

Thèse de Doctorat

Sami BRUMENT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : ED3MPL

Discipline : Chimie organique

Spécialité : Glycochimie

Unité de recherche : CEISAM UMR 6230

Soutenue le 03 Novembre 2016

Ligands multivalents pour l'interaction par effet chélate avec les récepteurs nicotiques et les lectines AFL et DC-SIGN

JURY

Président du jury :
Rapporteur :

Olivier RENAUDET, Professeur des Universités, Département de chimie moléculaire de Grenoble
Boris VAUZEILLES, Directeur de Recherche au CNRS, ICMMO - SM2B - Université Paris-Sud

Examineur :

Gwladys POURCEAU, Maître de conférences, LG2A - Université de Picardie Jules Verne

Invité(s) :

Franck HALARY, Chargé de recherche au CNRS, INSERM/CRTI-Nantes

Directeur de Thèse :

Sébastien Gouin, Chargé de recherche au CNRS, CEISAM Nantes

Co-directeur de Thèse :

Patrice LE PAPE, Professeur d'université, Université de Nantes

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme. »

Rabelais

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Bruneau Bujoli pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire CEISAM (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse et Modélisation).

Je remercie tout particulièrement les Docteurs Olivier Renaudet, Boris Vauzeilles pour avoir accepté de juger ces travaux de thèse en tant que rapporteurs ainsi que Gwladys Pourceau pour avoir accepté d'être examinatrice.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Sébastien Gouin, mon directeur de thèse, ainsi que le Professeur David Deniaud, qui m'ont été d'un grand soutien pendant ces trois années, qui m'ont conseillé et aiguillé pour parvenir au bout de ces travaux de recherche. Merci également pour tous les bons moments passés ensemble, pour cette disponibilité même en dehors du cadre du laboratoire qui permettait de décompresser.

Merci à tous les membres du laboratoire, particulièrement au personnel technique, vous avez été vraiment présents quand j'avais besoin de vous, même pour me donner toutes les explications que je vous demandais avec une grande patience. Merci encore à tous les doctorants pour les bons moments passés ensemble que ce soit dans le laboratoire ou en dehors. Merci aussi à tous les membres de l'équipe CORAIL, permanents, doctorants, post-docs ou stagiaires avec qui cela a toujours été agréable de travailler et d'échanger.

Merci à Martin, Dimitri, Tibo. Si ces trois années ont été si agréables c'est en bonne partie grâce à vous, et pourvu que ça ne s'arrête pas là, on n'arrête pas un train CORAIL si facilement. Les moments passés ensemble que ce soit à la rituelle pause-café ou au Michelet du vendredi étaient obligatoires pour venir à bout de ces trois années. Les soirées jeux accompagnées de rhum au piment me manqueront, même s'il nous reste encore quelques occasions de le finir quand même ce rhum ! Merci à Lucie, même si tu n'es restée que quelques mois, tu t'étais fait ta place et on en a bien profité pendant tes stages. Merci beaucoup pour le travail que tu as abattu, pourvu que tes souvenirs du laboratoire ne soient pas trop marqués par mon amour pour la vaisselle.

Merci à ma famille, pour le soutien pendant toutes mes études et surtout pendant la thèse. Même si cette thèse n'aboutira sur rien de concret pour moi dans l'avenir, elle a au moins permis de vous montrer de quoi j'étais capable et de vous en mettre plein les yeux !

Merci surtout à Anaïs qui m'a toujours soutenu et aidé durant ces trois ans, si j'avais besoin de me relever tu as toujours été là, à me donner de la force pour surmonter les mauvais moments, tu as vraiment su me donner le courage d'aller au bout.

Abréviations :

9-BBN :	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane
ABPA :	Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
AFL :	Aspergillus Fumigatus Lectin
AFM :	Atomic-force microscopy (Microscope à force atomique)
AI :	Aspergillose invasive
AIBN :	Azobisisobutyronitrile
APC :	Allophycocyanin
Asn :	Asparagine
BSA :	Bovine serum albumine (albumine de sérum bovin)
CD :	Cyclodextrine
CFU :	Colony-Forming Unit (unité formant colonie)
cGMP :	Cyclic guanosine monophosphate (guanosine monophosphate cyclique)
CLR :	C-type lectin receptor (récepteur lectine de type C)
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	Cytomégalovirus
CNG :	Cyclic nucleotide-gated
ConA :	Concavaline A
CRD :	Carbohydrate recognition domain (domaine de reconnaissance des sucres)
CuAAC :	Copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (cycloaddition alcyne-azoture cupro-catalysée)
CYP3A4 :	Cytochrome P450 3A4
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCM :	Dichlorométhane
DCs :	Dendritic cells (cellules dendritiques)
DEAD :	Diéthyl azodicarboxylate

DIAD :	Diisopropyl azodicarboxylate
DLS :	Dynamic light scattering (diffusion dynamique de la lumière)
DMAP :	4-Diméthylaminopyridine
DME :	Diméthoxyéthane
DMF :	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMJ :	désoxymannojirimycine
DNJ :	désoxynojirimycine
DPPA :	Diphenylphosphoryl azide (azoture de diphosphoryle)
EC₅₀ :	(half maximal) Effective concentration (concentration efficace médiane)
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
gB :	Glycoprotéine B
GFP :	Green fluorescent protein (Protéine fluorescente verte)
Glc :	Glucose
Glu :	Glutamate
GM1 :	Monosialotetrahexosylganglioside
HAART :	Highly active antiretroviral therapy (traitement antirétroviral hautement actif)
HATU :	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBA :	Hydrogen bond acceptor (accepteur de liaison hydrogène)
HM :	Heptylmannoside
HOBT :	Hydroxybenzotriazole
IC₅₀ :	(half maximal) Inhibitory concentration (Concentration inhibitrice médiane)
IL :	Interleukine
ITC :	Isothermal titration calorimetry (titration calorimétrique isotherme)
JbMan :	mannosidase de Jack Bean
Kd :	Constante de dissociation

Ki :	Constant d'inhibition
LiHMDS :	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
LT :	Lymphocytes T
Man :	Mannose
MBP :	Mannose binding protein (protéine se liant au mannose)
MOI :	Multiplicity Of Infection (multiplicité d'infection cellulaire)
nAChR :	Nicotinic acetylcholine receptor (récepteur nicotinique à acetylcholine)
NK :	Natural Killer (tueur naturel)
OEG :	Oligoéthylène glycol
PA :	Potentiel d'action
PPSE :	Potentiel post-synaptique excitateur
PRR :	Pattern recognition receptor (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROMP :	Ring-opening metathesis polymerization (polymérisation par ouverture de cycle)
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC :	Système nerveux central
TCR :	T cells receptors (récepteurs des Lymphocytes T)
TEBAC :	triéthylbenzylammonium
TES :	Triethylsilane
THF :	Tetrahydrofurane
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine

Sommaire

Ligands Multivalents : Principes et applications.....	1
I. Effets de multivalence	2
1) Définition et principes généraux	2
2) Effets multivalents	3
3) Structuration d'un composé multivalent.....	12
II. Champs d'application de la multivalence	24
1) Inhibition de l'interaction hôte-pathogène.....	24
2) Inhibition de protéines fonctionnelles	28
III. Objectifs.....	32
1) Inhibiteurs multivalents d'adhésion du cytomégalovirus	32
2) Inhibiteurs multivalents d'adhésion d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	32
3) Ligands multivalents de récepteurs nicotiniques	33
<i>Aspergillus fumigatus</i>	34
I. Introduction	35
1) Découverte/partie historique	35
2) Risque infectieux	36
3) Aspergilloses.....	36
4) Traitements.....	39
5) Adhésion fongique - <i>Aspergillus fumigatus</i> lectin	41
6) Stratégie antiadhésive appliquée à AFL - structures envisagées.....	44
II. Synthèse	46
1) Synthèse des charpentes	46
2) Synthèse des ligands	52
3) Insertion des ligands sur la charpente	55

4) Synthèse du ligand monovalent de référence.....	58
III. Evaluations biologiques.....	58
1) Titration calorimétrique isotherme.....	59
2) Test d'adhésion de conidies sur pneumocytes en présence de fucosides.....	65
IV. Conclusion.....	68
Inhibiteurs de DC-SIGN et de l'adhésion du CMV.....	69
I. Le cytomégalovirus, un pathogène opportuniste.....	70
1) Découverte/partie historique.....	70
2) Epidémiologie.....	70
3) Risques infectieux congénitaux et de l'immunodéprimé.....	71
4) Structure du CMV.....	73
5) Rôle des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire adaptative.....	73
6) Echappement viral.....	75
7) Traitements actuels.....	75
II. DC-SIGN.....	76
1) Rôles de DC-SIGN dans l'immunité et la mobilité des DCs.....	77
2) Voie d'entrée virale.....	78
3) Structure générale de DC-SIGN.....	81
4) Stratégie antiadhésive appliquée à DC-SIGN.....	84
5) Stratégie multivalente et structures envisagées.....	88
III. Les dérivés de quinoxalinone.....	90
1) Généralités.....	90
2) Discussion de la synthèse décrite par Kiessling.....	94
3) Modification de l'alcène terminal.....	98
4) Modification de l'alcool terminal en azoture.....	104
IV. Inhibiteurs de première génération.....	105

1) Synthèse des charpentes	105
2) Synthèse des mannosides de première génération	109
3) Insertion des ligands sur la charpente et déprotection des composés	110
4) Synthèse du ligand monovalent de référence	112
5) Test de <i>trans</i> -infection	112
6) Test d'inhibition de l'adhésion de la glycoprotéine B.	115
V. Inhibiteurs de seconde génération.....	116
1) Ligands de seconde génération	117
2) Insertion des ligands sur les charpentes	118
3) Tests d'adhésion de la gB.....	121
VI. Conclusion.....	123
Inhibiteurs multivalents de récepteurs nicotiques... 125	
VII. Récepteurs à l'acétylcholine et maladies neurodégénératives.....	126
4) Fonction physiologique.....	126
5) Structure des récepteurs nicotiques neuronaux.....	127
6) Les maladies neurodégénératives.....	128
7) Nicotine et dérivés nicotiques	129
8) L'altinicline ((S)-SIB-1508Y)	131
9) Stratégie multivalente et structures envisagées.....	132
10) Synthèse du SIB	134
11) Composés multivalents.....	136
VIII. Conclusion.....	139
Conclusion Générale	140
Partie expérimentale.....	144
Bibliographie.....	194

Ligands Multivalents :

Principes et applications

I. Effets de multivalence

1) Définition et principes généraux

En biologie, les liaisons inter ou intracellulaires sont parfois basées sur des interactions ligand-récepteur faibles. Un moyen trouvé par la nature pour augmenter l'affinité et la spécificité de ces adhésions est la présentation multiple des motifs de reconnaissance conduisant à un grand nombre d'interactions simultanées (Figure 1).¹

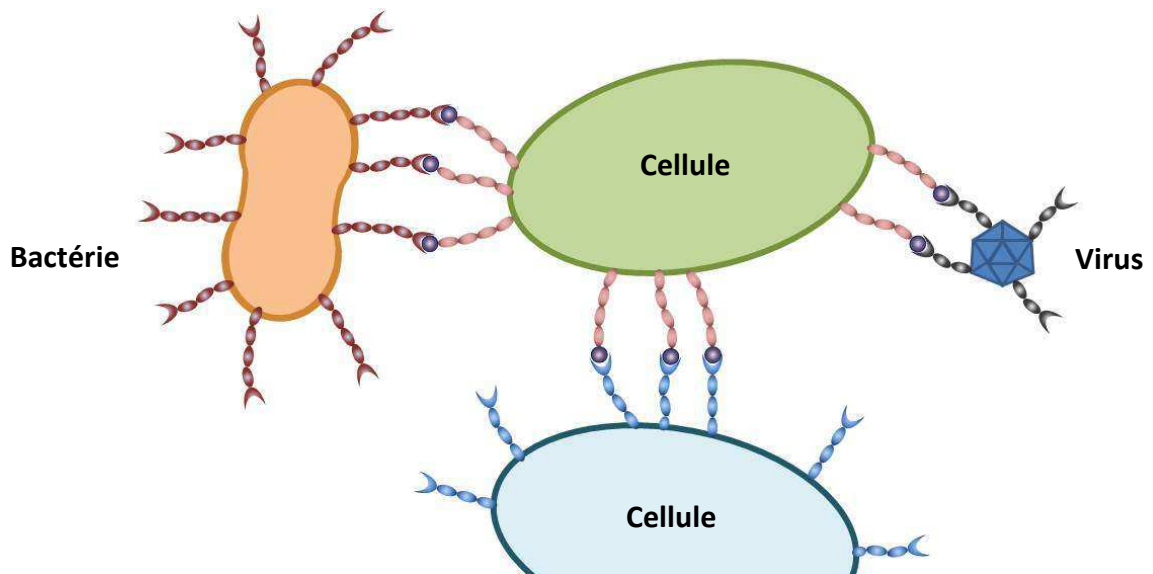


Figure 1 : Exemples d'interactions multivalentes

La multiplication des liaisons ligand-récepteur au niveau moléculaire peut conduire à une adhésion globale forte au niveau cellulaire qui peut être bien supérieure à la simple addition des interactions faibles. Cela peut être expliqué par des phénomènes de multivalence ou de coopérativité au niveau du récepteur ou au niveau cellulaire. Néanmoins, il faut bien dissocier les processus de coopérativité et de multivalence. Lorsqu'une protéine possède plusieurs sites d'interactions, un ligand se fixant sur un de ces sites peut influencer l'affinité des autres récepteurs par un phénomène connu sous le nom de « coopérativité ».² Si la coopérativité est liée à l'interdépendance de plusieurs récepteurs, la multivalence se détache de ce concept puisqu'elle peut intervenir sur différents récepteurs indépendants.

La multivalence a été particulièrement étudiée sur les protéines se liant aux sucres (lectines) par l'équipe de Lee qui a introduit le terme « cluster effect ».³ Les auteurs ont notamment observé une augmentation significative de l'affinité pour des protéines reconnaissant des motifs mannoses (MBP : mannose binding protein) avec des mannosides

di- et trivalents ($IC_{50} = 120 \mu M$ pour la meilleure structure) en comparaison avec le mannose ($IC_{50} = 1100 \mu M$). Depuis, de nombreuses équipes de recherche ont développé des structures synthétiques pour obtenir des gains d'affinité par multivalence. Malgré le nombre important de publications sur ce thème, la détermination de la structure optimale pour obtenir un effet multivalent et la prédiction de son affinité potentielle reste difficile et demeure un enjeu majeur.

La difficulté provient en partie des nombreux modes de liaisons possibles qui peuvent opérer de façon indépendante ou simultanée. Ces différents types d'interaction peuvent notamment varier en fonction de la structuration des composés multivalents, selon la charpente chimique employée, le type d'espaceur ou la nature du ligand.

2) Effets multivalents

La conception d'une structure multivalente passe tout d'abord par l'étude tridimensionnelle de la protéine ciblée. Ainsi le concept de multivalence sera abordé de manière différente si la protéine étudiée présente un seul site d'interaction ou plusieurs, proches ou non spatialement. Les aspects topologiques de la protéine et du ligand vont être essentiels pour la formation d'une interaction multivalente de type effet de glissement, agrégatif et chélate.⁴

i. Effet de glissement/recapture

Après une première interaction d'un épitope du composé multivalent sur un récepteur, la proximité d'autres épitopes adjacents permet la recapture d'un second ce qui diminue la vitesse de dissociation du complexe (Figure 2). Ce phénomène de recapture (ou glissement) peut être expliqué par une concentration en ligand plus importante à proximité du récepteur.

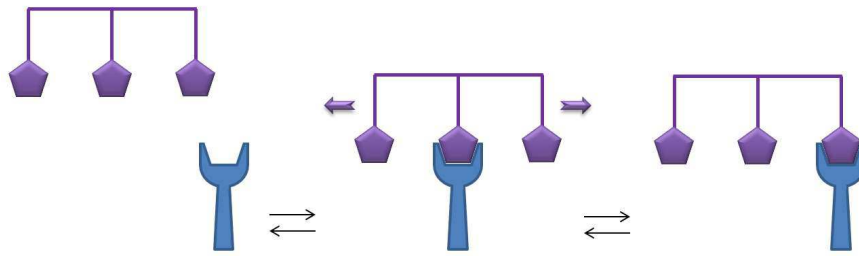


Figure 2 : Effet de glissement

La vitesse de complexation entre un ligand et son récepteur est dépendante de la concentration des deux entités. Si on augmente la concentration en ligand, il sera plus facile de créer une liaison ligand-récepteur. Ainsi, une structure multivalente va créer une augmentation « artificielle » de la concentration dans l'environnement du site d'interaction (que l'on peut schématiser par une sphère) que l'on nomme concentration effective. En cas de perte de la liaison ligand-récepteur, cette concentration effective élevée permettra d'augmenter la vitesse d'association du complexe et donc la recapture rapide d'un second épitope. (Figure 3)

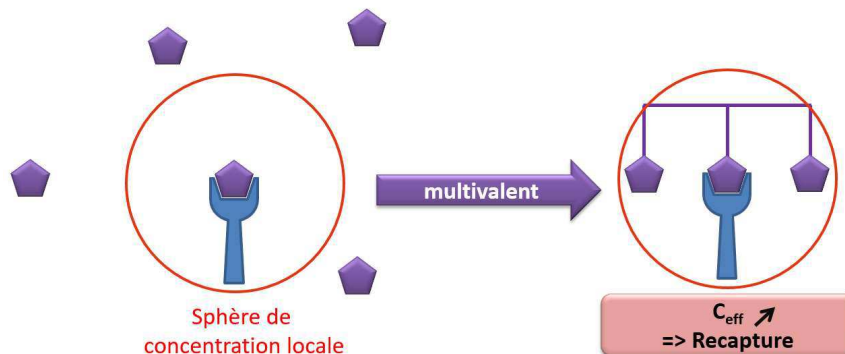


Figure 3 : Concentration effective et influence sur les effets de recapture

Ce phénomène peut se produire avec tous types de composés multivalents, mais est particulièrement important dans le cas de structures à très haute valence (polymères et glycoprotéines).^{5,6} Par exemple, une étude par calorimétrie (ITC) a mis en évidence une diminution de la constante de dissociation d'un facteur 10^6 de l'interaction entre une glycoprotéine présentant ~2300 motifs *N*-acétyl- α -galactoside avec une lectine de soja en comparaison avec le sucre monovalent.⁷

ii. Effet agrégatif - formation de réseaux

Lorsqu'une structure multivalente présente des ligands suffisamment éloignés dans l'espace, il est alors possible qu'elle interagisse simultanément avec plusieurs protéines multimériques pour former des réseaux agrégatifs de différentes tailles et formes (Figure 4).

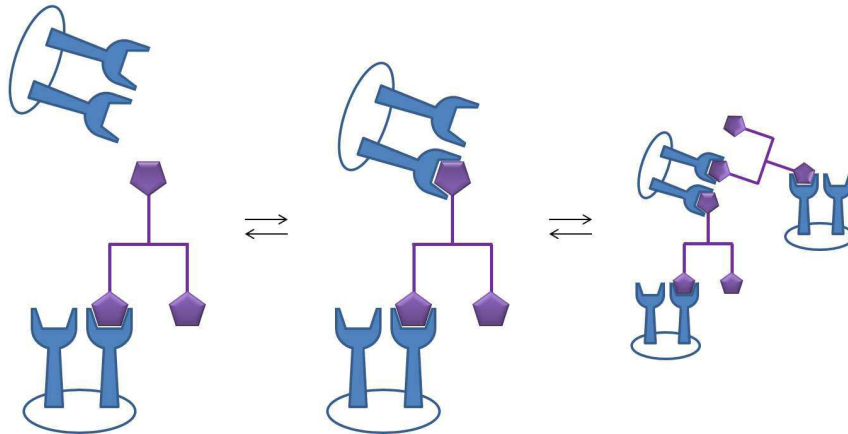


Figure 4 : Effets agrégatifs

La constitution d'agrégats et leur précipitation favorise la formation du complexe ligand-protéine en accord avec la loi d'action de masse : la précipitation conduit à une diminution de la concentration en complexe déplaçant l'équilibre de complexation en faveur de sa formation.

Plusieurs types d'organisation ont été décrits pour l'arrangement des agrégats formés. Lorsqu'une protéine dimérique interagit avec un ligand divalent, seule une organisation linéaire est possible (Figure 5a). Si l'un des partenaires a une valence de deux et l'autre plus élevée, il y a formation d'un réseau bidimensionnel que l'on peut qualifier de maillage (Figure 5b). Brewer et al. ont participé à l'identification de ces structures d'agrégats avec certaines galectines^{8,9}.

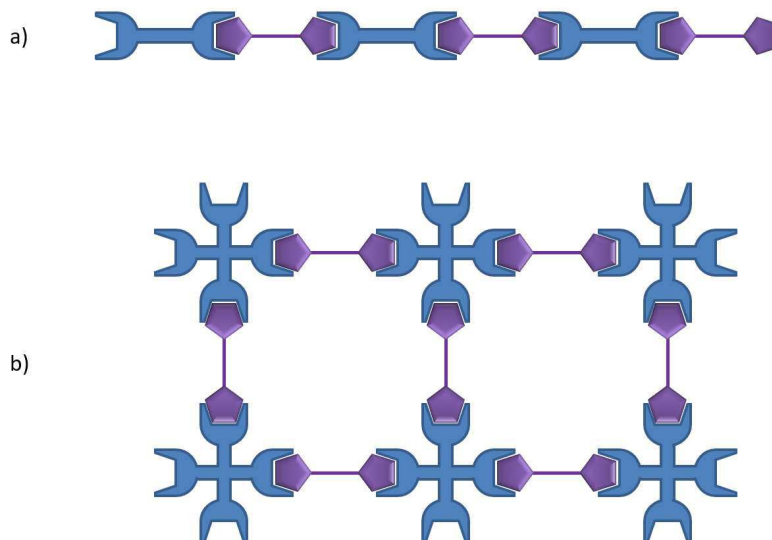


Figure 5 : Structuration des réseaux lors de modes de liaison agrégatifs

Ce phénomène a été observé plus récemment dans notre équipe, lors de l'étude d'inhibiteurs multivalents de glycosidases. Cette étude portait sur une série de composés tétra- et octavalents pour l'inhibition de différentes glycosidases. Il a été démontré, par corrélation entre des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et de microscopie de force atomique (AFM), qu'il y avait une relation entre le phénomène d'agrégation et l'activité inhibitrice des composés multivalents sur l' α -mannosidase de Jack Bean (Tableau 1)¹⁰.

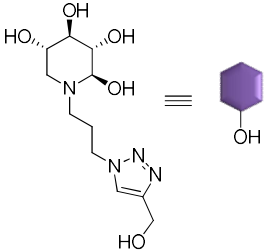
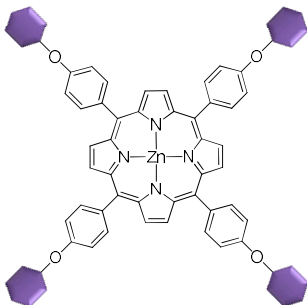
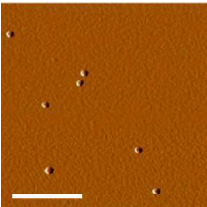
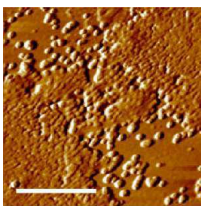
Composé		
Constante d'inhibition (Ki)	400 ± 48	0.5 ± 0.05
Cliché AFM		

Tableau 1 : Corrélation entre pouvoir inhibiteur et formation de réseaux

iii. Densité d'épitopes

La structure d'un composé multivalent permet de regrouper spatialement plusieurs épitopes. Cela se traduit par une densité plus ou moins grande en épitopes ce qui a un impact significatif sur l'interaction ligand-protéine.^{11,12} Cela a été particulièrement étudié par Kiessling et al. lors d'une étude sur la Concanavaleine A (ConA), une protéine tétravalente reconnaissant des motifs mannose. L'objectif de leurs travaux était de faire varier la densité de mannose sur une même structure.

Pour cela, Kiessling et al. ont synthétisé deux synthons portant un groupement 5-norbornène-2,3-dicarboximide réactif pour la métathèse ROMP, l'un avec un mannose et l'autre avec un galactose. Ces deux monomères ont été employés en différentes concentrations dans des métathèses ROMP pour générer sept copolymères avec des densités en épitopes mannose variables (Figure 6).¹³

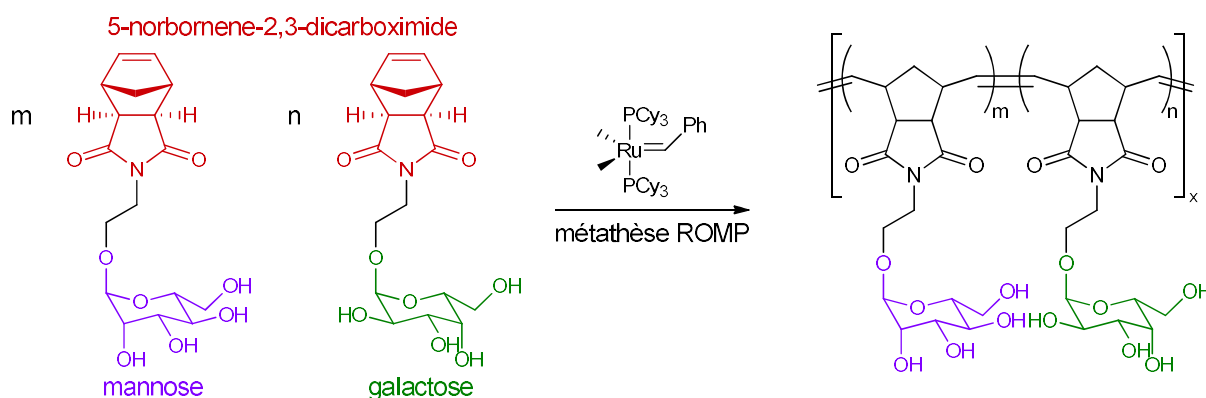


Figure 6 : Métathèse ROMP - structure des copolymères

Les sept polymères présentant différents pourcentages en mannose (rapport entre la quantité de mannose et la quantité totale de sucre sur le polymère) ont ensuite été testés sur ConA. La stœchiométrie ligand-protéine ainsi que la vitesse de complexation ont été étudiées et présentent des variations intéressantes en fonction du pourcentage en mannose (Tableau 2).

%mannose	Stœchiométrie (ConA/polymère)	ConA/mannose	Vitesse de complexation lecture graphique (AU/min)
100	16	0,11	0,26
71	15	0,14	0,14
45	9	0,17	0,075
31	7	0,26	0,06
18	6	0,33	0,03
10	3	0,25	0,025
2	1	0,5	-

Tableau 2 : influence de la densité en mannose sur les paramètres d'interaction avec ConA

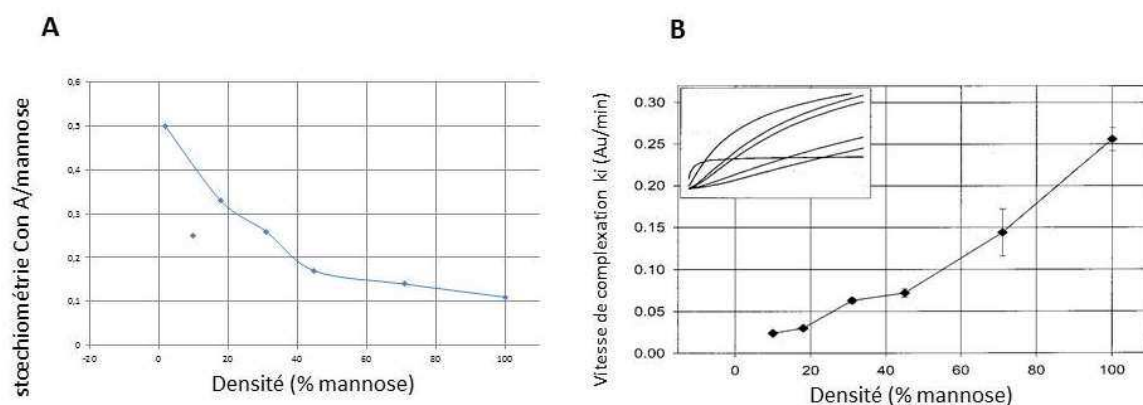


Figure 7 : stœchiométrie Con A/mannose (A) et vitesse de complexation (B) en fonction de la densité en mannose

Lorsqu'on augmente considérablement la densité en mannose, on observe une stœchiométrie ConA/mannose qui diminue exponentiellement, ce qui traduit qu'une seule partie des mannoses est mobilisée sur l'ensemble du polymère. Cependant, un polymère plus dense en épitope pour lequel la concentration locale en mannose sera importante conduit à une plus grande vitesse de complexation, qui croît en fonction du pourcentage en mannose (Figure 7).

Ainsi, l'ensemble de ces observations démontre que la densité en ligands a une influence sur les effets de multivalence et notamment sur les effets agrégatifs.

iv. Effet chélate

Comme énoncé précédemment, le design de structures multivalentes est grandement facilité lorsque l'on connaît la structure de la protéine cible. Les avancées technologiques en spectrométrie de diffraction des rayons X ainsi que la mise à disposition de structures de protéines par des plateformes d'échanges telles que la PDB nous permettent aujourd'hui d'appréhender de manière plus rationnelle le design de composés multivalents.

Cela est d'autant plus vrai lorsque l'effet de multivalence recherché est l'effet chélate. Ce dernier correspond à l'interaction simultanée de multiples ligands présentés sur un inhibiteur multivalent avec les sites de reconnaissance d'une protéine multimérique. En connaissant les distances entre les récepteurs d'une protéine il sera possible de concevoir une structure adaptée capable de se fixer simultanément avec les différents sites (Figure 8).

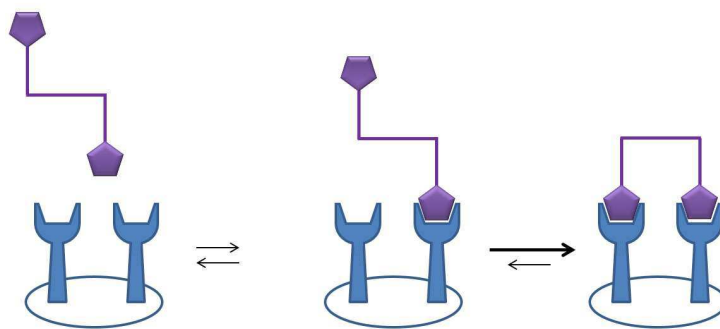
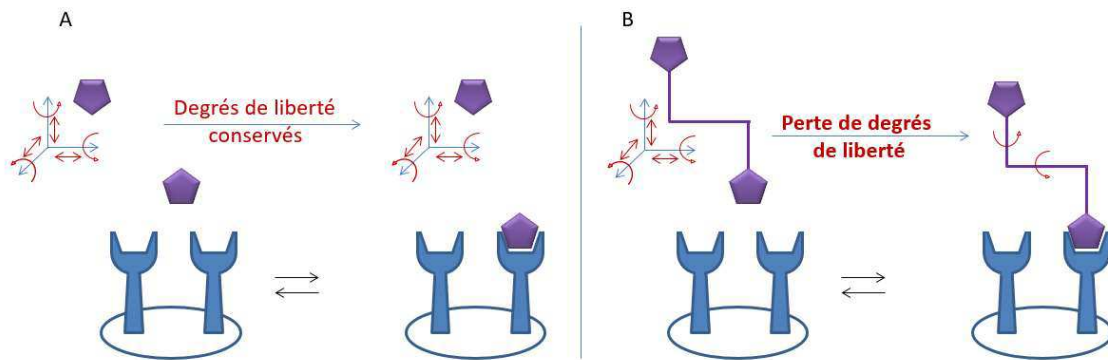


Figure 8 : Effet chélate

Lorsqu'une molécule évolue sans contrainte dans un milieu, elle possède une liberté de mouvement traduite par de nombreux degrés de liberté translationnels et rotationnels. Si on lui applique une contrainte, telle qu'une liaison avec une protéine, tous les degrés de liberté translationnels et certains rotationnels disparaissent (Figure 9). C'est ce qui traduit la diminution du facteur entropique dans l'association du complexe ligand-récepteur.

Une des limitations dans la formation d'un complexe ligand-récepteur vient de la probabilité de leur rencontre qui transparait dans l'entropie de la réaction. Dans le cas d'une structure multivalente, une perte entropique lors de la formation du complexe se rencontre principalement lors de la première interaction ligand/protéine. Le complexe se trouve alors préorganisé pour une seconde interaction, et la perte entropique est alors fortement diminuée.



A) Degrés de libertés (rotations et translations) dans le cadre d'interactions monovalentes multiples.

B) Pertes de translations et de rotations pour une interaction multivalente par effet chélate

Figure 9 : Paramètres entropiques de l'effet chélate

Un des exemples marquants reporté dans la littérature concerne des inhibiteurs pentavalents développés par Fan *et al* pour l'inhibition d'une entérotoxine produite par *Escherichia coli*. Cette toxine possède une structure symétrique composée de cinq monomères équivalents. Chacune de ces sous-unités possède un site d'interaction reconnaissant des motifs ganglioside GM1 qui sont des glycolipides présents sur la paroi intestinale. Il s'est avéré que c'était principalement les galactoses des gangliosides GM1 qui étaient reconnus. Par une approche rationnelle, Fan *et al.* ont élaboré des inhibiteurs présentant cinq dérivés galactoses séparés par des espaceurs flexibles portés par une structure pentaazacyclique. Cela a permis de les ordonner spatialement de manière à obtenir un effet chélate en occupant simultanément les cinq sites d'interaction de la protéine. Ils ont de cette manière obtenu, pour une de leur structure, une augmentation d'affinité d'un facteur 10^5 en comparaison avec le galactose (Figure 10A).¹⁴

Ce récepteur a également été ciblé en combinant l'effet chélate et l'effet agrégatif selon un mode particulier d'interaction que l'on nommera chélate-agrégatif. Ainsi, dans une seconde étude, Fan *et al.* ont modifié les structures pentavalentes précédentes en ligands décavalents. Ces composés ont été capables d'interagir non plus avec une mais avec deux protéines pentavalentes de toxine du choléra (Figure 10B). Ils ont obtenu dans ce cas une augmentation d'affinité d'un facteur 10^6 en comparaison avec le galactose, ce qui représente une affinité 10 fois supérieure à celle de son homologue pentavalent.¹⁵

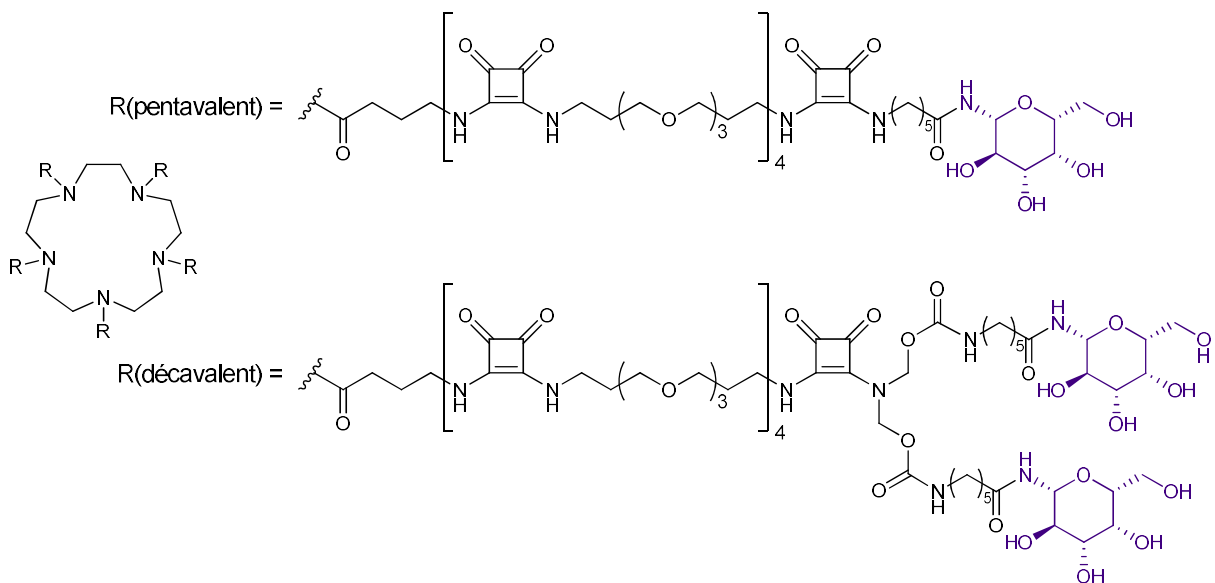
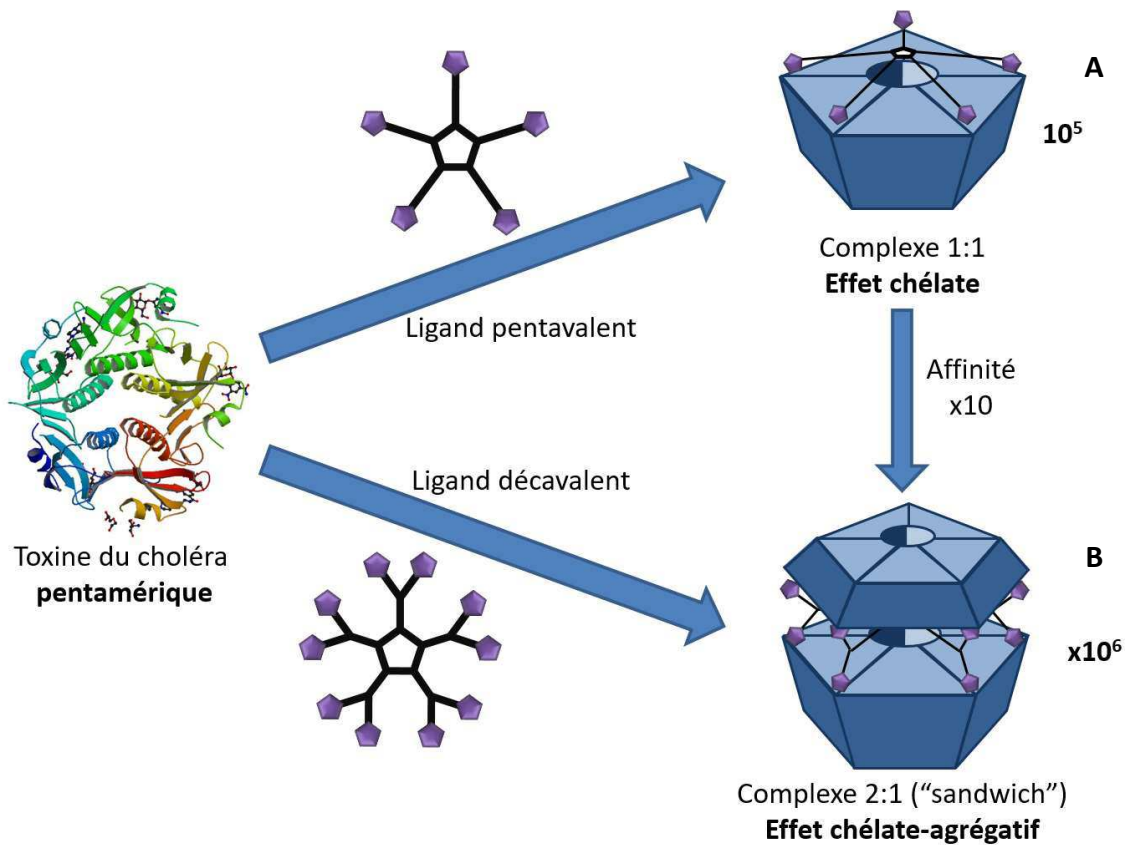


Figure 10 : effet chélate agrégatif - galactosides pentavalent et décavalent pour l'inhibition de toxines du choléra

L'effet chélate peut donc conduire à des gains d'affinité très importants si le ligand multivalent synthétisé est complémentaire à la cible. Le choix de la charpente centrale, du type d'espaceur et de leurs longueurs sont des facteurs particulièrement importants pour le

design d'une structure multivalente à forte affinité. Ils seront développés de façon plus approfondie dans la suite du manuscrit.

v. Affinité par ligand - Facteur β

Pour quantifier les effets de multivalence, il convient de comparer l'affinité observée avec la structure multivalente à celle du ligand monovalent de référence. Pour cela, le facteur β (ou effet β) a été défini : il représente le gain d'affinité apporté par chaque ligand monovalent de la structure multivalente en comparaison avec un ligand monovalent.¹⁶ Il est obtenu en divisant la constante de dissociation K_d du ligand monovalent par celle de la molécule multivalente multipliée par sa valence (Équation 1). Même si Whiteside décrit à l'origine ce calcul en employant les K_d , il est également possible d'utiliser les IC_{50} ou d'autres constantes d'affinité.

$$\text{facteur } \beta = \frac{K_d(\text{mono})}{K_d(\text{multi}) \times V} \quad \text{Équation 1}$$

Pour avoir une valeur fiable, il est fondamental de choisir un composé monovalent de référence dont la structure soit similaire à celle des ligands greffés. En effet, selon la protéine étudiée, un groupement chimique différent pourra potentiellement engendrer une interaction secondaire qui n'aurait aucun lien avec un effet de multivalence. Le composé monovalent de référence devra donc inclure le ligand, le lien chimique d'accroche à la plateforme et une partie du bras espaceur.

3) Structuration d'un composé multivalent

i. Importance du ligand

Comme expliqué précédemment, une structure multivalente est tripartite et chaque partie joue un rôle essentiel pour l'interaction avec la protéine. L'optimisation d'un ligand monovalent de manière à augmenter son affinité intrinsèque pour le récepteur est une étape préalable indispensable pour générer des structures multivalentes encore plus affines. Notre équipe a utilisé cette stratégie pour développer des inhibiteurs puissants de l'adhésion cellulaire d'*Escherichia coli* exprimant la lectine FimH.

FimH est une protéine adhésive qui reconnaît des motifs mannose présents notamment sur les cellules épithéliales de l'intestin ou du conduit urinaire. FimH présente un site

d'interaction avec une cavité hydrophile dans laquelle vient se lier l' α -D-mannose avec un K_d de 2,3 μ M. Cette poche est séparée de la surface de la protéine par un conduit hydrophobe terminée par deux tyrosines. L'insertion d'un groupement hydrophobe en position anomérique du mannose peut ainsi apporter une interaction supplémentaire.

C'est par une découverte fortuite d'une contamination irréversible de FimH par le butylmannoside que l'idée de développer des alkylmannosides est née. Des dérivés d'alkylmannoside présentant une chaîne carbonée en position anomérique ont été synthétisés pour déterminer la longueur optimale de cette chaîne. Il s'est avéré que l'heptylmannoside (HM) était le meilleur candidat avec un K_d 460 fois inférieur à celui de l' α -D-mannose (Figure 11A).¹⁷

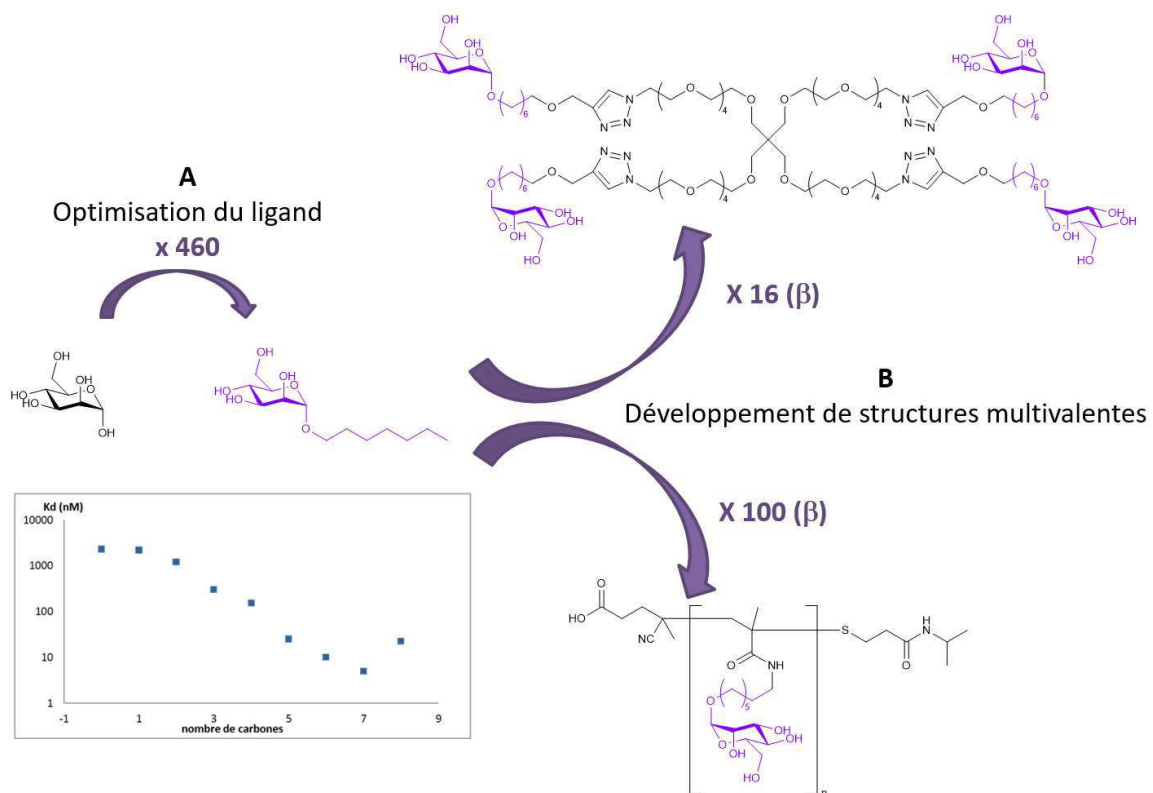


Figure 11 : Développement d'inhibiteurs multivalents de FimH : A) Optimisation d'un ligand monovalent (heptylmannoside) ; B) Développement de structures multivalentes d'HM.

L'identification de l'HM a ensuite donné lieu à l'élaboration de nombreuses structures multivalentes et particulièrement dans notre groupe de recherche. Le meilleur candidat fut un composé tétravalent d'HM qui a montré une affinité 64 fois ($\beta = 16$) supérieure à celle de

l'HM et 6000 fois supérieure à celle du mannose (Figure 11B).¹⁸ Ces études se sont poursuivies par l'élaboration de structures polyméthylacrylamide multivalentes plus complexes. La plus intéressante présente un facteur β supérieur à 100 avec l'HM comme référence.^{19,20} En comparaison un polymère ne présentant pas l'HM mais l'éthylmannoside comme ligand a montré une affinité bien inférieure montrant l'intérêt de synthétiser des structures multivalentes avec des ligands puissants.

ii. *Charpentes multivalentes - Topologie et densité d'épitopes*

Un grand éventail de charpentes chimiques a été décrit dans la littérature pour construire des ligands multivalents. Elles peuvent être classées en cinq grands ensembles : Les petites structures à valence modérée, les structures dendrimériques, les nanostructures (nanoparticules et protéines) et enfin les structures polymériques (Tableau 3).


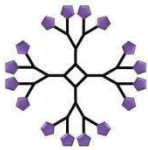
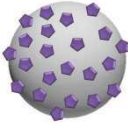
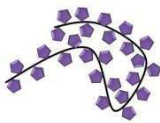
Structure				
Type	Petites molécules de faible valence	Dendrimères	nanostructures	polymères
Valences les plus reportées	2-10	4-16	15 - 30	100-1000
Contrôle de la valence	contrôlée	contrôlée	Non contrôlée	Non contrôlée
Exemple de la littérature	Fan et al. ¹⁴	Sharpless et al. ²¹	Penadés et al. ²²	Kiessling et al. ²³
Valence et Facteur β de l'exemple	Valence = 10 $\beta = 10^6$	Valence = 16 $\beta = 240$	Valence = 25 $\beta = 765$	Valence = 700 $\beta > 1000$

Tableau 3 : Type de charpentes multivalentes, valences et exemples correspondants.

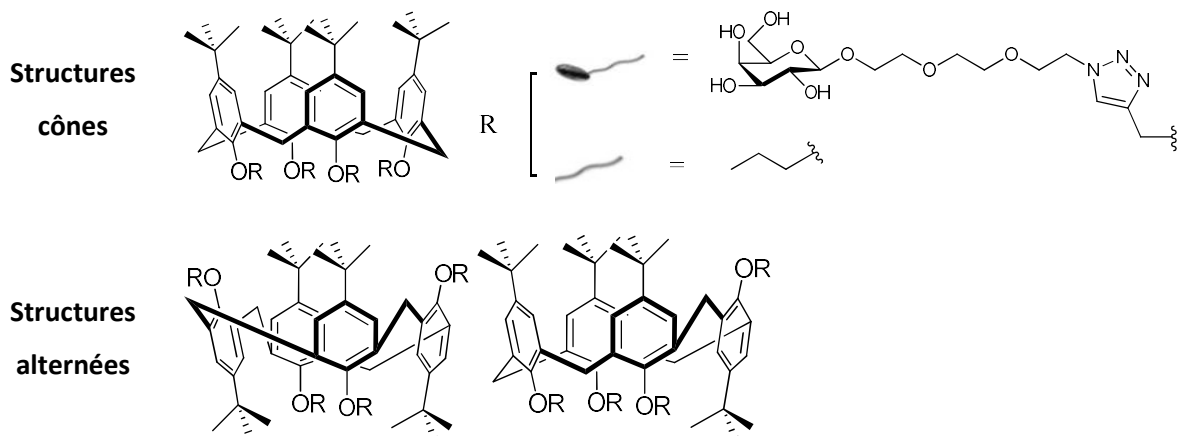
Comme il existe de nombreux types de charpente, il est très difficile d'appréhender son apport au niveau de l'affinité. La solution la plus radicale est de tester tous les types de

charpentes pour identifier celle qui convient le mieux. Kiessling *et al.* ont adopté cette solution dans le cadre d'un développement de ligands multivalents très affins pour la lectine ConA.²³ Ils se sont basés sur cinq types de structures : petites molécules à faible valence (valence = 2-3), dendrimères (valence = 4-16), protéines globulaires (valence = 15-20), polymères linéaires à valence modérée (valence = 5-100), polymères polydisperses à très haute valence (valence = 700). Différents paramètres ont été étudiés sur l'interaction de ces mannosides multivalents avec ConA : avidité, vitesse de complexation, agrégation. Cette étude a mis en évidence la plus grande affinité apportée par le polymère à très haute valence avec ConA ($\beta > 1000$, reporté dans le tableau) très liée à sa capacité agrégative.

Les propriétés topologiques d'un ligand représentent la disposition des épitopes dans l'espace qui est dictée par la nature de la charpente et des espaceurs. S'il est très difficile de déterminer l'organisation spatiale des ligands sur des structures polymériques flexibles, cet aspect a été étudié sur des charpentes à faible valence. Un travail de Vidal *et al.* présente des calix[4]arènes multivalents terminés par quatre galactoses capables d'interagir avec la lectine PA-IL de la bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*.²⁴

Les calixarènes sont des structures macrocycliques associant quatre à huit phénols séparés par un pont méthine. Très souvent les phénols sont *para* substitués par un groupement encombrant (fréquemment isopropyle). La présence de groupements encombrants sur une même face du calixarène entraîne une gêne stérique obligeant le macrocycle à adopter une forme de calice. Cependant, d'autres structures de calix[4]arènes ont été développées dans le but d'orienter les groupements phénols de manière alternés, discriminant deux types de calixarènes : cône avec tous les phénols sur la même face, et alternés avec au moins un phénol sur une face différente.

Cette diversité topologique a été exploitée par Vidal *et al.* pour l'élaboration de structures multivalentes de galactose. C'est à travers de tests de calorimétrie en ITC et de SPR qu'ils ont souligné la différence d'apport d'affinité entre les différentes topologies de charpentes employées.²⁵ (Tableau 4)



Type de structure	cône					alterné	
Structure schématisée							
Topologie	ref	2 : 0	2 : 0	3 : 0	4 : 0	2 : 2	1 : 3
Kd (nM)	150000 ± 33000	/	/	2050 ±389	4200 ±160	176 ± 6	200 ± 5
IC ₅₀	71900	/	/	6400	2500	500	1700
β (Kd)	1	/	/	24	90	213	188
β (IC ₅₀)	1	/	/	4	7	36	11

Tableau 4 : Corrélation de la topologie des calixarènes galactosylés et de leur affinité pour PA-IL.

Les deux structures tétravalentes avec une topologie alternée (1 : 3 et 2 : 2) montrent un Kd ainsi qu'une IC₅₀ très inférieurs à celles comportant les galactoses sur la même face. En effet, une structure de calix[4]arène alternée permet une interaction simultanée avec deux protéines donnant lieu à un effet chélate-agrégatif conduisant à un gain d'affinité très important. Cet effet préalablement démontré par des études par modélisation moléculaire a été validé par des clichés de microscopie de force atomique validant la formation d'agrégats linéaires protéine-ligand-protéine (Figure 12).

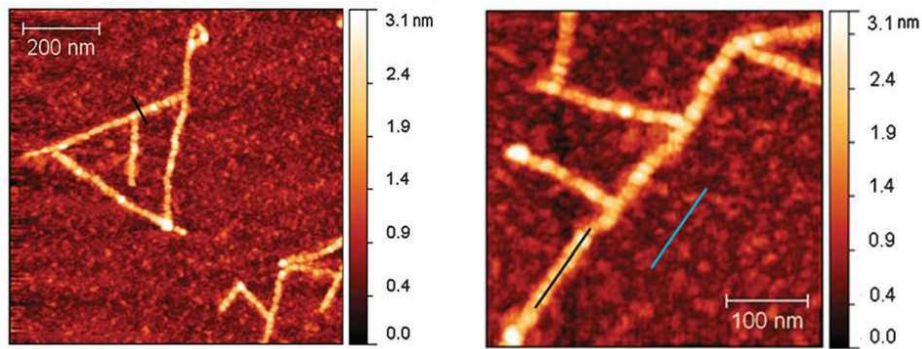


Figure 12 : Clichés AFM d'agrégats linéaires protéine-ligand-protéine avec des dérivés galactosides calix[4]arènes

L'objectif pour une stratégie multivalente étant de présenter à un ensemble de récepteurs plusieurs épitopes de la manière la plus efficace, Vidal *et al.* ont montré l'intérêt du choix de la charpente et des effets de topologie qu'elle peut apporter.

Dans ce contexte, le choix du « bras espaceur » est également d'une importance fondamentale.

iii. Importance de l'espaceur - les oligoéthylènes glycol (OEGs)

L'utilisation d'un espaceur est souvent nécessaire pour augmenter l'accessibilité du ligand à sa cible et limiter la gêne stérique engendrée par la proximité de la charpente. Sa taille doit être ajustée avec précision quand une protéine multimérique est ciblée par effet chélate.

Karpen *et al.* ont étudié l'influence de la longueur d'espacesurs oligoéthylène glycol (OEG) sur l'affinité pour leur récepteur de guanosines monophosphates cycliques (cGMP) divalentes.²⁶ Ils ont synthétisé sept structures avec deux cGMP séparées par des OEG de taille variable (Figure 13A) afin de déterminer la distance optimale pour une interaction simultanée avec deux récepteurs. Il s'agit de récepteurs à canaux cationiques contrôlés par les nucléotides cycliques qui sont des protéines possédant quatre sites d'interaction. Des tests d'activation sur deux CNG différentes (l'une provenant du bœuf (OLF) et l'autre du rat (RET)) ont été effectués pour évaluer la distance entre les récepteurs et déterminer la variabilité entre ces deux protéines (Figure 13B).

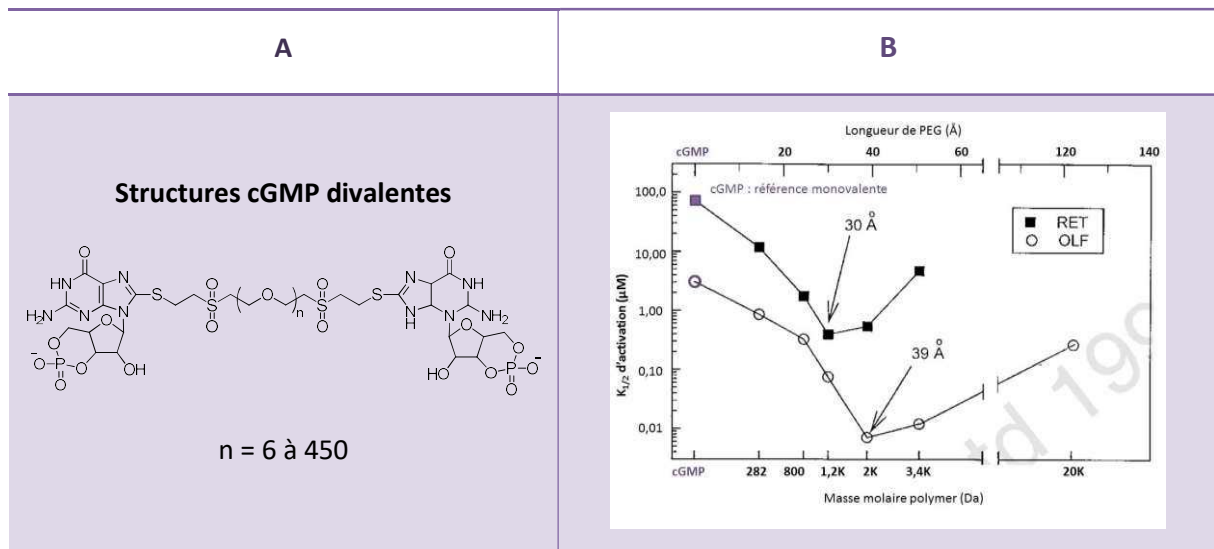


Figure 13 : cGMP divalents et interaction avec OLF et RET

L'évolution de l'affinité des cGMP divalents pour les récepteurs OLF et RET en fonction de la longueur de l'OEG est similaire dans les deux cas. En partant d'un maximum avec des espaceurs courts, on observe une décroissance de la valeur de la constante puis une augmentation avec des OEG plus longs. L'apparition d'un minima témoigne d'une longueur optimale d'OEG pour un effet chélate maximal. De façon intéressante, cette valeur leur a permis de déterminer la distance qui sépare les sites de reconnaissance sur la protéine, en se basant sur un calcul de la longueur de l'OEG utilisé.

Whitesides et al. ont étudié la longueur d'espaceur sous une approche différente.²⁷ Lorsqu'un composé divalent se lie par un de ses épitopes, cela augmente la concentration (ou molarité) effective en ligand à proximité d'un second site de liaison comme expliqué dans la partie I.1.2.i. De plus, cette molarité effective est optimale lorsque la longueur de chaîne de l'espaceur est adaptée (Figure 14).

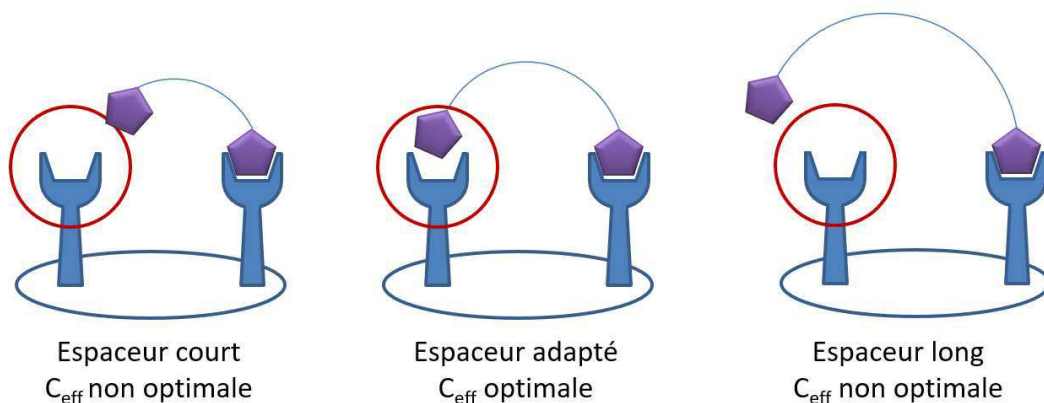


Figure 14 : concentration effective dans le cadre de ligand divalente en fonction de la longueur d'espaceur

Pour témoigner de ce phénomène, ils ont utilisé un modèle dans lequel un OEG est directement lié à une extrémité de manière covalente à une anhydrase carbonique humaine (HCA) et à l'autre extrémité au ligand de cette anhydrase : un benzenesulfonamide. Le phénomène de dissociation du ligand a été étudié pour différentes longueurs de OEG et comparé avec le ligand de référence libre par microcalorimétrie. A l'instar de Karpen et al ils observent un maximum de molarité effective pour une longueur d'espaceur optimale avec un OEG (n=2) puis une décroissance progressive en augmentant la taille de l'espaceur (Figure 15).

Même si les espaceurs utilisés possèdent un caractère flexible, l'élongation d'un espaceur court ou la torsion d'un long sont des contraintes nuisibles à l'interaction ligand-protéine.

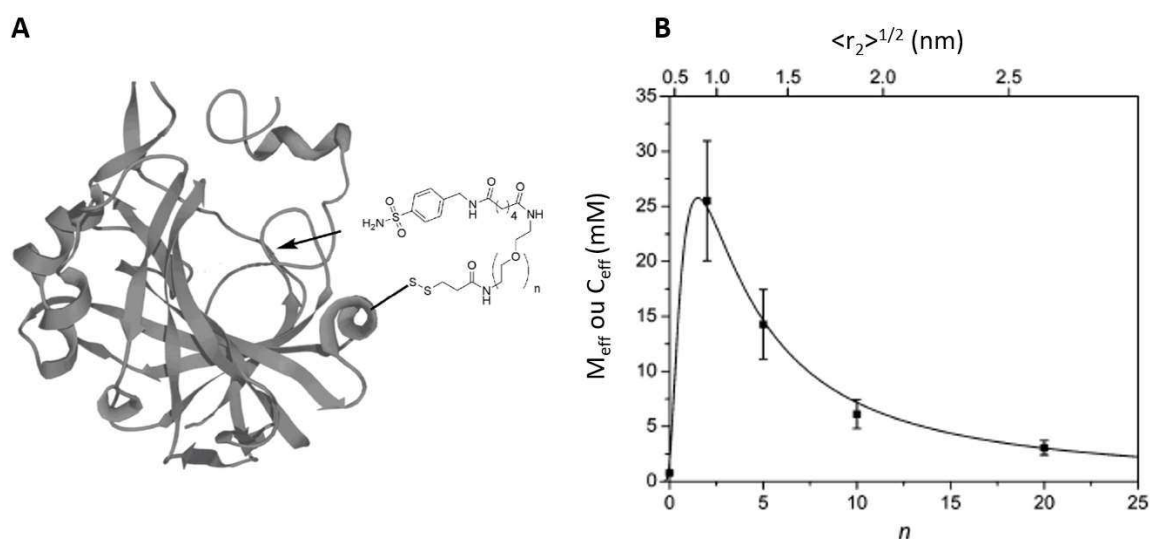


Figure 15 : Modèle d'étude de l'effet chélate à travers la molarité effective de Whiteside et al. en liant une structure OEG-Benzenesulfonamide directement sur une HCA. A) représentation du modèle étudié. B) molarités effectives expérimentales en fonction de la longueur de l'OEG utilisé.

Les espaceurs flexibles de type OEG permettent d'augmenter l'hydrosolubilité des structures chimiques et induisent peu d'interactions secondaires avec les protéines^{27,28}. Par contre, leur préparation la plus courante passe par une polymérisation anionique avec de l'éthylène glycol et de l'oxyde d'éthylène ce qui conduit à des mélanges polydisperses. Cependant, il existe des chaînes courtes commerciales qui sont monodisperses (jusqu'à 28 unités éthylène glycol).

Il est possible de déterminer approximativement la taille d'un OEG en solution, ou plus généralement d'un polymère linéaire, sachant qu'elle est proportionnelle à la racine carrée du nombre d'unités monomères $n^{26,29-31}$ (ou à la masse molaire) selon la formule :

$$L = \sqrt{n} \times L_0 \quad \text{Équation 2}$$

L : longueur du polymère en solution

n : nombre d'unités monomères

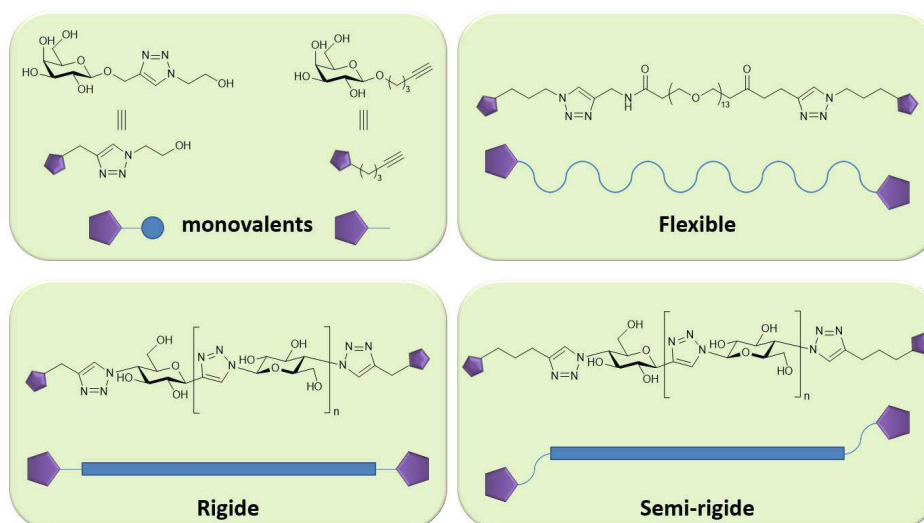
L_0 : Longueur initiale de référence d'une unité monomère ($L_0 = 6,15$)

Cette formule implique que la longueur d'un OEG à haut poids moléculaire varie faiblement avec le nombre d'unités monomères.

La grande flexibilité des chaînes OEG peut impacter de façon négative l'effet chélate. En effet, pour que le composé multivalent puisse se lier simultanément à plusieurs sites d'interaction, l'espaceur se retrouve contraint avec une perte importante de degré de liberté. Cela se traduit par une variation entropique néfaste pour l'interaction avec la protéine. Pour éviter ce phénomène, il est possible d'avoir recours à des espaceurs rigides qui sont en théorie bien plus adaptés, puisqu'ils subissent moins de perte entropique. Cependant il est très difficile de trouver une structure rigide parfaitement adaptée à la cible en termes de longueur, qui possède un caractère hydrosoluble et qui soit facilement fonctionnalisable. Il n'existe à l'heure actuelle que peu d'exemples d'utilisation d'espaceurs rigides.

On peut citer les travaux de Pieters *et al.* portant sur la conception d'espaceurs composés de glucoses reliés entre eux par des triazoles qui permettent d'obtenir des ligands hydrosolubles inhibiteurs de la protéine LecA de *Pseudomonas aeruginosa*. Les auteurs ont synthétisés trois classes de molécules : une possédant un espaceur rigide, une avec un espaceur rigide et un lien flexible aux extrémités, et la dernière entièrement flexible. Leur caractère inhibiteur a été évalué par un test ELISA avec deux structures monovalentes comme référence^{32,33} (Tableau 5)

Structures développées par Pieters et al.



Struct.									
				1	2	3	1	2	3
n	/	/	/	1	2	3	1	2	3
IC₅₀	20	120	2,0	3,5	0,0027	0,84	0,16	0,12	3,5
β	1	1	60	6	7555	24	770	968	34

Tableau 5 : Résultats de test d'adhésion de Lec A (IC₅₀) avec des galactosides mono- et divalents à rigidité variable

Les résultats montrent que le ligand divalent flexible permet une augmentation de l'affinité se traduisant par un facteur β de 60. En comparaison, la structure rigide avec $n=2$ permet un effet β de 7555 soit 126 fois plus important. Cependant, lorsque la longueur de l'espaceur n'est plus adaptée, cela se traduit par une perte drastique d'affinité avec des facteurs β de 6 et 24 pour $n=1$ et $n=3$. Néanmoins, les auteurs ont montré que la perte d'affinité peut être limitée si le ligand divalent possède une partie flexible à ses extrémités (facteurs β de 770 et 968 pour des longueurs de $n=1$ et 2).

De cette étude il en ressort qu'un espaceur rigide peut augmenter considérablement l'affinité pour un récepteur à la condition que sa longueur soit parfaitement adaptée.

iv. Liaisons chimiques - la chimie click dans un contexte de multivalence

Comme précédemment décrit, la construction d'une structure multivalente passe par l'association de trois parties : l'élément central, les ligands et les espaceurs. Les réactions de couplage entre les trois entités doivent être les plus chimiosélectives possibles selon le concept de chimie click proposé par Sharpless.³⁴ Une réaction par chimie click se fait en une seule étape, se caractérise par un haut rendement, une chimio- et une régiosélectivité importante et par l'accès simple aux fonctions mises en jeu lors de la réaction.^{34,35} On peut citer la réaction d'addition nucléophile sur les époxydes et les aziridines, la réaction photocatalysée de thiol-ène³⁶, la réaction de cycloaddition de Diels-Alder³⁷ ou la réaction de cyclisation 1,3 dipolaire³⁸ de Huisgen entre un azoture et un alcyne (Schéma 1).

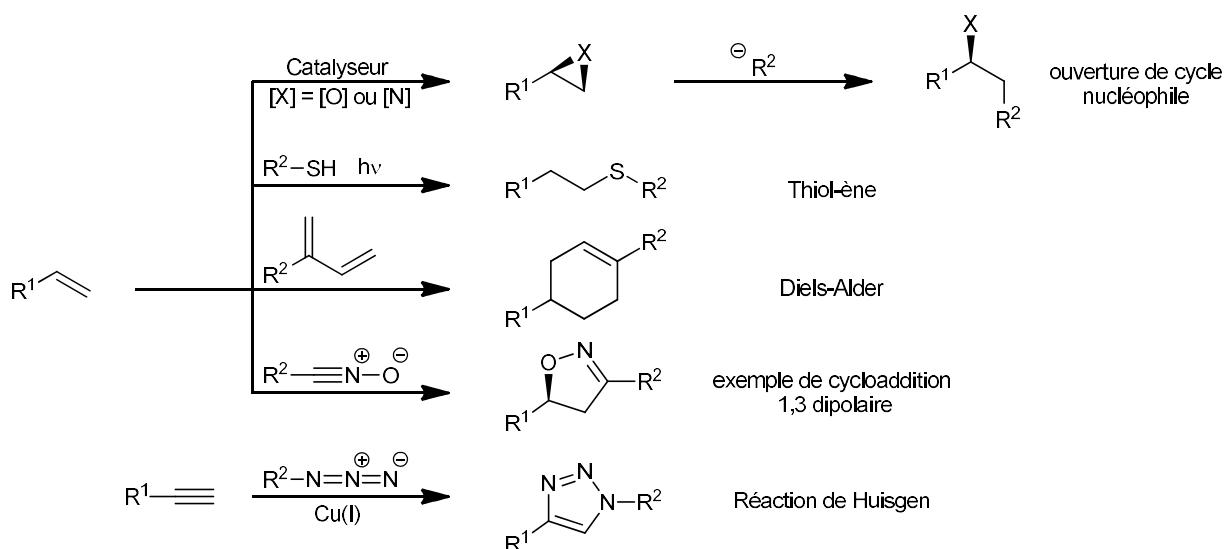


Schéma 1 : Exemples de réactions de chimie click

La réaction de cycloaddition azoture-alcyne a été décrite pour la première fois en 1893 par le chimiste Arthur Michael, elle ne fut développée par Huisgen que dans les années 1960 après son étude sur les réactions de cycloaddition 1,3 dipolaires.³⁹⁻⁴¹ La réaction d'Huisgen consistait initialement à faire réagir un azoture et un alcyne vrai dans des conditions thermiques pour obtenir un mélange de deux régioisomères 1,4 et 1,5-triazole. Ce n'est qu'en 2002 que des travaux indépendants de Sharpless et Meldal ont montrés que l'utilisation du cuivre en tant que catalyseur permettait de diminuer les températures de réaction et surtout de n'obtenir que le régioisomère 1,4 (Schéma 2).^{42,43} Cette réaction 1,3-dipolaire entre un

alcyne et un azoture, et cuprocatalysée est appelée CuAAC (pour copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition).

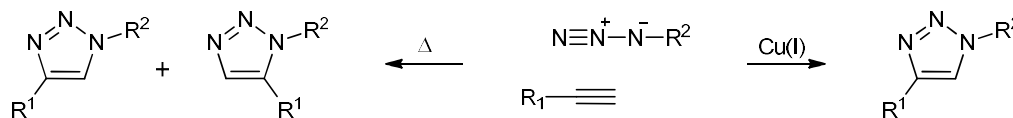


Schéma 2 : Cycloaddition azoture-alcyne thermique et cuprocatalysée

La notion de chimie click est souvent improprement utilisée pour désigner exclusivement la réaction de CuAAC. Cela s'explique par la très large démocratisation de cette réaction dans de nombreuses applications⁴⁴ (matériaux et polymères⁴⁵⁻⁴⁷, modification de protéines⁴⁸, chimie supramoléculaire⁴⁹...) et notamment dans le domaine de la multivalence. Cette réaction qui peut être effectuée dans de nombreux solvants organiques ou même dans l'eau fait intervenir un catalyseur de cuivre I généralement sous forme d'halogénure de cuivre ou obtenu *in situ* par réduction de cuivre II (par exemple avec du sulfate de cuivre et de l'ascorbate de sodium). Différents mécanismes ont été décrits, faisant intervenir un complexe à un atome de cuivre dans la proposition de Sharpless⁴², ou à des complexes bi ou trinucéaires dans les modèles proposés par Meldal⁴³. Des études plus récentes ont mis en évidence que les deux postulats étaient corrects et que les deux mécanismes s'effectuaient simultanément mais avec une cinétique favorisée pour la formation d'un complexe à deux atomes de cuivre (Schéma 3).⁵⁰

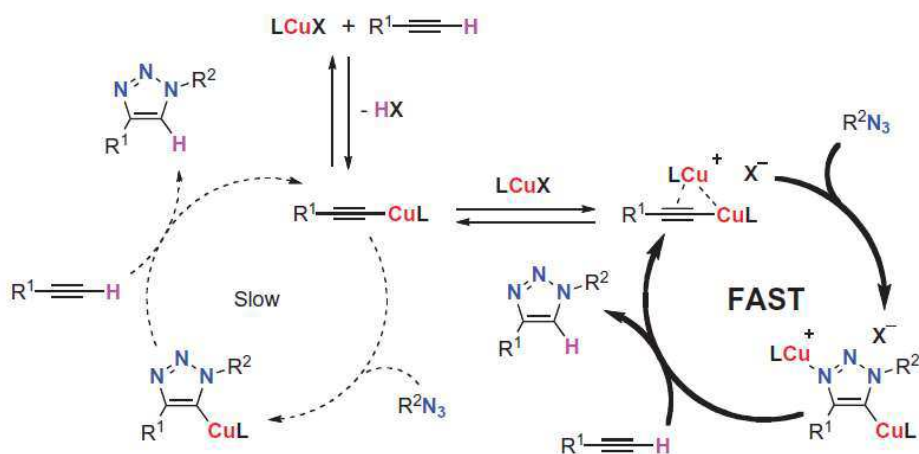


Schéma 3 : Mécanismes de CuAAC à un et deux atomes de cuivre possédant des cinétiques de réaction différentes en faveur du mécanisme à deux atomes de cuivre.

