



Plateforme modulable pour le développement de glycolipides à potentiel immunoadjuvant

Jeane Vaugenot

► To cite this version:

Jeane Vaugenot. Plateforme modulable pour le développement de glycolipides à potentiel immunoadjuvant. Autre. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1S098 . tel-02895005

HAL Id: tel-02895005

<https://theses.hal.science/tel-02895005>

Submitted on 9 Jul 2020

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière, Molécules, Matériaux
Spécialité : « *Chimie moléculaire et macromoléculaire* »

Par

Jeane VAUGENOT

**Plateforme modulable pour le développement de glycolipides à
potentiel immunoadjuvant**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 6 décembre 2019.

Unité de recherche : UMR 6226 – Institut des Sciences chimiques de Rennes

Rapporteurs avant soutenance :

Florence Djedaïni-Pilard
Olivier Renaudet

Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne
Professeur à l'Université de Grenoble-Alpes

Composition du Jury :

Examineurs : Joanne Xie
Karin Tarte

Dir. de thèse : Vincent Ferrières

Co-dir. de thèse : Thierry Benvegna

Professeur à l'Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay

Professeur à l'Université de Rennes 1

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

« J'ai appris que le succès ne doit pas être mesuré par la position qu'on a atteint dans la vie, mais par les obstacles qu'on a dû surmonter, tout en essayant de réussir. »

Booker T. Washington

Remerciements

Le travail réalisé au cours de cette thèse, financée par le ministère de la recherche et de l'enseignement, a été effectué au laboratoire de Chimie Organique et Interfaces de l'Institut des Sciences Chimies de Rennes, au sein de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Madame Florence DJEDAÏNI PILARD, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne et à Monsieur Olivier RENAUDET, Professeur à l'Université Grenoble-Alpes d'avoir accepté d'être rapporteurs et de juger ce travail.

Je remercie également Madame Joanne XIE, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Paris-Saclay ainsi que Madame Karin TARTE, Professeur à l'Université de Rennes 1 d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

A Vincent FERRIERES et Thierry BENVEGNU, merci de m'avoir fait confiance pour ce projet et de m'avoir laissé autant d'autonomie. Merci pour votre patience, votre implication, vos idées, pour nos discussions plus ou moins scientifiques. Merci également pour votre exigence, que ce soit pour la nomenclature (que je vais bien finir par intégrer), le dessin des molécules, ou pour la rédaction de ce manuscrit, qui, j'en suis bien consciente, m'a permis d'acquérir une grande rigueur scientifique.

Ce travail n'aurait pas pu être aussi complet sans l'aide précieuse de Boris LE GUENNIC pour les calculs théoriques de nucléophilie, Joëlle DULONG et Steve GENE BRIER pour les tests biologiques, Philippe JEHAN pour les analyses HRMS, Jean-Paul GUEGAN pour son expertise et RMN et Thomas VIVES pour la partie analytique. Merci pour votre temps, et les résultats que cela m'a permis d'obtenir.

Je remercie également les trois stagiaires que j'ai pu encadrer, Florian, Romain et même Yilin, merci pour votre contribution plus ou moins fructueuse à ce travail. J'espère vous avoir transmis un peu de connaissance durant votre passage au laboratoire. Je suis sortie grandie de chacune de ces expériences, notamment sur le plan managérial.

Merci à tous les permanents du laboratoire, Loïc, Laurent, Sandrine, Sylvain, Caroline, Yann, Jean-Claude, Jean-Paul, Thomas et Jelena pour vos idées et propositions quand mon projet stagnait. Mais surtout merci pour votre bonne humeur au quotidien, vos blagues, pour ces pauses café qui vont sans aucun doute me manquer, pour votre soutien, surtout au moment de la rédaction. Je n'aurais pas vécu ces trois années de la même façon sans la bonne ambiance que vous entretenez dans les couloirs de l'ENSCR.

Et cette bonne ambiance ne pourrait pas exister sans les thésards, post-doc et les autres, ceux du début Hubert, Cédric même si du coup je n'ai jamais vu la fin de Stranger Things, Anaëlle, Quentin qui m'aura supportée dans son bureau plus que n'importe qui, et les derniers arrivés Bénédicte, Clotilde, Tiphaine, Clarisse, Anh-Thy, Alexandre, Arnaud, Abderafeck, Andréas. Merci pour ces soirées, vos sourires, vos coups de gueule, vos encouragements, votre soutien, votre présence tout simplement. Un grand merci également à toute la team OMC pour ces bonnes soirées et goûters qu'on a pu faire ensemble. Merci à Romane et Delphine pour ces pauses décompression qui m'auront permis de voir les échecs sous un angle positif. Un mot tout particulier à Louise et Matthieu qui sont entrés dans cette belle galère en même temps que moi. On en aura vécu des réussites, des échecs, des fous rires, des pleurs. Je suis fière d'avoir pu travailler à vos côtés et j'espère avoir été à la hauteur de ce que vous m'avez apporté.

Guillaume, l'homme parfait, te rencontrer aura changé ma vie. Merci d'avoir partagé une partie de ton génie avec moi et d'avoir mis tes connaissances à disposition de ce travail. Merci pour ces discussions passionnantes sur la chimie et sur tous les autres sujets, merci de ton soutien sans faille, de ta patience, de ton réconfort permanent, de m'avoir reboostée ou apaisée quand il le fallait. Tu as toujours eu les bons mots et j'espère qu'un jour nous ferons des CCM ensemble.

Merci au petit groupe des runners, je sais que dernièrement je vous ai laissé tomber mais je ne perds pas espoir, je vais reprendre. Ces sorties m'auront bien aéré l'esprit au moment où j'en avais le plus besoin, et aussi prouvé que j'avais tort, courir en fait ce n'est pas de la torture, c'est même plutôt plaisant.

A titre plus personnel, je suis infiniment reconnaissante à ma famille de m'avoir toujours soutenue même lorsque vous ne compreniez pas ce que faisais. Merci de ne pas m'avoir tenu rigueur de mes humeurs durant la rédaction, d'avoir accepté que je ne pouvais pas toujours être présente pour vous, alors que vous l'avez toujours été pour moi. Merci de m'avoir soutenue depuis le commencement de ces longues années d'études, et durant mon expatriation en terre bretonne, pour vos sourires, vos encouragements, surtout sur la fin. Ce manuscrit c'est aussi le fruit de votre travail.

Merci aux amies de toujours Fanny et Charlène, dernières rescapées du lycée. Merci à tous les copains de la promo 2016 de l'ENSCR dont je ne peux pas citer tous les noms faute de place. Marie, Chloé, Daphné, particulièrement, merci à vous pour m'avoir écouté me plaindre, m'avoir soutenue, m'avoir conseillé, d'avoir été présentes, tout simplement.

Enfin merci à ceux qui auront supporté mes humeurs, bonnes comme mauvaises sans vraiment comprendre le sens de ce que je fais. La team « Orange Bleue », comment lui donner un autre nom ?!

La chimie n'est vraiment pas votre monde, pourtant je vous en aurais montré des galactofuranoses... C'est vous, plus que les autres, qui avez payé les frais de ces trois années, et surtout de ces derniers mois. Merci à Ludivine pour ta compréhension à toute épreuve, à Olivia pour ta spontanéité rafraichissante, à Florian pour m'avoir écoutée aux moments les plus compliqués, à Simon pour avoir corrigé entièrement ce manuscrit. Merci à Louis, le petit dernier, pour tous ces mots de réconfort et de soutien. Merci à Maëlle pour avoir ensoleillé ma vie bretonne, sans toi les journées et les week-ends auraient été bien vides ces trois dernières années. Merci à Delphine pour m'avoir supportée tous les jours au travail et tous les soirs au sport (100kil !). Et pour finir merci à Arthur pour m'avoir prouvé que j'en étais capable (après tout c'est dans la tête non ?!). Merci de m'avoir bousculée quand il le fallait, m'avoir écoutée quand c'était nécessaire, d'avoir toujours été présent, et de l'être encore aujourd'hui malgré les horreurs que j'ai pu te dire. Pour toutes ces raisons, j'aimerais vous dédier ce manuscrit.

Pour finir, merci à toi, qui que tu sois, d'avoir lu ces remerciements, certes un peu longs mais tellement importants pour moi.

Sommaire

Chapitre 1 : Bibliographie	1
I. Contexte général	3
II. Le mode de fonctionnement des immunostimulants	5
1. Les cellules du système immunitaire.....	5
a. Les cellules de l'immunité innée	6
b. Les cellules de l'immunité adaptative	7
c. Le système du complément	9
2. La reconnaissance des pathogènes	10
a) Les récepteurs Toll-like.....	11
b) Les lectines de type C	11
c) Les récepteurs de type NOD.....	12
d) Les récepteurs des cellules B.....	12
e) Les Récepteurs des lymphocytes T.....	12
3. Mode d'action des immunoadjuvants.....	13
III. Les glycolipides	15
1. Généralités	15
2. Partie saccharidique	16
a. Les sucres utilisés pour cibler le système immunitaire	16
b. Les sucres comme fragment antigénique	21
3. Partie lipidique	25
a. Les lipides détectés par des PRRs.....	25
b. Les lipides comme véhicules	26
c. Les lipides d'Archaea	27
4. Un glycolipide immunomodulateur naturel : le LPS.....	28
5. Glycolipides et liposomes.....	30
IV. Les objectifs de la thèse	31
1. Structure générale.....	32
a) Réaction click.....	33

b) La multiprésentation	33
2. Partie saccharidique	34
a. Le mannose	34
b. Les galactofuranosides	34
c) L'intérêt du fluor.....	35
3. Partie lipidique	37
4. La plateforme	38
5. Les tests biologiques	42
Références.....	43

Chapitre 2 : Synthèse des parties saccharidiques **57**

I Rappels sur la synthèse glycosidique	58
1) Généralités	58
2) Focus sur la synthèse des furanosides	60
a) Acylation à haute température	61
b) Silylation	61
c) Réduction de lactone.....	62
d) Cyclisation à partir d'un dithioacétal.....	63
e) Réarrangement pyranosides/furanosides.....	63
f) Alkylation en milieu basique	64
g) Glycosylation de Fischer	64
II Saccharides à synthétiser	65
1) Les mannopyranoses	66
2) Les dérivés galactofuranosidiques	67
III Synthèse des composés cibles	69
1) Synthèses des dérivés mannosylés	69
a) Synthèse de l' α -D-mannopyranoside d'azidoéthyle	69
b) Synthèse de l'azoture de mannopyranose	69
2) Synthèse de l'azoture de galactofuranyle	70
3) Synthèse du monomère fluoré.....	71
4) Synthèse de l'azoture fluoré	72

5) Synthèse des donneurs et accepteurs de la glycosylation	73
a) L'accepteur de glycosyle.....	73
b) Les donneurs de glycosyle	74
6) Synthèse des donneurs de glycosyle non fluorés.....	75
IV Réactions de glycosylation et résultats	76
1) Réactions de glycosylation entre les donneurs et l'accepteur fluorés.....	76
a) Réactions avec le donneur thiophényle	76
b) Réactions avec le donneur bromé.....	78
2) Identification des produits formés	80
a) Produit d'hydrolyse du donneur (65)	81
b) Transglycosylation (66).....	81
c) Disaccharides furanosidiques (61, 62, 63).....	82
d) Différenciation pyranose/furanose et élucidation des structures de 59 et 60	84
e) Identification des trisaccharides (58 et 64)	85
3) Réaction de glycosylation entre l'accepteur fluoré 36 et les donneurs non fluorés 56 et 57 ..	87
a) Produit d'hydrolyse des donneurs 75	88
b) Produit de la transglycosylation 74	88
c) Disaccharides 68, 69, 70, 72 et 73	89
d) Trisaccharides	91
4) Discussion	92
a) Analyse d'ensemble des résultats	92
b) Hydrolyse et transglycosylation	92
c) Ouverture de cycle	93
d) Influence du fluor	96
e) Calculs théoriques	97
V Déprotection des oligosaccharides	100
VI Conclusion	102
Expérimental section.....	107
Références.....	165

Chapitre 3 : Synthèse de la partie lipidique **171**

I	Les archaeolipides	173
1)	Structure des lipides d'Archaea.....	173
2)	Relations structures lipidiques/propriétés.....	174
a)	Organisation membranaire	174
b)	Propriétés physico-chimiques	176
3)	Extraction des archaéolipides naturels	177
4)	Synthèses des archaéolipides.....	178
a)	Biosynthèse	178
b)	Synthèses chimiques	180
5)	L'utilisation des lipides d'Archaea synthétiques dans les immunoadjuvants	183
II	Objectifs et stratégie de synthèse	188
III	Synthèse du diéther asymétrique	190
1)	Activation de la chaîne lipidique ramifiée	190
2)	Greffage de la première chaîne lipidique	191
3)	Greffage de la seconde chaîne grasse	192
4)	Oxydation de la fonction alcool en acide carboxylique.....	193
IV	Conclusion	194
	Expérimental section.....	197
	Références.....	209

Chapitre 4 : Synthèse de la partie plateforme et couplages aux parties glycosidiques et lipidiques **215**

I	Bibliographie.....	217
1)	La multiprésentation ou l'effet cluster.....	217
a)	Le principe de la multiprésentation	218
b)	Conception de ligands multivalents : le choix de l'espaceur et du noyau	222
2)	La réaction click	223
a)	Avantages d'une réaction click.....	223
b)	Les triazoles dans les composés bioactifs	224

II	Conception de la plateforme.....	227
III	Première voie de synthèse.....	230
1)	Partie phénolique.....	231
2)	Couplage à l'éther triallylique de pentaérythritol.....	232
IV	Deuxième voie de synthèse.....	234
1)	Couplage au pentaérythritol.....	234
2)	Déprotection des hydroxyles.....	238
3)	Elongation du bras.....	239
V	Couplages des trois différentes parties.....	241
1)	Couplage de la partie lipidique sur la plateforme.....	241
2)	Couplage des glycosides sur la plateforme.....	242
VI	Conclusion.....	246
	Expérimental section.....	249
	Références.....	269

Chapitre 5 : Synthèse dPropriétés immunostimulantes des composés finaux **275**

I	DC-SIGN.....	277
1)	Structure de DC-SIGN.....	278
2)	Rôles de DC-SIGN.....	279
a)	Migration des cellules dendritiques et interaction avec les LTs.....	279
b)	DC-SIGN une porte d'entrée pour les pathogènes.....	279
II	Les travaux du laboratoire MICMAC.....	280
III	Les tests réalisés sur les composés 26, 139, 140, 141.....	280
	Références.....	286

Conclusion générale..... **292**

Liste des figures

Figure 1 : Evolution schématique des vaccins (A), vaccin classique incorporant un pathogène entier, (B) vaccin basé sur une protéine et (C) vaccin peptidique ⁹	3
Figure 2 : Relation entre l'immunité innée et l'immunité adaptative ²⁰	6
Figure 3 : Interactions entre les cellules dendritiques et les lymphocytes Th ¹³	8
Figure 4 : Les cellules du système immunitaire ³²	10
Figure 5 : Activation du système immunitaire par les DCs ¹⁹	11
Figure 6 : Structures des BCRs et TCRs ⁴²	13
Figure 7 : Représentation des liposomes et virosomes ⁴⁹	14
Figure 8 : Exemples de structures exprimées par les cellules cancéreuses	16
Figure 9 : Structure d'un vaccin peptidique greffé sur du dextrane	17
Figure 10 : Structure schématique d'un dendrimère	18
Figure 11 : Exemples de structures de β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanes (A) et de mimes souffrés (B).....	19
Figure 12 : Oligosaccharides haut mannose et ses analogues	20
Figure 13 : Structure des antigènes de Lewis et des épitopes identifiés	21
Figure 14 : Structure de Le ^x et de certains analogues synthétiques	22
Figure 15 : Structures de quelques furanoses.....	23
Figure 16 : Structures d'arabinoconjugués immunostimulants	23
Figure 17 : Structures de galactofuranoconjugués ayant un effet sur le système immunitaire.....	24
Figure 18 : Structures de quelques lipides reconnus comme des PAMPs	25
Figure 19 : Structures de lipopolyamines.....	26
Figure 20 : Structures de quelques lipides cationiques.....	27
Figure 21 : Structures des composés <i>sn</i> -1,2 et <i>sn</i> -2,3.....	28
Figure 22 : Exemples de di- et tétraéthers issus des Archaea ¹⁰⁹	28
Figure 23 : Représentation schématique du LPS (A) et structure d'un lipide A monophosphorylé (MPLA) (B).....	29
Figure 24 : Structure d'un liposome ¹²³	30
Figure 25 : Structure générale des molécules cibles	32
Figure 26 : Analogue d'archaéolipide synthétisé au laboratoire ¹³²	34
Figure 27 : Structures des galactofuranosides cibles	36
Figure 28 : Structure du lipide cible	38
Figure 29 : Structures des métabolites secondaires isolés par Balskus et <i>coll.</i> ¹⁴⁸ et de la molécule plateforme.....	39
Figure 30 : Structure complète d'une des molécules cibles.....	42
Figure 31 : Structure des molécules à synthétiser	57
Figure 32 : Représentation des formes anomères et tautomères du D-galactose	58
Figure 33 : Structure d'un trimannoside synthétisé au laboratoire	66
Figure 34 : Structures de l'accepteur modèle et de l'accepteur nécessaire pour une réaction click ...	73
Figure 35 : Structures des différents produits obtenus lors des réactions de glycosylation entre accepteur et donneurs fluorés.....	80
Figure 36 : Appellation des différentes entités des di- et trisaccharides.....	81
Figure 37: Spectre RMN ¹ H du produit de transglycosylation 66 dans CDCl ₃	82
Figure 38 : Spectres RMN du disaccharide 61. A : COSY, B : HSQC, C : ¹³ C, D : HMBC dans CDCl ₃	83
Figure 39 : Corrélation entre les protons anomères et C-2 et C-3 de l'entité réductrice sur le spectre HMBC du trisaccharide 58 dans CDCl ₃	86
Figure 40 : Structures des composés issus de la glycosylation entre l'accepteur 36 et les donneurs non fluorés 56 et 57.....	88

Figure 41 : Superposition des spectres ^1H des disaccharides dans CDCl_3 , en rouge le composé difluoré 59, en bleu le composé monofluoré 72	89
Figure 42 : Spectre ^1H (CDCl_3) du mélange des trois disaccharides monofluorés.....	90
Figure 43 : Conformations les plus stables optimisées par DFT	98
Figure 44 : Structures des sucres déprotégés isolés	101
Figure 45 : Structure des réactifs et des produits des réactions de glycosylation	105
Figure 46 : Structures de lipides naturels diesters, diéthers linéaires et cycliques, tétraéthers	174
Figure 47 : Organisation des archaéolipides sous la forme de bicouche lipidique pour les diéthers (A), monocouche lipidique pour les tétraéthers (B) et archaeosome (C).....	176
Figure 48 : Structures de lipides d'Archaea synthétiques	185
Figure 49 : Les différentes formulations d'archaeosomes et d'antigènes: A) les antigènes sont encapsulés dans les archaeosomes et les antigènes non encapsulés sont retirés, B) les antigènes sont encapsulés dans des archaeosomes mais les antigènes non encapsulés sont conservés, C) les archaeosomes sont vides et les antigènes non encapsulés.....	186
Figure 50 : Composition d'un archaeosome ultradéformable ^{51,54}	187
Figure 51 : Structure du composé trimannosylé synthétisé au laboratoire.....	188
Figure 52 : Structure de la partie plateforme.....	217
Figure 53 : Interactions mono- et multivalentes ⁵	218
Figure 54 : Formation de complexes mono et multivalents	219
Figure 55 : Exemples de structures de dendrimères multivalents simples.....	220
Figure 56 : Structure du dendron inhibant DC-SIGN ¹⁴	221
Figure 57 : Exemple d'un glycopolymère multivalent	222
Figure 58 : Rôle de la longueur de l'espaceur dans la formation de complexes multivalents.....	223
Figure 59 : Structures de différents composés bioactifs comportant un motif 1,2,3-triazole.....	225
Figure 60 : Structures de composés inhibiteurs d' α -glucosidase.....	226
Figure 61 : Structures du Man_9 et des mimes obtenus par réaction click.....	227
Figure 62 : Structure, formulation et résultats biologiques du composé trimannosylé 9 synthétisé au laboratoire inspirant la structure de la molécule plateforme 22.....	228
Figure 63 : Structure du produit 135 issu de la dégradation de 132 lors de la purification sur colonne de gel de silice	238
Figure 64 : Composé 26 issu de la réaction click entre 15 et 121	245
Figure 65 : Composés 141 et 142 issus de la réaction click entre le Gal β fluoré 16 et 121	246
Figure 66 : Mécanisme d'intégration des pathogènes au sein des macrophages <i>via</i> DC-SIGN ¹	277
Figure 67 : Présentation schématique de la structure de DC-SIGN et structure du CRD (Ca^{2+} représentées sous la forme de boules vertes)	278
Figure 68 : Implication de DC-SIGN dans la propagation du VIH ¹¹	280
Figure 69 : Tests biologiques menés sur les molécules 26, 139 et 140.....	281
Figure 70 : Fluorescence observée suite à l'interaction de DC-SIGN avec les composés 26, 139 et 140	282
Figure 71 : Fluorescence observée par cytométrie en flux à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	282
Figure 72 : Courbes obtenues par spectrométrie en flux pour la molécule 141 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	282
Figure 73 : Structure des molécules cibles.....	294
Figure 74 : Structures des azotures saccharidiques synthétisées	296
Figure 75 : Structure des molécules finales synthétisées	297
Figure 76: Donneurs et accepteur de glycosyle synthétisés	298

Liste des schémas

Schéma 1 : Synthèse enzymatique de dérivés galactofuranosidiques.....	35
Schéma 2 : Récapitulatif de la structure des molécules cibles.....	41
Schéma 3 : Moyens de contrôle de la stéréochimie d'une réaction de glycosylation par (A) l'utilisation de groupe participant, (B) HAD, (C) effet de solvant	60
Schéma 4 : Formation de galactofuranosides par acylation à haute température	61
Schéma 5 : Formation de furanoses par silylation	62
Schéma 6 : Formation de furanosides par réduction de lactone	62
Schéma 7 : Formation de furanosides <i>via</i> un dithioacétal	63
Schéma 8 : Formation de furanosides par réarrangement de pyranosides.....	64
Schéma 9 : Synthèse de l' α -D-galactofuranoside par alkylation de la position anomère.....	64
Schéma 10 : Formation de furanosides par glycosylation de Fischer	65
Schéma 11 : Schéma rétrosynthétique des cibles mannopyranoses	67
Schéma 12 : Schéma rétrosynthétique des furanosides cibles	68
Schéma 13 : Synthèse de l' α -D-mannopyranoside d'azidoéthyle.....	69
Schéma 14 : Synthèse de l'azoture de mannopyranosyle.....	70
Schéma 15 : Synthèse de l'azoture de β -D-galactofuranosyle	71
Schéma 16 : Synthèse du 2,3-O-benzoyl-6-fluoro-6-déoxy- β -D-galactofuranoside d'octyle	72
Schéma 17 : Synthèse de l'azoture fluoré	73
Schéma 18 : Synthèse de l'accepteur	74
Schéma 19 : Synthèse du donneur bromé	74
Schéma 20 : Synthèse des deux donneurs non fluorés thiophényle et bromé	75
Schéma 21 : Réaction de glycosylation entre deux entités furanoses.....	76
Schéma 22 : Réaction de glycosylation en présence du couple NIS/TMSOTf.....	77
Schéma 23 : Hypothèse permettant d'expliquer la transglycosylation	93
Schéma 24 : Ouverture du cycle furanose ³⁸	94
Schéma 25 : Proposition d'explication de l'isomérisation de l'accepteur 36 du donneur de glycoside.....	96
Schéma 26 : Synthèse enzymatique de diéthers d'Archaea ³²	179
Schéma 27 : Synthèse de diéthers à partir du phytol	180
Schéma 28 : Synthèse de l'archaéol énantio pur	181
Schéma 29 : Synthèse du premier diéther macrocyclique à 36 carbones ³⁶	182
Schéma 30 : Synthèse de la chaîne ramifiée ⁴⁴	183
Schéma 31 : Voie de synthèse pour l'obtention de diéthers symétriques	183
Schéma 32 : Schéma rétrosynthétique de la liaison entre partie lipidique et plateforme	189
Schéma 33 : Schéma rétrosynthétique du diéther 23.....	190
Schéma 34 : Synthèse du bromure de phytanyle 90.....	191
Schéma 35 : Isolement de l'hydroxyle secondaire	191
Schéma 36 : Greffage de la chaîne lipidique ramifiée	192
Schéma 37 : Synthèse du diéther du glycérol 111	192
Schéma 38 : Synthèse de l'acide carboxylique 23	193
Schéma 39 : Mécanisme d'oxydation d'un alcool catalysée par le TEMPO benzoate	194
Schéma 40 : Mécanisme proposé de la réaction click catalysée au cuivre ⁴⁰	224
Schéma 41 : Rétrosynthèse des composés cibles	230
Schéma 42 : Rétrosynthèse de la partie plateforme.....	231
Schéma 43 : Schéma rétrosynthétique de la seconde voie d'accès à la plateforme	234
Schéma 44 : Synthèse de l'espèce nucléofuge	236
Schéma 45 : Synthèse de 132.....	236

Schéma 46 : Déprotection des trois hydroxyles de 132	238
Schéma 47 : Schéma réactionnel de l'élongation des chaînes du bras de la plateforme	239
Schéma 48 : Synthèse du composé 137	240
Schéma 49 : Déprotection de l'hydroxyle tritylé.....	240
Schéma 50 : Couplage de la plateforme à la partie lipidique.....	242
Schéma 51 : Couplage de la plateforme à la partie lipidique par utilisation du SOCl ₂	242
Schéma 52 : Réaction click entre 121 et 24	244
Schéma 53 : Synthèse de la plateforme	295
Schéma 54 : Synthèse de la partie lipidique.....	295
Schéma 55: Alternative pour la synthèse des disaccharides fluorés	299

