, 3H, H-3''), 5.38-5.14 (m broad, 7H, H-1,2',4'), 5.09-4.98 (m broad, 3H, H-3'), 4.92-4.65 (m broad, 6H, H-1''), 4.53-4.34 (m broad, 6H, H-4''), 4.32-4.15 (m broad, 6H, H-6'), 3.86-3.47 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.18-3.02 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.99-2.79 (m broad, 6H, H-1'_{B,5'}), 2.77-2.52 (m broad, 6H, H-6''), 2.38-1.78 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.9, 170.5, 170.0, 169.9 (C=O), 145.2 (C-2''), 124.2 (C-3''), 97.3 (C-1), 81.5 (C-3), 80.1 (C-2), 76.6 (C-4), 71.1 (C-3'), 70.7 (C-5,6), 68.0 (C-4'), 67.0 (C-2'), 66.3-65.5 (C-1''), 61.4 (C-5'), 60.0 (C-6'), 50.0 (C-1',6''), 47.9 (C-4''), 27.2 (C-5''), 21.2, 21.0, 20.9 (CH₃).

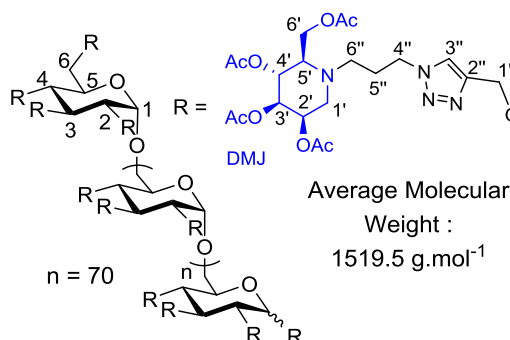


Compound 68:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **68** (27 mg, 49%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.19-7.72 (m broad, 3H, H-3''), 5.33-5.13 (m broad, 7H, H-1,2',4'), 5.07-4.97 (m broad, 3H, H-3'), 4.89-4.60 (m broad, 6H, H-1''), 4.52-4.31 (m broad, 6H, H-4''), 4.30-4.15 (m broad, 6H, H-6'), 3.87-3.41 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.17-3.02 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.95-2.77 (m broad, 6H, H-1'_{B,5'}), 2.77-2.53 (m broad, 6H, H-6''), 2.24-1.77 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.8, 170.5, 170.0, 169.8 (C=O), 145.0 (C-2''), 123.9 (C-3''), 97.3 (C-1), 81.2 (C-3), 80.1 (C-2), 76.5 (C-4), 71.2 (C-3'), 70.7 (C-5,6), 68.1 (C-4'), 67.0 (C-2'), 66.3-64.02 (C-1''), 61.3 (C-5'), 60.1 (C-6'), 49.7 (C-1',6''), 47.9 (C-4''), 27.3 (C-5''), 21.2, 21.0, 20.9 (CH₃).



Compound 69:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **69** (32 mg, 58%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.21-7.68 (m broad, 3H, H-3''), 5.27-5.10 (m broad, 7H, H-1,2',4'), 5.04-4.93 (m broad, 3H, H-3'), 4.89-4.53 (m broad, 6H, H-1''), 4.50-4.28 (m broad, 6H, H-4''), 4.27-4.13 (m broad, 6H, H-6'), 3.80-3.35 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.14-2.98 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.91-2.74 (m broad, 6H, H-1'_{B,5'}), 2.74-2.56 (m broad, 6H, H-6''), 2.13-1.85 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

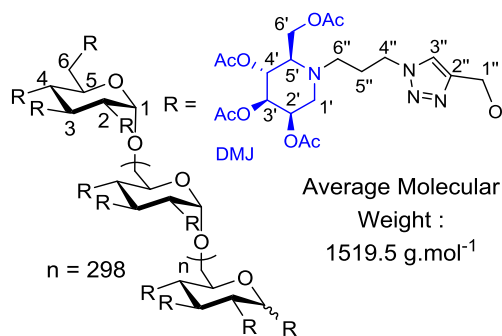
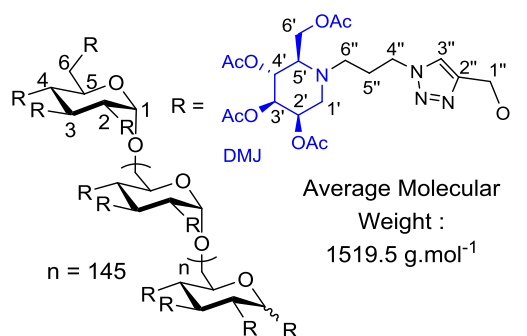
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.8, 170.4, 169.9, 169.8 (C=O), 145.0 (C-2''), 123.9 (C-3''), 97.7 (C-1), 81.4 (C-3), 79.9 (C-2), 76.5 (C-4), 71.3 (C-3'), 70.7 (C-5,6), 68.2 (C-4'), 67.0 (C-2'), 66.4 (C-1''), 61.3 (C-5'), 60.1 (C-6'), 49.6 (C-1',6''), 47.9 (C-4''), 27.2 (C-5''), 21.1, 21.0, 20.8 (CH₃).

Compound 70:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **70** (25 mg, 46%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.10-7.70 (m broad, 3H, H-3''), 5.29-5.14 (m broad, 7H, H-1,2',4'), 5.07-4.97 (m broad, 3H, H-3'), 4.91-4.63 (m broad, 6H, H-1''), 4.50-4.31 (m broad, 6H, H-4''), 4.30-4.16 (m broad, 6H, H-6'), 3.84-3.41 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.14-3.02 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.92-2.76 (m broad, 6H, H-1'_{B,5'}), 2.77-2.59 (m broad, 6H, H-6''), 2.38-1.80 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.9, 170.5, 170.0, 169.8 (C=O), 145.2 (C-2''), 123.7 (C-3''), 97.0 (C-1), 81.5 (C-3), 80.2 (C-2), 76.5 (C-4), 71.1 (C-3'), 70.7 (C-5,6), 68.2 (C-4'), 67.0 (C-2'), 66.3-65.0 (C-1''), 61.3 (C-5'), 60.1 (C-6'), 49.8 (C-1',6''), 47.9 (C-4''), 27.3 (C-5''), 21.2, 21.0, 20.9 (CH₃).

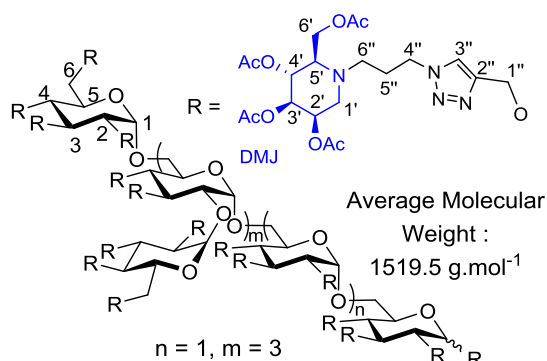


Compound 71:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **71** (27 mg, 49%) as a yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.25-7.70 (m broad, 3H, H-3''), 5.30-5.10 (m broad, 7H, H-1,2',4'), 5.03-4.94 (m broad, 3H, H-3'), 4.92-4.59 (m broad, 6H, H-1''), 4.51-4.28 (m broad, 6H, H-4''), 4.26-4.13 (m broad, 6H, H-6'), 3.82-3.37 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.12-2.99 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.92-2.74 (m broad, 6H, H-1'_{B,5'}), 2.76-2.56 (m broad, 6H, H-6''), 2.23-1.85 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 171.9, 170.5, 170.0, 169.9 (C=O), 145.0 (C-2''), 124.2 (C-3''), 97.1 (C-1), 81.4 (C-3), 79.7 (C-2), 76.6 (C-4), 71.2 (C-3'), 70.5 (C-5,6), 68.1 (C-4'), 67.0 (C-2'), 66.2-63.8 (C-1''), 61.2 (C-5'), 60.0 (C-6'), 50.0 (C-1',6''), 47.9 (C-4''), 27.0 (C-5''), 21.2, 21.0, 20.9 (CH₃).