Le caractère très « click » (mise en œuvre aisée, purifiable, économique, sélectif...) de la CuAAC a poussé les chimistes dans le domaine de la multivalence à l'employer pour

assembler les trois parties charpente-espaceur-ligand. Nous avons également privilégié cette stratégie pour la construction de nos charpentes multivalentes. D'autres réactions comme la thiol-ène prennent également une importance dans le domaine de la multivalence, mais à un moindre niveau.

II. Champs d'application de la multivalence

Nous avons abordé dans la partie précédente les effets physiques engendrés par la multivalence et l'influence de la structuration spatiale d'un composé multivalent. Concernant les cibles répondant positivement, elles sont nombreuses, et les exemples décrits dans cette section concerneront les deux applications envisagées dans le cadre de ma thèse : l'inhibition de l'adhésion de pathogènes et l'altération du fonctionnement de canaux ioniques.

1) Inhibition de l'interaction hôte-pathogène

S'il est un champ d'application de la multivalence qui a connu un vif intérêt, c'est l'inhibition de l'interaction hôte-pathogène. Comme énoncé précédemment, la nature elle-même emploie les principes de multivalence pour optimiser les interactions. Les bactéries, virus et champignons pathogènes présentent à leurs surfaces des protéines adhésives (lectines) capables de se lier à des sucres attachés à des glycoprotéines ou glycolipides (glycanes) présents au niveau des cellules hôtes.

i. Place des lectines

L'ensemble des cellules eucaryotes présentent à leur surface une couche de glycoprotéines et polysaccharides impliquée dans de nombreux phénomènes biologiques : le glycocalyx (Figure 16).⁵¹ Cette couche pouvant atteindre une épaisseur de 0,5 μ m comporte de très nombreux glycanes qui sont notamment impliqués dans la reconnaissance entre les cellules (notamment pour le système immunitaire).⁵²

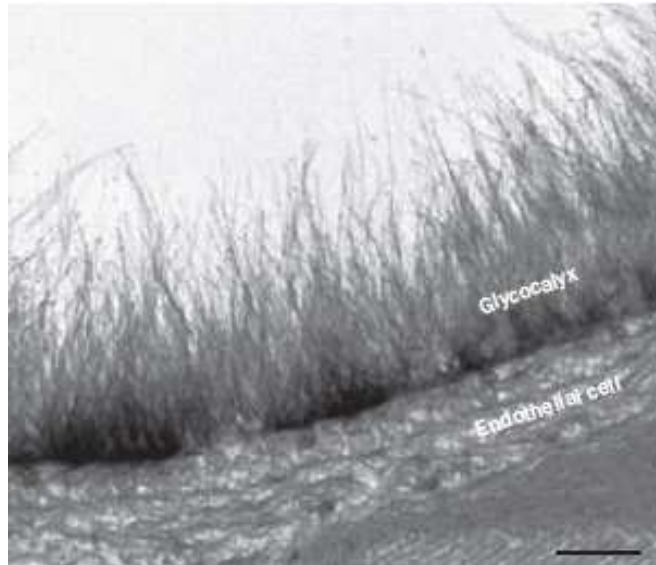


Figure 16 : glycocalyx de cellules épithéliales de capillaire coronaire.⁵³

Grâce à ce glycocalyx, les cellules sont porteuses à leur surface d'un grand nombre d'informations codées par l'ensemble des sucres. Ce codage basé sur les diverses associations de sucres des polysaccharides et glycoprotéines est extrêmement riche et implique une très haute spécificité d'information.

Les lectines sont une classe de protéines qui reconnaît spécifiquement les motifs osidiques et qui est capable de décrypter le glycode en interagissant de façon spécifique avec certains sucres de surface. Ces protéines ubiquitaires ont été découvertes dans des extraits végétaux. Le terme de lectine (du latin *lego*, choisir ou élire) apparaît en 1954 dans une étude de Boyd et Shapleigh portant sur la capacité d'un extrait d'ajonc d'Europe (*Ulex europeus*) à agglutiner sélectivement certains érythrocytes de groupes sanguins spécifiques.⁵⁴

Les études sur les lectines se sont ensuite multipliées, avec un décryptage du « code des sucres », dans de nombreux processus biologiques tels que la défense immunitaire, la dissémination de métastases ou les infections.⁵⁵ Cette reconnaissance sucre-lectine dans le cadre du processus infectieux présente un intérêt pour les biologistes et les chimistes dans une optique d'inhibition de l'infection.

ii. Infection et colonisation

La colonisation d'une cellule hôte passe le plus souvent par la reconnaissance initiale lectine-motif osidique avec l'une des deux entités portée par le pathogène.

Ensuite, le pathogène est internalisé dans la cellule pour se multiplier ce qui lui permet, dans certain cas, de bénéficier d'une certaine protection pour pouvoir échapper à la réponse immunitaire⁵⁶ ou aux médicaments employés (antibiotiques, antiviraux, antifongiques...). C'est notamment le cas des virus tels que le VIH ou le cytomégalovirus qui se cachent dans les cellules du système immunitaire puis réenclenchent le processus infectieux lorsque la menace a disparu.⁵⁷ En dernier lieu le pathogène sort de la cellule pour se propager et infecter de nouvelles cellules voire un nouvel hôte (Figure 17).

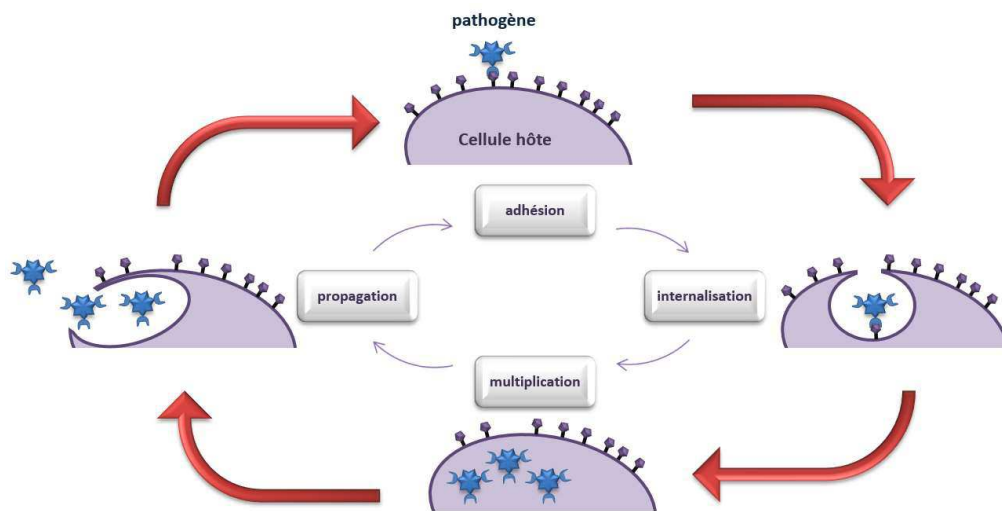


Figure 17 : processus infectieux général

Pour se multiplier au cours de son invasion, un agent pathogène dispose de plusieurs stratégies : l'échappement aux mécanismes de défense innée, une rapide multiplication et l'infection d'un nouvel hôte avant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée.

iii. Traitements usuels et phénomènes de résistance

Pour stopper une infection, nous avons classiquement recours à des traitements antifongiques, antiviraux ou antibactériens éliminant le pathogène. Cette destruction n'est souvent pas totale et va épargner une partie des pathogènes qui possèdent les caractéristiques génétiques nécessaires à leur survie. Cela exerce une pression sur la population du pathogène, que l'on appelle « pression de sélection », en entraînant la mort de la partie la plus faible et dont les seuls survivants vont engendrer une nouvelle génération résistante. (Schéma 4).

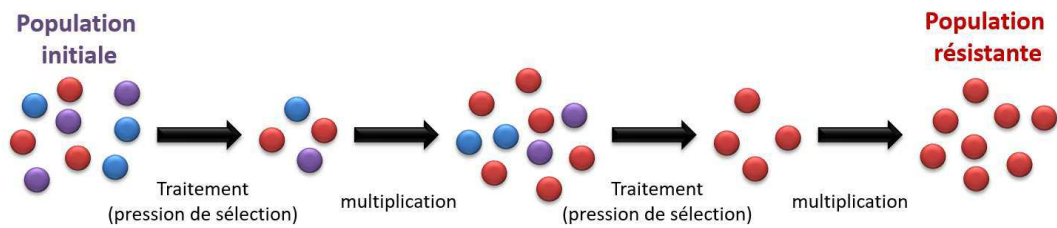


Schéma 4 : Evolution d'une population pathogène soumise à un traitement (pression de sélection)

Si ce phénomène est largement décrit pour les bactéries il est aussi applicable par exemple aux champignons pathogènes comme *Aspergillus fumigatus*.

iv. Adhésion cellulaire - Stratégie antiadhésive

Supprimer la première étape d'adhésion du pathogène en utilisant un ligand saccharidique très affiné pour la lectine permettrait de le leurrer. Celui-ci se fixera préférentiellement sur les sucres synthétiques plutôt que sur l'hôte (Figure 18).

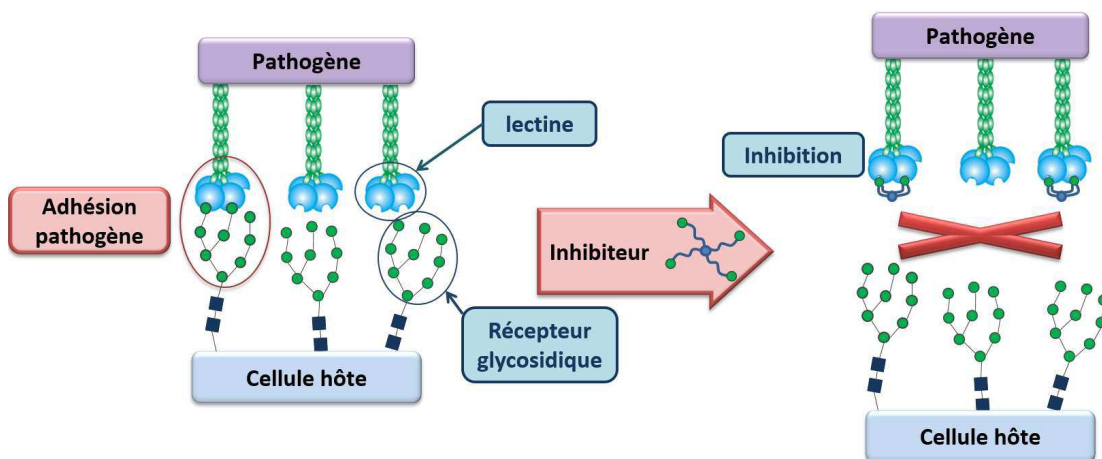


Figure 18 : Stratégie antiadhésive

Cette stratégie a prouvé son efficacité pour la première fois dans une étude d'Aronson et al. portant sur la prévention de la colonisation du tractus urinaire par des bactéries *Escherichia coli* en utilisant du α -D-mannopyranoside de méthyle.⁵⁸ L'administration de 18mg de méthylmannoside par souris (dont le poids ne dépasse pas 60g) a permis de réduire l'adhésion de bactérie *Escherichia coli* dans la vessie de 90% environ. Une telle quantité de composé ne représente pas un traitement adapté cliniquement mais a ouvert la voie pour le développement d'antiadhésifs plus affins.

Nombreuses sont les lectines qui possèdent une structure multimérique. Ainsi, même si la stratégie antiadhésive a été initiée avec des glycosides monovalents, de nombreux sucres multivalents ont été développés et ont montré un potentiel antiadhésif remarquable.⁵⁹⁻⁶¹

Par comparaison avec les traitements antibiotiques classiques, des ligands antiadhésifs ne devraient pas induire de phénomènes de résistances. En effet, contrairement aux antibiotiques, antifongiques et antiviraux qui engendrent des pathogènes résistants, les antiadhésifs ne font qu'empêcher leur adhésion. Le seul phénomène envisageable est une mutation de la structure de la lectine cible à la surface du pathogène qui ne reconnaîtrait plus le ligand. Cependant, la perte de cette reconnaissance devrait aussi induire une perte du pouvoir adhésif du pathogène pour la cellule hôte.

2) Inhibition de protéines fonctionnelles

Même si l'inhibition de l'interaction multivalente avec des lectines a été l'application la plus largement décrite, il existe de nombreux autres exemples sur des protéines adhésives ou fonctionnelles. Seulement deux exemples seront développés dans cette thèse : les inhibiteurs et activateurs enzymatiques, et les ligands de protéines à canaux ioniques. A l'inverse de l'inhibition de l'adhésion de pathogènes où l'on cherchait uniquement à bloquer la lectine, dans le cas des protéines fonctionnelles, on cherche à moduler leurs activités.

i. Ligands enzymatiques multivalents

Les enzymes remplissent de nombreuses fonctions indispensables à notre métabolisme mais il arrive qu'à cause de certains dérèglements (notamment d'ordre génétique) leur activité soit modifiée.

Des inhibiteurs ou activateurs enzymatiques ont été développés pour pallier ces problèmes de dérégulation. De la même manière que pour les inhibiteurs d'adhésion de pathogènes, une stratégie multivalente pour l'élaboration d'inhibiteurs enzymatiques à haute affinité s'est rapidement révélée efficace.^{62,63}

Le développement d'inhibiteurs de glycosidases passe par le design d'un mime de sucre, ici du mannose, ne pouvant pas être dégradé par l'enzyme. Une solution consiste à introduire un azote à la place de l'oxygène du sucre ce qui permet d'insérer une partie aglycone sur l'azote et non pas en position anomérique. De tels iminosucres peuvent être greffés sur une

charpente multivalente par un espaceur positionné sur l'azote. C'est une des thématiques que notre groupe de recherche a abordé ces dernières années. L'élaboration d'iminosucre multivalents avait permis d'identifier des ligands permettant d'inhiber ou d'activer significativement différentes glycosidases.^{10,64}

Compain et al. ont obtenu différents iminosucre multivalents en utilisant comme charpente soit un fullerène, pour obtenir un ligand dodécavalent, soit une β -cyclodextrine pour avoir des ligands hepta ou tétradécavalent. Parmi ces composés, ils ont observé des potentiels d'inhibition très intéressants pour l' α -mannosidase de Jack Bean avec un $K_i=0,15$ pour la structure fullerène et de $0,022$ pour la structure cyclodextrine donnant respectivement des effets β de 179 et 610 (Figure 19).⁶⁵⁻⁶⁷

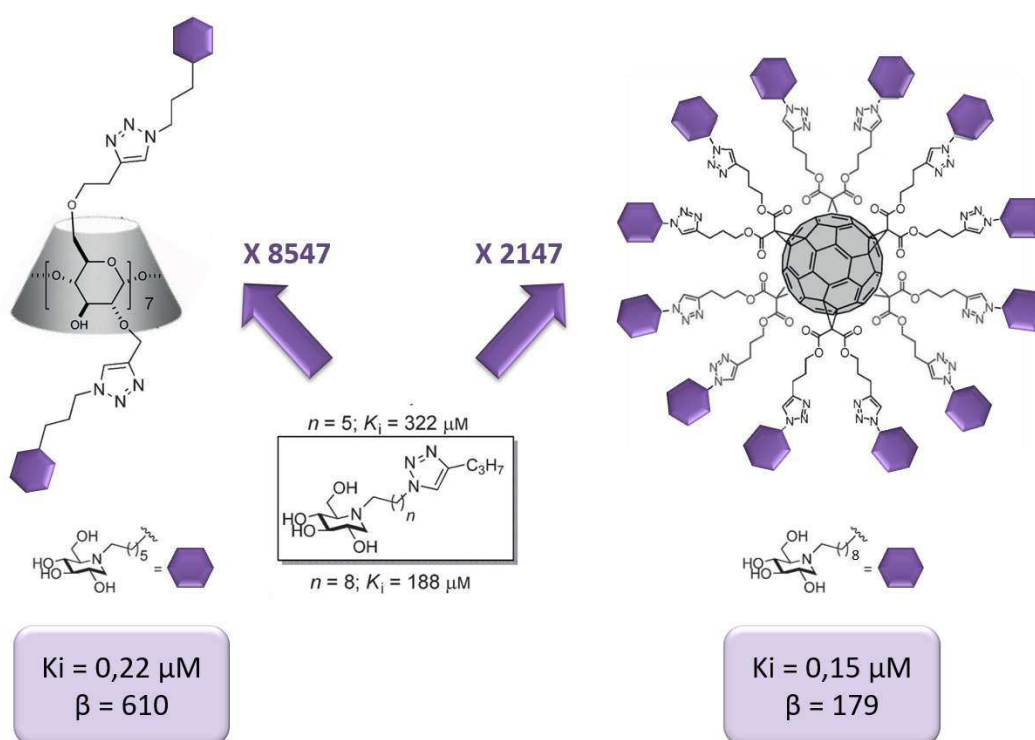


Figure 19 : inhibiteurs multivalents de l' α -mannosidase de Jack Bean avec des charpentes fullerènes et cyclodextrine

Ainsi, Compain et al. ont mis en évidence dans leurs études le potentiel de leur ligands multivalents pour l'inhibition enzymatique. Comme l'apparition des premiers ligands enzymatiques multivalents remonte aux années 2000 leur nombre est relativement restreint en comparaison aux composés antiadhésifs mais augmente de plus en plus dans la littérature.

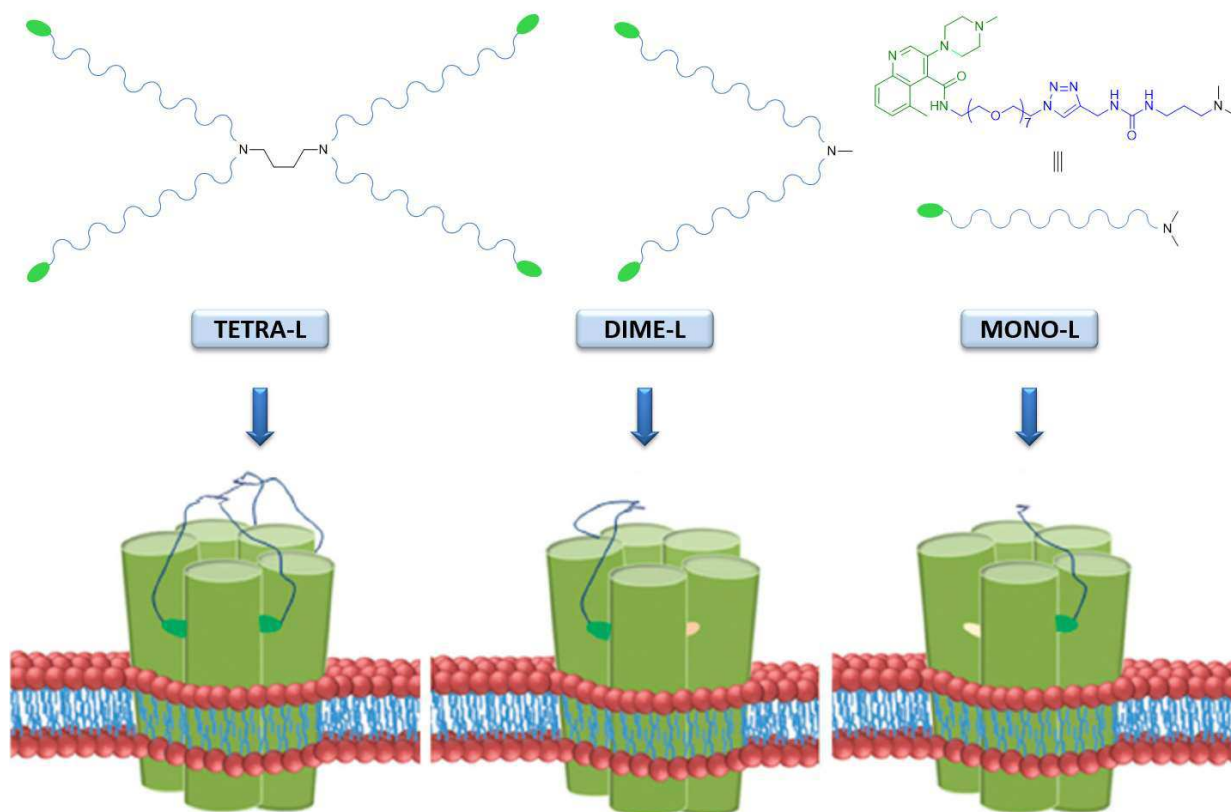
ii. Ligands multivalents de récepteur de canaux ioniques

Les récepteurs de canaux ioniques ou récepteurs ionotropes sont des protéines trans-membranaires qui régulent l'afflux d'un ion spécifique ou de différents ions à travers la membrane cellulaire. Cet afflux est contrôlé par l'interaction de ces protéines avec des ligands que l'on appelle aussi neurotransmetteurs (ou neuromédiateurs). Certaines maladies du système nerveux central apparaissent lors d'un dérèglement des neurotransmetteurs, ou encore lors d'une altération des récepteurs ionotropes (disparition ou accès rendu difficile).

Suivant le même schéma que précédemment la multivalence s'est révélée intéressante pour le développement de ligands très affins. En effet, les récepteurs ionotropes sont composés de trois à cinq sous-unités et peuvent donc présenter différents sites d'interaction proches spatialement. L'utilisation de composés multivalents pour obtenir un effet chélate par interaction simultanée avec différents sites semble donc être une stratégie intéressante. C'est ce qui a initié le développement de séries de composés multivalents par les équipes de Choquet et Imperiali⁶⁸ ou encore Cappelli et al.⁶⁹

Ces derniers ont montré qu'une approche d'optimisation structurale de composés di- et tétravalents permettait d'améliorer significativement l'interaction avec les récepteurs à sérotonine 5-HT₃ (Figure 20).

Cappelli et al. ont synthétisé des structures multivalentes avec des espaceurs flexibles de manière à atteindre un, deux ou quatre sites d'interaction. Ils ont observé une augmentation significative de l'affinité avec un facteur β de 238 pour le composé tétravalent.



Composé	valence	Constante d'inhibition	Effet β
MONO-L	1	20 \pm 4,2	1
DIME-L	2	1,2 \pm 0,21	8
TETRA-L	4	0,021 \pm 0,0047	238

Figure 20 : Modes d'interaction et constantes d'affinités des ligands multivalents de Cappelli et al. avec les récepteurs ionotropes 5-HT₃

En conclusion, les différents exemples abordés pour les diverses applications de la multivalence dressent un portrait assez large de la capacité de ce genre de ligands à augmenter l'interaction avec plusieurs types de protéines. Parmi celles-ci, les lectines et les récepteurs ionotropes nous ont intéressé plus particulièrement et ont fait l'objet de cette thèse.

III. Objectifs

Mon travail de thèse s'inscrit dans un projet collaboratif, intitulé ARMINA (Alliance de Recherche sur les Maladies Infectieuses Nantes Angers), entre différents groupes de recherches locaux. Le projet a été initié en 2012 suite au rapprochement de différentes équipes pour la mise en commun de leurs expertises dans le domaine infectieux. L'objectif est d'obtenir des outils de diagnostic et de nouveaux traitements pour comprendre et pallier l'émergence des résistances aux antibiotiques, antifongiques et antiviraux.

Trois axes se sont dessinés pour parvenir à ces fins : 1/ l'immunité humorale antibactérienne ; 2/ les réponses immunitaires post-infection et post-traumatique ; 3/ les interactions glycoconjugués-récepteurs. C'est dans ce dernier axe que notre équipe a proposé son expertise dans le domaine de la multivalence pour l'inhibition de l'adhésion de pathogènes. Dans le cadre de ma thèse, nous avons développé deux parties se référant à cette thématique. Une troisième partie portera sur le développement de ligands de récepteurs nicotiques.

1) Inhibiteurs multivalents d'adhésion du cytomégalovirus

Depuis de nombreuses années l'équipe du Dr Franck Halary travaille sur le cytomégalovirus et sur ses voies d'entrée dans l'organisme *via* la protéine DC-SIGN. Cette dernière est étudiée par de nombreuses équipes puisqu'elle est utilisée comme cheval de Troie par différents virus (Ebola, VIH, CMV). DC-SIGN étant une protéine tétravalente reconnaissant des motifs mannoses, certains chimistes ont élaboré des mannosides multivalents pour l'inhibition de l'adhésion virale. C'est dans ce cadre qu'est née la collaboration entre notre équipe et celle du Dr Franck Halary, la proposition initiale étant de parvenir à des structures tétravalentes adaptées pour obtenir un effet chélate

2) Inhibiteurs multivalents d'adhésion d'*Aspergillus fumigatus*

L'équipe du Professeur Patrice Le Pape travaille sur différents champignons pathogènes dont *Aspergillus fumigatus*. Ce dernier est responsable d'infections des voies bronco-pulmonaires. Il adhère aux pneumocytes, cellules formant l'épithélium des alvéoles pulmonaires, *via* une lectine nommée AFL dont la structure cristallographique n'a été obtenue que très récemment.⁶⁹

Cette lectine pentamérique reconnaît à la surface des pneumocytes des motifs fucose permettant son adhésion et l'invasion des voies bronco-pulmonaires. Pour y remédier, nous avons synthétisé différents composés multivalents dans le but d'obtenir un effet chélate et inhiber l'adhésion fongique.

3) Ligands multivalents de récepteurs nicotiques

C'est dans un contexte assez différent que se dessine la dernière partie de ma thèse puisqu'elle sort de la thématique « interaction hôte-pathogène » d'ARMINA pour se diriger vers des ligands multivalents de récepteurs nicotiques (nAChRs). Malgré une investigation très poussée autour des ligands et dérivés nicotiques, il n'existe à notre connaissance aucun exemple dans la littérature de dérivés nicotiques multivalents. Il se rencontre de nombreux nAChRs, tous présentant cinq sous-unités, pouvant être hétéromériques (avec des sous-unités différentes) ou homomériques (avec cinq sous-unités identiques). Cette dernière classe de récepteurs nous a particulièrement intéressés car, comme elle présente cinq sites d'interaction, elle pourrait être adaptée à une stratégie multivalente par effet chélate.

C'est donc autour d'un objectif commun que se situent les trois parties de mon travail : l'obtention et l'analyse de l'effet multivalent selon la charpente employée. Les trois cibles thérapeutiques (DC-SIGN, AFL et nAChRs) seront traitées dans des parties distinctes expliquant le contexte, la synthèse des composés et les résultats biologiques obtenus.

Aspergillus fumigatus

I. Introduction

1) Découverte/partie historique

Le genre *Aspergillus* est décrit en 1729 par le prêtre Pier Antonio Micheli lorsqu'il répertorie les divers types de moisissures. Son nom fait référence à sa forme de goupillon (*lat. : aspergillum*) comme celui permettant d'asperger l'eau bénite utilisée lors des messes.⁷⁰

Ce genre regroupe près de 200 espèces dont *Aspergillus fumigatus* qui est étudié pour la première fois par le médecin et botaniste Georg Fresenius qui donna ce nom en rapport à la « fumée » (*lat. fumigo*) qu'il observait sur les colonies, certainement à cause de la libération de très nombreuses spores.⁷¹

Les *Aspergillus* sont des moisissures qui se développent très facilement sur la matière organique en décomposition et qui sont donc très présentes dans la nature. Elles supportent une très large gamme de températures pour leur développement qui va de 12°C à 57°C avec une survie jusqu'à 70°C.⁷³ *Fumigatus* est une espèce de ce genre qui est caractérisée par une colonie bleu/verte très veloutée et duveteuse aux rebords blancs que l'on peut observer notamment sur les fruits en décomposition. L'aspect bleuté est caractéristique des spores de ce champignon tandis que la partie blanche correspond au mycélium, partie filamenteuse du champignon (Figure 21).

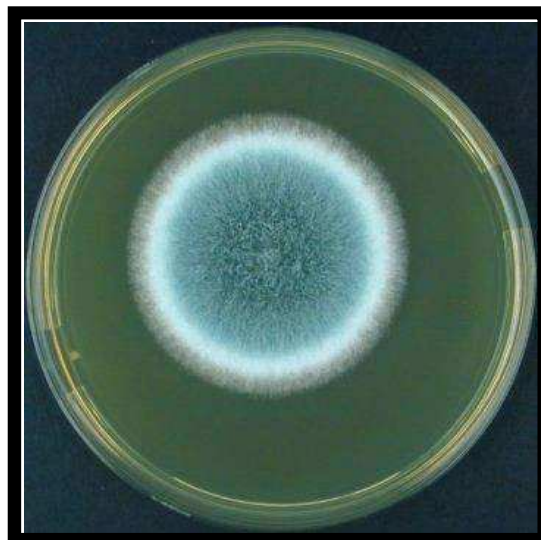


Figure 21 : Colonie d'*Aspergillus fumigatus* en culture sur gélose

2) Risque infectieux

Les spores d'*Aspergillus fumigatus* sont très présentes dans les poussières domestiques et nous en respirons quotidiennement, entre 35 et 978 CFU/m³ sont détectées dans les commerces (CFU = Colony-Forming Unit).⁷⁴ Pour un individu sain et immunocompétent, leur présence en grande quantité dans notre environnement n'est pas problématique et est prise en charge naturellement par le système immunitaire.⁷⁵ Par contre, elles deviennent des pathogènes majeurs et potentiellement mortels chez les personnes immunodéprimées ou avec des antécédents de maladies broncho-pulmonaires (atopie, mucoviscidose, tuberculose...) (Figure 22).⁷⁶

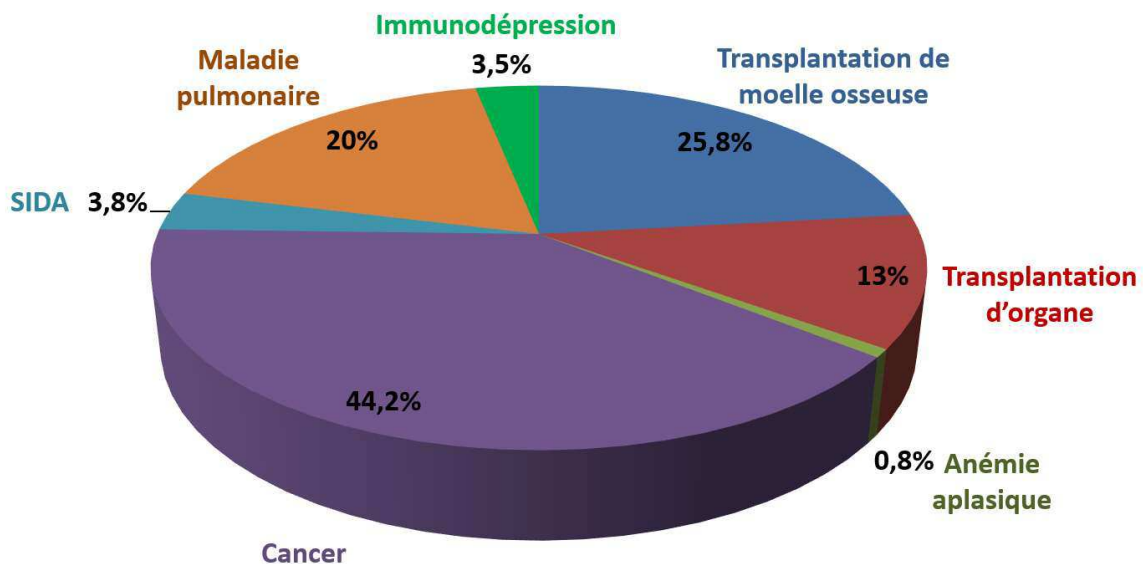


Figure 22 : Répartition en pourcentage des pathologies présentées par les patients atteints d'aspergillose. Un patient peut présenter une ou plusieurs pathologies (la somme des pourcentages excède 100%)

Selon le type d'exposition et les antécédents pathologiques d'un individu, l'infection aspergillaire peut se traduire par trois types d'aspergilloses (infections causées par les *Aspergillus*). Les plus courantes sont l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), l'aspergillose invasive (AI) et l'aspergillome.

3) Aspergilloses

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* possèdent un caractère pathogène mais *Aspergillus fumigatus* représente près de 90% des infections fongiques.⁷³ Les formes d'infections ABPA, aspergillome et AI sont à différencier puisqu'elles ne se déclarent pas sur les mêmes types de terrains et se traduisent par des symptômes très différents.

i. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique

Les aspergilloses allergiques sont liées à une hypersensibilité du tractus respiratoire face aux antigènes aspergillaires chez des patients présentant des caractères génétiques favorables (atopie) à la colonisation par *Aspergillus fumigatus*.^{77,78} Cette allergie est d'autant plus favorisée par une exposition prolongée à une grande quantité de spores due à un environnement propice à leur dissémination (cave, présence de végétaux en décomposition, atmosphère climatisée...).

L'ABPA est la forme la plus sévère d'aspergillose allergique. Elle est particulièrement fréquente chez les patients asthmatiques ou atteints de mucoviscidose (de 1 à 15% développent une ABPA).⁷⁹ L'ABPA est une maladie qui va évoluer au cours du temps. Initialement, elle se traduit par des crises allergiques intermittentes sans gravité qui peuvent être traitées par des corticoïdes. En l'absence d'un traitement effectué à temps la fréquence des crises conduit à des lésions sévères des tissus des voies broncho-pulmonaires, une insensibilité aux corticoïdes ainsi qu'une insuffisance respiratoire.

ii. Aspergillome

L'aspergillome (ou mycétome aspergillaire) est une masse fongique se développant dans une cavité pulmonaire préexistante. Il se présente sous la forme d'une pseudotumeur composée de filaments du champignon (mycélium et hyphes) mêlés à du mucus, des débris cellulaires et à une matrice protéique (Figure 23).⁸⁰

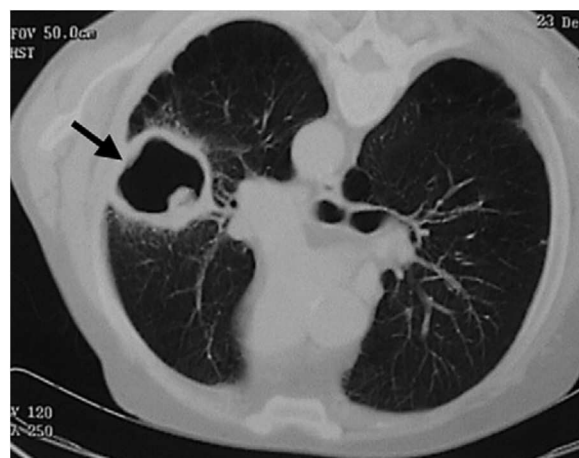


Figure 23 : Image d'un scanner de poumon envahi par un aspergillome⁸¹

De par la nécessité d'une cavité favorable à son développement, l'aspergillome se déclare souvent chez des patients ayant été atteints par la tuberculose, la sarcoïdose ou tout autre événement propice à la formation de cavités pulmonaires. Après la colonisation de celles-ci, l'aspergillome n'évolue plus au cours du temps et à l'inverse de l'ABPA il n'y a pas d'invasion pulmonaire ou des tissus. Cependant, l'organisme rejette le mycétome ce qui peut entraîner une forte toux ainsi que des rejets de sang par la bouche (hémoptysie). Ce phénomène est souvent lié à des lésions au niveau des vaisseaux sanguins situés à la périphérie de l'aspergillome.⁷³

iii. Aspergillose pulmonaire invasive

D'après une étude de 2011 en France, l'aspergillose pulmonaire invasive représente le cas le plus sévère d'aspergilloses avec un taux de mortalité de 44,8% 90 jours après le diagnostic⁸². Parmi les cas d'aspergilloses les plus importants, l'AI se déclare presque exclusivement chez les individus immunodéprimés car l'absence d'une réponse immunitaire ne prévient pas la propagation du pathogène dans l'organisme⁷⁶.

Les déficiences immunitaires chez le patient peuvent être causées par des phénomènes très variés qui entraînent des AI dont les caractères invasifs et les symptômes seront très différents. Dagenais et Keller opposent notamment les cas d'utilisation d'immunosuppresseurs aux cas de neutropénies (taux de granulocytes bas). Dans le cas d'AI survenue suite à une neutropénie, il y aura une importante croissance filamentaire et une forte dissémination tandis qu'un traitement par immunosuppresseur entrainera plutôt une importante inflammation de la zone infectée (Schéma 5).⁸³

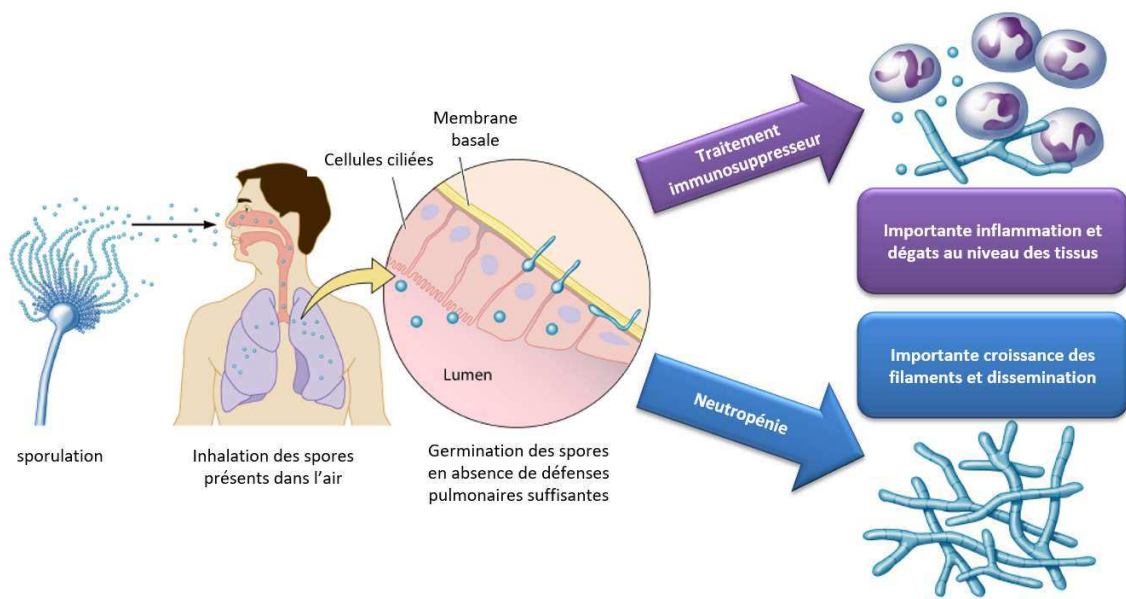


Schéma 5 : Développement d'aspergilloses invasives chez les patients immunodéprimés

Le caractère invasif d'*Aspergillus* est d'autant plus problématique dans les cas de greffes d'organes pour lesquelles l'utilisation d'immunosuppresseurs est nécessaire. Si une infection opportuniste se déclare chez un patient venant de recevoir une greffe, elle peut non seulement conduire à son rejet, mais aussi se déclarer mortelle si elle est diagnostiquée tardivement. Une des causes liées au diagnostic tardif est la suppression de fièvre engendrée par l'utilisation de corticoïdes qui font partie des immunosuppresseurs utilisés fréquemment en transplantation. Il est cependant très difficile de réduire l'utilisation d'immunosuppresseurs puisque cela pourrait se traduire par un rejet de la greffe.

Les symptômes cliniques d'une aspergillose invasive sont trop peu spécifiques pour pouvoir émettre un diagnostic. Les trois outils permettant la validation d'une AI sont : un scanner par tomodensitométrie ; la culture/microscopie de la biopsie de tissus infectés ; la détection d'antigènes d'*Aspergillus* dans le sérum.^{73,84}

4) Traitements

Parmi les classes d'antifongiques usuels on peut citer les polyènes, les échinocandines, les fluoropyrimidines, les allylamines et les dérivés azolés qui sont les plus utilisés et notamment l'itraconazole (Figure 24) le plus largement prescrit.^{85,86}

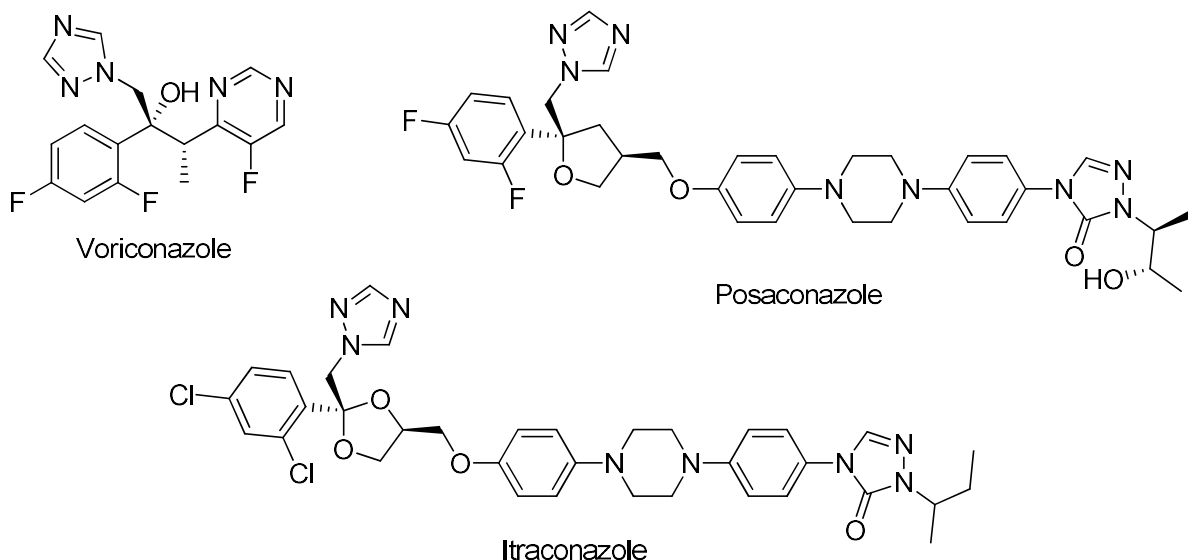


Figure 24 : Exemples d'antifongiques azolés : Voriconazole, posaconazole et Itraconazole.

Les antifongiques azolés sont des inhibiteurs enzymatiques de lanostérol 14 α -déméthylase qui est une enzyme du cytochrome P450 des mitochondries des cellules fongiques. Elle permet chez le champignon la transformation du lanostérol en ergostérol, principal stérol constituant la membrane fongique. Les azolés peuvent se lier fortement à l'enzyme, notamment par une liaison entre l'atome de fer présent dans le site et un atome d'azote du cycle triazole, inhibant ainsi la biosynthèse de l'ergostérol (Figure 25).⁸⁷

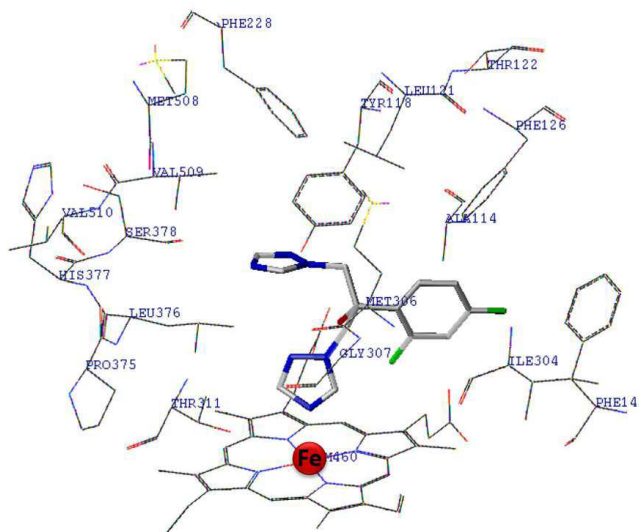


Figure 25 : Modélisation de l'inhibition du lanostérol 14 α -déméthylase par chélation du fer avec un atome d'azote du triazole présent sur le fluconazole¹⁷

Cette classe d'antifongiques a montré des effets secondaires et des interactions médicamenteuses non négligeables de type troubles digestifs ou hépatiques. Elle est capable d'inhiber certaines isoenzymes humaines. Parmi celles-ci, la CYP3A4 est responsable de la

synthèse du cholestérol et est impliquée dans le métabolisme de nombreux médicaments (dont certains corticoïdes et anti-cancéreux).⁸⁵ L'interaction médicamenteuse liée à la CYP34A peut conduire à une toxicité accrue de ces médicaments puisqu'ils ne seront plus métabolisés. Cela peut aussi se traduire par un traitement antifongique inefficace si le composé azolé se fixe principalement à la CYP34A plutôt qu'à la lanostérol déméthylase d'*Aspergillus fumigatus*.

Le recours à cette classe d'antifongiques est d'autant plus discuté que des phénomènes de résistances fongiques ont émergé depuis les années 2000. Les premiers cas recensés concernaient des patients ayant reçus des traitements azolés pendant une longue période. Cependant à partir de 2007, des cas de résistance se sont avérés chez des patients n'ayant jamais été traités par des composés azolés. Une des causes postulée en 2007 par Verweij et al. est leur large recours en agriculture pour le traitement des cultures.^{88,89} Le champignon a développé une mutation sur le gène codant pour la lanostérol 14 α -déméthylase la rendant résistante aux azolés notamment itraconazole, voriconazole et posaconazole utilisés cliniquement, mais aussi à six autres azolés utilisés dans le milieu agricole.⁹⁰

Ces problèmes d'émergence de résistances aux antifongiques se cumulent à certaines difficultés de diagnostic notamment dans le cas d'aspergilloses invasives ce qui incite la communauté scientifique à trouver une alternative aux azolés. C'est dans ce contexte que notre équipe propose une approche antiadhésive pour pallier ces phénomènes. L'utilisation de ligands non fongicides empêchant l'interaction du pathogène avec l'hôte limiterait les phénomènes de résistances fongiques et pourrait être utilisée de manière préventive.

5) Adhésion fongique - *Aspergillus fumigatus* lectin

i. *Structure d'Aspergillus fumigatus*

La structure des *Aspergillus* présente un réseau d'hyphes, filaments composant le mycélium, avec des ramifications appelées conidiophores terminées à leur extrémité par une tête aspergillaire qui est typique de la famille *Aspergillus*. Cette tête aspergillaire est composée d'une vésicule qui porte sur sa partie supérieure des phialides, cellules de production des spores (ou conidies). Ces phialides sont généralement reliées sur la vésicule par des organites nommés métules. Une des particularités d'*Aspergillus fumigatus* est l'absence de ces métules, les phialides étant dans ce cas directement fixés sur la vésicule. (Figure 26).⁹¹

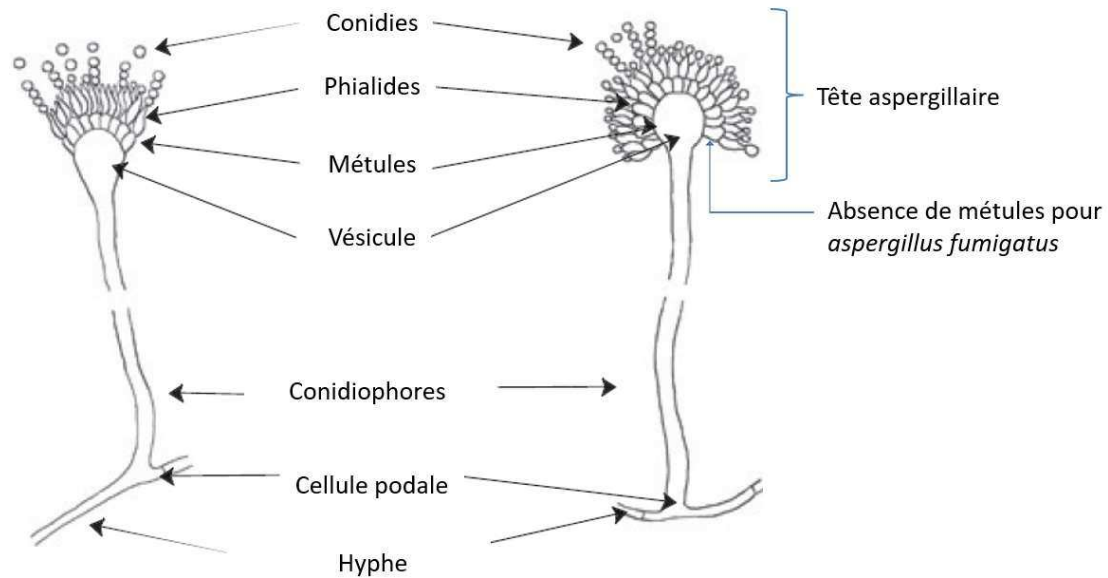


Figure 26 : Schéma structural général des champignons de la famille des *Aspergillus*

Les conidies sont disséminées lorsqu'elles arrivent à maturité si un élément extérieur leur permet de se séparer de leur phialide (vent, mouvement...). La conidie se fixe alors sur une nouvelle surface (élément organique ou hôte) et germe en mycélium si les conditions lui sont favorables.

ii. Structure d'AFL

Aspergillus fumigatus présente à la surface de ses conidies des lectines lui conférant la capacité d'adhérer à des surfaces glycosylées et notamment aux cellules épithéliales des voies broncho-pulmonaires.^{92,93} Une de ces lectines nommée AFL (*Aspergillus fumigatus* lectin) a été caractérisée et cristallisée par Houser et al. en 2013, et permet de reconnaître des motifs fucosylés du glycocalyx de l'hôte.^{70,94} AFL s'assemble sous la forme de dimères présentant chacun six sites d'interaction reconnaissant des fucosides (Figure 27A et B). Ces six sites ne sont pas équivalents et présentent des variabilités structurales entraînant des modes de fixation des ligands différents (Figure 27C).

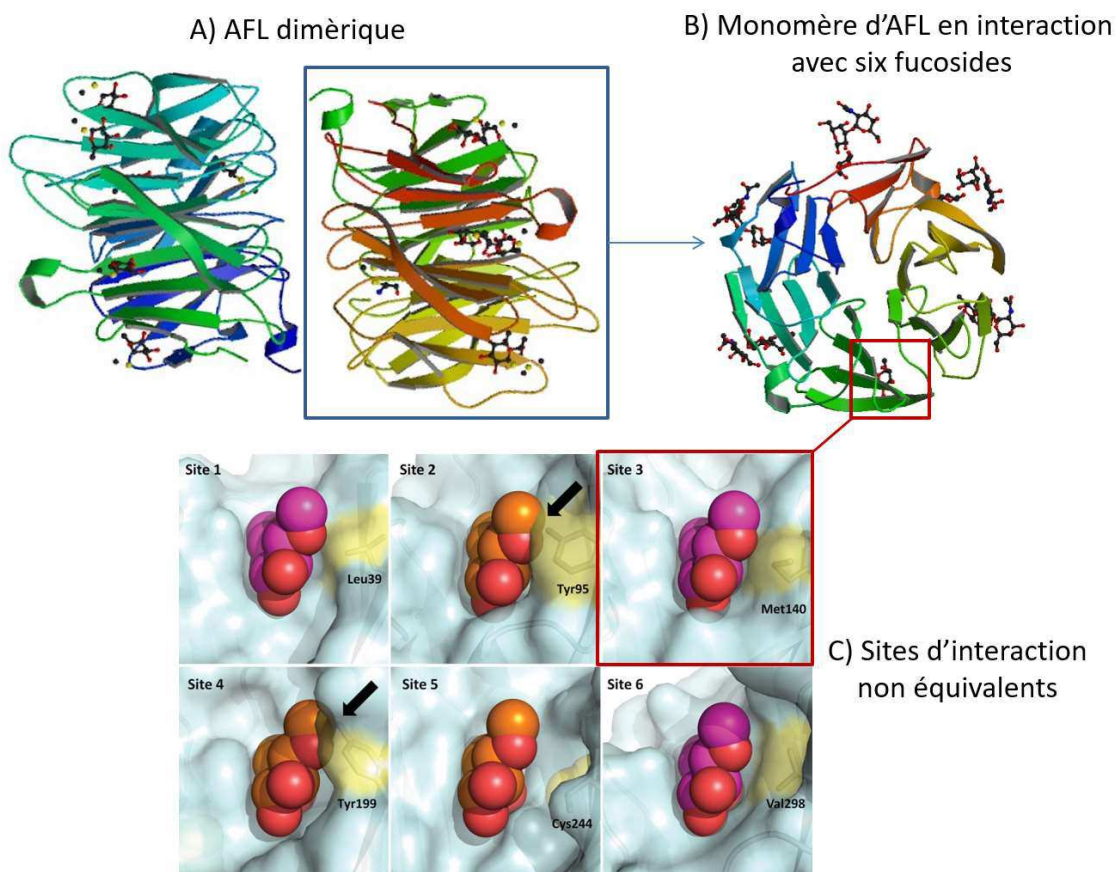


Figure 27 : Structures cristallographiques d'AFL ; A) AFL sous forme complète dimérique ; B) Monomère d'AFL présentant six sites de reconnaissance en interaction avec des dérivés fucosides ; C) Sites de reconnaissance non équivalents en interaction avec de l' α -méthylfucose adoptant différentes conformations

Malgré des modes de fixation différents, cette lectine présente pour chacun de ces sites une bonne affinité pour le fucose, et plus particulièrement pour les α -fucosides avec une constante de dissociation (K_d) à un site de 120 μM pour l' α -méthylfucose. Cela confère à AFL un fort pouvoir d'adhésion sur les cellules épithéliales qui présentent des motifs fucose à leur surface notamment sur certains marqueurs de groupes sanguins (A, B, H type 2, Lewis A, Lewis B, Lewis X et Lewis Y). Houser et al. ont caractérisé les constantes de dissociation avec ces marqueurs fucosylés qui sont de l'ordre de plusieurs dizaines de μM , avec $K_d=61,7 \mu\text{M}$ pour la constante la plus petite dans le cas du marqueur groupe sanguin B.⁹⁴

6) Stratégie antiadhésive appliquée à AFL - structures envisagées

La première étape d'adhésion d'*Aspergillus fumigatus* sur une cellule hôte s'effectue via l'interaction AFL-fucose. Ainsi, supprimer cette interaction permettrait de stopper la dissémination des conidies.

Lors d'un traitement antifongique ou d'une intervention chirurgicale pour retirer un aspergillome, le champignon est difficilement éliminé dans sa totalité et il peut rester des spores résiduelles qui pourront germer en nouveaux mycéliums. Utiliser un traitement antiadhésif dans ce cas de figure permettrait de réduire, voire supprimer, le risque de développement d'un nouvel aspergillome.

Ce traitement serait particulièrement adapté dans le cas d'utilisation d'immunosuppresseurs (greffes d'organes, de moelle osseuse) qui représentent un risque important de développement d'aspergillose. Il serait éventuellement utilisé en préventif pour éviter la contraction d'aspergillose en évitant le recours aux azolés connus pour leurs interactions médicamenteuses avec les immunosuppresseurs.

Nous avons proposé cette voie de recherche en collaboration avec le Professeur Patrice Le Pape du laboratoire IlciMed à Nantes qui possède une importante expertise des champignons pathogènes parmi lesquels figure *Aspergillus fumigatus*. Les structures que nous avons envisagées sont des fucosides di- et hexavalents avec des espaceurs OEG de différentes tailles dans le but d'obtenir un effet chélate, ainsi qu'un polymère de très haute valence basé sur une charpente dextrane (Figure 28).

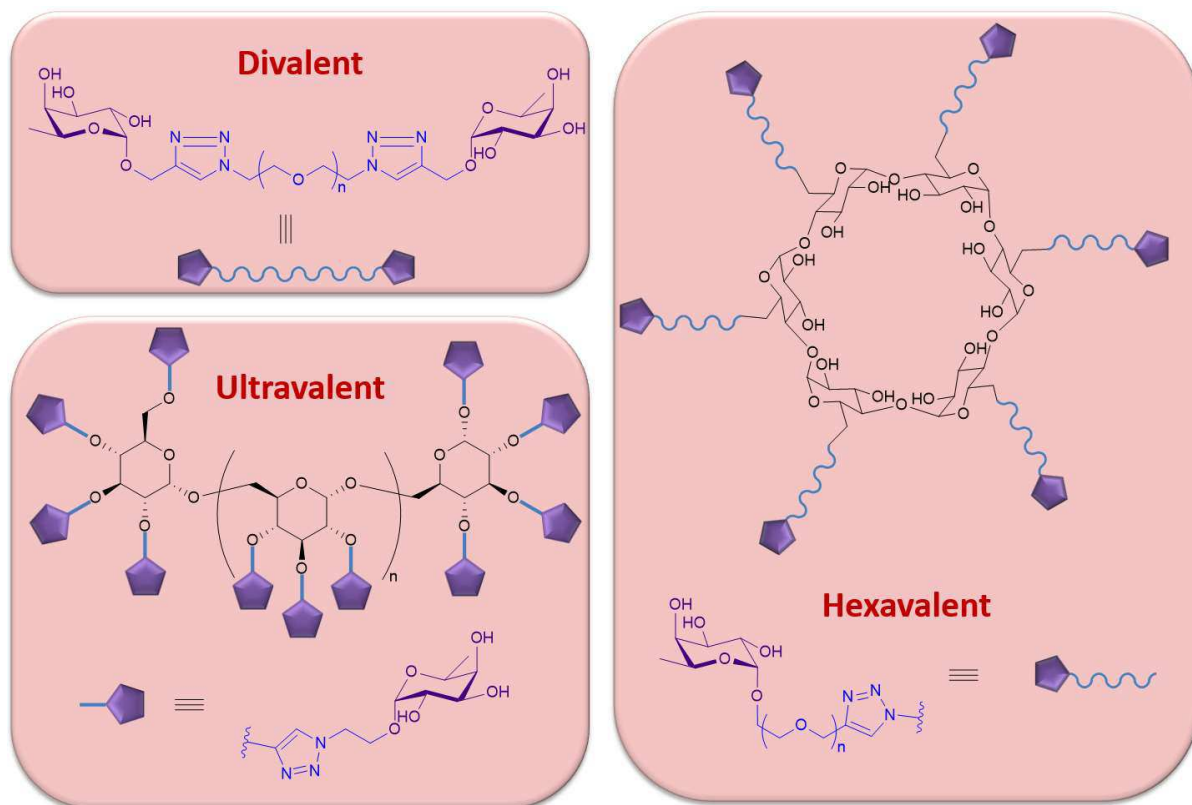


Figure 28 : Structures di-, hexa- et ultravalentes envisagées pour le développement d'inhibiteurs d'adhésion d'*Aspergillus fumigatus*

L'équipe d'Anne Imberti et Annabelle Varrot du laboratoire CERMAV de Grenoble a publié plusieurs structures cristallographiques d'AFL en présence de différents fucosides.²⁵ Cela a permis de connaître la distance séparant les sites de reconnaissance sur AFL et donc d'estimer la longueur *a priori* nécessaire entre deux fucoses dans le cas des structures multivalentes. Cette distance varie de 17,6 Å pour les sites les plus proches à 36 Å pour les plus éloignées (Figure 29).

Nous avons abordé dans la partie Principes et applications de la multivalence, section I.3.iii que la longueur d'un OEG en solution pouvait être calculée puisqu'elle était fonction de la racine carrée de la masse molaire du polymère. Cela nous a permis d'estimer que pour une distance de 17,6 Å un OEG d'environ huit unités serait adapté tandis que pour une distance de 31,3 Å le nombre d'unités OEG serait de 26. Compte tenu du caractère approximatif des longueurs des espaceurs, nous avons synthétisé des OEG avec un nombre d'unité monomère variable ($n = 4 ; 8 ; 12 ; 20 ; 28$) de manière à couvrir une taille de 10 Å à plus de 30 Å.

Un ligand hexavalent de taille appropriée permettrait théoriquement d'interagir simultanément dans les six sites d'AFL. En collaboration avec le Dr A. Varrot qui possède une

connaissance de la structure d'AFL, nous avons montré qu'un OEG de quatre unités EG était nécessaire pour atteindre cet objectif en modélisant une telle structure en interaction avec AFL.

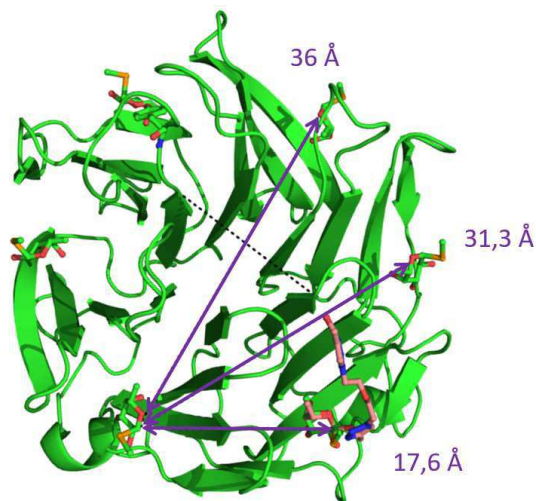


Figure 29 : Distances entre les sites de reconnaissance d'un monomère d'AFL

II. Synthèse

1) Synthèse des charpentes

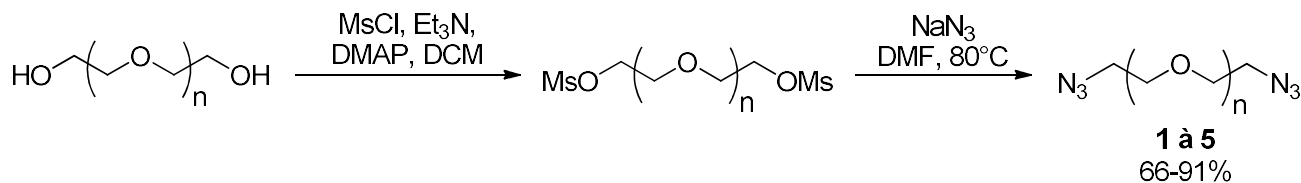
i. Fonctionnalisation des OEGs

Pour générer les composés divalents par CuAAC, nous avons opté pour la synthèse de polyéthylène glycols diazotures plutôt que les analogues dipropargylés qui peuvent présenter une certaine instabilité. En effet, les alcynes vrais sont sujets à la formation de radicaux à la lumière et cela peut conduire à leur polymérisation.

Différentes voies de synthèse sont décrites dans la littérature pour fonctionnaliser des OEGs par des azotures, elles consistent généralement à activer les hydroxyles terminaux en halogènes ou sulfonates avant d'effectuer la substitution nucléophile par un azoture en conditions thermiques ou par catalyse à l'iodure de tétrabutylammonium.

Pour fonctionnaliser la série de OEGs de longueurs variables sélectionnée préalablement ($n = 4 ; 8 ; 12 ; 20 ; 28$) nous avons suivi la méthode décrite par Brauch et al.³⁰ Dans un premier temps les alcools primaires sont activés en mésylate en présence de chlorure de méthanesulfonyle, de diméthylaminopyridine et de triéthylamine dans le dichlorométhane. Les OEGs di-mésylés sont ensuite engagés dans une étape de substitution nucléophile dans le

DMF à 80°C avec de l'azoture de sodium donnant accès à une librairie de OEGs de différentes tailles (composés **1 à 5**) (Schéma 6).



composé	1	2	3	4	5
n =	3	7	11	19	27
rendement	91%	86%	85%	68%	66%

Schéma 6 : Synthèse des OEGs diazotures 1 à 5

Les chaînes les plus longues ont montré une polarité et une hydrosolubilité plus importantes que les chaînes courtes. Lors des deux étapes de synthèse, les différents traitements (lavages) et purification sur gel de silice ont conduit à des rendements plus faibles avec les chaînes OEG les plus longues.

ii. Fonctionnalisation de la charpente α -cyclodextrine

Les cyclodextrines sont des macrocycles de plusieurs unités glucose associées par des liaisons α (1>4) (Figure 30A). Deux faces sont différenciables : une face « supérieure » vers laquelle sont orientés tous les hydroxyles primaires des positions 6 des sucres, et une face « inférieure » vers laquelle s'orientent les hydroxyles secondaires des positions 2 et 3 (Figure 30B). Cette conformation donne aux cyclodextrines une structure conique dont le côté le plus étroit correspond à la face supérieure (Figure 30C). Les trois cyclodextrines les plus usuelles sont l' α -cyclodextrine, la β -cyclodextrine et la γ -cyclodextrine composées respectivement de six, sept et huit unités glucose et possédant des diamètres supérieurs respectifs de 4,7 de 6 et 8,3 Å.⁹⁵

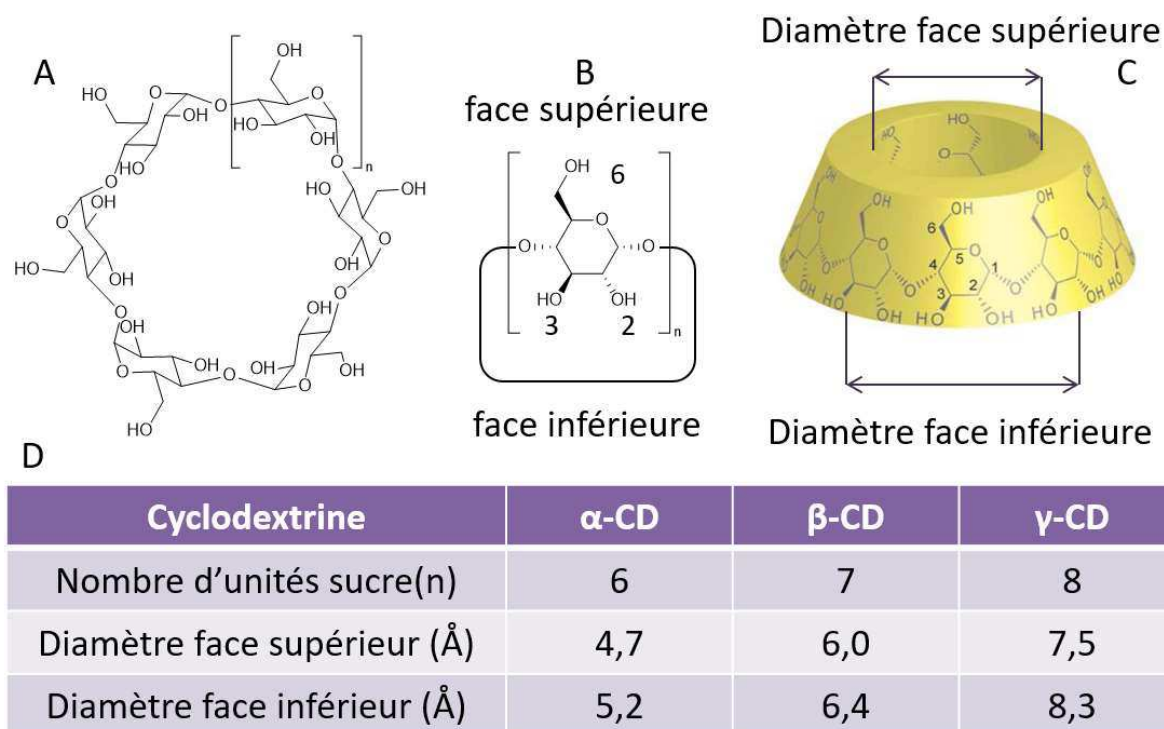


Figure 30 : Cyclodextrines. A) Structure macrocyclique de la cyclodextrine ; B) Différenciation des faces supérieures et inférieures des cyclodextrines ; C) Forme conique de la cyclodextrine ; D) Tableau des diamètres des trois cyclodextrines les plus usuelles

L' α -cyclodextrine est une charpente bien décrite dans la littérature, que ce soit structuralement ou pour la synthèse de dérivés. Le coût des cyclodextrines est très abordable, elles présentent un caractère très hydrosoluble ainsi qu'une absence de toxicité. L'ensemble de ces éléments nous ont conduit à recourir à l' α -cyclodextrine pour notre approche multivalente. La fonctionnalisation sélective des six hydroxyles de la face supérieure est bien décrite dans la littérature et nous a permis d'obtenir une structure à six fucoses permettant potentiellement de saturer tous les sites d'AFL.

Dans un premier temps, les hydroxyles primaires de la cyclodextrine sont substitués sélectivement avec du diiode en présence de triphénylphosphine dans le DMF.⁹⁶ Le composé **6** hexaïodé est obtenu avec un rendement quantitatif. Cette réaction est suivie d'une azoturation à 80°C dans le DMF en présence d'azoture de sodium. Les hydroxyles de la face inférieure ont été ensuite protégés afin de diminuer la polarité de la molécule et pouvoir la purifier sur gel de silice. Les hydroxyles ont été protégés par des groupements acétates avec de l'anhydride acétique et de la diméthylaminopyridine dans la pyridine pour donner l' α -cyclodextrine **7** hexaazoturée avec un rendement de 82 % sur les deux étapes (Schéma 7).

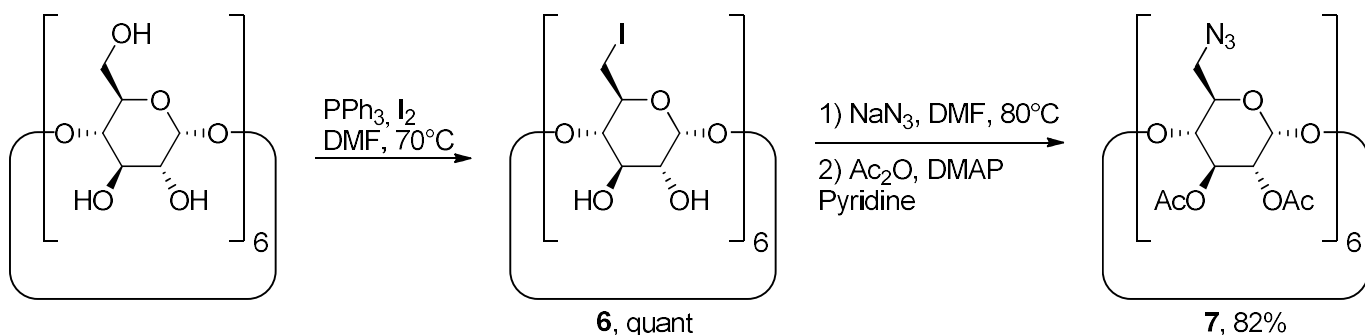


Schéma 7 : Synthèse de la per-2,3 -O-acétyl-per-6-azido- α -cyclodextrine 7

iii. Fonctionnalisation des polymères dextranses

Les dextranses sont des biopolymères naturels composés d'un réseau linéaire d'unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$ et pouvant présenter des ramifications avec des chaînes latérales courtes branchées en $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow4)$. Il existe une gamme très variée de dextranses commerciaux avec des degrés de polymérisation allant de 6 à 4000 unités glucose. Ils ont généralement des degrés de ramification négligeable (95 % de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$) (Figure 31).^{97,98}

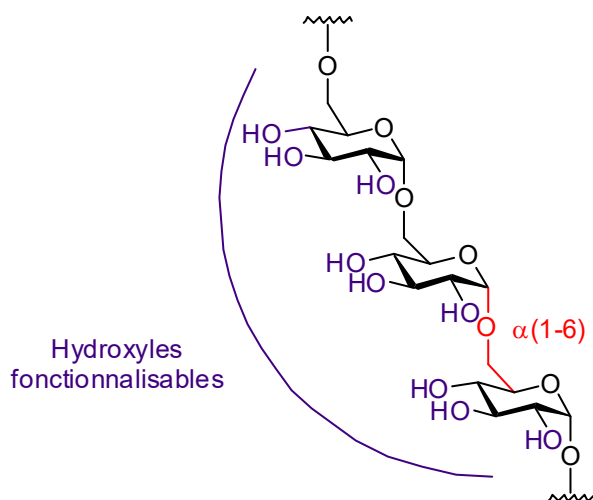


Figure 31 : Structure des dextranses linéaires composés d'unités glucose liés en $\alpha(1\rightarrow6)$ présentant chacun trois groupes hydroxyles fonctionnalisables

Morimoto et al. ont eu recours aux dextranses pour la synthèse de composés à haute valence.⁹⁹ Leur stratégie consistait à introduire sur ces charpentes des antigènes reconnus par les immunoglobulines des cellules B. Ce type de composés multivalents présente un intérêt pour réguler la réponse immunitaire des lymphocytes B qui sont suractivés dans le cas de leucémies lymphoïdes chroniques. Des dextranses de 35-45 kDa ont été fonctionnalisés sur une partie des hydroxyles en position 4 de manière à avoir une répartition statistique des antigènes

avec une faible densité sur toute la longueur du polymère. Cette stratégie leur permettrait d'interagir simultanément avec un grand nombre de récepteurs à la surface des cellules B (Schéma 8A).

Leur synthèse consistait en premier lieu à traiter le dextrane par du carbonyldiimidazole (0,5 équivalent par unité glucose du dextrane) puis par de l'éthylène diamine pour insérer une fonction amine primaire. Un test colorimétrique utilisant l'acide trinitrobenzenesulfonique a mis en évidence la présence d'environ 43 amines pour un dextrane de 246 unités glucose. Les amines ont permis d'introduire un groupement maléimide, réactif vis-à-vis des groupements thiol des antigènes (Schéma 8B). Morimoto *et al.* ont employé des antigènes reconnus par les récepteurs des cellules B et testé l'affinité de leurs structures multivalentes dans des études de compétition avec leurs homologues monovalents mettant en évidence une augmentation de l'affinité jusqu'à 1000 fois plus importante.