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents Th et leurs rôles ²⁸	8
Tableau 2 : Exemples de couples donneur/promoteur.....	59
Tableau 3 : Conditions et résultats de la réaction entre le donneur 52 et l'accepteur 38 (structures présentées sur la figure 35).....	78
Tableau 4 : Conditions et résultats de la réaction entre le donneur 53 et l'accepteur 36 (structures présentées sur la figure 35).....	79
Tableau 5 : Différences de déplacements chimiques observés en RMN ¹ H entre pyranoside et furanoside (a correspond à l'entité réductrice et b l'entité non réductrice).....	84
Tableau 6 : Différences de déplacements chimiques observés en RMN ¹³ C entre pyranoside et furanoside.....	85
Tableau 7 : Déplacements chimiques des protons et carbones anomères de l'entité réductrice.....	85
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des réactions de glycosylation entre donneur non fluoré et l'accepteur 36 (structures figure 40).....	87
Tableau 9 : Récapitulatif des déplacements chimiques des protons et carbones anomères des disaccharides monofluorés 68 à 73.....	91
Tableau 10 : Tableau des conditions testées pour isomériser l'accepteur 36	94
Tableau 11: Valeurs des fonctions de Fukui condensées pour les deux conformations de l'accepteur 99	
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des masses des saccharides déprotégés caractérisés.....	103
Tableau 13 : Table of conditions and yields of glycosylation reaction with brominated donors	134
Tableau 14 : Table of conditions and yields of glycosylation reaction with thiophenylated donors..	134
Tableau 15 : ¹ H NMR (CDCl ₃) data [δ (J, Hz)].	158
Tableau 16 : ¹³ C NMR (CDCl ₃) data [δ (J_{C-F} , Hz)].	160
Tableau 17 : Protection de l'alcool primaire de l'alcool p-hydroxybenzylique	232
Tableau 18 : Bases testées pour l'activation de la fonction hydroxyle	232
Tableau 19 : Conditions testées pour le couplage de 124 et 128	233
Tableau 20 : Bases testées pour la réaction de couplage entre le dérivé phénolique 124 et le tosylate 133.....	237

Liste des abréviations

9-BBN : 9-borabicyclo[3.3.1]nonane	IC : Concentration inhibitrice médiane
ACN : Acétonitrile	IPP : isopentényl diphosphate
Ac : Acétatyle	LA : lactosyl archaeol
ADMP : 2-azido-1,3-dimethylimidazolium hexafluorophosphate	LAM : Lipoarabinomannane
APC : Antigen presenting cell, cellule présentatrice d'antigène	LB : Lymphocyte B
AUD : Archaeosome ultradéformable	LPS : Lipopolysaccharide
BCR : B cell receptor, récepteur de lymphocyte B	LT : Lymphocyte T
CCM : Chromatographie sur couche mince	MHC : Major histocompatibilité complex, complexe majeur d'histocompatibilité
CHex : Cyclohexane	MPLA : Lipide A monophosphorylé
CHOL : Cholestérol	MR : Mannose receptor, récepteur à mannose
CLR : C-type lectin receptor, récepteur lectine de type C	MS : Spectrométrie de masse
COSY : Correlation spectroscopy, spectroscopie de corrélation	NK : Natural killer
DAMP : Damage antigen molecular pattern, motif moléculaire associé aux dégâts	NLR : NOD-like receptor
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	PAMP : Pathogen associated molecular pattern, motif moléculaire associé aux pathogènes
DC : Dendritic cell, cellule dendritique	PEG : Polyéthylène glycol
DCC : <i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	PRR : Pattern recognition receptor, récepteur de motif
DCM : Dichlorométhane	RMN : Résonance magnétique nucléaire
DFT : Density Functionnal Theory	SLA : sulfated lactosylarchaeol
D-Galf : D-Galactofuranose	TACA : Tumor associated carbohydrate antigen, antigène saccharidique associé aux tumeurs
DGGGP : 2,3-di- <i>O</i> -géranylgéranyl- <i>sn</i> -glycérol-1-phosphate	TBS : Tert-butylsilyle
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate	Tc : Lymphocyte T cytotoxique
DMAP : 4,4-Diméthylaminopyridine	TCR : T cell receptor, récepteur des lymphocytes T
DMF : <i>N,N</i> -Diméthylformamide	TFA : Acide trifluoroacétique
DMPC : Dipalmyristoylphosphatidyl choline	Th : Lymphocyte T helper
DMC : 2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride	TLR : Toll like receptor
DMPG : Dipalmyristoylphosphatidyl glycérol	Tm : Température de transition de phase
Eq : Equivalent	Tn : α -GalNAc
Et : Ethyle	TNF : Tumor necrosis factor, facteur de tumeur nécrosante
FPP : Farnésyl diphosphate	Treg : Lymphocyte T régulateur
GA : Groupe activateur	TOCSY : Total correlation spectroscopy
G-1-P : <i>sn</i> -Glycérol-1-phosphate	UDP : Uridine diphosphate
GP : Groupe protecteur	VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
GGGP : 3- <i>O</i> -géranylgéranyl- <i>sn</i> -glycérol-1-phosphate	
GGPP : géranylgéranyl pyrophosphate	
HMBC : Heteronuclear Multi-Bond Connectivity, Connectivité hétéronucléaire multi-liaison	
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence	

Glossaire

Agent fusogène : Substance permettant la fusion entre des cellules ou entre cellules et molécules.

Anticorps : Protéine sécrétée par les lymphocytes B ou les plasmocytes qui reconnaît un épitope particulier d'un antigène et facilite l'élimination de ce dernier.

Antigène : Substance capable d'engendrer une réponse immunitaire.

Apoptose : Processus, souvent appelé mort cellulaire programmée, par laquelle la cellule initie une voie de signalisation qui aboutit à sa propre fin.

Archae : Microorganisme unicellulaire procaryote se développant dans des milieux extrêmes.

Archaeolipide : Lipide constituant les membranes des Archaea.

Archaeosome : Liposome composé d'archaeolipides.

Avidité : Force de liaison antigène-anticorps lorsque les épitopes multiples d'un antigène interagissant avec les sites de liaison multiples d'un anticorps.

Biodisponibilité : Proportion d'une substance qui atteint la circulation sanguine sans être dégradée.

CD80, CD86 et CD40 : Collection d'anticorps qui reconnaissent tous un antigène trouvé sur un ou des types particuliers de cellules. Chaque antigène reconnu par une telle collection d'anticorps est appelé marqueur CD et est assorti d'un numéro d'identification spécifique.

Cellule dendritique : Cellule présentatrice d'antigènes faisant le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Cellule natural killer : Type de lymphocyte cytotoxique qui n'a pas de récepteur T ou B.

Cellule présentatrice d'antigènes : Toute cellule qui peut apprêter et présenter les peptides antigéniques en association avec les molécules du CMH II et délivrer un signal de costimulation nécessaire à l'activation des LTs (macrophages, cellules dendritiques, LBs).

Chimiokine : Sous-groupe des cytokines dont le rôle est d'attirer des cellules spécifiques sur le site de l'infection.

Cytokine : Protéine soluble qui assure la communication entre les différents composants des deux immunités.

Dendrimère : Macromolécule dont la forme reprend celle des branches d'un arbre.

Endosome : Vésicule située dans le cytoplasme qui fusionne avec des vésicules en provenance de l'espace extracellulaire pour véhiculer leur contenu vers la région la plus pertinente.

Epitope : Partie d'un antigène reconnue et fixée par un anticorps ou par le récepteur d'antigène des LBs ou des LTs, appelé aussi déterminant antigénique.

Erythrocyte : Globule rouge.

Eucaryote: Ensemble des organismes qui possèdent un noyau et des organites délimités par des membranes.

Granulocyte : Tout leucocyte qui contient des granules cytoplasmiques.

IC₅₀ : Concentration d'un composé inhibant 50% de l'effet observé.

Immunité adaptative : Défenses de l'hôte effectuées par les LBs et les LTs à la suite de l'exposition à un antigène ; elles présentent les caractères de spécificité, de diversité, de mémoire et de reconnaissance du Soi et du non Soi.

Immunité innée : Défenses non antigènes spécifiques de l'hôte qui existent avant l'exposition à un antigène et impliquent des mécanismes qui ne présentent pas de caractères adaptatifs ni de mémoire.

Immunogène : Substance capable de susciter une réponse immunitaire.

Immunoadjuvant : Substance agissant pour augmenter la réponse immunitaire à un antigène avec lequel il est administré.

Immunoglobuline : Protéine qui reconnaît un épitope particulier des antigènes et facilite son élimination, aussi appelé anticorps.

Immunostimulant : Substance qui stimule le système immunitaire.

Immunosuppresseur : Substance qui inhibe le système immunitaire.

Interleukine : Groupe de cytokines sécrétées par les leucocytes.

Lectine : Protéine qui lie les glucides.

Leucocyte : Cellule blanche du sang, inclus les lymphocytes, les granulocytes, les macrophages.

Lipoplexe : Liposome particulier composé de lipides et de fragments d'ADN.

Liposome : Vésicule lipidique dont la membrane est constituée d'une ou plusieurs bicouches de lipides.

Lymphocyte B : lymphocyte qui se développe dans la moelle osseuse et exprime un anticorps membranaire. Après interaction avec l'antigène, il se différencie en plasmocyte sécréteurs d'anticorps et en cellule mémoire.

Lymphocyte T : Lymphocyte qui se développe dans le thymus et qui exprime le récepteur des cellules T, CD4 ou CD8

Macrophage : Leucocyte phagocytaire qui joue des rôles dans l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Multivalent : Ayant plus d'un site de liaison pour un ligand.

Opsonisation : Recouvrement de la membrane, ce qui favorise sa phagocytose.

Organisme mésophile : Organisme qui prospère à des températures modérées (25-40 °C).

PAMP et PRR : Motifs moléculaires communs aux pathogènes mais absents des mammifères. Les PAMPs sont reconnus par les différents récepteurs du système immunitaire, les PRRs.

Phagocyte : Cellule douée de la capacité à internaliser et dégrader des pathogènes.

Phagocytose : Capture de matériel particulaire par les cellules, par internalisation

Plasmocyte : Cellule effectrice de la lignée des LBs qui sécrète les anticorps.

Procaryote : Organisme dont la structure cellulaire ne comporte pas de noyau ni d'organites membranés.

Tensioactif : Substance capable de réduire la tension de surface entre deux surfaces.

Système du complément : Groupe de protéines qui interagissent les unes avec les autres et avec d'autres molécules de l'immunité innée et adaptative pour conduire à la reconnaissance et à l'élimination des pathogènes.

Tc ou CD8+ : Cellule T effectrice qui peut entraîner la lyse des cellules cibles en exprimant des peptides antigéniques complexé à une molécule du CMH I.

Th ou CD4+ : Lymphocyte stimulé par l'antigène pour fournir des signaux qui favorisent les réponses immunitaires.

Th1 : Sous-population de cellules CD4 qui augmente la réponse immunitaire cytotoxique contre les pathogènes.

Th2 : Sous-population de cellules C qui augmente la production d'anticorps par les LBs et les réponses immunitaires contre les pathogènes.

Virosome : Liposome préparé à partir de membrane de virus.

Chapitre 1 : Introduction générale

Chapitre 1 : Introduction générale

I. Contexte général

Récemment le gouvernement français a voté une loi obligeant les nourrissons à subir non plus 3 mais 11 vaccins obligatoires afin de les protéger contre l'*Haemophilus influenzae B* (provoquant pneumopathies et méningites), la coqueluche, la rougeole, les oreillons, la rubéole, le méningocoque C et le pneumocoque, en plus de la trilogie diphtérie, tétanos et poliomyélite.¹ Malgré une actuelle défiance de la population, la vaccination est encore de nos jours l'un des plus grands succès de la recherche médicale. Certains pensent que les vaccins sont à l'origine de maladies auto-immunes ou encore d'autisme.² Ils dénoncent des effets secondaires parfois violents pour les enfants en bas âge ainsi que la présence d'aluminium dans les vaccins qu'ils rendent responsable de l'origine de maladies neurologiques.³ Tous ces arguments ont été démentis⁴ et dans les faits, les campagnes mondiales de vaccination ont permis de réduire à l'état de niche certaines maladies comme la tuberculose par exemple.⁵ Depuis les premiers travaux de Jenner en 1796,⁶ de nombreuses découvertes ont permis d'en améliorer l'efficacité. Il est parvenu à prouver que les personnes ayant été en contact avec la vaccine (variole bovine) étaient protégées contre la variole. Il utilisait alors le pus des pustules des animaux afin d'immuniser la population de la maladie.

Les premiers vaccins étaient composés de virus ou de bactéries atténués, voire tués (figure 1-A). C'est le cas du vaccin contre la rage par exemple. Plus tard, l'utilisation de fragments de pathogènes ou de toxines sécrétées par les bactéries a permis d'immuniser la population contre des maladies telles que le tétanos (figure 1-B).⁷ Maupas a ouvert, dans les années 70, la voie aux **vaccins antigéniques** (figure 1-C).⁸ Les antigènes sont des substances capables d'engendrer une réponse immunitaire.

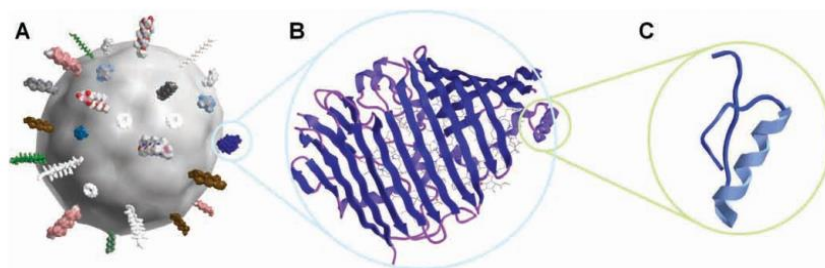


Figure 1 : Evolution schématique des vaccins (A), vaccin classique incorporant un pathogène entier, (B) vaccin basé sur une protéine et (C) vaccin peptidique⁹

L'utilisation de pathogènes entiers peut provoquer des réactions systémiques (fièvre, maux de tête, nausées), ce qui explique que les recherches se soient concentrées sur l'identification et l'isolement

de fragments antigéniques de plus en plus petits. Les **peptides antigéniques** sont une des solutions pour diminuer les effets indésirables des vaccins. Cependant ils ne permettent pas d'obtenir une réponse immunitaire suffisante et durable pour garantir l'immunisation. Afin d'en améliorer l'efficacité, des **immunoadjuvants** ont été ajoutés à la formulation du vaccin.¹⁰ Ils modulent la réponse immunitaire afin d'en augmenter la rapidité ainsi que l'intensité.¹¹

Les immunoadjuvants entrent également dans la composition de vaccins anticancéreux et anti-hépatiques (cancer de l'utérus ¹², hépatite B ¹³). Bien qu'ils ne soient pas encore efficaces dans le cas des cancers avancés, ils peuvent être utilisés en prévention et aux premiers stades de la maladie.^{13,14}

Les immunoadjuvants sont une sous-famille d'une catégorie de composés appelés **immunomodulateurs**. Ces substances ont un effet, stimulant ou suppresseur, sur le système immunitaire. Ils peuvent réguler, altérer la portée, le type, la durée ou l'intensité de la réponse immunitaire.¹¹ Les immunosuppresseurs ont pour but d'inhiber le système immunitaire. Ils sont utilisés dans des cas de réponses immunitaires excessives ou non souhaitées (allergies, greffes, maladies auto-immunes).¹⁵ Les immunostimulants, au contraire, permettent une meilleure résistance du corps face aux infections et autres maladies en augmentant le niveau basique de la réponse immunitaire. Ils sont le plus souvent non spécifiques et utilisés en cas d'immunodéficience.¹¹ Enfin les immunoadjuvants sont ajoutés aux vaccins (préventifs et curatifs) afin d'accroître la rapidité de la réponse immunitaire et assurer une immunisation sur le long terme.

L'engouement autour des vaccins peptidiques, les traitements anticancéreux ciblés ou contre le VIH, a entraîné le développement de la recherche sur les immunoadjuvants, nécessaires pour un résultat efficace. De nombreuses substances sont actuellement testées cliniquement pour leurs propriétés d'immunostimulation.^{16,17}

Les laboratoires pharmaceutiques sont en quête constante de nouvelles molécules immunostimulantes ou immunoadjuvantes spécifiques et performantes. La synthèse de molécules ciblant le système immunitaire et efficacement détectées par celui-ci afin d'initier une réponse spécifique et maîtrisée est un des challenges actuels de la recherche en chimie médicinale.

Dans ce chapitre bibliographique, la première partie est consacrée à quelques notions importantes sur le **fonctionnement du système immunitaire**, les cellules qui le composent et les mécanismes qui permettent de l'activer. La seconde partie est dédiée à la description des **glycolipides**, reconnus pour leurs propriétés immunoadjuvantes. La partie lipidique et la partie saccharidique y sont décrites ainsi que leur rôle dans les interactions avec le système immunitaire. Enfin, la dernière partie se concentre

sur l'objectif de cette thèse avec la **description des molécules** que nous avons choisies de synthétiser.

II. Le mode de fonctionnement des immunostimulants

1. Les cellules du système immunitaire

Le système immunitaire se compose d'un ensemble complexe de cellules, de molécules et d'organes travaillant ensemble mais également en collaboration avec d'autres systèmes du corps (endocrinien par exemple). L'immunité peut être décrite de différentes manières en fonction des propriétés étudiées. L'acquisition de cette immunité, par exemple, mène à la différenciation entre immunité passive (transfert mère-enfant, antidotes) ou acquise.¹⁸ L'immunité peut également être décrite en fonction des entités qui la composent. L'immunité humorale est due aux médiateurs solubles (anticorps, protéines) et l'immunité cellulaire aux organismes (macrophages, lymphocytes).

Enfin, une distinction peut être faite entre **l'immunité innée**, plus rapide, qui permet au corps de gérer les infections bénignes et courantes, et **l'immunité adaptative**, plus spécifique de chaque pathogène.¹⁹ La figure 2 illustre la mise en place de ces deux immunités après une infection. La première, la réponse innée entraîne la sécrétion des substances solubles (peptides, cytokines et chimiokines) ainsi qu'à l'activation de phagocytes. La combinaison de ces phénomènes peut suffire à éliminer le pathogène. Lorsque ce n'est pas le cas, la réponse adaptative est alors initiée par les cellules dendritiques (à l'interface entre les deux immunités). Elles peuvent interagir directement avec les lymphocytes T (LTs). Les LTs peuvent alors directement combattre l'infection, de manière ciblée ou participer à l'activation des lymphocytes B (LBs). Ces derniers sécrètent alors des anticorps qui neutralisent le pathogène et améliorent son élimination par les cellules telles que les phagocytes.

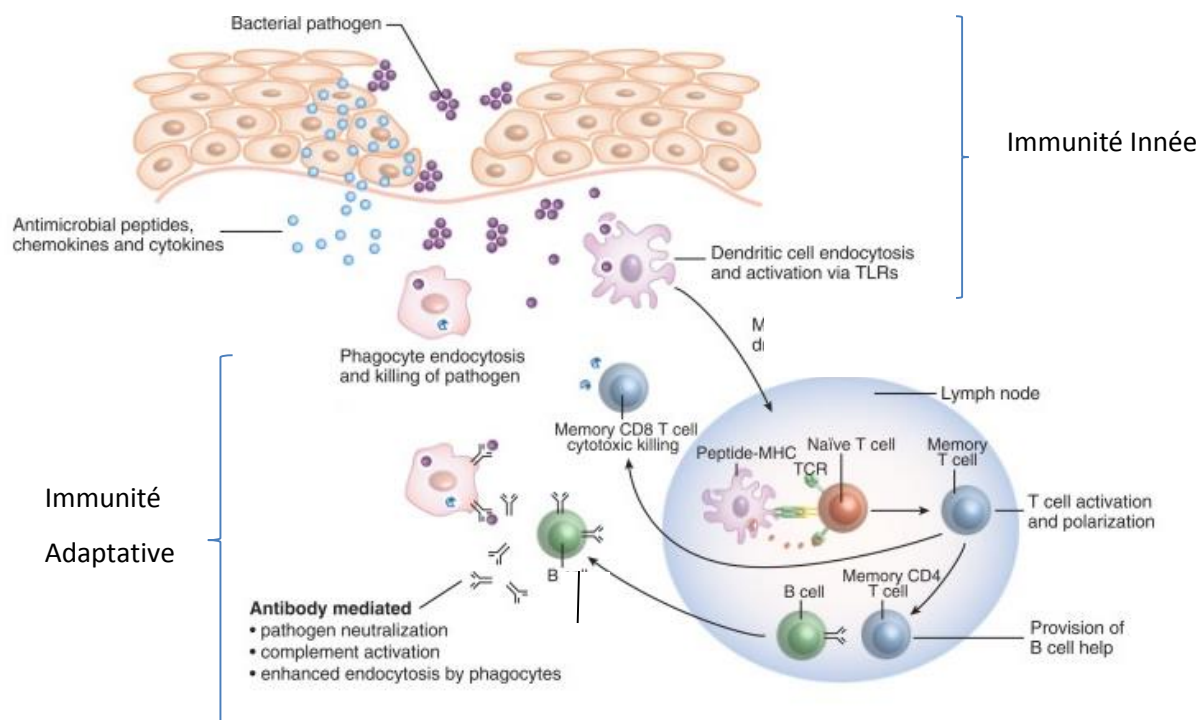


Figure 2 : Relation entre l'immunité innée et l'immunité adaptative²⁰

a. Les cellules de l'immunité innée

L'immunité innée est la première à intervenir lors de l'intrusion d'un pathogène dans le corps. Elle comprend des barrières physiques (peau, muqueuses) mais également des barrières chimiques (substances solubles antimicrobiennes ou acides) sécrétées par les cellules épithéliales. Si le pathogène surmonte ces barrières, la réponse du système immunitaire innée se déclenche en quelques minutes seulement, entraînant la destruction du pathogène par phagocytose.²¹

Celle-ci est effectuée par les **macrophages** ou des **granulocytes**.²² Ils sécrètent également de nombreuses chimiokines et cytokines afin d'activer et d'attirer d'autres cellules du système immunitaire (inné et adaptatif).

Les **cytokines** sont des protéines solubles qui assurent la communication entre les différents composants des deux immunités. Elles ont une activité antimicrobienne directe ou permettent de recruter des liquides et des cellules sur le site de l'infection provoquant un gonflement localisé, l'inflammation. Les **chimiokines** représentent un sous-groupe des cytokines dont le rôle est d'attirer des cellules spécifiques sur le site de l'infection.²³

Les **cellules NK** (Natural Killer) sont des lymphocytes qui reconnaissent des composants associés aux pathogènes, au stress et aux lésions. Il s'agit des seuls lymphocytes appartenant à l'immunité innée puisqu'ils ne sont pas spécifiques à un pathogène. Après reconnaissance de l'antigène par ses

récepteurs, les cellules NK produisent des protéines cytotoxiques qui tuent les cellules par apoptose ainsi que des cytokines dont le rôle est d'activer les macrophages (du système adaptatif).^{15,24}

En plus du rôle défensif, le système inné permet d'alerter et d'activer le système adaptatif *via* les **cellules présentatrices d'antigènes** ou APCs. Les plus connues sont les **cellules dendritiques** (DCs) qui reconnaissent les agents pathogènes grâce à leurs nombreux récepteurs, les ingèrent et les fragmentent afin de présenter un antigène aux lymphocytes T (figures 2 et 3). Cette interaction sera décrite dans le paragraphe suivant. Bien qu'appartenant au système inné, ces cellules sont indispensables pour la communication inter-cellulaire et le déclenchement de l'immunité adaptative.²⁵

b. Les cellules de l'immunité adaptative

Lorsque la réponse innée n'est pas suffisante, l'immunité adaptative prend le relais. Plus lente à se mettre en place, elle nécessite plusieurs intermédiaires cellulaires afin de répondre de manière ciblée à l'infection (figure 2).