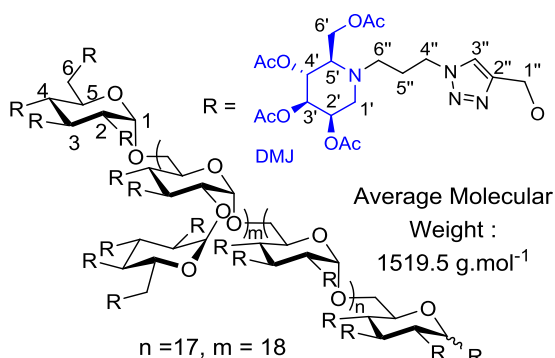


Compound 72:

Obtained following method E. This reaction afforded the compound **72** (25 mg, 44%) as a yellow solid.

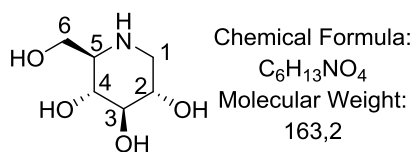
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8.18-7.71 (m broad, 3H, H-3''), 5.31-5.08 (m broad, 7H, H-1,2',4'), 5.05-4.95 (m broad, 3H, H-3'), 4.89-4.54 (m broad, 6H, H-1''), 4.53-4.31 (m broad, 6H, H-4''), 4.30-4.10 (m broad, 6H, H-6'), 3.93-3.37 (m broad, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6), 3.16-3.00 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.95-2.76 (m broad, 6H, H-1'_{B,5'}), 2.76-2.55 (m broad, 6H, H-6''), 2.23-1.73 (m broad, 42H, H-5'', O=CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.7, 170.3, 169.8, 169.6 (C=O), 145.7 (C-2''), 124.0 (C-3''), 96.7 (C-1), 81.2 (C-3), 80.1 (C-2), 76.5 (C-4), 71.1 (C-3'), 70.9 (C-5,6), 68.1 (C-4'), 66.9 (C-2'), 66.4 (C-1''), 61.1 (C-5'), 60.0 (C-6'), 49.8 (C-1',6''), 47.9 (C-4''), 27.0 (C-5''), 21.1, 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃).



1-deoxynojirimycin (73):

Obtained following method B. This reaction afforded the compound **73** (120 mg, 79 %) as a white solid.



$[\alpha]_D^{20} = +42.1$ ($c = 1$, H₂O).

ES-HRMS [M+H]⁺ m/z 164.0917 requires for C₆H₁₄NO₄; found 164.0917.

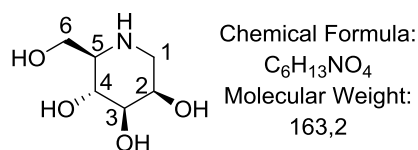
FT-IR: (ATR, cm⁻¹) 3393 (ν_{OH}), 1628 (ν_{NH}), 1452 (ν_{C-N}), 1082 (ν_{CH-OH}), 1046(ν_{CH-OH}), 960, 893.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ(ppm): 4.00-3.86 (m, 2H, H-6), 3.86-3.77 (m, 1H, H-2), 3.63 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4), 3.57-3.49 (m, 2H, H-1_A,3), 3.28-3.20 (m, 1H, H-5), 3.00 (t, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ(ppm): 76.1 (C-3), 67.7 (C-4), 66.8 (C-2), 59.9 (C-5), 57.7(C-6), 45.8 (C-1).

1-Deoxymannojirimycin (74):

Obtained following method B. This reaction afforded the compound **74** (61 mg, 79 %) as a white solid.



$[\alpha]_D^{20} = -8.3$ ($c = 1$, H₂O)

ES-HRMS [M+H]⁺ m/z 164.0923 requires for C₆H₁₄NO₄; found 164.0915

FT-IR: (ATR, cm⁻¹) 3404 (ν_{OH}), 1636 (ν_{NH}), 1457 (ν_{C-N}), 1083 (ν_{CH-OH}), 1047(ν_{CH-OH}), 960, 893.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ(ppm): 4.38-4.32 (m, 1H, H-2), 4.10 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 12.6$ Hz, 1H, H-6_A), 4.02-3.92 (m, 2H, H-4, 6_B), 3.80 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 9.6$ Hz 1H, H-3), 3.53 (dd, , $J = 3.0$ Hz, $J = 13.6$ Hz, 1H, H-1_A), 3.35 (dd, $J = 1.1$ Hz, $J = 13.6$ Hz, 1H, H-1_B), 3.31-3.23 (m, 1H, H-5)

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ(ppm): 72.5 (C-3), 66.0 (C-2), 65.8 (C-4), 60.4 (C-5), 58.2 (C-6), 47.6 (C-1).

N-(3-(4-hydroxymethyl-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol (75):

Obtained following method C. This reaction afforded the compound **75** (11 mg, 86%) as pale yellow solid.

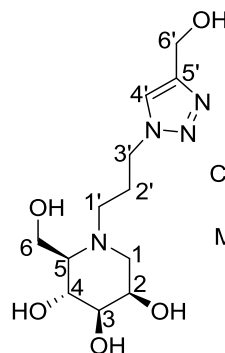
$[\alpha]_D^{20} = -42.4$ ($c = 0.5$, H₂O).

ES-HRMS $[M+H]^+$ m/z 303.1663 requires for C₁₂H₂₃N₄O₅; found 303.1665.

FT-IR: (ATR, cm⁻¹) 3402 (ν_{OH}), 1631 (ν_{NH}), 1459 (ν_{C-N}), 1081 (ν_{CH-OH}), 1049 (ν_{CH-OH}), 960, 895.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ(ppm): 7.97 (s, 1H, H-4'), 4.69 (s, 1H, H-6'), 4.47-4.38 (m, 2H, H-3'), 3.96-3.90 (m, 1H, H-2), 3.75 (d, 2H, H-6), 3.61 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-4), 3.43 (dd, $J = 3.5$ Hz, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-3), 2.90 (dd, $J = 3.5$ Hz, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-1_A), 2.78-2.65 (m, 1H, H-1'_A), 2.63-2.54 (m, 1H, H-1'_B), 2.51 (dd, $J = 1.3$ Hz, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-1_B), 2.21-2.13 (m, 1H, H-5), 2.13-2.01 (m, 1H, H-2').

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ(ppm): 146.8 (C-5'), 124.1 (C-4'), 74.3 (C-3), 67.7 (C-4, 2), 65.1 (C-5), 57.8 (C-6), 54.6 (C-1), 54.5 (C-6'), 48.8 (C-1'), 48.5 (C-3'), 24.0 (C-2').