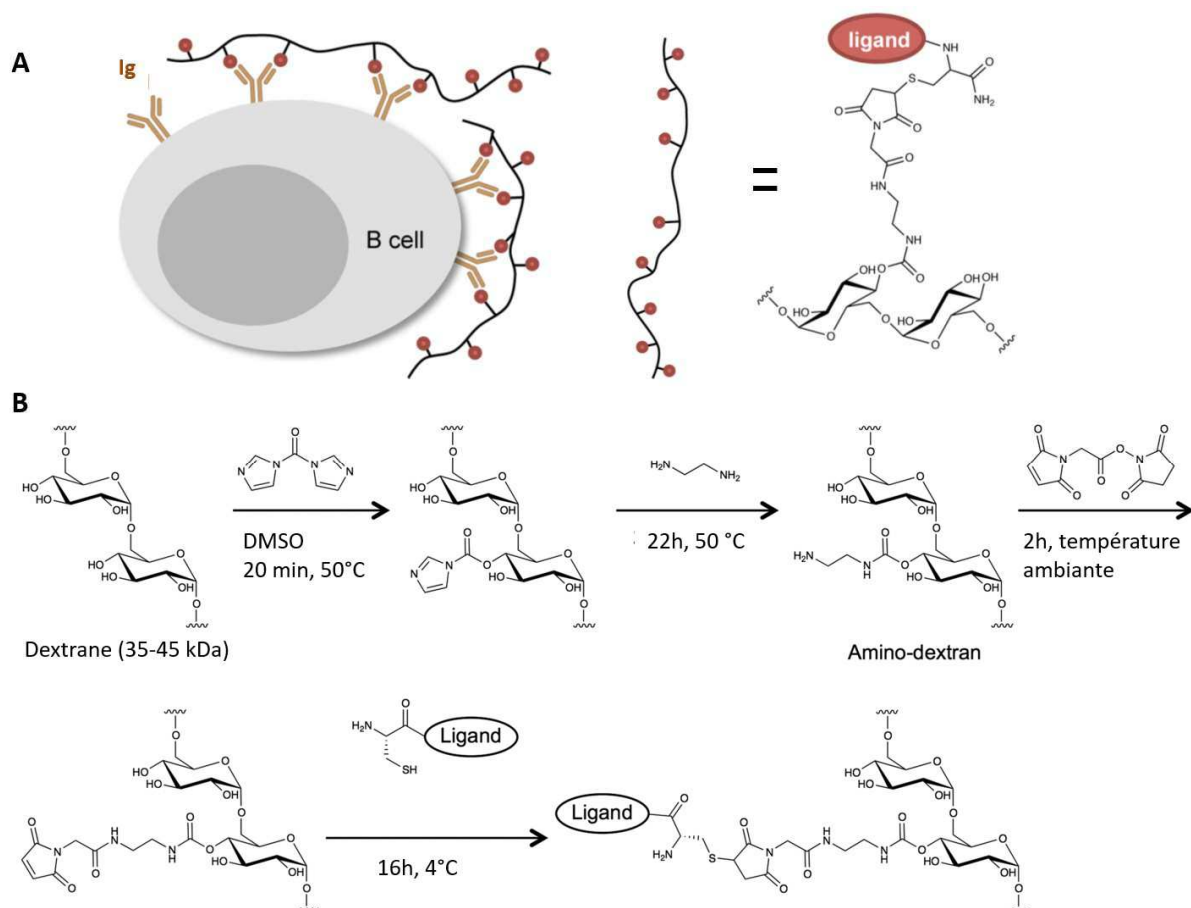


Schéma 8 : Dextrane multivalent développé par Morimoto et al. A) Représentation de l'interaction avec les immunoglobulines de cellules B ; B) Synthèse employée pour générer les structures à faible densité de ligands

Contrairement à Morimoto et al. c'est le potentiel en terme de densité d'épitopes qui nous intéressait avec les structures dextranses. Cette stratégie avait été utilisée précédemment dans notre équipe pour la synthèse d'iminosucres à très haute valence.⁶⁴ Les travaux de thèse du Dr Y. Brissonnet avaient conduit à des structures ultravalentes de motifs désoxynojirimycine (DNJ) et désoxymannojirimycine (DMJ), des iminosucres permettant de moduler l'activité enzymatique de différentes glycosidases, inhibant notamment celle de la mannosidase de Jack Bean (JbMan). Des structures avec des valences de 23 à 900 DMJ et DNJ avaient été évaluées pour leur inhibition potentielle de la JbMan en comparaison avec leur référence monovalente. Les composés multivalents de DMJ s'étaient révélés particulièrement efficaces avec des effets β allant de 40 à 121, la structure présentant la plus forte activité inhibitrice étant celle de plus haute valence (900), mais certaines structures possédaient aussi de manière surprenante un pouvoir activateur sur certaines enzymes, notamment l'agaB, enzyme ciblant les motifs *N*-acetylgalactosamine (Figure 32).

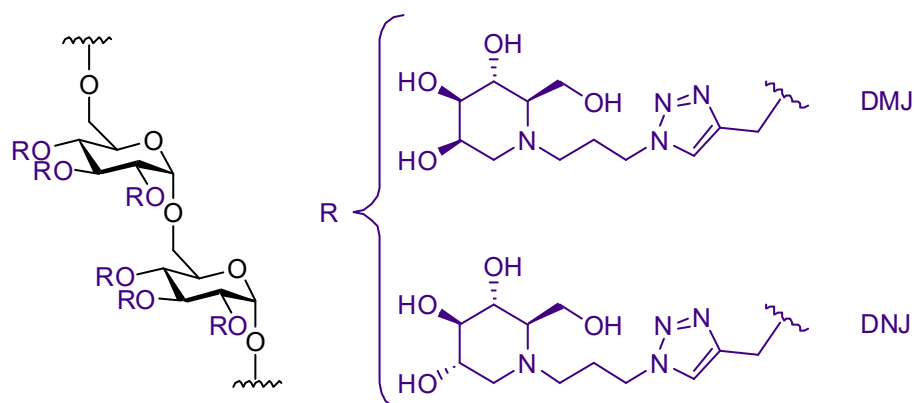


Figure 32 : Structures ultravalentes de DMJ et DNJ basées sur des charpentes dextranses

Pour la synthèse de fucosides ultravalents, la structure idéale serait un dextrane per-azoturé par analogie aux structures di- et hexavalentes. Cependant, la fonctionnalisation des dextranses en azoture s'est révélée infructueuse lors des travaux sur les iminosucres, ce qui nous a contraints à recourir à des structures propargylées.

La synthèse des structures dextranses propargylées est basée sur les travaux de Grischenko et al. pour la fonctionnalisation d'arabinogalactanes.¹⁰⁰ Le polymère est préalablement solubilisé dans une solution concentrée d'hydroxyde de potassium dans l'eau, puis l'ajout de bromure de propargyle dans du toluène conduit au produit **8** per-propargylé avec un rendement de 60%. Pour optimiser cette réaction qui met en jeu deux solvants non miscibles, Grischenko et al. avaient montré que l'utilisation du chlorure de

triéthylbenzylammonium (TEBAC), en quantité catalytique, comme agent de transfert de phase permettait non seulement d'augmenter les rendements mais aussi de réduire les temps de réaction.

Nous avons utilisé ces conditions de propargylation pour accéder à une structure dextrane 20.000 (masse du dextrane de 20kDa) avec 68 unités glucose perpropargylés (Schéma 9).

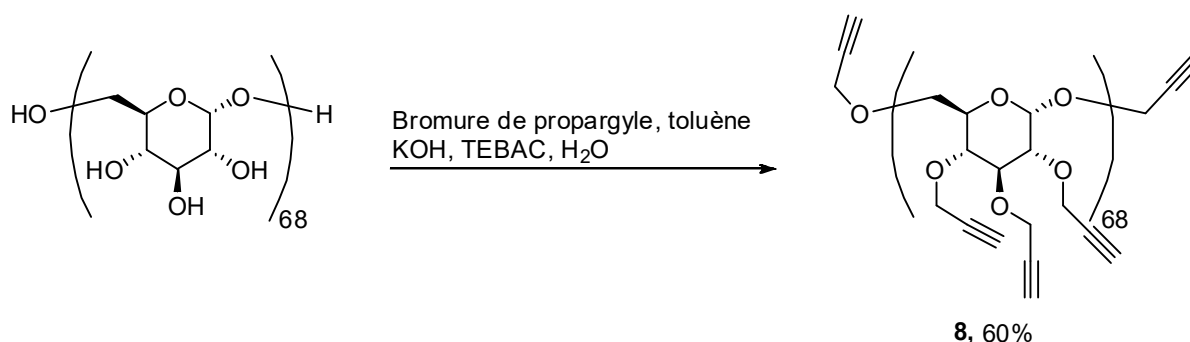


Schéma 9 : Protocole de propargylation des dextrans

2) Synthèse des ligands

Les charpentes synthétisées présentent des fonctions d'ancrage différentes qui sont soit un azoture dans le cas des OEGs et de la cyclodextrine, soit un groupement propargyle dans le cas du dextrane. Il était donc nécessaire de synthétiser également deux types de ligands fucosides pour la réaction de CuAAC.

Les études de Houser et al. avaient montré la meilleure affinité pour AFL de l' α -méthylfucose en comparaison à l'anomère β . Il était nécessaire de trouver une méthode stéréosélective pour la synthèse de fucosides α . Mukhopadhyay et Roy ont décrit une méthode de glycosylation de Fisher utilisant de l'acide sulfurique immobilisé sur silice afin d'accéder à une série d' α -glycosides.¹⁰¹ Dans cette étude, les auteurs se sont focalisés sur l'introduction d'un groupement alcool propargylique à partir de sucres non protégés. Ils ont décrit un mode opératoire optimal qui utilise 5 équivalents d'alcool propargylique et une quantité catalytique d'acide sulfurique sur silice (5mg/mmol de sucre). Le mélange réactionnel est chauffé à une température de 65°C pendant 4h en présence de fucose pour conduire au L-fucose propargylé avec un rendement de 74% et un rapport α/β de 10/1.

Malgré plusieurs tentatives pour reproduire cette réaction dans les conditions décrites par Mukhopadhyay et Roy, nous n'avons jamais réussi à atteindre le rapport α/β de 10/1. Nous

obtenions chaque fois un ratio maximum de 3/1 en faveur de l'anomère α . Cela était problématique car il est très difficile de purifier deux anomères par chromatographie sur gel de silice, particulièrement quand la proportion en anomère attendue n'est pas très élevée, car leur grande proximité structurale leur confère des polarités très similaires.

Après optimisation des conditions de réaction, il s'est avéré qu'une température de 80°C pour un temps de réaction de 6h permettait d'obtenir une proportion d'anomère α plus importante (α/β de 5/1). Il était cependant difficile d'augmenter encore la température et le temps de réaction car même si la proportion d'anomère α augmentait, cela entraînait aussi la formation de différents produits secondaires faisant baisser significativement les rendements de réaction.

Sans étape de purification préalable, nous avons ensuite protégé les hydroxyles par des acétates dans un souci de facilité de purification et de synthèse pour le reste des étapes. Nous avons utilisé un mélange d'anhydride acétique et de pyridine (1/1) comme solvant et une quantité catalytique de DMAP. Ces conditions nous ont permis d'obtenir l' α -L-fucose propargylé **9** avec un rendement de 51 % sur les deux étapes (Schéma 10).

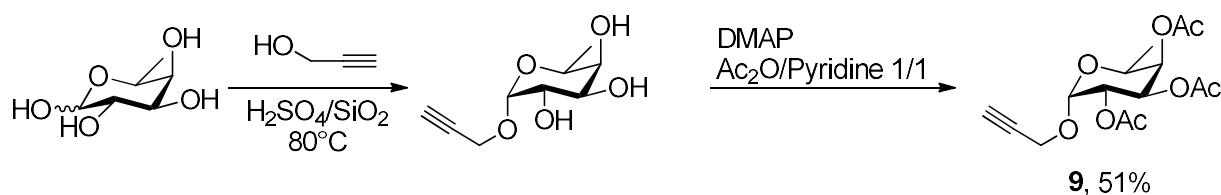


Schéma 10 : Synthèse du ligand α -L-fucose propargylé **9 avec un rendement de 51% sur deux étapes**

De la même façon, trois autres ligands fucosides **11**, **14** et **15** (Schéma 11) qui comportent respectivement une fonction azoture ou des espaceurs OEGs propargylés de 2 et 4 unités, ont été préparées.

La première étape de synthèse du fucoside **11** a consisté à faire réagir le 2-bromoéthanol et le fucose dans les conditions précédemment décrites pour conduire au composé **10**. Ensuite, l'atome de brome est substitué par de l'azoture de sodium dans le DMF à 80°C pour donner le fucoside **11** (Schéma 11A) avec un rendement de 74%. Pour l'obtention des fucosides OEGylés (fonctionnalisés avec un OEG) **14** et **15**, nous avons dans un premier temps effectué la mono-propargylation du di- et du tétraéthylène glycol. Cette réaction a été effectuée dans le THF en utilisant une quantité sub-stœchiométrique de bromure de propargyle et d'hydruure de sodium pour conduire aux OEGs monofonctionnalisés **12** et **13** avec

de bons rendements. Nous avons initialement employé une méthode de propargylation de l'OEG en quantité stœchiométrique, mais nous obtenions toujours de l'OEG bis-propargylé qui était difficilement séparable de l'OEG mono fonctionnalisé. Souvent deux purifications sur gel de silice étaient nécessaires pour la séparation des composés entraînant une chute importante du rendement à 59%. Le recours à une quantité sub-stœchiométrique d'alcool nous a fait gagner en rendement et en temps de manipulation. Les deux OEGs ont ensuite été engagés dans la réaction de glycosylation de Fischer en présence de fucose afin d'accéder après acétylation aux composés **14** et **15** sous forme d'anomère α (Schéma 11B).

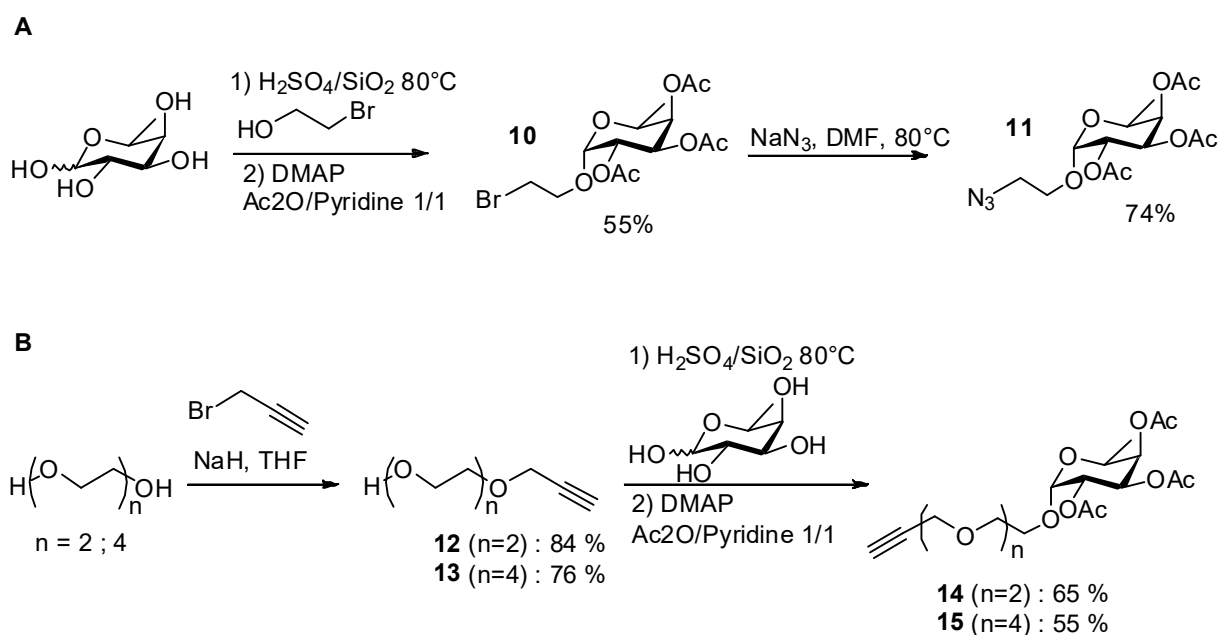


Schéma 11 : Synthèse des fucosides azoturés et OEGylés

Il est à noter que les fucosides **14** et **15** se sont montrés particulièrement difficiles à purifier sur gel de silice en raison de leur forte polarité. Il était nécessaire d'effectuer deux à trois purifications successives pour isoler complètement l'anomère α .

Wang et al. avaient eu recours à une stratégie différente pour accéder à ce genre de structures. Ils avaient mis au point une méthode de glycosylation sur le fucose libre utilisant une activation de l'alcool anomérique grâce à un mélange $\text{PPh}_3/\text{CBr}_4$ et du triéthylène glycol monopropargylé comme solvant. Ces conditions leur avaient permis d'atteindre des proportions en isomères α/β de 72/28 mais un rendement de 40% en anomère α isolé après protection des hydroxyles libres en acétate (Schéma 12).

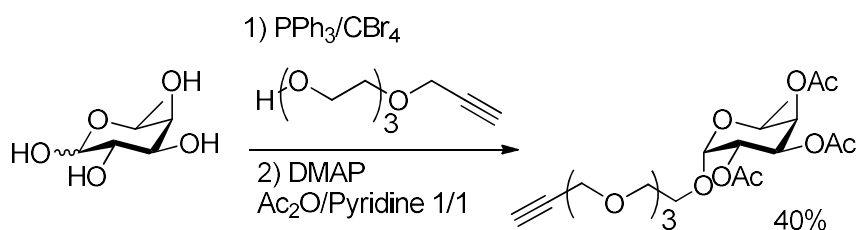


Schéma 12 : Synthèse des Fucosides OEGylés en deux étapes décrites par Wang et al.

3) Insertion des ligands sur la charpente

Les ligands obtenus ont ensuite été insérés sur les charpentes fonctionnalisées par CuAAC dans un mélange dioxane/eau (4/1) avec un chauffage à 60 °C et du cuivre(I) obtenu *in situ* par réduction du sulfate de cuivre avec de l'ascorbate de sodium (méthode A). Ces conditions ont été employées pour la synthèse des composés divalents **16** à **20** obtenus avec des bons rendements compris entre 74 et 85% (Schéma 13A). Elles ont ensuite été appliquées à la synthèse des structures hexavalentes **21** et **22** isolées avec des rendements respectifs de 72% et 67% (Schéma 13B). Par contre, cette méthode s'est révélée inadaptée au greffage des ligands sur la charpente dextrane. Dans ces conditions, la réaction de CuAAC n'était jamais complète même en augmentant les temps de réaction jusqu'à 72h. Pour obtenir la structure ultravalente **23** totalement fonctionnalisée, nous avons eu recours à une activation sous micro-onde à 80°C pour un temps de réaction de 1h30 (Schéma 13C). Ces conditions avaient préalablement été décrites par Appukkuttan et al. dans le but de réduire les temps de réaction pour la CuAAC.¹⁰² Une seconde difficulté rencontrée pour obtenir cette structure fut la purification puisqu'un tel polymère n'est pas isolable par chromatographie sur gel de silice. Nous avons eu recours à une méthode de précipitation dans l'éther diéthylique qui nous permettait d'obtenir le dextrane avec une bonne pureté mais le rendement final restait modéré (44%) à cause de la perte de produit lors du rinçage du précipité.

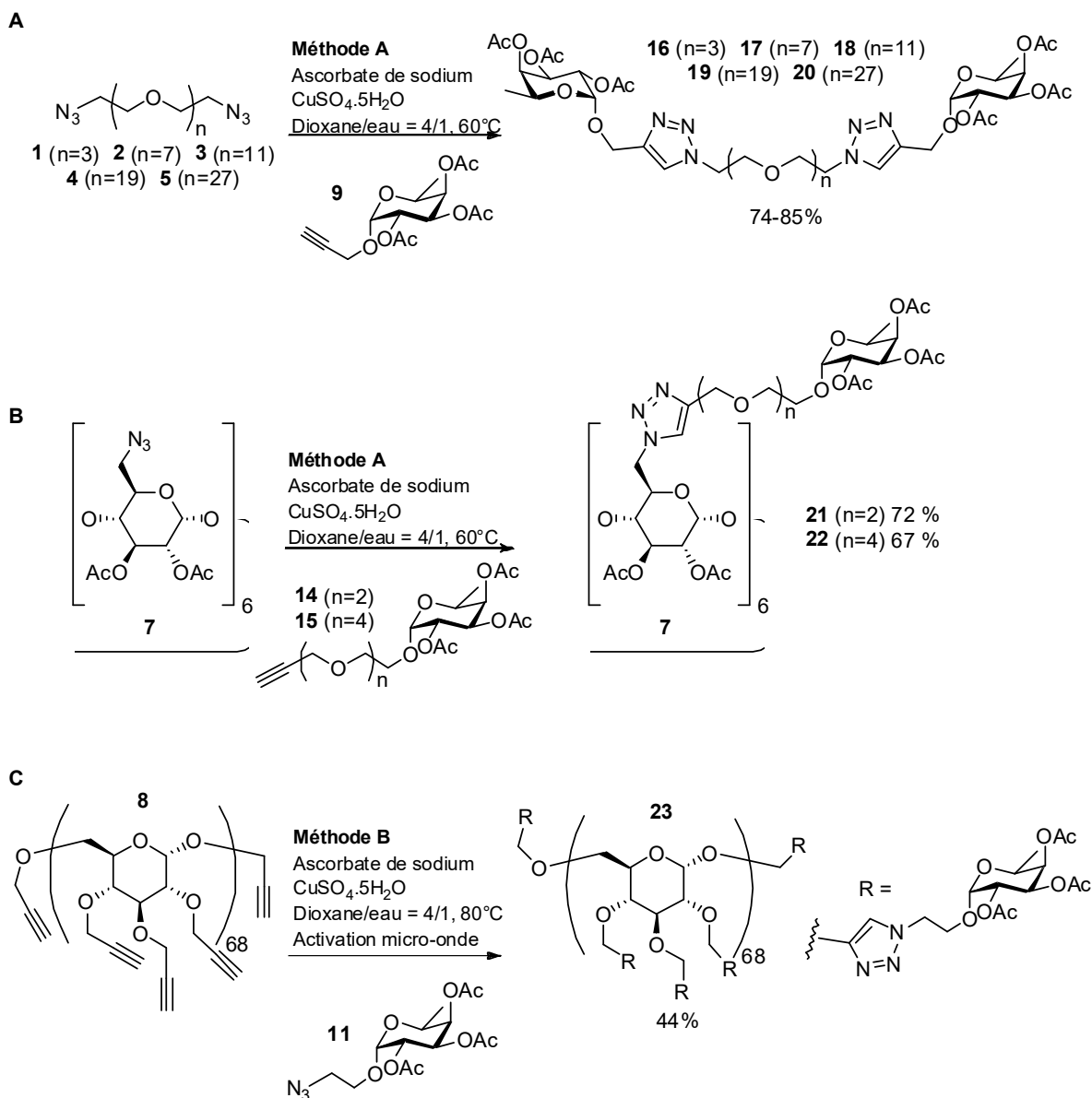


Schéma 13 : Insertion des ligands sur les charpentes multivalentes par CuAAC

La dernière étape de déprotection des alcools se fait classiquement par transestérification en utilisant une solution de méthanolate de sodium en quantité catalytique dans le méthanol (méthode de Zemplén). Une neutralisation consécutive avec une résine acide (type amberlite IR 120 H⁺) suivie d'une filtration permet d'accéder au sucre déprotégé. Cette méthode a été employée avec succès pour la déprotection des composés divalents **16** à **20** qui ont été obtenus avec des rendements quantitatifs. Cependant, elle n'a pas donné de bons résultats pour les structures hexa- et ultravalentes. L'utilisation de la résine basique (amberlite IRN 78 OH⁻) dans un mélange méthanol/eau (1/1) s'est révélée efficace pour l'obtention des ligands multivalents correspondants **29** et **30** ainsi que le composé ultravalent **31** avec respectivement des rendements quantitatifs et de 72% (Schéma 14).

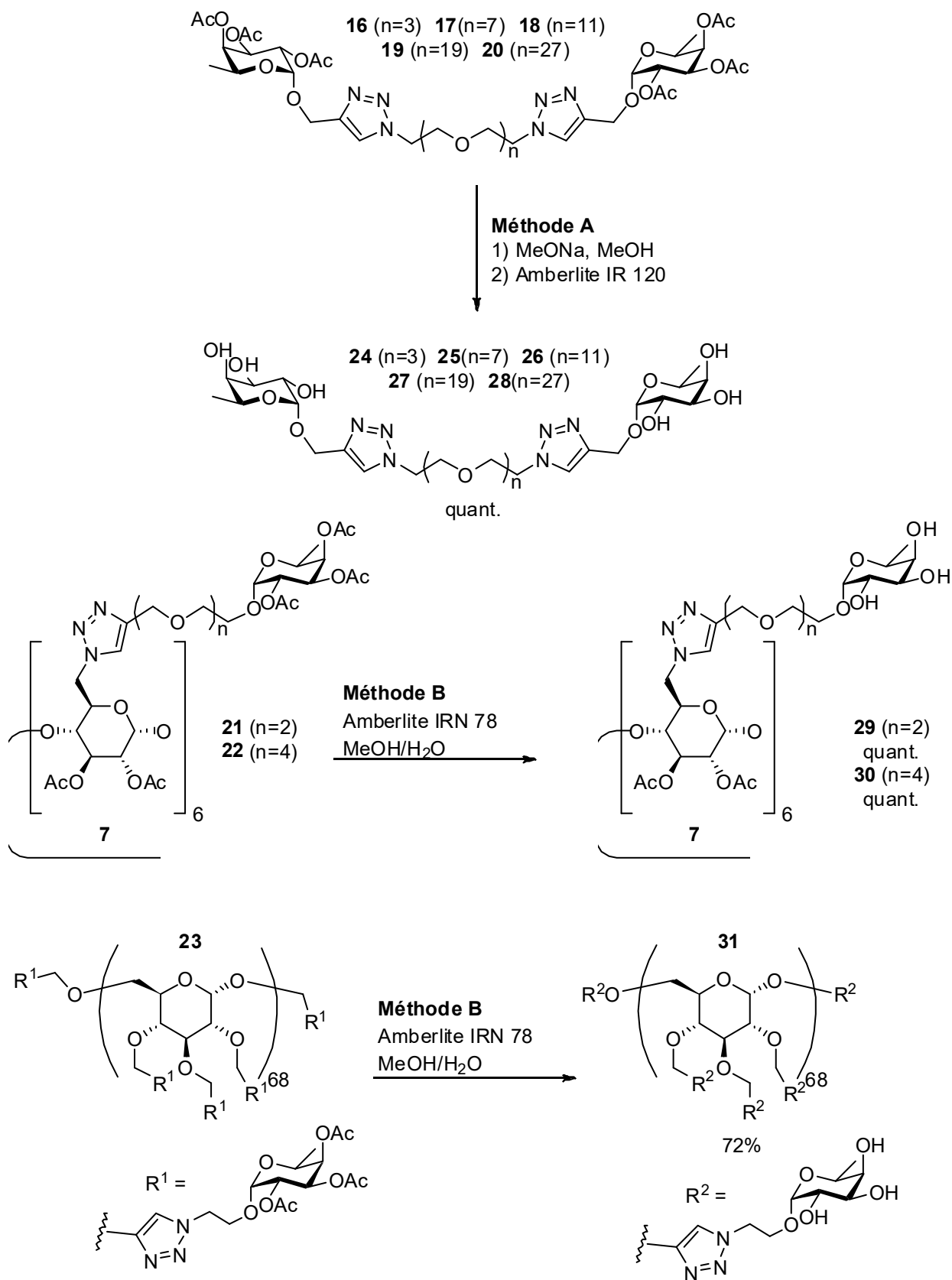


Schéma 14 : Réactions de déprotection des composés multivalents

4) Synthèse du ligand monovalent de référence

Pour pouvoir calculer le gain d'affinité apporté par des effets multivalents éventuels, il est nécessaire de disposer d'une référence monovalent adaptée. Elle doit être proche structuralement de l'unité monovalente répétée sur la charpente.

Pour cela, nous avons greffé un enchainement tétraéthylène glycol par l'intermédiaire d'un azoture sur le composé **9**. Le tétraéthylène glycol a d'abord été monomésylé par du chlorure de méthanesulfonyle utilisé en défaut (0,2 équivalent) en présence de triéthylamine et d'une quantité catalytique de DMAP. Le produit de mono-mésylation a ensuite été engagé dans une étape d'azoturation pour former le composé **32**. Les acétates ont été déprotégés par la méthode A décrite précédemment pour conduire au composé de référence **33** avec un rendement de 86% sur les deux étapes (Schéma 15).

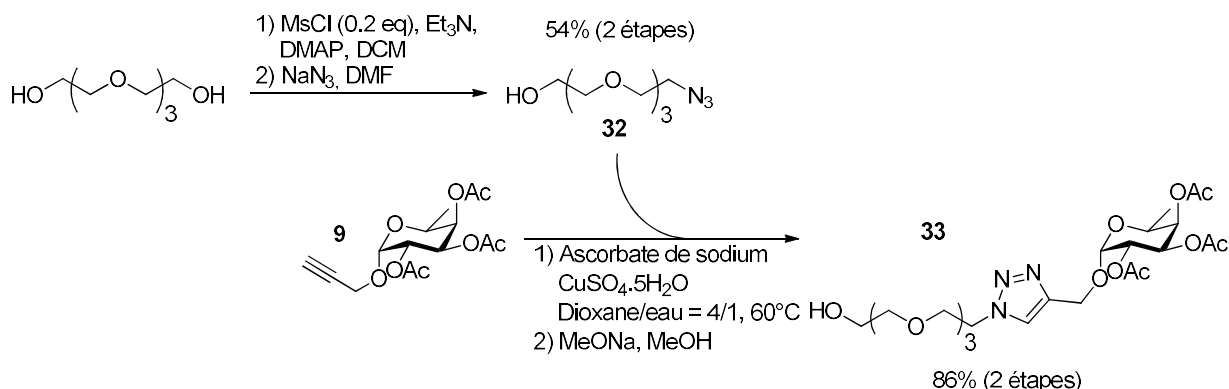


Schéma 15 : Synthèse du composé monovalent de référence **33** avec un rendement de 86 % en deux étapes

III. Evaluations biologiques

Nous avons obtenu un panel de composés comprenant cinq divalents, deux hexavalents, un ultravalent et une référence monovalente que nous avons souhaité évaluer par deux méthodes. La collaboration avec l'équipe des Dr. A. Varrot et A. Imberty nous permettait de tester ces composés par microcalorimétrie. Lorsque l'on peut avoir accès à une protéine isolée, cette technique est facile d'accès et permet d'obtenir des informations thermodynamiques sur les affinités ligand-protéine. Cependant, il est aussi intéressant d'avoir des renseignements sur le potentiel d'inhibition de ligands en milieu cellulaire qui est plus représentatif du milieu naturel. C'est pourquoi nous avons effectué des tests complémentaires d'inhibition de l'adhésion de spores d'*Aspergillus fumigatus* dans l'équipe du Pr Patrice Le Pape.

1) Titration calorimétrique isotherme

L'équipe d'A. Imberty et d'A. Varrot du laboratoire CERMAV de Grenoble possède une reconnaissance forte dans l'élucidation structurale de lectines de pathogènes et l'étude de leur implication dans les processus infectieux. Elle a un savoir-faire important dans l'obtention de structures cristallographiques de complexes ligands-protéines et dans la détermination de leurs affinités par microcalorimétrie. En 2013, cette équipe a publié la première structure d'AFL complexée par des fucosides monovalents.⁷⁰ Elle a également étudié l'affinité de nombreuses lectines pour leur ligand sucre par microcalorimétrie.

Cette expertise nous a particulièrement intéressés pour l'évaluation de l'affinité de nos ligands multivalents sur AFL. Ainsi, je me suis rendu dans leur laboratoire pour me former à l'utilisation de microcalorimètres.

i. Description de la méthode

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une méthode souvent utilisée pour mesurer les constantes thermodynamiques de l'interaction entre une biomolécule (AFL) et un ligand synthétique. C'est la seule technique permettant de mesurer à la fois les paramètres enthalpiques et entropiques de liaison et sans modification des partenaires impliqués.

Il s'agit d'estimer la libération de chaleur lors de la formation de la liaison ligand-récepteur dans un microcalorimètre comportant deux cellules. L'une comporte de l'eau ultra pure maintenue à une température précise et sert de cellule de référence, l'autre contient une solution de protéine à une concentration fixe (Figure 33A). À cette solution, l'appareil additionne à intervalles de temps réguliers et sous agitation un volume précis d'une solution de ligand. Cette injection génère alors une variation de chaleur par rapport à la cellule de référence qui est compensée par une résistance chauffante. La puissance nécessaire pour maintenir la température est alors enregistrée pour toutes les injections de ligands. L'intégration de ces données brutes sous forme de graphique (Figure 33B et C) donne accès à la constante d'association K_a , aux données de stœchiométrie et d'enthalpie (ΔH) de liaison. A partir de ces données il est alors possible de déterminer l'enthalpie libre (ΔG) et la variation d'entropie du système (ΔS).

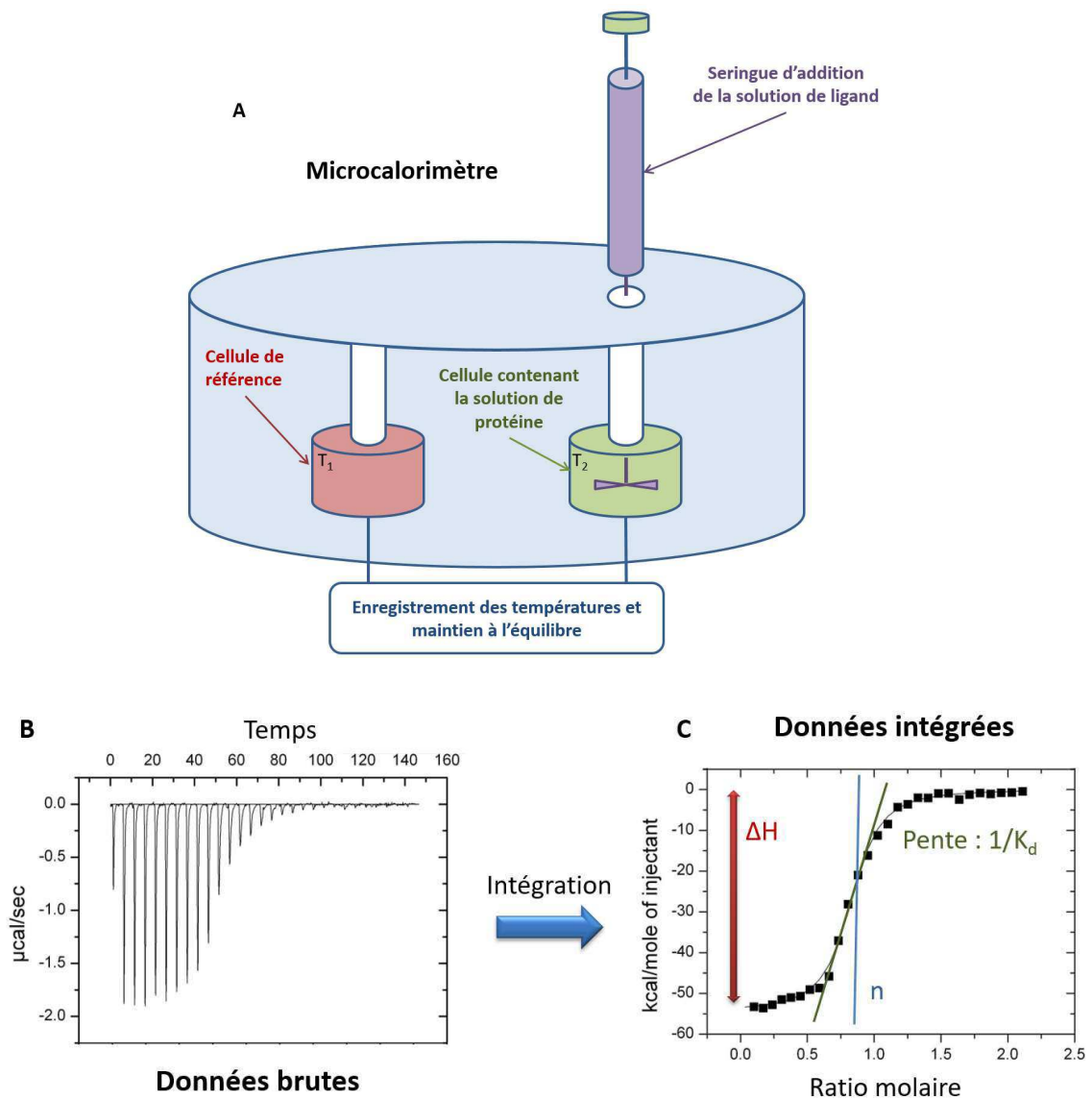


Figure 33 : Principe de la microcalorimétrie. A) Microcalorimètre ; B) Données brutes ; C) Données intégrées

La constante de dissociation obtenue grâce à la pente à l'équilibre indique l'affinité thermodynamique ligand-protéine, tandis que la différence d'énergie entre le plateau inférieur et le plateau supérieur donne la valeur de l'enthalpie. Celle-ci témoigne de la contribution des liaisons hydrogène et des énergies de Van Der Waals dans la liaison formée. Les valeurs d'enthalpie libre et d'entropie peuvent être déduites à partir des premières données acquises grâce aux équations de thermodynamique. L'entropie nous fournit la part des aspects conformationnels comme la perte de degrés de liberté ...

ii. Résultats

Les tests d'ITC que j'ai effectué au laboratoire CERMAV de Grenoble n'ont pas concerné l'intégralité des composés synthétisés. Une des limites nous a été imposée par le microcalorimètre : la cellule contenant la solution de protéine est de très petite taille pour pouvoir faire des tests avec des quantités réduites de protéines et de ligands, cependant cela rend l'appareil très sensible à l'agrégation. Les agrégats se déposent très facilement sur les parois de la cellule ce qui fausse les mesure et encrasse la cellule la rendant inopérante sans un nettoyage long et délicat. Cela a proscrit la structure dextrane ultravalente des tests de microcalorimétrie.

De plus, nous disposions d'un temps limité pour effectuer l'ensemble des tests. Nous avons donné la priorité aux structures hexavalentes **29** et **30** puisqu'elles nous semblaient les plus prometteuses. Nous avons aussi évalué en priorité le composé monovalent **33**, référence nécessaire au calcul de l'effet β , ainsi que les ligands **24**, **26** et **28** avec des espaceurs OEGs de respectivement 4, 12 et 28 unités. Enfin, nous avons inclus la structure α -cyclodextrine libre aux tests : elle n'a montré aucune affinité pour la lectine AFL et n'est donc pas représentée dans le Tableau 6.

Nous avons répété le test deux à trois fois pour chaque composé. Les résultats nous donnent accès aux différentes constantes thermodynamiques pour chaque ligand. Les valeurs de constantes de dissociation nous ont permis de déterminer le facteur β pour les composés multivalents selon l'équation 1 donnée dans la partie I.I.2.v.

Composé	Valence	OEG (n)	Stoechiométrie	K _d (μM)	-ΔH	-TΔS	-ΔG	β ^b
αMeFuc ^a	1	0	/	120 ±8	/	/	/	/
33	1	4	4.0 ± 0.3	167 ± 62	60 ± 8	38 ± 9	22 ± 1	1
24	2	4	2.12 ± 0.03	3.8 ± 0.3	77 ± 3	46 ± 3	31 ± 0.2	21
26	2	12	2.35 ± 0.31	0.55 ± 0.19	74 ± 6	36 ± 0.6	35.9 ± 0.9	151
28	2	28	3.81 ± 0.08	52 ± 2	52 ± 5	28 ± 5	24.5 ± 0.1	1,6
29	6	2	1.01 ± 0.02	0.60 ± 0.03	161 ± 1	125.5 ± 0.6	35.5 ± 0.1	46
30	6	4	0.77 ± 0.04	0.18 ± 0.01	220 ± 8	181 ± 8	38.4 ± 0.2	154

Tableau 6 : Tableau des grandeurs thermodynamiques des interactions ligand-protéine mesurées en ITC ;

^a Données indicatives du K_d de l'αMeFuc déterminées par méthode SPR par Houser et al.²⁵

^b Facteur β déterminé par le rapport des K_d rapporté au nombre de ligands de la charpente

Comme ce sont les constantes de dissociation qui témoignent de la force d'interaction des ligands avec AFL, nous avons dressé l'historgramme suivant pour les comparer avec plus de facilité (Figure 34).

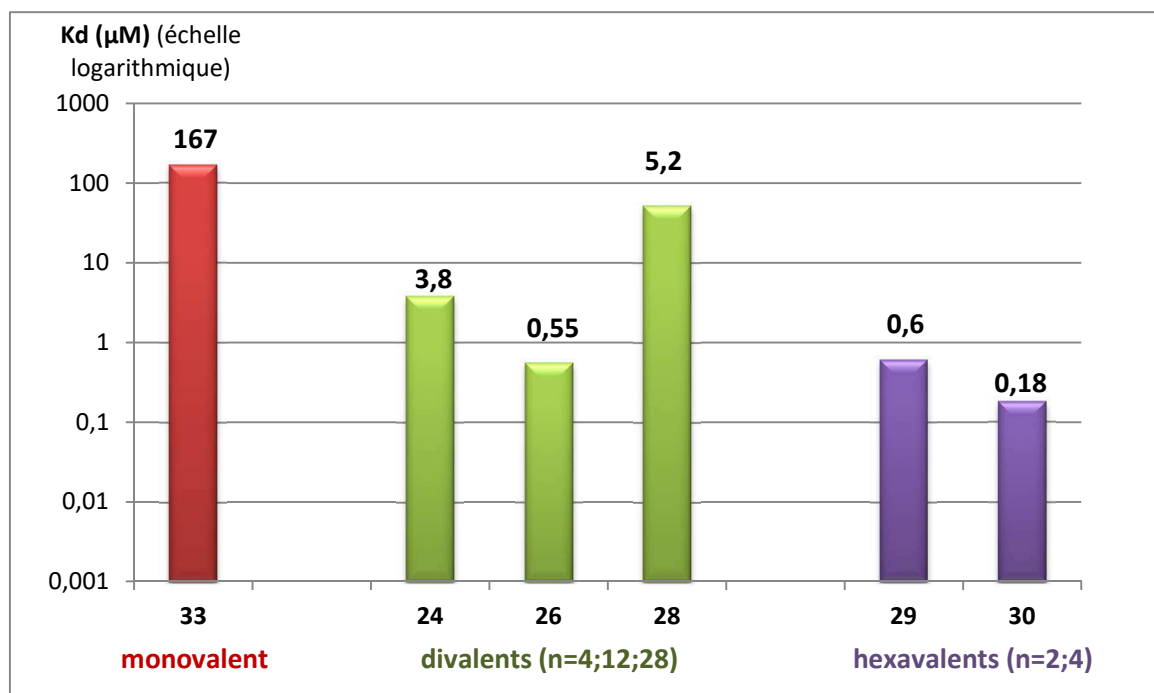


Figure 34 : Représentation en histogramme des constantes de dissociation (échelle logarithmique) des fucosides multivalents et de la référence monovalente 33.

Dans l'ensemble, les composés multivalents possèdent des K_d inférieurs à celle de la référence monovalente. Les composés hexavalents **29** et **30** présentent tous les deux des K_d sub-micromolaires et le ligand **30** est celui qui présente la meilleure affinité avec un faible K_d de 180 nM. Le facteur β de ce ligand est de 154, meilleure valeur obtenue parmi tous les autres. En comparaison, le facteur β du composé **29** qui possède un bras espaceur OEG avec $n = 2$ n'est que de 46, plus de trois fois inférieure à celui de **30**. Cela confirme nos attentes : la molécule **30** qui possède un espaceur OEG de quatre unités est particulièrement adaptée pour l'interaction simultanée avec les six sites d'AFL, alors que l'espaceur de **29** plus court n'est pas optimal.

Les divalents ont aussi montré un effet multivalent significatif ($\beta = 21 ; 151 ; 1,6$ respectivement pour **24**, **26** et **28**) comparé à la référence monovalente **33**. Les composés **24** et **28** présentent des effets β modérés comparés à **26** ce qui illustre l'importance fondamentale d'ajuster la longueur de l'espaceur pour une interaction forte avec AFL. En effet le ligand **26** possède un espaceur de douze unités éthylène glycol adapté pour interagir efficacement avec différents sites d'interaction d'AFL ($K_d = 550$ nM).

Les valeurs de K_d sont à mettre en relation avec la stœchiométrie d'interaction (Tableau 6) qui indique le nombre de ligands lié à une seule protéine. Comme la protéine est hexamérique, nous attendions idéalement des valeurs de 6 pour la référence monovalente, de 3 pour les composés divalents et de 1 pour les fucosides hexavalents. Initialement, lors des tests la protéine est dosée avec du fucose pour lequel la stœchiométrie est fixée à 6. Les données expérimentales de stœchiométrie présentées dans le tableau en sont assez proches avec cependant une valeur généralement inférieure à celle attendue. Il apparaît qu'un seul composé hexavalent est fixé par protéine ce qui témoigne d'un mode d'interaction chélate.

Les composés divalents **24**, **26** et **28** possèdent des stœchiométries respectivement de 2,12 ; 2,35 et 3,81. Ces valeurs témoignent de l'interaction simultanée avec plusieurs sites de fixation puisqu'elles sont inférieures à 6. La variation observée peut provenir à la fois d'une faible qualité de la protéine ou bien d'un mode de fixation différent comme présenté ci-dessous (Figure 35). Les différentes interactions peuvent coexister et la valeur de stœchiométrie résultante serait une combinaison de ces différents modes.

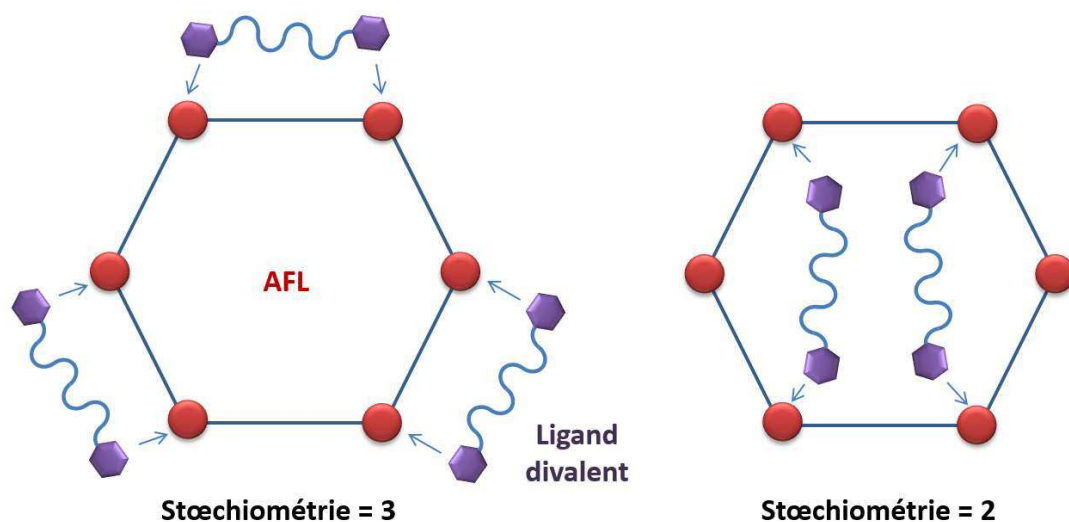


Figure 35 : Différents modes de fixation possibles et leur stœchiométrie pour les composés divalents

Houser et al. avaient obtenu pour l' α MeFuc une valeur de $K_d = 120 \mu\text{M}$ lors de leurs études par SPR.²⁵ En comparaison, la référence monovalente **33** possède un K_d légèrement plus élevé ($167 \mu\text{M}$). La présence de la partie aglycone (triazole et OEG) induit donc une légère diminution de l'affinité.

En ce qui concerne les contributions enthalpiques et entropiques, elles évoluent assez peu lorsque l'on considère les composés divalents **24**, **26** et **28** par rapport au fucose monovalent **33**. Cependant pour les hexavalents, la contribution enthalpique est multipliée par 2,7 pour la structure **29** (OEG $n=2$) et par 3,7 pour la structure **30** (OEG $n=4$) qui est très favorable pour l'interaction avec AFL. L'évolution de l'entropie est néfaste pour cette interaction avec une multiplication du facteur $-T\Delta S$ de 3,3 pour le ligand **29** et de 4,7 pour le composé **30**. Ces variations enthalpiques et entropiques attestent également d'interactions supplémentaires des ligands multivalents avec différents sites d'AFL.

Ces premiers résultats encourageants sur AFL nous ont conduits à poursuivre notre investigation au niveau cellulaire. Ainsi, nous avons voulu déterminer la faculté des composés à inhiber l'adhésion des spores d'*Aspergillus fumigatus* sur des lignées de pneumocytes humains.

2) Test d'adhésion de conidies sur pneumocytes en présence de fucosides

Les tests d'inhibition de l'adhésion de spores aspergillaires avec nos fucosides multivalents ont été effectués dans l'équipe du Professeur Patrice Le Pape. Ce protocole d'évaluation n'ayant jamais été décrit sur *Aspergillus fumigatus*, il a nécessité une mise au point spécifique.

i. Description de la méthode

L'intérêt de la stratégie antiadhésive dans le cas d'*Aspergillus fumigatus* est d'inhiber l'adhésion des conidies à la surface de l'épithélium des voies broncho-pulmonaires. Ces spores présentent un potentiel d'adhésion particulièrement important sur les pneumocytes alvéolaires, cellules formant l'épithélium. Nous avons eu recours à une lignée de pneumocytes (A549) qui permettait une fixation des conidies adéquate dans le cadre de la méthode développée.

Pour cette technique (Figure 36), la première étape consistait à obtenir un tapis de pneumocytes alvéolaires dans des plaques 96 puits. Pour cela, environ 40.000 cellules sont introduites dans chaque puits puis sont incubées pendant 7 jours à 37 °C. Pendant ce temps d'incubation, les cellules vont se déposer au fond des puits de manière homogène pour atteindre une confluence et ne laisser aucun espace vide entre les cellules qui entrent en contact les unes avec les autres. En parallèle, *Aspergillus fumigatus* est cultivé à 37°C pendant 3 à 5 jours. Les spores sont alors récoltées délicatement dans une solution de tampon PBS en évitant de prélever ceux qui ont évolué en filaments (hyphes). Cette solution est diluée à une concentration de 1 à 2 x 10⁶ spores/mL puis préincubée avec les différents fucosides en concentration variable.

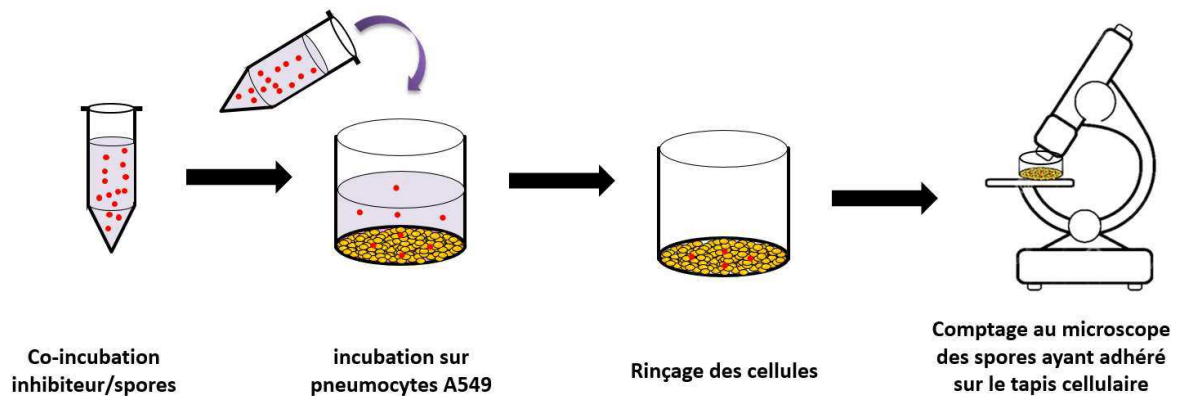


Figure 36 : Schéma général du test d'adhésion de conidies sur pneumocytes en présence de fucosides

Cette étape permet aux fucosides d'interagir préalablement avec la lectine sur *Aspergillus fumigatus*. Chacune de ces solutions est ensuite additionnée dans un puits contenant le tapis de pneumocytes puis incubée à 37°C pendant 45 minutes. Les composés ayant un potentiel antiadhésif important vont réduire le pouvoir de fixation des spores. Ainsi après incubation, les spores présents dans le surnageant sont éliminées par trois étapes de rinçage. Les spores ayant adhéré au tapis cellulaire sont alors comptés au microscope sur une surface moyenne de 400 pneumocytes.

ii. Résultats

Le test d'adhésion de spores d'*Aspergillus fumigatus* n'est pas une méthode restrictive en termes de types de ligands multivalents. Nous avons de ce fait pu tester le caractère antiadhésif des composés di- et hexavalents mais aussi du dextrane ultravalent, ce qui n'était pas possible par ITC sur AFL. Pour pouvoir comparer directement les effets multivalents, nous avons exprimé les concentrations molaires en ligands fucose et non en molécules. Par exemple, une solution à 5µM de composé divalent, correspond à une concentration en fucose de 10µM. Cela était particulièrement nécessaire pour le composé dextrane. Cela nous a permis de comparer directement l'apport d'affinité de chaque fucose présent sur les charpentes multivalentes.

Nous avons évalué l'activité de chaque composé à trois concentrations différentes en équivalent fucose (1, 10 et 100 µM). Cependant, suite à une mauvaise répartition des pneumocytes dans certaines plaques, les composés **28**, **31** et **33** n'ont été testés qu'à deux concentrations différentes (Figure 37). Les mesures ont été répliquées trois fois.

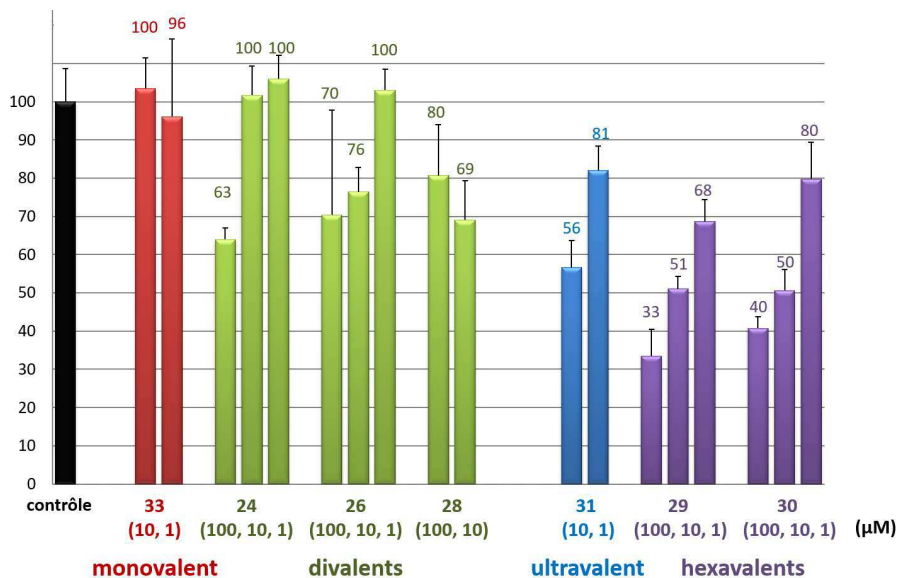


Figure 37 : Pourcentage d'adhésions résiduelles des conidies d'*Aspergillus fumigatus* sur pneumocytes en présence de fucosides multivalents et à des concentrations de 100, 10 et 1 μM

La première information que l'on peut dégager de ce test est l'absence d'activité antiadhésive du composé monovalent aux concentrations de 1 et 10 μM. Le composé divalent **24** a montré une diminution de l'adhésion des conidies de 37% à une concentration forte de 100 μM. Le fucoside **26** qui avait une forte affinité pour AFL lors des tests ITC a un pouvoir antiadhésif supérieur avec une réponse (76% d'adhésion résiduelle) à 10 μM. Les résultats obtenus avec le composé **28** sont à prendre avec précaution, puisqu'on observe un effet dose inversé aux deux concentrations testées.

Le dextrane **31** a un potentiel antiadhésif significatif et l'on observe une inhibition à la plus faible concentration testée et une réduction de l'adhésion des spores de 44 % à une concentration de 10 μM. Il est à noter que lors de la lecture au microscope du nombre de conidies résiduelles, nous avons eu la surprise d'observer une formation d'agglomérats de spores, ce qui témoigne du potentiel agrégatif de cette classe de ligands.

Les ligands ayant montrés le plus haut potentiel d'inhibition de l'adhésion de spores aspergillaires sont les fucosides hexavalents **29** et **30** avec des inhibitions d'environ 50 % des conidies à des concentrations en mannose de 10 μM. Le composé **29** possédant le bras espaceur le plus court a une activité similaire au fucoside **30** alors qu'il était légèrement moins performant dans les tests ITC ($K_d = 0,60 \mu\text{M}$ pour **29** contre $K_d = 0,18 \mu\text{M}$ pour **30**).

Comme exposé précédemment, nous avons exprimé les résultats des tests en fonction des concentrations effectives en fucose. Pour une concentration de 10 μM en fucose, la

concentration molaire en ligand **29** ou **30** est donc de 1,7 μM , (six fucoses par molécules). Les ligands **29** et **30** ont donc une IC_{50} de 1,7 μM .

IV. Conclusion

Les premiers résultats suggèrent que la valence des ligands a une grande importance sur l'affinité pour AFL. En effet, le meilleur composé divalent identifié (**26**) qui présente un bon K_d de 151 μM pour AFL, possède une IC_{50} supérieure à 50 μM dans les tests cellulaires. Par contre, les fucosides hexavalents **29** et **30** qui ont une IC_{50} inférieure à 2 μM dans ce test cellulaire, laissent présager un développement potentiel prometteur dans l'inhibition de l'adhésion des spores d'*Aspergillus fumigatus*. Ces composés sont actuellement en cours de protection sous forme de brevet.

L'équipe du Dr Anne Imberty effectue actuellement une étude de docking dans le site d'AFL de manière à identifier des ligands plus affins que le fucose en vue de les insérer sur des charpentes multivalentes.

Enfin, des essais de co-cristallisation du composé **30** avec AFL sont actuellement en cours. L'obtention d'une structure cristallographique permettrait de valider ou non l'interaction chélate des fucosides dans les sites de liaison d'AFL.

Inhibiteurs de DC-SIGN et de l'adhésion du CMV

I. Le cytomégalovirus, un pathogène opportuniste

1) Découverte/partie historique

En 1881, le pathologiste Hugo Ribbert observe de larges cellules dans des sections rénales et de glandes salivaires d'enfants mort-nés qu'il ne peut expliquer.¹⁰³ En 1904 lorsque Jesionek et Kiolemenoglou décrivent des observations de cellules similaires dans le poumon, le rein et le foie de fœtus (Figure 38) ils donnent à ces symptômes le nom de « maladie des inclusions cytomégaliqes » (du grec *cyto* : cellule ; *mégas* : grand).¹⁰⁴

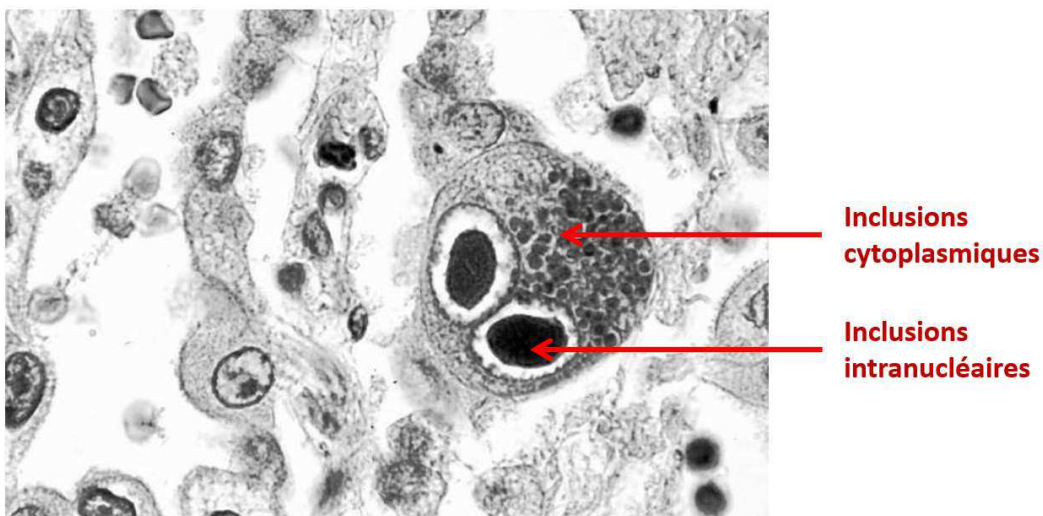


Figure 38 : Cliché microscopique d'inclusion cytoplasmique et intranucléaire de cytomégalovirus (Dan Wiedbrauk, Warde Medical Laboratory, Ann Arbor, MI.)¹⁰⁵

En 1932, dans une étude de Farber *et al.* ces inclusions cytomégaliqes sont retrouvées dans les glandes salivaires chez 12 % d'enfants mort-nés ne présentant a priori pas de point commun dans leur pathologie.¹⁰⁶ Le virus est finalement isolé dans les années 50 par différentes équipes, parmi lesquelles celle de Weller, qui lui donne le nom de cytomégalovirus (CMV) en 1960.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

2) Epidémiologie

Le CMV appartient à la famille des *Herpesviridae* parmi lesquels seulement huit types infectent l'homme, le plus connu étant certainement le virus de la varicelle : varicelle zona virus (VZV). Le CMV est un virus ubiquitaire spécifique d'espèce, ce qui signifie que chaque espèce est son propre réservoir. La séroprévalence de ce virus varie en fonction des zones géographiques avec un lien important avec le développement socio-économique et sanitaire.

Elle est importante dans les zones en voie de développement, jusqu'à 100% dans certaines régions d'Afrique et d'Asie contre 40 à 80% dans les régions industrialisées.¹¹⁰ En France, une étude de 2013 a montré une prévalence de 41,9 % chez les 15-49 ans avec un sex-ratio en défaveur des femmes (45,6 % contre 39,3 % chez les hommes).¹¹¹ Celle-ci augmente également avec l'âge des individus.

Chez les sujets infectés, le virus est présent dans toutes les sécrétions corporelles : salive, sang, lait maternel, sperme, urine. C'est un virus enveloppé qui possède une demi-vie estimée à environ 24 heures en milieu extérieur. Il peut facilement être dégradé par la chaleur (<56°C), détruit par les solvants et ne résiste pas aux conditions acides.¹¹² Pour ces raisons, le CMV est transmis par contact *via* les fluides biologiques et par voie trans-placentaire.

Chez le sujet immunocompétent, l'infection à CMV est le plus souvent asymptomatique. Elle peut parfois se traduire par un syndrome pseudo-grippal, une lymphocytose atypique, une pharyngite ou encore des anomalies de la fonction hépatique. Dans de rares cas, des complications peuvent conduire à une pneumopathie, une myocardite, une méningite aseptique.¹¹³

3) Risques infectieux congénitaux et de l'immunodéprimé

Le risque le plus important d'infection à CMV concerne essentiellement les individus ne possédant pas un système immunitaire efficace comme les personnes immunodéprimés, ou les fœtus et nouveau-nés qui présentent un système immunitaire immature.

i. Infections congénitales

Le fœtus ou le nouveau-né peuvent être infectés *via* plusieurs voies incluant le placenta durant la grossesse (CMV congénital), le lait maternel, les sécrétions cervicales et la salive. Le risque d'infection chez le nouveau-né s'élève à 40% si c'est une primo-infection pour la mère contre 0,5 à 2% dans le cas d'une réactivation ou réinfection.^{113,114} En effet, le système immunitaire lors d'une primo-infection n'a pas rencontré précédemment le virus et la réponse immunitaire met du temps à se mettre en place, ce qui augmente le risque d'infection congénital. Ce risque est d'autant plus grand si le fœtus est à un stade plus précoce de maturité mais il est possible de le réduire avec des conditions d'hygiène simples telles qu'un lavage fréquent des mains et en limitant des contacts rapprochés avec de jeunes enfants.¹¹⁵

Parmi ces infections congénitales, seulement 5 à 15 % vont être symptomatiques et se traduiront par des séquelles telles qu'une perte auditive, un retard du développement psychomoteur ou une atrophie optique.¹¹⁶ Parmi la totalité des cas symptomatiques d'infections congénitales, 5 à 10 % se solderont par la mort du nourrisson due à une coagulation intravasculaire disséminée, une insuffisance hépatique ou une surinfection bactérienne.

ii. Infections de l'immunodéprimé

Le cytomégalovirus est un pathogène qui peut passer à un état latent lorsque l'individu est immunocompétent. Il se met alors hors de portée des défenses immunitaires ce qui explique l'importance de la séroprévalence du CMV. Lorsqu'un patient devient immunodéprimé, le virus peut sortir de sa dormance et l'infection prend alors une ampleur dont la gravité est proportionnelle à la hauteur du déficit immunitaire.

Chez les individus atteints du SIDA l'infection reste asymptomatique tant que les défenses immunitaires du patient sont suffisantes. Cependant, dès que l'individu devient immunodéprimé, le CMV se réactive et cela se traduit le plus souvent par une infection rétinienne (rétinite) pouvant entraîner une cécité.¹¹⁷ Avant le recours depuis les années 1990 au traitement antirétroviral hautement actif (HAART), les cas de rétinites atteignaient 25% des patients séropositifs au VIH. De façon plus problématique, l'infection au CMV est une cause indirecte du développement plus rapide du SIDA et d'une morbidité accrue des patients séropositifs.

L'infection à CMV est aussi une des principales infections opportunistes chez les patients greffés (organes ou moelle osseuse). Elle représente 60 à 100% des infections chez les transplantés rénaux. La probabilité de développer une infection opportuniste à CMV est dépendante du type d'organe transplanté, du traitement utilisé lors de la greffe et évidemment de la présence du CMV dans le greffon.^{118,119} L'utilisation d'un traitement immunosuppresseur pour le greffé a un effet activateur sur le CMV s'il est à l'état latent. C'est problématique puisque la réduction des immunosuppresseurs pour réduire l'infection pourrait entraîner le rejet de la greffe.

4) Structure du CMV

Le CMV fait partie des virus les plus imposants avec un diamètre de 200 nm. La capsid virale icosaédrique contenant l'ADN est entouré par le tégment, une matrice protéique contenant au moins 39 protéines. Celles-ci ont des rôles variables liés à l'entrée du virus dans la cellule hôte, l'expression des gènes à la surface virale, l'évasion immunitaire, l'assemblage virale ou la sortie cellulaire. Le tégment représente environ 40% de la masse du virion. Il est protégé par une bicouche lipidique protectrice, issue des membranes cytoplasmiques et nucléaires des cellules infectées. A la surface de cette enveloppe, le virus exprime différentes glycoprotéines parmi lesquelles la glycoprotéine B (gB) qui est particulièrement impliquée dans le phénomène d'adhésion sur la cellule hôte (Figure 39)

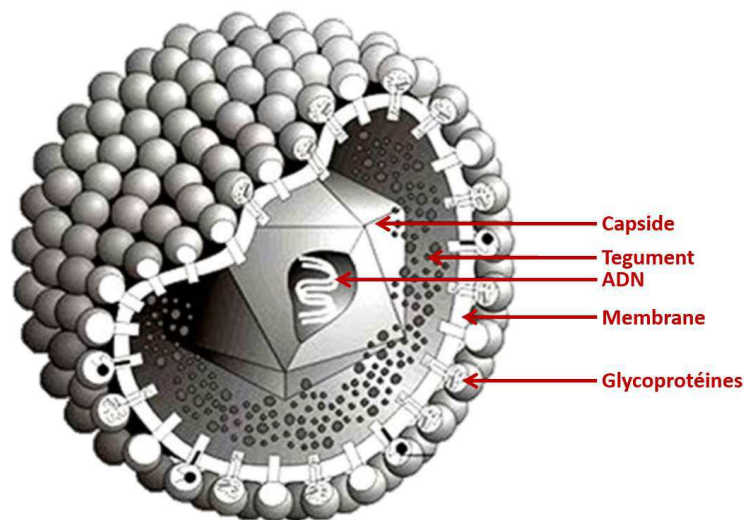


Figure 39 : Structure du cytomégalovirus

Les différentes glycoprotéines constituent aussi des antigènes qui sont reconnus par le système immunitaire de l'hôte, lui permettant de lutter contre les infections à CMV.

5) Rôle des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire adaptative

Il y a différentes cellules du système immunitaire qui sont impliquées dans la prise en charge du CMV. Dans cette thèse, nous nous intéresserons uniquement aux cellules dendritiques (DCs).

Les DCs font partie des cellules présentatrices d'antigènes. Elles sont impliquées dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative selon le processus suivant : lors d'une infection par un pathogène, les DCs sont chargées de sa détection grâce à des récepteurs

nommés PRR (pattern recognition receptor : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires). Parmi ces récepteurs on retrouve notamment les lectines de type C (CLR : C-type lectin receptor) qui permettent aux DCs d'intercepter le pathogène et de capturer l'antigène détecté. Plusieurs mécanismes de capture peuvent être mis en œuvre pour conduire à l'internalisation de l'antigène mais cela ne sera pas détaillé ici.

Certaines DCs vont ensuite se diriger vers les organes lymphoïdes contenant les lymphocytes T (LT). Les DCs possèdent à leur surface des récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui sont reconnus par les récepteurs des Lymphocytes T (TCR). Lorsque les récepteurs du CMH présentent un antigène, les récepteurs TCR vont le capter pour l'intégrer aux LTs. Cela constitue un transfert d'information des DCs aux LTs qui vont alors diriger une réponse immunitaire adaptative spécifiquement contre les pathogènes présentant l'antigène capturé (Figure 40).¹²⁰⁻¹²²

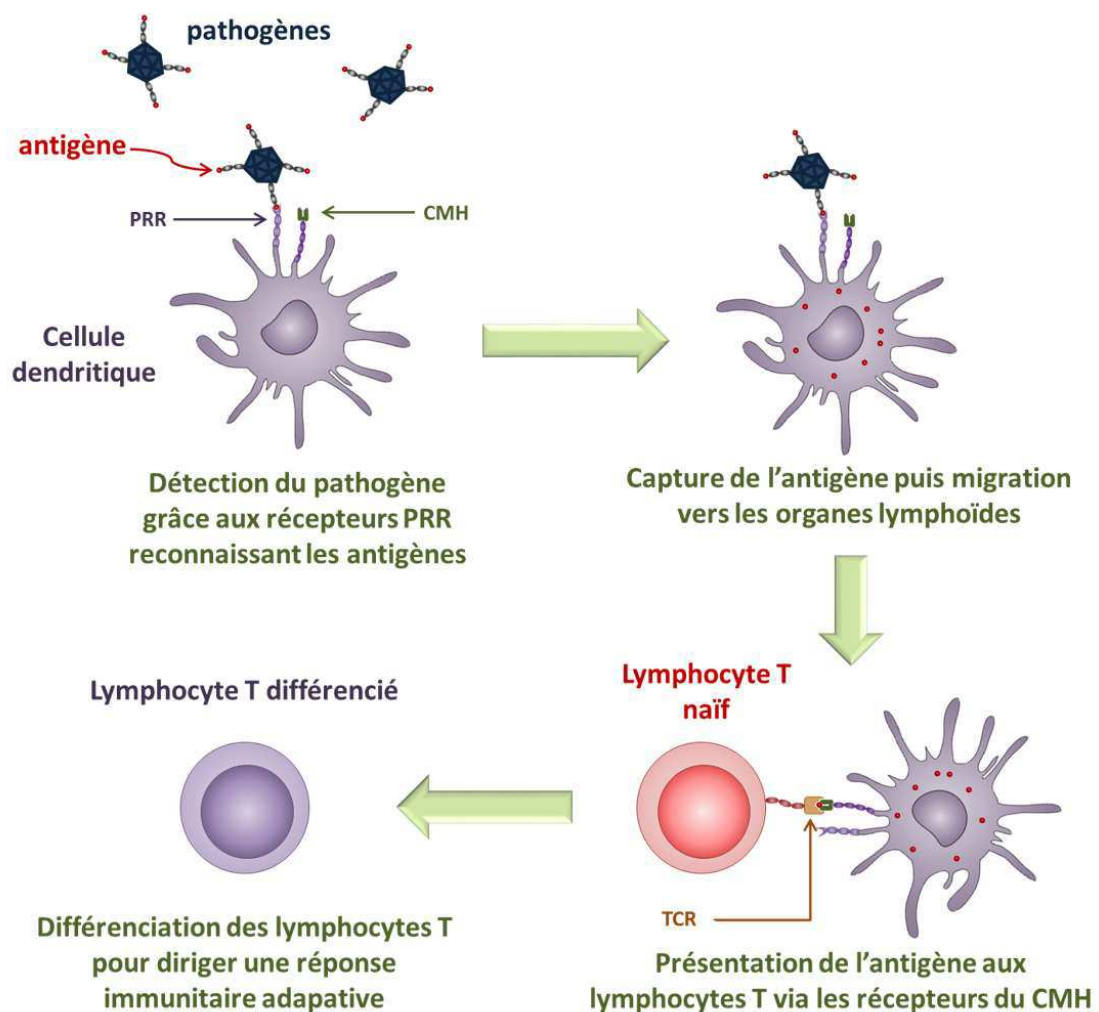


Figure 40 : Schéma général du rôle des cellules dendritiques dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative grâce à la capture d'antigènes puis sa présentation aux lymphocytes T.

6) Echappement viral

La plupart des virus de la famille *Herpesviridae* ont développé des mécanismes qui leur permettent d'échapper aux acteurs de la réponse immunitaire. Selon une étude de Mocarski *et al.* plus de 20% des gènes du CMV seraient dédiés à lui assurer une persistance à long terme dans l'organisme.¹²³ Le CMV aurait la possibilité de coloniser les DCs et d'y persister pour les utiliser comme transporteurs vers des organes plus lointains afin de coloniser des cellules plus permissives. Les DCs seraient ainsi utilisées comme un « cheval de Troie » par le CMV.¹²⁴ Cependant cet emploi des DCs n'est possible que grâce à l'échappement immunitaire que le CMV a mis en place.