La mise en place de l'immunité adaptative résulte d'une coopération avec l'immunité innée. Lorsque les pathogènes pénètrent la barrière épithéliale, ils sont interceptés par les APCs. Ces cellules ont pour rôle, entre autres, d'activer les différents lymphocytes du système immunitaire.¹⁹

Les DCs internalisent les pathogènes dans des phagosomes, les dégradent et en présentent un fragment aux lymphocytes T. Cette présentation se fait *via* l'expression d'une protéine à la surface de la cellule dendritique, le **complexe majeur d'histocompatibilité** (MHC) (figure 3). Il existe deux types de MHC, le MHC de type I et le MHC de type II. Le complexe peptide/MHC est reconnu par les récepteurs des lymphocytes (TCRs) et permet de lancer leur différenciation. Le MHC de type I est destiné à activer les lymphocytes **T cytotoxiques** (Tc ou CD8+) afin de rendre ces cellules effectrices. Celui de type II engendre la différenciation des lymphocytes **T helper** (Th ou CD4+). Les noms CD8+ et CD4+ proviennent de protéines exprimées à la surface des lymphocytes, différentes en fonction de leur activité.^{25,26}

En plus des MHC, les cellules dendritiques, une fois activées par les pathogènes, expriment des protéines de co-stimulation CD80, CD86 ou encore CD40 qui se lient également à des récepteurs présents sur les LTs naïfs (encore non différenciés), qu'ils soient Tc ou Th. En fonction de l'épitope antigénique détecté, les cellules dendritiques sécrètent également des cytokines qui interviennent dans l'activation des Tc et Th ainsi que dans la différenciation des lymphocytes Th et orientent la nature de ces derniers (figure 3). Les cellules dendritiques sont donc d'une importance capitale dans la mise en place de l'immunité adaptative.²⁵

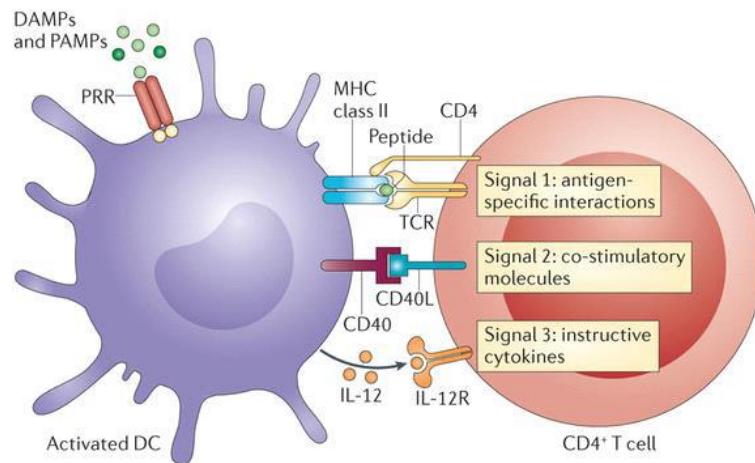


Figure 3 : Interactions entre les cellules dendritiques et les lymphocytes Th¹³

Les **lymphocytes T**, une fois activés, se différencient et acquièrent alors leur rôle au sein du système immunitaire. Il existe 5 grandes sous-populations de lymphocytes Th (tableau 1) qui régulent l'immunité humorale en sécrétant des cytokines. Les lymphocytes Tc ont pour rôle de tuer les bactéries, les virus, mais également les cellules tumorales ou les cellules soumises à un stress. Les LTs sont activés grâce aux cellules dendritiques et également aux cytokines sécrétées par les cellules Th. Les lymphocytes Tc induisent la mort des cellules par apoptose en libérant le contenu de granules au sein du cytoplasme des cellules infectées. Les lymphocytes Tc possèdent un ligand sur leur membrane cellulaire qui interagit avec un récepteur situé sur le pathogène, induisant la nécrose de la cellule.^{17,27}

Une fois l'infection traitée, la plupart des lymphocytes T sont détruits par apoptose. Certains vont cependant persister et constitueront ainsi une mémoire de lymphocytes T.

Tableau 1 : Les différents Th et leurs rôles²⁸

Sous-population de Th	Rôles
Th1	Activation et stimulation des macrophages, favorisation de la fixation du complément, différenciation des Tc
Th2	Activation des réponses anti-helminthes (vers parasites), activation des lymphocytes B pour la production d'anticorps
Th17	Activation de l'immunité cellulaire, inflammation, protection contre les infections fongiques et les bactéries extracellulaires
Tfh	Différenciation des lymphocytes B
Treg	Régulation des réponses immunitaires et inflammatoires

En plus des différents lymphocytes T, le corps sécrète des **lymphocytes B**. Chaque cellule B exprime un type unique de récepteur (BCR, B Cell Receptor) de l'antigène. Quand ce dernier interagit avec le récepteur, il induit une prolifération de cellules B par la production de clones avec la même spécificité. Cet antigène peut être détecté par la cellule B elle-même, ou par le biais de macrophages ou de cellules dendritiques particulières. La reconnaissance de l'antigène par le BCR provoque l'activation de la cellule B : la membrane de la cellule recouvre alors l'ensemble BCR/antigène et provoque leur agrégation puis leur internalisation et enfin la présentation de l'antigène à la cellule Th de même spécificité. Suite à cette interaction, les cellules B se différencient en plasmocytes qui sécrètent des anticorps IgM ou fondent des centres germinatifs afin d'engendrer des anticorps de haute affinité. Ces anticorps vont se fixer au pathogène. Ce marquage permet sa reconnaissance par le complément qui assure alors la destruction (le complément sera détaillé dans la partie suivante). A la fin de la réponse cellulaire B, une mémoire sur le long terme est mise en place par des cellules B à **mémoire** recirculante et par la sécrétion en permanence de ces anticorps destinés aux antigènes déjà rencontrés.^{19,29}

c. Le système du complément

Le système du complément fait partie intégrante de l'immunité innée. Cependant il coopère avec le système adaptatif. Il comprend des protéines qui circulent de manière inactive dans le sang et nécessite une modification pour être activé. La voie classique d'activation du complément passe par des anticorps qui se fixent sur des antigènes. Cela permet la fixation du complément sur le pathogène (qui aboutit après une cascade réactionnelle à la lyse de la cellule ciblée). Une deuxième voie possible passe par des lectines qui se fixent sur les glycosides présents à la surface des bactéries (puis le même chemin que la voie classique est suivi). Les protéines du complément peuvent provoquer la mort d'une cellule de plusieurs façons, par opsonisation (recouvrement de la membrane, ce qui favorise sa phagocytose) ou en provoquant de larges pores dans la membrane de la cellule visée³⁰. Les protéines du complément peuvent également se lier aux cellules présentatrices d'antigènes ou aux lymphocytes T et B afin de produire des cytokines qui participent à leur activation.^{19,31}

Le système immunitaire est une machine complexe, qui nécessite le recrutement de nombreuses cellules spécifiques à chaque réponse immunitaire. L'immunité innée est la première à se mettre en place pour empêcher une contamination avec des cellules effectrices et peu spécifiques telles que les macrophages, les cellules NK et les granulocytes, mais également des cellules permettant de communiquer avec celles de l'immunité adaptative et les protéines du complément et les DCs (figure

4). Ces dernières assurent l'activation des différents lymphocytes, nécessaires lorsque l'immunité innée ne suffit pas à éliminer le pathogène.

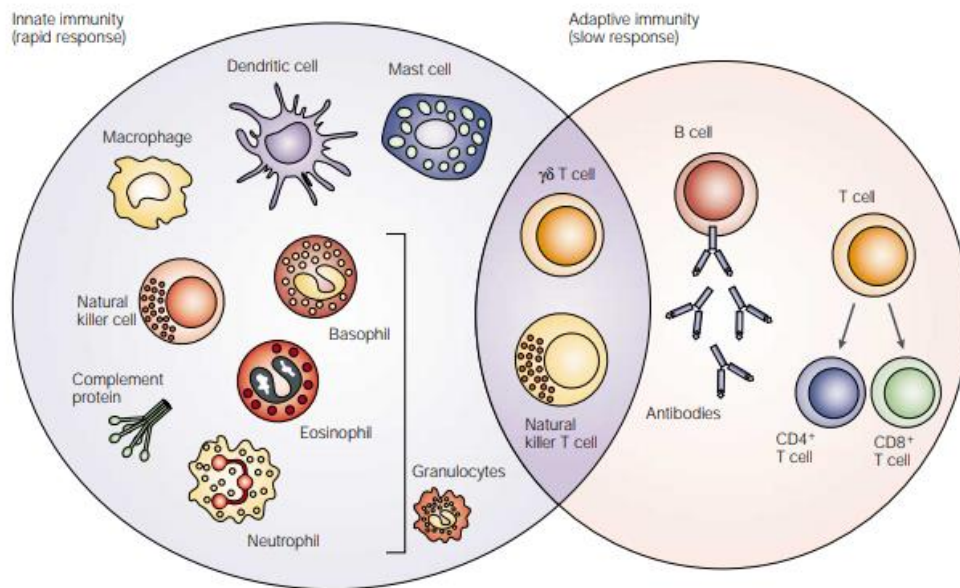


Figure 4 : Les cellules du système immunitaire³²

2. La reconnaissance des pathogènes

La mise en place d'une réponse immunitaire, qu'elle soit innée ou adaptative, n'est possible que grâce à la **reconnaissance** et l'**identification** des pathogènes comme des molécules extérieures au corps.

Cette reconnaissance est due à l'interaction entre des protéines présentes à la surface du pathogène (les **PAMPs** pour Pathogen Associated Molecular Patterns) et des récepteurs spécifiques situés à la surface ou à l'intérieur des cellules du système immunitaire (appelés **PRRs** pour Pattern Recognition Receptors). L'interaction entre les PAMPs et les PRRs entraîne une cascade signalétique au sein de la cellule menant aux réponses exposées plus haut (phagocytose, sécrétion de protéines, ...) du système immunitaire inné et adaptatif (figure 5). Parmi ces PAMPs, on retrouve des complexes glucidiques, des lipides, des lipopolysaccharides, des peptidoglycanes, des acides nucléiques... Ces structures sont spécifiques à des classes de microbes et essentielles pour leur survie.^{21,33}

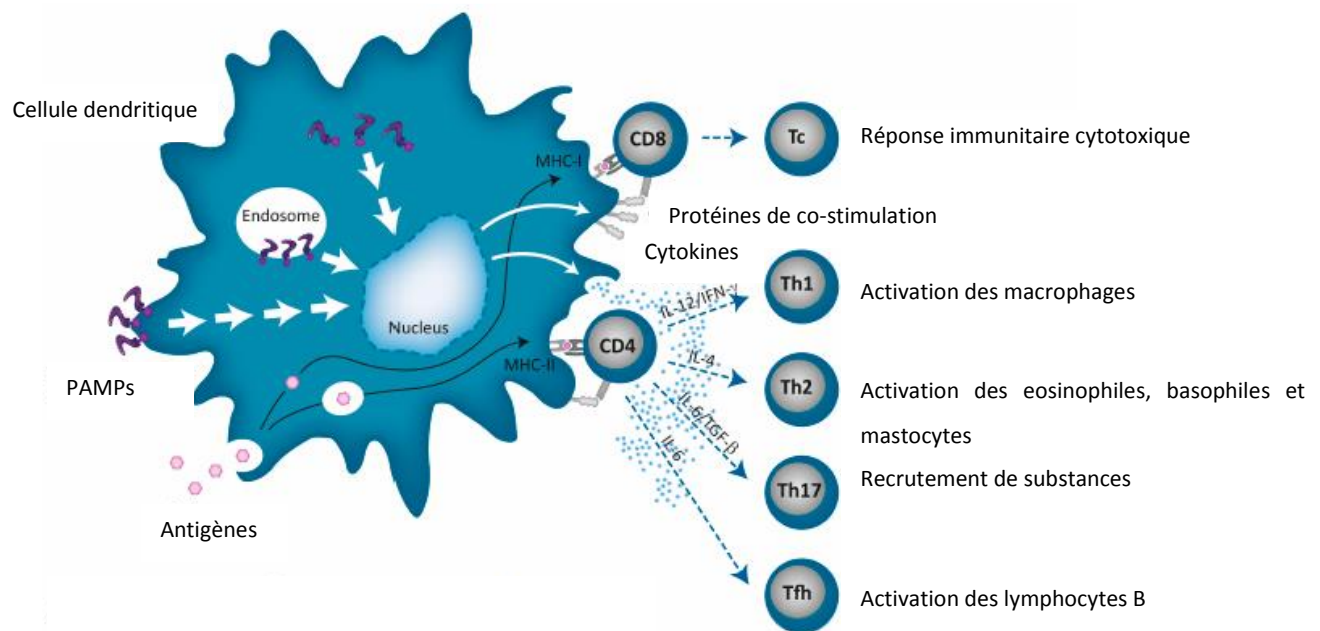


Figure 5 : Activation du système immunitaire par les DCs¹⁹

Plusieurs familles de PRRs ont pu être identifiées au cours des dernières années dont les Toll-like (TLRs), les NOD-like (NLRs), les lectines de type C (CLRs).

a) Les récepteurs Toll-like

Ce sont des dimères riches en leucines. 13 TLRs ont été recensés à ce jour, dont 10 chez l'Homme. Ils peuvent se présenter sous la forme de protéines transmembranaires et se lier à des PAMPs présents sur la surface des pathogènes ou se trouver dans des endosomes ou lysosomes et reconnaître des PAMPs libérés par la dégradation des pathogènes (des acides nucléiques par exemple). Les ligands des TLRs sont donc nombreux et variés : lipopeptides, lipopolysaccharides (LPS), ARN, etc.^{10,34,35}

b) Les lectines de type C

Cette superfamille de récepteurs se lie surtout à des sucres et polysaccharides grâce à la présence d'ion calcium Ca^{2+} . Ils sont présents sous forme soluble comme transmembranaire. Parmi les CLRs, on retrouve le **DC-SIGN**, présent à la surface des macrophages et des DCs. Il peut notamment interagir avec le lipoarabinomannane de mannosyle et induire la production de l'interleukine IL-10 (cytokine ayant un effet immunosuppresseur).³⁶ Un autre exemple de CLR est le Dectin-1. Il se lie aux β -glucanes, ce qui provoque la production de cytokines activant les Th1 et Th17. Enfin le **récepteur à mannose** (MR) interagit avec le mannose, mais également le fucose ou la *N*-acétylglucosamine présente sur la paroi des pathogènes, et conduit à la phagocytose du pathogène et la production de nombreuses cytokines.^{33,36}

c) Les récepteurs de type NOD

Cette famille de récepteurs a la particularité d'être présente sous forme soluble. Ces récepteurs cytosoliques peuvent se lier à des fragments de la paroi cellulaire, des PAMPs ou des DAMPs (Damaged Associated Molecular Pattern, molécules sécrétées par des cellules soumises à un stress) et des cristaux. Ils induisent la production de cytokines et de chimiokines telles que l'IL-23 et IL-1 qui activent les lymphocytes Th17.^{21,37}

Lorsque les APCs détectent un PAMP, l'antigène est internalisé puis présenté aux cellules T et/ou B. Une fois encore, c'est la liaison avec un des récepteurs spécifiques du complexe antigène/MHC qui permet l'activation de la réponse immunitaire.

d) Les récepteurs des cellules B

Ils ont une structure d'anticorps liés à la cellule par une partie transmembranaire. Après avoir été stimulées par un antigène, les cellules B produisent des anticorps qui sont des clones de leurs récepteurs, sans la partie transmembranaire. Les BCRs sont composés de plusieurs domaines Immunoglobuline, IgM et IgD. Tout comme les anticorps, ils possèdent deux chaînes lourdes et deux chaînes légères liées entre elles par des ponts disulfures. Chacune de ces chaînes est caractérisée par une partie variable et une partie constante (voir figure 6).³⁸ Lors d'une interaction antigène/BCR, la conformation du BCR est altérée, ce qui induit le recrutement d'enzymes au niveau de la membrane plasmique et perturbe les concentrations salines. L'augmentation de la concentration en calcium intracytoplasmique inhibe la production d'une cytokine (IL-2) qui contrôle la prolifération des lymphocytes T.^{29,39}

e) Les Récepteurs des lymphocytes T

Comme évoqué précédemment, les TCRs se lient à un complexe MHC/antigène. Les TCRs sont composés de deux hétérodimères (deux polypeptides différents α et β) possédant des parties variables, constantes, transmembranaires et intracytoplasmique reliées par un pont disulfure (figure 6).⁴⁰ En plus des TCRs, les lymphocytes T possèdent des corécepteurs, CD4 et CD8 (en fonction de la nature du lymphocyte T) qui sont capables de reconnaître les complexes MHC/antigène. CD4 et CD8 fixent des régions du MHC. Ce dernier est donc lié au lymphocyte par le TCR et un corécepteur afin de favoriser les cascades d'événements intracellulaires qui activent les lymphocytes T (voir figures 3 et 4). Lorsque le TCR interagit avec un antigène, les corécepteurs se regroupent en cluster et l'association de CD4 ou CD8 à des enzymes initie les réactions intracellulaires. Les lymphocytes peuvent ainsi sécréter des cytokines, des chimiokines et combattre l'infection.⁴¹

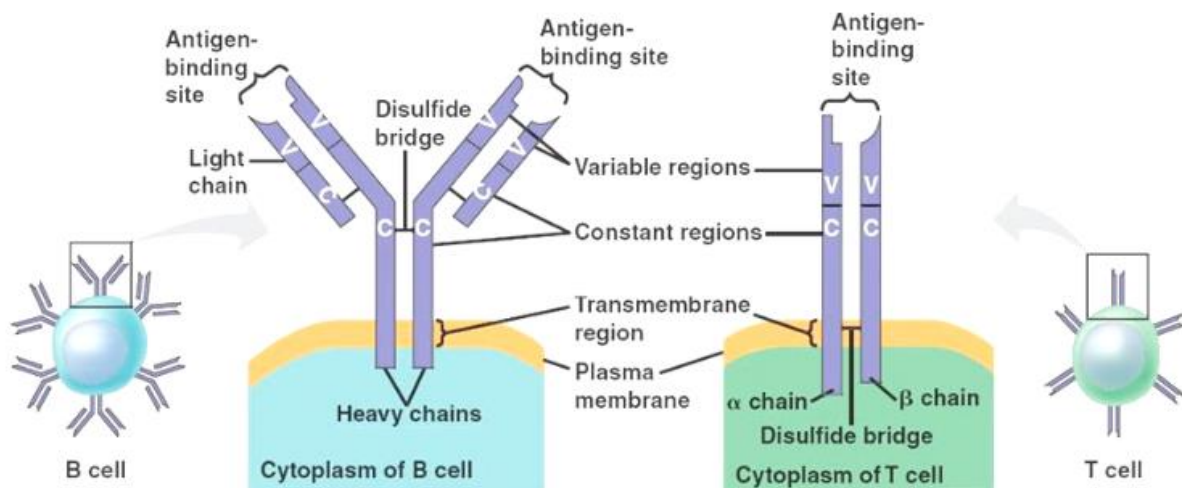


Figure 6 : Structures des BCRs et TCRs⁴²

3. Mode d'action des immunoadjuvants

Le rôle des immunoadjuvants consiste à **activer le système immunitaire** mais également à **créer une mémoire**. Pour cela ils doivent assurer l'activation des différents lymphocytes T et B. Plusieurs modes d'action peuvent être envisagés. Ils peuvent cibler les cellules du système inné telles que les APCs (macrophages ou DCs) ou même directement les lymphocytes (B et T).

Les APCs sont une cible de choix pour les adjuvants puisqu'elles initient la réponse immunitaire adaptative et qu'elles possèdent de nombreux récepteurs à leur surface. Une des méthodes imaginées est l'utilisation de nano- et microparticules lipidiques, polymériques ou métalliques comme véhicules afin de délivrer spécifiquement un traitement. Lorsque les particules sont suffisamment petites (moins de 5 μm), elles sont endocytées par les DCs, sans même avoir besoin d'un ligand spécifique aux récepteurs de ces cellules. Elles peuvent ainsi libérer le contenu antigénique qu'elles contiennent à l'intérieur des DCs et mettre en place toute la chaîne de présentation de l'antigène. Lorsque la taille de la particule est plus importante, il devient plus intéressant d'y greffer des molécules qui seront reconnues par les récepteurs des DCs tels que des sucres, des lipides ou des peptides antigéniques.^{24,26,43,44}

Des substances solubles peuvent également être ajoutées à la formulation des vaccins comme des lipopolysaccharides (LPS) ou certaines cytokines comme le $\text{TNF-}\alpha$. En se liant aux récepteurs des DCs, ils induisent la maturation de ces dernières et favorisent l'assimilation des antigènes du vaccin.⁷ Les chimiokines ou leurs agonistes peuvent également être utilisés comme adjuvant afin de recruter les DCs sur le lieu de l'injection du vaccin.¹⁰

Certaines interactions ligand/récepteur à la surface des DCs entraînent la production de cytokines spécifiques. L'utilisation d'analogues de ces substances dans des vaccins permet ainsi la sécrétion de substances comme certaines interleukines qui favorisent ensuite le développement des lymphocytes T.^{24,26,44,45}

Outre les APCs, les adjuvants peuvent cibler les **lymphocytes T**. En fonction de l'effet souhaité, ils peuvent servir à augmenter la production de certains lymphocytes et à diminuer celle d'autres populations lymphocytaires. Par exemple, dans le cas de maladies auto-immunes ou d'allergies, les lymphocytes Th et Tc sont présents en grande quantité et produisent des effets indésirables. Afin de limiter le nombre de lymphocytes, une des stratégies employées est de stimuler la prolifération des lymphocytes Treg grâce à certaines cytokines, afin de réguler les populations de ces cellules.⁴³ D'un autre côté, si l'effet souhaité est une augmentation du nombre de lymphocytes Th ou Tc, il faut alors diminuer celui des Treg. Pour cela, des antagonistes de récepteurs des DCs sont utilisés. Ils inhibent la production d'IL-10 nécessaire au développement des Treg.⁴⁵

Certaines combinaisons de cytokines peuvent également être utilisées afin d'orienter la réponse immunitaire. En effet, l'IL-12 et le TNF- γ sont associés aux réponses Th1, alors que l'IL-4, 5 et 13 plutôt aux réponses Th2.⁴⁵

Actuellement, l'adjuvant le plus utilisé dans la formulation de vaccin est un **mélange de sels d'aluminium** (hydroxyde et phosphate). Il permet d'augmenter la réponse inflammatoire, d'obtenir une meilleure assimilation des antigènes par les APCs et une production plus importante d'anticorps. Il est utilisé dans de nombreux vaccins contre les hépatites, la méningite, la poliomyélite, etc.^{10,46}

A partir du milieu des années 90, de nouveaux adjuvants ont fait leur apparition dans des vaccins. Les **liposomes**, par exemple, sont utilisés comme véhicules encapsulant la substance au sein d'une sphère de lipides ciblant les APCs. Des antigènes peuvent également être liés à des virosomes (vésicules mimant la membrane des pathogènes, figure 7) afin d'interagir avec les cellules B.^{16,47,48} Les squalènes sont également utilisés dans plusieurs vaccins contre la grippe afin de recruter des APCs et d'augmenter la production de cytokines.¹⁶

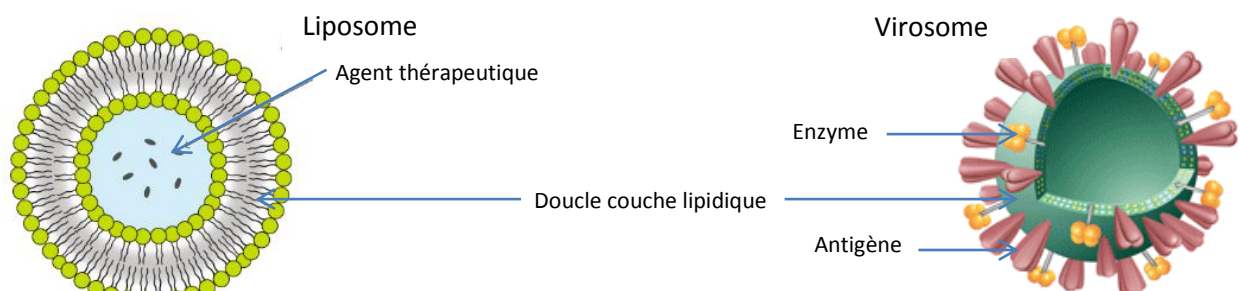


Figure 7 : Représentation des liposomes et virosomes⁴⁹

Depuis plusieurs années, des équipes de recherche, dont notre laboratoire, se concentrent sur une autre catégorie de molécules immunoadjuvantes prometteuses, les **glycolipides**.

III. Les glycolipides

1. Généralités

Les **glycolipides** sont des molécules composées d'une **partie osidique** (hydrophile) et d'une autre **lipidique** (hydrophobe), ce qui en fait des molécules amphiphiles. Ces dernières, de par leur structure, peuvent être des tensioactifs ou encore appelés surfactants.

Les tensioactifs modulent la tension de surface entre deux milieux non miscibles. Cette propriété est particulièrement intéressante lorsque des milieux aqueux et organiques sont mis en contact. La diminution de la tension interfaciale permet, par exemple, de stabiliser des émulsions (crèmes, mousses) ou d'incorporer des principes actifs *via* les micelles.⁵⁰⁻⁵² De plus, les tensioactifs augmentent la solubilité des contaminants dans la phase aqueuse en incorporant le composé hydrophobe au cœur de micelles.

Les glycolipides sont une alternative possible aux surfactants chimiques, issus de la chimie du pétrole. Ces derniers sont souvent toxiques pour l'environnement et les organismes vivants. Au contraire, les surfactants bio-sourcés ou dérivés de molécules amphiphiles naturelles comme le sont les glycolipides, sont biodégradables et sont généralement non toxiques.^{51,53}

Certains glycolipides, comme par exemple les sophorolipides ou les rhamnolipides, possèdent des propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques. Ils sont utilisés afin de désinfecter les surfaces.^{54,55}

Grâce à leur structure amphiphile et les propriétés tensioactives qui en découlent, les glycolipides sont utilisés dans de nombreux domaines tels que les cosmétiques, l'alimentation, le textile, le papier ou encore les polymères.^{56,57}

Au-delà de leurs propriétés amphiphiles, les glycolipides possèdent des propriétés propres à chacune de leurs deux parties (saccharidique et lipidique). Chaque partie a un intérêt biologique et peut être utilisée dans le domaine pharmaceutique. La combinaison de ces effets est donc une piste intéressante pour la mise au point d'immunostimulants.