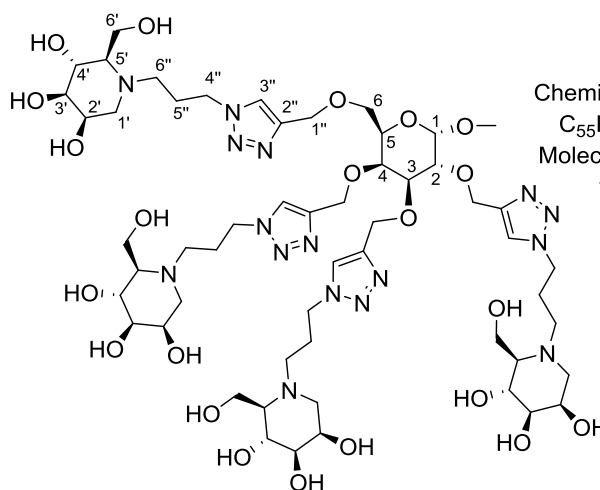
Chemical Formula:
C₁₂H₂₂N₄O₅
Molecular Weight:
302,3

Compound 76:

Obtained following method C. This reaction afforded the compound **74** (30 mg, 91%) as a white solid.

$[\alpha]_D^{20} = -15.3$ ($c = 1$, H₂O).

MALDI, TOF-HRMS
 $[M+H]^+$ m/z 1331.6807
requires for C₅₅H₉₅N₁₆O₂₂;
found 1331.6851.



Chemical Formula:
C₅₅H₉₄N₁₆O₂₂
Molecular Weight:
1331,4

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ(ppm): 8.12, 8.11, 8.10, 8.09 (4 H, s, H-3''), 4.96-4.63 (m, 9H, H-1, 1''), 4.60-4.44 (m, 8H, H-4''), 4.18-4.14 (m, 1H, H-3), 4.07-3.98 (m, 5H, H-5, 2'), 3.98-3.89 (m, 2H, H-2, 4), 3.89-3.79 (m, 8H, H-6'), 3.75-3.66 (m, 4H, H-4'), 3.65-3.58 (m, 1H, H-6), 3.56-3.47 (m, 5H, H-6, 3'), 3.39 (s, 3H, CH₃), 3.05-2.94 (m, 4H, H-1'_A), 2.90-2.76 (m, 4H, H-6''_A), 2.73-2.61 (m, 4H, H-6''_B), 2.61-2.50 (m, 4H, H-1'_B), 2.30-2.20 (m, 4H, H-5'), 2.20-2.07 (m, 8H, H-5'').

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ(ppm): 144.2, 143.8 (C-2''), 125.2, 125.1, 125.0 (C-3''), 97.7 (C-1), 77.5 (C-3), 75.6 (C-2), 74.7 (C-4), 74.4 (C-3'), 68.8 (C-6), 68.5 (C-5), 67.8 (C-

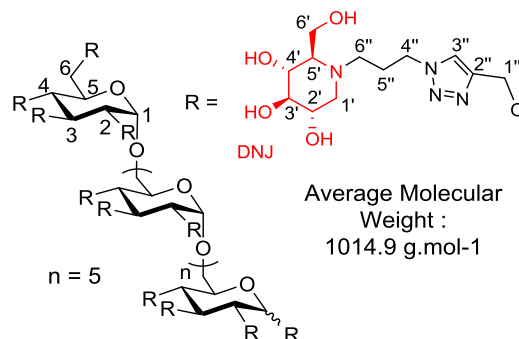
4'), 67.7 (C-2'), 65.3 (C-5'), 64.9, 63.5, 63.4, 63.0 (C-1''), 57.9 (C-6'), 55.1 (CH₃), 54.7 (C-1'), 48.9(C-6''), 48.6 (C- 4''), 24.3 (C-5'').

Compound 77:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **77** (22 mg, 55%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ(ppm): 8.20-7.95 (m broad, 3H, H-3''), 5.28-5.10 (m broad, 1H, H-1), 5.03-4.70 (m broad, 6H, H-1''), 4.56-4.30 (m broad, 6H, H-4''), 4.03-3.67 (m broad, 11H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 3.62-3.49 (m broad, 4H, H-2, 2'), 3.49-3.36 (m broad, 3H, H-4'), 3.35-3.23 (m broad, 3H, H-3'), 3.07-2.91 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.91-2.74 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.74-2.57 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.38-2.18 (m broad, 6H, H-1'_B, 5'), 2.18-1.94 (m broad, 6H, H-5'').

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ(ppm): 144.4 (C-2''), 125.0 (C-3''), 96.5 (C-1), 80.7 (C-3), 79.3 (C-2), 78.5 (C-3'), 77.0 (C-4), 70.1 (C-5, 4'), 69.0 (C-2'), 65.7 (C-6), 65.0 (C-5'), 63.3 (C-1''), 57.7 (C-6'), 55.6 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.2 (C-5'').

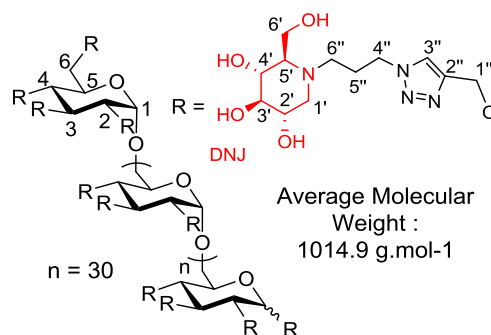


Compound 78:

Obtained with the method F. This reaction afforded the compound **78** (25 mg, 53%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ(ppm): 8.20-7.98 (m broad, 3H, H-3''), 5.25-5.07 (m broad, 1H, H-1), 5.03-4.81 (m broad, 6H, H-1''), 4.49-4.36 (m broad, 6H, H-4''), 4.05-3.69 (m broad, 11H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 3.64-3.52 (m broad, 4H, H-2, 2'), 3.49-3.36 (m broad, 3H, H-4'), 3.35-3.26 (m broad, 3H, H-3'), 3.07-2.95 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.91-2.76 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.76-2.60 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.41-2.21 (m broad, 6H, H-1'_B, 5'), 2.21-2.00 (m broad, 6H, H-5'').

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ(ppm): 144.2 (C-2''), 125.1 (C-3''), 96.0 (C-1), 80.8 (C-3), 79.1 (C-2), 78.4 (C-3'), 77.4 (C-4), 72.4 (C-5), 70.1 (C-4'), 69.0 (C-2'), 65.8 (C-6), 65.0 (C-5'), 63.3 (C-1''), 57.7 (C-6'), 55.5 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.1 (C-5'').



Compound 79:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **79** (24 mg, 60%) as a pale yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.23-7.98 (m broad, 3H, H-3''), 5.30-5.07 (m broad, 1H, H-1), 5.04-4.75 (m broad, 6H, H-1''), 4.57-4.28 (m broad, 6H, H-4''), 4.05-3.67 (m broad, 11H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 3.67-3.47 (m broad, 4H, H-2, 2'), 3.46-3.334 (m broad, 3H, H-4'), 3.34-3.23 (m broad, 3H, H-3'), 3.05-2.93 (m broad, 3H, H-1'A), 2.90-2.74 (m broad, 3H, H-6''A), 2.74-2.55 (m broad, 3H, H-6''B), 2.37-2.20 (m broad, 6H, H-1'B, 5'), 2.20-2.00 (m broad, 6H, H-5'').