Les protéines nommées immuno-évasines sont un des éléments clés du mécanisme permettant au virus d'échapper à la réponse immunitaire. Ces protéines interviennent dans un phénomène de séquestration, clivage et inhibition du transport des protéines du CMH. Ces protéines sont retenues à l'intérieur des DCs et vont subir une dégradation. Selon le schéma précédent, s'il y a une inhibition dans le CMH, cela empêche la présentation des antigènes viraux et bloque la réponse des LTs.¹²⁵ Le rôle des immuno-évasines est également de bloquer l'activation des lymphocytes NK, agents de la réponse immunitaire innée, par l'inactivation de leurs récepteurs CD94/NKG2D avec des peptides viraux (UL40 et UL16).^{126,127} Le CMV possède aussi une protéine homologue à l'interleukine 10 (cmvIL-10) qui possède les mêmes caractéristiques que l'IL-10 cellulaire dont le rôle est de moduler la réponse immunitaire. L'expression de la cmvIL-10 va réduire l'inflammation et l'apoptose des DCs pour faciliter la dissémination du virus.

Enfin la faculté du CMV à entrer dans un état de latence est aussi un des phénomènes qui le met hors de portée du système immunitaire. Le virus a la possibilité d'infecter les cellules CD34+ présentes dans la moelle osseuse. Dans ces cellules le virus va alors réduire l'expression de ses gènes viraux et limiter son activité pour entrer en latence.

7) Traitements actuels

Le Ganciclovir ou sa prodrogue, le Valganciclovir, sont généralement utilisés en cas d'infection ou de réactivation du CMV chez les patients immunodéficients. Approuvé en 1988 comme traitement, le Ganciclovir, qui est un analogue de la guanosine, est incorporé à l'ADN viral lors de sa réplication et permet de bloquer sa synthèse (Figure 41). Seules les cellules

infectées sont ciblées puisqu'elles expriment la kinase virale UL97 qui peut phosphoryler le Ganciclovir, étape nécessaire avant qu'il soit incorporé à l'ADN du virus.¹²⁸ Le Foscarnet commercialisé depuis 1991 et le Cidofovir depuis 1997 ont été les derniers traitements anti-CMV développés.

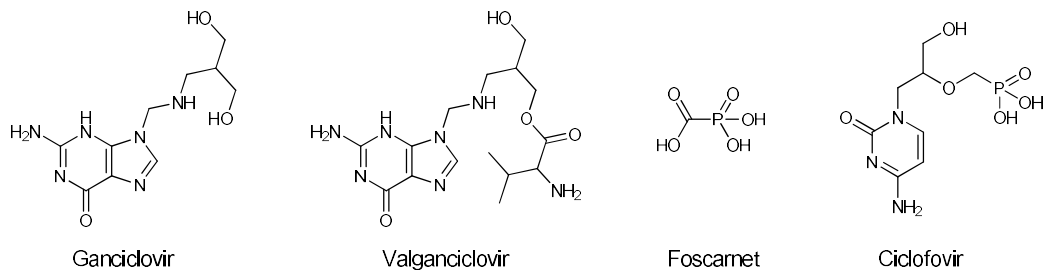


Figure 41 : Ganciclovir et Valganciclovir, bloqueurs de la synthèse de l'ADN viral utilisés comme traitement contre le CMV.

Ces quatre composés constituent un arsenal assez limité pour le traitement de l'infection à CMV. Ils présentent aussi des effets de toxicité indésirables, limitant leur utilisation chez les transplantés rénaux pour leur caractère néphrotoxique important (augmentation de la perméabilité rénale). Leur emploi chez la femme enceinte est proscrit, ce qui prévient toute utilisation lors d'infections congénitales.

Malgré le potentiel antiviral de ces médicaments, certaines souches de CMV ont développé une résistance voire une multirésistance qui commence à préoccuper les cliniciens par l'absence d'alternative thérapeutique satisfaisante.¹²⁹ De plus, aucun traitement n'est capable d'éliminer le CMV lorsqu'il est à l'état latent et à l'abri dans les cellules CD34+.

L'impossibilité d'utiliser ces traitements chez certains transplantés et chez la femme enceinte, ainsi que l'émergence de résistances, font du CMV un candidat potentiel pour une stratégie antiadhésive.

II. DC-SIGN

Le cytomégalo virus peut infecter un grand nombre de types cellulaires grâce à ses glycoprotéines d'enveloppe : cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes, monocytes, macrophages, cellules nerveuses, cellules musculaires lisses, hépatocytes et cellules dendritiques. Nous nous sommes principalement intéressés à l'infection des DCs puisqu'elles seraient particulièrement impliquées dans la dissémination du virus dans l'hôte et dans la contamination d'autres cellules, phénomène connu sous le nom de *trans*-infection.

En 2002, Halary *et al.* ont mis en évidence que l'adhésion du CMV aux DCs était promu par l'adhésion de la glycoprotéine B sur la lectine DC-SIGN, exprimée à la surface de certaines sous-populations de DCs et de macrophages tissulaires jouant un rôle important dans l'immunité.¹³⁰

1) Rôles de DC-SIGN dans l'immunité et la mobilité des DCs

DC-SIGN est principalement exprimé par les DCs myéloïdes (ou conventionnelles) présentes dans la *lamina propria* des muqueuses du rectum et de l'utérus, dans le derme de la peau ou encore dans les tissus lymphoïdes ou la moelle osseuse.¹³¹ DC-SIGN est une lectine de type-C présente à la surface cellulaire qui permet la reconnaissance de motifs mannosylés. Le terme « type-C » sous-entend que le domaine de reconnaissance des sucres (CRD : carbohydrate recognition domain) possède un ion Ca^{2+} . Les lectines de type-C sont aussi présentes sur les cellules de Langerhans qui, tout comme les DCs de la *lamina propria*, sont des acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. Le spectre de reconnaissance de DC-SIGN, même s'il est assez dirigé vers les motifs mannosylés, reste relativement large, ce qui lui permet de capturer divers pathogènes présentant des antigènes glycosylés.

Le deuxième rôle de DC-SIGN est d'adhérer à différentes surfaces cellulaires, comme celles des cellules endothéliales, ce qui participe ainsi à la mobilité des DCs au sein de l'organisme. La lectine peut notamment se lier aux récepteurs ICAM-2 de ces cellules pour promouvoir cette migration *trans*-endothéliale.¹³²

DC-SIGN intervient également dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T naïfs qui possèdent à leur surface le récepteur ICAM-3 qui pourrait interagir avec DC-SIGN en parallèle de la présentation de l'antigène au sein du complexe CMH/TCR (Figure 42).¹³³ Ce genre d'interactions secondaires semblerait avoir un rôle dans la réponse immunitaire mais demeure aujourd'hui encore mal compris.

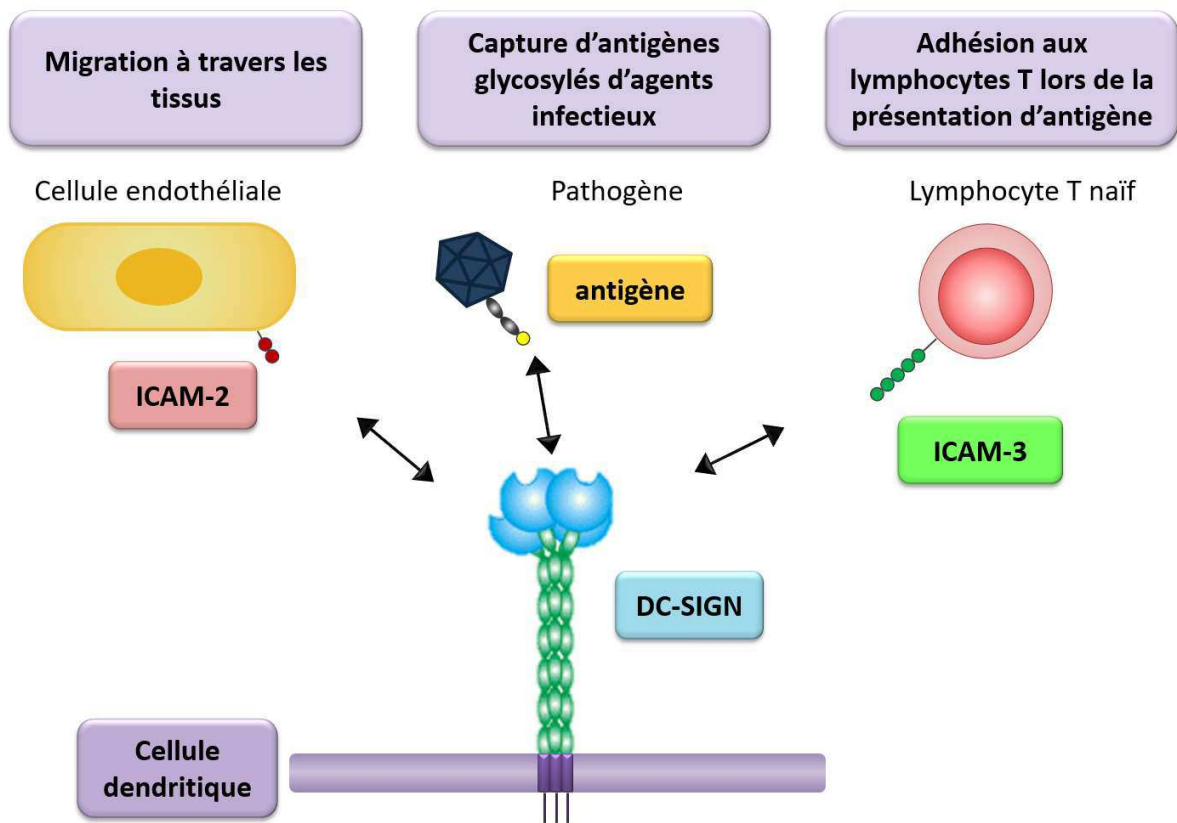


Figure 42 : Intervention de DC-SIGN dans l'adhésion aux protéines glycosylées au cours de : la migration des DCs via l'interaction avec le récepteur ICAM-2 des cellules endothéliales ; la capture d'antigènes glycosylés d'agents infectieux ; l'adhésion aux lymphocytes T promus par leur récepteur ICAM-3 lors de la présentation d'antigènes.

2) Voie d'entrée virale

Alors que DC-SIGN a une importance immunologique capitale, certains pathogènes ont détourné son caractère adhésif aux glycoprotéines pour infecter les DCs. C'est le cas du VIH dont la capacité à infecter le système immunitaire est aujourd'hui assez bien connue et dont le processus d'infection pourrait être assez similaire à celui du CMV.

i. Utilisation de DC-SIGN lors de l'infection par le VIH

Le VIH présente une glycoprotéine d'enveloppe nommée gp120 qui possède une grande affinité pour DC-SIGN ainsi que pour les récepteurs CD4 présents à la surface des DCs et des lymphocytes T CD4+. Deux mécanismes ont été proposés concernant son entrée dans le système immunitaire :

Une première proposition de Geijtenbeek *et al.* serait une adhésion de la gp120 du VIH sur DC-SIGN suivie d'une internalisation du complexe gp120/DC-SIGN dans un endosome

précoce. Le VIH resterait fixé sur le récepteur à l'intérieur de l'endosome se protégeant ainsi de la dégradation par protéolyse cellulaire des DCs. Le VIH ainsi protégé profiterait de la migration des DCs vers les organes lymphoïdes contenant les lymphocytes T CD4+ pour leur être transmis par *trans*-infection (Figure 43).^{134,135}

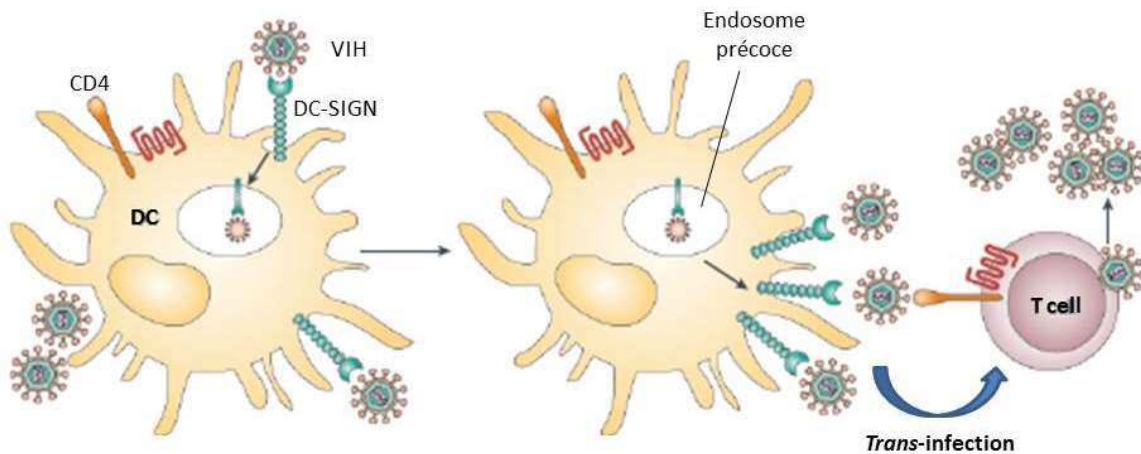


Figure 43 : Mécanisme d'infection des DCs par le VIH issue d'une première interaction gp120/DC-SIGN, suivie d'une internalisation dans un endosome précoce. Après migration des DCs vers les organes lymphoïdes, il y a *trans*-infection du VIH vers les lymphocytes T (Van Kooyk).¹³⁴

Selon d'autres études, le VIH contaminerait préalablement les cellules dendritiques *via* DC-SIGN et les récepteurs CD4+ pour s'y répliquer, sans rester dans un endosome. Cela conduirait à une production importante de virus qui seraient libérés dans les organes lymphoïdes sans avoir recours à DC-SIGN.¹³⁶ Ce mécanisme dit de *cis*-infection n'est pas issu d'un transfert du virus entre récepteurs comme celui de *trans*-infection. Lors de cette *cis*-infection, DC-SIGN n'intervient pas directement dans le mécanisme d'infection des lymphocytes T CD4+. Cependant, il n'assure pas son rôle pour la dégradation et la présentation de l'antigène aux LTs. DC-SIGN semblerait même intervenir dans un phénomène de protection du virus contre la dégradation cellulaire.

ii. Parallèle avec le CMV

Les informations concernant l'infection du CMV et l'interaction avec DC-SIGN sont beaucoup moins nombreuses que celles concernant le VIH. Cependant, les études tendent à montrer que le CMV se comporte de manière similaire au VIH en utilisant les DCs à leur avantage.¹³⁰

En 2012, Haspot *et al.* ont montré que les CMV, après avoir été internalisés dans les DCs au sein d'endosomes, peuvent y demeurer pendant plusieurs heures sans subir de dégradation (Figure 44).

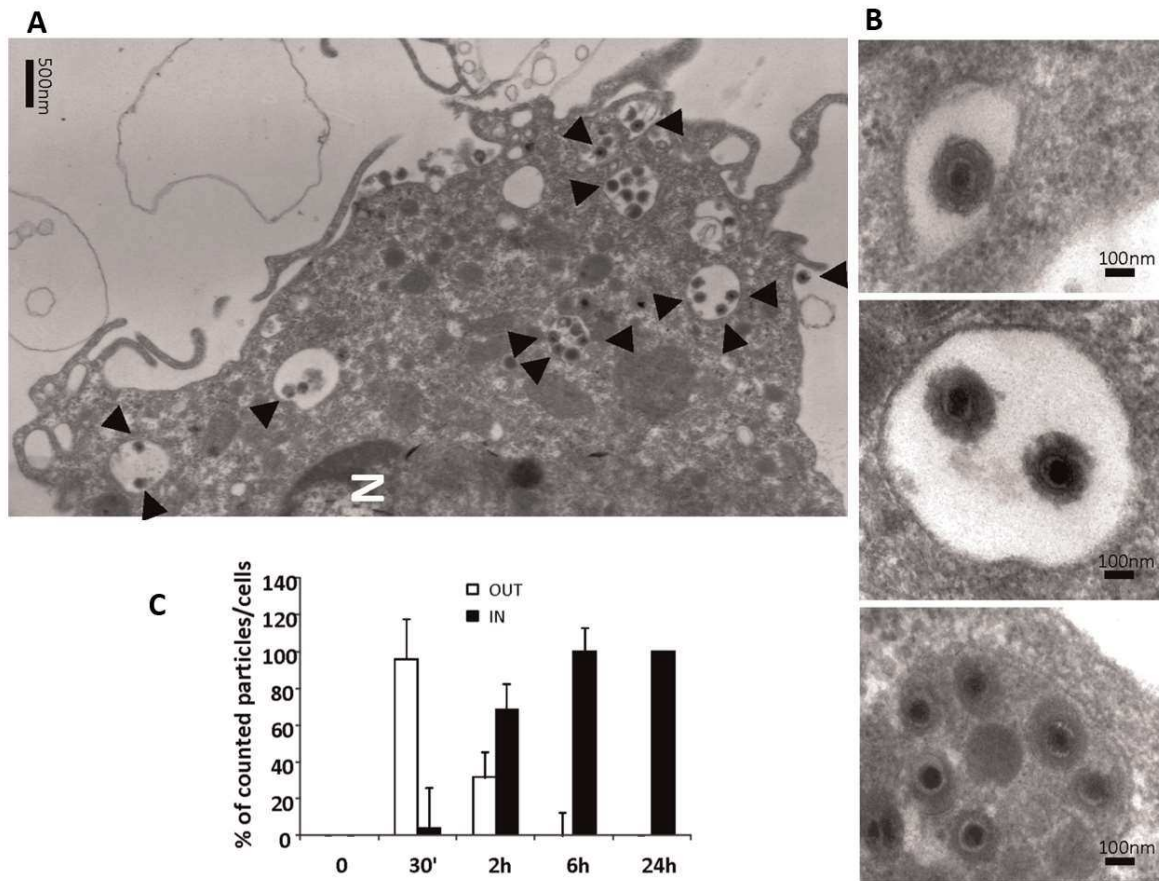


Figure 44 : Image de microscopie électronique à transmission de l'incubation de DCs en présence de CMV après 2h. A) Vue générale de la DC infectée présentant sur sa membrane ainsi que dans les endosomes des particules virales (indiquées par les flèches noires) ; B) Agrandissement des endosomes infectés ; C) Temps d'infection et de rétention du virus sans phénomène de dégradation à l'intérieur des DCs (Haspot *et al.*)¹³⁷

Durant ma thèse et en parallèle des travaux collaboratifs pour le développement d'inhibiteurs de DC-SIGN, le Dr Coraline Chéneau a étudié l'interaction DC-SIGN/gB qui a montré un profil très similaire à celle entre DC-SIGN et gp120 (Figure 45).¹³⁸

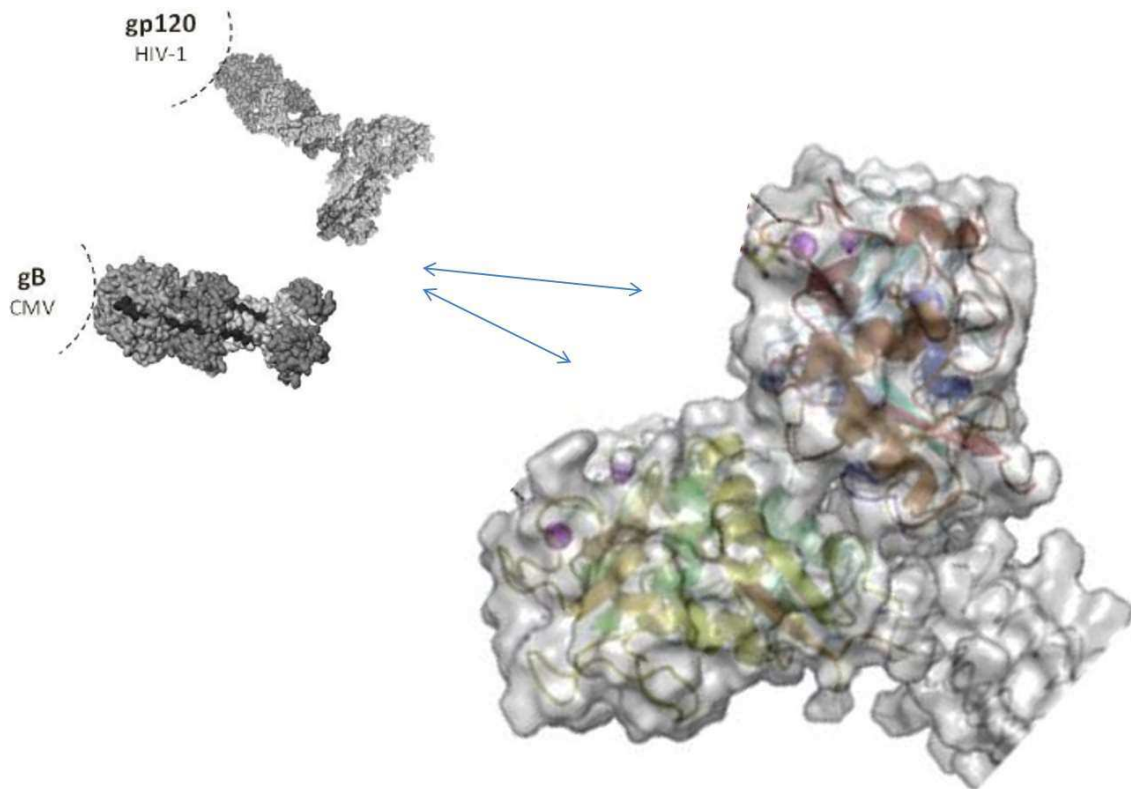


Figure 45 : Profils d'interaction de DC-SIGN avec la gp120 et la gB présentant d'importantes similarités.¹¹²

DC-SIGN a montré qu'il était une voie d'entrée pour l'infection virale que ce soit pour le VIH et pour le CMV. Plusieurs équipes ont mené une investigation importante dans le développement d'inhibiteurs permettant de bloquer l'adhésion du VIH sur DC-SIGN. Cependant aucun inhibiteur d'adhésion du CMV sur DC-SIGN n'a pour le moment été rapporté dans la littérature.

3) Structure générale de DC-SIGN

Il existe deux types de lectines de type C : le type I pour celles dont la partie C-terminale se situe dans le cytoplasme et le type II pour celles dont c'est la partie N-terminale. DC-SIGN fait partie de ce deuxième type qui présente globalement les mêmes propriétés structurales : un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire. Ce dernier se compose d'une partie dédiée à la reconnaissance des sucres (CRD) présentée à l'extrémité d'un domaine « neck » d'une longueur de 230 à 235 Å qui permet d'éloigner le CRD de la membrane cellulaire jusqu'à sortir du glycocalyx.¹³⁹ L'ensemble de la lectine contient 404 acides aminés pour un poids total de 44 kDa. (Figure 46)

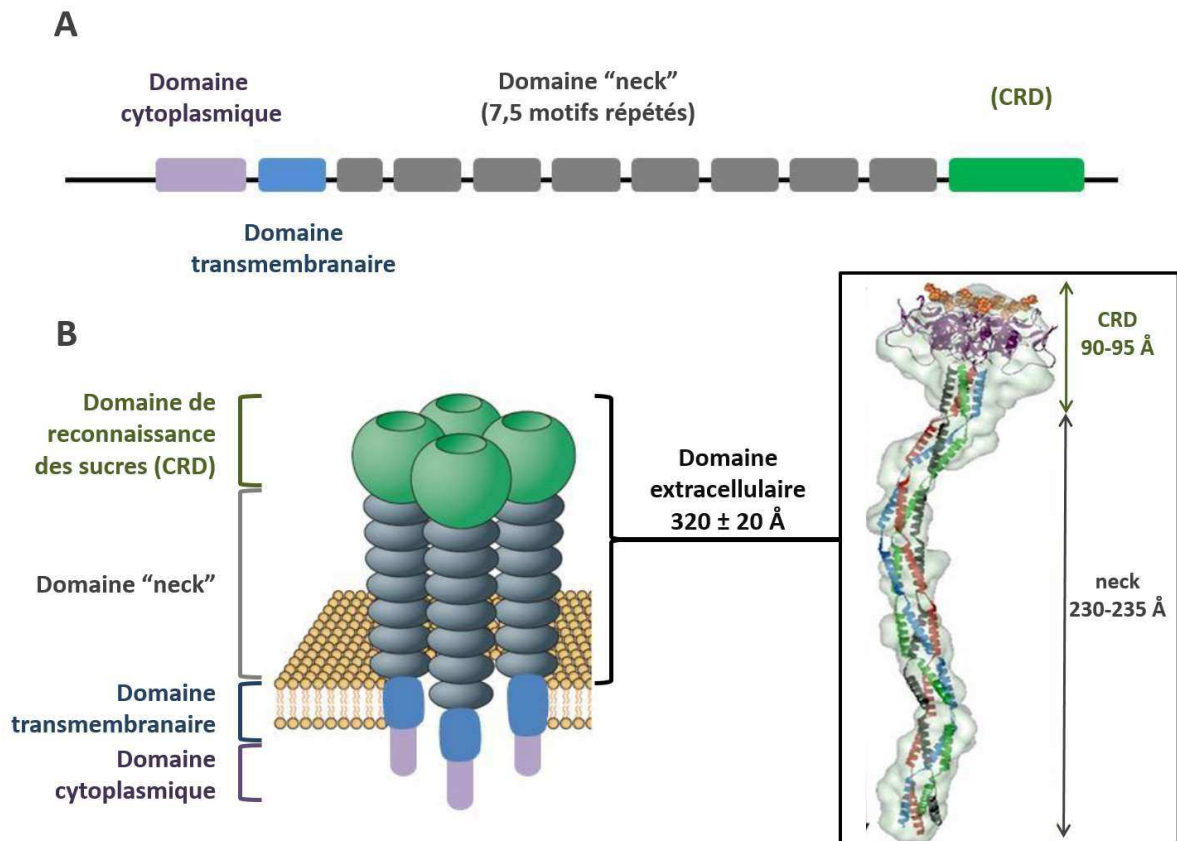


Figure 46 : (A) Représentation schématique des acides aminés et (B) de la structure 3D de DC-SIGN présentant un domaine cytoplasmique (violet), un domaine transmembranaire (bleu), une région neck disposant de 7,5 motifs répétés pour une longueur de 230 Å (gris) avec à son extrémité un domaine de reconnaissance des sucres (CRD)(vert). Les parties neck et CRD forment le domaine extracellulaire de DC-SIGN.¹⁴⁰

iii. Le domaine de reconnaissance des sucres (CRD)

Le CRD présent à l'extrémité de la lectine possède une structure relativement plane et permet la reconnaissance des sucres avec une meilleure affinité pour le mannose. Il inclut deux ions Ca^{2+} , le premier assure le maintien de la structure de la protéine et le second est impliqué dans le site de reconnaissance des sucres. Autour de cet ion, on peut retrouver les résidus acide aminés intervenant lors de la formation de la liaison ligands-récepteur : Glu 347, Asn 349, Glu 345 et Asn 365 (Figure 47).¹⁴¹

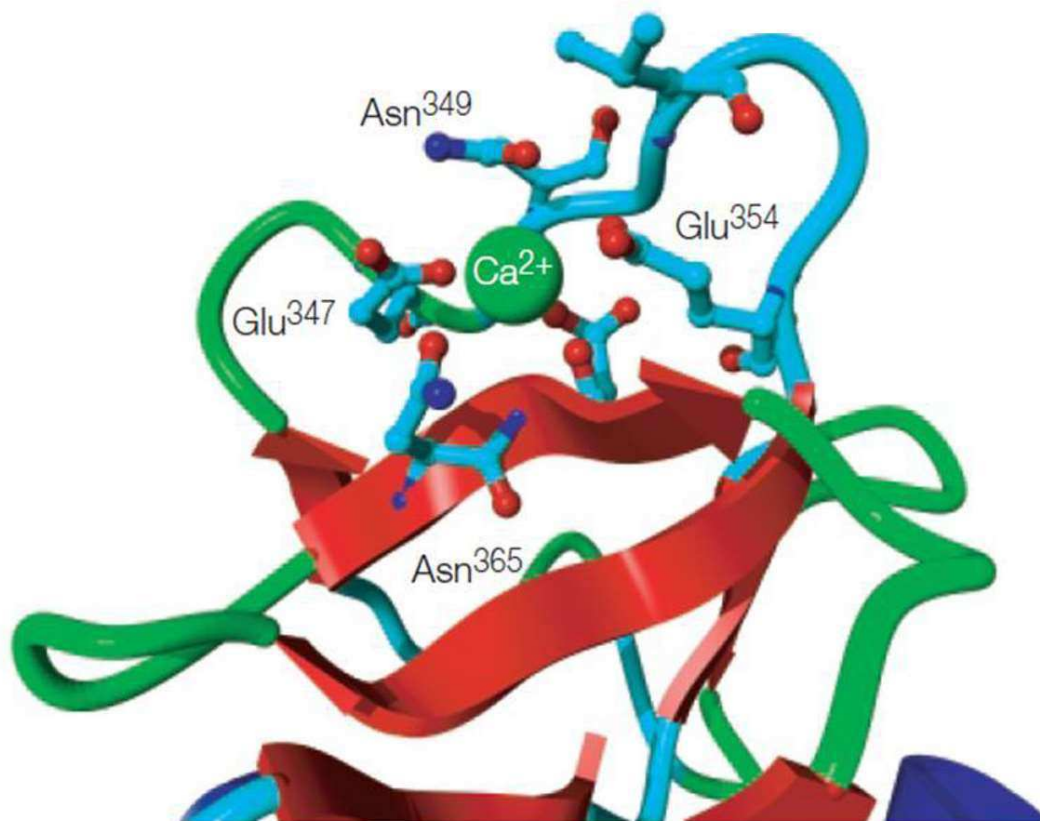


Figure 47 : Structure du CRD de DC-SIGN possédant un ion Ca^{2+} (en vert) ainsi que les résidus Glu 347, Asn 349, Glu 345 et Asn 365 impliqués dans la reconnaissance de motifs glycosidiques (Feinberg et al., 2001).

iv. Tétramérisation de la lectine

Une des particularités des lectines de type C est leur capacité à se multimériser. DC-SIGN peut se tétramériser par l'assemblage de quatre monomères qui s'organisent en super-hélice « coiled coil » au niveau du domaine neck.^{142,143} Cette stratégie illustre l'utilisation de la multivalence dans la reconnaissance cellulaire. DC-SIGN est un récepteur à large spectre possédant une affinité modérée pour divers motifs glycosidiques, la présentation dans une même direction de quatre sites de reconnaissance permet d'augmenter l'affinité du récepteur pour les sucres de façon importante.

Des études de diffusion des rayons X en solution par les équipes de Fieschi et Bernardi ont permis de déterminer la forme de l'enveloppe du tétramère de DC-SIGN. Ils ont effectué des études de modélisation sur l'organisation structurale de la protéine, notamment au niveau du CRD, mettant en évidence une distance entre deux sites de reconnaissance de 40 Å (Figure).^{143,144}

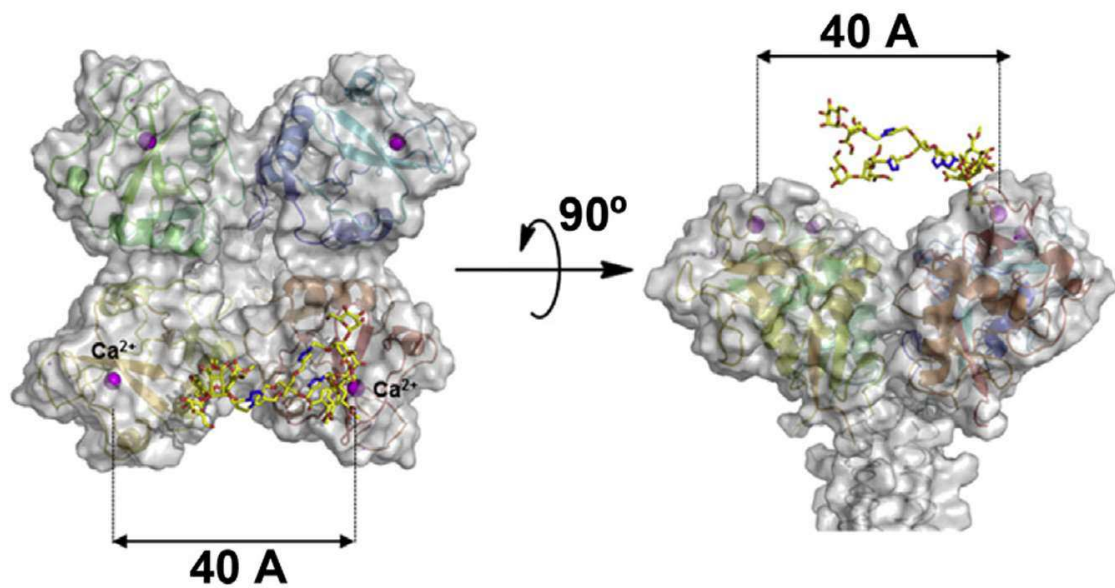


Figure 48 : Structure du CRD de DC-SIGN tétramérique décrit par Fieschi et Bernardi dans une étude de docking d'un mannoside multivalent.¹⁴⁴

Ces études structurales ont ouvert la voie pour le développement de ligands multivalents de DC-SIGN possédant une structure adaptée pour l'interaction simultanée avec plusieurs sites de reconnaissance.

4) Stratégie antiadhésive appliquée à DC-SIGN

DC-SIGN étant une importante voie d'entrée du CMV, la bloquer avec des ligands très affins permettrait de stopper la diffusion du virus. Des inhibiteurs d'adhésion à DC-SIGN pourraient être utilisés de manière préventive dans le cas de greffes ou chez la femme enceinte pour éviter la dissémination du virus promue par les cellules dendritiques.

DC-SIGN présente une forte affinité pour les structures hautement mannosylées. Liempt *et al.* ont mis en évidence dans un test d'adhésion de plusieurs glycanes qu'une structure polysaccharide à neuf mannoses (Man9GlcNAc2 ou Man9 : Figure 49A) montrait une interaction pour DC-SIGN sept fois supérieure à celle du mannose (Figure 49B).¹⁴⁵ Ils ont également mis en évidence qu'une réduction du nombre de mannoses entraînait une baisse de l'affinité.

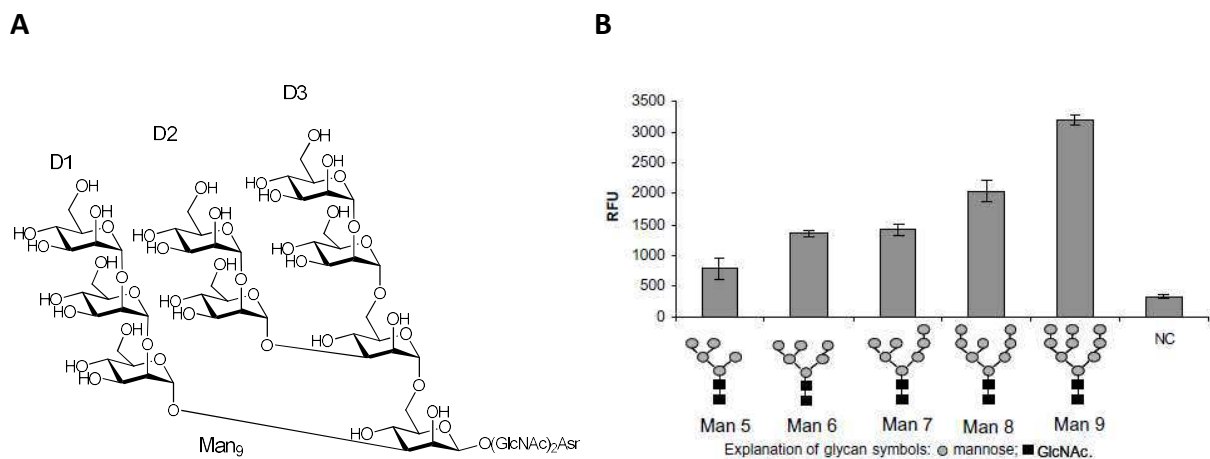
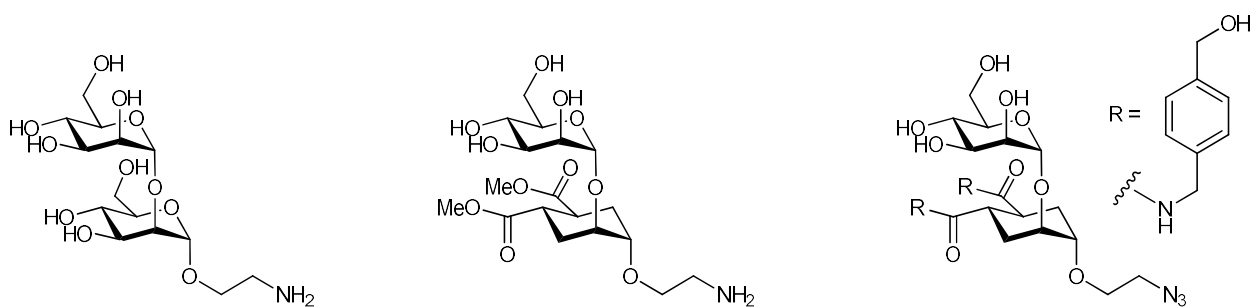


Figure 49 : Potentiel d'adhésion de structures mannosylées à la lectine DC-SIGN. A) Structure chimique de l'oligosaccharide Man₉; B) Test d'adhésion de DC-SIGN marquée par fluorescence sur différents glycanes mannosylés sur support solide. RFU : unité de fluorescence relative.

Man₉ présente trois parties distinctes: une trisaccharidique D1, une disaccharidique D2 et une tétrasaccharidique D3. Les équipes de Fieschi et Bernardi se sont basées sur la structure Man₉ pour développer des mannosides mimant les parties D1 et D2 plus abordables synthétiquement que la structure complète Man₉.^{146,147} Après différentes optimisations, ils sont parvenus à une série de pseudo-dimannosides conçus dans l'optique de ne pas être facilement métabolisés et de présenter une affinité plus forte pour DC-SIGN. Ils ont ainsi obtenu le composé **35** avec une IC₅₀ de 0,62 mM, plus de trois fois inférieur à celle du dimannoside **34** correspondant (1,91 mM) (Figure 50).¹⁴⁸



Dimannoside **34**, IC₅₀ = 1,91 mM Pseudo-dimannoside **35**, IC₅₀ = 0,62mM Pseudo-dimannoside **36**, IC₅₀ = 0,32mM

Figure 50 : Structures des dimannosides et pseudo-dimannosides 34

La substitution des fonctions esters par des fonctions amides possédant un groupement aromatique a permis d'augmenter l'affinité avec une IC₅₀ de 0,32 mM pour le composé **36**.^{146,149}

Les pseudo-disaccharides ont ensuite été insérés sur des charpentes multivalentes (valence = 4, 6, 9, 12 et 18) pour accroître leurs affinités.¹⁵⁰ Le composé hexavalent à base de dimannoside **36** a notamment montré une bonne IC₅₀ de 5,7 μM (effet β de 9) (Figure 51A).¹⁴⁴ Les auteurs recherchaient un effet chélate en interagissant avec plusieurs sites de DC-SIGN éloignés de 40 Å. Cependant, après des études de modélisation, ils ont mis en évidence que leurs charpentes multivalentes étaient trop courtes pour atteindre cet objectif (Figure 51B).

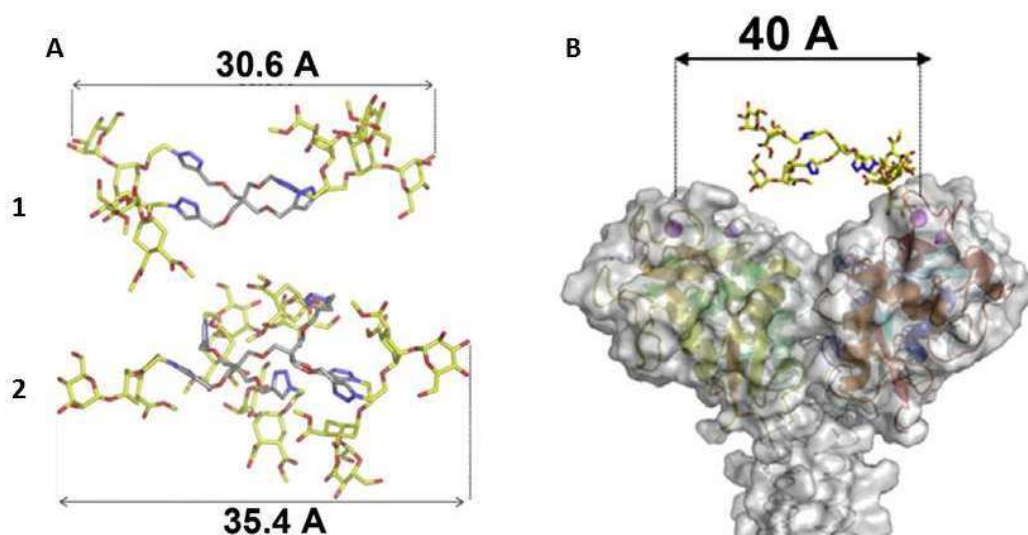


Figure 51 : Interaction des composés multivalents développés par Varga *et al.*¹⁴⁴

A) 1 : structure tridimensionnelle du composé tétravalent de pseudo-dimannoside avec une longueur maximale de 30,6 Å. 2 : structure tridimensionnelle du composé hexavalent de pseudo-dimannoside avec une longueur maximale de 35,4 Å. B) Structure de DC-SIGN dont les sites d'interaction sont distants de 40 Å en interaction avec le composé tétravalent : impossibilité d'interagir avec les deux sites simultanément.

Les auteurs ont continué leurs efforts de recherche vers une nouvelle gamme de structures plus longues pour obtenir un effet chélate.¹⁵¹ Ils ont eu recours à des charpentes polyaromatiques linéaires terminées par des espaceurs OEGs, liés à chaque extrémité à trois pseudo-dimannosides **35** ou **36**. Parmi les composés qu'ils ont obtenus, la structure la plus longue **37a**, avec six fois le ligand **36**, possède une IC₅₀ de 5 μM avec un effet β de 9 en comparaison avec le composé **36**. L'homologue **37b** présente quant à lui une IC₅₀ de 9 μM pour un effet β de 17 (Figure 52).

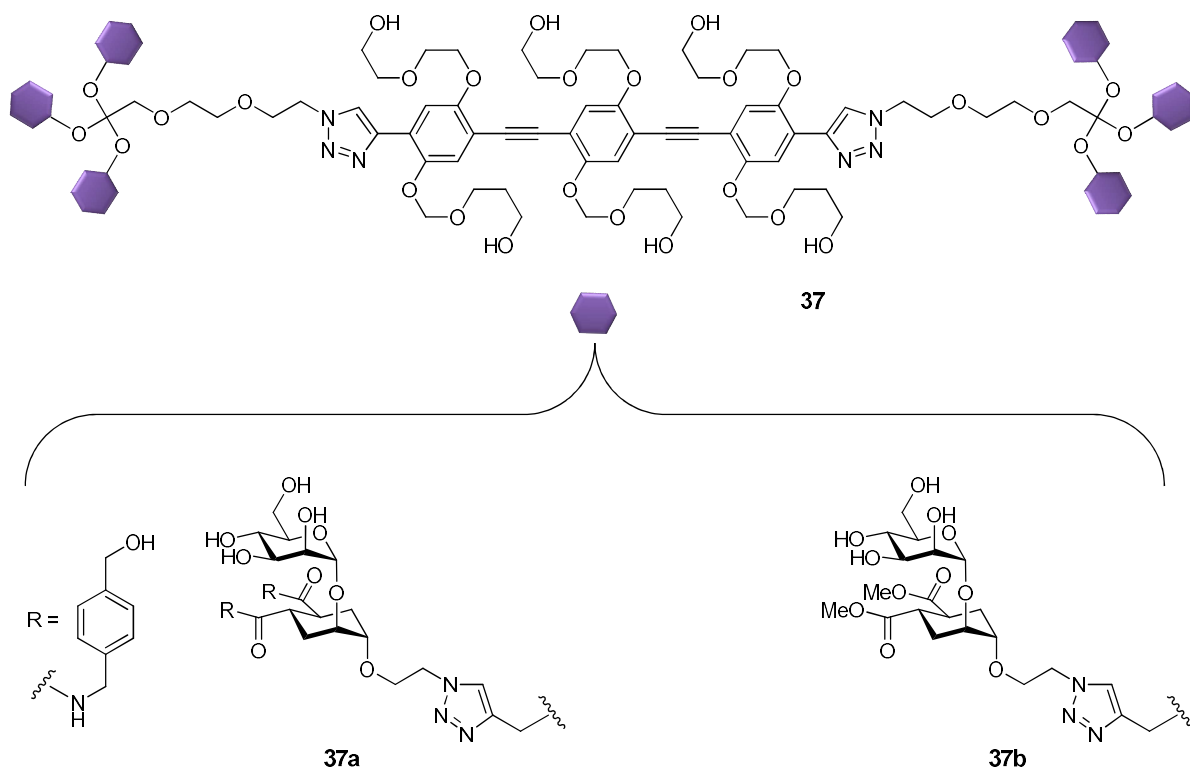


Figure 52 : Structures polyaromatiques linéaires hexavalentes développées par Ordanini *et al.* 37a (IC₅₀ de 5 μM avec un effet β de 9) et 37b (IC₅₀ de 9 μM avec un effet β de 17)

Compte tenu des résultats d'IC₅₀ qui n'étaient pas supérieurs à ceux de la première génération de composés, Ordanini *et al.* ont de nouveau effectué des études de modélisation.¹⁵¹ Le dimère **37c**, homologue aux composés **37a** et **b** et ne présentant qu'un seul ligand **35** à chaque extrémité est maintenant potentiellement capable d'interagir dans deux sites distincts de DC-SIGN (Figure 53).

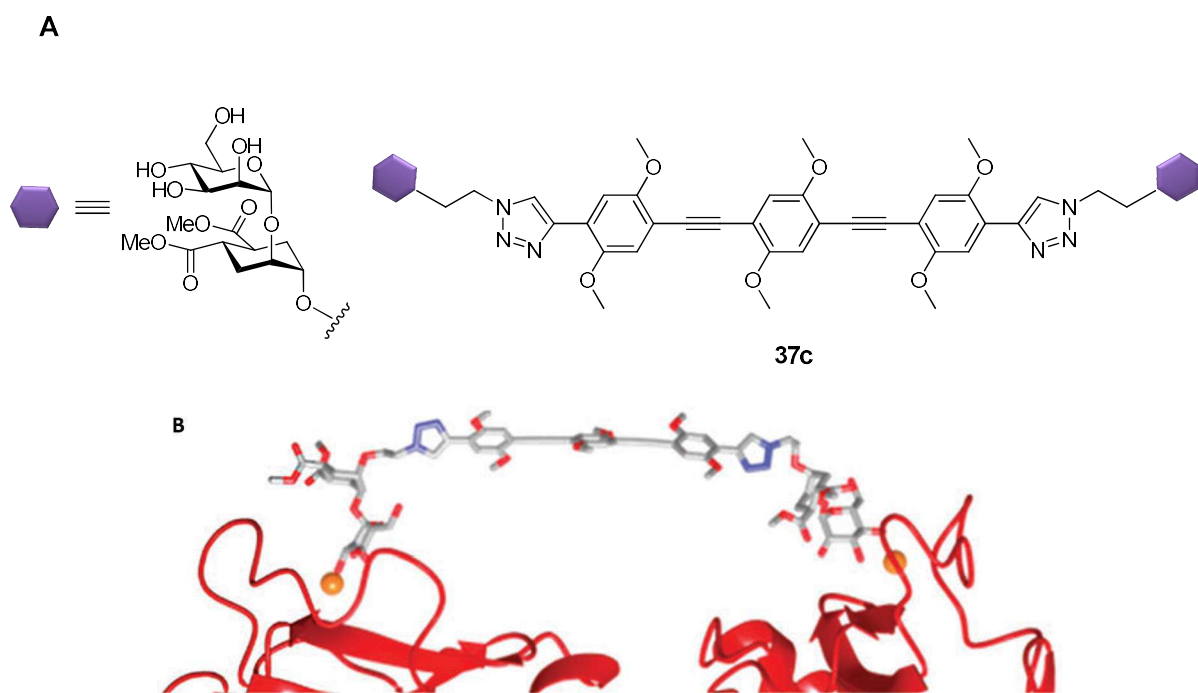


Figure 53 : Dimère 37c ; A) structure chimique de 37c, analogue « simplifié » des composés 37a et 37b ; B) Docking du dimère avec DC-SIGN témoignant de l'interaction simultanée possible avec deux sites de reconnaissance de DC-SIGN

Si le mode d'interaction chélate semble théoriquement possible avec **37c**, l'IC₅₀ obtenue, qui est similaire à la première génération de ligands à espaceurs courts, ne plaide pas en faveur de ce mode d'interaction.

5) Stratégie multivalente et structures envisagées

L'approche que nous avons envisagée au début de nos travaux sur DC-SIGN est proche de celle abordée par les équipes de Fieschi et Bernardi : obtenir des composés multivalents les plus affins possibles qui pourraient interagir *via* le mode chélate. Une collaboration avec l'équipe du Dr. Franck Halary est née de cette ambition. Son équipe travaille depuis de nombreuses années sur l'infection des DCs par le CMV. Plus récemment, ils se sont intéressés au développement de composés pour prévenir cette interaction.

Un premier objectif était de synthétiser des mannosides divalents et tétravalents avec des espaceurs OEGs de différentes tailles. Cette première approche nous permettait d'évaluer l'importance de la longueur des OEGs sur l'affinité du ligand. Nous avons également envisagé une structure ultravalente basée sur une charpente dextrane qui pourrait avoir un mode d'interaction de type agrégatif (Figure 54).

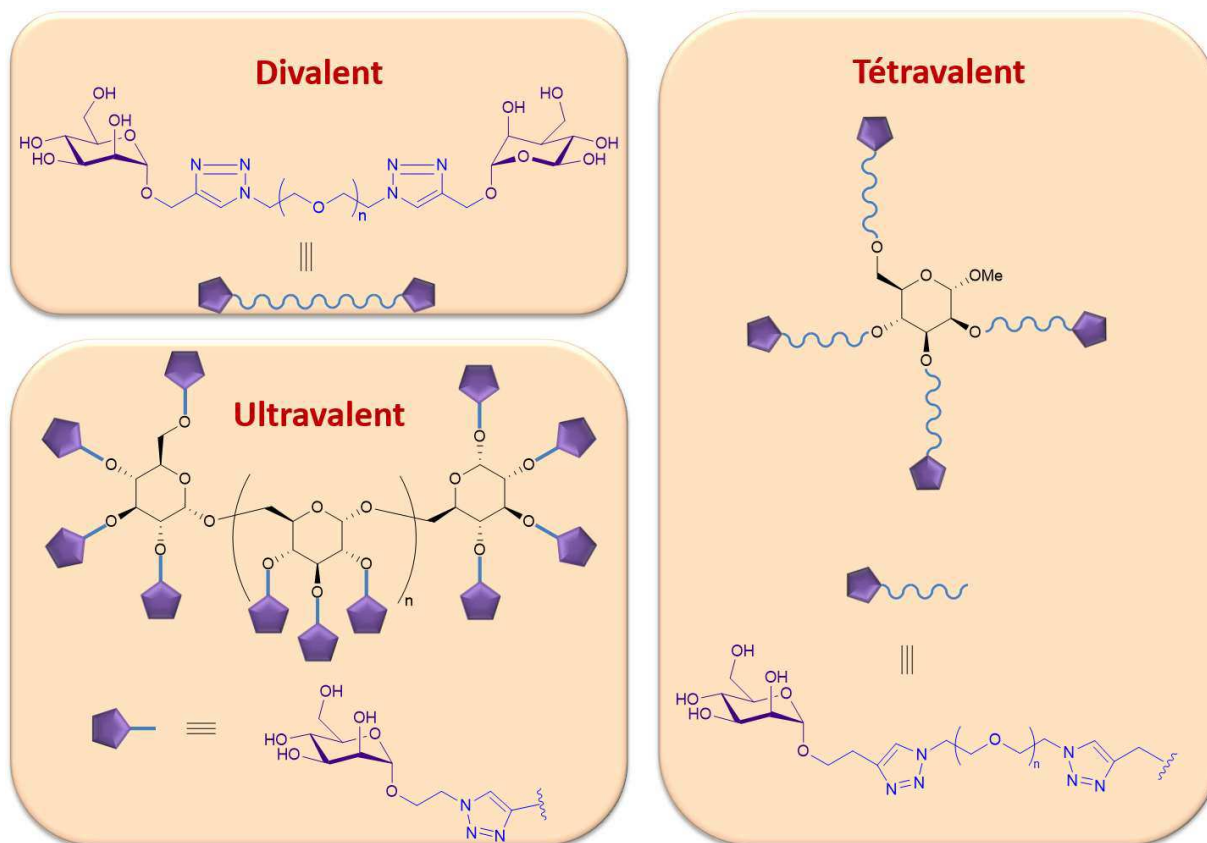


Figure 54 : Structures di-, tétra- et ultravalentes envisagées pour le développement d'inhibiteurs d'adhésion du CMV sur la lectine DC-SIGN.

Différentes structures divalentes avec des OEGs de 4, 12, 20 et 28 unités ont été synthétisées pour couvrir une large gamme de distance, de façon similaire à notre approche de synthèse de fucosides divalents pour AFL. Dans le cas des structures tétravalentes, nous avons estimé que des espaceurs permettant de couvrir une distance de 30 Å (en employant des OEGs de 25 unités environ) pourraient interagir de façon simultanée avec les quatre sites de DC-SIGN (Figure 55). Cette distance est une estimation géométrique en considérant deux bras OEG en tant que côtés d'un triangle rectangle : pour un triangle avec une base de 40 Å, la taille des deux autres côtés doit être d'environ 30 Å.

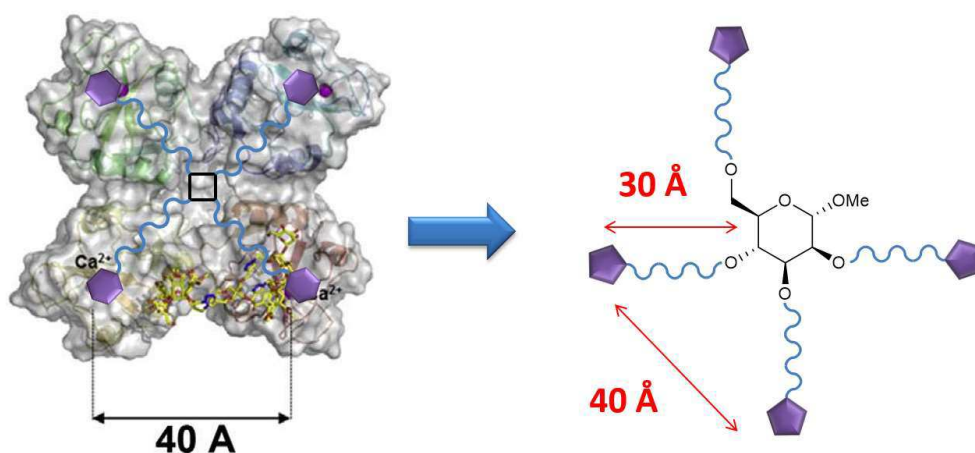


Figure 55 : Estimation des longueurs des espaceurs OEGs nécessaires pour qu'un mannoside tétravalent puisse interagir simultanément avec les quatre sites de reconnaissance de DC-SIGN séparés de 40 Å

Dans un deuxième temps, nous voulions insérer sur ces charpentes un meilleur ligand pour DC-SIGN que le mannose afin d'augmenter le pouvoir antiadhésif. Lors de criblages, Kiessling *et al.* ont identifiés les dérivés de quinoxalinone comme forts inhibiteurs de DC-SIGN avec des IC_{50} submicromolaires jusqu'à 0,31 μM pour le composé **38** (Figure 56).

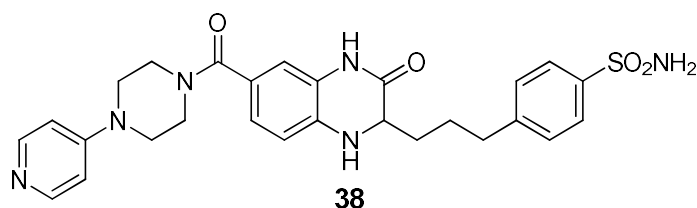


Figure 56 : Dérivé de quinoxalinone développé par Kiessling *et al.* possédant une IC_{50} de 0,31 μM (SPR) pour l'inhibition de l'interaction d'Albumine mannosylée avec DC-SIGN.

Dans le but d'introduire ce ligand sur une charpente multivalente, nous avons entrepris de reproduire la synthèse décrite par Kiessling *et al.* Nous voulions ensuite introduire une fonction azoture sur la molécule pour pouvoir la lier par CuAAC à une charpente multivalente.

III. Les dérivés de quinoxalinone

1) Généralités

A l'affinité modérée de DC-SIGN pour les mannosides s'ajoute le problème récurrent des drogues basées sur des structures saccharidiques : leur faible résistance *in vivo* face aux glycosidases.

Pour pallier ces problèmes, il peut être judicieux de recourir à des structures non glycosylées. Pour cela, l'équipe de Kiessling a effectué un criblage haut débit d'une librairie de petites molécules. Les ligands testés étaient mis en compétition avec de l'albumine mannosylée (ManBSA) marquée sur une surface où était immobilisée la protéine DC-SIGN. De cette étude, différentes structures polyaromatiques ont montré un potentiel inhibiteur intéressant de l'adhésion de ManBSA (Figure 57).¹⁵²

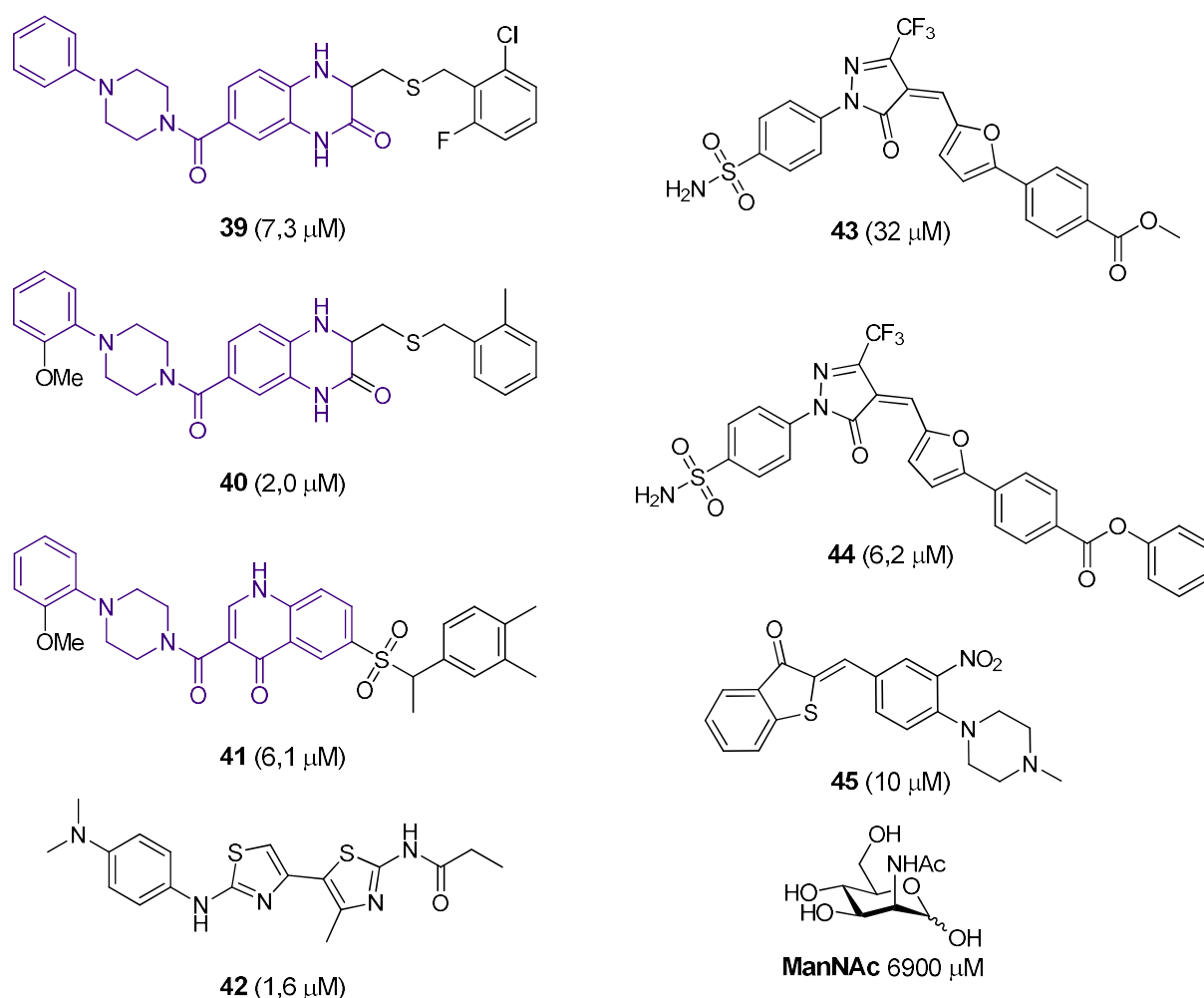


Figure 57 : Molécules 39 à 45 identifiées par Kiessling *et al.* pour leur potentiel inhibiteur d'adhésion de ManBSA sur DC-SIGN. Les données entre parenthèses correspondent aux IC_{50} .

Les composés présentent dans l'ensemble des IC_{50} inférieures de 3 ordres de grandeur par rapport au **ManNAc**. Les composés **40** et **42** ont montrés des inhibitions importantes avec des IC_{50} respectifs de 2,0 et 1,6 μM . Une observation intéressante de cette étude est que l'on peut retrouver sur trois de ces composés un squelette commun dérivé d'une quinoxalinone (en violet).

Les auteurs se sont ensuite plus particulièrement intéressés à la quinoxalinone dans une étude de pharmacomodulation. De manière à identifier un composé encore plus affin que le composé **40**, ils ont sélectionné trois zones de la molécule de base pour y effectuer des modifications structurales (Figure 58).¹⁵³

(piperazine-1-carbonyl)-3,4 dihydroquinoxalinone

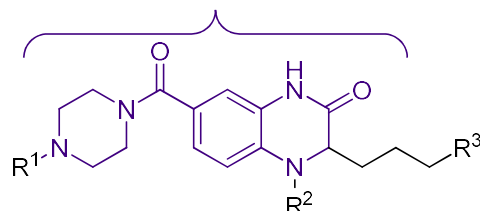


Figure 58 : Structure des dérivés de quinoxalinone obtenus en modifiant les groupements R¹, R² et R³.

Quinze dérivés ont été synthétisés avec des IC₅₀ comprises entre 370 μM et 0,31 μM (Tableau 7).

composé	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μM)
46	Pr	Et	Et	370 ± 70,0
47	Et	Me	Et	360 ± 69,2
48	Me	Me	Me	329 ± 65,8
49	Me	H	Me	313 ± 47,7
50	Boc	Et	Me	270 ± 43,8
51		Bn		170 ± 28,5
52		H		113 ± 20,4
53		H		71 ± 11

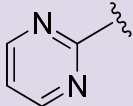
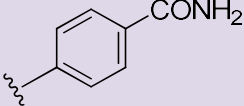
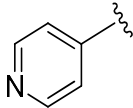
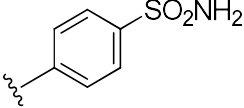
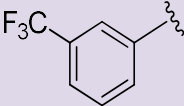
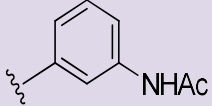
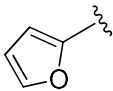
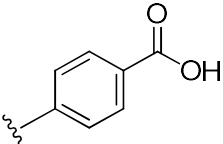
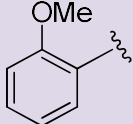
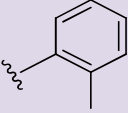
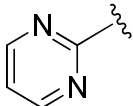
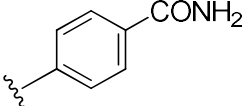
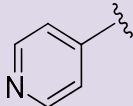
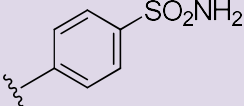
54		Et		68 ± 11
55		Bn		39 ± 6,2
56		H		23 ± 3,4
57		H		10 ± 1,3
58		H		4,4 ± 0,64
59		H		2,6 ± 0,28
38		H		0,31 ± 0,13

Tableau 7 : Composés 38 et 46 à 59 développés par Kiessling par modification des groupements R¹, R² et R³ présentant des IC₅₀ variant de 0,31 à 370 μM

Cette étude leur a permis non seulement d'identifier la structure **38** (R¹ = 4-pyridyle ; R² = H ; R³ = benzenesulfonamide) comme lead de cette série avec une IC₅₀ de 0,31 μM, mais aussi de déterminer les modifications délétères à l'affinité pour DC-SIGN. L'ensemble des modifications apportées au niveau du groupement R² a induit une diminution de l'IC₅₀ de la molécule. Par exemple, les molécules **38** et **55** qui varient par leurs groupements R² (**38** : R² = H, **55** : R² = Bn) montrent des IC₅₀ respectifs de 0,31 μM et 39 μM. L'addition d'un groupement benzyle sur cette position entraîne donc une diminution d'affinité importante d'un facteur 100.

Ces différents résultats nous ont conduits à sélectionner la charpente **38** afin de concevoir de nouveaux inhibiteurs multivalents de DC-SIGN.

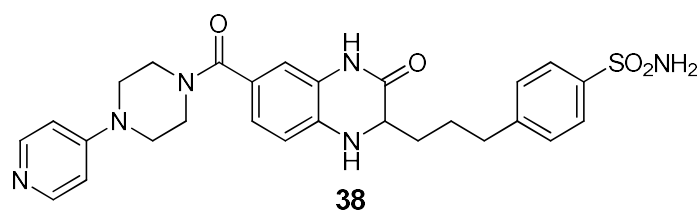


Figure 59 : Quinoxalinone 38 sélectionnée pour le développement de composés multivalents

2) Discussion de la synthèse décrite par Kiessling

Dans un premier temps nous avons mis en œuvre la synthèse décrite par Kiessling *et al.* Celle-ci repose sur l'élaboration préalable d'un synthon allyl-quinoxalinone pouvant être greffé à une pyridyl-pipérazine par couplage peptidique puis avec un vinylbenzènesulfonamide par métathèse croisée (Schéma 16).

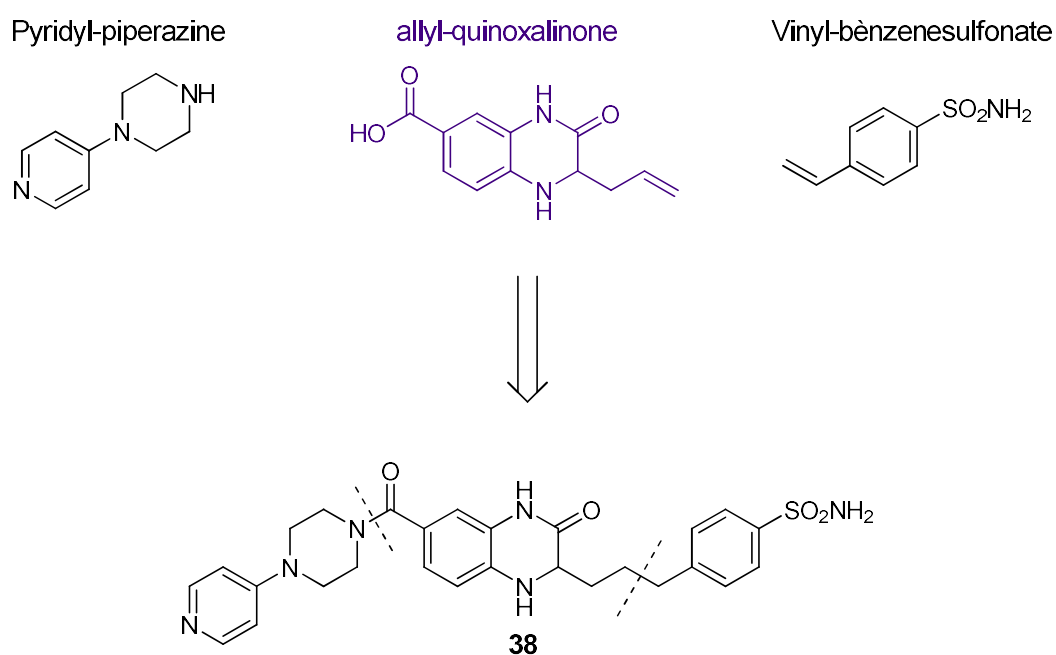


Schéma 16 : Rétrosynthèse du composé 38 obtenue à partir du synthon allylquinoxalinone, de pyridylpipérazine et de vinylbenzènesulfonamide

i. Synthèse de l'allylquinoxalinone

L'allylquinoxalinone peut être obtenu par couplage entre un composé aromatique dérivé de l'aniline A et d'un dérivé carbonyle β -aminé B porteur du groupement allyle (Schéma 17).

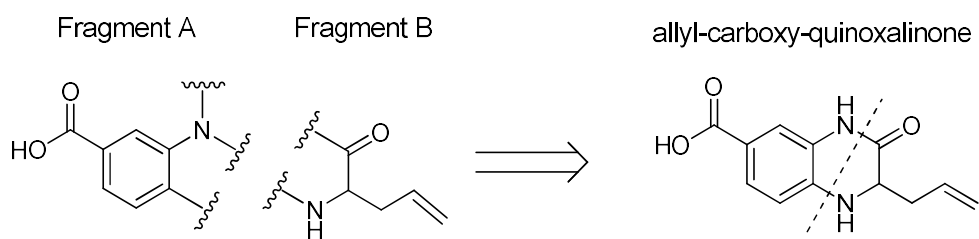


Schéma 17 : Rétro synthèse de l'allylquinoxalinone.

L'allylglycine a d'abord été converti en chlorure d'acide en présence de chlorure de thionyle et le produit obtenu est converti *in situ* en ester méthylique **60** en utilisant le méthanol comme solvant. L'amine réagit ensuite par substitution nucléophile aromatique sur l'acide 4-fluoro-3-nitrobenzoïque en présence de DIPEA dans le DMF à 90°C pour donner le précurseur **61** avec un rendement de 82% (Schéma 18).

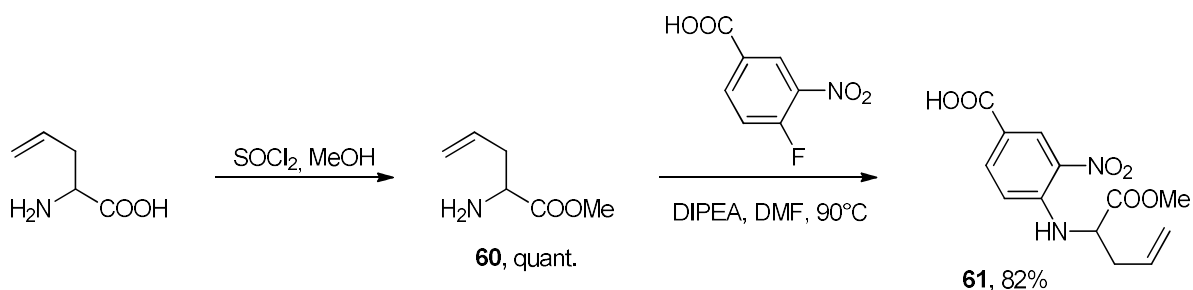


Schéma 18 : Synthèse des composés **60** et **61**

Nous avons rencontré divers problèmes lors de l'étape de purification du composé **61**. En effet, les auteurs décrivent dans le mode opératoire trois lavages à l'acide chlorhydrique 1M avant une neutralisation par une solution saturée de chlorure de sodium. Les premiers essais ont montré que le lavage acide entraînait le produit **61** en phase aqueuse. Il semblerait que le doublet de la fonction amine soit suffisamment disponible pour se protoner, augmentant alors considérablement son hydrosolubilité. Après diverses tentatives infructueuses, nous avons éliminé ce lavage et concentré directement le mélange sous pression réduite de manière à éliminer un maximum de DMF et de DIPEA.

Un second problème provenait de la qualité du solvant utilisé. En effet, le DMF peut comporter des traces de diméthylamine. Ce composé entre alors en compétition avec l'amine du composé **60** pour la substitution du fluor. L'inconvénient majeur est que le produit de substitution par la diméthylamine se comporte de la même manière que le composé **61** sur gel de silice, les rendant très difficilement séparable par chromatographie. Il est donc indispensable d'utiliser du DMF de qualité élevée.

Le groupement nitro du cycle aromatique est ensuite réduit en présence de zinc et d'acétate d'ammonium. L'amine intermédiaire n'est pas isolée et il y a couplage spontané avec l'ester méthylique pour obtenir l'allylquinoxalinone souhaitée **62** avec un rendement de 74% (Schéma 19).

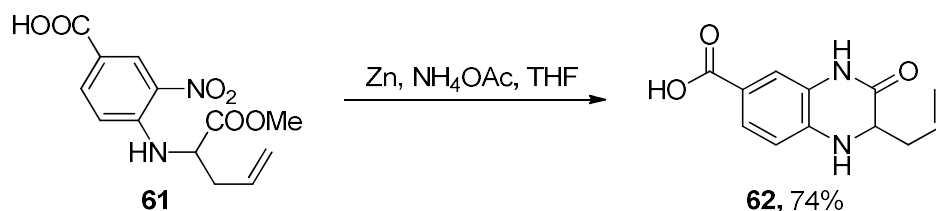


Schéma 19 : Réduction du groupement nitro en amine et couplage avec la fonction ester pour donner la molécule 62

Cette étape a été également difficile à reproduire. Selon les conditions décrites, le zinc est filtré sur célite puis le filtrat est concentré sous pression réduite avant traitement. Cependant une grande partie de l'acétate d'ammonium se retrouve dans le filtrat et après évaporation cette espèce est majoritairement sous forme d'acide acétique. La quinoxalinone **62** étant instable en milieu acide il n'était pas possible de laisser le mélange pendant une longue période sous vide poussé afin d'éliminer les traces d'acide acétique. Le second inconvénient est la protonation de l'atome d'azote de la quinoxalinone entraînant une importante perte de produit en phase aqueuse lors des lavages. Ainsi, nous avons effectué des lyophilisations pour éliminer l'acide acétique avant et après purification sur gel de silice.

ii. Couplage avec le groupement pyridylpiperazine

L'introduction du groupement pyridyl-piperazine sur la quinoxalinone a été effectuée par une réaction de couplage peptidique en présence d'HOBT, de HATU et de DIPEA dans le DMF (Schéma 20).