2. Partie saccharidique

Les sucres sont une des classes de molécules les plus représentées dans la nature. Ils sont surtout présents sous la forme de pentoses (5 atomes de carbone) ou d'hexoses (6 atomes de carbone). La majorité se trouve sous la configuration D (quelques exceptions tout de même comme le L-arabinose, le L-fucose, le L-rhamnose) et cyclique (furanose ou pyranose). Ils sont utilisés par les cellules pour des fonctions aussi nombreuses que la transduction de signaux et la prolifération des cellules.⁵⁸ Ils entrent également dans la **composition des membranes cellulaires** et permettent la **reconnaissance** entre les cellules.⁵⁹ Ces deux dernières propriétés en font des composés de choix comme immunomodulateurs. En effet certains saccharides présents à la surface des microorganismes sont identifiés et reconnus comme des PAMPs par le système immunitaire. Ces sucres sont différents de ceux présents sur les membranes des cellules humaines saines par leur structure, les enchaînements de monomères ou encore leurs liaisons glycosidiques. Dans le cas des cellules cancéreuses, des sucres normalement non synthétisés par les cellules sont alors exprimés (figure 8).^{60,61}

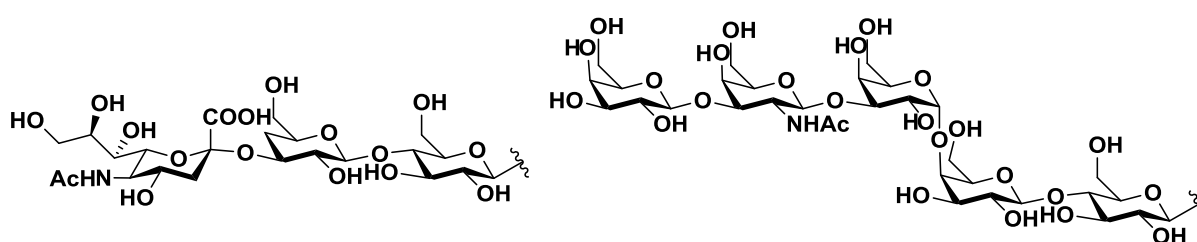


Figure 8 : Exemples de structures exprimées par les cellules cancéreuses

Les immunostimulants à base de sucres sont conçus à partir de l'étude approfondie des polysaccharides contenus dans les membranes bactériennes ainsi que celle des récepteurs du système immunitaire. Le plus souvent, seule une fraction du motif saccharidique est nécessaire pour induire une réponse.⁶²

a. Les sucres utilisés pour cibler le système immunitaire

i) Ciblage du récepteur à mannose

Le **mannose** est l'hexose le plus largement utilisé dans la synthèse de glycoconjugués pour la pharmacie. En effet, de nombreuses cellules humaines et notamment les APCs possèdent un récepteur spécifique de ce saccharide, le MR.

Engering et coll.⁶³ ont démontré que, quand le MR est **impliqué dans l'internalisation des antigènes** par les DCs, la présentation aux lymphocytes T est cent fois plus efficace que lorsque les antigènes sont internalisés *via* une phase fluide (sans passer par un récepteur). Les sucres peuvent être liés chimiquement aux antigènes afin de les « guider » jusqu'aux DCs et ainsi augmenter leur potentiel antigénique. Cette meilleure internalisation peut s'expliquer, selon Tan et coll.,⁶⁴ par la taille des vésicules formées dans les DCs après l'internalisation. Elles sont beaucoup plus petites dans le cas de l'endocytose *via* le MR que lorsque ce récepteur n'entre pas en jeu. La conséquence est une présentation plus importante aux lymphocytes T, ce qui est un avantage pour une meilleure activation du système immunitaire.⁶⁴

Les **polymères saccharidiques** sont aussi une piste intéressante à suivre pour la mise au point de vaccins. Récemment Liu et coll.⁶⁵ ont mis au point un nouveau vaccin anti-cancer permettant de **cibler les APCs et activer les lymphocytes** Tc et Th1 (médiateurs anti tumoraux les plus importants) situés dans les ganglions lymphatiques. Ce vaccin est composé d'un oligopeptide pouvant être internalisé par les APCs. Cependant, pour les atteindre dans les ganglions, le poids global de la molécule ainsi que sa spécificité à cibler les APCs devaient être améliorés. Pour cela, ils ont greffé sur l'épitope un polymère linéaire de dextrane.⁶⁵ Le dextrane est un polymère de glucose dont les unités sont branchées en (1→6), (1→3) ou (1→4), motif détecté entre autres, par les MRs situés à la surface des APCs. Ici, le polymère choisi (figure 9) est branché en (1→4) et oxydé afin d'y greffer par amination réductrice l'oligopeptide. Le polysaccharide permet d'augmenter la taille des molécules et ainsi d'atteindre les ganglions lymphatiques mais également de cibler les APCs. De plus, une activité biologique est observée que l'épitope soit greffé sur le polymère ou juste formulé avec lui, impliquant donc une activité du polysaccharide à lui seul, mais tout de même beaucoup moins intense⁶⁶.

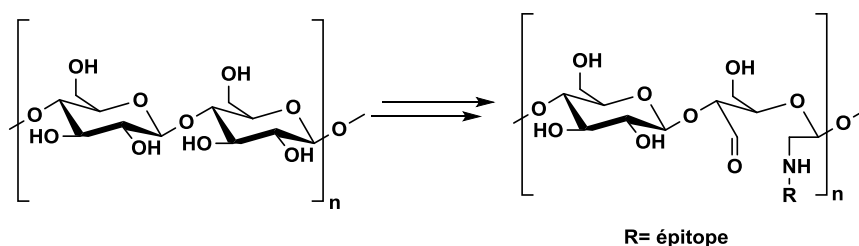


Figure 9 : Structure d'un vaccin peptidique greffé sur du dextrane

Les **dendrimères** (structure arborescente schématisée sur la figure 10) mannosylés permettent d'obtenir les mêmes interactions avec les DCs.⁶⁷ Ainsi des mannoses ont été greffés à la surface de dendrimères, permettant de multiplier par 12 les interactions entre le composé et les macrophages par comparaison avec le produit non mannosylé.⁶⁸

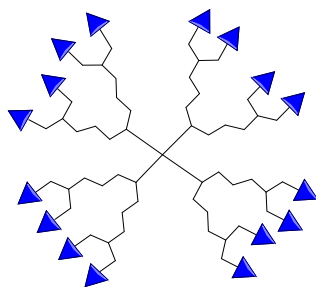


Figure 10 : Structure schématique d'un dendrimère

L'utilisation de mannopyranose ou d'autres ligands du MR pourrait donc être une solution afin de synthétiser des immunoadjuvants. Cependant le MR ne se situe pas uniquement à la surface des DCs. On peut également le trouver à la surface des macrophages. *In vivo*, l'utilisation seule de mannoconjugués permet donc de cibler le MR, mais pas spécifiquement les DCs. Ce manque de spécificité explique que ces ligands sont encore si peu utilisés.

ii) Interactions avec les lectines de DC-SIGN et Dectin-1

Outre le MR, d'autres CLRs interagissent avec de nombreux sucres.

Les **β -(1→3)-glucanes** par exemple ont été largement étudiés pour leur capacité à interagir avec des récepteurs du complément mais également avec Dectin-1, un CLR présent à la surface des cellules dendritiques.^{69,70} Ces polymères de glucose, retrouvés dans les champignons, les levures⁷¹, les plantes ou encore les algues⁷² varient les uns des autres par la présence ainsi que le degré de ramifications (structures courantes sur la figure 11-A). Ces composés ont été reconnus pour leurs propriétés immunostimulantes puisqu'ils **augmentent la résistance** des sujets contre les infections bactériennes, virales, mycosiques et parasitaires.⁷¹ Les polymères interagissent avec Dectin-1⁷³, présent à la surface des macrophages, et le complexe Dectin-1/ β -glucane peut alors être détecté par des TCRs et activer la prolifération des LTs.⁷⁴ La liaison des glucanes avec Dectin-1 induit également la production de plusieurs cytokines qui stimulent les DCs, macrophages et monocytes des mammifères.^{72,75} Ces polymères ont également démontré des propriétés anticancéreuses, seuls⁶⁹ ou combinés à des anticorps spécifiques à certaines tumeurs.⁷⁶ Un des problèmes de ces composés est leur biodisponibilité. En effet, ils sont fragmentés par la flore intestinale ou après l'internalisation dans les macrophages.⁷⁷ Néanmoins, certains produits issus de la fragmentation présentent également des intérêts biologiques avant d'être hydrolysés par des enzymes. Dans le but de renforcer les liaisons glycosidiques et ainsi éviter l'hydrolyse, notre équipe a synthétisé des fragments de β -(1→3)-glucanes dont certaines liaisons *O*-glycosides ont été substituées par des liaisons *S*-glycosides (figure 11-B).⁷⁷ Ainsi, il a été montré que les composés obtenus stimulent les

macrophages sur une durée trois fois supérieure à celle observée pour les composés *O*-glycosylés, mettant ainsi en évidence un effet immunopotenteur plus long.

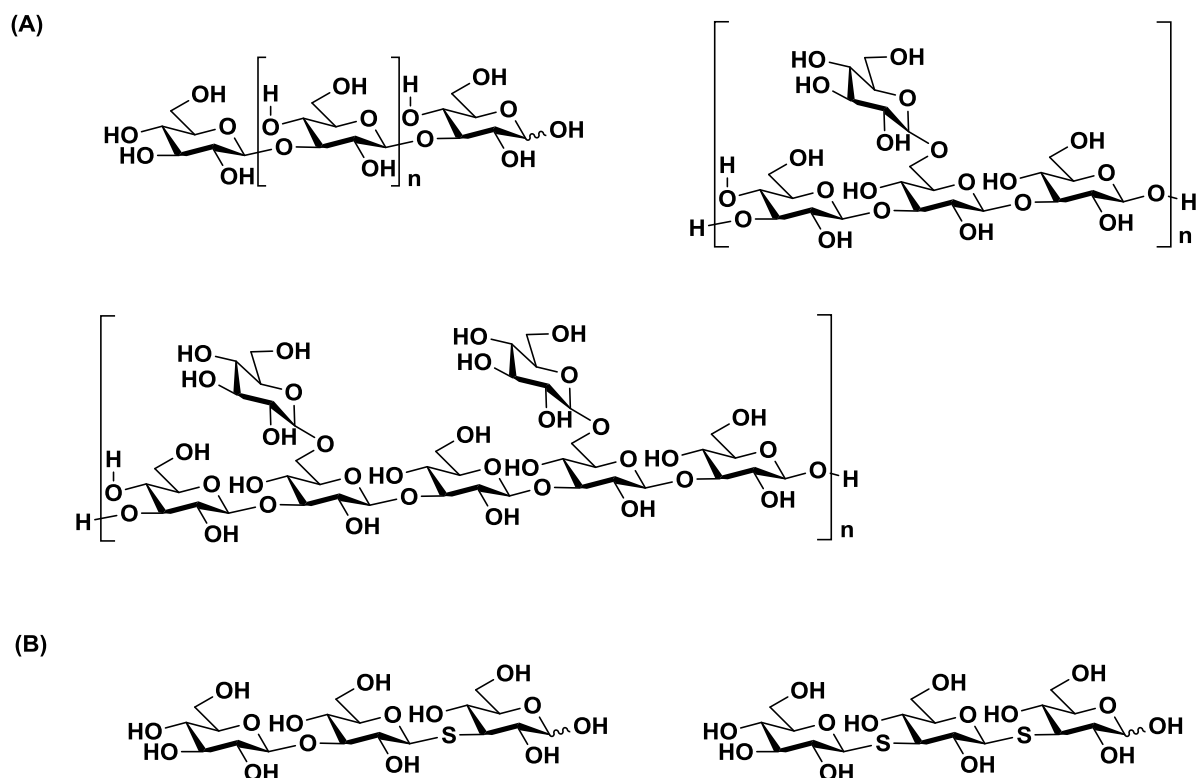


Figure 11 : Exemples de structures de β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanes (A) et de mimes soufrés (B)

Comme Dectin-1, DC-SIGN est également composé de lectines, des protéines qui se lient spécifiquement aux glucides. Cibler ce récepteur, présent sur les DCs, représente une des stratégies mises en œuvre pour permettre d'accéder à une réponse immunitaire plus rapide. Lorsque le récepteur n'est lié à aucun ligand, il s'exprime à la surface des DCs et de certains macrophages uniquement. Il est donc plus spécifique que le MR. Une fois qu'il interagit avec un ligand, une grande proportion du récepteur est internalisée dans la cellule.⁷⁸

Les ligands naturels du DC-SIGN sont des **oligosaccharides de mannose ou de fucose**. Plusieurs structures ont ainsi pu être identifiées qui ciblent ces récepteurs. L'une de ces structures est appelée l'oligosaccharide haut mannose, (Man)₉(GlcNAc)₂ (figure 12). Hacohe et *coll.* sont partis de ce saccharide pour synthétiser des analogues et tester leurs propriétés biologiques et leur capacité à être détectés par DC-SIGN.⁷⁹ Ils ont prouvé que les composés **1** à **4** permettent une meilleure internalisation des antigènes avec les résultats les plus probants pour le composé **1** (comparé à l'oligosaccharide haut mannose). Cela se traduit par une activation des lymphocytes T naïfs, puis, par la suite, à leur prolifération.⁷⁹

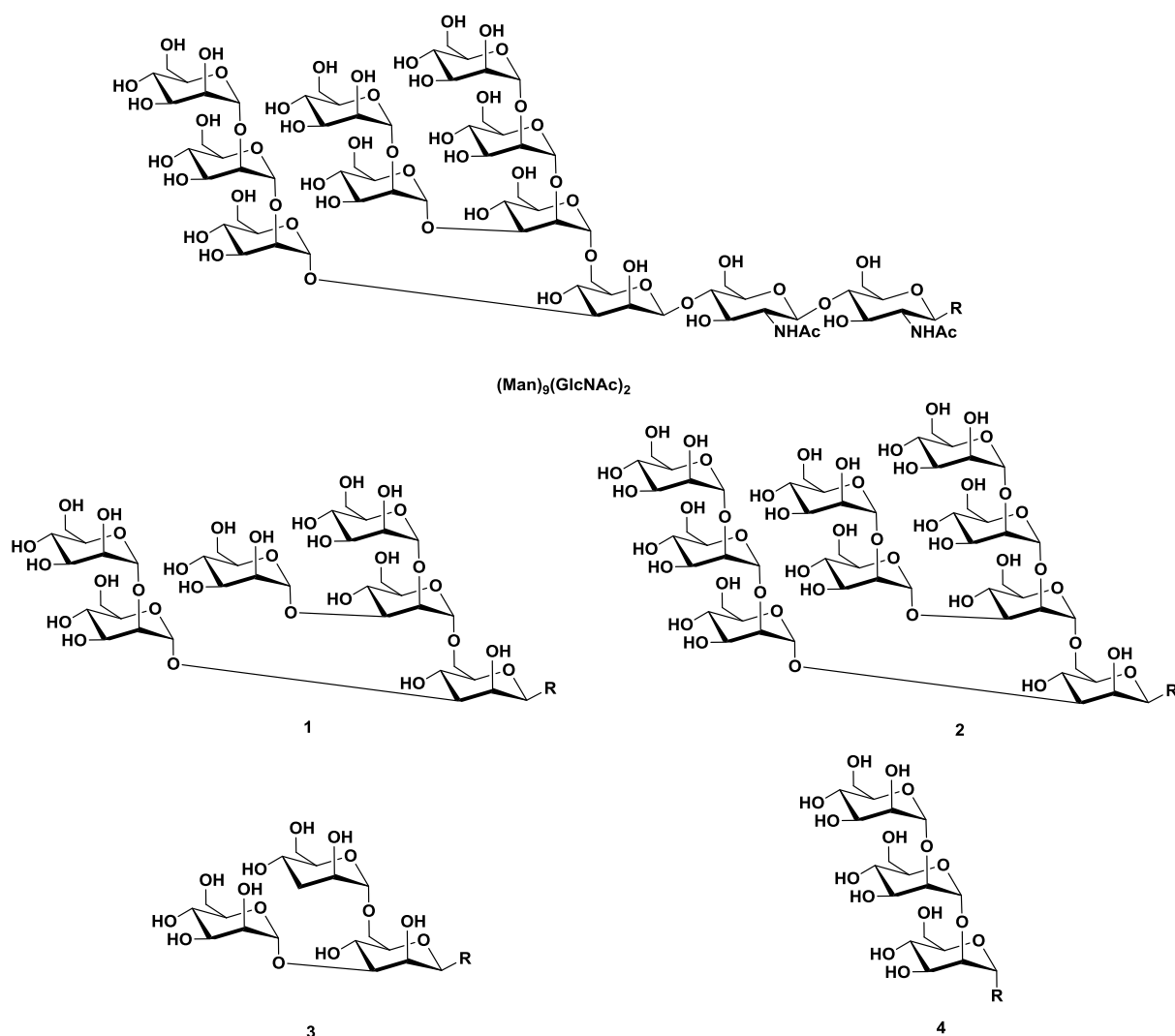


Figure 12 : Oligosaccharides haut mannose et ses analogues

Les structures composées de **fucose** sont quant à elles basées sur la structure de l'**antigène du système Lewis (Le)**. Parmi ces structures, on retrouve le Le^a, Le^b, Le^y et Le^x. Ces antigènes sont des structures naturelles, retrouvées à la surface de certaines cellules pathogènes mais également des cellules du sang humain. Pour Le^a et Le^x, seule une partie de l'antigène est nécessaire pour être détectée par les récepteurs (épitopes encadrés sur la figure 13).⁸⁰ Contrairement à Le^a et Le^b, Le^y et Le^x ne sont pas présents à la surface des membranes des globules rouges et ne représentent donc pas d'authentiques antigènes sanguins. On les retrouve cependant à la surface de certaines cellules cancéreuses. Ils peuvent ainsi être utilisés comme immunoadjuvants sans risque de réactions croisées avec les globules rouges.⁸¹

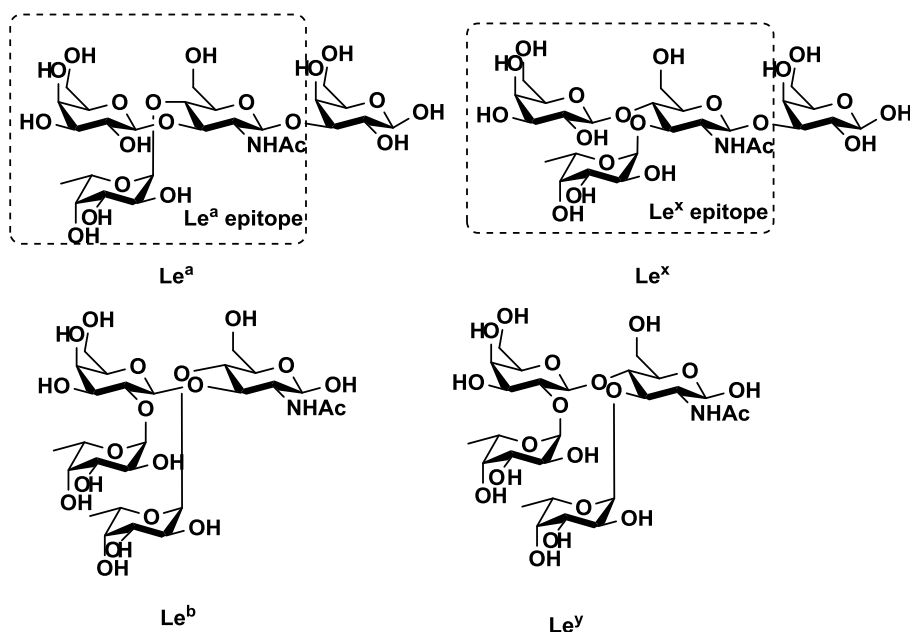


Figure 13 : Structure des antigènes de Lewis et des épitopes identifiés

Les antigènes du système Lewis peuvent servir de **véhicules**, transportant des antigènes dans le but de les diriger vers DC-SIGN. Etant donné qu'ils sont présents à la surface de pathogènes, ils sont également considérés comme des **épitopes** et sont donc internalisés par les APCs.⁸² Le^x est donc à la fois un véhicule, servant à cibler spécifiquement un récepteur pour livrer des antigènes, et un épitope capable d'induire une réponse immunitaire.

b. Les sucres comme fragment antigénique

i) Lewis X, ligand et inhibiteur du DC-SIGN, un traitement potentiel contre le VIH

Comme décrit précédemment, Le^x est un ligand naturel de DC-SIGN. Il se lie donc au récepteur et empêche un autre ligand de s'y placer. Or DC-SIGN est un des récepteurs impliqués dans la propagation du VIH. En effet, le virus se lie au récepteur et cela facilite l'invasion virale du système immunitaire. Une des thérapies envisagées est donc de bloquer la communication entre DC-SIGN et le VIH en utilisant des inhibiteurs du récepteur. Le glycoside n'est donc plus un immunoadjuvant mais il est à l'origine même de la réponse immunitaire, c'est donc un épitope. Le saccharide le plus connu est Le^x. Plusieurs équipes travaillent à la synthèse de dérivés également reconnus par DC-SIGN. Ces structures se basent sur le Le^x, ce qui permet une liaison avec le récepteur. En 2008, Bernardi et coll.⁸³ ont décrit les premiers ligands non naturels reposant sur un fucose (figure 14). La structure générale s'articule autour d'un fucose relié à un cyclohexane pour une liaison amide (molécule 6). Ce

dimère peut être à nouveau relié à un mime de galactose par liaison amide (molécule **5**). Les premiers résultats ont montré que ces structures se lient à DC-SIGN et possèdent même des IC_{50} plus faibles que le ligand naturel (Le^x). L' IC_{50} est la concentration inhibitrice médiane. Elle permet de déterminer la concentration nécessaire afin d'inhiber 50% d'une fonction biologique. Ainsi, plus l' IC_{50} est basse, plus le composé est efficace. Les bons résultats de **6** ont même permis de prouver que le résidu galactopyranosidique n'est pas nécessaire pour l'interaction.⁸³ Plus tard, en 2011, partant de ce résultat, l'équipe a synthétisé une quarantaine de composés basés sur la structure de **7** afin de trouver celui qui induit la plus grande inhibition de DC-SIGN. La molécule **8** (1R,2S) correspond à la molécule possédant la meilleure affinité pour DC-SIGN. De plus, elle n'est pas reconnue par d'autres récepteurs. Il s'agit donc d'un agent thérapeutique potentiel du VIH.⁸⁴

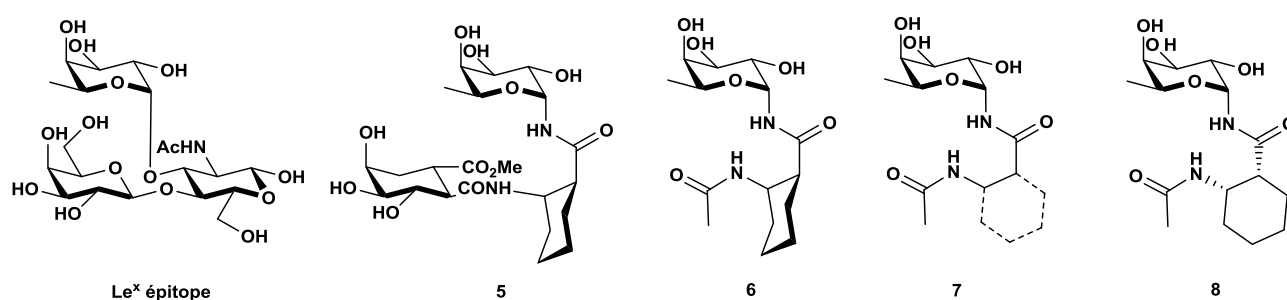


Figure 14 : Structure de Le^x et de certains analogues synthétiques

i) Les furanoses

Bien que la majorité des recherches mettant en avant l'utilisation des sucres comme immunoadjuvants se concentrent sur les pyranoses, les **furanosides** (cycle à 5 chaînons) présentent également des propriétés intéressantes. En effet, ils sont retrouvés en grande quantité dans la nature puisque deux furanoses, le D-ribose (figure 15) et le 2-désoxy-D-ribose, entrent dans la composition des acides nucléiques. D'autres furanoses comme le D-fructose, le D-arabinose et le **D-galactose** (figure 15) sont largement présents dans les plantes et les microorganismes sous forme d'oligo- ou de polysaccharides mais pas chez les mammifères.⁸⁵

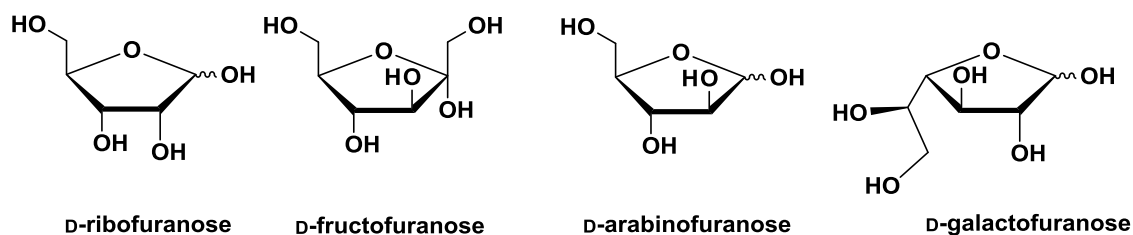


Figure 15 : Structures de quelques furanoses

Le D-arabinose, par exemple, est présent au sein des membranes cellulaires des mycobactéries (responsables entre autres de la tuberculose et de la lèpre).⁸⁶ Le lipoarabinomannane (LAM) est un polymère antigénique composé d'arabinofuranoses branchés en β -(1 $\rightarrow$ 5), substitués par des oligomères de mannane (polymannopyranose dont les unités sont reliées en α -(1 $\rightarrow$ 6)). Le LAM est hautement antigénique et un candidat potentiel comme vaccin contre la tuberculose.⁸⁷ Cependant, les arabinanes (figure 16) sont suffisamment immunopotenteur pour activer les macrophages et la sécrétion de TNF- α ainsi que de certaines interleukines⁸⁸. Au sein de notre équipe de recherche, des dérivés d'arabinofuranose, l'UDP- α / β -L-arabinofuranose (UDP : uridine diphosphate), ont été synthétisés. Le composé α (figure 16) a démontré une capacité à inhiber la croissance de parasites provoquant la leishmaniose, une maladie de peau importante.⁸⁹