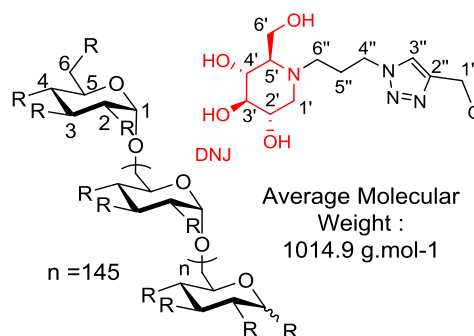
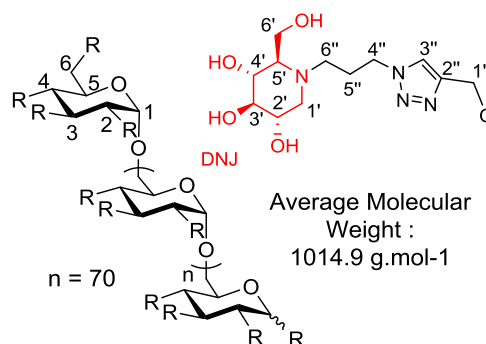
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.2 (C-2''), 125.0 (C-3''), 96.2 (C-1), 80.7 (C-3), 79.1 (C-2), 78.4 (C-3'), 77.1 (C-4), 72.4 (C-5), 70.1 (C-4'), 69.0 (C-2'), 65.6 (C-6), 65.0 (C-5'), 63.1 (C-1''), 57.7 (C-6'), 55.5 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.2 (C-5'').

Compound 80:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **80** (20 mg, 50%) as a pale yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.20-7.99 (m broad, 3H, H-3''), 5.27-5.16 (m broad, 1H, H-1), 5.04-4.81 (m broad, 6H, H-1''), 4.60-4.28 (m broad, 6H, H-4''), 4.05-3.66 (m broad, 11H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 3.66-3.50 (m broad, 4H, H-2, 2'), 3.46-3.34 (m broad, 3H, H-4'), 3.34-3.23 (m broad, 3H, H-3'), 3.10-2.90 (m broad, 3H, H-1'A), 2.90-2.72 (m broad, 3H, H-6''A), 2.72-2.54 (m broad, 3H, H-6''B), 2.38-2.18 (m broad, 6H, H-1'B, 5'), 2.20-1.95 (m broad, 6H, H-5'').

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.4 (C-2''), 125.0 (C-3''), 96.6 (C-1), 80.6 (C-3), 79.1 (C-2), 78.4 (C-3'), 77.0 (C-4), 71.9 (C-5), 70.1 (C-4'), 68.8 (C-2'), 65.6 (C-6), 65.0 (C-5'), 63.2 (C-1''), 57.7 (C-6'), 55.6 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.1 (C-5'').

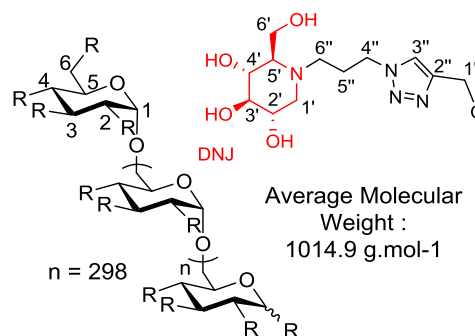


Compound 81:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **81** (25 mg, 62%) as a pale yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.22-7.99 (m broad, 3H, H-3''), 5.27-5.09 (m broad, 1H, H-1), 5.05-4.89 (m broad, 6H, H-1''), 4.58-4.37 (m broad, 6H, H-4''), 4.03-3.70 (m broad, 11H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 3.67-3.48 (m broad, 4H, H-2, 2'), 3.47-3.35 (m broad, 3H, H-4'), 3.35-3.24 (m broad, 3H, H-3'), 3.09-2.95 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.90-2.76 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.76-2.61 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.40-2.22 (m broad, 6H, H-1'_B, 5'), 2.20-2.00 (m broad, 6H, H-5'').

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.3 (C-2''), 125.2 (C-3''), 96.3 (C-1), 80.6 (C-3), 79.1 (C-2), 78.4 (C-3'), 76.5 (C-4), 72.5 (C-5), 70.2 (C-4'), 69.0 (C-2'), 65.8 (C-6), 65.0 (C-5'), 63.1 (C-1'), 57.7 (C-6'), 55.6 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.1 (C-5'').

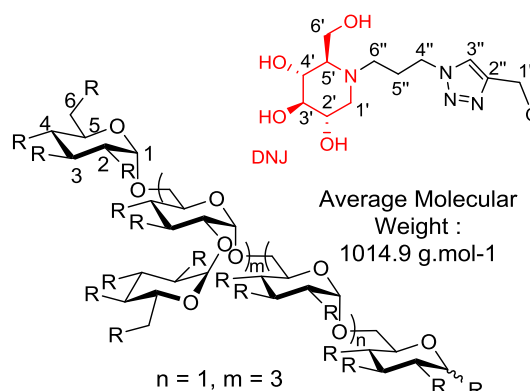


Compound 82:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **82** (16 mg, 45%) as a pale yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.19-7.92 (m broad, 3H, H-3''), 5.42-5.22 (m broad, 1H, H-1), 5.20-4.72 (m broad, 6H, H-1''), 4.55-4.29 (m broad, 6H, H-4''), 4.00-3.66 (m broad, 11H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 3.66-3.48 (m broad, 4H, H-2, 2'), 3.48-3.35 (m broad, 3H, H-4'), 3.34-3.21 (m broad, 3H, H-3'), 3.08-2.93 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.89-2.75 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.73-2.52 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.38-2.18 (m broad, 6H, H-1'_B, 5'), 2.18-1.97 (m broad, 6H, H-5'').

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.3 (C-2''), 125.0 (C-3''), 96.4 (C-1), 80.6 (C-3), 79.3 (C-2), 78.3 (C-3'), 76.7 (C-4), 70.0 (C-5, 4'), 68.9 (C-2'), 65.5 (C-6), 64.9 (C-5'), 63.4 (C-1'), 57.6 (C-6'), 55.5 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.1 (C-5'').

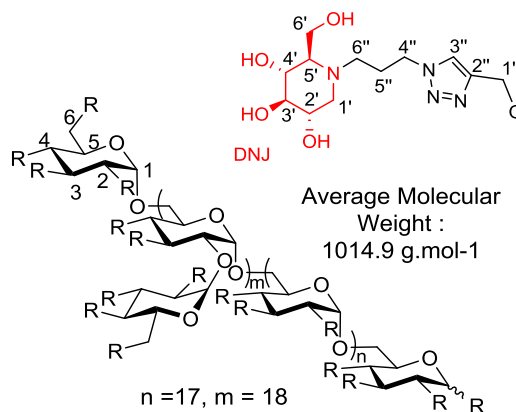


Compound 83:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **83** (22 mg, 46%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.19-7.92 (m broad, 3H, H-3''), 5.41-5.15 (m broad, 1H, H-1), 5.06-4.65 (m broad, 6H, H-1''), 4.60-4.27 (m broad, 6H, H-4''), 3.95-3.66 (m broad, 11H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 3.65-3.48 (m broad, 4H, H-2, 2'), 3.48-3.34 (m broad, 3H, H-4'), 3.34-3.21 (m broad, 3H, H-3'), 3.06-2.90 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.90-2.72 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.72-2.53 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.38-2.18 (m broad, 6H, H-1'_B, 5'), 2.18-1.92 (m broad, 6H, H-5'').

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ (ppm): 144.3 (C-2''), 124.9 (C-3''), 96.6 (C-1), 80.7 (C-3), 79.3 (C-2), 78.4 (C-3'), 76.9 (C-4), 70.1 (C-5, 4'), 69.0 (C-2'), 65.7 (C-6), 65.0 (C-5'), 63.0 (C-1''), 57.7 (C-6'), 55.6 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.3 (C-5'').