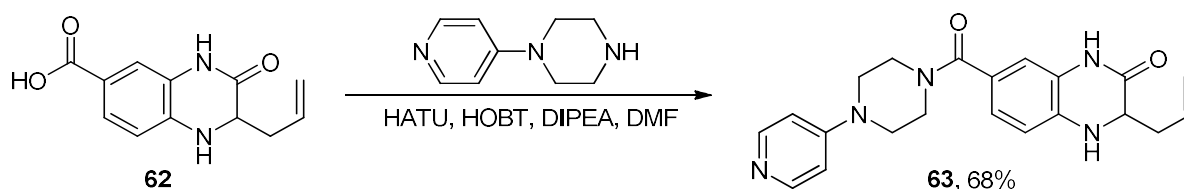


Schéma 20 : Couplage peptidique entre la quinoxalinone 62 et la pyridyl-piperazine

Comme précédemment, le traitement décrit par Kiessling et al. incluait un lavage avec une solution d'acide chlorhydrique 1M incompatible avec la présence des nombreux azotes de la molécule **63**. Après optimisation des conditions de traitement, il s'est avéré que la

La quinoxalinone semble donc être un substrat particulièrement délicat pour effectuer cette métathèse. C'est pourquoi nous avons changé de stratégie pour nous concentrer sur l'introduction d'un groupement azoture ou alcyne sur la quinoxalinone **63**.

iv. Stratégie d'introduction d'un cycle triazole

L'introduction d'un groupement aromatique lors de la métathèse croisée permet d'augmenter l'affinité de la quinoxalinone pour DC-SIGN. Dans la mesure où nous voulions insérer la quinoxalinone sur les charpentes multivalentes par CuAAC, le cycle triazole pourrait mimer le noyau aromatique pour conduire à des composés d'affinités similaires pour DC-SIGN (Figure 60).

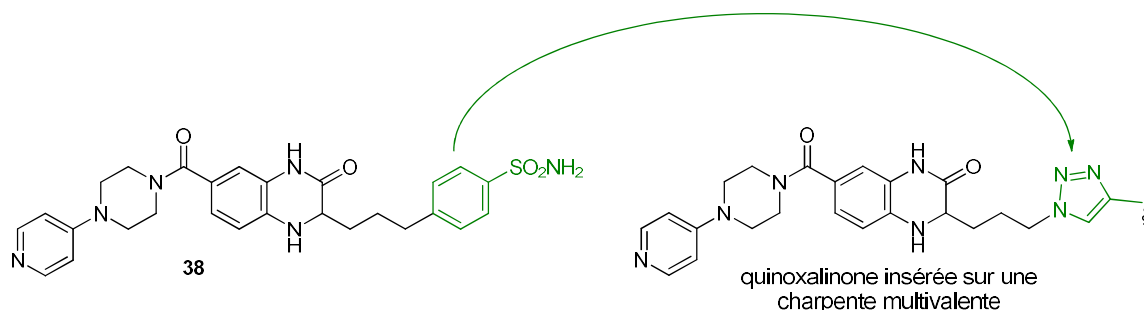


Figure 60 : Structure de la quinoxalinone envisagée pour le développement de composés multivalents

Avant d'effectuer la réaction par chimie click il fallait modifier la double liaison de la quinoxalinone **63** en fonction azoture ou en alcyne terminal.

3) Modification de l'alcène terminal

La première solution envisagée consistait à introduire une fonction azoture sur la molécule. Une des possibilités était d'oxyder l'alcène en alcool, de l'activer puis de le substituer par un groupement azoture. Par contre, peu de protocoles de formation d'un alcool à partir d'un alcène tolèrent les autres fonctions présentes sur la quinoxalinone **63**.

i. Réaction d'hydroboration

Parmi les réactions d'oxydation d'alcènes, l'hydroboration fait partie des plus classiques et peut s'effectuer à partir de nombreux dérivés borés. Parmi eux, le 9-BBN (9-borabicyclo[3.3.1]nonane) est un agent d'hydroboration plus doux que les autres homologues boranes.

La méthode que nous avons employée suit celle décrite par Bertozzi et al. pour la fonctionnalisation d'alcènes terminaux portés par un dérivé C-mannoside.

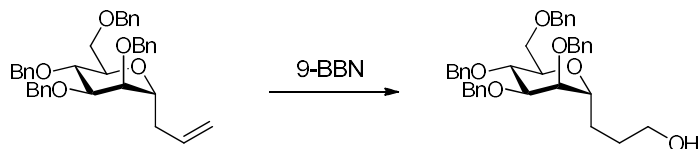


Schéma 23 : Réaction d'hydroboration avec le 9-BBN effectuée par Bertozzi et al. sur des dérivés C-mannosides

La quinoxalinone **63** a été mise en présence de 9-BBN dans le THF à reflux mais quels que soient les essais nous n'avons jamais pu obtenir l'alcool correspondant. Nous récupérons le produit de départ sans trace de modification de la double liaison. La quantité de borane employé par l'équipe de Bertozzi était de 1,3 équivalents et après les premiers essais nous avons augmenté la proportion (jusqu'à 5 équivalents) en 9-BBN mais toujours sans succès (Schéma 24).

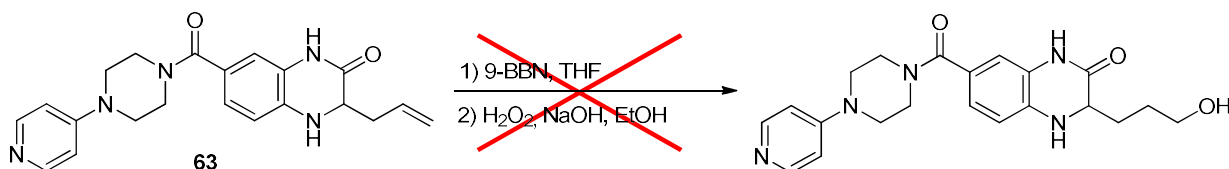


Schéma 24 : Réaction d'hydroboration avec du 9-BBN

Nous avons également effectué cette réaction sur les précurseurs **61** et **62** mais ces composés se sont également révélés peu réactifs. Compte tenu des nombreux atomes électrodonneurs présents sur la molécule, il est possible qu'il y ait des phénomènes de chélation de l'atome de bore le rendant indisponible pour la réaction d'hydroboration. Nous nous sommes donc dirigés vers des méthodes alternatives de couplage.

ii. Réaction de Thiol-ène

Les alcènes sont sensibles à la formation de radicaux et sont employés pour le couplage avec des dérivés thiols. La réaction thiol-ène possède toutes les caractéristiques d'une réaction de chimie click comme expliqué en première partie de ce manuscrit.

Cette réaction a été particulièrement utilisée pour la synthèse de dendrimères.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Cela a notamment permis à Son *et al.* de développer des dendrimères comptant jusqu'à 972

groupements vinyles en utilisant alternativement la réaction de thiol-ène et la réaction de Grignard (Schéma 25).

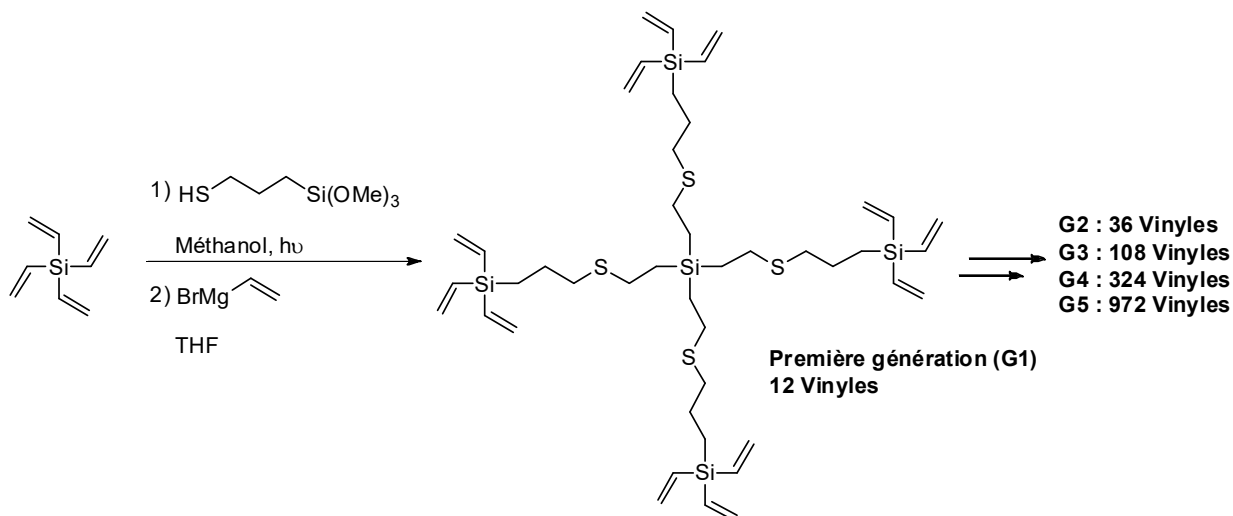


Schéma 25 : Dendrimères synthétisés par Son *et al.* mettant en jeu une réaction de thiol-ène

Nous avons envisagé la thiol-ène pour fonctionnaliser l'alcène de la quinoxalinone **63** par de l'éthanethiol fonctionnalisé en position 2 par une fonction précurseur d'azoture. Dans un premier temps, cette réaction a été mise au point avec la cystéamine.

La réaction de thiol-ène supporte une large gamme de solvants et nous avons opté pour un mélange THF/éthanol/eau qui permet de solubiliser la quinoxalinone **63**. L'AIBN est utilisé comme initiateur radicalaire de la fonction thiol de la cystéamine. Cependant, cette réaction n'a pas fonctionné malgré différents essais et nous récupérons à chaque fois le produit de départ (Schéma 26).

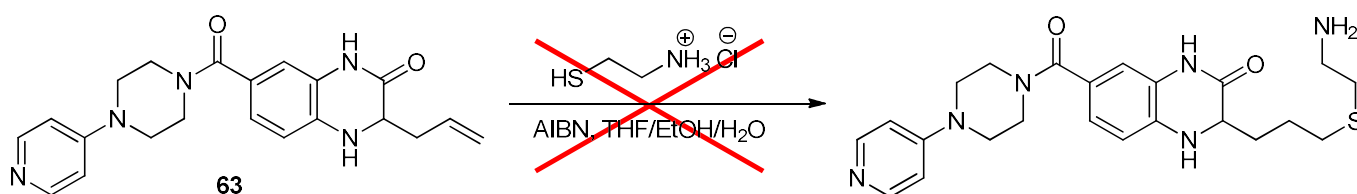


Schéma 26 : réaction thiol-ène appliquée à la quinoxalinone **63**

Nous avons également employé cette méthode sur les précurseurs **62** et **61** mais les résultats étaient les mêmes qu'avec la quinoxalinone **63**. Au vu de ces échecs, nous avons envisagé des méthodes d'oxydation.

iii. Réaction d'ozonolyse

La réaction d'ozonolyse permet la coupure oxydante d'alcènes et l'utilisation de méthanol conduit à un intermédiaire de type peroxyde d'hémicétal (Schéma 27) plus stable que l'ozonide et qui mène généralement à de meilleurs rendements.¹⁵⁷ L'utilisation de borohydrure de sodium additionné *in situ* à la fin de l'ozonolyse réduit ce peroxyde en l'alcool correspondant.

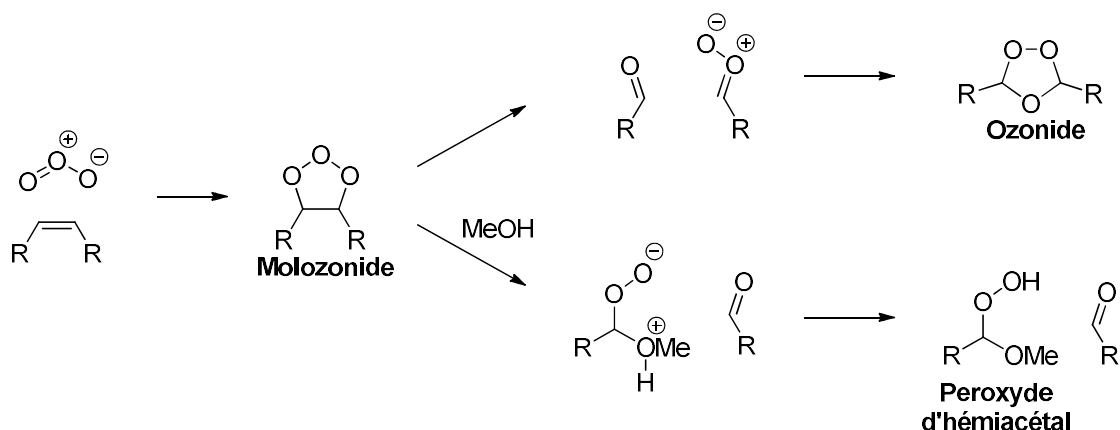


Schéma 27 : Mécanisme d'ozonolyse sans méthanol conduisant à l'ozonide et avec le méthanol conduisant au peroxyde d'hémicétal

Cette méthode a été testée sur les composés **61**, **62** et **63**, dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol (Schéma 28). Cependant, les différents essais ont été infructueux et une nouvelle fois l'alcène n'a pas réagi dans ces conditions.



Schéma 28 : Réaction d'ozonolyse appliquée au composé **63**

iv. Réaction d'hydrobromation

L'utilisation d'acide halogénohydrrique permet notamment l'halogénéation d'alcènes en conditions radicalaires. Les études récentes de Galli *et al.* ont montré que l'on pouvait obtenir le produit d'addition anti-Markovnikov même en s'affranchissant d'un initiateur radicalaire.¹⁵⁸

Ils expliquent cette régiosélectivité par les conditions employées lors de leur synthèse qui s'écartent drastiquement des conditions historiques comme celles décrites en 1940 par Mayo *et al.*¹⁵⁹ Pour obtenir un produit d'addition suivant la loi de Markovnikov, l'alcène

réagissait sans solvant et dans des conditions inertes, sans aucune trace d'oxygène. Cependant, dans des conditions diluées et sans précaution pour éliminer l'oxygène, Galli *et al.* ont montré que le produit très majoritairement formé correspond à l'addition anti-Markovnikov (Figure 61).¹⁵⁸

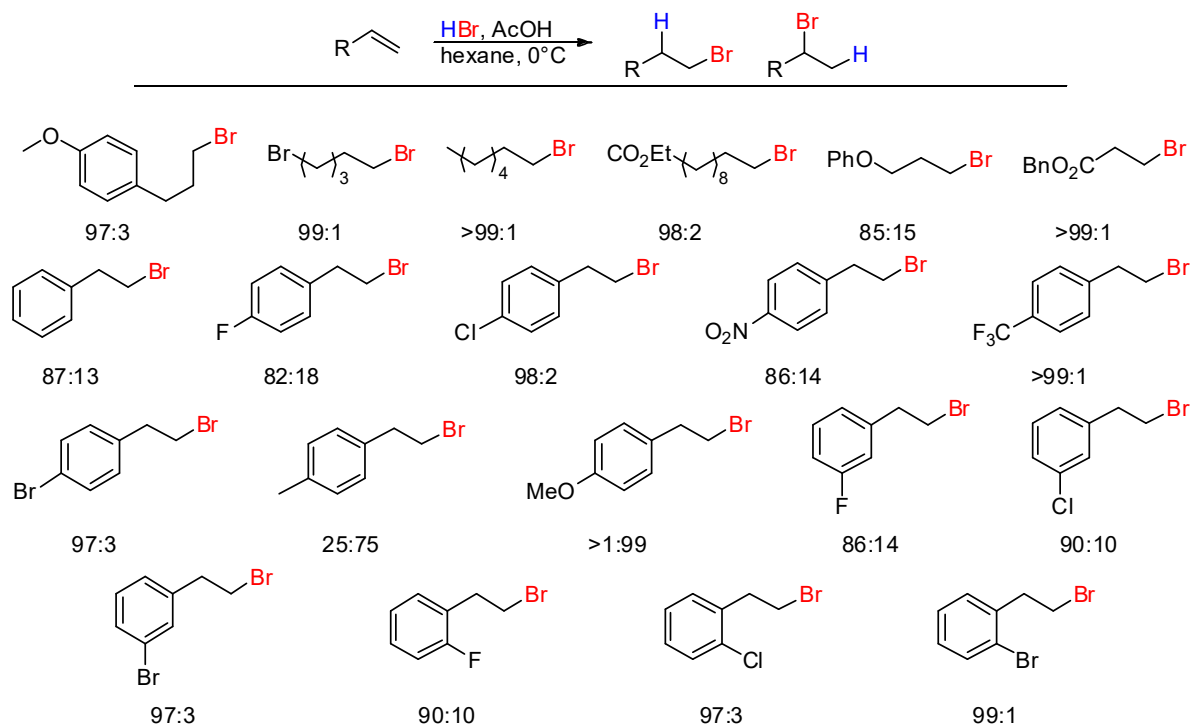


Figure 61 : Réaction d'hydrobromation anti-markovnikov développée par Galli *et al.*

Cette réaction a d'abord été évaluée sur le composé **62**, plus simple structurellement que la molécule **63**.

Gulli *et al.* utilisent des solvants apolaires qui ne solubilisent pas la quinoxalinone **62** et nous avons dû employer des solvants plus polaires (pyridine, DMF et méthanol). Après différents essais cette réaction n'a pas permis d'obtenir le composé attendu et la double liaison du produit de départ n'a pas réagi (Figure 51).

Suite à ce nouveau manque de réactivité, nous avons progressivement augmenté la température de réaction et avons observé par RMN une disparition des signaux de l'alcène à partir de 80°C. Cependant le mélange obtenu était difficilement purifiable sur gel de silice. Par contre, en effectuant la réaction en tube scellé et sous irradiation micro-onde, il y a conversion totale de la quinoxalinone **62**. Les analyses physico chimiques indiquent que nous avons obtenu le composé **66** issu d'une cyclisation intramoléculaire avec l'amine secondaire pour former un cycle à cinq chaînons favorisé thermodynamiquement. C'est pourquoi, supposant

la formation intermédiaire du composé bromé attendu, nous avons envisagé de protéger l'amine secondaire afin d'empêcher la cyclisation.

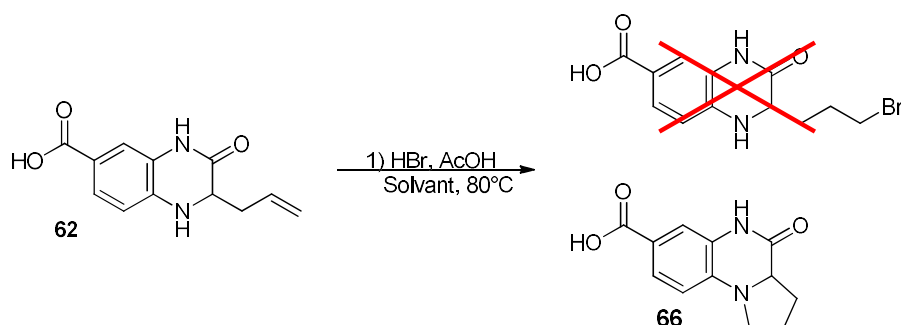


Schéma 29 : Réaction d'hydrobromation appliquées à la quinoxalino-6-carboxy-2-allyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline **62**

v. Protection de l'amine

La protection de l'azote sous forme de trifluoroacétamide semblait adaptée, ce groupement est moins sensible aux conditions acides que la plupart des groupements protecteurs d'amines et la déprotection est aisée en milieu basique.¹⁶⁰ Nous avons employé la méthode classique de trifluoroacétylation sur les quinoxalino-6-carboxy-2-allyl-1,2,3,4-tétrahydroquinolines **62** et **63** dans un mélange d'anhydride trifluoroacétique et de pyridine en présence de DMAP. Ces conditions nous ont permis d'obtenir les quinoxalino-6-carboxy-2-allyl-1,2,3,4-tétrahydroquinolines protégées **67** et **68** (Schéma 30).

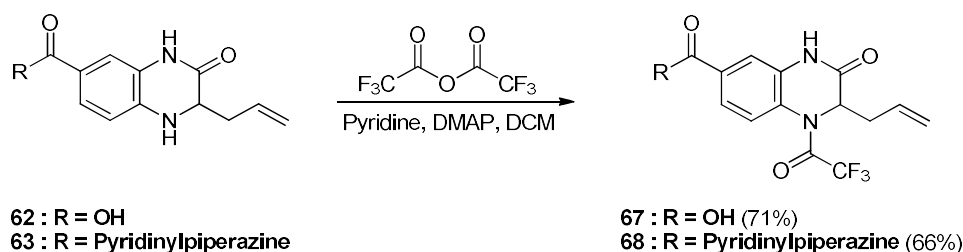


Schéma 30 : Protection des quinoxalino-6-carboxy-2-allyl-1,2,3,4-tétrahydroquinolines **62** et **63** en trifluoroacétamides

Ces deux quinoxalino-6-carboxy-2-allyl-1,2,3,4-tétrahydroquinolines protégées **67** et **68** ont été engagées dans la réaction d'hydrobromation. Malheureusement nous avons obtenu un mélange de nombreux composés impossibles à séparer sur gel de silice.

Parallèlement, nous avons engagé la quinoxalino-6-carboxy-2-allyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline **68** en réaction d'ozonolyse dans les conditions décrites précédemment. Cette réaction a permis d'obtenir la quinoxalino-6-carboxy-2-allyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline **69** dont le groupement trifluoroacétamide a été éliminé *in situ* (Schéma 31).

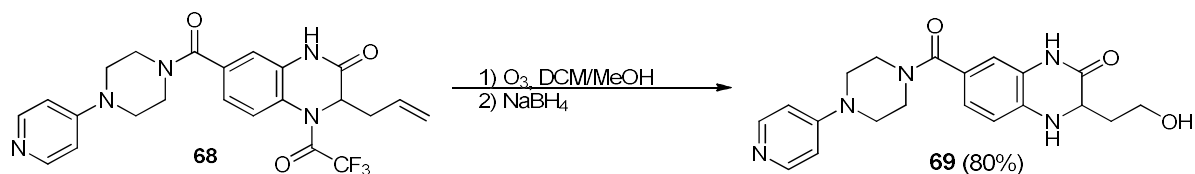


Schéma 31 : Ozonolyse de la quinoxalinone 68 conduisant au dérivé alcool 69

4) Modification de l'alcool terminal en azoture

Les étapes envisagées pour l'introduction de l'azoture sur l'alcool terminal étaient initialement une activation de l'hydroxyle par mésylation suivie d'une substitution par de l'azoture de sodium. Cependant, la déprotection du trifluoroacétamide durant l'étape précédente rendait la mésylation de l'alcool peu envisageable à cause de la présence de l'amine secondaire nucléophile. Nous nous sommes alors tournés vers la réaction d'azido-Mitsunobu sélective des fonctions alcools.

i. Azido-Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu est bien connue pour l'inversion de configuration stéréochimique d'alcools secondaires chiraux lorsqu'ils sont activés par un mélange de triphénylphosphine et d'azocarboxylates (DEAD, DIAD...). Cette réaction est aussi sélective des alcools qui ont une très grande affinité pour les dérivés phosphorés.

La réaction d'azido-Mitsunobu en est une variante dans laquelle l'azoture de diphosphoryle (DPPA) est employé.¹⁶¹ Le caractère oxophile du phosphore permet d'activer l'alcool de la même manière que la triphénylphosphine. Durant cette activation l'azoture de la DPPA est libéré et peut alors agir en tant que nucléophile pour conduire au dérivé azoturé correspondant. Nous avons mis en œuvre cette réaction sur la quinoxalinone 69 en présence de DPPA, de triphénylphosphine et de diéthyl azodicarboxylate (DEAD) (Schéma 32). Cependant malgré de nombreuses tentatives, nous ne sommes jamais parvenu au composé azoturé et nous récupérons systématiquement le produit de départ pollué avec de l'oxyde de triphénylphosphine.

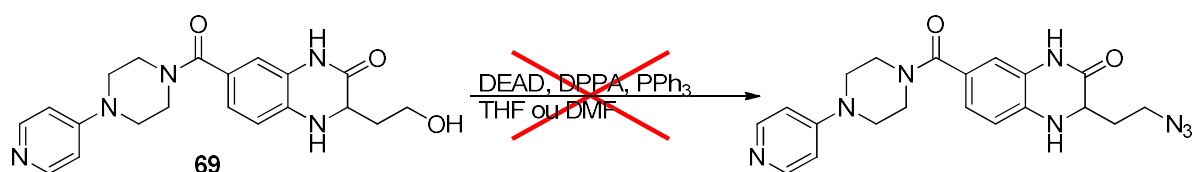


Schéma 32 : Réaction d'azido-Mitsunobu sur la quinoxalinone 69

Ces expériences ayant été effectuées en fin de thèse, nous n'avons pu poursuivre ces travaux et terminer la synthèse de la quinoxalinone modifiée.

IV. Inhibiteurs de première génération

1) Synthèse des charpentes

i. Charpentes multivalentes envisagées

Trois types de charpentes ont été envisagés pour le développement de mannosides divalents, tétravalents et ultravalents. Les charpentes divalentes ont été décrites dans le premier chapitre du manuscrit (Figure 62).

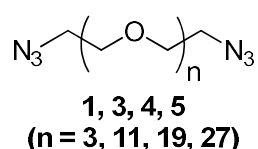


Figure 62 : OEGs bis-azoturés 1, 3, 4 et 5

Nous avons développé une structure tétravalente basée sur un α -methyl-mannoside fonctionnalisé par des OEGs de différentes longueurs sur quatre des atomes d'oxygènes exocycliques. Les OEGs présentent à leur extrémité une fonction azoture afin d'introduire un mannoside par chimie click (Figure 63). On aura alors un ligand tétravalent capable d'interagir potentiellement dans les 4 sites de reconnaissance de DC-SIGN.

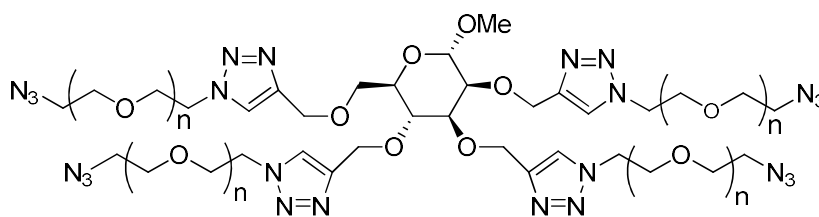


Figure 63 : Structures envisagées pour le développement de mannosides tétravalents

Le dextrane employé pour le développement de mannosides multivalents comporte un nombre d'unités moyen de glucose plus faible que celui utilisé pour le polymère de fucose au chapitre 2 (29 contre 68) (Figure 64).

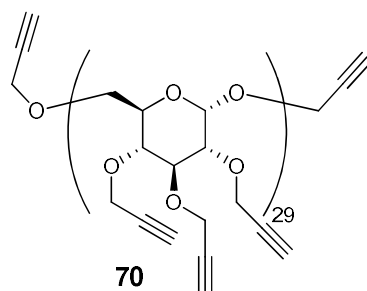


Figure 64 : Dextrane perpropargylé 70 employé pour la synthèse de mannosides multivalents.

ii. Synthèse du mannoside perpropargylé

La synthèse débute par le traitement du methyl-mannoside par du bromure de propargyle en présence d'hydrure de sodium pour former le composé perpropargylé **71** avec un rendement de 69% (Schéma 33).

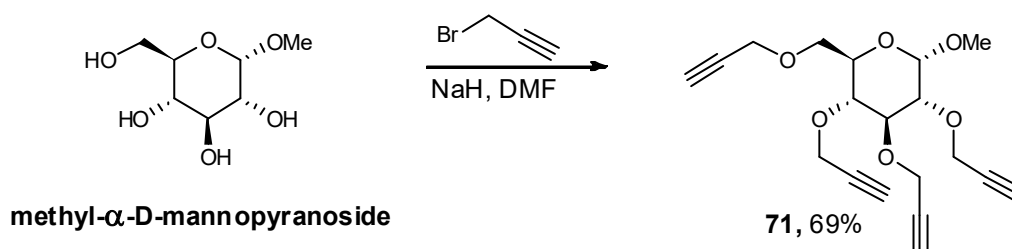


Schéma 33 : Réaction de propargylation du methyl-mannoside

iii. Synthèse des espaceurs OEGs azoturés

Une longueur d'espaceur moyenne de 30 Å est nécessaire pour interagir simultanément avec les quatre sites de reconnaissance de DC-SIGN. Pour cela, le nombre d'unités EGS théorique serait approximativement de 25. Cependant, nous avons préféré synthétiser une gamme d'espaceurs afin d'évaluer l'influence de ce paramètre sur l'affinité.

La première réaction pour la synthèse de OEGs mono-fonctionnalisés est une mésylation en présence de triéthylamine, de DMAP et d'un seul équivalent de chlorure de méthanesulfonyle (Schéma 34). Nous avons utilisé ces conditions sur un OEG de 20 unités, ce qui a conduit à un mélange de réactif de départ ainsi que des composés mono- et di-mésylés impossible à purifier par chromatographie sur gel de silice.

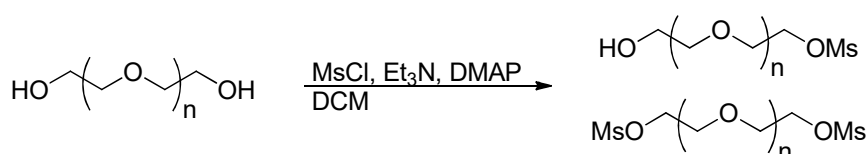


Schéma 34 : Réaction de mésylation de l'OEG-20 conduisant à un mélange de OEGs non, mono- et di-mésylés

La purification des OEGs avec un nombre d'unités supérieur à 10 étant difficile, nous avons eu recours à une synthèse d'élongation des OEGs décrite par French *et al.* qui permet d'accéder à des chaînes jusqu'à 48 unités.

Cette synthèse repose sur le couplage de deux chaînes OEGs mono-protégés par un groupement benzyle (Bn) ou trityle (Tr). Pour effectuer le couplage entre les OEGs, French *et al.* ont employé une tosylation de la chaîne benzylée (**72**). L'alcool libre de la chaîne tritylée **73** peut ensuite substituer le tosylo, en conditions basiques, soit en présence d'hydruure de sodium, soit en utilisant du *tertiobutoxyde* de potassium (Schéma 35)

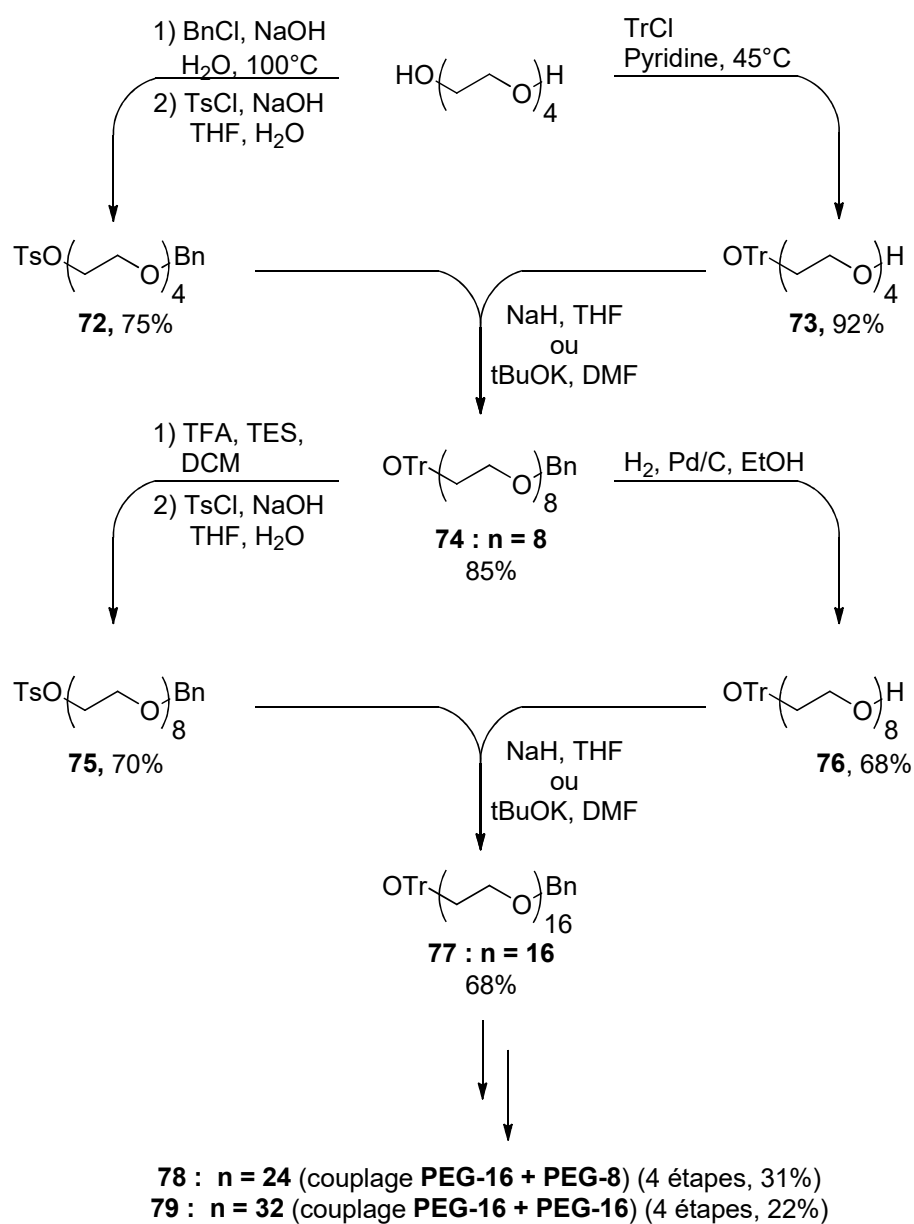


Schéma 35 : Elongation de OEGs décrite par French *et al.* pour accéder à des chaînes de longueurs élevées

Nous avons obtenu les chaînes désirées avec des rendements décroissants lorsque le nombre d'unités augmente, ce qui est essentiellement dû aux difficultés de purification. Les groupements benzyles des OEGs **74**, **77**, **78** et **79** ont ensuite été déprotégés par hydrogènyse puis engagés dans les étapes de méthylation et azotation pour former les composés attendus **83** à **87** (Schéma 36).

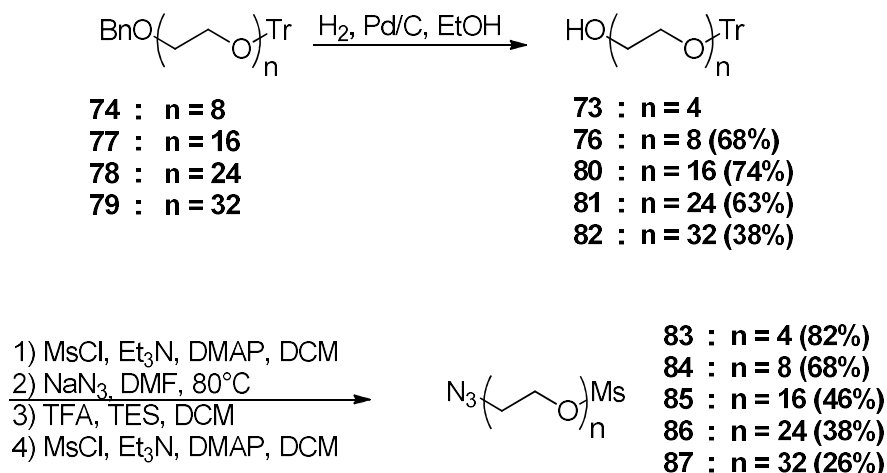


Schéma 36 : Synthèse en quatre étapes des OEGs mono-azoturés

Ces cinq espaceurs ont été greffés sur le mannose perpropargylé **71** selon la méthode classique de CuAAC (sulfate de cuivre, ascorbate de sodium dans le dioxane à 60°C pour les composés **88** et **89** et sous activation micro-onde à 80 °C pour les produits **90** et **91**) (Schéma 37). Par contre, le produit de couplage comportant 32 unités EGs n'a pas pu être obtenu dans ces mêmes conditions.

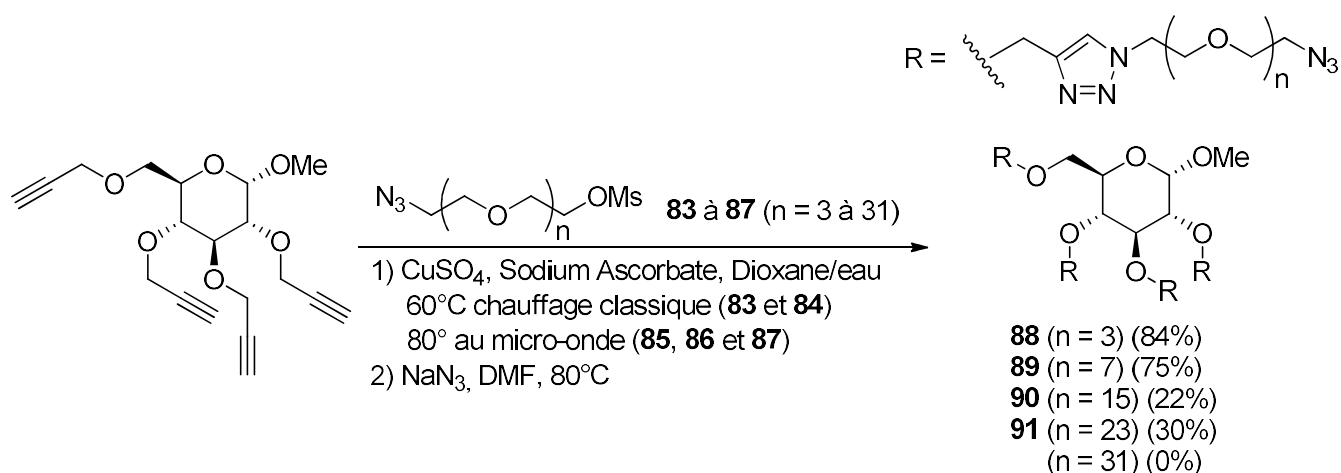


Schéma 37 : Insertion des espaceurs sur le mannose per-propargylé **71** suivi de l'azotation en bout de chaîne

2) Synthèse des mannosides de première génération

La glycosylation pour obtenir un α -mannoside est beaucoup plus facile que pour un α -fucoside. En effet, la stéréochimie peut être contrôlée par assistance anchimérique de l'hydroxyle protégé en position 2 (Schéma 38).

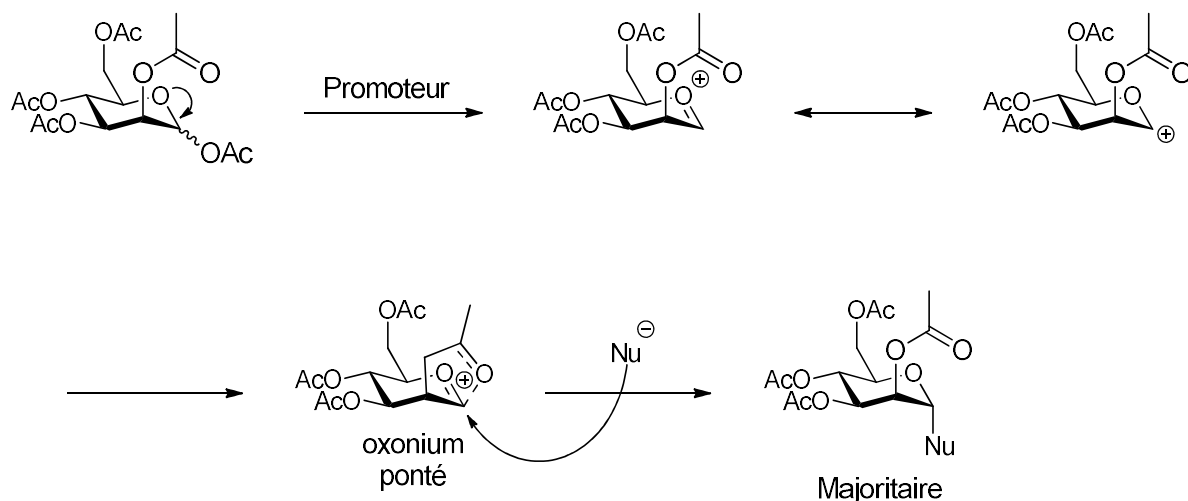


Schéma 38 : Mécanisme de glycosylation via une assistance anchimérique

L'activation du mannose peracétylé par de l'éthérate de trifluorure de bore en présence de prop-2-yn-1-ol permet d'isoler le composé **92** sous forme d'un seul anomère. Pour introduire la fonction azoture, nous partons du 2-bromoéthanol dont le produit de glycosylation est azoturé pour donner le composé **93** (Schéma 39).

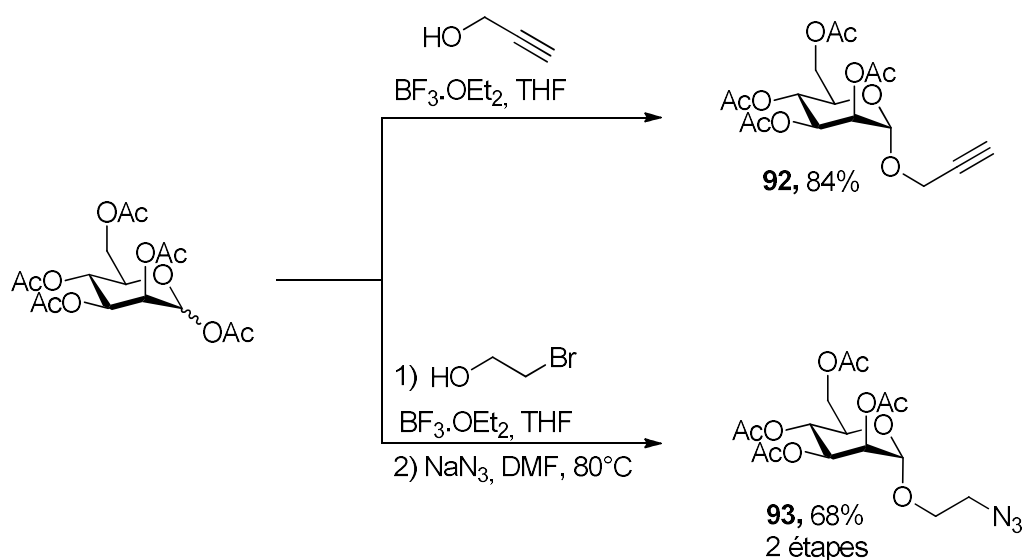


Schéma 39 : Synthèse des mannosides propargylés et azoturés

3) Insertion des ligands sur la charpente et déprotection des composés

Le mannoside **93** a été inséré sur les différentes charpentes divalentes par CuAAC à 60°C (Méthode A). Cependant, pour les structures tétravalentes cette méthode s'est révélée peu adaptée et donnait des rendements faibles. Nous avons alors employé la méthode par chauffage microonde pour pallier ce problème (Méthode B) (Figure 65).

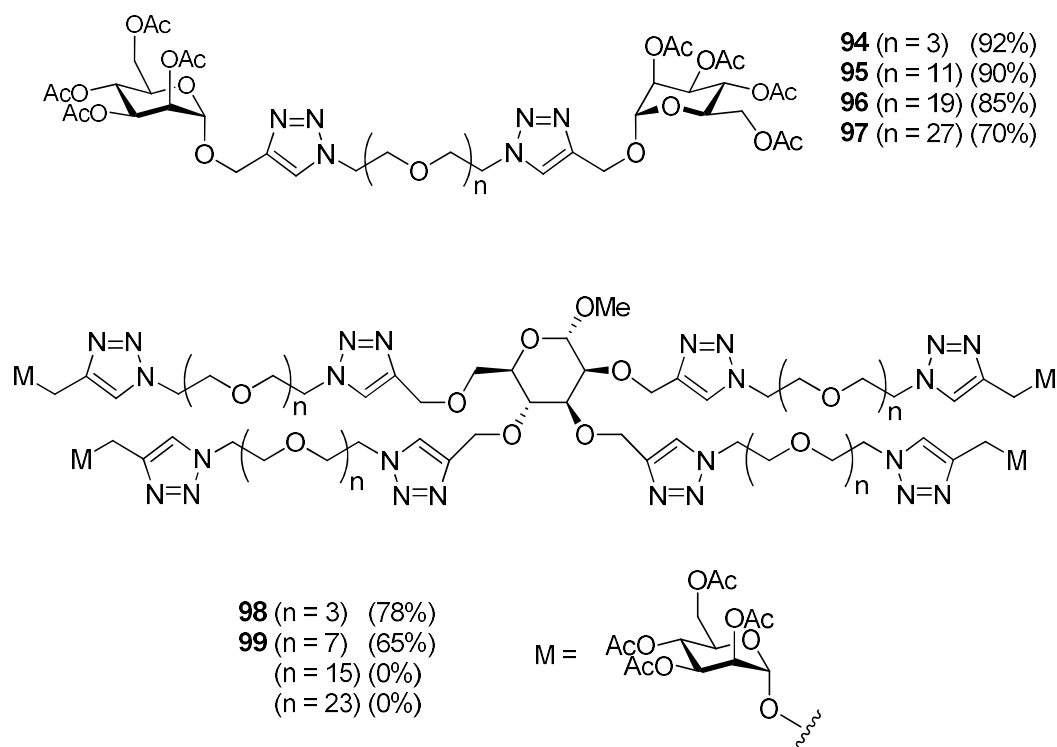


Figure 65 : Structures et rendements des composés di- et tétravalents obtenus par insertion du mannoside propargylé **92** sur les charpentes *via* la réaction de CuAAC

Les structures tétravalentes avec 16 et 24 unités EGs n'ont pas été isolées dans ces conditions.

Pour la synthèse du dérivé polymérique **100**, nous avons employé une activation micro-onde pour l'insertion du mannoside azoturé **93** sur le dextrane **70** (Figure 66).

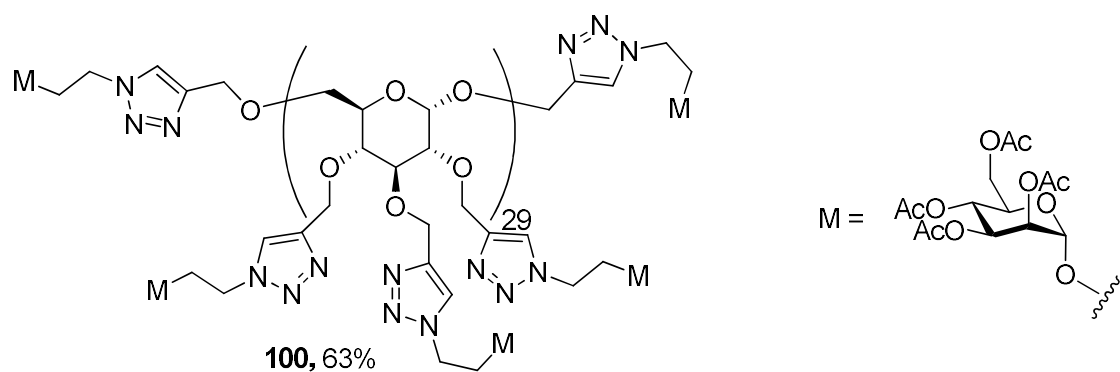


Figure 66 : Structure et rendement obtenu lors de la CuAAC pour le mannoside ultravalent

L'ensemble des structures di-, tétra et ultravalentes a ensuite été déprotégé en utilisant de l'amberlite basique IRN 78 dans un mélange méthanol/eau pour donner les sept structures multivalentes **101-107** avec des rendements compris entre 71 et 97% (Figure 67)

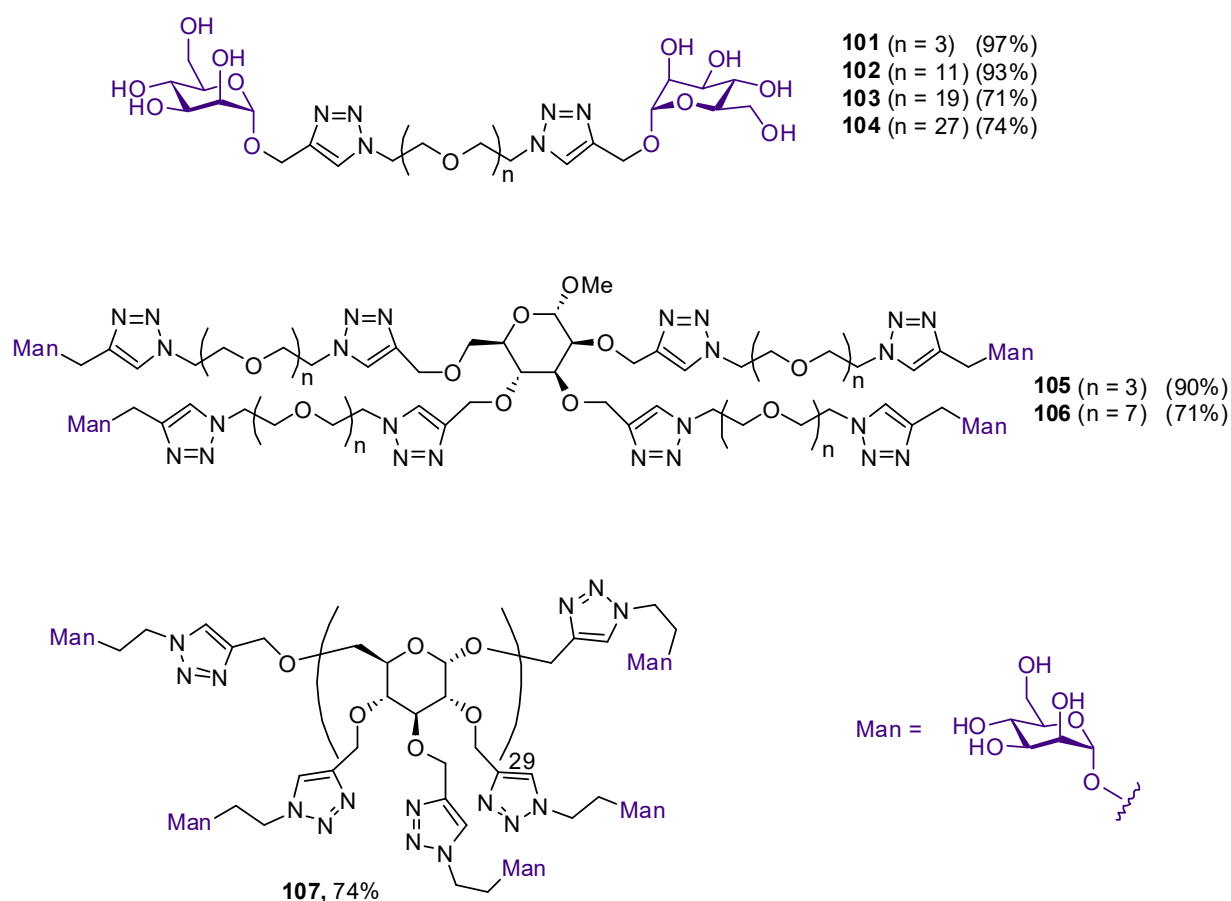


Figure 67 : Structures et rendements des composés finaux obtenus après déprotection des hydroxyles

4) Synthèse du ligand monovalent de référence

Comme pour les fucosides multivalents inhibiteurs d'AFL, il fallait une référence monovalente pour calculer le gain d'affinité apporté par des effets multivalents éventuels. Pour cela, nous avons greffé le bras espaceur **32** sur le mannoside propargylé **92** puis effectué la déprotection des groupements hydroxyles avec de l'amberlite IRN78 (

Schéma 40).

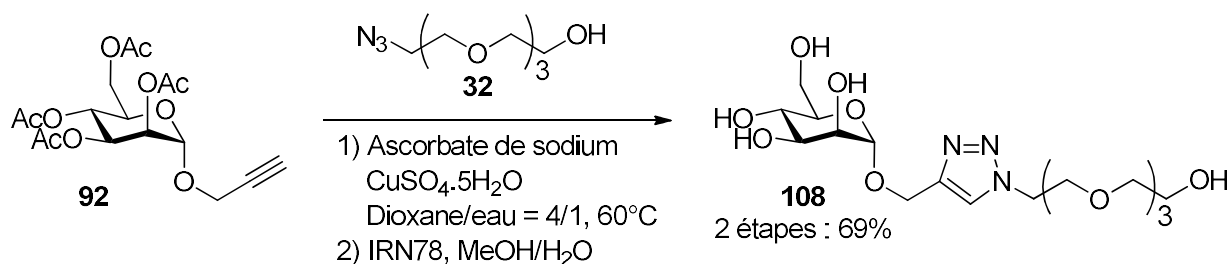


Schéma 40 : Synthèse du mannoside monovalent 108

5) Test de *trans*-infection

Les évaluations biologiques ont été effectuées dans l'équipe du Dr Franck Halary de l'UMR1064 INSERM/CRTI (Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie) au sein de l'ITUN (Institut de Transplantation, Urologie, Néphrologie) du CHU Hotel Dieu (Nantes). J'ai eu l'opportunité d'évaluer le caractère antiadhésif de nos composés dans ce laboratoire.

Le premier test que nous avons utilisé consiste à évaluer l'adhésion du CMV entier sur une lignée de cellules dendritiques. Ce test de *trans*-infection repose sur l'utilisation de fibroblastes MRC-5 qui peuvent être très facilement infectés par le CMV. Comme les DCs pourraient être employées comme vecteur par le CMV pour atteindre des cellules plus permissives, le test va reproduire ce processus : après infection par le CMV, les DCs seront mises en contact avec les cellules MRC-5 qui vont alors être trans-infectées par le virus. Le CMV recombinant va alors entraîner la lignée de MRC-5 à exprimer une protéine fluorescente (la GFP = green fluorescent protein) lorsqu'elles sont infectées. Le taux d'infection sera alors quantifié par microscopie à fluorescence inversée.

iv. Mode opératoire

Dans un premier temps, les DCs exprimant DC-SIGN sont placées en plaques 96 puits en présence des inhibiteurs synthétiques à une concentration de 1 μ M puis incubés pendant 20 minutes de manière à permettre l'interaction mannoside/DC-SIGN. Le CMV est ensuite ajouté au milieu à une concentration de 2 virus par cellule (Multiplicity Of Infection, MOI de 2). Après une incubation de 2h, les particules virales n'ayant pas réagi sont éliminées par trois lavages successifs avec du milieu de culture seul contenant des ions calcium.

Le milieu contient alors des DCs sur lesquelles ont adhéré des particules virales de manière plus ou moins importante en fonction du potentiel antiadhésif des inhibiteurs employés. Ces cellules sont ensuite récupérées en suspension puis mises en coculture sur un tapis de MRC-5 en plaques 24 puits. Cela permet aux CMV présents à la surface des DCs de *trans*-infecter les cellules MRC-5. Après 48h d'incubation, la *trans*-infection vers les MRC-5, si elle se produit, conduit à l'expression de la GFP dans les MRC-5. Le pourcentage de MRC-5 infectées est alors déterminé par examen visuel en comparant le nombre de cellules fluorescentes observées par microscopie à fluorescence inversée au nombre de cellules totales observées (coloration des noyaux par le DAPI qui apparaissent en rouge sur les figures 31 et 32) (Figure 68).

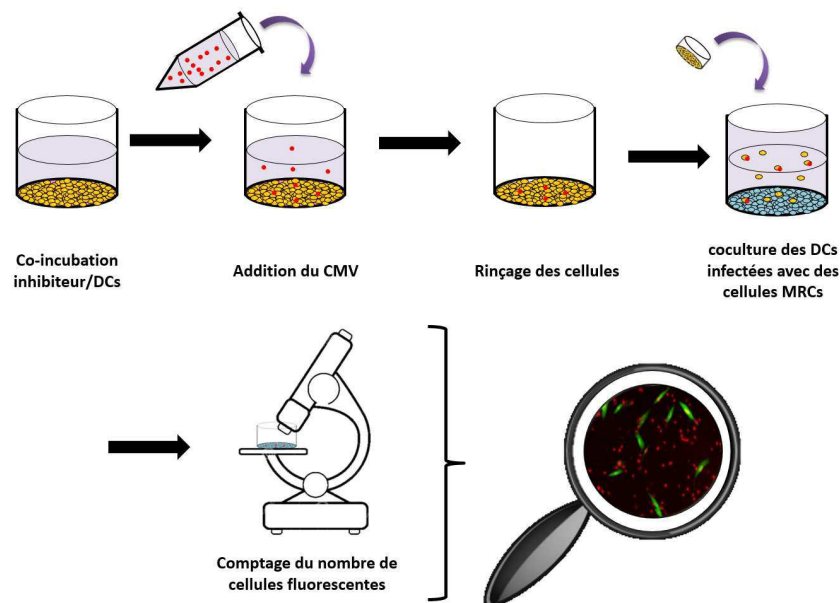


Figure 68 : Test de *trans*-infection employé pour évaluer le potentiel antiadhésif des mannosides multivalents

Cette méthode mime des conditions très proches des milieux biologiques naturels puisqu'elle emploie le CMV et non simplement la gB isolée. Même si les temps d'incubation sont parfois longs, cette méthode permet d'avoir un visuel simple de fluorescence pour évaluer le taux d'infection cellulaire.

v. Résultats

Le mannane a été utilisé comme contrôle positif car c'est un polymère composé de mannoses permettant une bonne inhibition de l'adhésion virale. Malheureusement, les composés **101** à **108** n'ont pas permis d'inhiber fortement l'adhésion virale même à une concentration élevée de 1 mM et l'ensemble des résultats pour les composés multivalents est similaire à celui de la référence monovalente **108** (Figure 69).

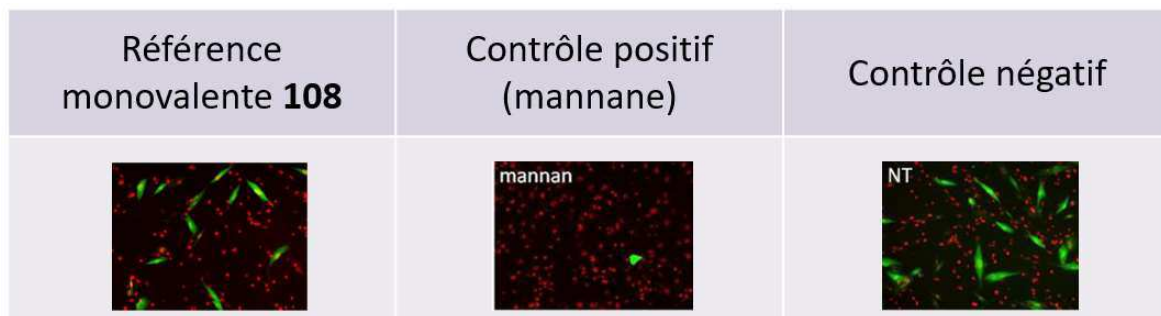


Figure 69 : clichés de microscopie à fluorescence inversée des tests de trans-infection

A l'instar du composé 108, comme on peut le voir sur l'image de droite, le nombre de cellules fluorescentes est toujours important lorsque l'on utilise les composés multivalents. Le nombre de cellules infectées reste toutefois inférieur au contrôle négatif dans lequel aucun inhibiteur n'a été employé. Il semblerait que les composés multivalents soient plus efficaces que la référence monovalente. Cependant, l'inhibition d'adhésion du CMV avec nos ligands synthétiques reste malheureusement modérée et loin de ce que l'on peut observer sur le cliché du contrôle positif employé. Pour obtenir des informations complémentaires sur le caractère antiadhésif des mannosides multivalents, nous avons évalué les composés sur la gB isolée.

6) Test d'inhibition de l'adhésion de la glycoprotéine B.

i. Description

La première étape de ce test est une incubation, avec les DCs, des inhibiteurs synthétiques à des concentrations variables pendant 20 minutes à 37 °C. De la gB couplée à la biotine est ajoutée au milieu qui est ensuite incubé 20 minutes à 4 °C pour permettre à la gB de se fixer sur les DCs. Le milieu est rincé à plusieurs reprises pour éliminer la protéine en excès. Les gBs restantes adhérees aux DCs sont marquées *via* leur biotine par de la streptavidine couplée à l'APC (allophycocyanin). Ce marquage permet une lecture par fluorescence analysée par cytométrie en flux. Cette méthode identifie les différentes populations cellulaires présentes dans un milieu et compte le nombre total de DCs marquées par la streptavidine-APC et le compare au nombre total de DCs. Cette valeur est comparée avec un témoin négatif correspondant au test d'interaction en l'absence d'inhibiteur synthétique pour lequel la fixation est normalisée à 100%. Cela permet de déterminer des IC₅₀ pour les inhibiteurs synthétiques.

ii. Résultats

Les pourcentages d'adhésion étant difficilement interprétables dans le cas des composés divalents, et peu reproductibles en raison d'un trop faible signal, ils ne seront pas commentés ici. Les composés tétravalents **105** et **106** ont permis d'inhiber faiblement l'adhésion de la gB à de fortes concentrations supérieures à 1 mM. On observe bien un effet-dose avec ces composés ou l'adhésion de la gB décroît en fonction de la concentration en ligand.

Enfin, le polymère mannosylé **107** s'est révélé légèrement supérieur dans ces tests avec une IC₅₀ de l'ordre de 500 µM (Figure 70). Les résultats obtenus lors de ces tests d'adhésion ont donc confirmé le faible effet inhibiteur de cette première série de molécules.

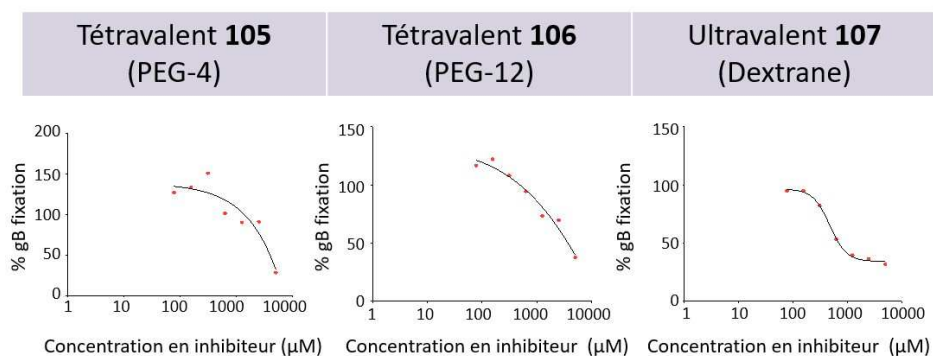


Figure 70 : Résultats des tests d'inhibition des différentes structures multivalentes 105 à 107

En dehors de la valence, une des principales différences entre le composé ultravalent **107** et les composés di- ou tétravalents est la fonctionnalisation du triazole par le mannose. En effet, le groupement triazole est substitué en position 4 dans le cas des composés à faible valence et ainsi plus proche de l'oxygène anomérique (Figure 71).

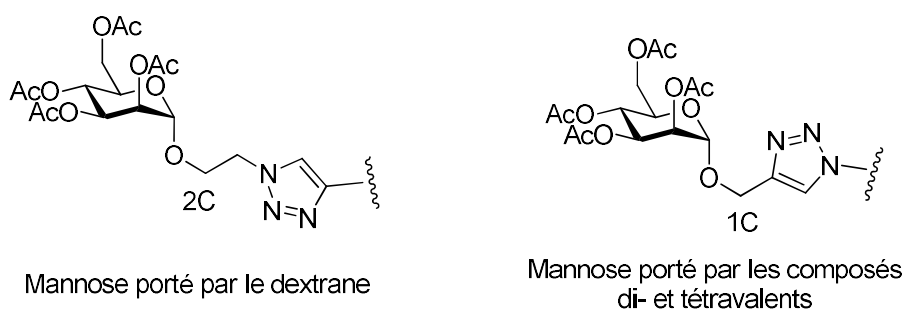


Figure 71 : Motifs mannoses portés par les différentes structures multivalentes

La faible affinité des inhibiteurs de synthèse pourrait être due à une gêne stérique dans le site actif de DC-SIGN, engendrée par le motif triazole. C'est pourquoi nous avons développé une seconde génération d'inhibiteurs avec des bras espaceurs en position anomérique de plus grande taille.

V. Inhibiteurs de seconde génération

La première approche envisagée était d'introduire une chaîne tétraéthylène glycol en position anomérique du mannose afin d'éloigner le triazole du sucre et d'augmenter la distance inter-ligands. Cette approche a été appliquée pour obtenir les structures di- et tétravalentes **109** et **110** (Figure 72).

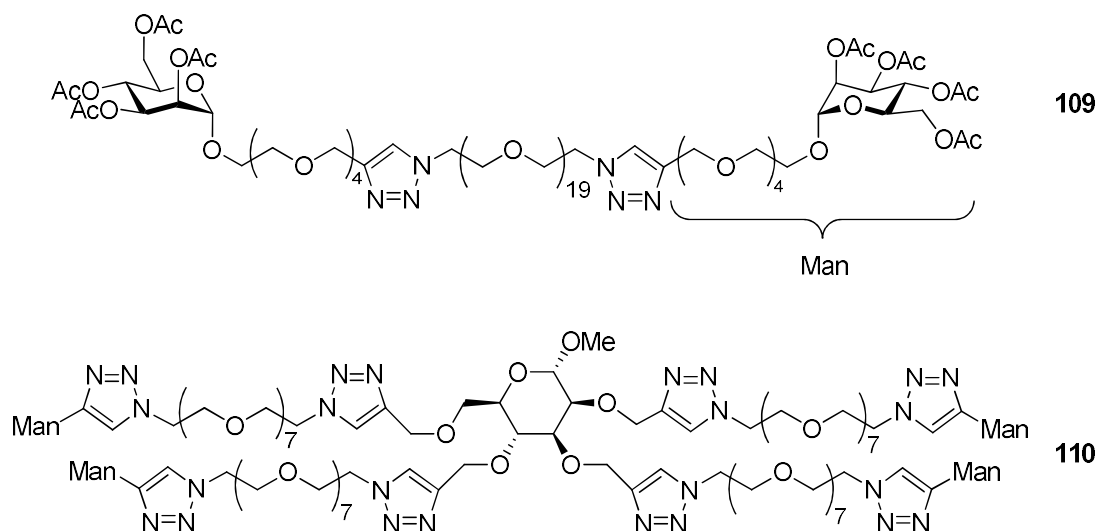


Figure 72 : inhibiteurs di et tétravalents de seconde génération

Dans le cas des composés ultravalents, nous avons greffé des mannosides par l'intermédiaire d'une chaîne à sept carbones, plus hydrophobes que les OEGs. Ces heptylmannosides avaient été précédemment développés dans le groupe pour inhiber l'adhésion de souches pathogènes d'*Escherichia coli* (Figure 73).¹

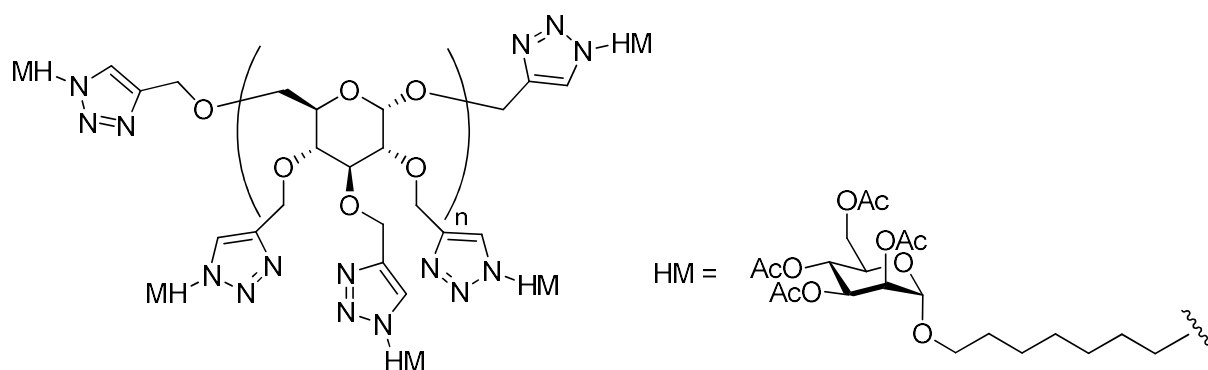


Figure 73 : Inhibiteurs ultravalents de seconde génération

1) Ligands de seconde génération

i. Synthèse du mannose OEGylé

La glycosylation du mannose peracétylé avec la chaîne tétraéthylène glycol mono-propargylée est effectuée en présence d'éthérate de trifluorure de bore dans le dichlorométhane (Schéma 41).

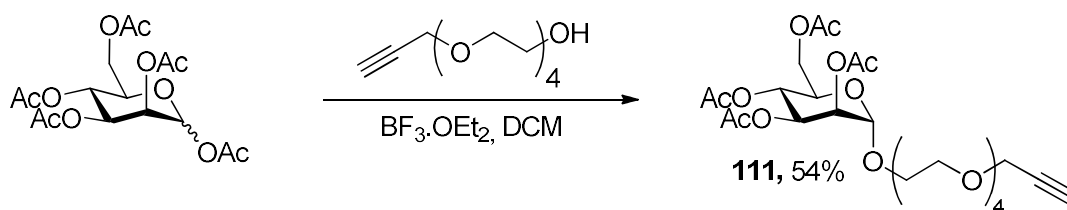


Schéma 41 : Synthèse du mannose OEGylé présentant un alcyne terminal

ii. Synthèse d'azido-heptylmannoside

L'introduction de la chaîne heptyle a été effectuée par glycosylation du mannose peracétylé avec le 7-bromoheptan-1-ol en présence de chlorure d'étain (IV) et de trifluoroacétate d'argent. Une fois la réaction complète et après traitement du brut réactionnel, le produit est engagé sans purification dans une azoturation conduisant au dérivé **112** (Schéma 42).

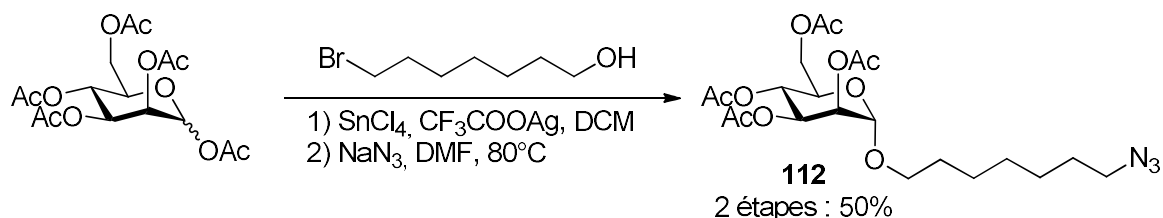


Schéma 42 : Synthèse de l'azido-heptylmannoside

L'assistance anchimérique de l'acétate en position 2 du sucre permet d'orienter la réaction de glycosylation pour former exclusivement l'anomère α .

2) Insertion des ligands sur les charpentes

Les ligands **111** et **112** ont été greffés sur les charpentes par CuAAC selon la méthode A (chauffage à 60°C) pour le composé divalent **109** et selon la méthode B (chauffage microonde à 80°C) pour le composé tétravalent **110** et les polymères **113-116** (Figure 74)

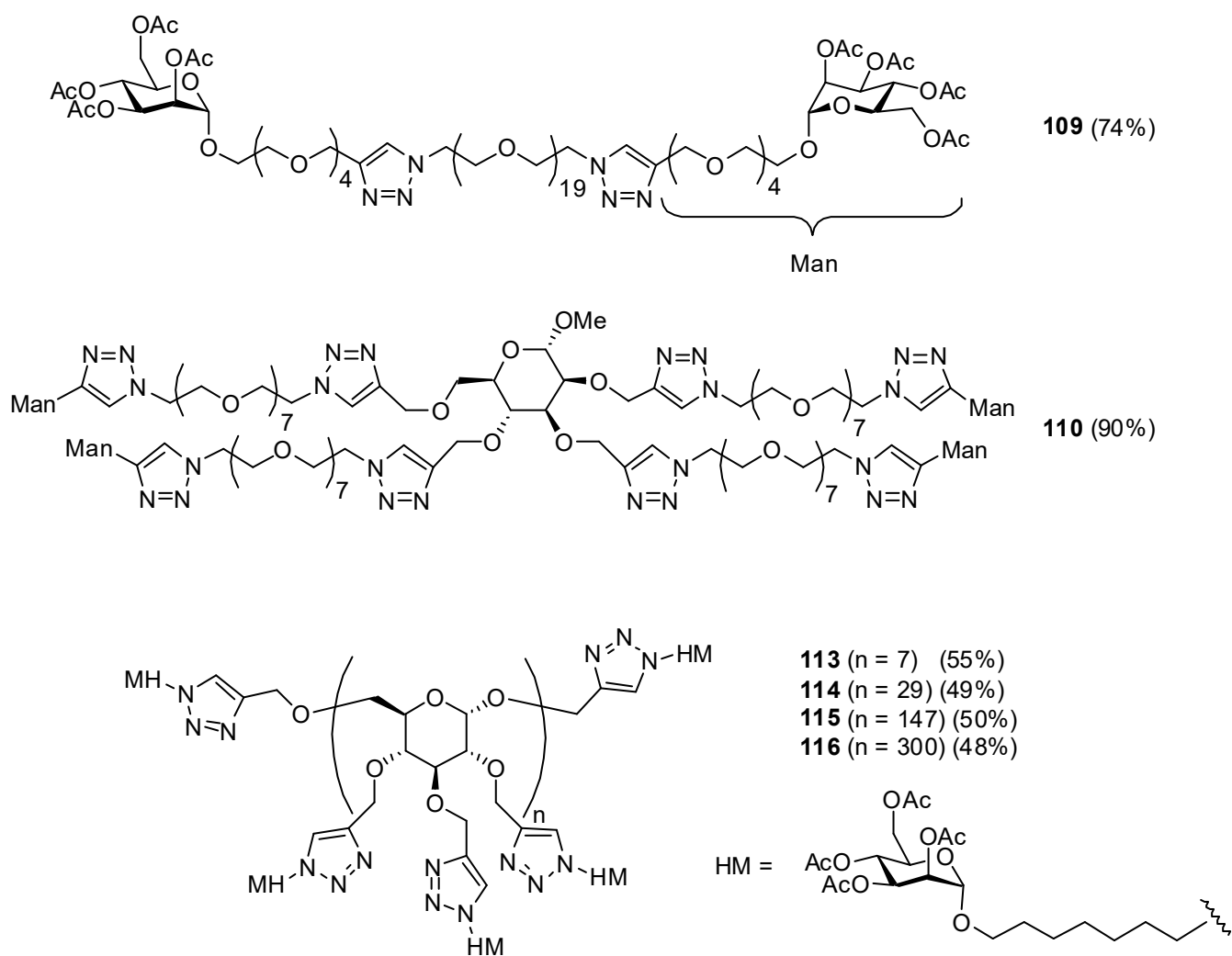


Figure 74 : Structures et rendements des structures multivalentes d'heptylmannoside et de mannose OEGylé

Deux inhibiteurs monovalents ont également été synthétisés afin de servir de référence aux deux familles distinctes de molécules. Une fois déprotégés, l'affinité des deux ligands est comparée à celle des dérivés multivalents pour déterminer les facteurs β . L'une des références est issue du couplage de l'heptylmannoside **112** avec l'alcool propargylique, l'autre de la réaction entre le mannose OEGylé **111** et le tétraéthylène glycol azoturé **32** (Figure 75).