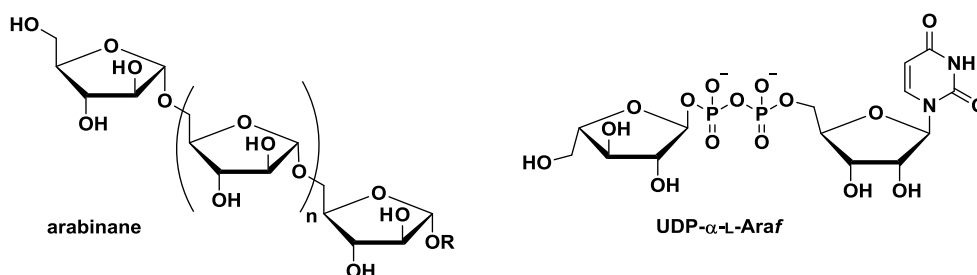


Figure 16 : Structures d'arabinoconjugués immunostimulants

Des composés similaires, N-acétylés, et de la série galactose (figure 15) ont présenté des résultats encore plus probants, allant jusqu'à l'inhibition complète de la croissance du parasite.⁹⁰ Le D-galactofuranose (abrégé sous la forme D-Galf) est également très répandu dans la nature. On peut le retrouver dans de nombreux champignons tels que *Penicilium*, *Histoplasma*, *Aspergillus*. Chez *Aspergillus*, le D-Galf est constitutif d'un polysaccharide, le galactomannane.⁹¹ Ce polymère, composé de galactofuranose et de mannopyranose, activeraient la production de cytokines *via* des interactions avec des TLRs des macrophages.⁹² Lors d'une précédente thèse réalisée au sein du laboratoire, plusieurs oligosaccharides de taille variant de 2 à 5 galactofuranoses ont été synthétisés de manière chimioenzymatique puis testés afin de déterminer leurs propriétés immunostimulantes (figure 17).⁹³ Il s'est avéré que ces propriétés sont dépendantes de la longueur de l'oligosaccharide

ainsi que du groupement porté sur le carbone anomère (groupement octyle ou paranitrophényle). Ainsi les oligosaccharides terminant par une chaîne grasse ont induit une plus grande production de TNF- α (sécrété par les macrophages lorsqu'ils sont activés). Un minimum de trois motifs sucre est nécessaire pour obtenir des résultats à une concentration de 100 ng/mL. La sécrétion de plusieurs interleukines (IL-10, IL-1 α) ainsi que la détection de molécule de co-stimulation à la surface des cellules dendritiques (CD86, CD40 et MHC II) a pu être observée pour ces mêmes composés, prouvant ainsi leur effet sur les cellules du système immunitaire.³⁴

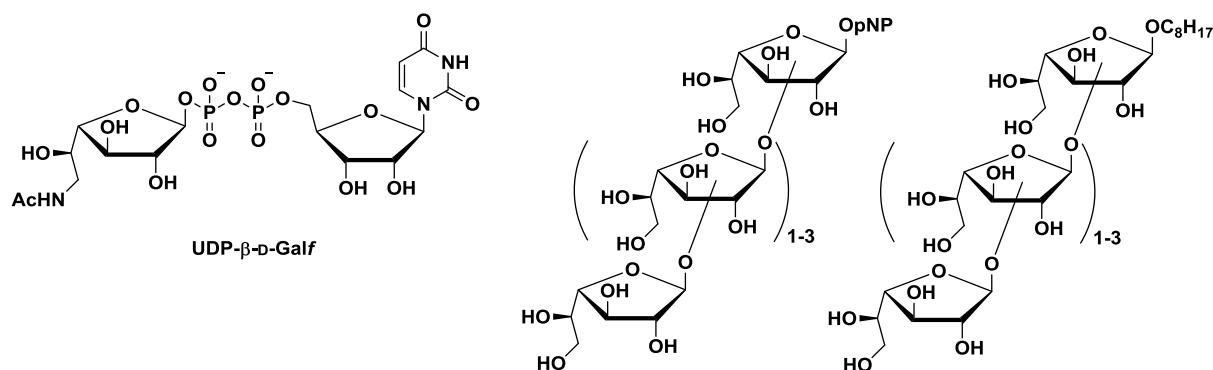


Figure 17 : Structures de galactofuranosyl-conjugués ayant un effet sur le système immunitaire

Du fait de leur présence chez des pathogènes et de leur absence du monde mammifère, les hexafuranoses sont facilement reconnus comme des molécules extérieures par le système immunitaire, ce qui en fait des composés de choix pour la synthèse d'adjuvants. En 2001, Tsuji et coll.⁵⁹ ont identifié le premier récepteur des galactofuranoses. **L'intelectin-1** est un récepteur de type CLR. La reconnaissance des galactofuranosides présents dans les membranes bactériennes permet l'identification ainsi que l'opsonisation des pathogènes. L'intelectin-1 se lie aux mycobactéries et assiste la phagocytose du microorganisme par les macrophages.⁹⁴ Les galactofuranosides ont également démontré pouvoir interagir avec les récepteurs DC-SIGN, largement répandus sur les APCs du système immunitaire.⁹⁵

Les furanoses possèdent donc toutes les caractéristiques des molécules immunomodulatrices. Ils sont présents à la surface de pathogènes et peuvent être reconnus par des récepteurs spécifiques. De nombreuses études ont donc été menées afin d'utiliser ces propriétés. Au sein de notre laboratoire, les furanoses sont synthétisés afin de tester leur potentiel d'inhibition de la croissance du parasite de la leishmaniose et de mycobactéries.⁹⁰

La partie saccharidique d'un glycolipide peut donc servir de « driver », de support ou même d'épitope. Ces propriétés peuvent être similaires ou complémentaires de la partie lipidique.

3. Partie lipidique

Les **lipides** peuvent exercer plusieurs rôles : celui de véhicules (d'antigène, d'épitope, d'ADN), celui d'agent fusogènes ou celui d'agent ciblant. Les agents fusogènes sont les substances qui permettent la fusion entre des cellules ou entre cellules et molécules.⁹⁶ Leur structure permet d'améliorer la diffusion des vaccins à travers la barrière épithéliale et leur stabilité face à la dégradation enzymatique.⁹

a. Les lipides détectés par des PRRs

Les lipides sont des **constituants essentiels des membranes**. Présents *a fortiori* dans les microorganismes pathogènes, ils peuvent donc naturellement être des PAMPs et être reconnus par plusieurs des récepteurs des cellules du système immunitaire. Les TCRs peuvent par exemple détecter certains lipides de mycobactéries.⁹⁷ De nombreux lipides ont été synthétisés en se basant sur des structures naturelles afin d'interagir avec les PRRs. Le DOTAP (figure 18), par exemple, a la capacité d'activer les DCs. Lorsqu'il est utilisé dans la formulation de liposomes cationiques, l'expression de protéines de costimulation (CD80 et CD86) à la surface des DCs a été observée. D'autres structures induisent la sécrétion de cytokines et de chimiokines en augmentant la transcription de certains gènes codant pour leur synthèse.^{98,99} Les lipides peuvent également activer les TLRs. Les ligands des TLR2 comptent généralement deux ou trois chaînes lipidiques présentes à la surface de bactéries (Pam2Cys et Pam3Cys, figure 18). L'activation du TLR2 favorise l'activation des macrophages et la production de certaines cytokines comme l'IL-6.¹⁰⁰

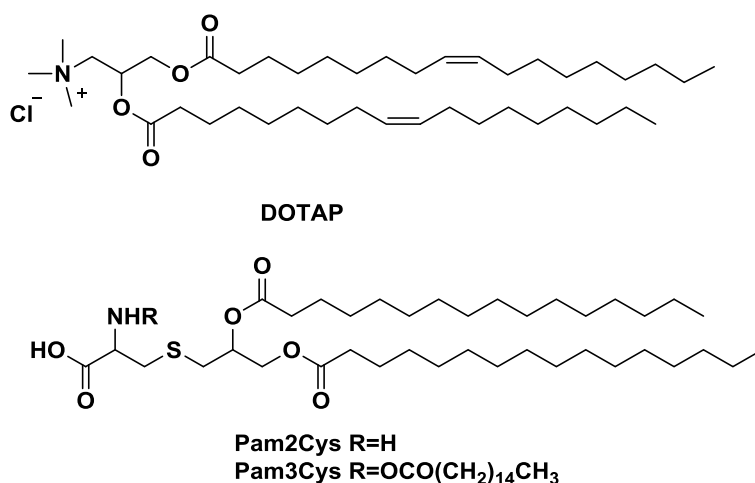


Figure 18 : Structures de quelques lipides reconnus comme des PAMPs

Prenons l'exemple des **lipopolyamines** : Lonez et coll.⁹⁶ ont étudié les propriétés adjuvantes de plusieurs lipopolyamines dont la taille des chaînes grasses varie de 12 à 18 carbones (figure 19). Tous

les lipides interagissent avec le TLR2, voire avec le TLR4, et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires. Les lipopolyamines à 12 et 14 carbones activent le système immunitaire aussi rapidement que les PAMPs de bactéries (contrairement au C18, plus lent). Lorsque le lipide C12 est couplé à un antigène, le complexe est détecté par les APCs et internalisé en plus grande quantité que lorsque l'antigène est présenté seul. Et contrairement à un mélange Alum-antigène, le complexe lipopolyamine-antigène permet la différenciation des Th1 et des Th2 (seulement Th2 dans le cas de l'Alum alors qu'il faut les Th1 dans le cas de la protection contre les pathogènes intracellulaires par exemple).

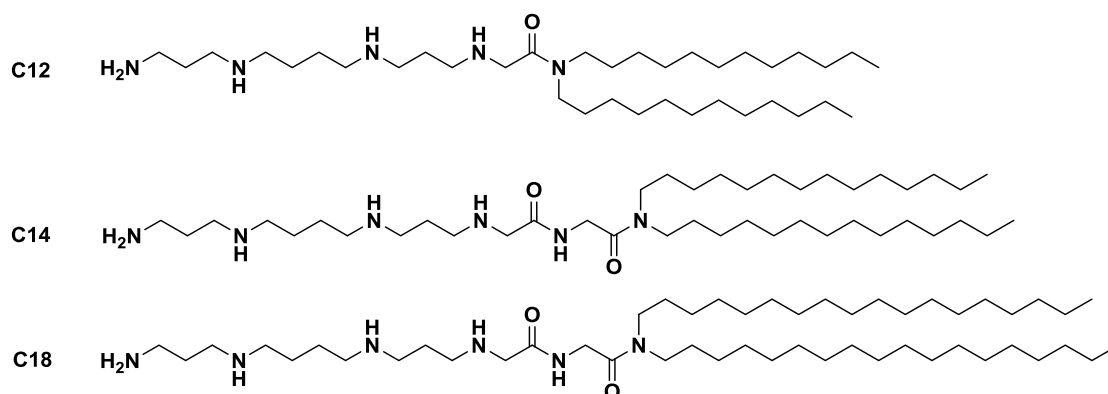


Figure 19 : Structures de lipopolyamines

Les lipides ont donc cet avantage d'être immunopotentiateur mais également le véhicule d'autres molécules comme des anticorps, des antigènes, de l'ADN, ...

b. Les lipides comme véhicules

Les lipides peuvent également être intégrés à des **vaccins auto-adjuvantés** (ou l'adjuvant et l'épitope se trouvent sur la même molécule). Ces composés sont notamment utilisés dans les vaccins anti-cancéreux.¹⁰¹ Ainsi un épitope de lymphocyte T peut être greffé à un ou plusieurs lipides afin de cibler les TCRs et permettre par la suite de détruire les cellules cancéreuses. Ces composés peuvent posséder une ou plusieurs chaînes lipidiques et être greffés à plusieurs épitopes différents, permettant ainsi la production d'anticorps contre chacun des antigènes supportés.¹⁰² Citons par exemple **les lipides cationiques** : les lipides cationiques sont utilisés pour augmenter les propriétés adjuvantes des antigènes et des immunostimulants en les présentant à des TLRs des APCs. Ils peuvent en effet servir de véhicules aux antigènes et activer les réponses humorales et cellulaires du système immunitaire. Ils peuvent ainsi être utilisés comme vaccin ne comportant qu'un seul et unique composé (auto-adjuvanté). C'est le cas du lipide diC14-amidine synthétisé par Ishii et coll.¹⁰³ (figure 20). Cependant, bien que les propriétés adjuvantes fussent prometteuses contre certaines

allergies, elles ne permettent pas d'induire la production d'immunoglobuline IgG sans la présence d'Alum (sels d'aluminium). Ces composés sont de bons véhicules mais ne parviennent pas seuls à activer les Th1 et Th2.¹⁰² Néanmoins, les lipides cationiques, chargés positivement, interagissent avec les membranes de cellules chargées négativement, ce qui augmente leur internalisation et donc augmente la livraison de plasmide, de protéines, d'oligonucléotides.¹⁰⁵ De plus, la charge positive permet également de déstabiliser les endosomes en fusionnant avec leur membrane et donc de libérer les antigènes dans le cytoplasme des APCs.¹⁰⁶ Les lipides neutres ou anioniques, quant à eux, sont utilisés dans le but de protéger un antigène mais sont moins bien internalisés par les APCs (du fait de l'absence de charge positive).

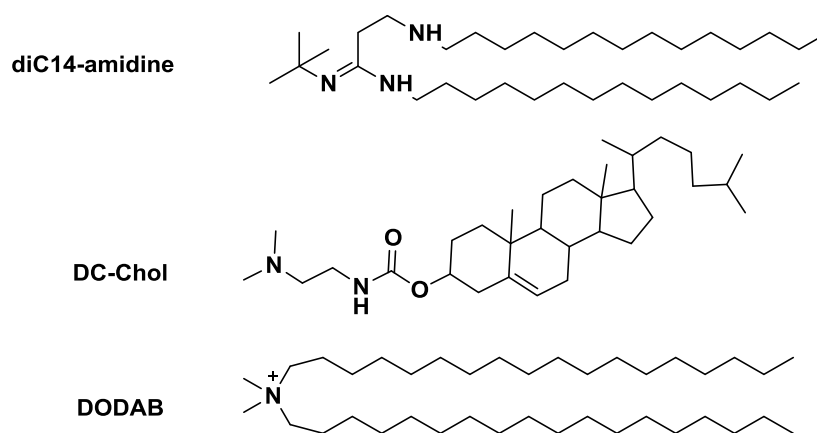


Figure 20 : Structures de quelques lipides cationiques

c. Les lipides d'Archaea

Les **lipides d'Archaea** sont des lipides naturels trouvés dans les membranes de ces microorganismes. Les Archaea ont été découverts en 1977 et ne sont considérés ni comme des procaryotes ni comme des eucaryotes. Ils se développent dans des **milieux hostiles**, à très hautes ou à très basses températures (respectivement thermophiles et psychrophiles), en milieux soufré et acide (thermoacidophiles), ...¹⁰⁷ Cette résistance développée par les Archaea s'explique en partie par la structure de leurs lipides membranaires (figure 21).¹⁰⁸ Parmi ces lipides, plusieurs structures de **diéthers et de tétraethers** reliés par des motifs **glycérol *sn*-2,3** ont été isolées.

Les liaisons éthers sont plus stables chimiquement que les esters, ils sont moins sensibles à l'hydrolyse. De plus le motif glycérol *sn*-2,3 n'est pas un substrat des enzymes humaines qui hydrolysent les motifs *sn*-1,2. La dénomination de ces deux configurations relève de la représentation de Fischer des molécules (figure 21). Ces propriétés permettent aux éthers d'être plus stables que les phospholipides des membranes des organismes mésophiles.¹⁰⁹

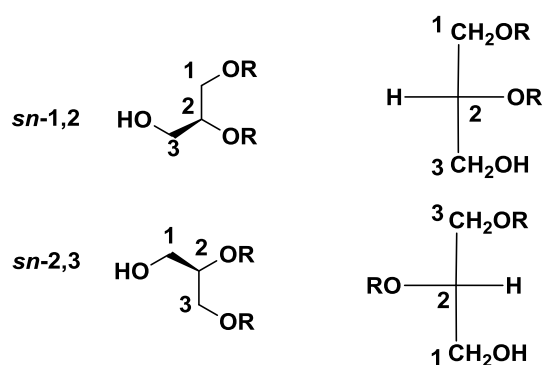


Figure 21 : Structures des composés *sn*-1,2 et *sn*-2,3

De plus, les chaînes lipidiques possèdent des **ramifications** qui assurent la **fluidité** de la membrane grâce aux répulsions hydrophobes. Les archaeolipides possèdent également des **motifs cycliques** (cyclopentane) (figure 22) qui contribuent à la **rigidité** et la stabilité de la membrane. En effet, ils limitent la libre rotation des chaînes grasses sur elles-mêmes.¹¹⁰ Néanmoins, les lipides d'Archaea ne sont pas immunogènes. Ils ne sont donc pas reconnus par les récepteurs des cellules immunitaires. Cependant, ils augmentent la durée de la réponse immunitaire lorsqu'ils sont ajoutés à un vaccin.¹¹¹

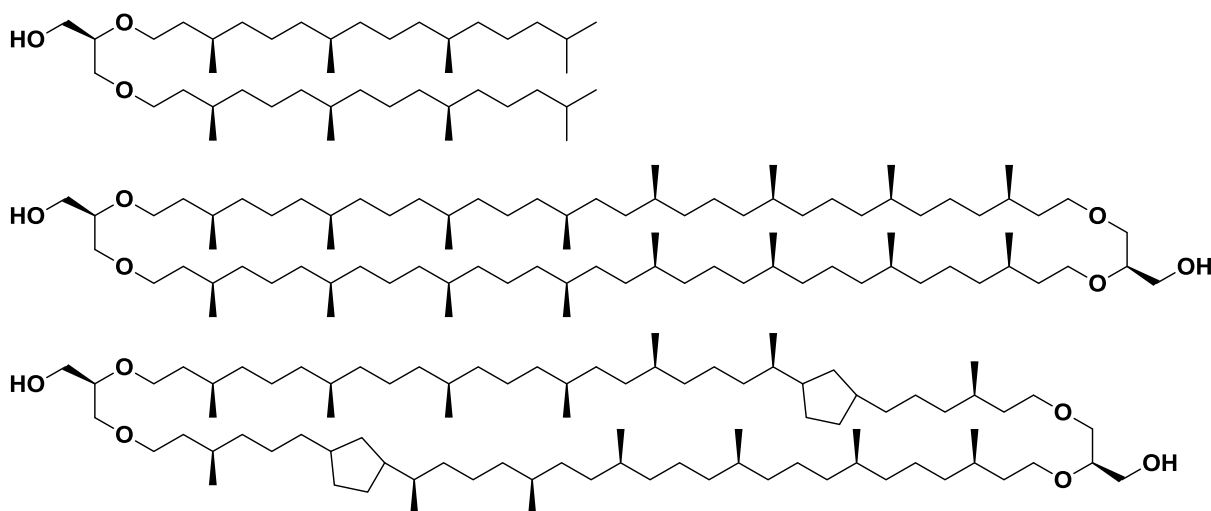


Figure 22 : Exemples de di- et tétraéthers issus des Archaea¹⁰⁹

4. Un glycolipide immunomodulateur naturel : le LPS

Le **lipopolysaccharide** (LPS) (figure 23) est le glycolipide de référence dans les tests d'activités biologiques. On le retrouve dans les bactéries Gram(-) qui ont la particularité de posséder une membrane extérieure composée majoritairement de LPS. Il est reconnu par des PRRs du système immunitaire.¹¹² Ce n'est pas une molécule unique mais plutôt une collection de molécules possédant de nombreuses variations structurales. Chaque bactérie possède ses propres LPS, dont les structures

lui sont spécifiques. Le LPS est composé du lipide A, d'un noyau (oligosaccharide) et d'un polysaccharide appelé antigène O (figure 23). Le noyau est séparé en deux parties, le noyau interne et le noyau externe. Le premier est composé d'heptoses et d'acides uroniques, le second d'hexoses. L'antigène O est une répétition d'unités d'oligosaccharides.¹¹³ Le lipide A (figure 23) est un disaccharide de *N*-acétylglucosamine dont les monomères sont reliés en β -(1 $\rightarrow$ 6), ce disaccharide porte lui-même des acides gras *via* des liaisons esters ou amides.²⁴

Le LPS est un ligand naturel d'un TLR, le TLR-4.¹¹⁴ Il est reconnu par une protéine, la LPS binding protein. Ce complexe se lie lui-même à un co-récepteur et l'ensemble interagit avec le TLR-4. L'interaction ligand/TLR-4 induit la production d'IL-12 ainsi que l'activation des réponses humorale et cellulaire induites par les Th1.¹¹⁵

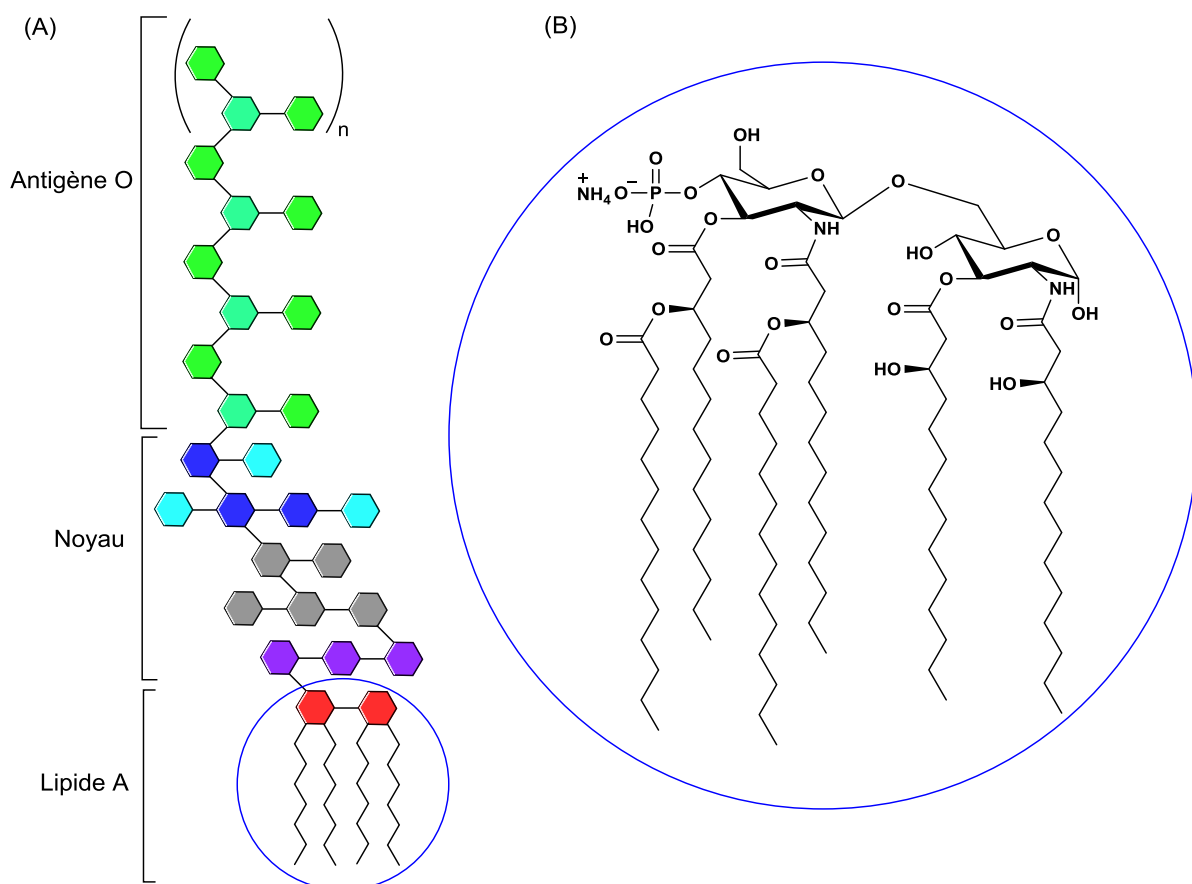


Figure 23 : Représentation schématique du LPS (A) et structure d'un lipide A monophosphorylé (MPLA) (B)

Cependant, l'utilisation de LPS comme adjuvant ou agent thérapeutique est impossible en raison d'effets indésirables (fièvre, sécrétions d'anti-inflammatoires, coagulation, etc).¹¹⁶ Néanmoins l'utilisation du **MPLA** (figure 23 B) permet l'induction d'une réponse immunitaire tout en affichant une toxicité comparable à l'Alum. Le MPLA a montré une stimulation de la production de certains anticorps dans le cas de traitements contre l'hépatite B,¹¹⁷ le tétanos¹¹⁸ ou encore la grippe.¹¹⁹ Il est

commercialisé et approuvé par la FDA sous la forme d'un mélange MPLA/Alum. On peut retrouver cet adjuvant dans plusieurs traitements (contre le *Papillomas virus* ou l'hépatite B).^{120,121}

5. Glycolipides et liposomes

Les lipides sont souvent utilisés sous la forme de **liposomes**. Cette structure supramoléculaire est composée d'une **double couche** de lipides amphiphiles et présente plusieurs avantages en tant qu'adjuvant. Tout d'abord un pouvoir d'**encapsulation** : en effet, des substances actives et solubles en milieu aqueux peuvent être retenues au centre de cette double couche lipidique, telles que des protéines, de l'ADN, des enzymes (figure 24).^{47,48,122} Cette structure permet également de transporter des substances organiques au sein même de la couche lipidique.¹²³ Le liposome a donc un rôle de protecteur et de véhicule. De plus, différents ligands peuvent être greffés sur les têtes polaires des molécules amphiphiles formant la double couche lipidique tels que des peptides, des anticorps ou en encore des sucres.^{61,124,125} Ces ligands permettent un **ciblage** des cellules du système immunitaire comme décrit dans le cas des sucres et de libérer le contenu des liposomes directement au sein des APCs. Dans le cas des glycolipides, des sucres peuvent être greffés à la surface de liposomes.