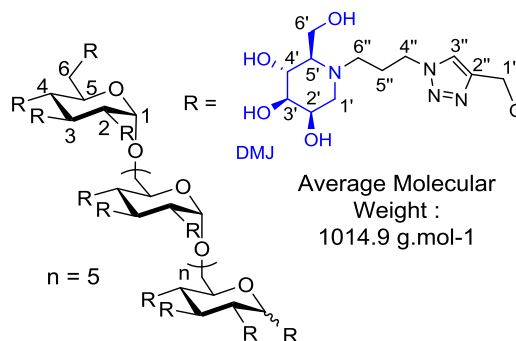


Compound 84:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **84** (12 mg, 75%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.19-8.00 (m broad, 3H, H-3''), 5.26-5.10 (m broad, 1H, H-1), 5.04-4.82 (m broad, 6H, H-1''), 4.56-4.32 (m broad, 6H, H-4''), 4.07-3.61 (m broad, 18H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 4', 6'), 3.54-3.44 (m broad, 3H, H-3'), 3.04-2.87 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.87-2.72 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.69-2.55 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.55-2.39 (m broad, 3H, H-1'_B), 2.33-1.99 (m broad, 9H, H-5', 5'').

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ (ppm): 144.4 (C-2''), 125.0 (C-3''), 96.4 (C-1), 80.8 (C-3), 79.3 (C-2), 77.0 (C-4), 74.5 (C-3'), 70.1 (C-5), 67.9 (C-2', 4'), 65.4 (C-6, 5'), 63.5 (C-1''), 58.0 (C-6'), 54.9 (C-1'), 49.0 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.6 (C-5'').

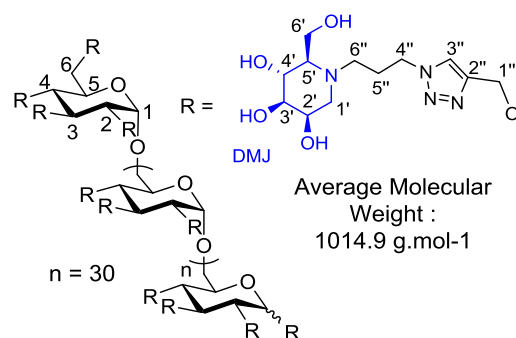


Compound 85:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **85** (16 mg, 75%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (700 MHz, D₂O) δ(ppm): 8.18-7.97 (m broad, 3H, H-3''), 5.24-5.10 (m broad, 1H, H-1), 5.04-4.81 (m broad, 6H, H-1''), 4.55-4.33 (m broad, 6H, H-4''), 4.02-3.57 (m broad, 18H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 4', 6'), 3.53-3.45 (m broad, 3H, H-3'), 3.04-2.88 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.88-2.72 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.71-2.57 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.57-2.44 (m broad, 3H, H-1'_B), 2.27-2.00 (m broad, 9 H, H-5', 5'').

¹³C NMR (175 MHz, D₂O) δ(ppm): 144.1 (C-2''), 124.9 (C-3''), 96.2 (C-1), 80.8 (C-3), 79.0 (C-2), 77.4 (C-4), 74.4 (C-3'), 69.7 (C-5), 67.8 (C-2',4'), 65.3 (C-6, 5'), 63.2 (C-1''), 57.8 (C-6'), 54.8 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.6 (C-4''), 24.4 (C-5'').

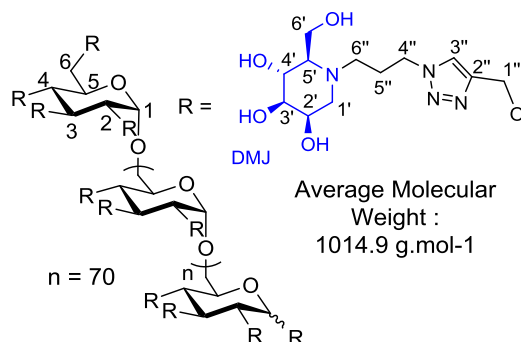


Compound 86:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **86** (9.5 mg, 71%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ(ppm): 8.17-7.91 (m broad, 3H, H-3''), 5.20-5.05 (m broad, 1H, H-1), 5.00-4.78 (m broad, 6H, H-1''), 4.54-4.22 (m broad, 6H, H-4''), 4.03-3.48 (m broad, 18H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 4', 6'), 3.53-3.36 (m broad, 3H, H-3'), 2.99-2.11 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.81-2.64 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.64-2.50 (m broad, 3H, H-6''_B), 2.50-2.33 (m broad, 3H, H-1'_B), 2.23-1.85 (m broad, 9 H, H-5', 5'').

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ(ppm): 144.2 (C-2''), 125.0 (C-3''), 96.4 (C-1), 81.0 (C-3), 78.8 (C-2), 77.3 (C-4), 74.5 (C-3'), 70.0 (C-5), 67.8 (C-2',4'), 65.3 (C-6, 5'), 63.1 (C-1''), 57.9 (C-6'), 54.9 (C-1'), 49.0 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.5 (C-5'').

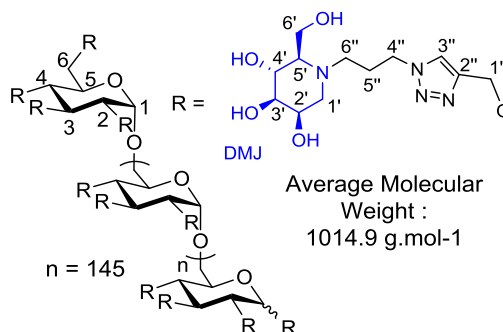


Compound 87:

Obtained with the method F. This reaction afforded the compound **87** (13 mg, 69%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.19-7.97 (m broad, 3H, H-3''), 5.27-5.14 (m broad, 1H, H-1), 5.06-4.84 (m broad, 6H, H-1''), 4.56-4.30 (m broad, 6H, H-4''), 4.15-3.55 (m broad, 18H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 4', 6'), 3.55-3.38 (m broad, 3H, H-3'), 3.05-2.86 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.86-2.69 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.69-2.37 (m broad, 6H, H-1'_B, 6''_B), 2.30-1.91 (m broad, 9 H, H-5', 5'').

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ (ppm): 144.3 (C-2''), 124.9 (C-3''), 96.6 (C-1), 80.9 (C-3), 79.2 (C-2), 76.9 (C-4), 74.6 (C-3'), 70.1 (C-5), 67.9 (C-2',4'), 65.4 (C-6, 5'), 63.3 (C-1''), 58.0 (C-6'), 54.9 (C-1'), 49.0 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.7 (C-5'').

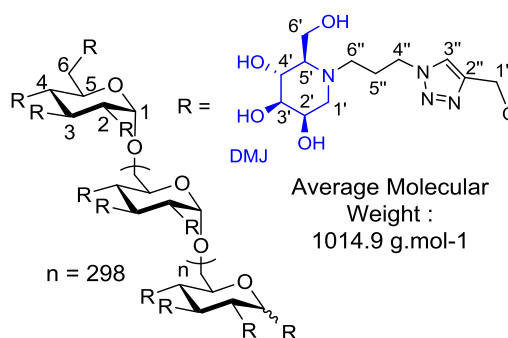


Compound 88:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **88** (7 mg, 53%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (700 MHz, D₂O) δ (ppm): 8.22-8.00 (m broad, 3H, H-3''), 5.20-5.06 (m broad, 1H, H-1), 5.06-4.82 (m broad, 6H, H-1''), 4.61-4.33 (m broad, 6H, H-4''), 4.10-3.55 (m broad, 18H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 4', 6'), 3.55-3.41 (m broad, 3H, H-3'), 3.47-2.89 (m broad, 3H, H-1'_A), 2.89-2.73 (m broad, 3H, H-6''_A), 2.73-2.43 (m broad, 6H, H-1'_B, 6''_B), 2.33-1.98 (m broad, 9 H, H-5', 5'').