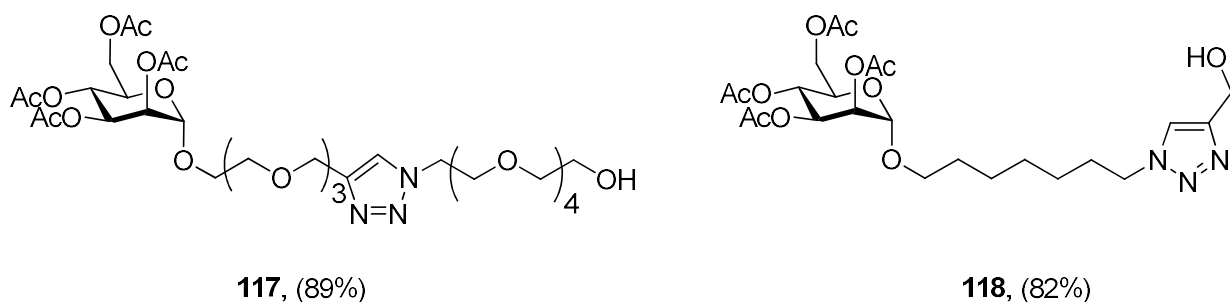


Figure 75 : Structures et rendements des mannosides monovalents obtenus par CuAAC

Les mannosides **117** et **118** ont été déprotégés en utilisant l'amberlite IRN 78 dans un mélange méthanol/eau. Les structures mono-, di- et tétravalentes **119**, **120**, **125** et **126** ont été isolées avec des rendements supérieurs à 78%. La déprotection des structures ultravalentes **121** à **124** a donné des rendements plus faibles probablement en raison de l'étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex™).

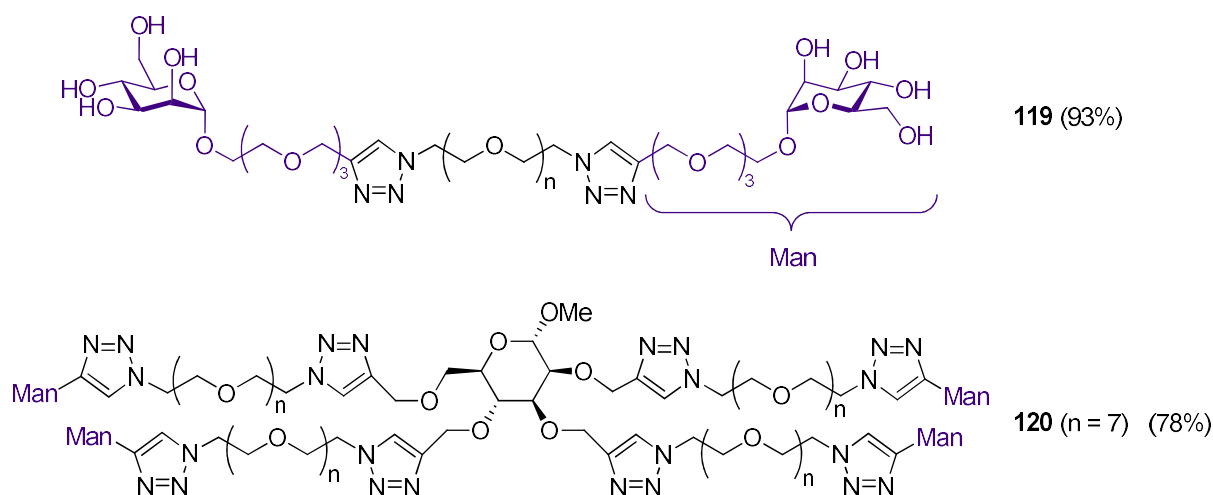


Figure 76 A : Structures et rendements des mannosides di- et tétravalents de deuxième génération après déprotection

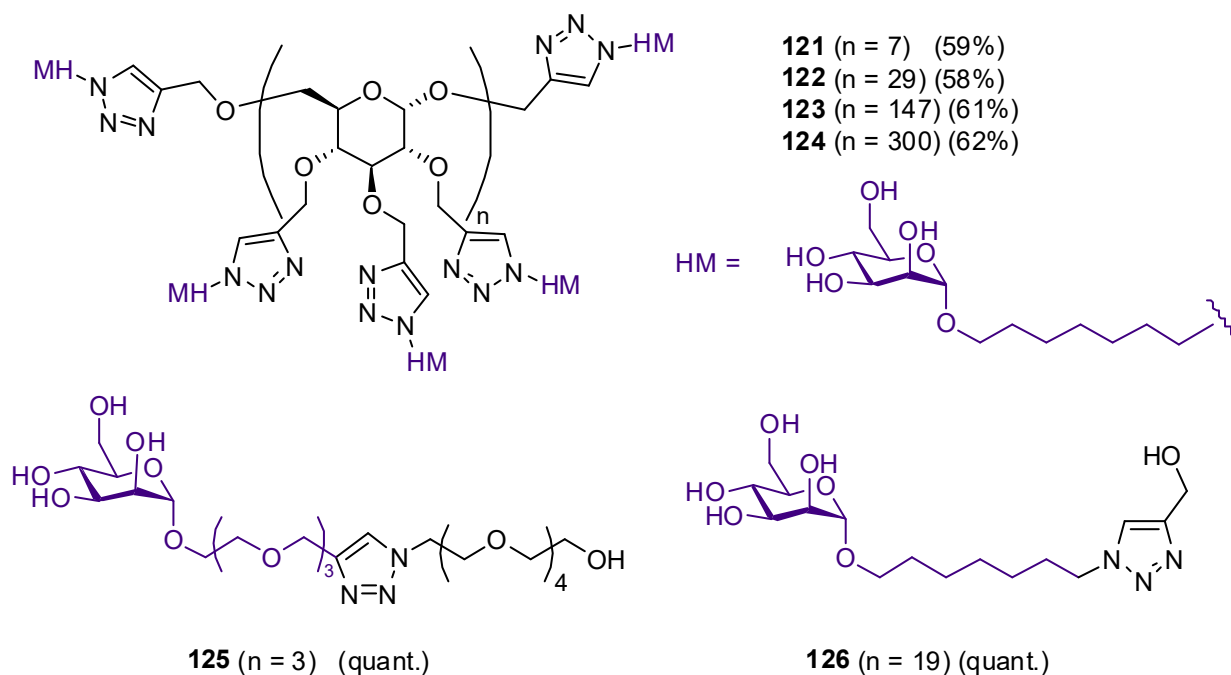


Figure 77 B : Structures et rendements des mannosides ultravalents de deuxième génération après déprotection

3) Tests d'adhésion de la gB

Les affinités des mannosides de deuxième génération pour DC-SIGN ont été évaluées par des tests d'adhésion de la gB sur les DCs comme décrit précédemment. Les courbes de titration sont représentées dans la Figure 78. La titration du composé ultravalent **124** a montré une distribution des points incohérente, probablement due aux faibles écarts des valeurs mesurées conduisant à une erreur trop importante. Ceci ne sera pas discuté davantage dans ce manuscrit.

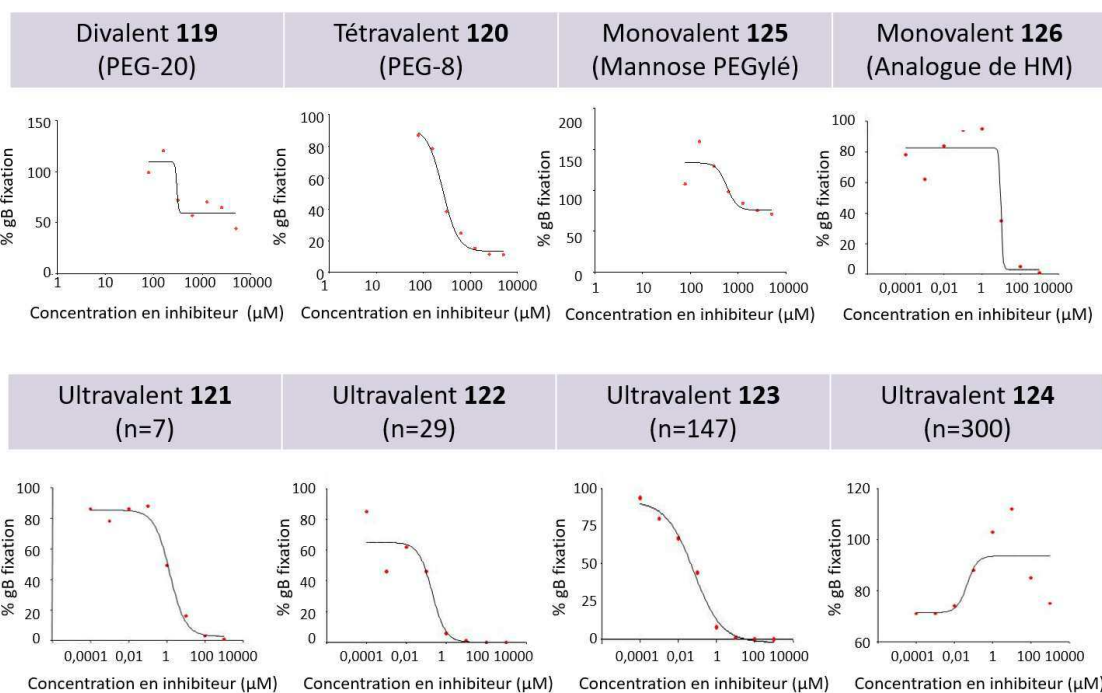


Figure 78 : Résultats des tests d'inhibition des différents composés multivalents

Les résultats montrent la très bonne affinité des dérivés d'heptylmannosides pour DC-SIGN. L'ensemble des composés basés sur ce ligand présente des IC_{50} exprimées en moles de monomère allant de 10 μM pour le composé monovalent **126** jusqu'à seulement 50 nM pour le composé **123**. En comparaison, le composé monovalent **125** n'atteint pas une inhibition de 50% de l'adhésion de la gB à une forte concentration de 1 mM. Ainsi, la référence monovalente **126** est au moins 100 fois plus affine pour DC-SIGN que le composé OEGylé **125**. Les effets β obtenus pour les structures multivalentes d'heptylmannosides sont présentés dans le Tableau 8.

composé	Monovalent 126	Ultravalent 121 (n=7)	Ultravalent 122 (n=29)	Ultravalent 123 (n=147)	Ultravalent 124 (n=300)	Tétravalent 120 (n=7)
IC_{50} (μM)	10	1	0,1	0,05	/	250
Effet β	1	3	30	60	/	/

Tableau 8 : IC_{50} et effets β estimés des composés ultravalents et tétravalent de seconde génération

Les structures **121**, **122** et **123** possèdent des IC_{50} respectifs de 1 μM , 0,1 μM et 0,05 μM . Il faut souligner que les concentrations prises en compte correspondent à une unité glucose du dextrane portant à chaque fois trois heptylmannosides ce qui donne donc des effets β de

3, 30 et 60. On peut conclure que la nature de la chaîne carbonée et la valence du ligand sont deux paramètres importants augmentant l'affinité des ligands de deuxième génération.

Même si les structures di- et tétravalentes de deuxième génération présentent des affinités beaucoup plus modérées, elles demeurent supérieures à leurs homologues de première génération. Le composé tétravalent **120** possède une IC_{50} d'environ 250 μM alors que les composés tétravalents **105** et **107** ont des IC_{50} comprises entre 1 et 10 mM.

VI. Conclusion

Les différentes études d'interaction ont mis en évidence le faible pouvoir inhibiteur des composés de première génération. Il est probable que ces résultats médiocres soient dus à la présence du triazole à proximité de la liaison anomérique du mannose. Ces résultats sont d'autant plus surprenants puisque des mannosides multivalent basés sur des charpentes fullerènes présentant un triazole à proximité de l'oxygène anomérique avaient été synthétisés par Luczkowiak et al. avaient présenté un profil d'interaction très intéressant avec une IC_{50} de 2 μM pour DC-SIGN (Figure 79).¹⁶³

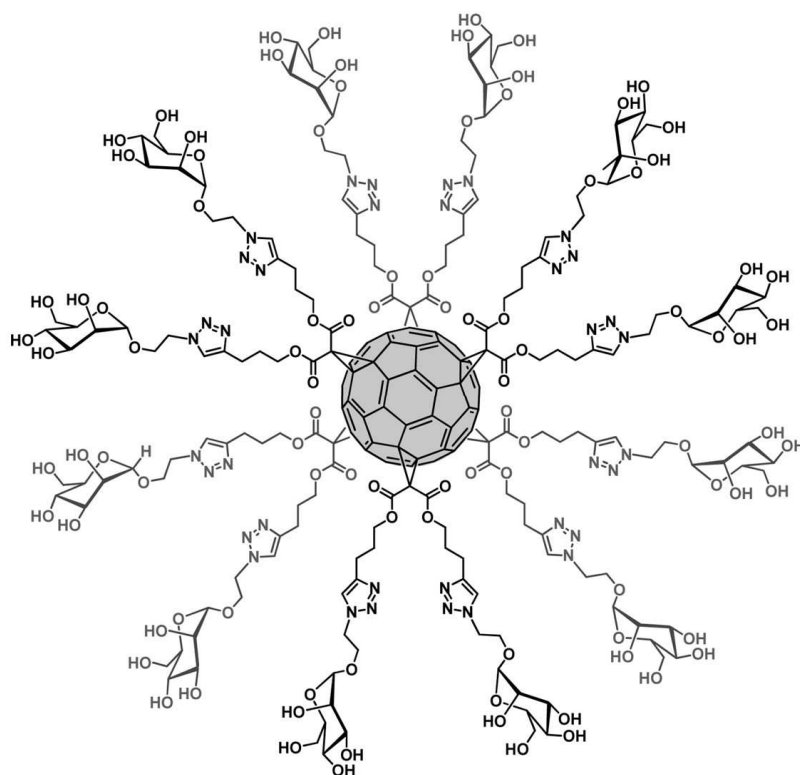
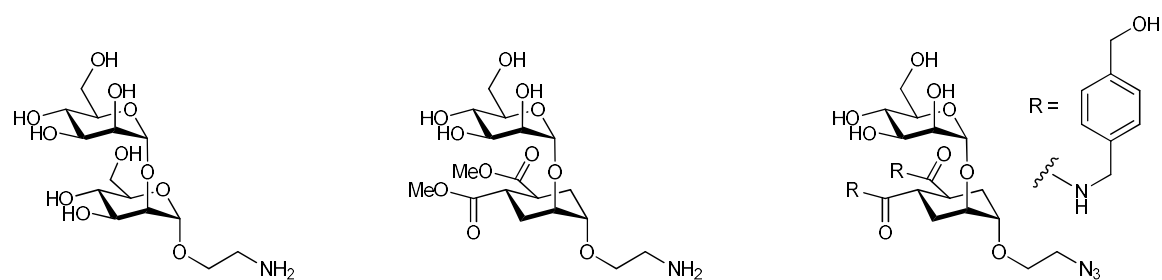


Figure 79 : Glycofullerene développé par Luczkowiak et al. avec une IC_{50} de 2 μM

Au contraire, l'utilisation d'une chaîne heptyle en position anomérique a permis d'augmenter considérablement l'affinité des mannosides multivalents pour leur cible jusqu'à des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaires pour le composé **123** (effet β de 60 pour une IC_{50} de 50 nM). La simplicité de synthèse et de fonctionnalisation de l'heptylmannoside et sa forte affinité pour DC-SIGN en font un synthon particulièrement intéressant pour la construction de ligands multivalents pour inhiber la voie d'entrée virale sur les DC. En effet, avec une IC_{50} de 10 μ M, il semblerait que ce ligand soit un bon concurrent les di-mannosides décrits par Fieschi et Bernardi. Ceux-ci avaient été élaborés pour inhiber l'adhésion du VIH dans un test différent et possèdent des IC_{50} supérieures à 320 μ M (Figure 80).¹⁴⁸



Dimannoside **34**, IC_{50} = 1,91 mM Pseudo-dimannoside **35**, IC_{50} = 0,62 mM Pseudo-dimannoside **36**, IC_{50} = 0,32 mM

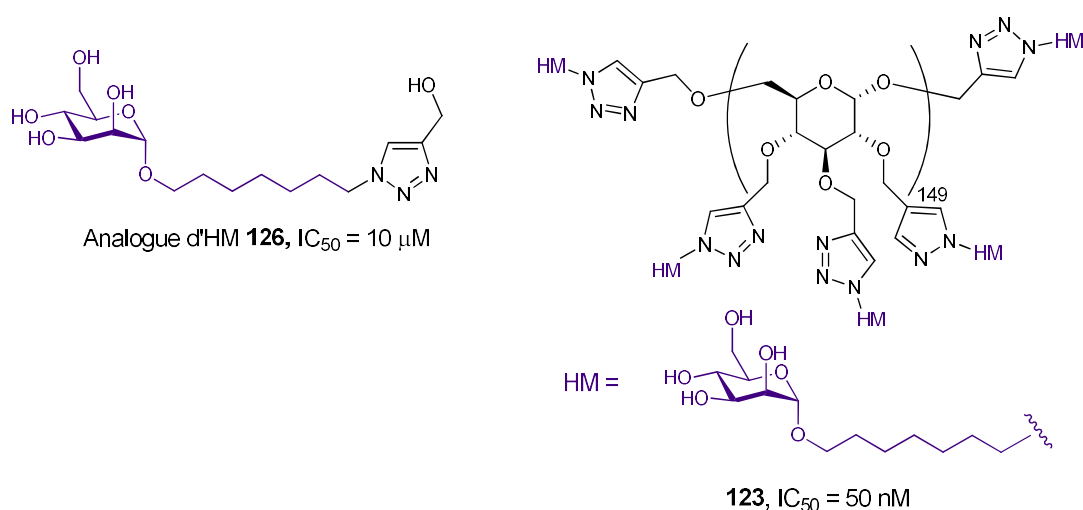


Figure 80 : Di-mannoside **34** et pseudo di-mannosides **35** et **36** présentant des IC_{50} respectifs de 1,91 ; 0,62 et 0,32 mM supérieurs à ceux du dérivé d'HM **126** (IC_{50} de 10 μ M).¹⁴⁸ L'insertion de ce ligand sur une charpente dextrane a permis d'atteindre une IC_{50} de 50 nM avec le composé **123**.

Inhibiteurs multivalents de récepteurs nicotiques

VII. Récepteurs à l'acétylcholine et maladies neurodégénératives

1) Fonction physiologique

Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs) ont un rôle essentiel dans la transmission de l'influx nerveux. Ils assurent une neurotransmission rapide au sein du système nerveux central et sont notamment impliqués dans des phénomènes tels que le mouvement, la détection de la douleur ou encore la mémoire.

Les nAChRs font partie de la famille des récepteurs transmembranaires ionotropes, c'est-à-dire qu'ils permettent le passage d'ions sodium et potassium lorsqu'un ligand vient activer leur ouverture. Dans le cas des nAChRs, le ligand endogène est l'acétylcholine qui est présent au niveau de vésicules à l'intérieur du neurone présynaptique. Lors de l'influx nerveux, ces vésicules vont migrer vers la paroi du neurone pour libérer l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique. Elle sera alors captée par les nAChRs qui vont s'ouvrir pour laisser circuler les ions Na^+ et K^+ à travers la membrane du neurone (Figure 81).

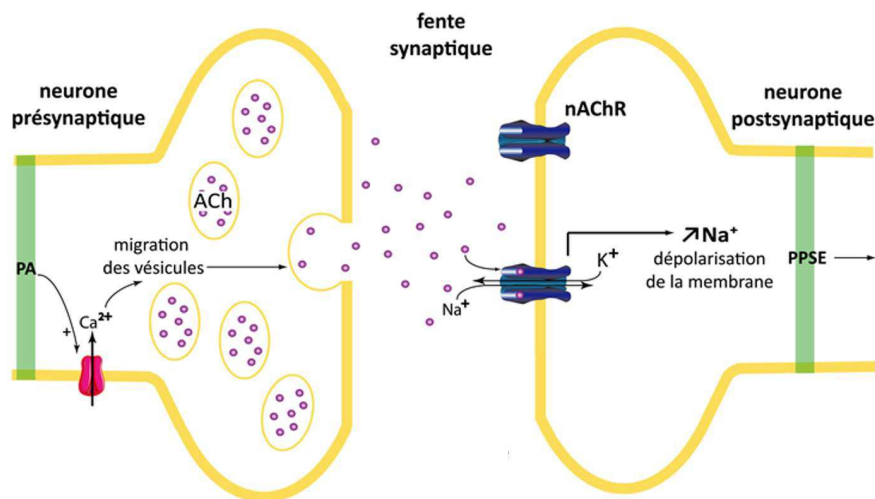


Figure 81 : Circulation de l'acétylcholine depuis le neurone présynaptique vers les nAChRs du neurone postsynaptique (PA = potentiel d'action, phénomène déclencheur de l'influx nerveux).¹⁶⁴

Le passage des ions sodium crée une dépolarisation de la membrane et entraîne un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) permettant de transmettre l'information nerveuse au neurone post-synaptique. Les nAChRs sont essentiels pour l'ensemble de la physiologie nerveuse et assurent le fonctionnement de nombreux organes comme les muscles squelettiques, les organes du système nerveux autonome ou encore du système sensoriel. Ils

sont particulièrement présents au niveau du système nerveux central (SNC) qui est le centre de réception et de transmission de l'influx nerveux.

2) Structure des récepteurs nicotiques neuronaux

Les récepteurs nicotiques neuronaux ont été caractérisés depuis la fin des années 70 lors d'études sur des récepteurs de poissons torpilles chez qui les nAChRs sont très abondants.^{165,166} Ils sont de types pentamériques composés de sous-unités comprenant : $\alpha 1$ à 10, $\beta 1$ à 4, γ , δ , et ϵ . Les nAChRs neuronaux sont uniquement composés de sous unités $\alpha 2$ à 10 et $\beta 1$ à 4. Les récepteurs peuvent être de type homomérique lorsque toutes les sous-unités sont identiques ou hétéromériques dans le cas contraire. Il existe ainsi une multitude de récepteurs nicotiques résultant de l'association des différentes sous-unités existantes (Figure 82A). L'organisation des nAChRs s'articule autour de trois domaines. Un domaine intracellulaire, un domaine s'étendant dans la partie membranaire et un dernier extracellulaire comprenant le site de fixation de l'acétylcholine (Figure 82B)

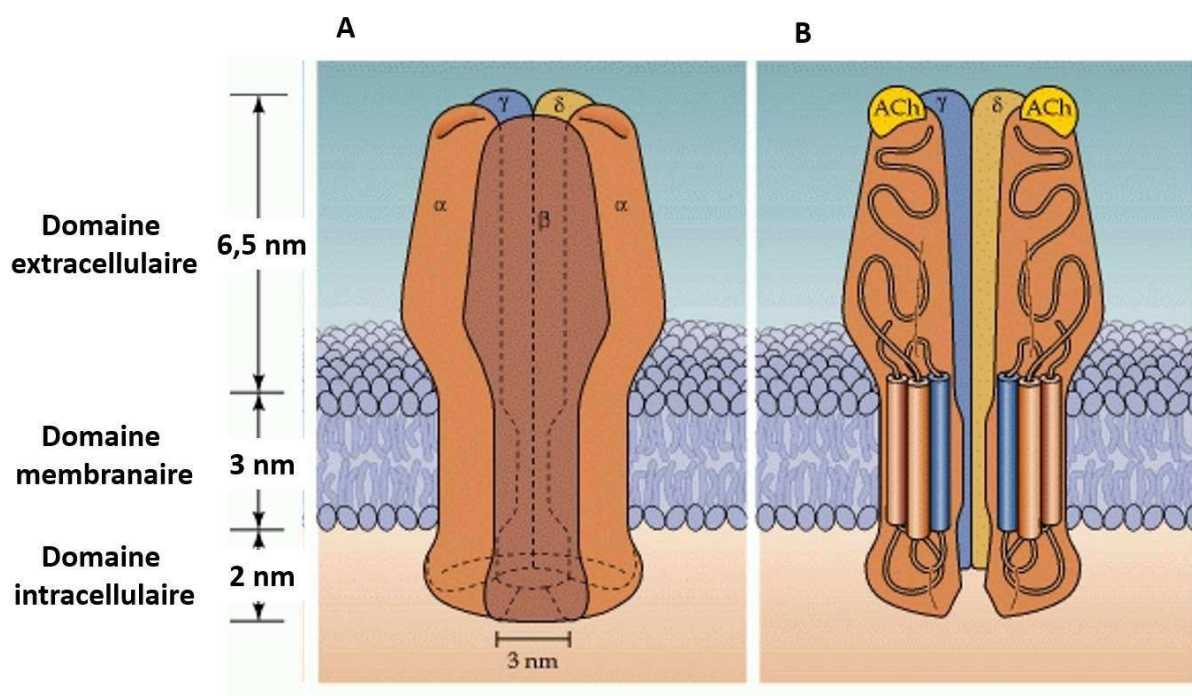


Figure 82 : Structure et organisation des récepteurs nicotiques ¹⁶⁷

Le site de fixation de l'acétylcholine se situe entre une sous-unité α et une seconde sous-unité non spécifique (α ou β) (Figure 83). Cela s'explique par la présence de trois boucles A, B et C dans le domaine extracellulaire de la sous-unité α créant une poche hydrophobe notamment du fait de la présence d'acides aminés contenant des cycles aromatiques (tyrosine et tryptophane). Cette poche est nécessaire pour la fixation de l'acétylcholine et est complétée par trois boucles D, E et F issues de la seconde sous-unité.

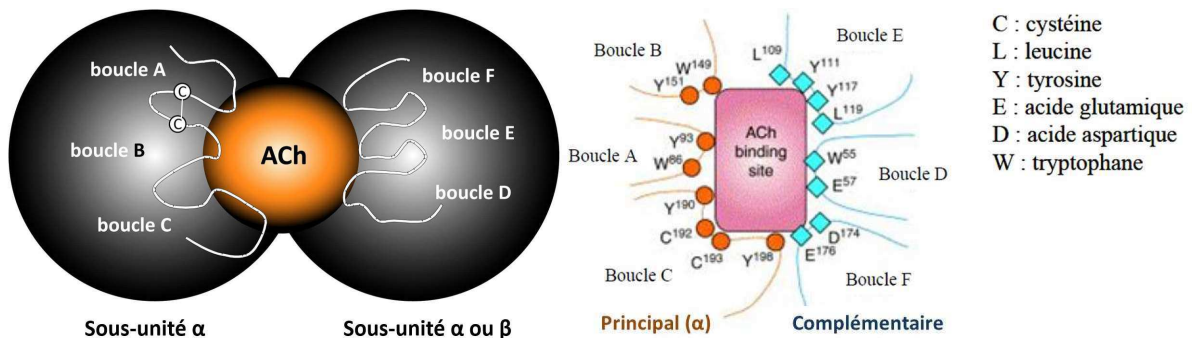


Figure 83 : Poche hydrophobe composée de trois boucles A, B et C issues du domaine extracellulaire d'une sous-unité α et de trois boucles D, E et F issues d'une seconde sous-unité. Cette poche est le site de fixation de l'acétylcholine.^{164,168}

Ainsi, selon leur composition en sous-unités α , les nAChRs peuvent comporter plusieurs sites de fixation, jusqu'à cinq pour des récepteurs homomériques.

3) Les maladies neurodégénératives

A cause de leur implication au sein de différentes fonctions physiologiques, les nAChRs constituent une cible thérapeutique importante pour le traitement de nombreuses pathologies liées notamment au SNC telles que les troubles comportementaux (schizophrénie, dépression, déficit de l'attention chez l'enfant) ou les maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson).

Les maladies neurodégénératives touchaient en France en 2014 plus d'un million de personnes selon les chiffres donnés dans le cadre du plan maladies neurodégénératives 2014-2019.¹⁶⁹ Ce sont des maladies chroniques invalidantes dont l'évolution est lente et discrète. Elles affectent notamment les neurones par une détérioration de leur fonction. Les deux pathologies les plus courantes sont la maladie d'Alzheimer avec plus de 850 000 cas répertoriés en France en 2014 suivie de la maladie de Parkinson avec plus de 150 000 cas.

i. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer qui se caractérise essentiellement par des troubles de la mémoire trouve sa cause dans l'altération des neurones. Une formation de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements de protéines tau hyperphosphorylées à l'extérieur des neurones est mise en cause.¹⁷⁰ De plus, une diminution de la concentration en acétylcholine dans les vésicules synaptiques a été observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.¹⁷¹

ii. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la conséquence d'une perte importante de neurones du système nerveux central liés à la libération de dopamine. Les symptômes sont des tremblements, une lenteur des mouvements et des troubles de l'équilibre et de la coordination.¹⁷² Plusieurs études ont montré l'importance des nAChRs dans la maladie de Parkinson puisque l'évolution de la maladie pouvait être corrélée avec une baisse du nombre de récepteurs nicotiques.¹⁷³ Par contre, la consommation de tabac est un facteur diminuant le risque de développement de la maladie de Parkinson.

4) Nicotine et dérivés nicotiques

La nicotine est un agoniste de l'acétylcholine puisqu'elle possède le même site de fixation au sein des nAChRs. L'acétylcholine a une structure linéaire avec à une extrémité un ester accepteur de liaison hydrogène (HBA) et à l'autre extrémité, à 5,9 Å, un ammonium quaternaire (N⁺) (modèle de Beers et Reich, Figure 84A).¹⁷⁴ La nicotine quant à elle possède un noyau pyridine, accepteur de liaison hydrogène, et un cycle N-méthylpyrrolidine qui peut se protoner à pH physiologique pour donner un ammonium. Ces sites qui permettent de mimer l'acétylcholine ont mis en évidence un modèle général d'agoniste de l'acétylcholine déterminé par Sheridan en 1986. Ce modèle se compose de l'ammonium et de l'accepteur de liaison hydrogène liés l'un et l'autre à un centre aryle ou carbonyle noté C (modèle de Sheridan, Figure 84B).¹⁷⁵

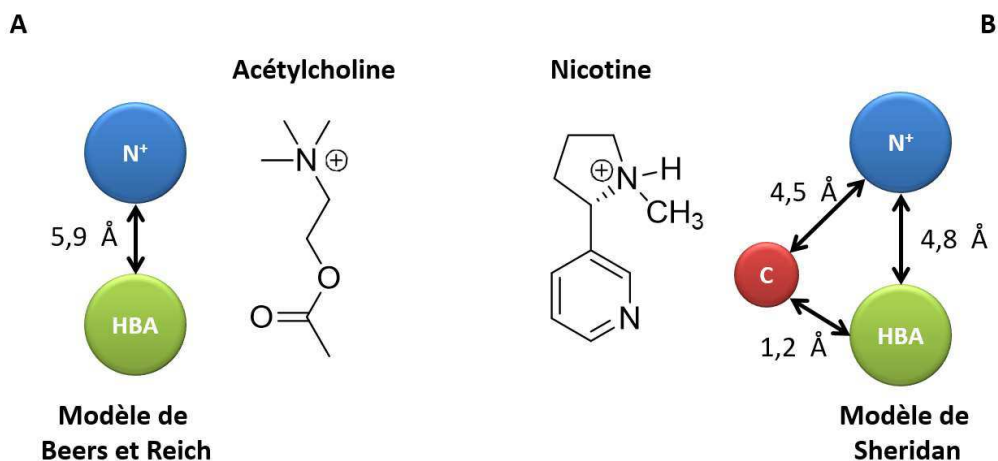


Figure 84 : Modèle de Beers et Reich caractérisant la structure de l'acétylcholine (A) et modèle de Sheridan caractérisant la structure de la nicotine (B).

Cela a servi de base pour l'élaboration de différents analogues de la nicotine qui sont arrivés jusqu'en phase clinique grâce à leur activité sur des familles variées de nAChRs. Cependant, leurs développements ont été plus ou moins stoppés à cause d'effets secondaires trop importants (Figure 85).

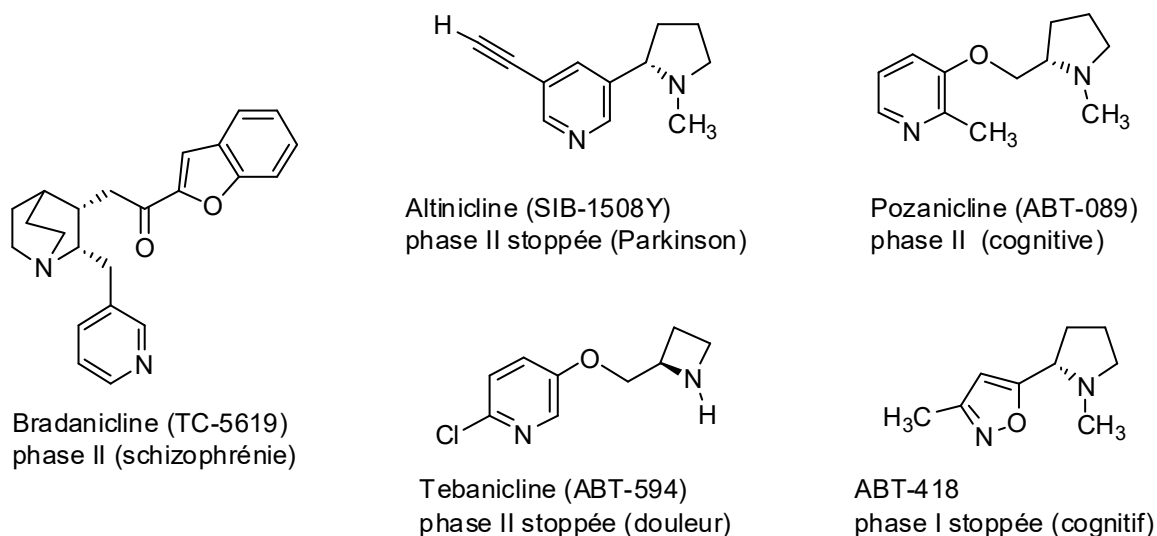


Figure 85 : Dérivés nicotiniques ayant atteint la phase d'études cliniques dont le développement est actuellement en cours ou stoppé à cause d'effets secondaires importants

Les efforts de la recherche se portent actuellement vers un développement de composés permettant de cibler plus spécifiquement un seul sous-type de récepteurs nicotiniques de manière à limiter les effets secondaires.

Compte tenu du caractère multimérique des nAChRs qui peuvent présenter jusqu'à cinq sites d'interaction, une stratégie multivalente pourrait être une option pour atteindre une

bonne sélectivité. Cependant, il n'existe à notre connaissance aucun dérivé multivalent de ligand nicotinique.

5) L'altinicline ((S)-SIB-1508Y)

Dans le cas d'un développement de dérivés multivalents, la structure de l'altinicline est particulièrement intéressante. Cette molécule a été décrite à la fin des années 1990 pour son activité agoniste de l'acétylcholine notamment sur le sous-type $\alpha 4\beta 2$ des nAChRs. Ce dérivé permet notamment de stimuler les neurones dopaminergiques et ainsi de déclencher la libération de dopamine et d'acétylcholine. Cela lui a valu un développement jusqu'en phase clinique II dans le cas du traitement de la maladie de Parkinson.

Une étude de Cosford *et al.* de 1996 a mis en évidence que l'altinicline possède une affinité similaire à la nicotine pour les nAChRs.¹⁷⁶ Pour cela, les auteurs ont utilisé une membrane corticale de rat exprimant différents sous-types de nAChRs sur laquelle ils ont évalué le déplacement de la nicotine marquée ($[^3\text{H}]$ Nicotine) en présence de différents dérivés nicotinniques. Ainsi, ils ont évalué les IC_{50} de l'altinicline sous forme racémique ou énantiopure (R et S) ainsi que de la nicotine et d'un dérivé où le noyau pyridine est méthylé. (Tableau 9).

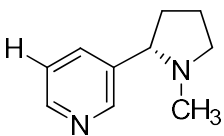
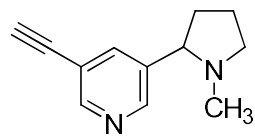
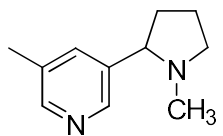
Composé					
	Nicotine	Altinicline			
Stéréo.	/	Rac.	S	R	Rac.
IC_{50} (nM)	$4 \pm 1,2$	$4,6 \pm 0,9$	$3 \pm 0,5$	$75 \pm 1,7$	$11 \pm 1,7$

Tableau 9 : Evaluation des IC_{50} de l'altinicline sous forme racémique ou énantiopure en comparaison avec la nicotine et un dérivé nicotinnique méthylé

Ce qui transparait ici est que l'énantiomère S de l'altinicline se fixe aux nAChRs avec une force comparable à la nicotine avec des IC_{50} respectivement de 3 et 4 nM. Enfin, la comparaison avec l'analogue méthylé montre que la présence de la triple liaison est bénéfique pour l'interaction avec les nAChRs puisque l' IC_{50} du dérivé méthylé est de 11 sous forme racémique.

Cosford *et al.* ont ensuite évalué la sélectivité de l'altinicline pour différents sous-types de récepteurs nicotiques. Pour cela, ils ont exprimé à la surface de lignées cellulaires un seul sous-type de nAChRs recombinants. Ils ont ainsi comparé les sélectivités entre les sous-types $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$ (Tableau 10).

EC ₅₀ (μM) en fonction de différents sous-types de nAChRs					
composé	$\alpha 2\beta 4$	$\alpha 3\beta 4$	$\alpha 4\beta 4$	$\alpha 4\beta 2$	$\alpha 1\beta 1\gamma \delta$
Nicotine	10 ± 2	51 ± 2	7,1 ± 1,8	2,1 ± 0,6	65 ± 18
Altinicline	15 ± 3,6	41 ± 7	25 ± 7	2,6 ± 1	52 ± 6

Tableau 10 : Evaluation de la sélectivité du sous-type de nAChR de l'altinicline en comparaison avec la nicotine

L'altinicline présente globalement une sélectivité comparable à la nicotine pour les sous-types de récepteurs nicotiques avec une EC₅₀ le plus faible pour les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ (2,6 μM pour l'altinicline contre 2,1 μM pour la nicotine). Par contre, les EC₅₀ de l'altinicline pour les récepteurs $\alpha 2\beta 4$ et $\alpha 4\beta 4$ sont plus élevés en comparaison avec la nicotine (15 et 25 contre 10 et 7,1). Cet écart d'affinité entre les différents récepteurs confère à l'altinicline un caractère encore plus sélectif pour le sous-type $\alpha 4\beta 2$.

Malgré une bonne sélectivité qui a permis à cette molécule d'arriver en phase clinique, le développement de l'altinicline s'est arrêté en phase II à cause d'effets secondaires tels que des étourdissements et des vertiges.¹⁷⁷. Nous nous sommes intéressés à ce composé car sa synthèse a été décrite en détails par Cosford *et al.* De plus, l'alcyne présent sur l'altinicline nous permettait de la greffer facilement sur une charpente multivalente.

6) Stratégie multivalente et structures envisagées

Si l'altinicline possède une bonne sélectivité pour les récepteurs $\alpha 4\beta 2$, il est possible qu'après son greffage sur une charpente multivalente par un couplage CuAAC, la modification de la triple liaison en triazole entraîne un changement d'affinité et de sélectivité pour les différents sous-types de récepteurs. Même si c'est le cas, l'intérêt potentiel de la multivalence pourra toujours être évalué en comparant l'affinité relative des ligands multivalents avec une référence monovalente adéquate comportant la fonction triazole.

Dans notre approche, nous avons souhaité développer une série de composés divalents et heptavalents qui pourrait être évaluée sur différents sous-types de nAChRs. Nous avons employé une gamme d'espaceurs de type OEGs diazoturés (4, 8, 12, 20 et 28 unités EG) pour synthétiser les composés divalents et une β -cyclodextrine comportant sept azotures pour former un dérivé heptavalent (Figure 86). Ces composés ont été développés pour évaluer le concept de la multivalence sur les récepteurs nicotiniques.

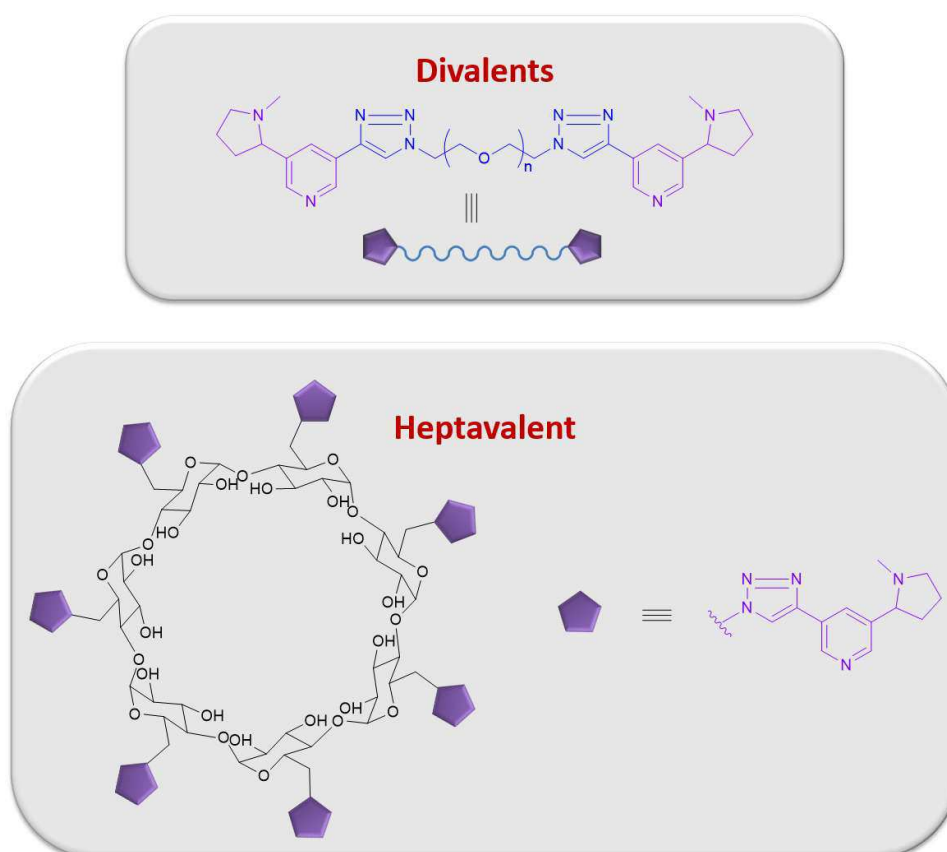


Figure 86 : structures nicotiniques di- et heptavalentes envisagées

L'évaluation des activités antagonistes sera réalisée en collaboration avec le Dr. Araoz de l'institut de Neurobiologie Alfred Fessard de Gif-sur-Yvette qui possède le matériel nécessaire pour l'évaluation de l'affinité de ligands sur des sous-types variés de nAChRs.

7) Synthèse du SIB

La synthèse que nous avons suivie pour obtenir l'altinicline s'inspire de celle décrite par Cosford *et al.* en 1996.¹⁷⁶ Celle-ci repose sur l'utilisation de 3 synthons : l'acide 5-bromonicotinique, la vinylpyrrolidinone et le 2-méthyl-3-butyn-2-ol (Schéma 43).

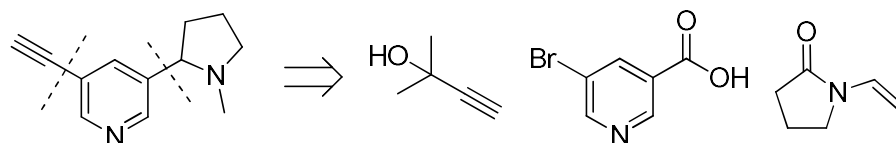


Schéma 43 : Rétrosynthèse de l'altinicline issu de réactions de condensation entre l'acide 5-bromonicotinique, la vinylpyrrolidinone et le 2-méthyl-3-butyn-2-ol

i. Couplage entre l'acide 5-bromonicotinique et la vinylpyrrolidinone

La première étape de la synthèse est le couplage entre le cycle pyridine et le dérivé pyrrolidinone employé sous forme de lactame, de manière à bénéficier du caractère acide du proton en α du carbonyle. Après déprotonation, l'anion résultant peut aisément attaquer un site électrophile tel qu'un carbonyle d'ester. La première étape a donc consisté à activer l'acide bromonicotinique sous forme d'ester éthylique. L'acide est tout d'abord activé en chlorure d'acide en présence de chlorure de thionyle pour former l'ester **127** avec un rendement de 97% après reflux dans l'éthanol. Cet intermédiaire est ensuite engagé dans un couplage avec la vinylpyrrolidinone en présence de LiHMDS pour former le dérivé nicotinique **128** avec un rendement de 95% (Schéma 44).

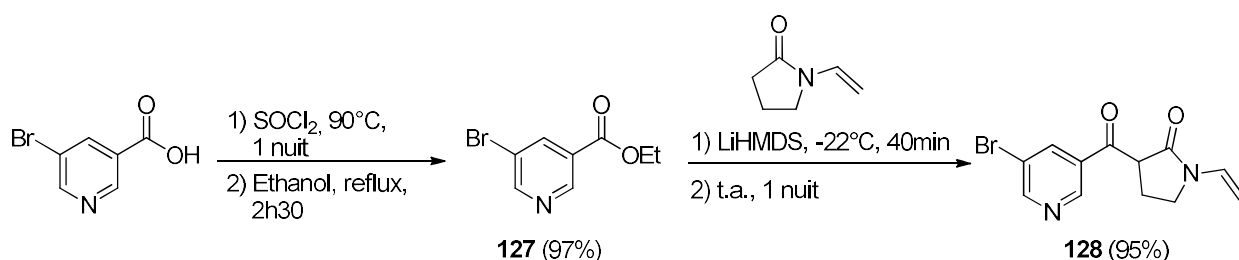


Schéma 44 : Activation de l'acide nicotinique en ester puis couplage avec la vinylpyrrolidinone

L'étape suivante est une décarboxylation et fermeture de cycle du composé **128** au reflux de l'acide chlorhydrique pour obtenir l'imine **129**. Nous avons obtenu un rendement modeste de 31%, contrairement au rendement de 71% annoncé dans la publication de Cosford *et al.* La raison probable est une certaine instabilité du composé **128** qui se dégrade rapidement une fois isolé (Schéma 45).

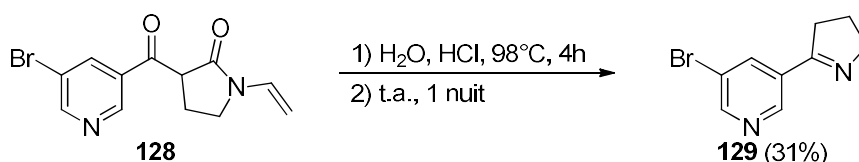


Schéma 45 : Décarboxylation et fermeture de cycle conduisant à l'imine 129

Nous avons solutionné ce problème en effectuant cette étape sans isoler préalablement le composé **128**. Le dérivé **129** est obtenu avec un rendement de 85% sur deux étapes, supérieur au rendement de 71% annoncé par Cosford *et al.* pour la seule deuxième étape.

ii. Synthèse du dérivé bromonicotinique

Le composé **129** est ensuite engagé dans une étape de réduction de l'imine de manière à obtenir l'amine correspondante. Pour cela, Cosford *et al.* préconisent l'utilisation de borohydrure de sodium comme agent réducteur à -40°C . Cependant, les premières tentatives pour reproduire cette étape de synthèse ont donné uniquement un sous-produit dont les analyses par RMN témoignent d'une structure proche du produit attendu mais que nous ne sommes pas parvenus à interpréter. Nous avons essayé un protocole décrit par Jacob *et al.* dans la synthèse de dérivés nicotiniques marqués au deutérium.¹⁷⁸ La température réactionnelle est plus basse (-78°C), et l'ajout du borohydrure de sodium est effectué par faibles portions sur une durée de 40 minutes avant retour à température ambiante. En employant ce protocole plus « doux », nous sommes parvenus à synthétiser le dérivé **130** avec un rendement de 89% (Schéma 46).

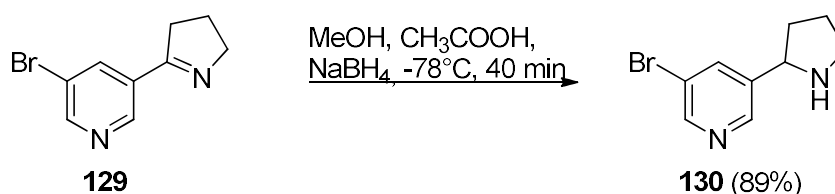


Schéma 46 : Réduction de la fonction imine en amine

Ce composé a ensuite été engagé dans une étape de méthylation de l'amine en présence d'acide formique et de formaldéhyde pour conduire à la bromonicotine **131** avec un rendement de 92 % (Schéma 47).

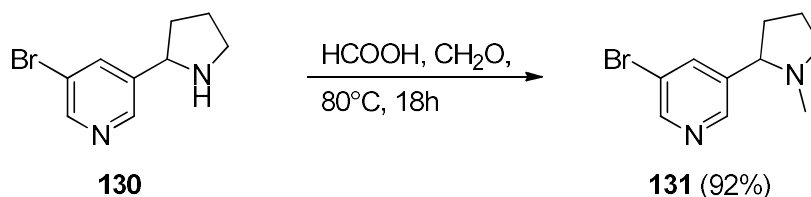


Schéma 47 : Méthylation de l'amine de la pyrrolidine

iii. Insertion de la triple liaison

Pour introduire la triple liaison sur le cycle pyridine, le dérivé bromé **131** est engagé dans un couplage de Sonogashira avec le 2-méthyl-3-butyn-2-ol. Dans un premier temps, le composé **131** est mis en présence d'un mélange contenant du palladium sur charbon de manière à opérer la première étape d'addition oxydante. L'alcyne est ensuite additionné pour permettre le couplage et conduire au synthon **132** avec un rendement de 90% (Schéma 48).

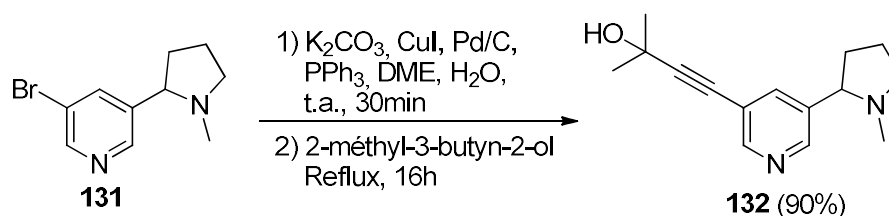


Schéma 48 : Couplage de Sonogashira entre le dérivé nicotinique **131** et le 2-méthyl-3-butyn-2-ol.

Finalement l'alcyne vrai est déprotégé en conditions basiques en présence de NaH au reflux du toluène de manière à éliminer par distillation l'acétone formée au cours de la réaction. Dans ces conditions, nous avons obtenu l'altinicline **133** avec un rendement de 91% (Schéma 49).

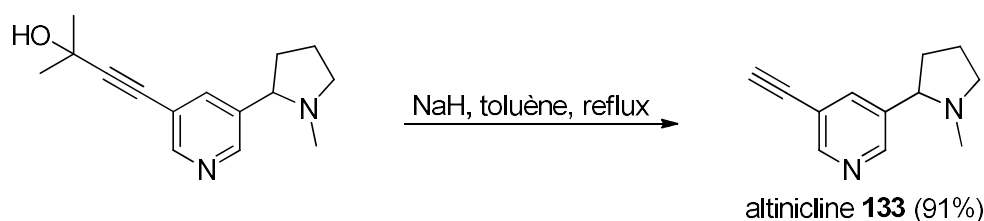


Schéma 49 : Déprotection de l'alcyne conduisant à l'altinicline **133**

8) Composés multivalents

i. Synthèse de dérivés nicotiniques divalents

Nous avons eu recours à la série des OEGs diazides de 4, 8, 12, 20 et 28 unités (cf chapitre II.2)1)i, composés **1** à **5**) pour développer les dérivés nicotiniques divalents. Nous avons

employé la CuAAC selon la méthode A (sulfate de cuivre à 60°C pendant 16 h) afin de synthétiser les produits **134** à **138** souhaités avec des rendements compris entre 75 et 91% (Schéma 50).

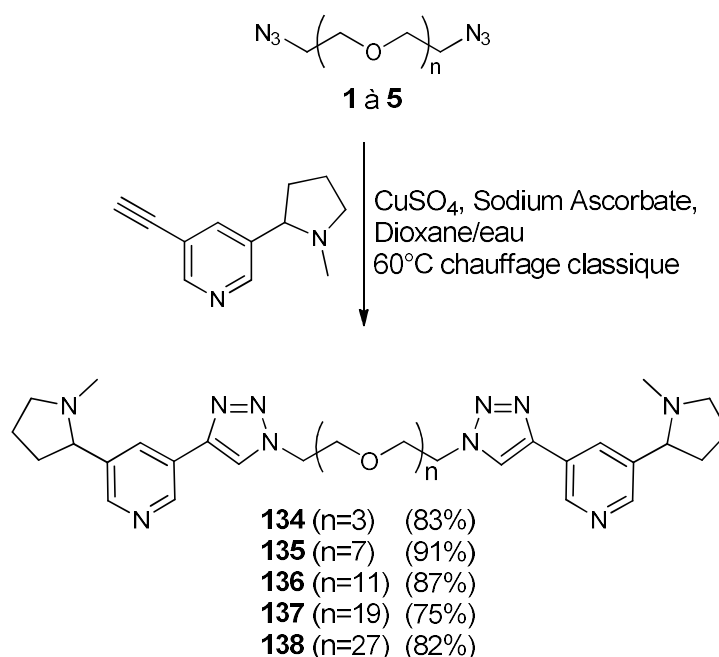


Schéma 50 : synthèse des dérivés nicotiniques divalents

Lors de cette synthèse, nous avons remarqué une certaine instabilité de ces premiers dérivés de l'altinicline avec l'apparition d'une coloration brune des échantillons. Pour pallier ce problème, nous les avons protonés en présence d'HCl pour les conserver sous forme de chlorure d'ammonium sous laquelle ils se sont révélés bien plus stables.

ii. Synthèse du dérivé heptavalent

La méthode A de CuAAC nous a permis d'introduire l'altinicline **133** sur une charpente de β -cyclodextrine heptaazoturée avec un rendement de 88%. Les groupements acétate sont ensuite éliminés en présence de résine basique IRN 78 dans un mélange méthanol/eau pour former le produit **140** avec un rendement quantitatif (Schéma 51).

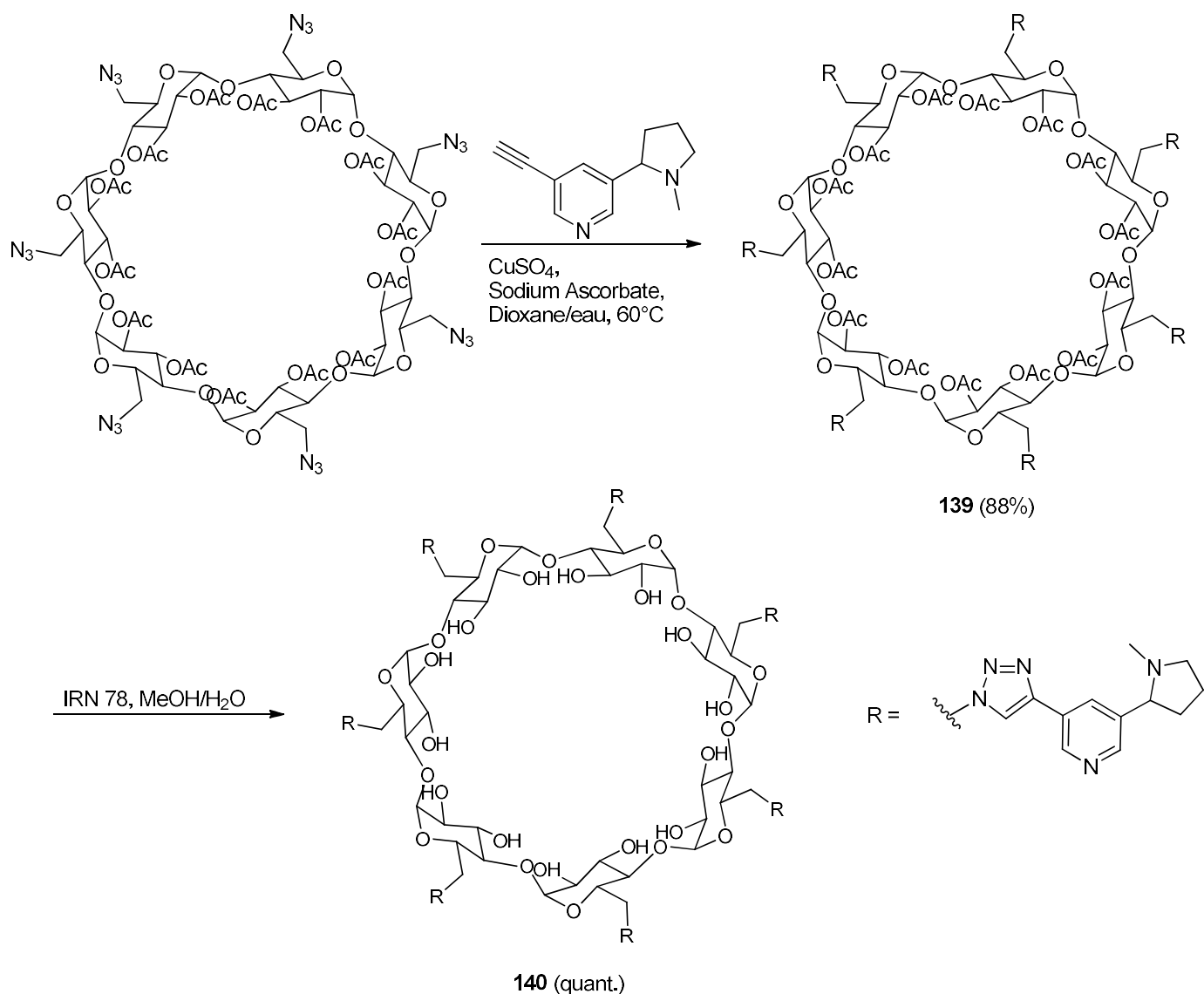


Schéma 51 : Synthèse du dérivé heptavalent de l'altinicline sur une charpente β -cyclodextrine

Ce dérivé nicotinique a également été protoné au niveau des azotes de manière à prévenir sa dégradation.

iii. Dérivés nicotiniques monovalents

Afin de disposer de structures monovalentes pour évaluer l'effet β des structures multivalentes, l'altinicline a été greffée sur un tétraéthylène glycol azoturé ainsi que sur une β -cyclodextrine monoazoturée. Nous avons souhaité intégrer une référence monovalente avec un cœur cyclodextrine afin de s'assurer qu'un éventuel effet β observé avec le composé heptavalent **140** ne soit pas dû à des interactions non spécifiques avec la charpente.

La méthode A de CuAAC puis une étape de déprotection avec l'IRN 78 (uniquement pour la structure cyclodextrine) nous a permis d'accéder aux composés **141** et **142** (Figure 87).

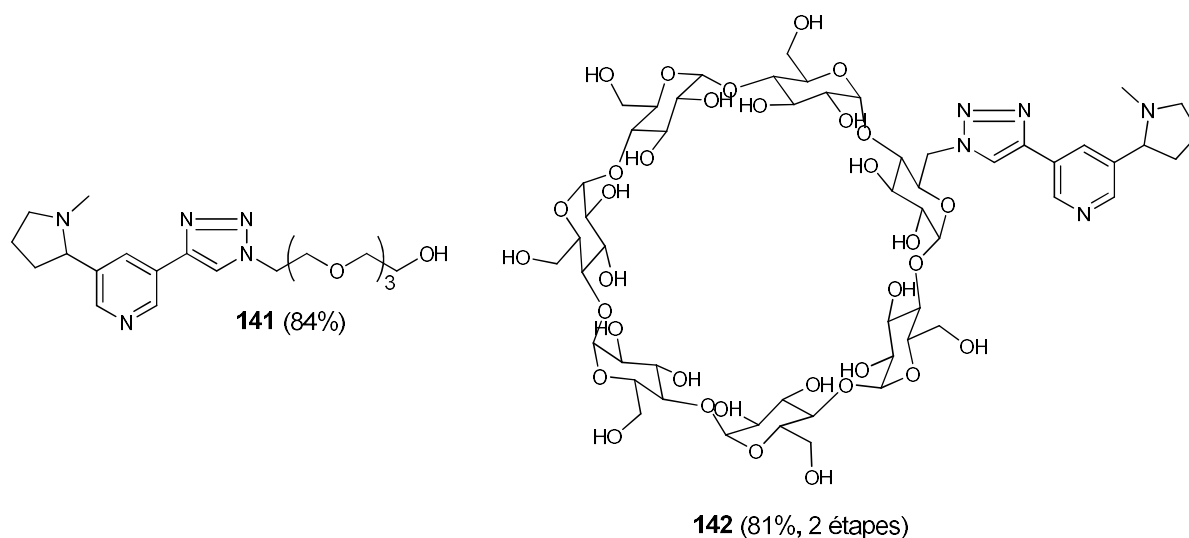


Figure 87 : Structure des deux dérivés nicotinique monovalents

VIII. Conclusion

Nous avons obtenu six structures multivalentes auxquelles s'ajoutent deux structures monovalentes de référence. Ces composés sont en cours d'évaluation biologique sur des lignées d'ovocytes d'amphibiens (espèce *Xenopus laevis*). Les tests sont réalisés par le Dr. Romulo Araoz de l'institut de Neurobiologie Alfred Fessard de Gif-sur-Yvettes qui utilise une technologie automatisée d'électrophysiologie « HiClamp ». Ce dispositif permet d'obtenir des ovocytes qui n'expriment à leur surface qu'un seul type de récepteur nicotinique. L'appareil « HiClamp » permet de mesurer la variation du potentiel membranaire (dépolérisation) en présence de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine ou des dérivés nicotiniques de synthèse.

Ces études sont actuellement en cours sur les récepteurs pentamériques $\alpha 7$ et sur les récepteurs $\alpha 4\beta 2$. Les premiers résultats montrent une activité antagoniste de nos ligands en compétition avec l'acétylcholine à des concentrations de l'ordre de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de micromolaires. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour estimer plus précisément la valeur des IC_{50} et pour déterminer la présence d'effets multivalents éventuels.

Conclusion Générale

Dans le cadre de ce travail, nous avons conçu diverses structures multivalentes pour le ciblage, par effet chélate, des récepteurs AFL, DC-SIGN et nAChRs impliqués respectivement dans l'adhésion fongique, virale et la transmission de l'influx nerveux. Dans les deux premiers cas, des fucosides et mannosides, antagonistes des deux lectines ciblées, ont été greffés sur des charpentes à valence et flexibilité variées de types OEGs, cyclodextrines et dextrans. Le concept de multivalence a également été étendu aux récepteurs de l'acétylcholine afin d'étudier la variation de l'ouverture des canaux ioniques en présence de dérivés nicotiniques multivalents.

Les fucosides di-, hexa- et polymériques synthétisés ont été évalués sur la lectine AFL qui a été récemment cristallisée et qui est exprimée par le champignon pathogène *Aspergillus fumigatus*. Un test de microcalorimétrie a mis en exergue un gain d'affinité important avec un composé hexavalent **30** dont le Kd est de 180 nM pour un effet β de 154. Un composé divalent **26** avec un espaceur OEG de douze unités présente aussi une forte affinité (Kd de 550 nM) pour un effet β de 151. La signature thermodynamique de l'interaction est cohérente avec un mode de liaison chélate. Ces résultats suggèrent que la lectine AFL est une cible particulièrement intéressante pour une stratégie d'inhibition multivalente. L'effet antiadhésif des fucosides a également été évalué sur des spores d'*A. fumigatus* et une nouvelle fois le fucoside hexavalent **30** a été particulièrement efficace avec une IC₅₀ inférieur à 2 μ M. Pour améliorer davantage l'efficacité de ces composés, l'étape suivante sera le greffage sur les charpentes tétravalentes d'un ligand plus affin que le fucose. Les composés les plus puissants seront évalués *in vivo* dans l'équipe du Professeur Patrice Le Pape. Cette première série de molécules et les futurs développements seront protégés sous forme de brevet par la Société d'Accélération du Transfert de Technologie (SATT) OUEST VALORISATION.

Notre seconde cible, la protéine DC-SIGN, a été très étudiée pour stopper différentes infections virales. Nous avons voulu évaluer si des inhibiteurs multivalents pouvaient bloquer les infections au CMV *via* DC-SIGN. Notre premier objectif était de synthétiser un dérivé de la quinoxalinone, décrit par Kiessling *et al.*, pour l'insérer sur une charpente multivalente. N'ayant pas réussi à reproduire cette synthèse, nous avons défini une nouvelle stratégie qui nous a permis d'insérer une fonction alcool sur la molécule. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour substituer cette fonction alcool par un azoture et effectuer un greffage sur une charpente multivalente. Parallèlement, nous avons synthétisé une première

famille de mannosides di- et tétravalents qui a montré de faibles pouvoirs inhibiteurs de l'ordre du millimolaire. La proximité du triazole et du sucre pouvant éventuellement expliquer cette faible affinité, nous avons conçu une seconde génération de ligands avec un espaceur supplémentaire de type OEG ou heptyle. Un composé tétravalent **120** comportant une chaîne OEG courte s'est révélé meilleur inhibiteur que son analogue **106** de première génération (IC_{50} de 250 μ M contre 1mM). De façon particulièrement intéressante, la présence d'une chaîne heptyle a permis d'augmenter bien plus fortement l'affinité pour DC-SIGN. En effet, malgré sa simplicité structurale, l'heptylmannoside fonctionnalisé **126** a montré une faible IC_{50} de 10 μ M. Il serait intéressant de comparer, dans un même test, le pouvoir inhibiteur de ce ligand avec celui des pseudo di-mannosides optimisés de Fieschi et Barnardi. Leurs composés ont montré des IC_{50} pour DC-SIGN de l'ordre de quelques centaines de micromolaires dans un test cellulaire spécifique.^{150,151} L'insertion de l'heptylmannoside sur des dextrans de différentes tailles a conduit à des composés dont les IC_{50} (exprimées par monomère) sont inférieures à 100 nM avec un optimum de 50 nM pour la structure polymérique **123**. Il reste aujourd'hui à évaluer ces ligands dans un test cellulaire de trans-infection, qui est actuellement en cours d'optimisation dans l'équipe du Dr. Franck Halary.

Alors que la multivalence est largement exploitée pour l'inhibition de l'adhésion de pathogènes, elle est très peu étudiée dans les domaines des protéines fonctionnelles telles que les récepteurs ionotropes. Nous avons voulu évaluer si des ligands multivalents des récepteurs à l'acétylcholine nAChRs, cible de nombreux analogues nicotiques de synthèse, pouvaient moduler la transmission de l'influx nerveux. Nous avons pour cela fonctionnalisé un ligand précédemment décrit dans la littérature par Cosford *et al.* : l'altinicline.¹⁷⁶ La présence d'une fonction alcyne a permis un greffage direct par CuAAC sur des charpentes divalentes et heptavalentes. Les premiers tests montrent une activité antagoniste à une concentration de plusieurs dizaines de micromolaires sur des récepteurs de type $\alpha 7$. Des tests complémentaires sur ovocytes devraient nous permettre d'obtenir les IC_{50} sur différents sous-types de nAChRs.

Les parties qui composent cette thèse ont représenté de nouvelles thématiques au sein du groupe de recherche intégré et ont fait l'objet de nouvelles collaborations avec des équipes de biologistes. Les premiers résultats semblent valider la pertinence de l'effet chélate pour inhiber les infections par *A. fumigatus* et le CMV en bloquant les lectines AFL et DC-SIGN. Les

prochains travaux devront se focaliser sur l'élaboration d'inhibiteurs multivalents encore plus affins et la démonstration de la validité du concept *in vivo* par nos collaborateurs biologistes.

Partie expérimentale

Synthesis

Material

All reagents were purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Carbosynth or Aldrich and were used without further purification. Dichloromethane ethyl acetate and petroleum ether were distilled on a *Buchi rotavapor R-220-SE*. Acetonitrile, pyridine, benzene and DMF were freshly distilled from calcium hydride under argon. THF was distilled on sodium, benzophenone and under argon. Reactions requiring anhydrous conditions were performed under argon. Column chromatography was conducted on silica gel Kieselgel Si60 (40–63 μm) from Merck, or on Silica cartridge from Interchim and eluted via a Puriflash 430 with an UV and ELSD detection. Thin layer chromatography (TLC): *Merck Silica gel 60 F254* analytical plates, detection either with UV (254 nm) or dipping in a solution of cerium molybdate, potassium permanganate, nihydriene and subsequent heating. 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 high homogeneity of the reaction mixtures.

Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on *Bruker Avance 300* spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBO probe carefully tuned to the recording frequency of 300.13 MHz (for ^1H) and 75.47 MHz (for ^{13}C), the temperature of the probe was set at room temperature (around 293–294 K), on a *Bruker Avance 400* spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBFO+ probe carefully tuned to the recording frequency of 400.13 MHz (for ^1H) and 100.61 MHz (for ^{13}C), the temperature of the probe was set at 303 K, on a *Bruker Avance III 500* spectrometer fitted with a 5mm i.d. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ cryoprobe carefully tuned to the recording frequency of 500.13 MHz (for ^1H) and 125.76 MHz (for ^{13}C), the temperature of the probe was set at 303 K. The spectra are referenced to the solvent in which they were run (7.26 ppm for ^1H CDCl_3 and 77.16 ppm for ^{13}C CDCl_3 , 2.50 ppm for ^1H DMSO- d_6 and 39.52 ppm for ^{13}C DMSO- d_6 , 3.31 ppm for ^1H CD_3OD and 49.00 ppm for ^{13}C , 7.16 ppm for ^1H C_6D_6 and 128.06 ppm for ^{13}C C_6D_6 , 5.32 ppm for ^1H CD_2Cl_2 and 53.84 ppm for ^{13}C , 4.79 ppm for ^1H D_2O). Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) and coupling constants (J) are given in Hz. Multiplicity of signals is indicated as following: s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), brs (broad singulet), dd (doublet of doublet), dt (doublet of triplet)... The numbering used for NMR attribution is different from IUPAC numbering, and written on each molecule.

Mass spectrometry

Low resolution mass spectrometry (MS) was recorded on a *ThermoFinnigan DSQII quadrupolar* spectrometer (coupled with a *TracUltra GC* apparatus) for Chemical Ionization (CI), on a *ThermoFinnigan LCQ Advantage* spectrometer for ElectroSpray Ionisation (ESI). High resolution mass spectrometry (HRMS) was recorded on a *ThermoFinnigan MAT95XL* spectrometer (for CI), on a *ThermoFisher Scientific LTQ-Orbitrap* spectrometer (for ESI+), on a *Bruker Autoflex III* spectrometer (for MALDI+).

Optical rotation measurements

Optical rotation data were obtained on a *Perkin-Elmer 341* polarimeter, in a 100 mm cell, under Na lamp radiation at 20 °C.

General procedures:

Preparation of H₂SO₄-Silica:

To a suspension of silica (10g) in diethyl ether (50ml) was added sulfuric acid (3ml). The mixture is stirred at r.t. during 15 min and then evaporated under vacuum. The resulted powder is dried at 80°C overnight.

Fisher Glycosylation G1:

To a solution of sugar (1 eq.) in alcohol (5 eq.) was added H₂SO₄-silica (5 mg/mmol) prepared as described in general procedure. The mixture was stirred at 80°C for 6 h. After filtration and evaporation of the solvent, the compound was per-*O*-acetylated in Ac₂O-pyridine 1:1 (10 mL/mmol). The solvent was removed under reduced pressure, dissolved in DCM (20mL/mmol) and washed with NaHCO₃ saturated solution (2 x 20mL/mmol). The organic phases are dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The reaction mixture was purified on a silica gel column to give the pure α -anomer.

Azidation G2:

To a solution of mesylated/bromated compound (1 eq.) in DMF (10ml/mmol) was added sodium azide (2 eq.). Then, the mixture was heated to 80°C for 16 h. After cooling to room temperature, the mixture was concentrated under vacuum. The crude product was dissolved in DCM (20mL/mmol) washed with H₂O (20 mL/mmol) and the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 20 mL/mmol). The organic layers are dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulted product is purified by flash chromatography.

Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Method G3 (method A):

The azide derivative and the alkyne derivative (1.1 or 0.9 eq./azide function) were dissolved in dioxane (2mL/mmol). A solution of copper sulfate (0.2 eq./azide function) and sodium ascorbate (0.4 eq./azide function) in water (0.5mL/mmol) was added and the mixture was heated at 60°C until completion. The mixture was dissolved in DCM (50mL/mmol), washed with a solution of EDTA (50 mL/mmol) and the aqueous layer was extracted twice with DCM (2 x 50mL/mmol). The organic layer was then dried over MgSO₄, filtered, concentrated under reduced pressure and purified.

Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Method G4 (method B):

The azide derivative and the alkyne derivative (1.1 or 0.9 eq./azide function) were dissolved in dioxane (2mL/mmol). A solution of copper sulfate (0.4 eq./azide function) and sodium ascorbate (0.8 eq./azide function) in water (0.5 mL/mmol) was added and the mixture was heated to 80°C under microwave condition in a sealed vessel during 90 min. The mixture was dissolved in DCM (50mL/mmol), washed with a solution of EDTA (50 mL/mmol) and the aqueous layer was extracted twice with DCM (2 x 50mL/mmol). The organic layer was then dried over MgSO₄, filtered, concentrated under reduced pressure and purified.

Deprotection of acetyl groups using sodium methanolate method G5:

The protected carbohydrate (1eq.) was dissolved in methanol (2mL/mmol) and a sodium methanolate solution (0.1 M, 0.05 eq./acetyl group) was added. The mixture was stirred at r.t. for 3h. After completion, water was added (0.5mL/mmol), followed by Amberlite® IR120. The mixture was stirred until the pH was around 5. After removal of the resin by filtration, the resulted mixture was lyophilized.

Deprotection of acetyl groups using sodium methanolate method G6:

The protected carbohydrate (1eq.) was dissolved in MeOH/H₂O (1:1, 1 mL/mmol). Amberlite resin IRN 78 OH⁻ 1.25 meq/mL (150 mg/mmol) was added, and the mixture was stirred overnight at r.t. The resin was filtered off and washed with methanol and water. The solvent was evaporated under reduced pressure.

Mesylation G7:

OEG (1eq.), and triethylamine (2 eq.) were dissolved in dichloromethane (15 mL/mmol), and cooled to 0 °C. Methanesulfonyl chloride (2 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred overnight. The filtrate was washed with saturated sodium carbonate (15 mL/mmol), extracted 3 times with dichloromethane (3 x 15 mL/mmol) and dried over anhydrous sodium sulfate. The solution was concentrated under reduced pressure and the crude product purified via silica gel column chromatography eluting with DCM/MeOH.

Removal of trityl ether protecting group G8:

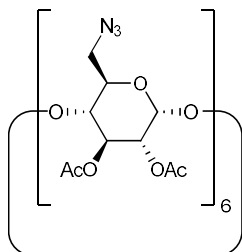
Triisopropyl silane (7 eq) was added to a functionalized OEG ether solution of DCM (20 mL/mmol). The mixture was then treated with TFA (1 mL/mmol) for 1h. After consumption of the starting material; excess TFA and DCM were removed under reduced pressure after co-evaporation with toluene. The residue was taken up in methanol (10 mL/mmol) and treated with sodium methoxide (1M, 2mL/mmol). The solvent was concentrated under reduced pressure, a saturated ammonium chloride solution (20mL/mmol) was added to the residue and the aqueous layer was extracted with DCM (5 x 20mL/mmol). The combined organic solutions were dried over magnesium sulfate and evaporated to give the crude product for purification by flash chromatography (DCM/MeOH)

Glycosylation G9

Boron trifluoride ethyl etherate (5 eq.) was added dropwise at 0°C to a solution of per-O-acetylated sugar (1 eq.) and alcohol acceptor (4 eq.) in anhydrous dichloromethane (15 mL/mmol). The solution was stirred at r.t. for 16h. Potassium carbonate (1g/mmol) was added by portions and the reaction mixture was stirred for further 1 h and filtered. The filtrate was diluted with dichloromethane (20 mL/mmol), washed with water (2 x 20 mL/mmol), dried over MgSO₄, filtered, concentrated and purified via a silica gel column chromatography (AcOEt/hexane).

Chapter 2:

Compound 7

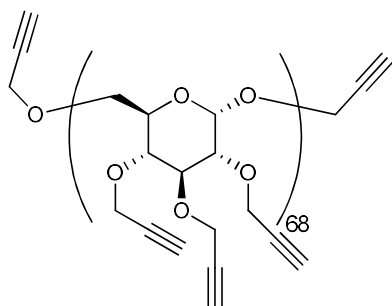


To a solution of triphenylphosphine (16.3 g, 62.1 mmol) and iodine (16.8 g, 66.24 mmol) in dry DMF (80 mL) was added CD (5 g, 4.14 mmol) and the solution was stirred at 70°C during 20 h. It was then concentrated under reduced pressure to about 30 mL and the pH was adjusted to 9 by addition of sodium methoxide in methanol (3M, 30 mL). The solution was kept at room temperature for 30 min, after what it was poured into ice water (20mL/mmol). The precipitate was collected by filtration and washed with methanol to afford 6-deoxy-6-iodo-CDs **6** in a quantitative yield.

6-deoxy-6-iodo-CD (**6**) (1g, 0.6 mmol) was dissolved in DMF (15 mL), and NaN₃ (0.36 g, 5.5 mmol) was added. The resulting suspension was stirred at 70 °C for 16 h. The suspension was then concentrated under reduced pressure and dissolved in a mixture of pyridine and acetic anhydride (1/1, 8 mL) before addition of DMAP (50 mg, 0.4 mmol). The solution was stirred at r.t. for 3h under nitrogen and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/EtOAc: 7/3) to give compound **7** in 86 % yield as a white powder.

The analytical data of **7** was in complete agreement with literature data¹⁷⁹

Compound 8

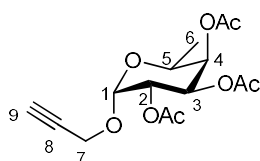


A solution of propargyl bromide (0.76 g, 4.92 mmol) in toluene (0.6 mL) was added dropwise to a stirred solution of dextran (0.1 g, 0.615 mmol of sugar unit) in 0.3 mL water, KOH-H₂O

(0.64 g, 8.6mmol) 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. Acetone (1 mL) was added, the organic layer was separated and the compound was precipitated in ethanol (75 mL). The residue was filtered on millipore, sequentially washed with water (25 mL) and ethanol (25 mL) then dried under vacuum to afford compound **8** as a white powder in 60% yield.

The analytical data of **8** were in complete agreement with literature data.⁶⁴

Compound 9



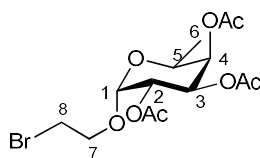
Obtained following the Fisher glycosylation protocol G1. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 8/2 (cyclohexane/AcOEt) as eluent to afford **9** (51% yield) as a white solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.38 (dd, $J = 11.0\text{Hz}$, $J = 3.4\text{Hz}$, 1 H; H-3), 5.32 (dd, $J = 1.3\text{Hz}$, 1 H; H-4), 5.27 (d, $J = 3.8\text{Hz}$, 1 H; H-1), 5.18 (dd, 1 H; H-2), 4.27 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 2 H; H-7), 4.21 (br q, $J = 6.5\text{Hz}$, 1 H; H-5), 2.44 (t, 1 H; H-9), 2.18, 2.10, 2.00 (3 s, 9 H; COCH₃), 1.16 (d, 3H; H-6)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.5, 170.3, 169.9 (3 COCH₃), 95.0 (C-1), 78.6 (C-8), 74.8 (C-9), 71.0 (C-4), 67.8 (C-2), 67.7 (C-3), 64.9 (C-5), 55.2 (C-7), 20.7, 20.6, 20.5 (3 COCH₃), 15.7 (C-6).

MS, ESI m/z : [M + H]⁺ = 351.2 Da

Compound 10



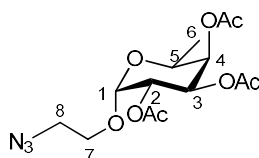
Obtained following the fisher glycosylation method G1. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 8/2 (Cyclohexane/AcOEt) as eluent to afford **10** (55% yield) as a yellow gum.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.32 (dd, *J* = 11.0Hz, *J* = 3.5Hz, 1 H; H-3), 5.30 (dd, *J* = 1.5Hz, *J* = 3.5Hz, 1 H; H-4), 5.27 (d, *J* = 3.8Hz, 1 H; H-1), 5.18 (dd, *J* = 3.8Hz, *J* = 11.0Hz, 1 H; H-2), 3.99 (m, *J* = 5.7Hz, 1 H, H-7a), 3.83 (m, *J* = 5.7Hz, 1 H, H-7b), 3.50 (t, *J* = 5.7Hz, 2H, H-8), 2.18, 2.08, 1.99 (3 s, 9H, COCH₃), 1.24 (d, *J* = 6.41Hz, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.5, 170.3, 169.7 (3 COCH₃), 96.4 (C-1), 70.1 (C-8), 69.8 (C-9), 69.6 (C-4), 68.4(C-2), 63.6(C-3), 62.5 (C-5), 30.1 (C-7), 29.8, 21.0, 20.7 (3 COCH₃), 16.2 (C-6).

MS, ESI *m/z*: [M + H]⁺ = 419.0 Da

Compound 11



Obtained following the azidation method G2. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 7/3 (Cyclohexane/AcOEt) as eluent to afford **11** (74% yield) as a yellow gum.

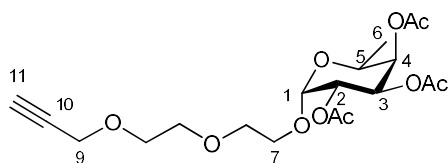
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 4.90 (d, *J* = 2.5Hz, 1H, H-1), , 3.99 (q, *J* = 6.8Hz, 1H, H-5), 3.93 - 3.78 (m, 3H), 3.77 - 3.68 (m, 2H), 3.55 - 3.38 (m, 2H, CH₂N₃), 1.29 (d, *J* = 6.6Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 98.0 (C-1), 71.8 (C-4), 71.1 (C-3), 69.0 (C-2), 67.0 (OCH₂), 66.5 (C-5), 50.8 (CH₂N₃), 16.3 (CH₃).

MS, ESI : [M + H]⁺ = 360.1 Da

The analytical data of **10** and **11** were in complete agreement with literature data.¹⁸⁰

Compound 14



Obtained following the fisher glycosylation method G1. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **14** (65% yield) as a yellow gum.

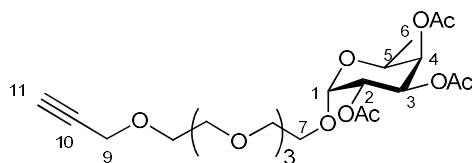
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.35 (dd, $J = 3.4, 9.6$ Hz, 1H, H-2), 5.22 (dd, $J = 1.1, J = 3.4$ Hz, 1H, H-4), 5.12 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-3), 5.10 (s, 1H, H-1), 4.27 - 4.19 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-5), 4.20 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, H-9), 3.78–3.70 (m, 2H, H-7), 3.70 - 3.60 (m, 6H, CH₂O), 2.40 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-11), 2.13, 2.04, 1.95 (3s, 9H, COCH₃), 1.13 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.5, 170.1 (3s, 3C, COCH₃), 96.3 (C-1), 79.7 (C-10), 74.6 (C-11), 71.3 (C-4), 70.8-69.2 (CH₂O), 68.2 (C-3), 68.1 (C-2), 67.6 (C-7), 64.4 (C-5), 58.4 (C-9) 20.9, 20.8, 20.7 (3s, 3C, COCH₃), 15.9 (C-6)

HRMS, ESI : m/z : $[M + Na]^+_{calc} = 439.1580$ Da, $[M + Na]^+_{mes} = 439.1578$ Da

$[\alpha]_D$ (CHCl₃, c=1, 20°C) = -15.8 Da

Compound 15



Obtained following the fisher glycosylation method G1. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 98/2 (DCM/MeOH) as eluent to afford **15** (55% yield) as a yellow gum.

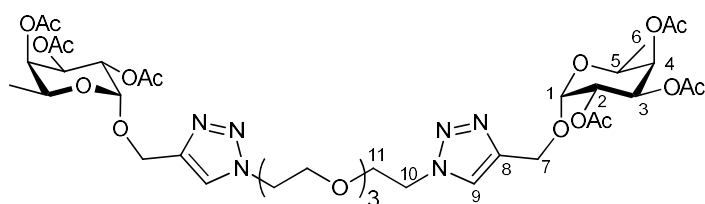
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.37 (dd, $J = 3.4, 9.6$ Hz, 1H, H-2), 5.24 (dd, $J = 1.1, J = 3.4$ Hz, 1H, H-4), 5.13 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-3), 5.11 (s, 1H, H-1), 4.29 - 4.20 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-5), 4.17 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, H-9), 3.79–3.70 (m, 2H, H-7), 3.70 - 3.60 (m, 14H, CH₂O), 2.41 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-11), 2.12, 2.04, 1.96 (3s, 9H, COCH₃), 1.11 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.8, 170.5, 170.2 (3s, 3C, COCH₃), 96.3 (C-1), 79.6 (C-10), 74.7 (C-11), 71.2 (C-4), 71.0-69.1 (CH₂O), 68.2 (C-3), 68.0 (C-2), 67.7 (C-7), 64.3 (C-5), 58.3 (C-9) 21.0, 20.8, 20.7 (3s, 3C, COCH₃), 15.8 (C-6)

HRMS, ESI : m/z: [M + Na]⁺_{calc} = 527.2104 Da, [m + Na]⁺_{mes} = 527.2101 Da

[α]_D (CHCl₃, c=1, 20°C) = -11.4 Da

Compound 16



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **16** (85% yield) as a colorless oil.

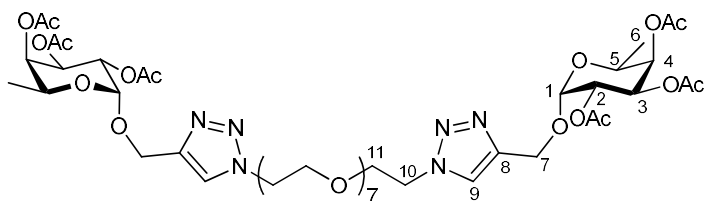
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.32 (dd, *J* = 11.0Hz, *J* = 3.6Hz, 2 H, H-3), 5.26 (bd, *J* = 6.5Hz, 2 H, H-4), 5.15 (d, *J* = 3.4Hz, 2 H, H-1), 5.18 (dd, *J* = 3.4Hz, *J* = 11.0Hz, 2 H, H-2), 4.79 (d, *J* = 11.7Hz, 2 H, H-7a), 4.63 (d, *J* = 11.7Hz, 2 H, H-7b), 4.53 (t, *J* = 4.8Hz, 4 H, H-11), 4.19 (br q, *J* = 6.5Hz, 2 H, H-5), 3.86 (t, *J* = 4.8Hz, 4 H, H-10), 3.65-3.53 (m, 8 H, CH₂O), 2.14, 2.00, 1.90 (3 s, 18 H; COCH₃), 1.11 (d, *J* = 6.3Hz, 6 H, H-6)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.5, 170.0 (3 COCH₃), 142.9 (C-8), 124.0 (C-9), 95.7 (C-1), 71.2 (C-4), 70.6-70.4 (CH₂O), 69.5 (C-10), 68.1 (C-2), 68.0 (C-3), 64.7 (C-5), 50.4 (C-7), 20.9, 20.8, 20.7 (3 COCH₃), 15.9 (C-6)

HRMS, MALDI : m/z: [M + H]⁺_{calc} = 901.3678 Da, [M + H]⁺_{mes} = 901.3682 Da

[α]_D (CHCl₃, c=1, 20°C) = -13.2

Compound 17



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **17** (82% yield) as a colorless oil.

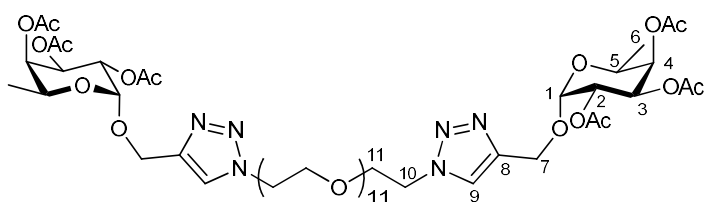
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.34 (dd, $J = 11.0\text{Hz}$, $J = 3.6\text{Hz}$, 2 H, H-3), 5.24 (bd, $J = 6.5\text{Hz}$, 2 H, H-4), 5.15 (d, $J = 3.4\text{Hz}$, 2 H, H-1), 5.17 (dd, $J = 3.4\text{Hz}$, $J = 11.0\text{Hz}$, 2 H, H-2), 4.80 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2 H, H-7a), 4.62 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2 H, H-7b), 4.53 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 4 H, H-11), 4.20 (br q, $J = 6.5\text{Hz}$, 2 H, H-5), 3.87 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 4 H, H-10), 3.68-3.50 (m, 24 H, CH₂O), 2.15, 2.01, 1.90 (3 s, 18 H; COCH₃), 1.13 (d, $J = 6.3\text{Hz}$, 6 H, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.6, 170.1 (3 COCH₃), 142.8 (C-8), 124.2 (C-9), 95.5 (C-1), 71.2 (C-4), 70.9-70.2 (CH₂O), 69.5 (C-10), 68.2 (C-2), 68.1 (C-3), 64.7 (C-5), 50.3 (C-7), 21.0, 20.7, 20.6 (3 COCH₃), 15.7 (C-6).

HRMS, MALDI : m/z : $[M + H]^+_{\text{calc}} = 1077.4727 \text{ Da}$, $[M + H]^+_{\text{mes}} = 1077.4722 \text{ Da}$

$[\alpha]_D$ (CHCl₃, $c=1$, 20°C) = -12.6

Compound 18



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **18** (78% yield) as a colorless oil.

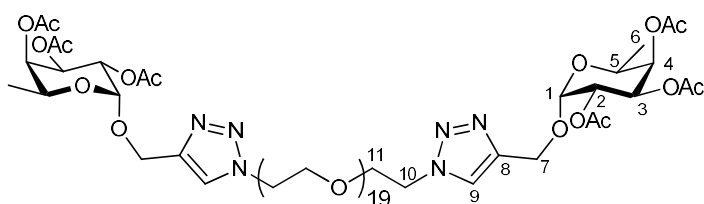
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.31 (dd, $J = 11.0\text{Hz}$, $J = 3.6\text{Hz}$, 2 H, H-3), 5.24 (bd, $J = 6.5\text{Hz}$, 2 H, H-4), 5.15 (d, $J = 3.4\text{Hz}$, 2 H, H-1), 5.12 (dd, $J = 3.4\text{Hz}$, $J = 11.0\text{Hz}$, 4 H, H-2), 4.84 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2H, H-7a), 4.62 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2 H, H-7b), 4.53 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 2 H, H-11), 4.21 (br q, $J = 6.5\text{Hz}$, 2 H, H-5), 3.88-3.36 (m, 42 H, H-10, CH₂O), 2.14, 2.01, 1.90 (3 s, 18 H; COCH₃), 1.12 (d, $J = 6.3\text{Hz}$, 6 H, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.8, 170.6, 170.0 (3 COCH₃), 142.7 (C-8), 124.3 (C-9), 95.5 (C-1), 71.2 (C-4), 70.9-70.0 (CH₂O), 69.4 (C-10), 68.2 (C-2), 68.1 (C-3), 64.6 (C-5), 50.4 (C-7), 21.0, 20.7, 20.5 (3 COCH₃), 15.5 (C-6).

HRMS, MALDI : m/z: [M + H]⁺_{calc} = 1253.5776 Da, [M + H]⁺_{mes} = 1253.5779 Da

[α]_D (CHCl₃, c=1, 20°C) = -15.5

Compound 19



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **19** (79% yield) as a white solid.

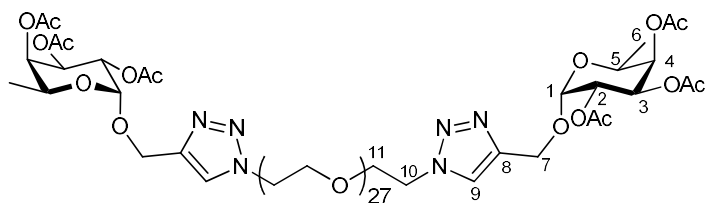
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.33 (dd, *J* = 11.0Hz, *J* = 3.6Hz, 2 H, H-3), 5.26 (bd, *J* = 6.5Hz, 2 H, H-4), 5.15 (d, *J* = 3.4Hz, 2 H, H-1), 5.11 (dd, *J* = 3.4Hz, *J* = 11.0Hz, 2 H, H-2), 4.87 (d, *J* = 11.2Hz, 2 H, H-7a), 4.60 (d, *J* = 11.2Hz, 2 H, H-7b), 4.55 (t, *J* = 4.8Hz, 2 H, H-11), 4.22 (br q, *J* = 6.5Hz, 2 H, H-5), 3.85-3.35 (m, 74 H, H-10, CH₂O), 2.15, 2.01, 1.91 (3 s, 18 H; COCH₃), 1.14 (d, *J* = 6.3Hz, 6 H, H-6)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.6, 170.1 (3 COCH₃), 142.5 (C-8), 124.2 (C-9), 95.4 (C-1), 71.1 (C-4), 71.1-70.1 (CH₂O), 69.4 (C-10), 68.3 (C-2), 68.0 (C-3), 64.7 (C-5), 50.4 (C-7), 21.1, 20.7, 20.5 (3 COCH₃), 15.3 (C-6)

HRMS, MALDI : m/z: [M + H]⁺_{calc} = 1605.7873 Da, [M + H]⁺_{mes} = 1605.7869 Da

[α]_D (CHCl₃, c=1, 20°C) = -17.3

Compound 20



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **20** (74% yield) as a white solid.

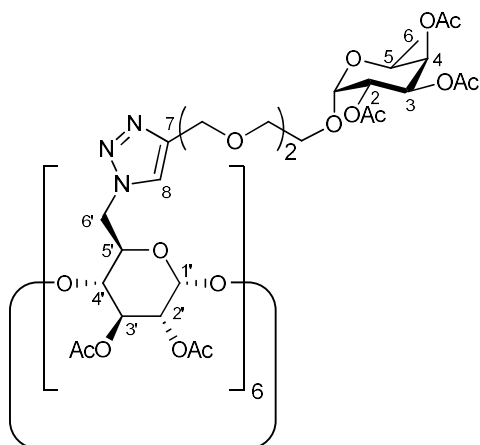
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 5.32 (dd, $J = 11.0\text{Hz}$, $J = 3.6\text{Hz}$, 2 H, H-3), 5.25 (bd, $J = 6.5\text{Hz}$, 2 H, H-4), 5.16 (d, $J = 3.4\text{Hz}$, 2 H, H-1), 5.12 (dd, $J = 3.4\text{Hz}$, $J = 11.0\text{Hz}$, 2 H, H-2), 4.85 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2 H, H-7a), 4.61 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2 H, H-7b), 4.54 (t, $J = 4.8\text{Hz}$, 4 H, H-11), 4.21 (br q, $J = 6.5\text{Hz}$, 2 H, H-5), 3.90-3.35 (m, 104 H, H-10, CH₂O), 2.14, 2.01, 1.90 (3 s, 18 H; COCH₃), 1.13 (d, $J = 6.3\text{Hz}$, 6 H, H-6)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.6, 170.1 (3 COCH₃), 142.5 (C-8), 124.2 (C-9), 95.4 (C-1), 71.1 (C-4), 71.1-70.1 (CH₂O), 69.4 (C-10), 68.3 (C-2), 68.0 (C-3), 64.7 (C-5), 50.4 (C-7), 21.1, 20.7, 20.5 (3 COCH₃), 15.3 (C-6)

HRMS, MALDI : m/z : $[M + H]^+_{\text{calc}} = 1957.9970 \text{ Da}$, $[M + H]^+_{\text{mes}} = 1957.9976 \text{ Da}$

$[\alpha]_D$ (CHCl₃, c=1, 20°C) = -14.2

Compound 21



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 8/2 (Cyclohexane/AcOEt) as eluent to afford **21** (65% yield) as a white solid.

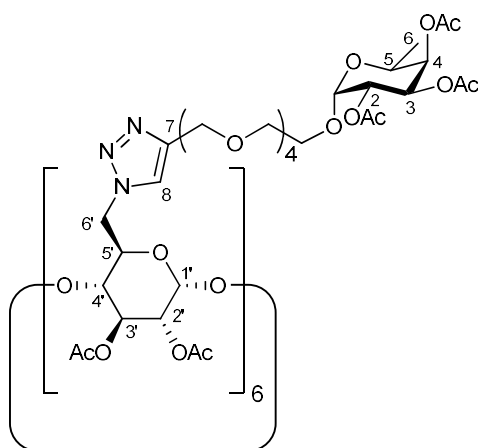
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.70 (bs, 6H, H-8), 5.43 (m, 6H, H-3), 5.39 (bs, 6H, H-1'), 5.30 (dd, *J* = 2.7Hz, *J* = 10.5Hz, 6H, H-2), 5.20 (bd, *J* = 6.5Hz, 6 H, H-4), 5.02 (t, *J* = 9.1Hz, 6H, H-3'), 5.01 (bs, 6H, H-1), 4.70-4.30 (m, 30H, H-2', H-4', H-5', H6'), 4.15 (m, 6 H, H-5), 3.56 (m, 60 H, CH₂O), 2.20-1.80 (5 bs, 90 H, CH₃CO), 1.05 (d, *J* = 6.0Hz, 18 H, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.8-169.2 (CH₃CO), 144.8 (C-7), 125.6 (C-8), 96.3 (C-1'), 71.2 (C-2), 70.5 (C-3), 70.2-69.0 (CH), 68.2-68.1 (CH₂O), 67.5 (CH₂O), 64.5 (C-5), 64.3 (CH), 20.9-20.5 (CH₃CO), 15.9 (C-6)

HRMS, MALDI : m/z: [M + 3H]³⁺_{calc} = 1375.8396 Da, [M + 3H]³⁺_{mes} = 1375.8390 Da

[α]_D (CHCl₃, c=0.7, 20°C) = -24.6

Compound 22



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 8/2 (Cyclohexane/AcOEt) as eluent to afford **22** (65% yield) as a white solid.

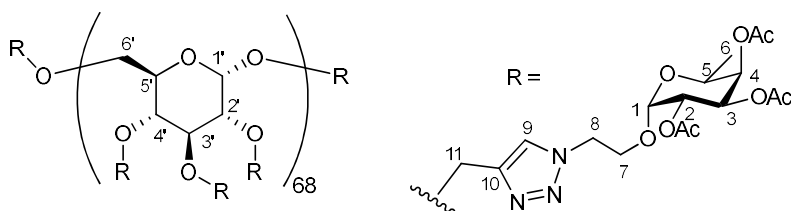
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.72 (bs, 6H, H-8), 5.40 (m, 6H, H-3), 5.38 (bs, 6H, H-1'), 5.31 (dd, *J* = 2.7Hz, *J* = 10.5Hz, 6H, H-2), 5.22 (bd, *J* = 6.5Hz, 6 H, H-4), 5.02 (t, *J* = 9.1Hz, 6 H, H-3'), 5.04 (bs, 6H, H-1), 4.70-4.30 (m, 30H, H-2', H-4', H-5', H6'), 4.16 (m, 6 H, H-5), 3.54 (m, 108 H, CH₂O), 2.20-1.80 (m, 90 H, CH₃CO), 1.07 (d, *J* = 6.0Hz, 18 H, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.8-169.2 (CH₃CO), 144.7 (C-7), 125.5 (C-8), 96.3 (C-1'), 71.3 (C-2), 70.6 (C-3), 70.3-69.0 (CH), 68.3-68.1 (CH₂O), 67.4 (CH₂O), 64.5 (C-5), 64.3 (CH), 20.9-20.5 (CH₃CO), 15.9 (C-6)

HRMS, MALDI : m/z: [M + 3H]³⁺_{calc} = 1552.2789 Da, [M + 3H]³⁺_{mes} = 1552.2793 Da

$[\alpha]_D$ (CHCl₃, c=0.5, 20°C) = -20.9

Compound 23

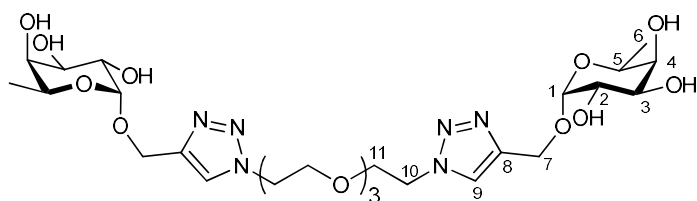


Obtained following the CuAAC method G3. The residue was dissolved in a small amount of CH₂Cl₂ and the product was precipitated by adding Et₂O (50mL). The precipitate was collected by filtration, washed with Et₂O (50mL), and precipitate twice from Et₂O to give **23** (63% yield) as a white solid.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.30-7.51 (m broad, 3H, H-9), 5.30-5.22 (m broad, 6 H, H-3, H-4) 4.80-4.49 (m broad, 13H, H-1, H-2, H-11, H-1'), 4.25-3.80 (m broad, 15H, H-5, H-8, H-7), 3.86-3.30 (m broad, 6H, H-2',3',4',5',6'), 2.15-1.80 (m, 18H, CH₃CO), 1.22 (bs, 9H, H-6).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.0, 169.8 (CH₃CO), 145.4 (C-10), 124.4 (C-9), 97.7 (C-1), 97.6 (C-1'), 77.3 (C-3'), 77.2 (C-4'), 70.7 (C-2'), 69.3 (C-4, C-5'), 66.4 (C-2), 65.9(C-3), 62.3 (C-5), 60.5 (C-7), 60.1 (C-6'), 49.7 (C-8), 20.8-20.6 (3 x CH₃CO), 14.3 (C-6).

Compound 24



Obtained following the acetate deprotection method G5. This reaction afforded the compound **24** (quant. yield) as a white solid.

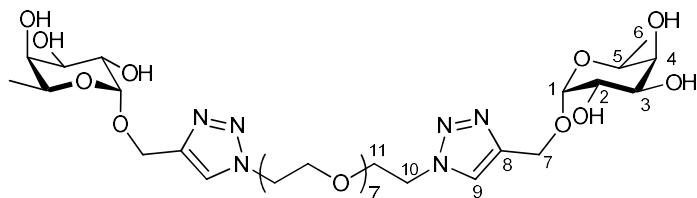
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.09 (s, 1H, H-9), 4.94 (bs, 1H, H-1), 4.89 (d, *J* = 12.5Hz, 1H, H-7a), 4.79 (d, *J* = 12.5Hz, 1H, H-7b) 4.60 (t, *J* = 5.1Hz, 2H, H-10), 3.95 (q, *J* = 6.7Hz, 1H, H-5), 3.89 (t, *J* = 5.1Hz, 2H, H-11), 3.75 (bd, 1H, *J* = 0.9Hz, H-2), 3.69-3.50 (m, 14H, H-3, H-4, CH₂O), 1.20 (d, *J* = 6.6Hz, 3H, H-6).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.5 (C-8) 126.0 (C-9), 100.2(C-1), 73.7 (C-3), 73.6-71.4 (CH₂O), 70.4 (C-11), 69.0 (C-2), 67.8 (C-5), 62.2 (C-4), 61.7 (C-7), 51.4 (C-10), 16.6 (C-6).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = -66.6

HRMS, ESI : m/z : $[M + H]^+_{\text{calc}} = 649.3045$ Da, $[M + H]^+_{\text{mes}} = 649.3041$ Da

Compound 25



Obtained following the acetate deprotection method G5. This reaction afforded the compound **25** (quant. yield) as a white solid.

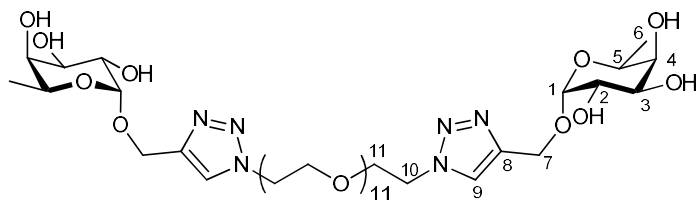
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.09 (s, 1H, H-9), 4.94 (bs, 1H, H-1), 4.89 (d, $J = 12.5\text{Hz}$, 1H, H-7a), 4.79 (d, $J = 12.5\text{Hz}$, 1H, H-7b), 4.60 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H, H-10), 3.95 (q, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H, H-5), 3.89 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H, H-11), 3.75 (bd, 1H, $J = 0.9\text{Hz}$, H-2), 3.69-3.50 (m, 14H, H-3, H-4, CH_2O), 1.20 (d, $J = 6.6\text{Hz}$, 3H, H-6).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 145.5 (C-8) 126.0 (C-9), 100.2 (C-1), 73.7 (C-3), 73.6-71.4 (CH_2O), 70.4 (C-11), 69.0 (C-2), 67.8 (C-5), 62.2 (C-4), 61.7 (C-7), 51.4 (C-10), 16.6 (C-6).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = -49.9

HRMS, ESI : m/z : $[M + H]^+_{\text{calc}} = 825.4093$ Da, $[M + H]^+_{\text{mes}} = 825.4092$ Da

Compound 26



Obtained following the acetate deprotection method G5. This reaction afforded the compound **26** (quant. yield) as a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.09 (s, 1H, H-9), 4.94 (bs, 1H, H-1), 4.89 (d, $J = 12.5\text{Hz}$, 1H, H-7a), 4.79 (d, $J = 12.5\text{Hz}$, 1H, H-7b), 4.60 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H, H-10), 3.95 (q, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H, H-

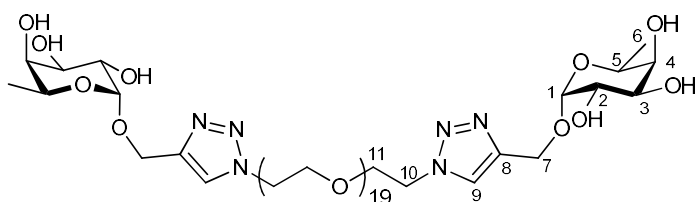
5), 3.89 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H, H-11), 3.75 (bd, 1H, $J = 0.9\text{Hz}$, H-2), 3.69-3.50 (m, 14H, H-3, H-4, CH₂O), 1.20 (d, $J = 6.6\text{Hz}$, 3H, H-6).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.5 (C-8) 126.0 (C-9), 100.2(C-1), 73.7 (C-3), 73.6-71.4 (CH₂O), 70.4 (C-11), 69.0 (C-2), 67.8 (C-5), 62.2 (C-4), 61.7 (C-7), 51.4 (C-10), 16.6 (C-6).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = -24.1

HRMS, ESI : m/z : $[M + H]^+$ calc = 1001.5142 Da, $[M + H]^+$ mes = 1001.5144 Da

Compound 27



Obtained following the acetate deprotection method G5. This reaction afforded the compound **27** (quant. yield) as a white solid.

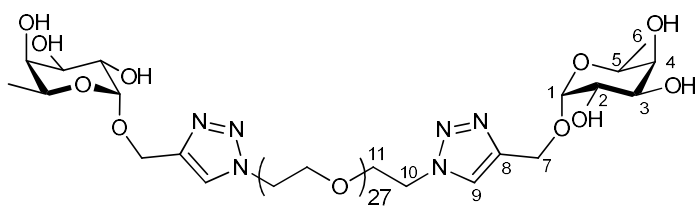
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.09 (s, 1H, H-9), 4.94 (bs, 1H, H-1), 4.89 (d, $J = 12.5\text{Hz}$, 1H, H-7a), 4.79 (d, $J = 12.5\text{Hz}$, 1H, H-7b) 4.60 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H, H-10), 3.95 (q, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H, H-5), 3.89 (t, $J = 5.1\text{Hz}$, 2H, H-11), 3.75 (bd, 1H, $J = 0.9\text{Hz}$, H-2), 3.69-3.50 (m, 14H, H-3, H-4, CH₂O), 1.20 (d, $J = 6.6\text{Hz}$, 3H, H-6).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.5 (C-8) 126.0 (C-9), 100.2(C-1), 73.7 (C-3), 73.6-71.4 (CH₂O), 70.4 (C-11), 69.0 (C-2), 67.8 (C-5), 62.2 (C-4), 61.7 (C-7), 51.4 (C-10), 16.6 (C-6).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = -63.3

HRMS, ESI : m/z : $[M + H]^+$ calc = 1353.7239 Da, $[M + H]^+$ mes = 1353.7241 Da

Compound 28



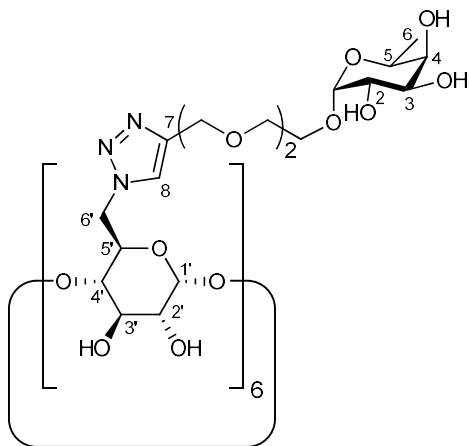
Obtained following the acetate deprotection method G5. This reaction afforded the compound **28** (quant. yield) as a white solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.09 (s, 1H, H-9), 4.94 (bs, 1H, H-1), 4.89 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, H-7a), 4.79 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, H-7b), 4.60 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H-10), 3.95 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-5), 3.89 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H-11), 3.75 (bd, 1H, $J = 0.9$ Hz, H-2), 3.69-3.50 (m, 14H, H-3, H-4, CH₂O), 1.20 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.5 (C-8) 126.0 (C-9), 100.2(C-1), 73.7 (C-3), 73.6-71.4 (CH₂O), 70.4 (C-11), 69.0 (C-2), 67.8 (C-5), 62.2 (C-4), 61.7 (C-7), 51.4 (C-10), 16.6 (C-6).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = -55.9

Compound 29



Obtained following the acetate deprotection method G6. This reaction afforded the compound **29** (quant. yield) as a white solid.

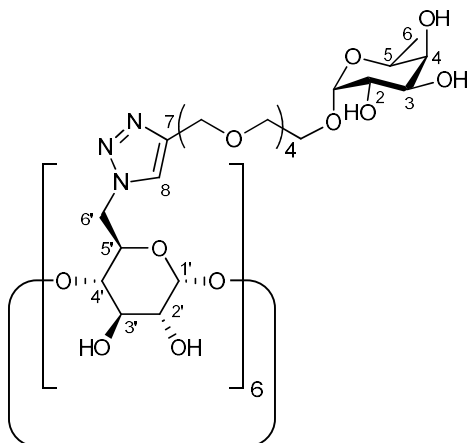
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.01 (s, 6 H, H-8), 5.04 (bd, $J = 3.2$ Hz, 6 H, H-1'), 4.76 (d, $J = 3.5$ Hz, 6 H, H-1), 4.37 (t, $J = 9.6$ Hz, 12 H, CH₂O), 4.17 (m, 12 H), 3.96 (m, 12H, H-5, H-6'a), 3.77-3.39 (m, 120 H), 3.24 (m, 6H, CH₂O), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 18 H, H-6)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 143.9 (C-8), 126.9 (C-9), 101.3 (C-1'), 98.6 (C-1), 82.3 (CH), 72.5 (CH'), 71.8 (CH), 71.3 (CH'), 70.1 (CH'), 69.7-69.4 (CH_2O), 69.0 (CH'), 68.1 (CH), 66.8 (CH), 66.6 (CH_2O) 62.9 (C-6'), 50.4 (CH_2O), 15.3 (C-6).

HRMS, MALDI : m/z : $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}_{\text{calc}} = 1705.9336 \text{ Da}$, $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}_{\text{mes}} = 1705.9334 \text{ Da}$

$[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = -36.5

Compound 30



Obtained following the acetate deprotection method G6. This reaction afforded the compound **30** (quant. yield) as a white solid.

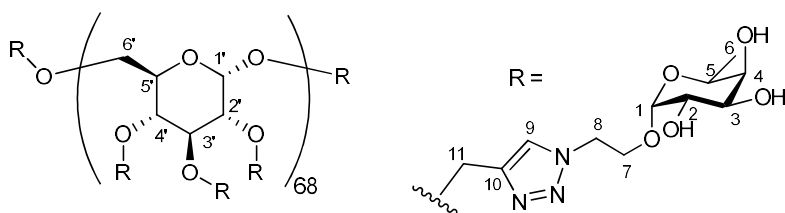
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.01 (s, 6 H, H-8), 5.04 (bd, $J = 3.2\text{Hz}$, 6 H, H-1'), 4.76 (d, $J = 3.5\text{Hz}$, 6 H, H-1), 4.37 (t, $J = 9.6\text{Hz}$, 12 H, CH_2O), 4.17 (m, 12 H), 3.96 (m, 12H, H-5, H-6'a), 3.77-3.39 (m, 120 H), 3.24 (m, 6H, CH_2O), 1.15 (d, $J = 6.8\text{Hz}$, 18 H, H-6).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 143.9 (C-8), 126.9 (C-9), 101.3 (C-1'), 98.6 (C-1), 82.3 (CH), 72.5 (CH'), 71.8 (CH), 71.3 (CH'), 70.1 (CH'), 69.7-69.4 (CH_2O), 69.0 (CH'), 68.1 (CH), 66.8 (CH), 66.6 (CH_2O) 62.9 (C-6'), 50.4 (CH_2O), 15.3 (C-6).

HRMS, MALDI : m/z : $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}_{\text{calc}} = 1697.2544 \text{ Da}$, $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}_{\text{mes}} = 1697.2543 \text{ Da}$

$[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = -33.2

Compound 31

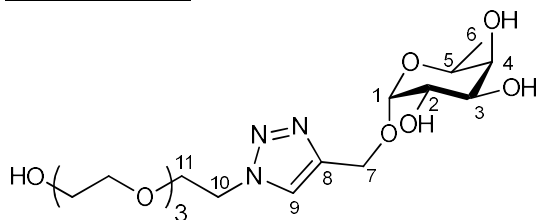


Obtained following the acetate deprotection method G6. This reaction afforded the compound **31** (72% yield) as a yellowish solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.18-7.95 (m broad, 3 H, H-9), 5.22-5.06 (m broad, 1 H, H-1'), 5.03-4.81 (m broad, 9 H, H-1, H-11), 4.50- 4.36 (m broad, 3H, H-7), 4.05-3.69 (m broad, 11H), 3.64-3.52 (m broad, 4 H), 3.49-3.36 (m broad, 3H), 3.35-3.26 (m broad, 3H), 3.07-2.95 (m broad, 3H), 2.91-2.76 (m broad, 3H), 2.76-2.60 (m broad, 3H), 2.41-2.21 (m broad, 3H), 1.55-1.30 (m broad, 3H, H-6).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 144.4 (C-10), 125.2 (C-9), 96.1 (C-1'), 94.4 (C-1), 80.6 (CH'), 79.2 (CH'), 78.5 (CH), 77.3 (CH'), 72.7 (CH'), 70.0 (CH), 69.1 (CH), 65.5 (CH'), 65.3 (CH), 63.3 (CH₂), 57.6 (CH₂), 48.9 (CH₂), 24.1 (C-6).

Compound 33



Obtained following the acetate deprotection method G5. This reaction afforded the compound **33** (quant. yield) as a white solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.09 (s, 1H, H-9), 4.94 (bs, 1H, H-1), 4.89 (d, *J* = 12.5Hz, 1H, H-7a), 4.79 (d, *J* = 12.5Hz, 1H, H-7b) 4.60 (t, *J* = 5.1Hz, 2H, H-10), 3.95 (q, *J* = 6.7Hz, 1H, H-5), 3.89 (t, *J* = 5.1Hz, 2H, H-11), 3.75 (bd, 1H, *J* = 0.9Hz, H-2), 3.69-3.50 (m, 14H, H-3, H-4, CH₂O), 1.20 (d, *J* = 6.6Hz, 3H, H-6).

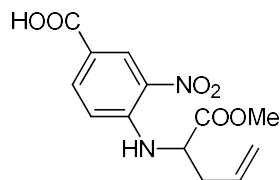
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.5 (C-8) 126.0 (C-9), 100.2 (C-1), 73.7 (C-3), 73.6-71.4 (CH₂O), 70.4 (C-11), 69.0 (C-2), 67.8 (C-5), 62.2 (C-4), 61.7 (C-7), 51.4 (C-10), 16.6 (C-6).

HRMS, ESI : m/z: [M + Na]⁺_{calc} = 356.1434 Da, [M + Na]⁺_{mes} = 356.1433 Da

[α]_D (MeOH, c=1, 20°C) = -48.7

Chapter 3

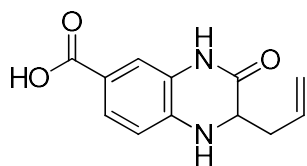
Compound 61



4-Fluoro-3-nitrobenzoic acid (2.00 g, 11.2 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (20 mL). *N,N*-diisopropylethylamine (11.5 mL, 66 mmol) was added followed by aminopentenoate (2 g, 15.5 mmol). The resulting solution was heated at 90 °C and allowed to stir for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by column chromatography with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **61** (82% yield) as a yellow solid.

The analytical data of **61** were in complete agreement with literature data.¹⁵³

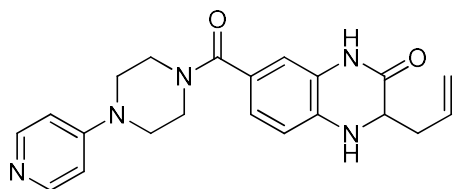
Compound 62



The nitrobenzoic acid intermediate **5** (1.00 g, 3.4 mmol) was dissolved in anhydrous THF (70 mL). Zinc metal (1.33 g, 20.4 mmol) was added to the stirred solution, followed by ammonium acetate (2.62 g, 34 mmol). The solution was stirred vigorously at rt for 4 h. The solution was filtered over celite and the filtrate concentrated to dryness. The crude residue was dispersed in water (10ml) and lyophilized. The product was purified by column chromatography with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **62** (74% yield) as a tan solid after lyophilization.

The analytical data of **62** were in complete agreement with literature data.¹⁵³

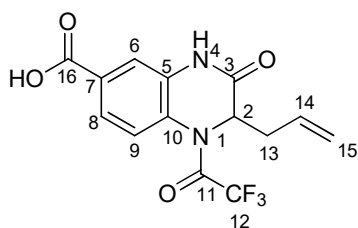
Compound 63



The tetrahydroquinoxaline **6** (0.50 g, 2.2 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL) under Ar(g). *N,N*-diisopropylethylamine (1.1 mL, 6.3 mmol) was added followed by HATU (0.90 g, 2.4 mmol) and HOBt (0.32 g, 2.4 mmol). The resulting solution was allowed to stir at r.t. for 15 min. 1-(4-Pyridyl)piperazine (0.46 g, 2.8 mmol) was added and the reaction allowed to stir at r.t. for 8 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by column chromatography with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **63** (68% yield) as a white solid after lyophilization.

The analytical data of **63** were in complete agreement with literature data.¹⁵³

Compound 67



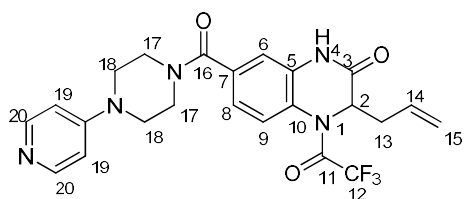
Quinoxalinone **62** (330 mg, 1 mmol), pyridine (0.17 mL, 2 mmol) and DMAP (12mg, 0.1 mmol) were added to dichloromethane (3 ml) and the mixture was stirred at 0°C. Then, trifluoroacetic anhydride (0.153 mL, 1.1 mmol) was added dropwise. After addition, the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Water (5 mL) was added to the mixture and the solvent was removed under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **67** (71%) as a tan solid after lyophilization.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 7.33 (dd, 1H, *J* = 8.0Hz, *J* = 1.8Hz, H-8), 6.92 (d, 1H, *J* = 1.9Hz, H-6), 6.75 (d, 1H, *J* = 8.1Hz, H-9), 5.90-5.75 (m, 1H, H-14), 5.15-4.98 (m, 2H, H-15), 3.98 (m, 1H, H-2), 2.54-2.42 (m, 2H, H-13).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 170.1 (C-16), 169.3 (C-3), 158.2 (C-11), 139.8 (C_{Ar}), 134.3 (C-14), 127.6 (C-8), 125.6 (C_{Ar}), 120.7 (C_{Ar}), 119.4 (C-15), 117.7 (C-6), 113.3 (C-9), 110.2 (C-12), 56.9 (C-2), 38.8 (C-13).

MS, ESI *m/z*: [M + H]⁺ = 329.1

Compound 68



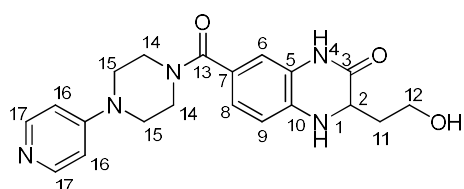
Quinoxalinone **63** (390 mg, 1 mmol), pyridine (0.17 mL, 2 mmol) and DMAP (12 mg, 0.1 mmol) were added in dichloromethane (3 ml) and the mixture was stirred at 0°C. Then, trifluoroacetic anhydride (0.153 mL, 1.1 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Water (5 mL) was added to the mixture and the solvent was removed under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **68** (71%) as a tan solid after lyophilization.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 8.13 (m, 2H, H-20), 7.02 (d, 1H, *J* = 8.0Hz, H-6), 6.93 (d, 1H, *J* = 1.8Hz, H-8), 6.89 (m, 2 H, H-19), 6.79 (d, 1H, *J* = 8.0Hz, H-9), 5.85-5.74 (m, 1H, H-14), 5.17-5.07 (m, 2H, H-15), 3.98 (m, 1H, H-2), 3.95(m, 4H, H-18),3.49(m, 4H, H-17), 2.12-1.73 (m, 2H, H-13).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 171.8 (C-16), 168.4 (C-3), 158.5 (C-11), 155.6 (C_{Ar}), 148.7, 148.6 (C_{Ar}), 136.2 (C_{Ar}), 133.2 (C_{Ar}), 125.0 (C-8), 123.7 (C_{Ar}), 118.1 (C-15), 114.7 (C-6), 112.7 (C-9), 108.5 (C_{Ar}), 55.7 (C-2), 45.5 (4C, C-14, C-15), 37.2 (C-13).

MS, ESI m/z: [M + H]⁺ = 329.1

Compound 69



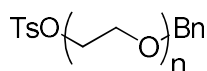
Quinoxalinone **68** (250 mg, 0.53 mmol) was dissolved in DCM/MeOH 1:1 (20mL) and the temperature was decreased to -70°C. Ozone was bubbled until the mixture turned blue. The solution was degassed by bubbling nitrogen and NaBH₄ was added (40 mg, 1.06 mmol). The solution was allowed to warm up to rt. After 1h, water was added (5 mL) and the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **68** (71%) as a tan solid.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 8.18 (m, 2H, H-17), 7.06 (m, 2 H, H-16), 7.03 (d, 1H, *J* = 1.8Hz, H-6), 6.95 (d, 1H, *J* = 1.8Hz, H-8), 6.77 (d, 1H, *J* = 8.1Hz, H-9), 4.09-4.00 (m, 1H, H-2), 3.87-3.62 (m, 10 H, H-12, H-14, H-15), 2.12-1.73 (m, 2H, H-11).

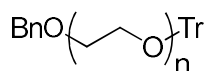
^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm): 170.1 (C-16), 169.3 (C-3), 158.2 (C-11), 139.8 (C_{Ar}), 134.32 (C-14), 127.6 (C-8), 125.6 (C_{Ar}), 120.7 (C_{Ar}), 119.4 (C-15), 117.7 (C-6), 113.3 (C-9), 110.2 (C-12), 56.9 (C-2), 38.8 (C-13).

MS, ESI m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+ = 382.2$

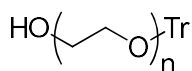
Compounds 72 to 82



72 : $n = 4$
75 : $n = 8$



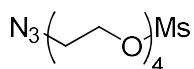
74 : $n = 8$
77 : $n = 16$
78 : $n = 24$
79 : $n = 32$



73 : $n = 4$
76 : $n = 8$ (68%)
80 : $n = 16$ (74%)
81 : $n = 24$ (63%)
82 : $n = 32$ (38%)

OEGs derivatives were obtained following French et al. synthesis and the analytical data was in accordance with French et al. description.¹⁸¹

Compound 83



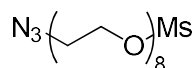
Obtained following the mesylation method G7, azidation method G2, trityl removal method G8. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **83** (82% yield) as a colorless oil.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 4.40-4.37 (m, 2 H, $\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.79-3.64 (m, 14 H, CH_2O), 3.08 (s, 3 H, SO_3CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 70.5–69.9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.3 ($\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 68.8 ($\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 51.0 (CH_2N_3), 37.6 (SO_3CH_3).

MS, ESI m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+ = 297.1$

Compound 84



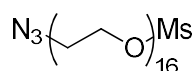
Obtained following the mesylation method G7, azidation method G2, trityl removal method G8. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **84** (68% yield) as a colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 4.40-4.36 (m, 2 H, SO₃CH₂CH₂), 3.80-3.62 (m, 30 H, CH₂O), 3.07 (s, 3 H, SO₃CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 70.6–69.9 (OCH₂CH₂O), 69.4 (SO₃CH₂CH₂), 68.7 (SO₃CH₂CH₂), 51.0 (CH₂N₃), 37.5 (SO₃CH₃).

MS, ESI m/z: [M + H]⁺ = 473.2

Compound 85



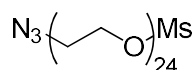
Obtained following the mesylation method G7, azidation method G2, trityl removal method G8. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **85** (46 % yield) as a colorless gum.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 4.40-4.37 (m, 2 H, SO₃CH₂CH₂), 3.90-3.55 (m, 62 H, CH₂O), 3.06 (s, 3 H, SO₃CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 70.8–69.9 (OCH₂CH₂O), 69.5 (SO₃CH₂CH₂), 68.6 (SO₃CH₂CH₂), 51.0 (CH₂N₃), 37.4 (SO₃CH₃).

MS, ESI m/z: [M + H]⁺ = 825.5

Compound 86

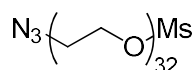


Obtained following the mesylation method G7, azidation method G2, trityl removal method G8. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **86** (38% yield) as a white solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 4.41-4.37 (m, 2 H, SO₃CH₂CH₂), 3.90-3.55 (m, 94 H, CH₂O), 3.05 (s, 3 H, SO₃CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 70.9–69.7 (OCH₂CH₂O), 69.6 (SO₃CH₂CH₂), 68.6 (SO₃CH₂CH₂), 51.1 (CH₂N₃), 37.5 (SO₃CH₃).

Compound 87

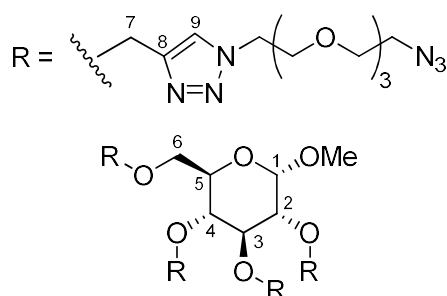


Obtained following the mesylation method G7, azidation method G2, trityl removal method G8. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **87** (26% yield) as a white solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 4.40-4.37 (m, 2H, SO₃CH₂CH₂), 3.92-3.56 (m, 126 H, CH₂O), 3.04 (s, 3 H, SO₃CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 70.9–69.6 (OCH₂CH₂O), 69.6 (SO₃CH₂CH₂), 68.7 (SO₃CH₂CH₂), 51.1 (CH₂N₃), 37.4 (SO₃CH₃).

Compound 88 :



Obtained following the CuAAC method G3. This reaction afforded the compound **88** (84% yield) as a colourless gum.

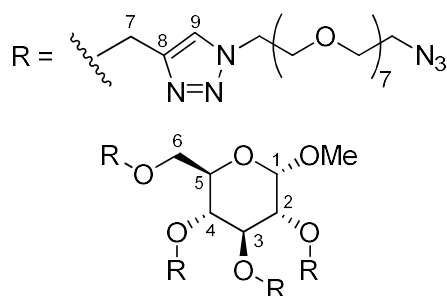
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.92, 7.89, 7.78, 7.76 (4 s, 4 H, H-9), 4.92 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H-7), 4.82 (bs, 2 H), 4.75 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H-7), 4.72 (bs, 1 H, H-2), 4.67 (d, *J* = 3.2Hz, 1 H, H-1), 4.64 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H7), 4.58 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H-7), 4.56 (m, 2 H, H-7), 4.53-4.48 (m, 6 H, H-4, H-7, CH₂O), 3.83-3.75 (m, 13 H, H-3, H-5, H-6, CH₂O), 3.68-3.55 (m, 42 H, CH₂O), 3.36 (m, 8 H, CH₂N₃), 3.29 (bs, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.2-145.0 (C-8), 124.4-124.0 (C-9), 99.1 (C-1), 79.8, 74.8, 74.5, (C-3, C-4, C-5), 71.5 (C6), 70.8-69.4 (CH₂O), 69.2, 66.2, 64.9 (C-7), 64.3 (C-2), 63.7 (C-7), 55.0 (OCH₃), 50.8 (CH₂N₃), 50.3-50.2 (CH₂N).

[α]_D (MeOH, c=1, 20°C) = +16.5

HRMS, ESI : m/z: [M + H]⁺_{calc} = 1323.6630 Da, [M + H]⁺_{mes} = 1323.6626 Da

Compound 89 :



Obtained following the CuAAC method G3. This reaction afforded the compound **89** (75% yield) as a colourless gum.

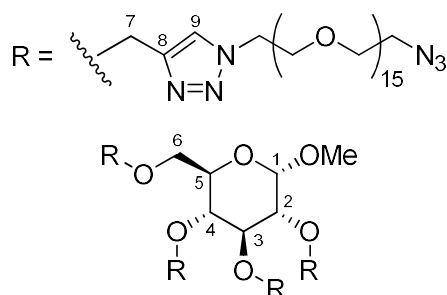
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.91, 7.89, 7.78, 7.75 (4 s, 4 H, H-9), 4.93 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H-7), 4.81 (bs, 2 H), 4.74 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H-7), 4.71 (bs, 1 H, H-2), 4.66 (d, *J* = 3.2Hz, 1 H, H-1), 4.64 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H7), 4.57 (d, *J* = 11.3Hz, 1 H, H-7), 4.55 (m, 2 H, H-7), 4.55-4.45 (m, 6 H, H-4, H-7, CH₂O), 3.83-3.72 (m, 13 H, H-3, H-5, H-6, CH₂O), 3.69-3.53 (m, 106 H, CH₂O), 3.35 (m, 8 H, CH₂N₃), 3.30 (bs, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.3-145.0 (C-8), 124.5-124.0 (C-9), 99.0 (C-1), 79.9, 74.8, 74.5, (C-3, C-4, C-5), 71.4 (C6), 70.8-69.3 (CH₂O), 69.2, 66.1, 64.9 (C-7), 64.2 (C-2), 63.7 (C-7), 55.1 (OCH₃), 50.7 (CH₂N₃), 50.4-50.1 (CH₂N).

[α]_D (MeOH, c=1, 20°C) = +14.2

HRMS, ESI : m/z: [M + 2H]²⁺_{calc} = 1014.5452 Da, [M + 2H]²⁺_{mes} = 1014.5455 Da

Compound 90 :



Obtained following the CuAAC method G3. This reaction afforded the compound **90** (22% yield) as a colourless gum.

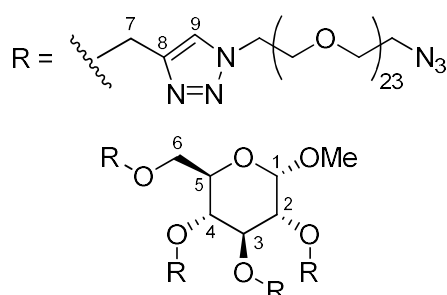
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.92, 7.89, 7.77, 7.75 (4 s, 4 H, H-9), 4.92 (d, $J = 11.3$ Hz, 1 H, H-7), 4.81 (bs, 2 H), 4.73 (d, $J = 11.3$ Hz, 1 H, H-7), 4.71 (bs, 1 H, H-2), 4.65 (d, $J = 3.2$ Hz, 1 H, H-1), 4.65 (d, $J = 11.3$ Hz, 1 H, H-7), 4.56 (d, $J = 11.3$ Hz, 1 H, H-7), 4.55 (m, 2 H, H-7), 4.54-4.45 (m, 6 H, H-4, H-7, CH₂O), 3.84-3.72 (m, 13 H, H-3, H-5, H-6, CH₂O), 3.70-3.50 (m, 170 H, CH₂O), 3.34 (m, 8 H, CH₂N₃), 3.31 (bs, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.5-145.0 (C-8), 124.5-124.1 (C-9), 99.1(C-1), 79.8, 74.8, 74.5, (C-3, C-4, C-5), 71.3 (C6), 70.8-69.2 (CH₂O), 69.2, 66.1, 64.9 (C-7), 64.1 (C-2), 63.6 (C-7), 55.0 (OCH₃), 50.6 (CH₂N₃), 50.5-50.1 (CH₂N).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = +17.8

HRMS, ESI : m/z : $[M + 2H]^{2+}_{calc} = 1719.4663$ Da, $[M + 2H]^{2+}_{mes} = 1719.4663$ Da

Compound 91 :



Obtained following the CuAAC method G3. This reaction afforded the compound **91** (30% yield) as a colourless gum.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.91, 7.89, 7.78, 7.75 (4 s, 4 H, H-9), 4.93 (d, $J = 11.3$ Hz, 1 H, H-7), 4.83 (bs, 2 H), 4.76 (d, $J = 11.3$ Hz, 1 H, H-7), 4.72 (bs, 1 H, H-2), 4.68 (d, $J = 3.2$ Hz, 1 H,

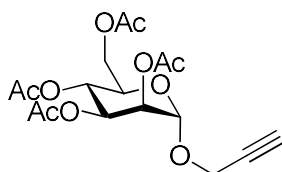
H-1), 4.65 (d, $J = 11.3\text{Hz}$, 1 H, H7), 4.57 (d, $J = 11.3\text{Hz}$, 1 H, H-7), 4.57 (m, 2 H, H-7), 4.54-4.47 (m, 6 H, H-4, H-7, CH₂O), 3.84-3.75 (m, 13 H, H-3, H-5, H-6, CH₂O), 3.73-3.50 (m, 234 H, CH₂O), 3.37 (m, 8 H, CH₂N₃), 3.31 (bs, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 145.3-144.9 (C-8), 124.4-123.9 (C-9), 99.2 (C-1), 79.9, 74.7, 74.6, (C-3, C-4, C-5), 71.5 (C6), 71.1-69.3 (CH₂O), 69.3, 66.3, 64.9 (C-7), 64.2 (C-2), 63.8 (C-7), 55.0 (OCH₃), 50.7 (CH₂N₃), 50.2-50.0 (CH₂N).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = +12.3

HRMS, ESI : m/z : $[M + 3H]^{3+}_{\text{calc}} = 1616.5942 \text{ Da}$, $[M + 3H]^{3+}_{\text{mes}} = 1616.5945 \text{ Da}$

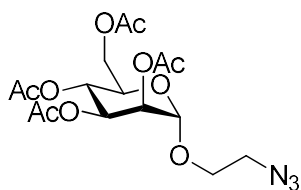
Compound 92



Obtained following the glycosylation method G9. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 6/4 (hexane/AcOEt) as eluent to afford **92** (84% yield) as a yellow gum.

The analytical data of **92** was in complete agreement with literature data.¹⁸²

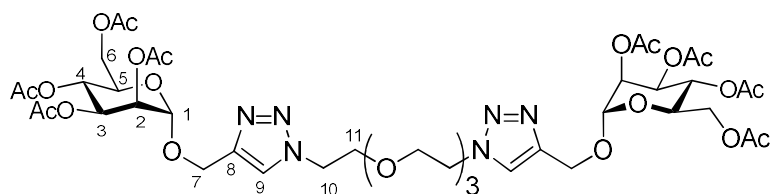
Compound 93



Obtained following the glycosylation method G9 without purification on silica gel column and azidation method G2. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 6/4 (hexane/AcOEt) as eluent to afford **93** (68% yield) as a colorless gum.

The analytical data of **93** was in complete agreement with literature data.¹⁸²

Compound 94



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **94** (92% yield) as a colorless gum.

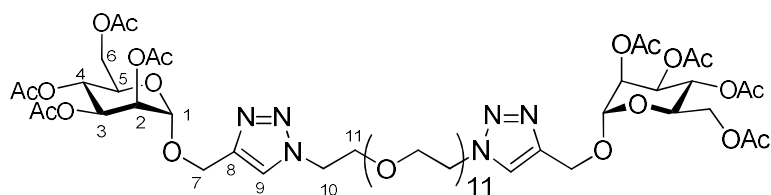
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.70 (s, 2 H, H-9), 5.28-5.21 (m, 4 H, H-3, H-4), 5.15 (bs, 2 H, H-2), 5.96 (bs, 2 H, H-1), 4.77 (d, $J = 12.4$ Hz, 2 H, H-7a), 4.60 (d, $J = 12.4$ Hz, 2 H, H-7b), 4.50 (t, $J = 4.7$ Hz, 4 H, H-11), 4.23 (dd, $J = 12.3, 5.0$ Hz, 2 H, H-6a), 4.08–4.04 (m, 4 H, H-5, H-6b), 3.83 (t, $J = 4.7$ Hz, 4 H, H-10), 3.59-3.50 (m, 8 H, CH₂O), 2.15, 2.11, 2.04, 1.98 (4 s, 24 H, CH₃CO).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.8, 170.2, 170.0, 169.7 (COCH₃), 143.4 (C-8), 124.3 (C-9), 96.9 (C-1), 70.6-69.6 (CH₂O), 69.5 (C-11), 69.4, 69.2, 68.8 (C-2, C-3, C-5), 66.2 (C-4), 62.5 (C-6), 61.0 (C-7), 52.8 (C-10), 21.0, 20.9, 20.8, 20.7 (COCH₃).

$[\alpha]_D$ (CHCl₃, $c=1$, 20°C) = +28.9

HRMS, ESI : m/z : $[M + Na]^+_{\text{calc}} = 1039.3608$, $[M + Na]^+_{\text{mes}} = 1039.3615$ Da

Compound 95



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **95** (90% yield) as a colorless gum.

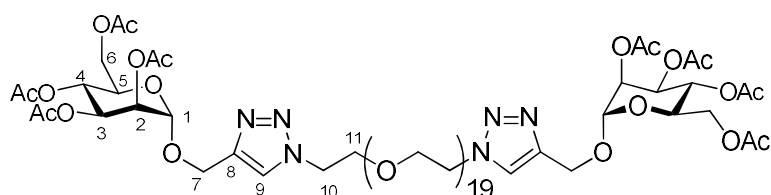
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.71 (s, 2 H, H-9), 5.28-5.20 (m, 4 H, H-3, H-4), 5.16 (bs, 2 H, H-2), 5.92 (bs, 2 H, H-1), 4.78 (d, $J = 12.4$ Hz, 2 H, H-7a), 4.61 (d, $J = 12.1$ Hz, 2 H, H-7b), 4.52 (t, $J = 4.7$ Hz, 4 H, H-11), 4.23 (dd, $J = 12.1, 5.0$ Hz, 2 H, H-6a), 4.09–4.03 (m, 4 H, H-5, H-6b), 3.82 (t, $J = 4.7$ Hz, 4 H, H-10), 3.62-3.50 (m, 24 H, CH₂O), 2.16, 2.11, 2.04, 1.99 (4 s, 24 H, CH₃CO).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.9, 170.2, 170.0, 169.6 (COCH₃), 143.4 (C-8), 124.4 (C-9), 96.9 (C-1), 70.6-69.6 (CH₂O), 69.4 (C-11), 69.4, 69.3, 68.8 (C-2, C-3, C-5), 66.1 (C-4), 62.5 (C-6), 61.1 (C-7), 52.8 (C-10), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6(COCH₃).

[α]_D (CHCl₃, c=1, 20°C) = +35.7

HRMS, ESI : m/z: [M + Na]⁺_{calc} = 1391.5705, [M + Na]⁺_{mes} = 1391.5708 Da

Compound 96



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **96** (85% yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.70 (s, 2 H, H-9), 5.27-5.21 (m, 4 H, H-3, H-4), 5.14 (bs, 2 H, H-2), 5.96 (bs, 2 H, H-1), 4.79 (d, *J* = 12.4Hz, 2 H, H-7a), 4.61 (d, *J* = 12.4Hz, 2 H, H-7b), 4.50 (t, *J* = 4.7Hz, 4 H, H-11), 4.24 (dd, *J* = 12.3, 5.0Hz, 2 H, H-6a), 4.09–4.03 (m, 4 H, H-5, H-6b), 3.83 (t, *J* = 4.7Hz, 4 H, H-10), 3.61-3.50 (m, 72 H, CH₂O), 2.15, 2.11, 2.04, 1.98 (4 s, 24 H, CH₃CO).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.2, 170.0, 169.8 (COCH₃), 143.3 (C-8), 124.3 (C-9), 96.9 (C-1), 70.6-69.5 (CH₂O), 69.4 (C-11), 69.4, 69.2, 68.9 (C-2, C-3, C-5), 66.3 (C-4), 62.5 (C-6), 61.1 (C-7), 52.7 (C-10), 21.0, 20.9, 20.8, 20.7(COCH₃).

[α]_D (CHCl₃, c=1, 20°C) = +54.3

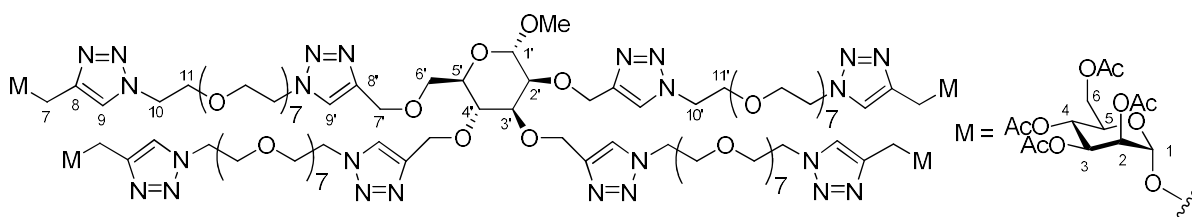
HRMS, ESI : m/z: [M + Na]⁺_{calc} = 1743.7802, [M + Na]⁺_{mes} = 1743.7811 Da

70.6-69.0 (C-11, C-11', CH₂O) 66.2, 64.9 (C-7, C-7'), 69.3, 69.2, 68.8 (C-2, C-3, C-5), 66.4 (C-4), 64.3 (C-2'), 63.6 (C-7'), 62.4 (C-6), 61.0 (C-7'), 55.4 (OCH₃), 50.3-50.1 (C10, C-10') 52.9-52.6 (C-10, C-10'), 21.0, 20.8, 20.7, 20.7 (COCH₃)

$[\alpha]_D$ (CHCl₃, c=1, 20°C) = +35.7

HRMS, MALDI : m/z: [M + H]⁺ calc = 1743.7802, [M + H]⁺ mes = 1743.7811 Da

Compound 99



Obtained following the CuAAC method G4. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **99** (65% yield) as a colorless gum.

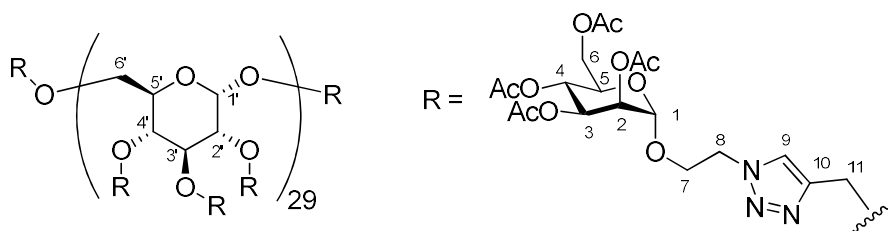
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.92, 7.85, 7.79, 7.76, 7.74 (8s, 8 H, H-9, H-9'), 5.29-5.23 (m, 8 H, H-3, H-4), 5.21 (bs, 4 H, H-2), 4.94 (bs, 4 H, H-1), 4.91-4.61 (m, 16 H, H-7, H-1', H-2', H7'), 4.55-4.44 (m, 18 H, H-7, H-11, H-11', H-7') 4.27 (dd, *J* = 12.3, 5.2Hz, 4 H, H-6a), 4.12-4.02 (m, 9 H, H-5, H-6b, H-4'), 3.91-3.72 (m, 20 H, H-10, H-3', H-5', H-6', H-10'), 3.64-3.49 (m, 96 H, CH₂O), 3.26 (s, 3 H, OCH₃), 2.11, 2.09, 2.01, 1.94 (4 s, 48 H, CH₃CO).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.5, 170.3, 170.1, 169.9 (COCH₃), 143.4 -145.0 (C-8, C-8'), 124.4-124.1 (C-9, C-9'), 99.1 (C-1'), 96.8 (C-1), 79.6, 74.7, 74.3, (C-3', C-4', C-5'), 71.3 (C6'), 70.6-69.1 (C-11, C-11', CH₂O) 66.2, 64.8 (C-7, C-7'), 69.2, 69.1, 68.8 (C-2, C-3, C-5), 66.3 (C-4), 64.3 (C-2'), 63.6 (C-7'), 62.3 (C-6), 61.2 (C-7'), 55.3 (OCH₃), 52.9-52.6 (C-10, C-10'), 21.0, 20.8, 20.7, 20.7 (COCH₃).