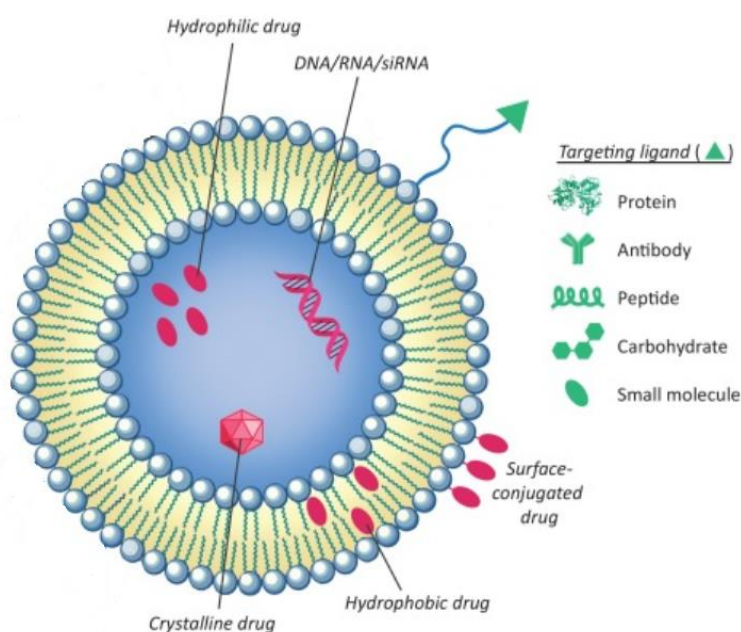


Figure 24 : Structure d'un liposome¹²³

Les mannoconjugués peuvent être utilisés pour recouvrir des liposomes afin de transporter un traitement ou des antigènes jusqu'aux cellules du système immunitaire. Des monomères de mannose comme des oligosaccharides ont été utilisés.¹²⁴ Leur propriété de transport a été testée sur des protéines, des médicaments antitumoraux, des plasmides, etc. Dans tous ces cas, les liposomes mannosylés ont été mieux détectés par le système immunitaire et induisent une meilleure

internalisation dans les APCs, de meilleurs effets antibactériens, une réduction de la charge parasitaire comparés aux liposomes classiques. Les liposomes mannosylés ont également été testés en tant que vaccins contre le cancer, certains pathogènes comme les leishmanies ou encore le VIH.^{122,126–128} Greffer des antigènes sur des liposomes mannosylés a également donné de bons résultats dans le cas de méningites. Dans le cas du VIH, les liposomes (encapsulant un épitope une glycoprotéine présente à la surface du virus) ont été recouverts de pentamannosides. Ces liposomes ont induit une réponse spécifique des lymphocytes Tc, due à une interaction spécifique MHC I-CD8+.¹²⁹ Dans une autre étude, Dubey et coll.¹²⁵ ont utilisé des liposomes mannosylés afin de cibler les macrophages et les DCs et y délivrer l'indinavir, un inhibiteur de protéase du VIH (enzyme qui joue un rôle majeur dans la réplication du virus).

Les propriétés adjuvantes des liposomes varient selon plusieurs critères. La taille par exemple, les liposomes de petites tailles (50-200 nm) sont moins retenus après l'injection et passent plus rapidement dans le sang que les liposomes plus volumineux (>400 nm). Cependant, ces derniers sont éliminés du système beaucoup plus lentement. La nature du lipide joue également un rôle important et notamment la charge superficielle. Comme décrit précédemment, les lipides cationiques présentent des propriétés d'interaction avec les membranes intéressantes et augmentent la détection par les APCs, ce qui en fait des composés de choix pour les liposomes. La surface des liposomes peut également être modifiée par le greffage de chaînes polyéthylène glycol (PEG). Ces structures ont démontré un effet sur la biodisponibilité des liposomes ainsi que sur le type de réponse immunitaire induit (diminution de la réponse des lymphocytes T mais augmentation de la sécrétion de certaines cytokines).¹²³ La longueur et la nature de la chaîne lipidique sont aussi importantes puisqu'elles influencent la température de transition de phase (T_m). Dans le corps humain, lorsque T_m est inférieure à 37 °C, alors les chaînes du liposome se trouvent sous forme rigide. Au contraire si T_m est supérieure à 37 °C, elles se présentent sous une forme fluide. Enfin, la fluidité de la double couche lipidique influence la biodistribution des liposomes (en augmentant sa stabilité pour les T_m supérieures à 37 °C), et la réponse immunitaire cellulaire induite par la vaccination (plus importante pour les T_m plus élevées).^{130,131} Un liposome n'est pas nécessairement formulé avec une seule structure moléculaire. Il peut être constitué de plusieurs lipides différents, ce qui permet de lui conférer plusieurs propriétés intéressantes. En effet, on peut ainsi cumuler les propriétés des lipides cationiques à des glycolipides.¹³²

IV. Les objectifs de la thèse

La synthèse de nouveaux adjuvants basés sur des structures naturelles demeure encore de nos jours un challenge important. Malgré les nombreuses études menées, trop peu ont passé les phases I et II

et l'immunoadjuvant le plus utilisé reste encore l'Alum, mélange de sels d'aluminium. Bien qu'aucune étude ne prouve que son utilisation puisse avoir un effet nocif, l'opinion publique reste méfiante sur ce genre de produits.³

Les glycolipides semblent être une piste des plus sérieuses pour la mise au point d'immunoadjuvants et d'immunostimulants. Leur structure inspirée de molécules naturelles en font des composés *a priori* non toxiques. Grâce aux propriétés de ciblage des cellules du système immunitaire par les sucres, conjuguées aux propriétés fusogènes des lipides, ces composés devraient remplir toutes les conditions pour remplacer les sels d'aluminium.

Partant de ces conclusions, nous avons décidé de relier les différentes études et spécificités du laboratoire en un projet commun de **synthèse d'immunomodulateurs glycolipidiques**.

La structure des molécules cibles (figure 25) a été conçue pour permettre de synthétiser une librairie de composés en faisant varier la partie saccharidique et la partie lipide. Une fois le cœur de la **plateforme** obtenu, un très grand nombre de structures sont envisageables. L'**adaptabilité** de la molécule donne accès à un large panel d'optimisations possibles. Cette synthèse est donc **convergente** car elle permet de synthétiser chaque partie de la molécule indépendamment des autres : la partie saccharidique, la partie lipidique et la plateforme.

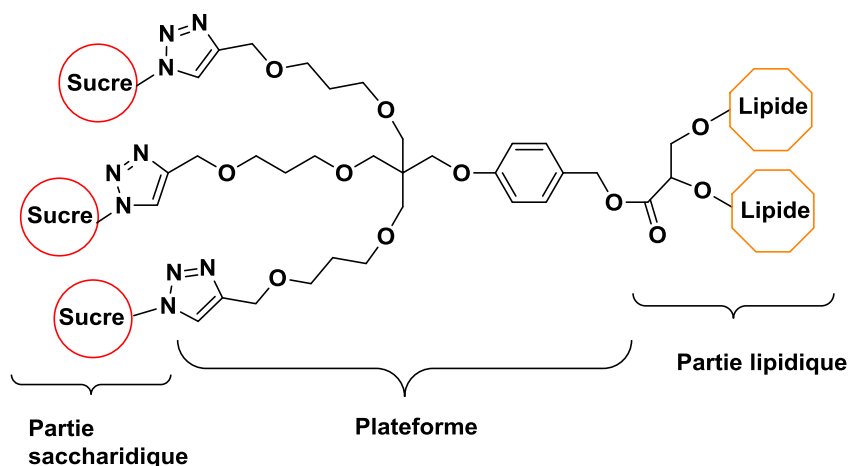


Figure 25 : Structure générale des molécules cibles

1. Structure générale

Le cœur de ces cibles est donc la plateforme. D'un côté du **noyau aromatique**, lié par une liaison ester, se trouve une **double chaîne lipidique**. Les lipides choisis sont inspirés de ceux trouvés dans les membranes des Archaea. De l'autre côté de l'aromatique, grâce à un bras permettant une

triprésentation, sont greffés des **sucres**. Différents sucres sont envisagés, mannose et galactose, sous forme pyranose ou furanose, **fluorés** en position 6 ou non.

a) Réaction click

Nous avons fait le choix de relier la partie plateforme aux différents sucres par **réaction click**. Ces réactions ont pour avantage de pouvoir faire réagir des sucres déprotégés, ce qui évite une étape de déprotection sur la molécule complète. En effet, les conditions basiques auraient pu être un problème pour la liaison ester reliant la plateforme à la partie lipidique (figure 25). La partie plateforme doit ainsi posséder des terminaisons de type triple liaison afin de mener une cycloaddition 1,3-dipolaire sur les sucres possédants un azoture.

b) La multiprésentation

De nombreuses études ont démontré qu'une activité biologique plus intense est observée lorsque plusieurs sucres identiques sont présentés aux récepteurs comparés à un sucre seul.^{68,79,80} Ainsi un dendrimère induit une plus grande réponse cellulaire qu'un monomère. C'est ce que Lee a introduit comme le « **glycoside cluster effect** ». ¹³³ La multiplication des interactions ligand/récepteur peut produire une adhésion globale bien plus importante que l'addition de plusieurs interactions entre un « monoligand » et son récepteur. La multivalence est utilisée dans la nature pour augmenter la force et la spécificité des interactions afin de pallier aux interactions faibles entre ligand et récepteur.¹³⁴ En effet, si les interactions individuelles à la surface des cellules étaient de grande spécificité, la somme de ces interactions fortes rendrait la liaison irréversible entre le ligand et le récepteur. Au contraire, les liaisons faibles sont labiles. Ainsi lorsque deux cellules se rencontrent, les interactions faibles permettent de capter la cellule d'intérêt mais également de la relâcher s'il s'avérait que ça ne soit pas une cellule d'intérêt. La multivalence permet donc d'augmenter la spécificité du ligand vis-à-vis d'un récepteur puisque le ligand détient la « bonne » valence pour un récepteur donné.^{134,135}

Globalement, les ligands multivalents, peu importe leur valence, sont plus efficaces que les monovalents. Cependant la relation entre le nombre de valence et l'activité biologique reste difficile à prédire. Ainsi, d'un récepteur à l'autre, la valence optimale n'est pas la même.^{136,137}

Plusieurs types de structures peuvent offrir de la multivalence. C'est le cas des dendrimères, des polymères, des nanoparticules, des liposomes.¹³⁴ Ces supports permettent d'obtenir une valence importante à l'échelle de particules. Cependant des études ont démontré qu'une triprésentation suffit à induire une activité biologique.¹³²

La multiprésentation a été étudiée au sein de notre laboratoire *via* la synthèse de composés trimannosylés (composé **9**, figure 26).¹³² La présentation de trois motifs mannopyranosidique a permis d'activer les cellules dendritiques du système immunitaire. En se basant sur ces résultats encourageants, nous avons imaginé une structure modulable (figure 25) potentiellement immunostimulante.

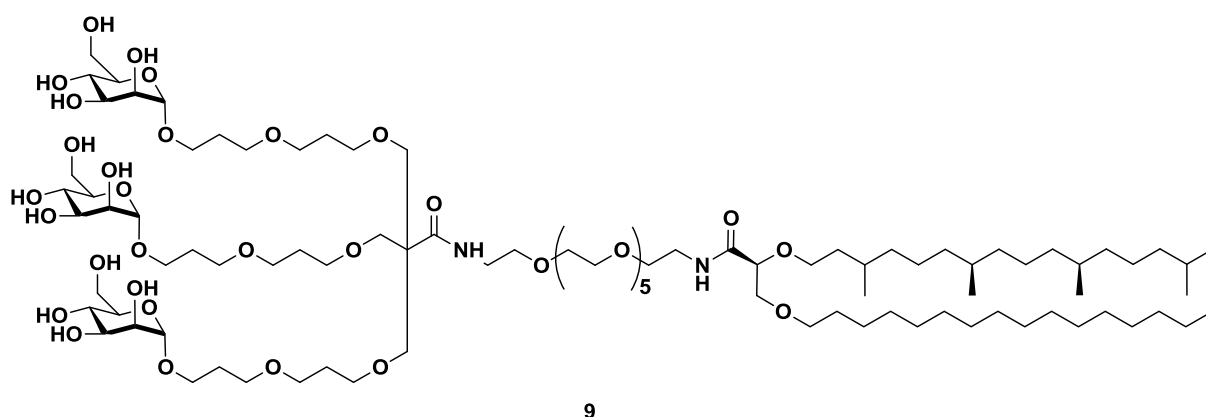


Figure 26 : Analogue d'archaéolipide synthétisé au laboratoire¹³²

Dans les paragraphes suivants seront présentés les différents choix que nous avons pu faire, afin de synthétiser des molécules glycolipidiques immunostimulantes. Dans une première partie, les saccharides envisagés seront présentés. Puis, dans une seconde partie, nous aborderons la structure du lipide choisi. La partie plateforme sera ensuite détaillée, avant de terminer par la présentation des tests biologiques envisagés.

2. Partie saccharidique

a. *Le mannose*

Comme cela été décrit précédemment, le **mannopyranose** est le sucre le plus étudié pour l'immunostimulation. De plus les résultats obtenus avec la structure trimannosylée démontrent que ces sucres interagissent avec le MR et activent le système immunitaire. Il était donc naturel de tester les propriétés de notre structure greffée avec des motifs mannopyranose.

b. *Les galactofuranosides*

Le **galactofuranose**, dont la synthèse de dérivés est très étudiée au sein de notre laboratoire, était une des cibles principales de notre étude. Au cours d'un projet antérieur, notre équipe a pu caractériser des structures de galactofuranosides synthétisés de manière enzymatique.³⁴ Plusieurs di-

, tri- et même oligosaccharides ont ainsi pu être isolés avec parfois un atome de fluor en position 6 sur une des entités (schéma 1). Ces composés ont été testés sur des macrophages de souris afin d'observer la sécrétion d'une cytokine, le TNF- α (médiateur de la réponse inflammatoire).¹³⁸ Les résultats montrent que les composés fluorés induisent une plus grande sécrétion de cytokines que leurs analogues non fluorés. Ils sont donc mieux détectés par les macrophages. Leur capacité à être internalisés par les DCs a également été étudiée *via* l'apparition des corécepteurs CD86 et CD40 ainsi que le MHC II. Le disaccharide **12** monofluoré en position 6 montre des résultats des plus encourageants. D'autres tests d'activité ont permis de mettre en évidence l'activation des Th2 ainsi que la prolifération des lymphocytes B.¹³⁸

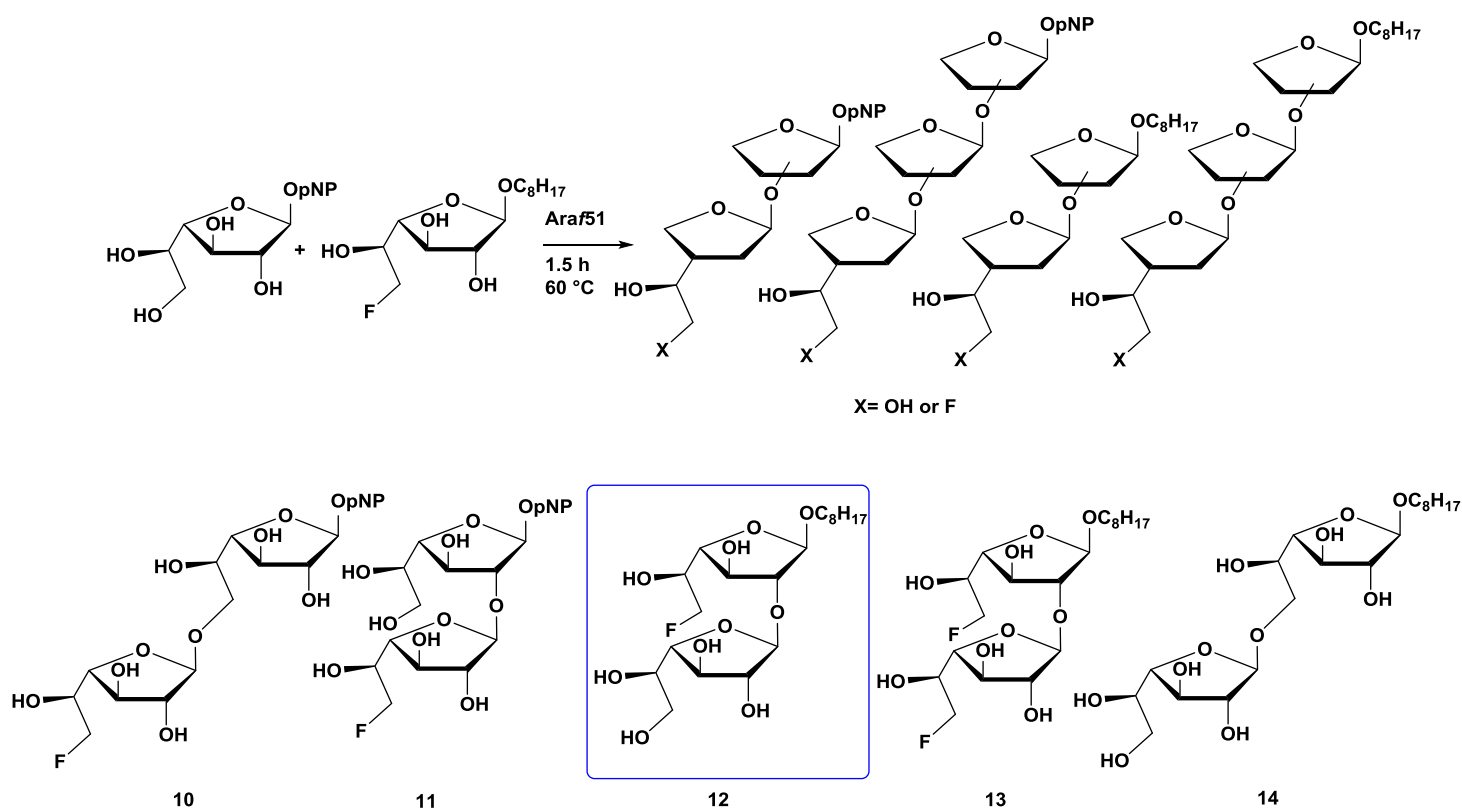


Schéma 1 : Synthèse enzymatique de dérivés galactofuranosidiques

c) L'intérêt du fluor

Depuis une trentaine d'années, l'intérêt des scientifiques pour les molécules bioactives fluorées ne cesse d'augmenter. Ses propriétés physico-chimiques (taille, électronégativité) en font un élément de choix pour la substitution d'un groupement hydroxyle (taille comparable). Le changement ne provoque donc pas ou **peu de perturbation stérique**. De nombreux nucléosides ont ainsi été synthétisés en y incorporant un atome de fluor et ces composés possèdent des **propriétés antivirales et anticancéreuses**.¹³⁹ 150 substances ont atteint la mise sur le marché depuis les années 50. Il est

même estimé que 20% à 30% des nouveaux candidats de médicaments et de traitements contiennent du fluor.¹⁴⁰ Cet élément a la capacité d'augmenter la lipophilie des composés, ce qui influence la perméabilité des membranes moléculaires. Cette propriété permet d'augmenter la biodisponibilité des traitements. Le fluor est également l'élément le plus électronégatif du tableau périodique (échelle de Pauling) et a un effet sur l'acidité et la basicité des groupements fonctionnels qui l'entourent. En effet, il modifie le pKa des fonctions, ce qui influence leur toxicité, sélectivité, pharmacocinétique et pharmacodynamique. De plus, la liaison C-F est fortement polarisée, ce qui induit une grande stabilité à la molécule.^{139–141}

Afin de poursuivre l'étude de l'effet du fluor sur l'activité biologique des galactofuranosides synthétisés au sein du laboratoire, de plus grandes quantités étaient nécessaires (la voie de synthèse chimioenzymatique ne permettant pas d'obtenir plus de quelques milligrammes). C'est pourquoi la synthèse organique s'est imposée comme une solution afin d'atteindre les composés suivants dans des quantités importantes (quelques centaines de milligrammes). En s'inspirant de la structure élucidée au laboratoire du disaccharide monofluoré (**12**, schéma 1), nous avons décidé de synthétiser des **disaccharides difluorés en position 6** pour les molécules cibles afin de comparer l'impact de l'ajout d'un fluor sur les propriétés biologiques des composés (figure 27). Nous avons également voulu vérifier si la position de la liaison glycosidique pouvait avoir un impact sur les résultats biologiques avec les deux structures **17** et **18**. Enfin nous avons choisi de synthétiser également deux monomères, l'un fluoré **16**, l'autre pas **15**, afin de pouvoir établir si le nombre de motif saccharidique avait une importance dans l'induction d'une réponse immunitaire. L'azoture présent sur la position anomère de chaque sucre devrait permettre de réaliser une réaction click pour lier les sucres à la plateforme.

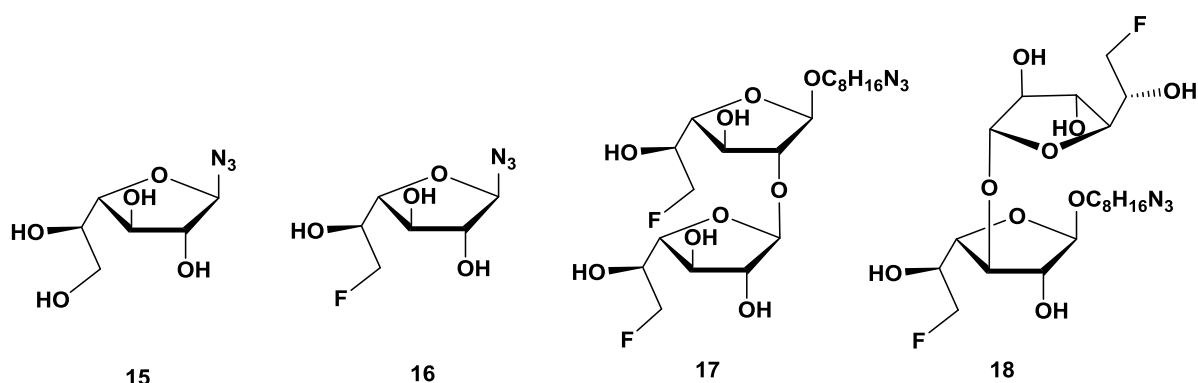


Figure 27 : Structures des galactofuranosides cibles

3. Partie lipidique

Comme présenté précédemment, les **archaéolipides** sont à l'origine de la survie des Archaea dans des conditions extrêmes. De par la présence d'un motif glycérol *sn*-2,3 et de nombreuses ramifications, ils assurent une rigidité tout en maintenant une certaine fluidité à la membrane de ces microorganismes.¹⁰⁸ De plus, ils possèdent des propriétés adjuvantes et peuvent aider au transport de molécules bioactives à travers les membranes cellulaires mais ils ne sont pas immunogènes. C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées afin de mettre au point un adjuvant à base de lipides d'Archaea. Dans la grande majorité des cas, les lipides sont formulés sous la forme de liposomes, appelés alors archaeosomes.^{142,143} Comme les liposomes classiques, ils peuvent contenir des antigènes ou des épitopes au cœur de la vésicule ainsi que des motifs sur la surface extérieure afin d'augmenter les propriétés de ciblage de récepteurs spécifiques. Ils sont détectés par les macrophages, et notamment les DCs, ce qui leur permet d'activer le système immunitaire adaptatif.¹⁴⁴ Etant donné qu'une activation des LTs est observée en présence d'archaeosomes, cela signifie qu'ils entraînent la production du MHC et de protéines de co-stimulation à la surface des DCs. Krishnan et coll.¹⁴⁵ ont démontré que l'immunisation avec des archaeosomes contenant des antigènes de mélanome génèrent des lymphocytes Tc spécifiques contre les tumeurs. Cela prouve que les archaeosomes sont une piste intéressante à étudier pour la mise au point de vaccins anticancéreux. En effet, l'association antigènes/archaeosome a permis de surpasser la tolérance du système immunitaire envers les antigènes tumoraux que le corps crée lui-même lors du développement des tumeurs.¹⁴⁶ Cependant l'extraction des archaéolipides en quantité suffisante reste difficile, c'est pourquoi la synthèse d'analogues est apparue comme une alternative viable pour la mise au point de nouveaux adjuvants. Très récemment, Mc Cluskie et coll.¹⁴⁷ ont publié les résultats de l'utilisation d'un vaccin contre la grippe à base d'archaeosomes semi-synthétiques. Ils ont pu démontrer que l'utilisation d'antigènes du virus encapsulés dans des archaeosomes induisant une réponse immunitaire chez les souris, qu'elles soient jeunes, âgées ou même enceintes, et que l'immunisation est transmise aux petits. Comme évoqué plus tôt, des analogues d'archaéolipides ont été synthétisés au sein de notre laboratoire (figure 26). Ils ont été intégrés au sein d'archaeosomes afin de cibler le système immunitaire. Ces glycolipides ont démontré pouvoir interagir avec les cellules dendritiques et les activer.