¹³C NMR (175 MHz, D₂O) δ (ppm): 144.2 (C-2''), 124.7 (C-3''), 96.3 (C-1), 80.5 (C-3), 78.8 (C-2), 77.8 (C-4), 74.2 (C-3'), 69.6 (C-5), 67.7 (C-2',4'), 65.4 (C-6, 5'), 63.2 (C-1''), 57.8 (C-6'), 54.8 (C-1'), 49.1 (C-6''), 48.6 (C-4''), 24.6 (C-5'').

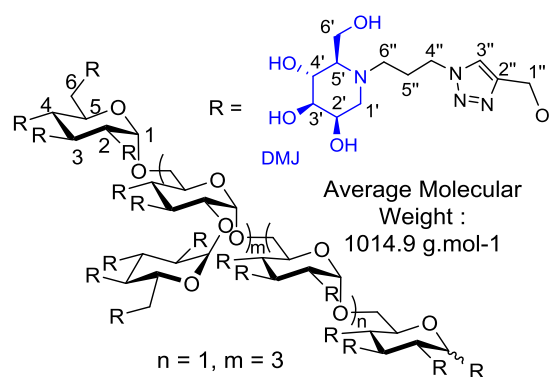


Compound 89:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **89** (12 mg, 71%) as a pale yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.25-7.83 (m broad, 3H, H-3''), 5.41-5.14 (m broad, 1H, H-1), 5.06-4.83 (m broad, 6H, H-1''), 4.55-4.20 (m broad, 6H, H-4''), 4.0-3.54 (m broad, 18H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 4', 6'), 3.54-3.38 (m broad, 3H, H-3'), 3.02-2.84 (m broad, 3H, H-1'A), 2.84-2.67 (m broad, 3H, H-6''A), 2.73-2.35 (m broad, 6H, H-1'B, 6''B), 2.29-1.87 (m broad, 9 H, H-5', 5'').

$^{13}\text{C NMR}$ (175 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.2 (C-2''), 124.8 (C-3''), 74.3 (C-3'), 67.6 (C-2', 4'), 65.3 (C-5'), 57.7 (C-6'), 54.7 (C-1'), 48.9 (C-6''), 48.5 (C-4''), 24.4 (C-5''). only characteristics peaks of iminosugars were observed on ^{13}C spectra.

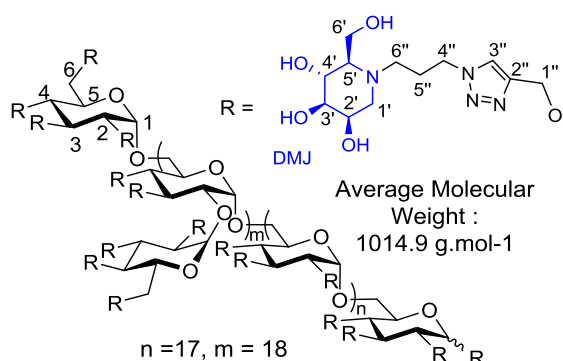


Compound 90:

Obtained following method F. This reaction afforded the compound **90** (11 mg, 70%) as a pale yellow solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.30-7.88 (m broad, 3H, H-3''), 5.36-5.22 (m broad, 1H, H-1), 5.09-4.82 (m broad, 6H, H-1''), 4.54-4.22 (m broad, 6H, H-4''), 4.06-3.56 (m broad, 18H, H-2, 3, 4, 5, 6, 2', 4', 6'), 3.54-3.37 (m broad, 3H, H-3'), 3.05-2.87 (m broad, 3H, H-1'A), 2.87-2.69 (m broad, 3H, H-6''A), 2.69-2.33 (m broad, 6H, H-1'B, 6''B), 2.33-1.88 (m broad, 9 H, H-5', 5'').

$^{13}\text{C NMR}$ (175 MHz, D_2O) δ (ppm): 144.4 (C-2''), 124.9 (C-3''), 96.6 (C-1), 80.5 (C-3), 78.7 (C-2), 77.8 (C-4), 74.5 (C-3'), 70.2 (C-5), 67.9 (C-2', 4'), 65.5 (C-6, 5'), 63.2 (C-1'), 58.0 (C-6'), 54.9 (C-1'), 49.0 (C-6''), 48.7 (C-4''), 24.7 (C-5'').



BIBLIOGRAPHIE

1. R. Wolfenden, X. Lu, G. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814-6815.
2. G. Davies, B. Henrissat, *Structure* **1995**, *3*, 853-859.
3. C. S. Rye, S. G. Withers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573-580.
4. Pour un ouvrage complet sur la glycogénogenèse : J. Kruh, *Biochimie-études médicales et biologiques Vol. II* **1983**, Hermann ed.
5. A. D. Elbein, *FASEB J.* **1991**, *5*, 3055-3063.
6. N. Asano, *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R-104R.
7. J. Rebière-Huët, P. Di Martino, O. Gallet, C. Hulen, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **1999**, *322*, 1071-1080.
8. D. E. Koshland, *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416-436.
9. M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202.
10. D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *33*, 11-18.
11. S. S. Rajan, X. Yang, F. Collart, V. L. Y. Yip, S. G. Withers, A. Varrot, J. Thompson, G. J. Davies, W. F. Anderson, *Structure* **2004**, *12*, 1619-1629.
12. Q. P. Liu, G. Sulzenbacher, H. Yuan, E. P. Bennett, G. Pietz, K. Saunders, J. Spence, E. Nudelman, S. B. Levery, T. White, J. M. Neveu, W. S. Lane, Y. Bourne, M. L. Olsson, B. Henrissat, H. Clausen, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 573-580.
13. (a) C. Teixeira, J. R. B. Gomes, P. Gomes, F. Maurel, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 979-992. (b) F. Baleux, L. Loureiro-Morais, Y. Hersant, P. Clayette, F. Arenzana-Seisdedos, D. Bonnaffe, H. Lortat-Jacob, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 743-748.
14. R. A. Gruters, J. J. Neefjes, M. Tersmette, R. E. Y. de Goede, A. Tulp, H. G. Huisman, F. Miedema, H. L. Ploegh, *Nature* **1987**, *330*, 74-77.
15. B. D. Walker, M. Kowalski, W. C. Goh, K. Kozarsky, M. Krieger, C. Rosen, L. Rohrschneider, W. A. Haseltine, J. Sodroski, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 8120-8124.
16. W. Puls, U. Keup, *Diabetologia* **1973**, *9*, 97-101.
17. D. A. Jenkins, R. Taylor, R. Nineham, D. Goff, S. Bloom, D. Sarson, K. George, M. M. Alberti, *Lancet* **1979**, *314*, 924-927.
18. K. M. Robinson, M. E. Begovic, B. L. Rhinehart, E. W. Heineke, J.-B. Ducep, P. R. Kastner, F. N. Marshall, C. Danzin, *Diabetes* **1991**, *40*, 825-830.
19. R. J. Walton, I. T. Sherif, G. A. Noy, K. G. Alberti, *Br. Med. J.* **1979**, *1*, 220-221.
20. A. Vellodi, *Br. J. Haematol.* **2005**, *128*, 413-431.
21. Y.-H. Xu, S. Barnes, Y. Sun, G. A. Grabowski, *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 1643-1675.
22. T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532-1568.
23. T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Glycobiology* **2005**, *15*, 43R-52R.
24. G. A. Grabowski, *Lancet* **2008**, *372*, 1263-1271.
25. N. W. Barton, F. S. Furbish, G. J. Murray, M. Garfield, R. O. Brady, *PNAS.* **1990**, *87*, 1913-1916.
26. F. M. Platt, G. R. Neises, R. A. Dwek, T. D. Butters, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8362-8365.
27. L. Qiao, B. W. Murray, M. Shimazaki, J. Schultz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7653-7662.
28. S. Takayama, R. Martin, J. Wu, K. Laslo, G. Siuzdak, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8146-8151.
29. (a) J.-Q. Fan, *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 355-360. (b) Z. Yu, A. R. Sawkar, L. J. Whalen, C.-H. Wong, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2006**, *50*, 94-100.
30. E. Borges de Melo, A. da Silveira Gomes, I. Carvalho, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10277-10302.
31. R. Datema, P. A. Romero, G. Legler, R. T. Schwarz, *PNAS.* **1982**, *79*, 6787-6791.
32. S. Atsumi, H. Inuma, C. Nosaka, K. Umezawa, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1579-1585.
33. S. Horii, H. Fukase, T. Matsuo, Y. Kameda, N. Asano, K. Matsui, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1038-1046.