$[\alpha]_D$ (CHCl₃, c=1, 20°C) = +12.7

HRMS, MALDI: [M + H]⁺ calc = 1743.7802, [M + H]⁺ mes = 1743.7811 Da

Compound 100

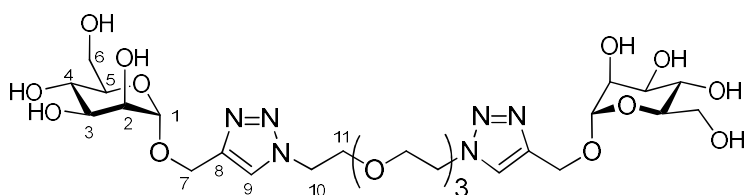


Obtained following the CuAAC method G4. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **94** (92% yield) as a colorless gum.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.30-7.51 (m broad, 3H, H-9), 5.30-5.22 (m broad, 6 H, H-3, H-4) 4.90-4.40 (m broad, 13H, H-1, H-2, H-11, H-1'), 4.25-3.80 (m broad, 15H, H-6a, H-8, H-7), 3.85-3.33 (m broad, 12H, H-5, H-6b, H-2', 3', 4', 5', 6'), 2.15-1.80 (m, 18H, CH₃CO).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.7, 170.5, 170.1 (CH₃CO), 145.4 (C-10), 124.4 (C-9), 97.7 (C-1), 97.6 (C-1'), 77.3 (C-3'), 77.2 (C-4'), 70.7 (C-2'), 69.3 (C-2, C-5'), 69.2 (C-3), 69.0 (C-5), 66.4 (C-4), 65.9 (C-11), 62.4 (C-6), 60.5 (C-7), 60.1 (C-6'), 49.7 (C-8), 21.2-20.8 (CH₃CO).

Compound 101 :



Obtained following the acetate deprotection method G6. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **101** (97% yield) as a colorless gum.

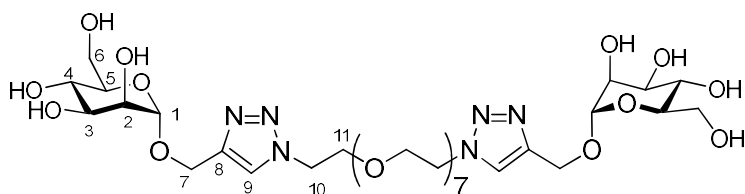
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.14 (s, 2H, H-9), 5.03 (d, *J* = 1.9Hz, 2 H, H-1), 4.88 (d, *J* = 12.7Hz, 2 H, H-7a), 4.75 (d, *J* = 12.7Hz, 2 H, H-7b), 4.69 (t, *J* = 5.2Hz, 4 H, H-11), 4.02 (t, *J* = 5.2Hz, 4 H, H-10), 3.98 (dd, *J* = 1.9Hz, *J* = 3.7Hz, 2 H, H-2), 3.91 (dd, *J* = 1.9Hz, *J* = 12.4Hz, 2 H, H-6a), 3.87-3.78 (m, 4 H, H-3, H-6b), 3.77-3.70 (m, 4 H, H-4, H-5), 3.70-3.67 (m, 8 H, CH₂O).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 143.5 (C-8), 126.6 (C-9), 99.5 (C-1), 73.0 (C-5), 70.5 (C-3), 70.0 (C-2), 69.7-69.5 (CH₂O), 68.7 (C-10), 66.7 (C-4), 60.9 (C-6), 59.8 (C-7), 50.1 (C-11).

[α]_D (MeOH, c=1, 20°C) = +78.5

HRMS, MALDI: [M + Na]⁺ calc = 703.2762 Da, [M + Na]⁺ mes = 703.2766 Da

Compound 102 :



Obtained following the acetate deprotection method G6. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **102** (93% yield) as a colorless gum.

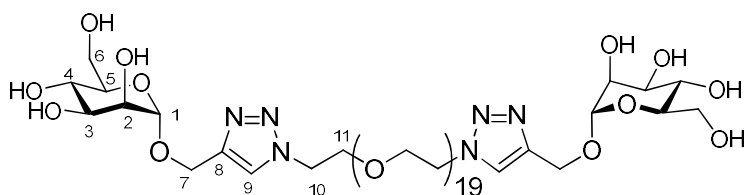
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.15 (s, 2H, H-9), 5.02 (d, $J = 1.9$ Hz, 2 H, H-1), 4.89 (d, $J = 12.7$ Hz, 2 H, H-7a), 4.75 (d, $J = 12.7$ Hz, 2 H, H-7b), 4.70 (t, $J = 5.2$ Hz, 4 H, H-11), 4.02 (t, $J = 5.2$ Hz, 4 H, H-10), 3.99 (dd, $J = 1.9$ Hz, $J = 3.7$ Hz, 2 H, H-2), 3.90 (dd, $J = 1.9$ Hz, $J = 12.4$ Hz, 2 H, H-6a), 3.87-3.78 (m, 4 H, H-3, H-6b), 3.77-3.71 (m, 4 H, H-4, H-5), 3.70-3.66 (m, 24 H, CH₂O).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 143.5 (C-8), 126.5 (C-9), 99.5 (C-1), 73.2 (C-5), 70.5 (C-3), 70.0 (C-2), 69.7-69.3 (CH₂O), 68.8 (C-10), 66.7 (C-4), 60.8 (C-6), 59.7 (C-7), 50.0 (C-11).

$[\alpha]_D$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = +68.3

HRMS, MALDI: $[M + Na]^+_{\text{calc}} = 879.3811$ Da, $[M + Na]^+_{\text{mes}} = 879.3815$ Da

Compound 103 :



Obtained following the acetate deprotection method G6. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **103** (71% yield) as a colorless gum.

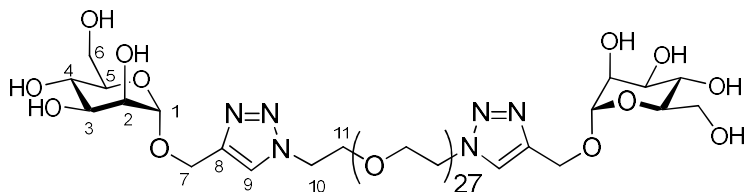
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.14 (s, 2H, H-9), 5.01 (d, $J = 1.9$ Hz, 2 H, H-1), 4.87 (d, $J = 12.7$ Hz, 2 H, H-7a), 4.76 (d, $J = 12.7$ Hz, 2 H, H-7b), 4.70 (t, $J = 5.2$ Hz, 4 H, H-11), 4.04 (t, $J = 5.2$ Hz, 4 H, H-10), 3.96 (dd, $J = 1.9$ Hz, $J = 3.7$ Hz, 2 H, H-2), 3.90 (dd, $J = 1.9$ Hz, $J = 12.4$ Hz, 2 H, H-6a), 3.87-3.78 (m, 4 H, H-3, H-6b), 3.77-3.69 (m, 4 H, H-4, H-5), 3.70-3.63 (m, 72 H, CH₂O).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 143.3(C-8), 126.4 (C-9), 99.5 (C-1), 73.0 (C-5), 70.6(C-3), 70.0 (C-2), 69.7-69.2 (CH_2O), 68.6 (C-10), 66.7 (C-4), 60.8 (C-6), 59.8 (C-7), 50.2 (C-11).

$[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = +59.7

HRMS, MALDI: $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{calc}} = 1407.6957$ Da, $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{mes}} = 1407.6953$ Da

Compound 104 :



Obtained following the acetate deprotection method G6. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **104** (74% yield) as a colorless gum.

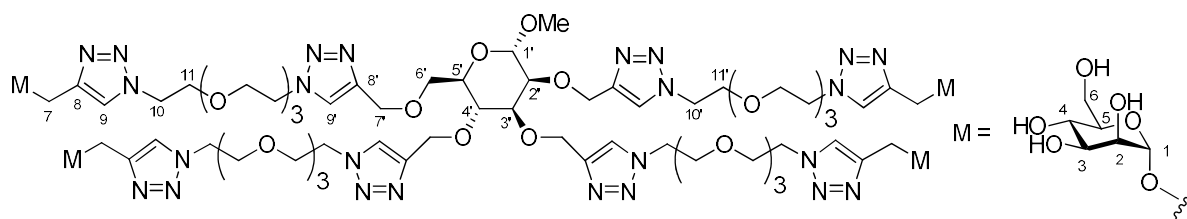
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.15 (s, 2H, H-9), 5.03 (d, $J = 1.9\text{Hz}$, 2 H, H-1), 4.88 (d, $J = 12.7\text{Hz}$, 2 H, H-7a), 4.75 (d, $J = 12.7\text{Hz}$, 2 H, H-7b), 4.69 (t, $J = 5.2\text{Hz}$, 4 H, H-11), 4.02 (t, $J = 5.2\text{Hz}$, 4 H, H-10), 3.98 (dd, $J = 1.9\text{Hz}$, $J = 3.7\text{Hz}$, 2 H, H-2), 3.91 (dd, $J = 1.9\text{Hz}$, $J = 12.4\text{Hz}$, 2 H, H-6a), 3.87-3.78 (m, 4 H, H-3, H-6b), 3.77-3.70 (m, 4 H, H-4, H-5), 3.70-3.61 (m, 104 H, CH_2O).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 143.5 (C-8), 126.6 (C-9), 99.5 (C-1), 73.0 (C-5), 70.5(C-3), 70.0 (C-2), 69.7-69.5 (CH_2O), 68.7 (C-10), 66.7 (C-4), 60.9 (C-6), 59.8 (C-7), 50.1 (C-11).

$[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH, $c=1$, 20°C) = +60.3

HRMS, MALDI: $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{calc}} = 703.2762$ Da, $[\text{M} + \text{Na}]^+_{\text{mes}} = 703.2766$ Da

Compound 105



Obtained following the acetate deprotection method G6. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **105** (78% yield) as a colorless gum.

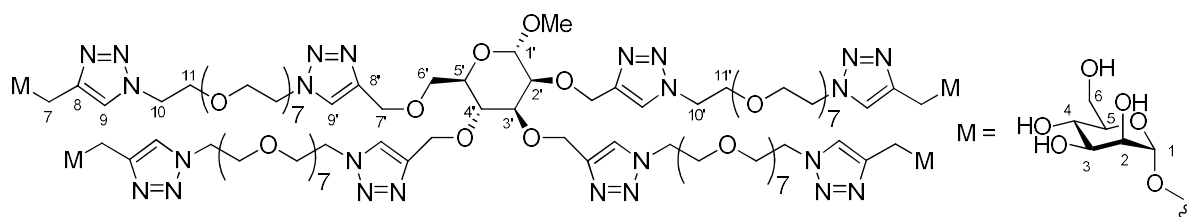
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.18-8.11 (8s, 82H, H-9, H-9'), 5.02 (bs, 4 H, H-1), 4.89-4.68 (m, 16 H, H-7, H7'), 4.67-4.55 (m, 18 H, H-11, H1', H-2', H-11'), 4.03-3.93 (m, 21 H, H-2, H-10, H-4', H-10'), 3.92-3.80 (m, 12 H, H-3, H-6), 3.78-3.68 (m, 8 H, H-4, H-5), 3.67-3.52 (m, 36 H, H-3', H-5', H-6', CH₂O), 3.41 (s, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 143.9, 143.8, 143.5 (C-8, C-8'), 125.7, 125.6, 125.3 (C-9, C-9'), 99.5 (C-1), 98.3 (C-1'), 77.5, 74.9, 74.0 (C-3', C-4', C-5'), 73.0 (C-5), 70.6 (C-3), 70.3 (C-6'), 70.0 (C-2), 69.7-69.5 (CH₂O), 68.7 (C-10), 66.7 (C-4), 64.2 (C-2'), 63.2 (C-7'), 60.9 (C-6), 59.8 (C-7), 55.0 (OCH₃), 50.1 (C-11).

[α]_D (MeOH, c=1, 20°C) = +81.2

HRMS, MALDI: $[M + 2H]^{2+}_{\text{calc}} = 1098.4935 \text{ Da}$, $[M + 2H]^{2+}_{\text{mes}} = 1098.4933 \text{ Da}$

Compound 106



Obtained following the acetate deprotection method G6. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **106** (65% yield) as a colorless gum.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.19-8.11 (8s, 82H, H-9, H-9'), 5.01 (bs, 4 H, H-1), 4.92-4.68 (m, 16 H, H-7, H7'), 4.67-4.54 (m, 18 H, H-11, H1', H-2', H-11'), 4.03-3.92 (m, 21 H, H-2,

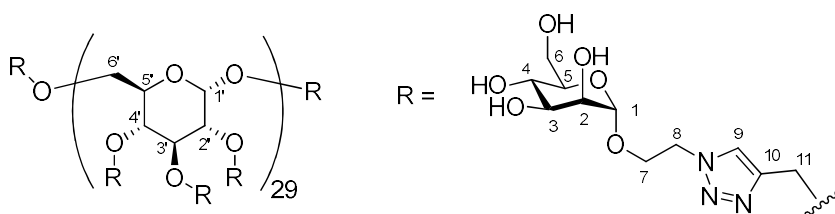
H-10, H-4', H-10'), 3.92-3.78 (m, 12 H, H-3, H-6), 3.78-3.68 (m, 8 H, H-4, H-5), 3.67-3.52 (m, 100 H, H-3', H-5', H-6', CH₂O), 3.41 (s, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 143.8, 143.8, 143.7 (C-8, C-8'), 125.6, 125.6, 125.2 (C-9, C-9'), 99.5 (C-1), 98.3 (C-1'), 77.6, 74.9, 74.1 (C-3', C-4', C-5'), 73.1 (C-5), 70.5 (C-3), 70.3 (C-6'), 70.0 (C-2), 69.7-69.5 (CH₂O), 68.7 (C-10), 66.7 (C-4), 64.2 (C-2'), 63.3 (C-7'), 60.7 (C-6), 59.8 (C-7), 55.1 (OCH₃), 50.2 (C-11).

[α]_D (MeOH, c=1, 20°C) = +67.5

HRMS, MALDI: [M + Na]⁺ calc = 1451.2049 Da, [M + Na]⁺ mes = 1451.2045 Da

Compound 107

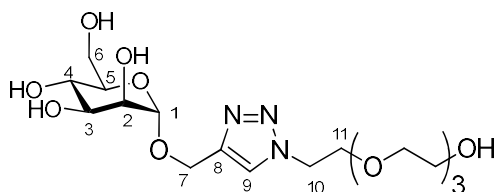


Obtained following the acetate deprotection method G6. This reaction afforded the compound **107** (74% yield) as a yellowish solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.22-8.00 (m broad, 3 H, H-9), 5.27-5.00 (m broad, 1 H, H-1'), 5.00-4.82 (m broad, 9 H, H-1, H-11), 4.55-4.39 (m broad, 3H, H-7), 4.05-3.68 (m broad, 11H), 3.64-3.51 (m broad, 6 H), 3.51-3.36 (m broad, 3H), 3.35-3.24 (m broad, 3H), 3.04-2.95 (m broad, 3H), 2.92-2.77 (m broad, 3H), 2.75-2.61 (m broad, 3H), 2.41-2.25 (m broad, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 142.7 (C-10), 125.5 (C-9), 97.3 (C-1'), 94.3 (C-1), 80.6 (CH'), 78.9 (CH'), 78.2 (CH), 77.8 (CH'), 72.5 (CH'), 70.3 (CH), 68.3 (CH), 65.4 (CH'), 65.2 (CH), 62.4 (CH), 63.2 (CH₂), 57.9 (CH₂), 49.5 (CH₂).

Compound 108 :



Obtained following the CuAAC method G3 and acetate deprotection method G6 to afford **108** (69% yield over 2 steps) as a colorless gum.

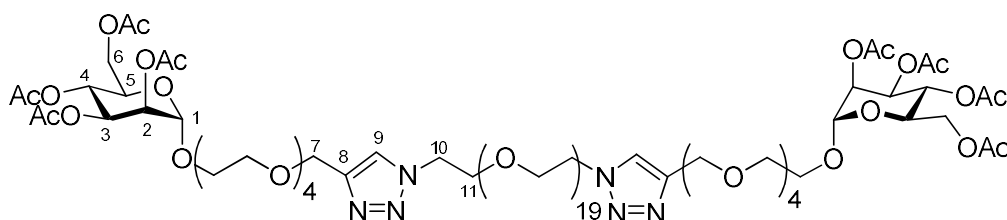
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.17 (s, 1H, H-9), 5.03 (d, *J* = 1.9Hz, 1H, H-1), 4.88 (d, *J* = 12.7Hz, 1 H, H-7a), 4.75 (d, *J* = 12.7Hz, 1 H, H-7b), 4.67 (t, *J* = 5.2Hz, 1 H, H-11), 4.05 (t, *J* = 5.2Hz, 2 H, H-10), 3.99 (dd, *J* = 1.9Hz, *J* = 3.7Hz, 1 H, H-2), 3.90 (dd, *J* = 1.9Hz, *J* = 12.4Hz, 1 H, H-6a), 3.84-3.78 (m, 2 H, H-3, H-6b), 3.75-3.70 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.68-3.61 (m, 12 H, CH₂O).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 143.9 (C-8), 126.8 (C-9), 99.7 (C-1), 73.5 (C-5), 70.6 (C-3), 70.4 (C-2), 69.9-69.5 (CH₂O), 68.8 (C-10), 66.9 (C-4), 61.0 (C-6), 59.9 (C-7), 50.3 (C-11).

[α]_D (MeOH, c=1, 20°C) = +28.6

HRMS, MALDI: [M + Na]⁺ calc = 460.1907 Da, [M + Na]⁺ mes = 460.1903 Da

Compound 109



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **109** (74% yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 7.74 (s, 2 H, H-9), 5.29-5.20 (m, 4 H, H-3, H-4), 5.19 (bs, 2 H, H-2), 5.02 (bs, 2 H, H-1), 4.85 (d, *J* = 12.4Hz, 2 H, H-7a), 4.59 (d, *J* = 12.4Hz, 2 H, H-7b), 4.50 (t, *J* = 4.7Hz, 4 H, H-11), 4.28 (dd, *J* = 12.3, 5.0Hz, 2 H, H-6a), 4.10–4.00 (m, 4 H, H-5, H-6b), 3.80 (t, *J* = 4.7Hz, 4 H, H-10), 3.61-3.45 (m, 104 H, CH₂O), 2.14, 2.11, 2.00, 1.95 (4 s, 24 H, CH₃CO).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 171.3, 170.2, 170.0, 169.5 (COCH₃), 143.3 (C-8), 124.3 (C-9), 96.9 (C-1), 70.6-69.5 (CH₂O), 69.4 (C-11), 69.6, 69.1, 68.5 (C-2, C-3, C-5), 67.0 (C-4), 62.5 (C-6), 59.4 (C-7), 52.4 (C-10), 21.2, 20.8, 20.6, 20.5 (COCH₃).

[α]_D (CHCl₃, c=1, 20°C) = +12.4

HRMS, MALDI : *m/z*: [M + H]⁺ calc = 2074.0080, [M + H]⁺ mes = 2074.0075 Da

Compound 110

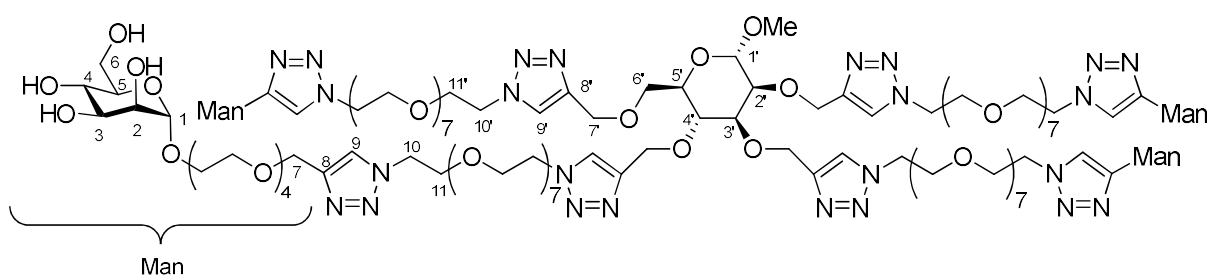
3.7Hz, 2 H, H-2), 3.91 (dd, $J = 1.9\text{Hz}$, $J = 12.4\text{Hz}$, 2 H, H-6a), 3.85-3.75 (m, 4 H, H-3, H-6b), 3.78-3.70 (m, 4 H, H-4, H-5), 3.70-3.65 (m, 104 H, CH₂O).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 143.5 (C-8), 126.5 (C-9), 99.5 (C-1), 73.2 (C-5), 70.5(C-3), 70.0 (C-2), 69.7-69.3 (CH₂O), 68.8 (C-10), 66.7 (C-4), 60.8 (C-6), 59.7 (C-7), 50.0 (C-11).

$[\alpha]_D$ (MeOH, c=1, 20°C) = +57.3

HRMS, MALDI: $[M + Na]^+_{\text{calc}} = 879.3811$ Da, $[M + Na]^+_{\text{mes}} = 879.3815$ Da

Compound 120



Obtained following the acetate deprotection method G6. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 95/5 (DCM/MeOH) as eluent to afford **120** (78% yield) as a white solid.

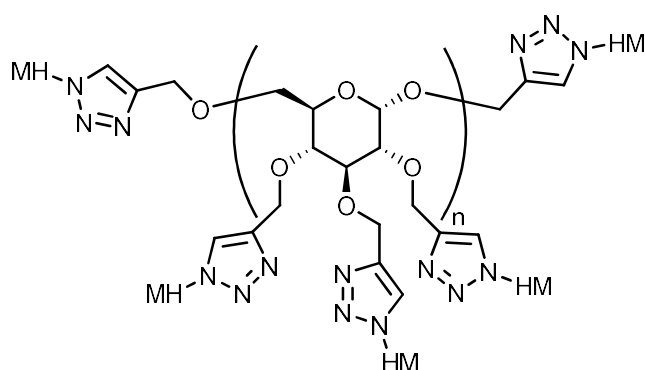
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.25-8.10 (8s, 82H, H-9, H-9'), 5.03 (bs, 4 H, H-1), 4.95-4.67 (m, 16 H, H-7, H-7'), 4.67-4.51 (m, 18 H, H-11, H-11', H-2', H-11'), 4.01-3.90 (m, 21 H, H-2, H-10, H-4', H-10'), 3.90-3.74 (m, 12 H, H-3, H-6), 3.74-3.67 (m, 8 H, H-4, H-5), 3.67-3.50 (m, 163 H, H-3', H-5', H-6', CH₂O), 3.41 (s, 3 H, OCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 144.2, 144.0, 143.9 (C-8, C-8'), 125.9, 125.5, 125.1 (C-9, C-9'), 99.1 (C-1), 98.4 (C-1'), 77.5, 74.7, 74.0 (C-3', C-4', C-5'), 73.3 (C-5), 70.4 (C-3), 70.3 (C-6'), 70.1 (C-2), 69.8-69.4 (CH₂O), 68.6 (C-10), 66.7 (C-4), 64.1 (C-2'), 63.4 (C-7'), 60.6 (C-6), 59.7 (C-7), 55.1 (OCH₃), 50.2 (C-11).

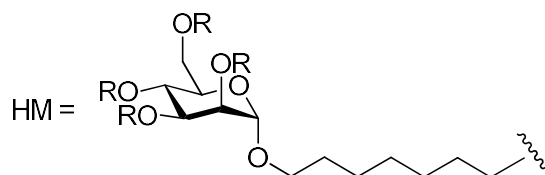
$[\alpha]_D$ (MeOH, c=1, 20°C) = +31.3

HRMS, MALDI: $[M + 3H]^{3+}_{\text{calc}} = 1202.6123$ Da, $[M + 3H]^{3+}_{\text{mes}} = 1202.6128$ Da

Compounds 113 to 116 and 121 to 124



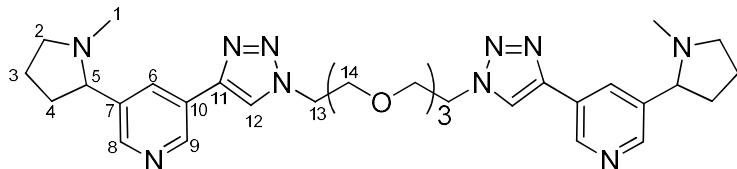
113 (R = Ac) **121** (R=H) (n = 7)
114 (R = Ac) **122** (R=H) (n = 29)
115 (R = Ac) **123** (R=H) (n = 147)
116 (R = Ac) **124** (R=H) (n = 300)



HM derivatives were obtained following Chalopin et al. synthesis and the analytical data was in accordance with Chalopin et al. description.¹⁶²

Chapter 4

Compound 134



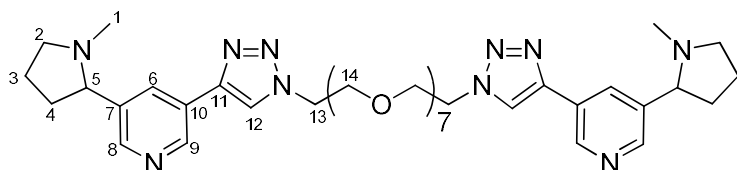
Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **134** (83% yield) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.67 (s, 2H, H-8), 8.56 (s, 2H, H-9), 8.33 (s, 2H, H-12), 8.13 (s, 2H, H-6), 4.61 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 4 H, H-14), 4.17-4.11 (m, 2H, H-5), 3.94 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 4 H, H-13), 3.63-3.55 (m, 9H, H-2a, CH_2O), 3.16-3.07 (m, 2H, H-2b), 2.62 (s, 6H, H-1), 2.56-2.52 (m, 2H, H-4a), 2.29-2.13 (m, 6H, H-3, H-4b).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 148.4 (C-8), 146.3 (C-9), 143.2 (C-11), 133.0 (C-6), 132.1, 16.6 (C-7, C-10), 123.2 (C-12), 69.7-69.5 (CH_2O), 69.1 (C-5), 68.5 (C-13), 56.2 (C-2), 50.3 (C-14), 38.6 (C-1), 31.3 (C-4), 21.6 (C-3).

HRMS, ESI: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{calc}} = 617.3673 \text{ Da}$, $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{mes}} = 617.3677 \text{ Da}$

Compound 135



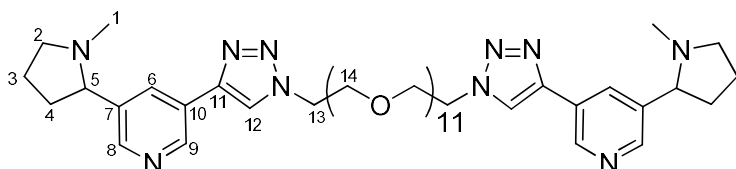
Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **135** (91% yield) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8.66 (s, 2H, H-8), 8.55 (s, 2H, H-9), 8.33 (s, 2H, H-12), 8.15 (s, 2H, H-6), 4.60 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 4 H, H-14), 4.18-4.11 (m, 2H, H-5), 3.95 (t, $J = 5.5\text{Hz}$, 4 H, H-13), 3.64-3.55 (m, 25H, H-2a, CH_2O), 3.15-3.07 (m, 2H, H-2b), 2.61 (s, 6H, H-1), 2.55-2.52 (m, 2H, H-4a), 2.30-2.12 (m, 6H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 148.3 (C-8), 146.2 (C-9), 143.1 (C-11), 133.1 (C-6), 132.0, 16.5 (C-7, C-10), 123.1 (C-12), 69.9-69.4 (CH₂O), 69.1 (C-5), 68.6 (C-13), 56.3 (C-2), 50.2 (C-14), 38.5 (C-1), 31.3 (C-4), 21.5 (C-3).

HRMS, ESI: [M + H]⁺_{calc} = 793.4725 Da, [M + H]⁺_{mes} = 793.4728 Da

Compound 136



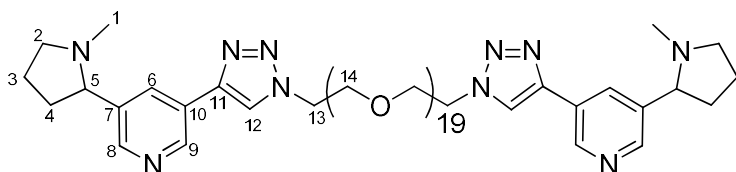
Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **136** (87% yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.66 (s, 2H, H-8), 8.56 (s, 2H, H-9), 8.34 (s, 2H, H-12), 8.14 (s, 2H, H-6), 4.60 (t, *J* = 5.5Hz, 4 H, H-14), 4.17-4.10 (m, 2H, H-5), 3.93 (t, *J* = 5.5Hz, 4 H, H-13), 3.67-3.53 (m, 4H, H-2a, CH₂O), 3.16-3.06 (m, 2H, H-2b), 2.60 (s, 6H, H-1), 2.55-2.51 (m, 2H, H-4a), 2.28-2.12 (m, 6H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 148.3 (C-8), 146.2 (C-9), 143.2 (C-11), 133.0 (C-6), 132.0, 16.6 (C-7, C-10), 123.3 (C-12), 69.9-69.2 (CH₂O), 69.1 (C-5), 68.4 (C-13), 56.2 (C-2), 50.2 (C-14), 38.5 (C-1), 31.3 (C-4), 21.7 (C-3).

HRMS, ESI: [M + H]⁺_{calc} = 969.5773 Da, [M + H]⁺_{mes} = 969.5778 Da

Compound 137



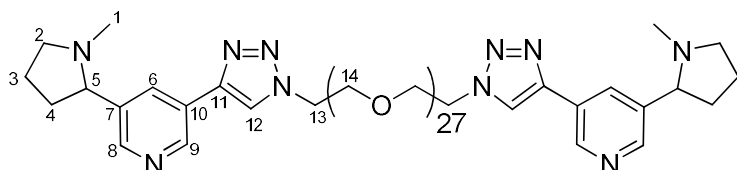
Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **137** (75% yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.68 (s, 2H, H-8), 8.57 (s, 2H, H-9), 8.33 (s, 2H, H-12), 8.13 (s, 2H, H-6), 4.61 (t, *J* = 5.5Hz, 4 H, H-14), 4.18-4.11 (m, 2H, H-5), 3.93 (t, *J* = 5.5Hz, 4 H, H-13), 3.68-3.55 (m, 73H, H-2a, CH₂O), 3.17-3.07 (m, 2H, H-2b), 2.63 (s, 6H, H-1), 2.56-2.50 (m, 2H, H-4a), 2.29-2.12 (m, 6H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 148.3 (C-8), 146.1 (C-9), 143.2 (C-11), 133.1 (C-6), 132.0, 16.4 (C-7, C-10), 123.3 (C-12), 69.6-69.5 (CH₂O), 69.1 (C-5), 68.3 (C-13), 56.1 (C-2), 50.2 (C-14), 38.5 (C-1), 31.2 (C-4), 21.5 (C-3).

HRMS, ESI: [M + H]⁺_{calc} = 1321.7870 Da, [M + H]⁺_{mes} = 1321.7872 Da

Compound 138



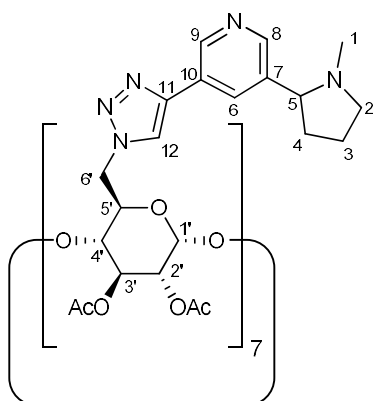
Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **138** (82% yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.68 (s, 2H, H-8), 8.57 (s, 2H, H-9), 8.34 (s, 2H, H-12), 8.14 (s, 2H, H-6), 4.61 (t, *J* = 5.5Hz, 4 H, H-14), 4.19-4.12 (m, 2H, H-5), 3.96(t, *J* = 5.5Hz, 4 H, H-13), 3.70-3.56 (m, 105H, H-2a, CH₂O), 3.15-3.06 (m, 2H, H-2b), 2.63 (s, 6H, H-1), 2.56-2.52 (m, 2H, H-4a), 2.28-2.11 (m, 6H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 148.2 (C-8), 146.1 (C-9), 143.2 (C-11), 133.0 (C-6), 132.2, 16.5 (C-7, C-10), 123.1 (C-12), 69.6-69.4 (CH₂O), 69.1 (C-5), 68.5 (C-13), 56.3 (C-2), 50.3 (C-14), 38.7 (C-1), 31.4 (C-4), 21.7 (C-3).

HRMS, ESI: [M + H]⁺_{calc} = 1673.9968 Da, [M + H]⁺_{mes} = 1673.9973 Da

Compound 139



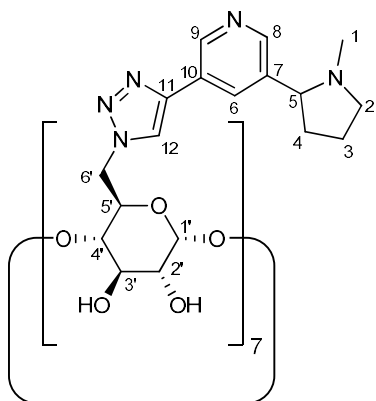
Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **139** (82% yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.85 (bs, 7H, H-8), 8.36 (bs, 7H, H-9), 8.17 (m, 14H, H-12, H-6), 5.50 (bs, 7H, H-1'), 5.35 (bs, 7H, CH'), 5.10-4.42 (m, 28H, H-5, 3xCH'), 3.62-3.58 (m, 7H, CH'), 3.31-3.18 (m, 14H, H-2a, CH'), 2.39-2.30 (bs, 7H, H-2b), 2.26-2.17 (m, 28H, H-1, H-4a), 2.09 (bs, 21H, CH₃CO), 2.02 (bs, 21H, CH₃CO), 1.80-1.75 (m, 14H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 170.4 (CH₃CO), 169.5 (CH₃CO), 148.9 (C-8), 146.3 (C-9), 144.5 (C-11), 133.3 (C-7), 132.2 (C-6), 126.5 (C-10), 123.8 (C-12), 96.6 (C-1'), 77.1 (CH'), 70.6 (CH'), 69.7 (C-5), 69.1 (2xCH'), 56.6 (C-2), 50.5(CH'), 39.9 (C-4), 34.3 (C-3), 22.6 (CH₃CO), 20.7 (CH₃CO).

HRMS, MALDI: $[M + 2H]^{2+}_{\text{calc}} = 1601.6960 \text{ Da}$, $[M + 2H]^{2+}_{\text{mes}} = 1601.6951 \text{ Da}$

Compound 140



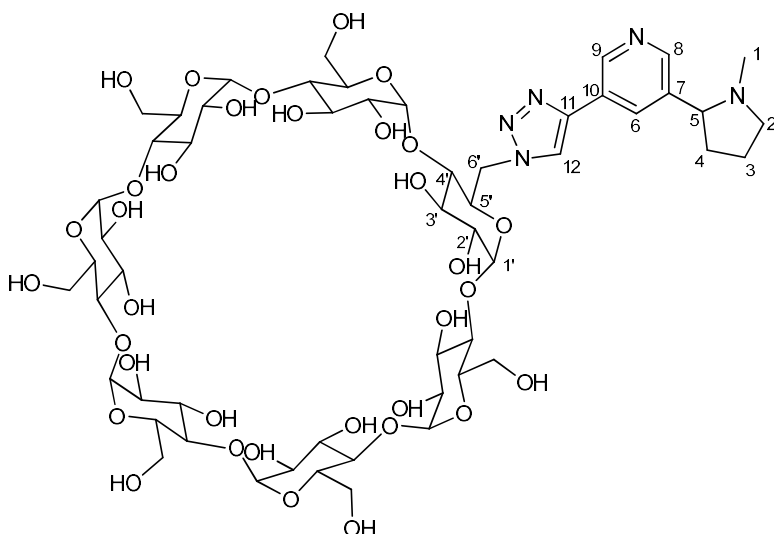
Obtained following the acetate déprotection method G6. The crude product was purified by size exclusion chromatography with Hitrap® column to afford **140** (quant. yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 9.30-8.60 (m, 28H, H-6, H-8, H-9, H-12), 5.25 (bs, 7H, H-1), 5.25 (bs 7H, H-1'), 4.40-4.35 (m, 7H, H-4'), 4.15-3.80 (m, 21H, H-5, H-6'a, H-3'), 3.72-3.27 (m, 42H, H-2, H-2', H-5', H-6'b), 2.86 (bs, 7H, H-1), 2.63-2.50 (m, 7H, H-4a), 2.50-2.20 (m, 21H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 148.9 (C-8), 146.3 (C-9), 144.5 (C-11), 133.3 (C-7), 132.2 (C-6), 126.5 (C-10), 123.8 (C-12), 101.3 (C-1'), 72.5 (CH'), 71.3 (CH'), 70.1 (CH'), 69.0 (CH'), 62.9 (C-6'), 59.2 (C-5), 54.2 (C-2), 40.7 (C-1), 39.2 (C-4), 34.7 (C-3).

HRMS, MALDI: [M + 2H]²⁺_{calc} = 1307.6220 Da, [M + 2H]²⁺_{mes} = 1307.6209 Da

Compound 141



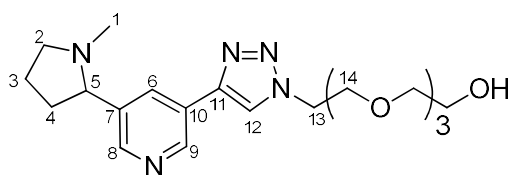
Obtained following the CuAAC method G3 and acetate déprotection method G6. The crude product was purified by size exclusion chromatography with Hitrap® column to afford **141** (quant. yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.86 (s, 1H, H-8), 8.54 (s, 1H, H-9), 8.40 (s, 1H, H-12), 8.25 (s, 1H, H-6), 5.15-4.80 (bs, 7H, H-1'), 4.10-4.00 (m, 1H, H-5), 4.00-3.20 (m, 43H, H-6'a, H-3', 42H, H-2, H-2', H-5', H-6'b), 2.87 (bs, 21H, H-1), 2.70-2.45 (m, 1H, H-4a), 2.30-2.10 (m, 21H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 148.8 (C-8), 146.4 (C-9), 144.4 (C-11), 133.5 (C-7), 132.3 (C-6), 126.7 (C-10), 123.9 (C-12), 101.5 (C-1') 72.2 (CH'), 71.1 (CH'), 70.0 (CH'), 69.3 (CH'), 62.6 (C-6'), 59.2 (C-5), 54.0 (C-2), 40.5 (C-1), 39.1 (C-4), 34.5 (C-3).

HRMS, MALDI: [M + H]⁺_{calc} = 1307.4998 Da, [M + H]⁺_{mes} = 1307.4992 Da

Compound 142



Obtained following the CuAAC method G3. The crude product was chromatographed on a silica gel column with 9/1 (DCM/MeOH) as eluent to afford **142** (82% yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 8.72 (s, 1H, H-8), 8.59 (s, 1H, H-9), 8.34 (s, 1H, H-12), 8.16 (s, 1H, H-6), 4.63 (t, *J* = 5.5Hz, 2H, H-14), 4.21-4.13 (m, 1H, H-5), 3.94 (t, *J* = 5.5Hz, 1H, H-13), 3.68-3.59 (m, 13H, H-2a, CH₂O), 3.16-3.08 (m, 1H, H-2b), 2.65 (s, 3H, H-1), 2.58-2.52 (m, 2H, H-4a), 2.27-2.11 (m, 3H, H-3, H-4b).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 148.0 (C-8), 146.2 (C-9), 143.3 (C-11), 133.1 (C-6), 132.1, 16.5 (C-7, C-10), 123.0 (C-12), 69.5-69.3 (CH₂O), 69.0 (C-5), 68.4 (C-13), 56.2 (C-2), 50.2 (C-14), 38.6 (C-1), 31.7 (C-4), 21.5 (C-3).

HRMS, ESI: [M + H]⁺_{calc} = 406.2454 Da, [M + H]⁺_{mes} = 406.2461 Da

Biological Assays

Isothermal Titration Microcalorimetry (AFL)

Recombinant lyophilized AFL was dissolved in buffer (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH=7.5) and degassed. Protein concentration (between 10 and 68 μ M depending on the ligand affinity) was checked by measurement of optical density using a theoretical molar extinction coefficient of 28000. Carbohydrate ligands were dissolved directly into the same buffer, degassed, and placed in the injection syringe (between 0.125 and 3 mM depending on the ligand). ITC was performed with a VP-ITC MicroCalorimeter from MicroCal Incorporated. AFL was placed into the 1.4478-mL sample cell, at 25°C. Titration was performed with 10 μ L injection of carbohydrate ligand every 300 s. Data were fitted with MicroCal Origin 7 software, according to standard procedures. Fitted data yielded the stoichiometry (n), the association constant (K_a) and enthalpy of binding (ΔH). Other thermodynamic parameters (i.e. changes in free energy ΔG and entropy ΔS) were calculated from the equation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a$ where T is the absolute temperature and R = 8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹. Two or three independent titrations were performed for each ligand tested.

Adhesion assay (AFL)

Fungal strain : *A. fumigatus* clinical isolate AFNAN017 issued from the EA1155 collection was used for all culture manipulations. The strain was propagated on sabouraud agar medium at 37°C for 3-5 days.

Host cells : the type II pneumocyte cell line CCL-185 (lung epithelial cells A549) was obtained from the American Type Culture Collection, and was grown in RPMI medium containing 10% foetal bovine serum, streptomycin (100 mg/litre) and penicillin (16 mg/litre).

Adherence test : to measure the adherence of *A. fumigatus* spores to A549 epithelial cells, an inoculum of 10⁴ cells was used and monolayers of A549 cells were grown to confluence (7 days) in 96-well plate (Nunclone, Inc). Then cells were incubated with varying concentrations of *A. fumigatus* spores suspended in RPMI to standardized the challenge in the test. For anti adhesive assay, spore were first pretreated by three fucoside concentrations and then seeded to the A549 monolayer. After a 45 mn incubation, the medium above the cells was retrieved and wells were washed three times. Binding was quantified by optical microscopy and results expressed as the number of adhered spores by 400 pneumocytes. Each fucoside concentration was tested in triplicate on two separate occasions. In some experiments, spores were stained by calcofluor to visualize the binding.

Trans-infection assay (DC-SIGN)

To assess the blocking properties of carbohydrate ligands in a relevant *in vitro* infection assay, DC-SIGN-expressing U937 cell lines as well as immature MD-DCs were used in a *trans*-infection assay. Cells were incubated with carbohydrate ligands for 30 min at 4°C before adding viruses without washing (MOI=2). After subsequent 2 hours incubation at 37°C, cells were washed and put in close contact with a highly permissive MRC-5 cell monolayer for 72 hours. MRC-5 cells were washed three times, fixed with acetone/water 9:1 vol:vol and stained with an Alexa

488[®]-conjugated anti-cytomegalovirus IE/E antigen antibody (clone 8B1.2, Millipore, MA). The percentage of infected MRC-5 cells was determined among the total cell number (DAPI positive cells) on digitalized images processed with Fiji software. For each experiment, at least four images per condition were analyzed on Fiji. Results are represented as mean percentages of infected cells.

IC₅₀ determination (DC-SIGN)

MDDC were incubated during 20 min at 4°C with glycosylated ligand (0.1 to 10mM or 0.0001 to 200µM, depending on the affinity of the ligand). Recombinant gB coupled with biotin was then added (3 µg/mL) during 20 min at 4°C. After addition of streptavidin coupled with APC (BD phamingen), fluorescence were determined by flow cytometry (LSR II flow cytometer, BD Biosciences) analyzed with FlowJo software (Tree Star). Data were treated with Prism software.

Bibliographie

- (1) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Glycoconj. J.* **2000**, *17* (7–9), 543–551.
- (2) Hunter, C. A.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (41), 7488–7499.
- (3) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28* (8), 321–327.
- (4) Ercolani, G.; Schiaffino, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (8), 1762–1768.
- (5) Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Biochemistry (Mosc.)* **2008**, *47* (33), 8470–8476.
- (6) Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Brewer, C. F. *Biochemistry (Mosc.)* **2009**, *48* (18), 3822–3827.
- (7) Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Cavada, B. S.; Nascimento, K. S.; Moura, T. R.; Brewer, C. F. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (38), 28256–28263.
- (8) Brewer, C. F.; Miceli, M. C.; Baum, L. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12* (5), 616–623.
- (9) Sacchettini, J. C.; Baum, L. G.; Brewer, C. F. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (10), 3009–3015.
- (10) Brissonnet, Y.; Ortiz Mellet, C.; Morandat, S.; Garcia Moreno, M. I.; Deniaud, D.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Šesták, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (49), 18427–18435.
- (11) Bovin, N. V. *Glycoconj. J.* **1998**, *15* (5), 431–446.
- (12) Ramström, O.; Lohmann, S.; Bunyapaiboonsri, T.; Lehn, J.-M. *Chem. – Eur. J.* **2004**, *10* (7), 1711–1715.
- (13) Cairo, C. W.; Gestwicki, J. E.; Kanai, M.; Kiessling, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (8), 1615–1619.
- (14) Fan, E.; Zhang, Z.; Minke, W. E.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (11), 2663–2664.
- (15) Zhang, Z.; Merritt, E. A.; Ahn, M.; Roach, C.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Fan, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (44), 12991–12998.
- (16) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2754–2794.
- (17) Bouckaert, J.; Berglund, J.; Schembri, M.; De Genst, E.; Cools, L.; Wuhrer, M.; Hung, C.-S.; Pinkner, J.; Slättegård, R.; Zavialov, A.; Choudhury, D.; Langermann, S.; Hultgren, S. J.; Wyns, L.; Klemm, P.; Oscarson, S.; Knight, S. D.; De Greve, H. *Mol. Microbiol.* **2004**, *55* (2), 441–455.
- (18) Gouin, S. G.; Wellens, A.; Bouckaert, J.; Kovensky, J. *ChemMedChem* **2009**, *4* (5), 749–755.
- (19) Yan, X.; Sivignon, A.; Yamakawa, N.; Crepet, A.; Travelet, C.; Borsali, R.; Dumych, T.; Li, Z.; Bilyy, R.; Deniaud, D.; Fleury, E.; Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A.; Gouin, S. G.; Bouckaert, J.; Bernard, J. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (6), 1827–1836.
- (20) Sivignon, A.; Yan, X.; Dorta, D. A.; Bonnet, R.; Bouckaert, J.; Fleury, E.; Bernard, J.; Gouin, S. G.; Darfeuille-Michaud, A.; Barnich, N. *mBio* **2015**, *6* (6), e01298-15.
- (21) Wu, P.; Malkoch, M.; N. Hunt, J.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; G. Finn, M.; V. Fokin, V.; Barry Sharpless, K.; J. Hawker, C. *Chem. Commun.* **2005**, *0* (46), 5775–5777.

- (22) Martínez-Ávila, O.; Hijazi, K.; Marradi, M.; Clavel, C.; Campion, C.; Kelly, C.; Penadés, S. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (38), 9874–9888.
- (23) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (50), 14922–14933.
- (24) Sicard, D.; Cecioni, S.; Iazykov, M.; Chevolot, Y.; E. Matthews, S.; Praly, J.-P.; Souteyrand, E.; Imberty, A.; Vidal, S.; Phaner-Goutorbe, M. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (33), 9483–9485.
- (25) Cecioni, S.; Lalor, R.; Blanchard, B.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (47), 13232–13240.
- (26) Kramer, R. H.; Karpen, J. W. *Nature* **1998**, *395* (6703), 710–713.
- (27) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (23), 10714–10721.
- (28) Kl, P.; Gm, W. *Science* **1991**, *252* (5009), 1164–1167.
- (29) Knoll, D.; Hermans, J. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (9), 5710–5715.
- (30) *IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*, 2.1.0.; Nič, M., Jirát, J., Košata, B., Jenkins, A., McNaught, A., Eds.; IUPAC: Research Triangle Park, NC, 2009.
- (31) Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press, 1953.
- (32) Pertici, F.; de Mol, N. J.; Kemmink, J.; Pieters, R. *J. Chem. – Eur. J.* **2013**, *19* (50), 16923–16927.
- (33) Pertici, F.; J. Pieters, R. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (33), 4008–4010.
- (34) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.
- (35) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (24), 1128–1137.
- (36) Killups, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5062–5064.
- (37) E. Moses, J.; D. Moorhouse, A. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (8), 1249–1262.
- (38) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216.
- (39) Michael, A. *J. Für Prakt. Chem.* **1893**, *48* (1), 94–95.
- (40) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (11), 633–645.
- (41) Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L. *Chem. Ber.* **1967**, *100* (8), 2494–2507.
- (42) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* **2002**, *114* (14), 2708–2711.
- (43) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.
- (44) Liang, L.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (23–24), 2933–2945.
- (45) Meldal, M. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29* (12–13), 1016–1051.
- (46) Sekine, T.; Takashima, Y.; Harada, A. *RSC Adv.* **2015**, *5* (69), 56130–56135.
- (47) Lutz, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (7), 1018–1025.
- (48) Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (5), 2174–2195.

- (49) A. Neal, E.; M. Goldup, S. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (4), 2398–2404.
- (50) Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. *Sci. Adv.* **2015**, *1* (5), e1500304.
- (51) Reitsma, S.; Slaaf, D. W.; Vink, H.; Zandvoort, M. A. M. J.; Egbrink, M. G. A. oude. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* **2007**, *454* (3), 345–359.
- (52) Weinbaum, S.; Tarbell, J. M.; Damiano, E. R. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, *9* (1), 121–167.
- (53) Rutledge, J. C.; Ng, K. F.; Aung, H. H.; Wilson, D. W. *Nat. Rev. Nephrol.* **2010**, *6* (6), 361–370.
- (54) Boyd, W. C.; Shapleigh, E. *Blood* **1954**, *9* (12), 1195–1198.
- (55) Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (2), 637–674.
- (56) Guillet, J. *médecine/sciences* **2000**, *16* (8–9), 874.
- (57) Mulvey, M. A.; Schilling, J. D.; Hultgren, S. J. *Infect. Immun.* **2001**, *69* (7), 4572–4579.
- (58) Aronson, M.; Medalia, O.; Schori, L.; Mirelman, D.; Sharon, N.; Ofek, I. *J. Infect. Dis.* **1979**, *139* (3), 329–332.
- (59) Parera Pera, N.; J. Pieters, R. *MedChemComm* **2014**, *5* (8), 1027–1035.
- (60) Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760* (4), 527–537.
- (61) Alvarez Dorta, D.; Sivignon, A.; Chalopin, T.; Dumych, T. I.; Roos, G.; Bilyy, R. O.; Deniaud, D.; Krammer, E.-M.; de Ruyck, J.; Lensink, M. F.; Bouckaert, J.; Barnich, N.; Gouin, S. G. *ChemBioChem* **2016**, n/a-n/a.
- (62) Kanfar, N.; Bartolami, E.; Zelli, R.; Marra, A.; Winum, J.-Y.; Ulrich, S.; Dumy, P. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (39), 9894–9906.
- (63) Gouin, S. G. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (37), 11616–11628.
- (64) Brissonnet, Y.; Ladevèze, S.; Tezé, D.; Fabre, E.; Deniaud, D.; Daligault, F.; Tellier, C.; Šesták, S.; Remaud-Simeon, M.; Potocki-Veronese, G.; Gouin, S. G. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (4), 766–772.
- (65) Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. *Angew. Chem.* **2010**, *122* (33), 5889–5892.
- (66) Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (33), 5753–5756.
- (67) Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (49), 13825–13831.
- (68) Sainlos, M.; Tigaret, C.; Poujol, C.; Olivier, N. B.; Bard, L.; Breillat, C.; Thiolon, K.; Choquet, D.; Imperiali, B. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7* (2), 81–91.
- (69) Paolino, M.; Mennuni, L.; Giuliani, G.; Anzini, M.; Lanza, M.; Caselli, G.; Galimberti, C.; Menziani, M. C.; Donati, A.; Cappelli, A. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (62), 8582–8585.
- (70) Houser, J.; Komarek, J.; Kostlanova, N.; Cioci, G.; Varrot, A.; Kerr, S. C.; Lahmann, M.; Balloy, V.; Fahy, J. V.; Chignard, M.; Imberty, A.; Wimmerova, M. *PLoS ONE* **2013**, *8* (12), e83077.

- (71) Micheli, P. A. *Nova plantarum genera*; 1729.
- (72) Fresenius, G. *Beiträge zur Mykologie*; Brönnner, 1863.
- (73) Latgé, J.-P. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12* (2), 310–350.
- (74) Gots, R. E.; Layton, N. J.; Pirages, S. W. *AIHA J.* **2003**, *64* (4), 427–438.
- (75) Balloy, V.; Chignard, M. *Microbes Infect.* **2009**, *11* (12), 919–927.
- (76) Lin, S.-J.; Schranz, J.; Teutsch, S. M. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *32* (3), 358–366.
- (77) Denning, D. W.; O’Driscoll, B. R.; Hogaboam, C. M.; Bowyer, P.; Niven, R. M. *Eur. Respir. J.* **2006**, *27* (3), 615–626.
- (78) Greenberger, P. A. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2003**, *8*, s119-127.
- (79) Moss, R. B. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2010**, *16* (6), 598–603.
- (80) Franquet, T.; Müller, N. L.; Giménez, A.; Guembe, P.; de la Torre, J.; Bagué, S. *RadioGraphics* **2001**, *21* (4), 825–837.
- (81) Passera, E.; Rizzi, A.; Robustellini, M.; Rossi, G.; Della Pona, C.; Massera, F.; Rocco, G. *Thorac. Surg. Clin.* **2012**, *22* (3), 345–361.
- (82) Lortholary, O.; Gangneux, J.-P.; Sitbon, K.; Lebeau, B.; de Monbrison, F.; Le Strat, Y.; Coignard, B.; Dromer, F.; Bretagne, S. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17* (12), 1882–1889.
- (83) Dagenais, T. R. T.; Keller, N. P. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (3), 447–465.
- (84) Smith, J. A.; Kauffman, C. A. *Respirology* **2012**, *17* (6), 913–926.
- (85) Sibrac-Pelayo, C. Les antifongiques azolés : utiles et efficaces mais non dénués de danger : adaptation de la thérapie antifongique chez une patiente atteinte d’histoplasmosse. exercice, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2013.
- (86) Lass-Flörl, P. D. C. *Drugs* **2012**, *71* (18), 2405–2419.
- (87) Yu, S.; Chai, X.; Hu, H.; Yan, Y.; Guan, Z.; Zou, Y.; Sun, Q.; Wu, Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (10), 4435–4445.
- (88) Snelders, E.; Veld, R. A. G. H. in ‘t; Rijs, A. J. M. M.; Kema, G. H. J.; Melchers, W. J. G.; Verweij, P. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (12), 4053–4057.
- (89) Verweij, P. E.; Mellado, E.; Melchers, W. J. G. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356* (14), 1481–1483.
- (90) Morio, F.; Aubin, G. G.; Danner-Boucher, I.; Haloun, A.; Sacchetto, E.; Garcia-Hermoso, D.; Bretagne, S.; Miegville, M.; Pape, P. L. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (8), 1870–1873.
- (91) Chabasse, D.; Bouchara, J.-P.; Gentile, L. de; Laboratoire de parasitologie-mycologie (Angers); Laboratoire de cryptogamie (Paris). *Les moisissures d’intérêt médical*; Bioforma: Paris, 2002.
- (92) Tronchin, G.; Esnault, K.; Renier, G.; Filmon, R.; Chabasse, D.; Bouchara, J. P. *Infect. Immun.* **1997**, *65* (1), 9–15.
- (93) Bouchara, J. P.; Sanchez, M.; Chevaller, A.; Marot-Leblond, A.; Lissitzky, J. C.; Tronchin, G.; Chabasse, D. *Infect. Immun.* **1997**, *65* (7), 2717–2724.

- (94) Houser, J.; Komarek, J.; Cioci, G.; Varrot, A.; Imberty, A.; Wimmerova, M. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71* (3), 442–453.
- (95) Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8* (8), 4961–4982.
- (96) Dong, R.; Zhou, L.; Wu, J.; Tu, C.; Su, Y.; Zhu, B.; Gu, H.; Yan, D.; Zhu, X. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (19), 5473–5475.
- (97) Rankin, J. C.; Jeanes, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (17), 4435–4441.
- (98) Van Cleve, J. W.; Schaefer, W. C.; Rist, C. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (17), 4435–4438.
- (99) Morimoto, J.; Sarkar, M.; Kenrick, S.; Kodadek, T. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (8), 1479–1491.
- (100) Grischenko, L. A.; Parshina, L. N.; Kanitskaya, L. V.; Larina, L. I.; Novikova, L. N.; Trofimov, B. A. *Carbohydr. Res.* **2013**, *376*, 7–14.
- (101) Roy, B.; Mukhopadhyay, B. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (22), 3783–3787.
- (102) Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.* **2004**, *6* (23), 4223–4225.
- (103) Ribbert, H. *Zentralbl Allg Pathol* **1904**, *15*, 945–948.
- (104) Jesionek, A.; Kiolemenoglou, B. *Munch Med Wochenschr* **1904**, *51*, 1905–1907.
- (105) cmv1.jpg (Image JPEG, 640 × 426 pixels) <http://www.asm.org/division/c/redesign/images/imagelib/photo/cmv1.jpg> (accessed Sep 14, 2016).
- (106) Farber, S.; Wolbach, S. B. *Am. J. Pathol.* **1932**, *8* (2), 123–136.3.
- (107) Weller, T. H.; Hanshaw, J. B.; Scott, D. E. *Virology* **1960**, *12* (1), 130–132.
- (108) Smith, M. G. *Exp. Biol. Med.* **1956**, *92* (2), 424–430.
- (109) Rowe, W. P.; HARTLEY, J. W.; WATERMAN, S.; TURNER, H. C.; HUEBNER, R. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1956**, *92* (2), 418–424.
- (110) Cannon, M. J.; Schmid, D. S.; Hyde, T. B. *Rev. Med. Virol.* **2010**, *20* (4), 202–213.
- (111) Lepoutre, A.; Antona, D.; Fonteneau, L.; Halftermeyer-Zhou, F.; Baudon, C.; Dorléans, F. *Séroprévalence des maladies à prévention vaccinale et de cinq autres maladies infectieuses en France. Résultats de 2 enquêtes nationales: 2008–2010*; BEH, 2013.
- (112) Cheneau, C. Caractérisation moléculaire des interactions HCMV/cellules dendritiques : impact des glycosylations de l’enveloppe virale sur le tropisme <http://www.theses.fr/s77974> (accessed Apr 12, 2016).
- (113) Gandhi, M. K.; Khanna, R. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, *4* (12), 725–738.
- (114) Stagno S; Pass RF; Cloud G; et al. *JAMA* **1986**, *256* (14), 1904–1908.
- (115) Vauloup-Fellous, C.; Picone, O.; Cordier, A.-G.; Parent-du-Châtelet, I.; Senat, M.-V.; Frydman, R.; Grangeot-Keros, L. *J. Clin. Virol.* **2009**, *46*, Supplement 4, S49–S53.
- (116) Syggelou, A.; Iacovidou, N.; Kloudas, S.; Christoni, Z.; Papaevangelou, V. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1205* (1), 144–147.

- (117) Song, M.-K.; Azen, S. P.; Buley, A.; Torriani, F.; Cheng, L.; Chaidhawangul, S.; Ozerdem, U.; Scholz, B.; Freeman, W. R. *Am. J. Ophthalmol.* **2003**, *136* (4), 696–702.
- (118) Bruminhent, J.; Thongprayoon, C.; Dierkhising, R. A.; Kremers, W. K.; Theel, E. S.; Razonable, R. R. *Liver Transpl.* **2015**, *21* (4), 539–546.
- (119) Ramanan, P.; Razonable, R. R. *Infect. Chemother.* **2013**, *45* (3), 260–271.
- (120) Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y.-J.; Pulendran, B.; Palucka, K. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18* (1), 767–811.
- (121) Grakoui, A.; Bromley, S. K.; Sumen, C.; Davis, M. M.; Shaw, A. S.; Allen, P. M.; Dustin, M. L. *Science* **1999**, *285* (5425), 221–227.
- (122) Guermonprez, P.; Valladeau, J.; Zitvogel, L.; Théry, C.; Amigorena, S. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20* (1), 621–667.
- (123) Mocarski Jr, E. S. *Trends Microbiol.* **2002**, *10* (7), 332–339.
- (124) Haspot, F.; Lavault, A.; Sinzger, C.; Laib Sampaio, K.; Stierhof, Y.-D.; Pilet, P.; Bressolette-Bodin, C.; Halary, F. *PLoS ONE* **2012**, *7* (11).
- (125) Miller, D. M.; Cebulla, C. M.; Rahill, B. M.; Sedmak, D. D. *Semin. Immunol.* **2001**, *13* (1), 11–18.
- (126) Dunn, C.; Chalupny, N. J.; Sutherland, C. L.; Dosch, S.; Sivakumar, P. V.; Johnson, D. C.; Cosman, D. *J. Exp. Med.* **2003**, *197* (11), 1427–1439.
- (127) Tomasec, P.; Braud, V. M.; Rickards, C.; Powell, M. B.; McSharry, B. P.; Gadola, S.; Cerundolo, V.; Borysiewicz, L. K.; McMichael, A. J.; Wilkinson, G. W. G. *Science* **2000**, *287* (5455), 1031–1033.
- (128) Littler, E.; Stuart, A. D.; Chee, M. S. *Nature* **1992**, *358* (6382), 160–162.
- (129) Smith, I. L.; Cherrington, J. M.; Jiles, R. E.; Fuller, M. D.; Freeman, W. R.; Spector, S. A. *J. Infect. Dis.* **1997**, *176* (1), 69–77.
- (130) Halary, F.; Amara, A.; Lortat-Jacob, H.; Messerle, M.; Delaunay, T.; Houlès, C.; Fieschi, F.; Arenzana-Seisdedos, F.; Moreau, J.-F.; Déchanet-Merville, J. *Immunity* **2002**, *17* (5), 653–664.
- (131) Bleijs, D. A.; Geijtenbeek, T. B. H.; Figdor, C. G.; Kooyk, Y. van. *Trends Immunol.* **2001**, *22* (8), 457–463.
- (132) Geijtenbeek, T. B. H.; Krooshoop, D. J. E. B.; Bleijs, D. A.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C. F.; Grabovsky, V.; Alon, R.; Figdor, C. G.; van Kooyk, Y. *Nat. Immunol.* **2000**, *1* (4), 353–357.
- (133) Geijtenbeek, T. B. .; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C. .; Adema, G. J.; van Kooyk, Y.; Figdor, C. G. *Cell* **2000**, *100* (5), 575–585.
- (134) van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B. H. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (9), 697–709.
- (135) Geijtenbeek, T. B. H.; Duijnhoven, G. C. F. van; Vliet, S. J. van; Krieger, E.; Vriend, G.; Figdor, C. G.; Kooyk, Y. van. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (13), 11314–11320.
- (136) Burleigh, L.; Lozach, P.-Y.; Schiffer, C.; Staropoli, I.; Pezo, V.; Porrot, F.; Canque, B.; Virelizier, J.-L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Amara, A. *J. Virol.* **2006**, *80* (6), 2949–2957.

- (137) Haspot, F.; Lavault, A.; Sinzger, C.; Sampaio, K. L.; Stierhof, Y.-D.; Pilet, P.; Bressolette-Bodin, C.; Halary, F. *PLOS ONE* **2012**, *7* (4), e34795.
- (138) Chéneau, C. *Caractérisation moléculaire des interactions HCMV/cellules dendritiques : impact des glycosylations de l'enveloppe virale sur le tropisme*; Nantes, 2015.
- (139) Feinberg, H.; Guo, Y.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (2), 1327–1335.
- (140) Liu, P.; Wang, X.; Itano, M. S.; Neumann, A. K.; Jacobson, K.; Thompson, N. L. *Traffic Cph. Den.* **2012**, *13* (5), 715–726.
- (141) Feinberg, H.; Mitchell, D. A.; Drickamer, K.; Weis, W. I. *Science* **2001**, *294*, 2163–2166.
- (142) Stetefeld, J.; Jenny, M.; Schulthess, T.; Landwehr, R.; Engel, J.; Kammerer, R. A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2000**, *7* (9), 772–776.
- (143) Tabarani, G.; Thépaut, M.; Stroebel, D.; Ebel, C.; Vivès, C.; Vachette, P.; Durand, D.; Fieschi, F. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (32), 21229–21240.
- (144) Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Ribeiro-Viana, R.; Berzi, A.; Ramdasi, R.; Daggetti, A.; Vettoretti, G.; Amara, A.; Clerici, M.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Biomaterials* **2014**, *35* (13), 4175–4184.
- (145) van Liempt, E.; Bank, C. M. C.; Mehta, P.; Garcí'a-Vallejo, J. J.; Kavar, Z. S.; Geyer, R.; Alvarez, R. A.; Cummings, R. D.; Kooyk, Y. van; van Die, I. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (26), 6123–6131.
- (146) Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Guzzi, C.; McGeagh, J.; Petit-Haertlein, I.; Gugliotta, S.; Weiser, J.; Angulo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19* (15), 4786–4797.
- (147) Mari, S.; Sánchez-Medina, I.; Mereghetti, P.; Belvisi, L.; Jiménez-Barbero, J.; Bernardi, A. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (12–13), 1859–1868.
- (148) Reina, J. J.; Sattin, S.; Invernizzi, D.; Mari, S.; Martínez-Prats, L.; Tabarani, G.; Fieschi, F.; Delgado, R.; Nieto, P. M.; Rojo, J.; Bernardi, A. *ChemMedChem* **2007**, *2* (7), 1030–1036.
- (149) Obermajer, N.; Sattin, S.; Colombo, C.; Bruno, M.; Švajger, U.; Anderluh, M.; Bernardi, A. *Mol. Divers.* **2010**, *15* (2), 347–360.
- (150) Sattin, S.; Daggetti, A.; Thépaut, M.; Berzi, A.; Sánchez-Navarro, M.; Tabarani, G.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Clerici, M.; Bernardi, A. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (3), 301–312.
- (151) Ordanini, S.; Varga, N.; Porkolab, V.; Thépaut, M.; Belvisi, L.; Bertaglia, A.; Palmioli, A.; Berzi, A.; Trabattoni, D.; Clerici, M.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3816–3819.
- (152) Borrok, M. J.; Kiessling, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (42), 12780–12785.
- (153) Mangold, S. L.; Prost, L. R.; Kiessling, L. L. *Chem. Sci. R. Soc. Chem. 2010* **2012**, *3* (3), 772–777.
- (154) Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5062–5064.
- (155) Montañez, M. I.; Campos, L. M.; Antoni, P.; Hed, Y.; Walter, M. V.; Krull, B. T.; Khan, A.; Hult, A.; Hawker, C. J.; Malkoch, M. *Macromolecules* **2010**, *43* (14), 6004–6013.
- (156) Rissing, C.; Son, D. Y. *Organometallics* **2009**, *28* (11), 3167–3172.

- (157) Kula, J. *Chem. Health Saf.* **1999**, *6* (6), 21–22.
- (158) Galli, M.; Fletcher, C. J.; Pozo, M. del; Goldup, S. M. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (24), 5622–5626.
- (159) Mayo, F. R.; Walling, C. *Chem. Rev.* **1940**, *27* (2), 351–412.
- (160) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., 2006; pp 696–926.
- (161) Scott, J. P.; Alam, M.; Bremeyer, N.; Goodyear, A.; Lam, T.; Wilson, R. D.; Zhou, G. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15* (5), 1116–1123.
- (162) Chalopin, T.; Brissonnet, Y.; Sivignon, A.; Deniaud, D.; Cremet, L.; Barnich, N.; Bouckaert, J.; Gouin, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (46), 11369–11375.
- (163) Luczkowiak, J.; Muñoz, A.; Sánchez-Navarro, M.; Ribeiro-Viana, R.; Ginieis, A.; Illescas, B. M.; Martín, N.; Delgado, R.; Rojo, J. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (2), 431–437.
- (164) Bodereau, B. RECEPTEURS NICOTINIQUES NEURONAUX D'INSECTES ET INSECTICIDES : CARACTERISATION DE FACTEURS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE L'EFFICACITE DES NEONICOTINOÏDES. phdthesis, Université d'Angers, 2011.
- (165) Romanelli, M. N.; Gratteri, P.; Guandalini, L.; Martini, E.; Bonaccini, C.; Gualtieri, F. *ChemMedChem* **2007**, *2* (6), 746–767.
- (166) Lindstrom, J.; Merlie, J.; Yogeewaran, G. **2002**.
- (167) *Neuroscience*, 2nd ed.; Sinauer Associates, 2001.
- (168) Grutter, T.; Changeux, J.-P. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26* (8), 459–463.
- (169) Le plan maladies neuro-dégénératives 2014-2019 <http://www.gouvernement.fr/action/le-plan-maladies-neuro-degeneratives-2014-2019> (accessed Aug 16, 2016).
- (170) Blennow, K.; Leon, M. J. de; Zetterberg, H. *The Lancet* **2006**, *368* (9533), 387–403.
- (171) Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306* (3), 821–827.
- (172) Chen, J. J. *Am. J. Manag. Care* **2010**, *16 Suppl Implications*, S87-93.
- (173) Kalamida, D.; Poulas, K.; Avramopoulou, V.; Fostieri, E.; Lagoumintzis, G.; Lazaridis, K.; Sideri, A.; Zouridakis, M.; Tzartos, S. J. *FEBS J.* **2007**, *274* (15), 3799–3845.
- (174) Beers, W. H.; Reich, E. *Nature* **1970**, *228* (5275), 917–922.
- (175) Sheridan, R. P.; Nilakantan, R.; Dixon, J. S.; Venkataraghavan, R. **2002**.
- (176) Cosford, N. D. P.; Bleicher, L.; Herbaut, A.; McCallum, J. S.; Vernier, J.-M.; Dawson, H.; Whitten, J. P.; Adams, P.; Chavez-Noriega, L.; Correa, L. D.; Crona, J. H.; Mahaffy, L. S.; Menzaghi, F.; Rao, T. S.; Reid, R.; Sacca, A. I.; Santori, E.; Stauderman, K. A.; Whelan, K.; Lloyd, G. K.; McDonald, I. A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (17), 3235–3237.
- (177) Group, T. P. S. *Neurology* **2006**, *66* (3), 408–410.
- (178) Jacob, P.; Benowitz, N. L.; Shulgin, A. T. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1988**, *25* (10), 1117–1128.

- (179) Xiao, S.; Si, L.; Tian, Z.; Jiao, P.; Fan, Z.; Meng, K.; Zhou, X.; Wang, H.; Xu, R.; Han, X.; Fu, G.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Zhou, D. *Biomaterials* **2016**, *78*, 74–85.
- (180) Hauck, D.; Joachim, I.; Frommeyer, B.; Varrot, A.; Philipp, B.; Möller, H. M.; Imberty, A.; Exner, T. E.; Titz, A. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (8), 1775–1784.
- (181) French, A. C.; Thompson, A. L.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (7), 1248–1252.
- (182) Percec, V.; Leowanawat, P.; Sun, H.-J.; Kulikov, O.; Nusbaum, C. D.; Tran, T. M.; Bertin, A.; Wilson, D. A.; Peterca, M.; Zhang, S.; Kamat, N. P.; Vargo, K.; Moock, D.; Johnston, E. D.; Hammer, D. A.; Pochan, D. J.; Chen, Y.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Bergeron-Brlek, M.; André, S.; Roy, R.; Gabius, H.-J.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (24), 9055–9077.

Thèse de Doctorat

Sami BRUMENT

Ligands multivalents pour l'interaction par effet chélate avec les récepteurs nicotiniques et les lectines AFL et DC-SIGN de thèse

Multivalent ligands for the interactions by chelate binding mode with nicotinic receptors and lectins AFL and DC-SIGN

Résumé

Les reconnaissances cellulaires sont souvent promues par des interactions multiples et simultanées entre des ligands et leurs récepteurs spécifiques. Ce principe de multivalence a inspiré la communauté scientifique pour accroître l'affinité d'un ligand synthétique son récepteur. Différents effets de multivalence ont été identifiés parmi lesquels l'effet chélate basé sur l'interaction simultanée d'un ligand avec plusieurs sites de reconnaissance d'une protéine. Nous avons développé durant cette thèse trois séries ligands multivalents pour obtenir un effet chélate avec trois cibles : les récepteurs nicotiniques et les lectines AFL et DC-SIGN. *Aspergillus fumigatus* est un pathogène adhérant aux récepteurs fucosylés via la lectine hexavalente AFL. Nous avons développé des fucosides di-, hexa- et polyvalent dont les affinités pour AFL ont été évaluées par microcalorimétrie et par test cellulaire. Cela nous a permis d'identifier un ligand hexavalent capable d'inhiber l'adhésion cellulaire des spores d' *A. fumigatus* à des concentrations micromolaires. DC-SIGN est une lectine tétramérique reconnaissant les motifs mannose et utilisée comme voie d'entrée infectieuse par le cytomégalovirus. Plusieurs structures à faible et haute valence (2, 4 et 89) de mannose nous ont permis d'obtenir des composés très affins pour cette lectine avec des IC50 de l'ordre du nanomolaire lors de tests d'adhésion cellulaire. Enfin, nous avons développé des séries de composés multivalents pour l'interaction avec les récepteurs nicotiniques pour une application potentielle aux maladies neurodégénératives. Ces ligands ont montré des propriétés antagonistes de l'acétylcholine sur des récepteurs de type $\alpha 7$.

Mots clés

Multivalence, effet chélate, lectine, AFL, DC-SIGN, Récepteurs nicotiniques

Abstract

Cell recognitions are often promoted by multiple and simultaneous interactions between ligands and their specific receptors. This concept of multivalency has inspired the scientific community to increase the affinity of a synthetic ligand for his receptor. Various effects of multivalency have been identified, including the chelate binding mode based on the simultaneous interactions of a ligand with several binding sites of a protein. During this thesis, we have developed three families of multivalent structures to reach a chelate binding mode with three proteins: the nicotinic receptors and the DC-SIGN and AFL lectins. *Aspergillus fumigatus* is a pathogen adhering to the fucosylated receptors through the hexavalent lectin AFL. We have developed di-, hexa and polyvalent fucosides whose affinities for AFL were evaluated by microcalorimetry and cellular assays. We identified a hexavalent ligand able to inhibit the cell adhesion of *A. fumigatus* spores at micromolar concentrations. DC-SIGN is a tetrameric lectin binding to mannose units, used in an infectious pathway by the cytomegalovirus. Several structures at low and high valency (2, 4 and 89) of mannose allowed us to reach high affinity for this lectin with IC50 in nanomolar range in the cell adhesion tests. Finally, we developed a series of multivalent compounds to interact with the nicotinic receptors for an application in neurodegenerative diseases. These ligands have shown antagonist properties on acetylcholine $\alpha 7$ type receptor.

Key Words

Multivalence, chelate binding mode, lectin, AFL, DC-SIGN, nicotinic receptor