Nous avons décidé de nous inspirer de ces structures et d'utiliser les propriétés de passage des membranes cellulaires des archaéolipides pour synthétiser notre molécule cible. En se basant sur des résultats encourageants obtenus au sein de notre laboratoire, nous avons décidé de commencer par une structure de type diéther constituée d'un lipide ramifié et d'une chaîne linéaire (produit **19**, figure 28).¹³²

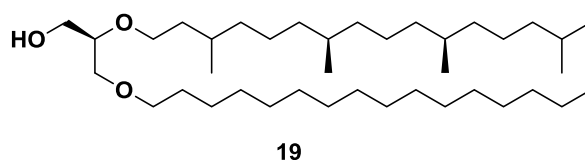


Figure 28 : Structure du lipide cible

4. La plateforme

Pour relier la partie lipidique et la partie saccharidique, nous nous sommes inspirés de structures présentes dans des bactéries et isolées par Balskus et *coll.*¹⁴⁸ en 2015 (composés **20** et **21**, figure 29). Nous avons donc choisi d'utiliser un **cœur aromatique** présent dans les métabolites secondaires de certaines cyanobactéries en espérant que cette structure augmenterait encore le pouvoir immunomodulateurs de la molécule. Ces molécules, appelées bartolosides comprennent un motif phénolique relié au minimum à un sucre par une liaison *O*- ou *C*-glycosidique, ainsi qu'à deux chaînes grasses incorporant des atomes de chlore. Les substituants du phénol correspondent donc aux différentes unités que nous souhaitons apporter à la structure de nos cibles. En se rapprochant le plus possible de cette plateforme naturelle présente chez des bactéries, nous pourrions augmenter leur détection par les cellules du système immunitaire. En effet, la présence de ces composés chez des bactéries laisse supposer qu'ils peuvent être détectés comme du non Soi par les cellules et enclencher une réponse immunitaire. La structure de la plateforme pourrait ainsi induire un effet immunopotenteur supplémentaire.

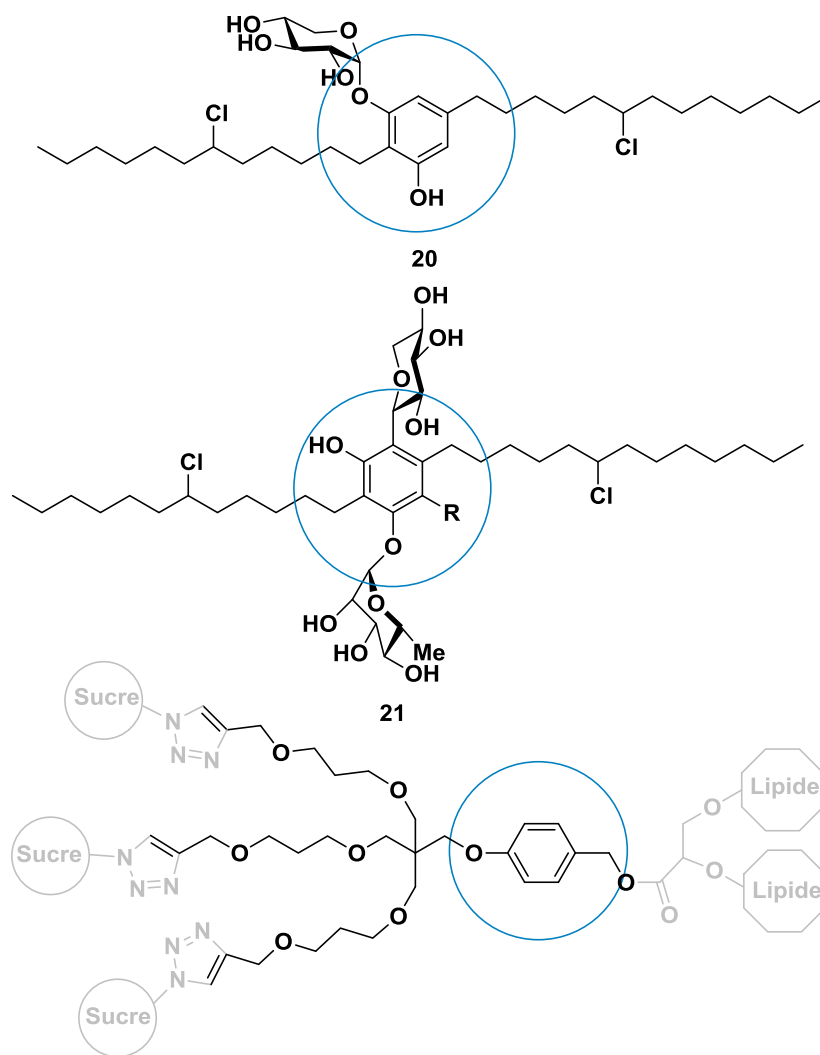


Figure 29 : Structures des métabolites secondaires isolés par Balskus et coll.¹⁴⁸ et de la molécule plateforme

Le cœur aromatique des composés cibles est lié par une liaison éther à un **bras triantenné** composé de propylène glycol. La liaison éther a été choisie dans le but de mimer la structure naturelle des métabolites décrits par Balskus. L'espaceur, élément important de la structure, doit permettre à la fois d'éloigner suffisamment les motifs sucres les uns des autres, tout en les conservant une distance compatible avec les récepteurs des cellules du système immunitaire (la distance sucre-origine du bras doit être supérieure à 2 Å).¹⁴⁹ La taille d'un motif 1,3-propylènediol assure cette condition puisqu'elle possède un diamètre de 0.533 nm.¹⁵⁰

A l'opposé du cycle aromatique, une liaison ester permet de relier la plateforme à la partie lipidique. La liaison ester a été choisie afin de mimer la structure du composé trimannosylé **9**. De plus les conditions d'une réaction d'estérification sont compatibles avec la présence des triples liaisons.

Le choix de décorer la plateforme par trois motifs saccharidiques a été fait en se basant sur les études du laboratoire précédemment citées.¹³¹ De plus, des recherches menées par Fritsch et coll.¹⁵⁵

en 2008 ont permis de mettre en évidence que des glycolipides di- et tétra-mannosylés possèdent la même affinité pour les récepteurs à mannose. Ainsi, afin de simplifier la structure, un seul motif pentaérythritol a été utilisé, permettant de synthétiser des molécules tri-antennées **22**. La triprésentation des motifs saccharidiques devrait être suffisante pour obtenir une interaction forte avec les récepteurs des cellules du système immunitaire. Néanmoins, une plus grande valence pourrait facilement être obtenue en formulant les glycolipides sous forme de liposomes, multipliant ainsi le nombre de motifs saccharidiques à interagir avec les récepteurs.

Le premier objectif de ce travail était de **synthétiser des glycolipides potentiellement immunomodulateurs**.

La synthèse des molécules a été séparée en trois grandes phases : la synthèse de la **partie sucre**, la synthèse de la **plateforme** ainsi que la synthèse de la **partie lipidique**, toutes indépendantes les unes des autres, avant d'être finalement assemblées. Comme on peut le voir sur le schéma 2, six sucres différents ont été initialement choisis pour la synthèse des molécules cibles. Parmi ces six composés, il a été décidé de se concentrer sur les mannopyranoses, permettant un ciblage des MR et les galactofuranoses pour un ciblage de DC-SIGN. Ces galactoconjugués ont été choisis, notamment pour étudier l'impact d'un ou de deux atomes de fluor sur les activités des molécules ainsi que l'influence de la taille de la partie saccharidique (mono- ou disaccharide). Pour les chaînes lipidiques, nous avons décidé de nous concentrer sur une structure mimant celle des archaeolipides avec un diéther. Les dernières étapes de la synthèse ont consisté à relier ces trois parties ensemble, tout d'abord par une réaction d'estérification entre la plateforme et la partie lipidique, puis par la formation d'un triazole *via* une réaction click entre le complexe plateforme/lipide et la partie saccharidique.

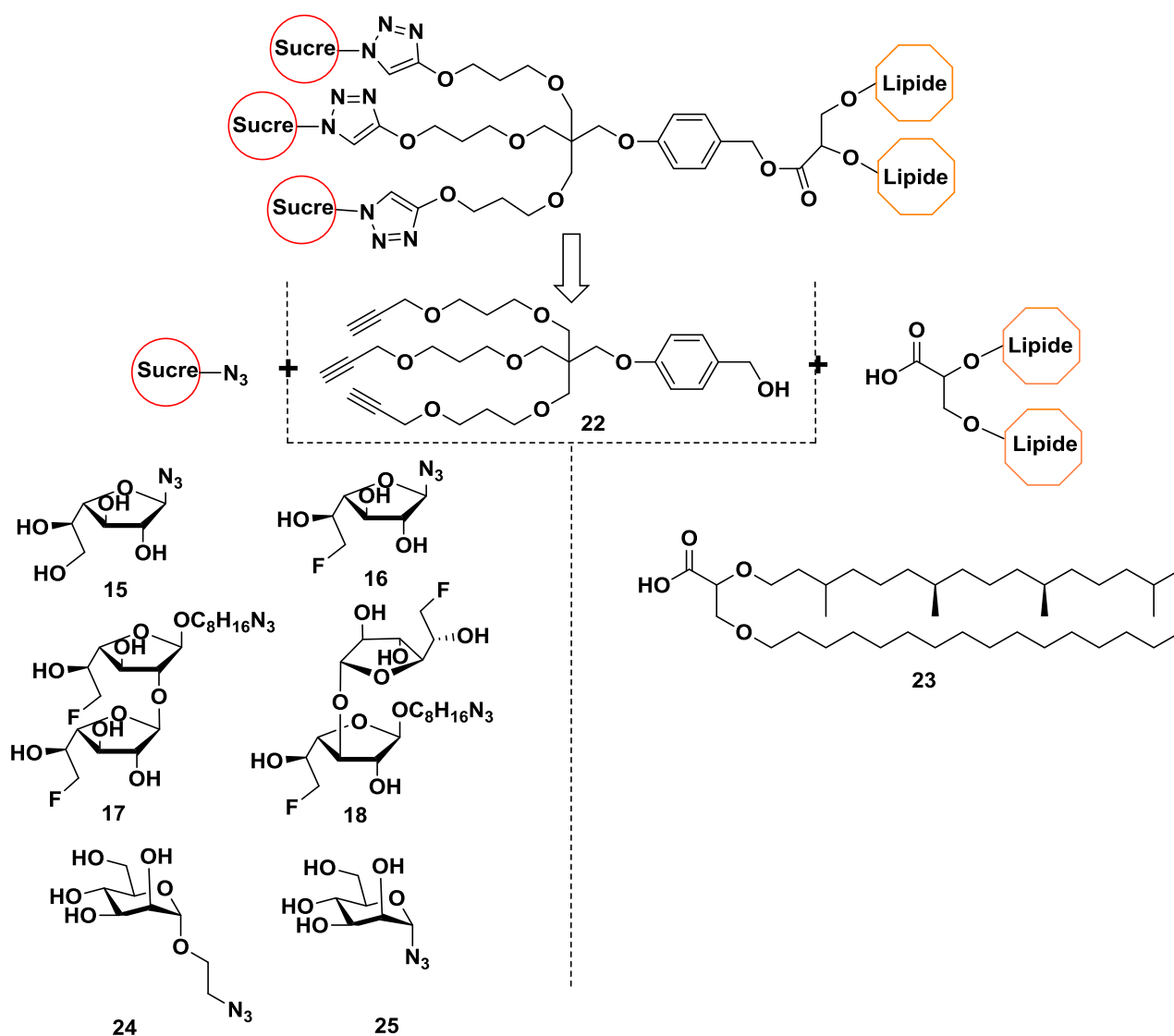


Schéma 2 : Récapitulatif de la structure des molécules cibles

L'une des molécules cibles de ce travail est présentée sur la figure 30.

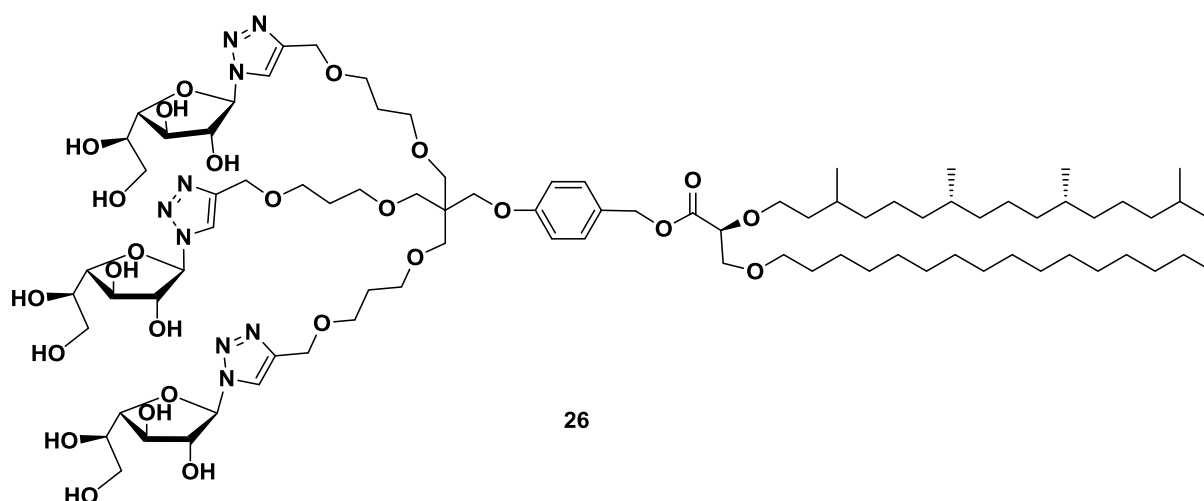


Figure 30 : Structure complète d'une des molécules cibles

5. Les tests biologiques

Le second but était de tester ces glycolipides sur des cellules du système immunitaire afin de déterminer si elles ont un rôle immunoadjuvant, immunostimulant ou même immunosuppresseur. Une comparaison des résultats obtenus peut être menée entre différents sucres (mannopyranose, galactofuranose, sucre fluoré ou non). L'étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec Karin Tarte et Joëlle Dulong de l'unité INSERM U1236, laboratoire MICMAC (Microenvironment, Cell differentiation, iMmunology And Cancer).

Références

1. Loi n° 2017-1836 du 30 décembre 2017 de financement de la sécurité sociale pour 2018, Journal officiel du 31 décembre 2017, article L3111-2 du code de la santé publique.
2. Gross, L. A Broken Trust: Lessons from the Vaccine–Autism Wars. *PLoS Biol.* **7** (2009).
3. Toxicité de l'aluminium vaccinal : l'état des connaissances scientifiques. <https://www.vaccinssansaluminium.org/approfondir/connaissances-scientifiques/>, consulté le 13/05/2019.
4. <https://vaccination-info-service.fr/Questions-frequentes/Questions-generales/Effets-indesirables-et-securite>, consulté le 19/09/2019.
5. <https://vaccination-info-service.fr/Les-maladies-et-leurs-vaccins>, consulté le 19/09/2019.
6. Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* **18**, 21–25 (2005).
7. Schijns, V. E. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 456–463 (2000).
8. Chiron, J.-P., Coursaget, P., Yvonnet, B. Philippe Maupas : inventeur du vaccin contre l'hépatite B. *Rev. Hist. Pharm.* **86**, 279–292 (1998).
9. Skwarczynski, M., Toth, I. Peptide-Based Subunit Nanovaccines. *Curr. Drug Deliv.* **8**, 282–289 (2011).
10. Burdin, N., Guy, B., Moingeon, P. Immunological Foundations to the Quest for New Vaccine Adjuvants: *BioDrugs* **18**, 79–93 (2004).
11. Lebish, I. J., Moraski, R. M. Mechanism of Immunomodulation by drugs. *Toxicologic Pathology* **15**, 338–345 (1987).
12. Lehtinen, M., Baussano, I., Paavonen, J., Vänskä, S., Dillner, J. Eradication of human papillomavirus and elimination of HPV-related diseases – scientific basis for global public health policies. *Expert Rev. Vaccines* **18**, 153–160 (2019).
13. Finn, O. J. The dawn of vaccines for cancer prevention. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 183–194 (2017).
14. Hu, Z., Ott, P. A., Wu, C. J. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 168–182 (2017).
15. Nagarathna, P. K. M., Reena, K., Sriram, R., Johnson, W. Review on Immunomodulation and Immunomodulatory Activity of Some Herbal Plants. *Int. J. Oharm. Sci. Rev. Res.* **22**, 223–230 (2013).
16. Pasquale, A., Preiss, S., Silva, F., Garçon, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* **3**, 320–343 (2015).
17. Purcell, A. W., McCluskey, J., Rossjohn, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 404–414 (2007).
18. Marcotte, H., Hammarström, L. Passive Immunization. in *Mucosal Immunology* 1403–1434 (2015).
19. Owen, J., Punt, J., Stranford, S. Immunologie, Le cours de Janis Kuby, 7ème édition. 141–480 (2013).
20. Clark, R., Kupper, T. Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 629–637 (2005).
21. Palm, N. W., Medzhitov, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 221–233 (2009).
22. Chang, Z.-L. Recent development of the mononuclear phagocyte system: in memory of Metchnikoff and Ehrlich on the 100th Anniversary of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biol. Cell* **101**, 709–721 (2009).

23. Kwak, J.-Y., Mamura, M., Barlic-Dicen, J., Grage-Griebenow, E. Pathophysiological Roles of Cytokine-Chemokine Immune Network. *J. Immunol. Res.* **2014**, 1–2 (2014).
24. Marzabadi, C. H., Franck, R. W. Small-Molecule Carbohydrate-Based Immunostimulants. *Chem. - Eur. J.* **23**, 1728–1742 (2017).
25. Mellman, I., Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255–258 (2001).
26. Sioud, M., Skorstad, G., Mobergslien, A., Sæbøe-Larsen, S. A novel peptide carrier for efficient targeting of antigens and nucleic acids to dendritic cells. *FASEB J.* **27**, 3272–3283 (2013).
27. British Society for Immunology. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/cd8-t-cells>, consulté le 03/10/2017.
28. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., Xia, B. CD4 + T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–12 (2012).
29. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. B-cell activation by armed helper T cells. (2001).
30. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–797 (2010).
31. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. The complement system and innate immunity. (2001).
32. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11–22 (2004).
33. Hollmig, S. T., Ariizumi, K., Cruz, P. D. Recognition of non-self-polysaccharides by C-type lectin receptors dectin-1 and dectin-2. *Glycobiology* **19**, 568–575 (2009).
34. Chlubnová, I. Chemo-Enzymatic synthesis of bioactive furanosyl containing glycoconjugates. (2010).
35. Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* **30**, 23–32 (2009).
36. Geijtenbeek, T. B., den Dunnen, J., Gringhuis, S. I. Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol.* **4**, 879–890 (2009).
37. Kaufmann, S. H. E. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 491–504 (2007).
38. <https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-lymphocytes-b.html>, consulté le 28/08/2019.
39. Yin, M., Ochs, R. S. Mechanism for the paradoxical inhibition and stimulation of calcineurin by the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506). *Arch. Biochem. Biophys.* **419**, 207–213 (2003).
40. <https://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-lymphocytes-t.html>, consulté le 28/08/2019.
41. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., Jordan, M. S. T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
42. <http://www.sliderbase.com/spitem-1464-4.html>, consulté le 28/08/2019.
43. Stewart, J. M., Keselowsky, B. G. Combinatorial drug delivery approaches for immunomodulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **114**, 161–174 (2017).
44. Jia, Y., Akache, B., Deschatelets, L., Qian, H., Dudani, R., Harrison, A., Stark, F., Chandan, V., Jamshidi, M., KrishnanL., McCluskie, M. A comparison of the immune responses induced by antigens in three different archaeosome-based vaccine formulations. *Int. J. Pharm.* **561**, 187–196 (2019).

45. Ribeiro, C. M. S., Schijns, V. E. J. C. Immunology of Vaccine Adjuvants. *Vaccine Adjuvants*, **626**, 1–14 (2010).
46. Schinjs, V. E. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Currunt Opinion in Immunology*, **12**, 456–463 (2000).
47. Çağdaş, M., Sezer, A. D., Bucak, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, (2014).
48. Felnerova, D., Viret, J.-F., Glück, R., Moser, C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 518–529 (2004).
49. Singh, N., Gautam, S., Kumari, N., Kaur, R., Kaur, M. Virosomes as Novel drug delivery System: An Overview. *PharmaTutor* **5**, 47–55 (2017).
50. Koh, A., Gross, R. Molecular editing of sophorolipids by esterification of lipid moieties: Effects on interfacial properties at paraffin and synthetic crude oil-water interfaces. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **507**, 170–181 (2016).
51. Lourith, N., Kanlayavattanukul, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Int. J. Cosmet. Sci.* **31**, 255–261 (2009).
52. Jiménez-Peñalver, P., Castillejos, M., Koh, A., Gross, R., Sánchez, A., Font, X., Gea, T. Production and characterization of sophorolipids from stearic acid by solid-state fermentation, a cleaner alternative to chemical surfactants. *J. Clean. Prod.* **172**, 2735–2747 (2018).
53. Zheng, M., Ahuja, M., Bhattacharya, D., Clement, T., Hayworth, J., Dhanasekaran, M. Evaluation of differential cytotoxic effects of the oil spill dispersant Corexit 9500. *Life Sci.* **95**, 108–117 (2014).
54. Schofield, M., Renga, T., Gross, R. Modified sophorolipids for the inhibition of plant pathogens, US20130085067A1 (2012).
55. Sen, S., Borah, S. N., Bora, A., Deka, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microb. Cell Factories* **16**, 95 (2017).
56. Mnif, I., Ellouz-Chaabouni, S., Ghribi, D. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. *J. Polym. Environ.* **26**, 2192–2206 (2018).
57. Deb, M., Mandal, N., Sathiavelu, M., Arunachalam, S. Application and future aspects of microbial biosurfactants - review. *RJPBCS* **7**, 2803–2812 (2016).
58. Furukawa, K., Ohkawa, K., Yamauchi, Y., Hamamura, K., Ohmi, Y. Fine tuning of cell signals by glycosylation. *J. Biochem.* **151**, 573–578 (2012).
59. Tsuji, S., Uehori, J., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Matsuhisa, A., Toyoshima, K., Seya, T. Human Intelectin Is a Novel Soluble Lectin That Recognizes Galactofuranose in Carbohydrate Chains of Bacterial Cell Wall. *J. Biol. Chem.* **276**, 23456–23463 (2001).
60. Whitman, C. M., Bond, M. R., Kohler, J. J. Chemical Glycobiology. in *Comprehensive Natural Products*, 175–224 (2010).
61. Deng, S., Bai, L., Reboulet, R., Matthew, R., Engler, D., Teyton, L., Bendelac, A., Savage, P. A peptide-free, liposome-based oligosaccharide vaccine, adjuvanted with a natural killer T cell antigen, generates robust antibody responses in vivo. *Chem Sci* **5**, 1437–1441 (2014).
62. Stallforth, P., Lepenies, B., Adibekian, A., Seeberger, P. H. Carbohydrates: A Frontier in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **52**, 5561–5577 (2009).
63. Engering, A., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E., Lanzavecchia, A., Pieters, J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2417–2425 (1997).

64. Tan, M., Mommaas, A., Drijfhout, J., Jordens, R., Onderwater, J., Verwoerd, D., Mulder, A., van der Heiden, A., Scheidegger, D., Oomen, L., Ottenhoff, T., Tulp, A., Neefjes, J., Koning, F. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2426–2435 (1997).
65. Zhang, W., An, M., Xi, J., Liu, H. Targeting CpG Adjuvant to Lymph Node via Dextran Conjugate Enhances Antitumor Immunotherapy. *Bioconjug. Chem.* **28**, 1993–2000 (2017).
66. Xu, X., Jin, Z., Liu, Y., Gong, H., Sun, Q., Zhang, W., Zhao, L. Carbohydrate-based adjuvants activate tumor-specific Th1 and CD8+ T-cell responses and reduce the immunosuppressive activity of MDSCs. *Cancer Lett.* **440–441**, 94–105 (2019).
67. Sedaghat, B., Stephenson, R., Giddam, A., Eskandari, S., Apte, S., Pattinson, D., Doolan, D., Toth, I. Synthesis of Mannosylated Lipopeptides with Receptor Targeting Properties. *Bioconjug. Chem.* **27**, 533–548 (2016).
68. Gao, J., Chen, P., Singh, Y., Zhang, X., Szekely, Z., Stein, S., Sinko, P. Novel Monodisperse PEGtide Dendrons: Design, Fabrication, and Evaluation of Mannose Receptor-Mediated Macrophage Targeting. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1332–1344 (2013).
69. Descroix, K., Ferrieres, V., Jamois, F., Yvin, J.-C., Plusquellec, D. Recent Progress in the Field of beta-(1,3)-Glucans and New Applications. *Mini-Rev. Med. Chem.* **6**, 1341–1349 (2006).
70. Legentil, L., Paris, F., Ballet, C., Trouvelot, S., Daire, X., Vetvicka, V., Ferrières, V. Molecular Interactions of β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glucans with Their Receptors. *Molecules* **20**, 9745–9766 (2015).
71. Kogan, G. (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. in *Studies in Natural Products Chemistry* vol. 23 107–152 (Elsevier, 2000).
72. Brown, G. D., Gordon, S. Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity* **19**, 311–315 (2003).
73. Tanaka, H., Kawai, T., Adachi, Y., Hanashima, S., Yamagushi, Y., Ohno, N., Takahashi, T. Synthesis of β (1,3) oligoglucans exhibiting a Dectin-1 binding affinity and their biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 3898–3914 (2012).
74. Herre, J. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Mol. Immunol.* **40**, 869–876 (2004).
75. Chan, G. C.-F., Chan, W. K., Sze, D. M.-Y. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* **2**, 25 (2009).
76. Xiang, D., Sharma, V. R., Freter, C. E., Yan, J. Anti-Tumor Monoclonal Antibodies in Conjunction with β -Glucans: A Novel Anti- Cancer Immunotherapy. *Curr. Med. Chem.* **19**, 4298–4305 (2012).
77. Sylla, B., Legentil, L., Saraswat-Ohri, S., Vashishta, A., Daniellou, R., Wang, H., Vetvicka, V., Ferrières, V. Oligo- β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans: Impact of Thio-Bridges on Immunostimulating Activities and the Development of Cancer Stem Cells. *J. Med. Chem.* **57**, 8280–8292 (2014).
78. Tacke, P. J., ter Huurne, M., Torensma, R., Figdor, C. G. Antibodies and carbohydrate ligands binding to DC-SIGN differentially modulate receptor trafficking: Antigen processing. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1989–1998 (2012).
79. Adams, E. W., Ratner, D. M., Seeberger, P. H., Hacohen, N. Carbohydrate-Mediated Targeting of Antigen to Dendritic Cells Leads to Enhanced Presentation of Antigen to T Cells. *ChemBioChem* **9**, 294–303 (2008).
80. Geurtsen, J., Driessen, N. N., Appelmelk, B. J. Mannose–fucose recognition by DC-SIGN. in *Microbial Glycobiology* 673–695 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-374546-0.00034-1.