34. Y.-I. Kwon, H.-J. Son, K. S. Moon, J. K. Kim, J.-G. Kim, H.-S. Chun, S. K. Ahn, C. I. Hong, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 462-471.
35. M. Yoshikawa, T. Murakami, H. Shimada, H. Matsuda, J. Yamahara, G. Tanabe, O. Muraoka, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8367-8370.
36. B. D. Johnston, A. Ghavami, M. T. Jensen, B. Svensson, B. M. Pinto, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8245-8250.
37. V. Ulgar, J. G. Fernandez-Bolanos, M. Bols, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1242-1246.
38. S. Sou, S. Mayumi, H. Takahashi, R. Yamasaki, S. Kadoya, M. Sodeoka, Y. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1081-1084.
39. T. Niwa, U. Doi, T. Osawa, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *51*, 90-94.
40. (a) D. J. Jenkins, T. M. Wolever, R. H. Taylor, H. Barker, H. Fielden, J. M. Baldwin, A. C. Bowling, H. C. Newman, A. L. Jenkins, D. V. Goff, *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, *34*, 362-366. (b) D. J. Jenkins, T. M. Wolever, G. S. Wong, A. Kenshole, R. G. Josse, L. U. Thompson, K. Y. Lam, *Am. J. Clin. Nutr.* **1984**, *40*, 971-981.
41. V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-554.
42. (a) H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 495-510. (b) Paulsen, H.; Todt, K. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3385-3407
43. (a) Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Niida, T. *J. Antibiot. Ser. A19* **1966**, *19*, 288-292. (b) S. Inouye, T. Tsuruoka, T. Ito, T. Niida, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2125-2144.
44. (a) C. H. Wong, D. P. Dumas, Y. Ichikawa, K. Koseki, S. J. Danishefsky, B. W. Weston, J. B. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7321-7322. (b) P. Compain, O. R. Martin, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3077-3092.
45. P. Jakobsen, J. M. Lundbeck, M. Kristiansen, J. Breinholt, H. Demuth, J. Pawlas, M. P. Torres Candela, B. Andersen, N. Westergaard, K. Lundgren, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 733-744.
46. N. Asano, K. Oseki, H. Kizu, K. Matsui, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3701-3706.
47. J. E. Tropea, R. J. Molyneux, G. P. Kaushal, Y. T. Pan, M. Mitchell, A. D. Elbein, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2027-2034.
48. M. Haraguchi, S. L. Gorniak, K. Ikeda, Y. Minami, A. Kato, A. A. Watson, R. J. Nash, R. J. Molyneux, N. Asano, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4995-5000.
49. (a) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674. (b) M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608.
50. T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387-430.
51. Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199-202.
52. M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
53. E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664.
54. M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, D. Rodriguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. Garcia Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971.
55. T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256-28263.
56. C. F. Brewer, M. C. Miceli, L. G. Baum, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 616-623.
57. I. Vrasidas, S. Andre, P. Valentini, C. Bock, M. Lensch, H. Kaltner, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius, R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 803-810.
58. D. Sicard, S. Cecioni, M. Iazykov, Y. Chevolot, S. E. Matthews, J.-P. Praly, E. Souteyrand, A. Imberty, S. Vidal, M. Phaner-Goutorbe, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9483-9485.
59. N. V. Bovin, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 431-446.

60. C. W. Cairo, J. E. Gestwicki, M. Kanai, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1615-1619.
61. J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
62. V. L. Rath, M. Ammirati, D. E. Danley, J. L. Ekstrom, E. M. Gibbs, T. R. Hynes, A. M. Mathiowetz, R. K. McPherson, T. V. Olson, J. L. Treadway, D. J. Hoover, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 677-682.
63. N. Schaschke, G. Matschiner, F. Zettl, U. Marquardt, A. Bergner, W. Bode, C. P. Sommerhoff, L. Moroder, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 313-327.
64. G. T. Noble, F. L. Craven, J. Voglmeir, R. Sardzik, S. L. Flitsch, S. J. Webb, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13010-13017.
65. B. T. Houseman, M. Mrksich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 782-785.
66. B. A. Johns, C. R. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 749-752.
67. A. Lohse, K. B. Jensen, K. Lundgren, M. Bols, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965-1971.
68. I. McCort, M. Sanière, Y. Le Merrer, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2693-2700.
69. J. Diot, M. I. Garcia-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357-363.
70. (a) P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756. (b) C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. M. Barragán, Carmen Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.
71. C. Bonduelle, J. Huang, T. Mena-Barragan, C. Ortiz Mellet, C. Decroocq, E. Etame, A. Heise, P. Compain, S. Lecommandoux, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3350-3352.
72. T. K. Dam, S. Oscarson, R. Roy, S. K. Das, D. Pagé, F. Macaluso, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8640-8646.
73. S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J.-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2146-2159.
74. S. Howard, S. He, S. G. Withers, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2067-2072.
75. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
76. K. L. Killops, L. M. Campos, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062-5064.
77. J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 1249-1262.
78. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 210-216.
79. A. Michael, *J. Prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94-95.
80. R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
81. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
82. C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
83. M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
84. C. R. R. Matos, R. S. C. Lopes, C. C. Lopes, *Synthesis* **1999**, *1999*, 571-573.
85. S. G. Gouin, J.-F. Gustin, K. Joly, A. Loussouarn, A. Reliquet, J. Claude Meslin, D. Deniaud, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1131-1136.
86. V. Liautard, A. E. Christina, V. r. Desvergnès, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7337-7345.
87. E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797-3800.
88. S. Cecioni, R. Lalor, B. Blanchard, J.-P. Praly, A. Imberty, S. E. Matthews, S. Vidal, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 13232-13240.
89. Y. Liu, C.-F. Ke, H.-Y. Zhang, J. Cui, F. Ding, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *130*, 600-605.
90. (a) A. Joshi, S. Kate, V. Poon, D. Mondal, *et al.*, *Biomacromolecules*, *12*, 791-796. (b) T. Carofiglio, M. Cordioli, R. Fornasier, L. Jicsinszky, U. Tonellato, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1361-1366.

91. P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin, E. Van der Eycken, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4223-4225.
92. (a) N. A. Rodios, *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, *21*, 1169-1173. (b) A. Marra, A. Vecchi, C. Chiappe, B. Melai, A. Dondoni, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2458-2461.
93. Y. Brissonnet, C. Ortiz Mellet, S. Morandat, M. I. Garcia Moreno, D. Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Sestak, K. El Kirat, S. G. Gouin, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18427-18435.
94. P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.
95. D. R. Tulsiani, T. M. Harris, O. Touster, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7936-7939.
96. (a) M. S. Kang, A. D. Elbein, *Plant Physiology* **1983**, *71*, 551-554. (b) D. R. P. Tulsiani, H. P. Broquist, O. Touster, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1985**, *236*, 427-434.
97. (a) A. Kumar, S. M. Gaikwad, *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49*, 1066-1071. (b) Y. Kimura, D. Hess, A. Sturm, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 168-175.
98. S. M. Snaith, *Biochem. J.* **1975**, *147*, 83-90.
99. T. K. Dam, T. A. Gerken, B. S. Cavada, K. S. Nascimento, T. R. Moura, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28256-28263.
100. (a) T. Kiba, H. Suzuki, K. Hosokawa, H. Kobayashi, S. Baba, T. Kakuchi, S.-i. Sato, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11560-11563. (b) S. Perrier, P. Takolpuckdee, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 5347-5393.
101. M. K. Müller, L. Brunsveld, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2921-2924.
102. R. H. Jacobson, X. J. Zhang, R. F. DuBose, B. W. Matthews, *Nature* **1994**, *369*, 761-766.
103. (a) J. C. Rankin, A. Jeanes, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4435-4441. (b) J. W. Van Cleve, W. C. Schaefer, C. E. Rist, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4435-4438.
104. (a) B. Lindberg, S. Svensson, *acta.chem.scand.* **1968**, *22*, 1907-1912. (b) O. Larm, B. Lindberg, S. Svensson, *Carbohydr. Res.* **1971**, *20*, 39-48.
105. (a) Y. Brison, E. Fabre, C. Moulis, J. C. Portais, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 545-554. (b) S. R. Sarbini, S. Kolida, T. Naeye, A. Einerhand, Y. Brison, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, G. R. Gibson, R. A. Rastall, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *77*, 5307-5315.
106. L. A. Grischenko, L. N. Parshina, L. V. Kanitskaya, L. I. Larina, L. N. Novikova, B. A. Trofimov, *Carbohydr. Res.* **2013**, *376*, 7-14.
107. D. A. Comfort, K. S. Bobrov, D. R. Ivanen, K. A. Shabalin, J. M. Harris, A. A. Kulminkaya, H. Brumer, R. M. Kelly, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3319-3330.
108. D. A. Sela, D. Garrido, L. Lerno, S. Wu, K. Tan, H.-J. Eom, A. Joachimiak, C. B. Lebrilla, D. A. Mills, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *78*, 795-803.
109. R. Merceron, M. Foucault, R. Haser, R. Mattes, H. Watzlawick, P. Gouet, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39642-39652.
110. G. Sulzenbacher, C. Bignon, T. Nishimura, C. A. Tarling, S. G. Withers, B. Henrissat, Y. Bourne, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13119-13128.
111. D. Ling, L. Gao, J. Wang, M. Shokouhimehr, J. Liu, Y. Yu, M. J. Hackett, P.-K. So, B. Zheng, Z. Yao, J. Xia, T. Hyeon, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 7916-7921.
112. G. J. Davies, K. S. Wilson, B. Henrissat, *Biochem. J.* **1997**, *321*, 557-559.
113. T. Nishio, S. Hoshino, A. Kondo, M. Ogawa, Y. Matsuishi, M. Kitagawa, R. Kawachi, T. Oku, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1389-1393.

Résumé

Malgré les efforts de recherche importants consentis pour le développement d'inhibiteurs de glycosidases, très peu de molécules ont atteint le stade de médicaments. Ce constat s'explique aisément par la complexité d'avoir un inhibiteur qui possède à la fois une affinité importante mais également une sélectivité envers une seule et unique cible. Récemment, la possibilité d'accroître considérablement ces deux paramètres a été rapportée grâce à la conception d'inhibiteurs multivalents.

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer des iminosucres multivalents dont certains paramètres structuraux varient, comme la topologie des ligands ou la valence, afin d'étudier les aspects fondamentaux qui régissent les interactions multivalentes dans l'inhibition de glycosidases.

La synthèse de ligands à faible valence (inférieure ou égale à 8) mais de structuration spatiale contrôlée, nous a tout d'abord permis d'observer une amélioration importante d'affinité, qui est dépendante de la distribution spatiale des iminosucres. Nous avons également obtenu une sélectivité accrue envers *Jbαman*. De plus, un effet multivalent a aussi été observé sur une mannosidase d'intérêt biologique de la famille GH38. Des analyses AFM ont permis de montrer la formation d'agrégats, confirmé par DLS, qui pourraient expliquer les augmentations d'affinité observées.

Ensuite, la synthèse de différents ligands multivalents, à base de déoxynojirimycine et déoxymannojirimycine, de très haute valence, comprise entre 20 et 900, a été effectuée afin de déterminer l'influence de la valence dans l'inhibition des glycosidases. Les évaluations biologiques effectuées sur cinq glycosidases, mono et oligomériques, ont permis d'identifier deux enzymes sensibles aux effets multivalents, *Jbαman* et l' α -L-fucosidase de *thermotoga maritima*. Durant ces tests, un comportement particulièrement intéressant d'accélération de la catalyse enzymatique a pu être observé sur trois enzymes, démontrant ainsi que ces composés ultravalents peuvent aussi jouer le rôle d'activateurs enzymatiques.

Mots clé : glycosidases, iminosucres, multivalence, topologie.

Abstract

Despite significant research efforts made for the development of monovalent glycosidases inhibitors, few molecules reached the markets. This fact is easily explained by the complexity to obtain an inhibitor which possesses both a strong affinity and selectivity toward the targeted glycosidase. Recently, the possibility to significantly increase these two parameters was shown with multivalent glycosidase inhibitors.

The aim of the thesis has been to develop multivalent iminosugars displaying various structural parameters, such as ligand's topology or valence, in order to study fundamental aspects governing multivalents interactions for the inhibition of glycosidases.

The synthesis of low valency ligands (≤ 8) with controlled topology, allowed us to observe a strong increase of affinity and selectivity with α -mannosidase from Jack bean (*Jbαman*). Interestingly, a multivalent effect was also observed with a biologically relevant mannosidase from the GH 38 family. AFM and DLS analysis showed the formation of aggregates which potentially explain the increased affinity. Finally, the synthesis of ligands with much higher valencies (between 20 and 900), based on deoxynojirimycin and deoxymannojirimycin was performed to determine the influence of the valency on the affinity towards specific glycosidases. The biological assays made on five glycosidases, mono and oligomeric, allowed used to identify a new enzyme sensitive to multivalency, the alpha-L-fucosidase from *thermotoga maritima*. During these tests, we observed an increased enzymatic catalysis on three enzymes, demonstrating that ultravalents compounds can also play the role of enzymatic activators, and therefor modulating enzymatic activity.

Key words : glycosidases, iminosugars, multivalency, topology.