81. Yuriev, E., Farrugia, W., Scott, A. M., Ramsland, P. A. Three-dimensional structures of carbohydrate determinants of Lewis system antigens: Implications for effective antibody targeting of cancer. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 709–717 (2005).
82. Poiroux, G., Barre, A., van Damme, E., Benoist, H., Rougé, P. Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1232 (2017).
83. Timpano, G., Tabarano, G., Anderluh, M., Invernizzi, D., Vasile, F., Potenza, D., Nieto, P., Rojo, J., Fieschi, F., Bernardi, A. Synthesis of Novel DC-SIGN Ligands with an α -Fucosylamide Anchor. *ChemBioChem* **9**, 1921–1930 (2008).
84. Andreini, M., Doknic, D., Sutkeviciute, I., Reina, J., Duan, J., Chabrol, E., Thepaut, M., Moroni, E., Doro, F., Belvisi, L., Weiser, J., Rojo, J., Fieschi, F., Bernardi, A. Second generation of fucose-based DC-SIGN ligands : affinity improvement and specificity versus Langerin. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 5778 (2011).
85. Peltier, P., Euzen, R., Daniellou, R., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V. Recent knowledge and innovations related to hexofuranosides: structure, synthesis and applications. *Carbohydr. Res.* **343**, 1897–1923 (2008).
86. Brennan, P. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **83**, 91–97 (2003).
87. Nigou, J. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* **85**, 153–166 (2003).
88. Leelayuwapan, H., Ruchirawat, S., Boonyarattanakalin, S. Rapid synthesis and immunogenicity of mycobacterial (1 $\rightarrow$ 5)- α -d-arabinofuranan. *Carbohydr. Polym.* **206**, 262–272 (2019).
89. Cabezas, Y., Legentil, L., Robert-Gangneux, F., Daligault, F., Belaz, S., Nugier-Chauvin, C., Tranchimand, S., Tellier, C., Gangneux, J., Ferrières, V. Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 8393–8404 (2015).
90. Dureau, R., Robert-Gangneux, F., Gangneux, J., Nugier-Chauvin, C., Legentil, L., Daniellou, R., Ferrières, V. Synthetic UDP-furanoses inhibit the growth of the parasite *Leishmania*. *Carbohydr. Res.* **345**, 1299–1305 (2010).
91. Marino, C., Rinflerch, A., de Lederkremer, R. M. Galactofuranose antigens, a target for diagnosis of fungal infections in humans. *Future Sci. OA* **3**, FSO199 (2017).
92. Perera, N., Yang, F., Lu, Y., Li, L., Hua, K., Wu, S. *Antrodia cinnamomea* Galactomannan Elicits Immuno-stimulatory Activity Through Toll-like Receptor 4. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 1378–1388 (2018).
93. Chlubnová, I., Filipp, D., Spiwok, V., Dvořáková, H., Daniellou, R., Nugier-Chauvin, C., Králová, B., Ferrières, V. Enzymatic synthesis of oligo-d-galactofuranosides and l-arabinofuranosides: from molecular dynamics to immunological assays. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 2092 (2010).
94. Tsuji, S., Yamashita, M., Hoffman, D., Nishiyama, A., Shinohara, T., Ohtsu, T., Shibata, Y. Capture of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin by intelectin-1 deposited on cell surfaces. *Glycobiology* **19**, 518–526 (2009).
95. Chiodo, F., Marradi, M., Park, J., Ram, A., Penadés, S., van Die, I., Tefsen, B. Galactofuranose-Coated Gold Nanoparticles Elicit a Pro-inflammatory Response in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Are Recognized by DC-SIGN. *ACS Chem. Biol.* **9**, 383–389 (2014).
96. Pizzuto, M., Bigey, P., Lachgès, A., Hoffmann, C., Ruyschaert, J., Escriou, V., Lonz, C. Cationic lipids as one-component vaccine adjuvants: A promising alternative to alum. *J. Controlled Release* **287**, 67–77 (2018).
97. Moody, D. B. How T cells grasp mycobacterial lipid antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 13312–13314 (2017).

98. Vasievich, E. A., Chen, W., Huang, L. Enantiospecific adjuvant activity of cationic lipid DOTAP in cancer vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 629–638 (2011).
99. Yan, W., Chen, W., Huang, L. Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: Phosphorylation of a MAP kinase, ERK and induction of chemokines. *Mol. Immunol.* **44**, 3672–3681 (2007).
100. Moyle, P., Dai, W., Zhang, Y., Batzloff, M., Good, M., Toth, I. Site-Specific Incorporation of Three Toll-Like Receptor 2 Targeting Adjuvants into Semisynthetic, Molecularly Defined Nanoparticles: Application to Group A Streptococcal Vaccines. *Bioconjug. Chem.* **25**, 965–978 (2014).
101. Hussein, W., Liu, T., Maruthayanar, P., Mukaida, S., Moyle, P., Wells, J., Toth, I., Skarczynski, M. Double conjugation strategy to incorporate lipid adjuvants into multiantigenic vaccines. *Chem Sci* **7**, 2308–2321 (2016).
102. Toth, I., Moyle, P., Simerska, P., Fujita, Y., Olive, C., Good, M. Vaccine Delivery: Synthesis and Investigation of a Highly Pure, Multi-Epitopic Lipopeptide Vaccine Candidate. *Peptides for Youth* **611**, 347–349 (2009).
103. Sasaki, S., Fukushima, J., Arai, H., Kusakabe, K., Hamajima, K., Ishii, N., Hirahara, F., Okuda, K., Kawamoto, S., Ruyschaert, J., Vanderbranden, M., Wahren, B., Okuda, K. Human immunodeficiency virus type-1-specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3121–3129 (1997).
104. Wilmar, A., Lonz, C., Vermeersch, M., Andrianne, M., Pérez-Morga, D., Ruyschaert, J., Vanderbranden, M., Leo, O., Temmerman, S. The cationic lipid, diC14 amidine, extends the adjuvant properties of aluminum salts through a TLR-4- and caspase-1-independent mechanism. *Vaccine* **30**, 414–424 (2012).
105. Lonz, C., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J.-M. Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling. *Prog. Lipid Res.* **47**, 340–347 (2008).
106. Ahmad, A., Khan, J. M., Haque, S. Strategies in the design of endosomolytic agents for facilitating endosomal escape in nanoparticles. *Biochimie* **160**, 61–75 (2019).
107. Schleper, C., Puhler, G., Klenk, H.-P., Zillig, W. *Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., Two Species of Hyperacidophilic, Thermophilic, Heterotrophic, Aerobic Archaea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 814–816 (1996).
108. Oger, P. M., Cario, A. Adaptation of the membrane in Archaea. *Biophys. Chem.* **183**, 42–56 (2013).
109. Benvegna, T., Brard, M., Plusquellec, D. Archaeobacteria bipolar lipid analogues: structure, synthesis and lyotropic properties. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8**, 469–479 (2004).
110. De Rosa, M., Esposito, E., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Bu'Lock, J. D. Effects of temperature on ether lipid composition of *Caldariella acidophila*. *Phytochemistry* **19**, 827–831 (1980).
111. Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Côté, J.-P., Whitfield, D. M. Adjuvant potential of archaeal synthetic glycolipid mimetics critically depends on the glyco head group structure. *Glycobiology* **18**, 559–565 (2008).
112. Pfalzgraff, A., Weindl, G. Intracellular Lipopolysaccharide Sensing as a Potential Therapeutic Target for Sepsis. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 187–197 (2019).
113. Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
114. Barker, J. H., Weiss, J. P. Detecting lipopolysaccharide in the cytosol of mammalian cells: Lessons from MD-2/TLR4. *J. Leukoc. Biol.* **106**, 127–132 (2019).

115. Steinhagen, F., Kinjo, T., Bode, C., Klinman, D. M. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* **29**, 3341–3355 (2011).
116. Zielen, S., Trischler, J., Schubert, R. Lipopolysaccharide challenge: immunological effects and safety in humans. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **11**, 409–418 (2015).
117. Sahu, K. K., Pandey, R. S. Immunological evaluation of colonic delivered Hepatitis B surface antigen loaded TLR-4 agonist modified solid fat nanoparticles. *Int. Immunopharmacol.* **39**, 343–352 (2016).
118. Buffa, V., Klein, K., Fischetti, L., Shattock, R. J. Evaluation of TLR Agonists as Potential Mucosal Adjuvants for HIV gp140 and Tetanus Toxoid in Mice. *PLoS ONE* **7**, e50529 (2012).
119. Dong, W., Bhidé, Y., Marsman, S., Holtrop, M., Meijerhof, T., de Vries-Idema, J., de Hanns, A., Hurickriede, A. Monophosphoryl Lipid A-Adjuvanted Virosomes with Ni-Chelating Lipids for Attachment of Conserved Viral Proteins as Cross-Protective Influenza Vaccine. *Biotechnol. J.* **13**, 1700645 (2018).
120. Reed, S. G., Hsu, F.-C., Carter, D., Orr, M. T. The science of vaccine adjuvants: advances in TLR4 ligand adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* **41**, 85–90 (2016).
121. Casella, C. R., Mitchell, T. C. Putting endotoxin to work for us: Monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3231–3240 (2008).
122. Markov, O. V., Mironova, N. L., Shmendel, E. V., Maslov, M. A., Zenkova, M. A. Systemic delivery of complexes of melanoma RNA with mannosylated liposomes activates highly efficient murine melanoma-specific cytotoxic T cells in vivo. *Mol. Biol.* **51**, 102–107 (2017).
123. Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T., Bilgicer, B. Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol.* **32**, 32–45 (2014).
124. Kojima, N., Kawauchi, Y., Ishii, M. Development of Novel Carbohydrate-Coated Liposome-Based Vaccines. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **23**, 257–271 (2011).
125. Dubey, V., Nahar, M., Mishra, D., Mishra, P., Jain, N. K. Surface structured liposomes for site specific delivery of an antiviral agent-indinavir. *J. Drug Target.* **19**, 258–269 (2011).
126. Filatova, L. Y., Klyachko, N. L., Kudryashova, E. V. Targeted delivery of anti-tuberculosis drugs to macrophages: targeting mannose receptors. *Russ. Chem. Rev.* **87**, 374–391 (2018).
127. Kang, X., wang, H., Peng, H., Chen, B., Zhang, W., Wu, A., Xu, Q., Huang, Y. Codelivery of dihydroartemisinin and doxorubicin in mannosylated liposomes for drug-resistant colon cancer therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **38**, 885–896 (2017).
128. Rathore, A., Jain, A., Gulbake, A., Shilpi, S., Khare, P., Jain, A., Jain, S. Mannosylated liposomes bearing Amphotericin B for effective management of visceral Leishmaniasis. *J. Liposome Res.* **21**, 333–340 (2011).
129. Irache, J. M., Salman, H. H., Gamazo, C., Espuelas, S. Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5**, 703–724 (2008).
130. Tandrup Schmidt, S., Foged, C., Smith Korsholm, K., Rades, T., Christensen, D. Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. *Pharmaceutics* **8**, 7 (2016).
131. Nordly, P., Madsen, H. B., Nielsen, H. M., Foged, C. Status and future prospects of lipid-based particulate delivery systems as vaccine adjuvants and their combination with immunostimulators. *Expert Opin. Drug Deliv.* **6**, 657–672 (2009).
132. Barbeau, J., Lemiègre, L., Quelen, A., Malard, V., Gao, H., Gonçalves, C., Berchel, M., Jaffrès, P., Pichan, C., Midoux, P., Benvegnu, T. Synthesis of a trimannosylated-equipped archaeal diether lipid for the development of novel glycoliposomes. *Carbohydr. Res.* **435**, 142–148 (2016).

133. Lee, Y. C., Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **28**, 321–327 (1995).
134. Kiessling, L. L., Grim, J. C. Glycopolymer probes of signal transduction. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4476 (2013).
135. Charville, H., Jin, J., Evans, C. W., Brimble, M. A., Williams, D. E. The synthesis and lectin-binding properties of novel mannose-functionalised polymers. *RSC Adv.* **3**, 15435 (2013).
136. Lundquist, J. J., Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chem. Rev.* **102**, 555–578 (2002).
137. Lee, R. T., Lee, Y. C. Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj. J.* **17**, 543–551 (2000).
138. Chlubnová, I., Králová, B., Dvořáková, H., Spiwok, V., Fillip, D., Nugier-Chauvin, C., Daniellou, R., Ferrières, V. Biocatalyzed synthesis of difuranosides and their ability to trigger production of TNF- α . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 1550–1553 (2016).
139. Cavaliere, A., Probst, K. C., Westwell, A. D., Slusarczyk, M. Fluorinated nucleosides as an important class of anticancer and antiviral agents. *Future Med. Chem.* **9**, 1809–1833 (2017).
140. Berger, A. A., Völler, J.-S., Budisa, N., Kokscho, B. Deciphering the Fluorine Code—The Many Hats Fluorine Wears in a Protein Environment. *Acc. Chem. Res.* **50**, 2093–2103 (2017).
141. Purser, S., Moore, P. R., Swallow, S., Gouverneur, V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem Soc Rev* **37**, 320–330 (2008).
142. Réthoré, G., Montier, T., Le Gall, T., Delépine, P., Cammas-Marion, S., Lemiègre, L., Lehn, P., Benvegna, T. Archaeosomes based on synthetic tetraether-like lipids as novel versatile gene delivery systems. *Chem Commun* **20**, 2054–2056 (2007).
143. Shinde, G., Kumbhani, P., Gophane, V., Bangale, G., Rajesh, K. S. Archaeosomes : modified potential liposomes (from archeal lipids). *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* **5**, 3667-3673 (2015).
144. Haq, K., Jia, Y., Krishnan, L. Archaeal lipid vaccine adjuvants for induction of cell-mediated immunity. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 1557–1566 (2016).
145. Krishnan, L., Deschatelets, L., Stark, F. C., Gurnani, K., Sprott, G. D. Archaeosome Adjuvant Overcomes Tolerance to Tumor-Associated Melanoma Antigens Inducing Protective CD8⁺ T Cell Responses. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, 1–13 (2010).
146. Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B., Sprott, G. D. The Potent Adjuvant Activity of Archaeosomes Correlates to the Recruitment and Activation of Macrophages and Dendritic Cells In Vivo. *J. Immunol.* **166**, 1885–1893 (2001).
147. Stark, F., Akache, B., Ponce, A., Dudani, R., Deschaetelets, L., Jia, Y., Sauvageau, J., Williams, D., Jamshidi, M., Agbayani, G. Archaeal glycolipid adjuvanted vaccines induce strong influenza-specific immune responses through direct immunization in young and aged mice or through passive maternal immunization. *Vaccine* (2019).
148. Leão, P., Nakamura, H., Costa, M., Pereira, A., Martins, R., Vasconcelos, V., Gerwick, W., Balskus, E. Biosynthesis-Assisted Structural Elucidation of the Bartolosides, Chlorinated Aromatic Glycolipids from Cyanobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 11063–11067 (2015).
149. Bock, K., Arnarp, J., Lonngrén, J. The Preferred Conformation of Oligosaccharides Derived from the Complex-Type Carbohydrate Portions of Glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **129**, 171–178 (1982).
150. Marcus, Y. *The properties of solvents*. (1998).
151. Reina, J. J., Rojo, J. Glycodendritic structures: tools to interact with DC-SIGN. *Braz. J. Pharm. Sci.* **49**, 109–124 (2013).

152. Sattin, S., Daggetti, A., Thépaut, M., Berzi, A., Sánchez-Navarro, M., Tabarani, G., Rojo, J., Frieschi, F., Clerici, M., Bernadi, A. Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV Infection by a Linear Trimannoside Mimic in a Tetravalent Presentation. *ACS Chem. Biol.* **5**, 301–312 (2010).
153. Bhatia, S., Dimde, M., Haag, R. Multivalent glycoconjugates as vaccines and potential drug candidates. *Med Chem Commun* **5**, 862–878 (2014).
154. Lu, W., Du, W., Somovilla, V., Yu, G., Haksar, D., De Vries, E., Boons, G., de Vries, R., De Haans, C., Pieters, R. Enhanced Inhibition of Influenza A Virus Adhesion by Di- and Trivalent Hemagglutinin Inhibitors. *J. Med. Chem.* **62**, 6398–6404 (2019).
155. Espuelas, S., Thumann, C., Heurtault, B., Schuber, F., Frisch, B. Influence of Ligand Valency on the Targeting of Immature Human Dendritic Cells by Mannosylated Liposomes. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2385–2393 (2008).

Chapitre 2 : Synthèse des parties saccharidiques

Chapitre 2 : Synthèse des parties saccharidiques

Comme décrit dans le chapitre précédent, la structure des différentes molécules cibles peut se diviser en trois parties distinctes et indépendantes les unes des autres : une partie saccharidique, une partie lipidique et une partie plateforme (figure 31). La synthèse se veut la plus convergente possible afin de pouvoir modifier chaque domaine et ainsi accéder à une librairie de composés.

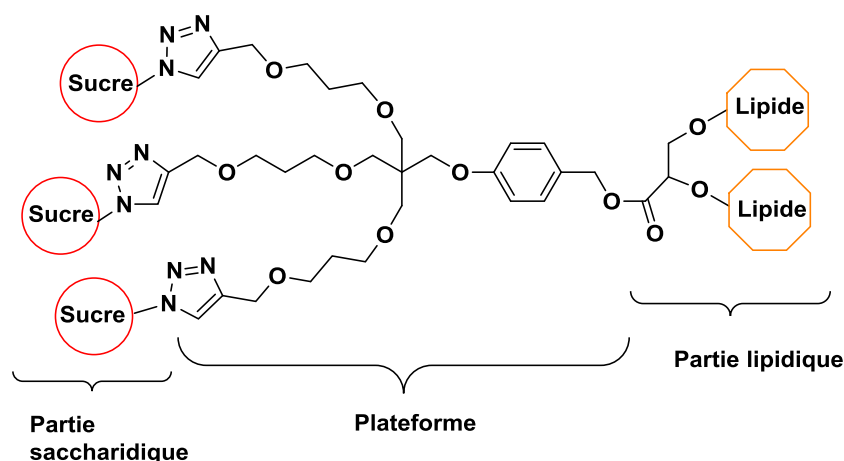


Figure 31 : Structure des molécules à synthétiser

La plateforme est la seule des trois parties à rester constante, aucune modulation n'a été envisagée à ce stade du projet. Plusieurs lipides ont été considérés, sur la base de structures lipidiques d'Archaea (diéthers dont les chaînes carbonées sont ramifiées). Enfin, plusieurs glycosides ont été ciblés pour leur potentiel de reconnaissance de récepteurs impliqués dans la mise en place de l'immunité. La structure globale et la stratégie développée nous ont permis de faire varier le nombre d'unités saccharidiques, la nature du sucre (D-galactose ou D-mannose) ainsi que la taille du cycle. Nous avons également considéré l'apport d'atome de fluor sur des entités galactofuranosidiques en substitution d'un groupement hydroxyle.

Dans cette première partie, nous aborderons la synthèse des différents saccharides envisagés pour la conception des molécules cibles. Quelques rappels sur la synthèse glycosidique seront tout d'abord présentés avec une attention particulière portée à la synthèse des furanosides. Puis, les stratégies de synthèse mises en œuvre pour synthétiser les différents composés seront exposées, ainsi que les résultats que nous avons obtenus.

I Rappels sur la synthèse glycosidique

Dans la Nature, les sucres libres sont présents sous cinq formes différentes, **anomères** et tautomères (figure 32) : une acyclique, deux cycliques à 6 chaînons (α et β pyranoses) et deux cycliques à 5 chaînons (α et β furanoses).

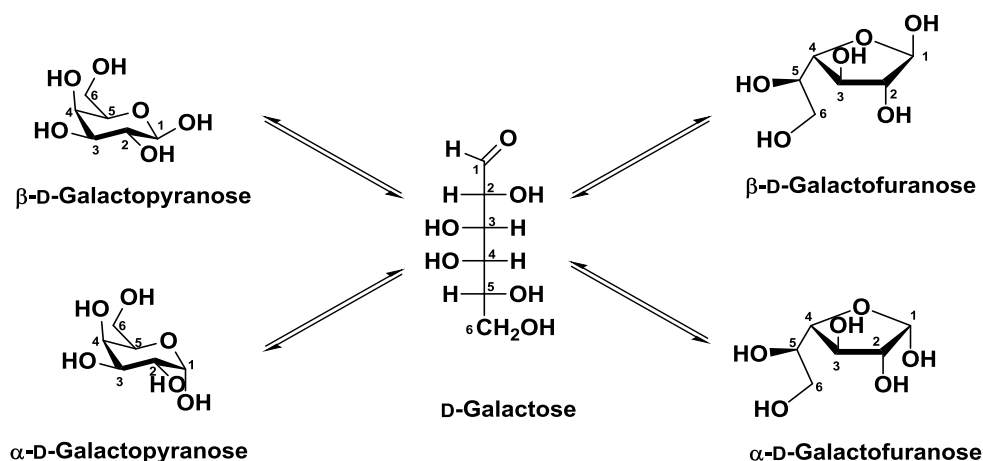


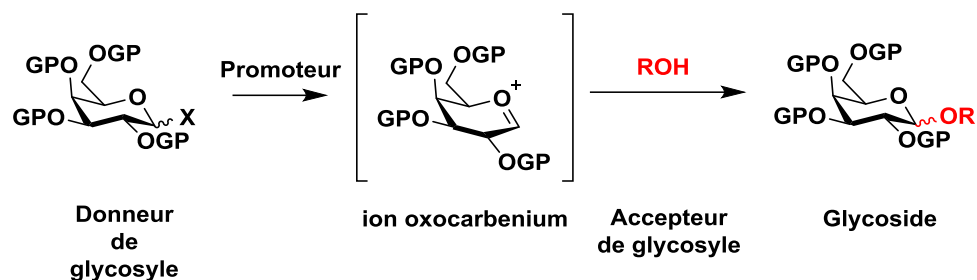
Figure 32 : Représentation des formes anomères et tautomères du D-galactose

Un des challenges de la synthèse de glycosides est d'obtenir la forme souhaitée du produit synthétisé. Dans le cas des hexoses, les pyranosides sont les produits thermodynamiques, les furanosides les composés cinétiques.

1) Généralités

Les réactions de glycosylation (tableau 2) font intervenir une espèce électrophile, le **donneur de glycosyle**, une espèce nucléophile, l'**accepteur de glycosyle**, et un **promoteur**. Le donneur est activé par un groupe partant sur sa position anomère. L'accepteur présente quant à lui un groupement nucléophile, un OH dans le cas des *O*-glycosylations, mais cela peut également être une amine, un thiol ou un carbone. Le promoteur, présentant un caractère acide de Lewis, permet d'augmenter le caractère nucléofuge du groupe partant du donneur afin de former un intermédiaire électrodéficient appelé ion oxocarbenium. L'accepteur peut ainsi attaquer la position électrophile du donneur et former la **liaison glycosidique**. Le promoteur choisi est donc dépendant du type de donneur utilisé. Plusieurs couples donneur/promoteur ont ainsi pu être identifiés (liste de quelques couples dans le tableau 2).¹

Tableau 2 : Exemples de couples donneur/promoteur



GP: Groupe protecteur

Groupe partant (X)	Promoteur	
Br	AgOTf, Ag ₂ O, Ag ₂ CO ₃ , Hg ₂ Br ₂ , Hg ₂ (CN) ₂	Tf : Triflyle HMDS : Bis(triméthylsilyl)amidure TBA : Tétrabutylammonium DIPEA : Diisopropyléthylamine Ac : Acétyle NIS : <i>N</i> -iodosucinimide BSP : Bromosulfoptaléine DMTST : Diméthyl(méthylthio)sulfonium tétrafluoroborate DTBMP : 2,6-Di-tert-butyl-4-méthylpyridine
I	KHMDS, TBAI/DIPEA	
OCNHCCl ₃	TMSOTf, BF ₃ .OEt ₂	
OAc	TMSOTf, BF ₃ .OEt ₂ , SnCl ₄	
SR	NIS/AgOTf, NIS/TMSOTf, BSP/Tf ₂ O, DMTST	
S(O)R	Tf ₂ O/DTBMP	
OPO(OR) ₂	TMSOTf, BF ₃ .OEt ₂	

L'accepteur doit posséder au moins une fonction nucléophile. Les autres positions sont, le plus souvent, protégées afin de limiter au maximum le nombre de produits secondaires. Outre leur rôle de protections des hydroxyles, les groupes protecteurs peuvent également influencer la stéréochimie du composé formé, on parle alors de **groupes participants**, à l'inverse des groupes non participants. Lors d'une réaction de glycosylation, une fois le carbone anomère activé par le départ du groupe nucléofuge, l'ion oxocarbenium formé peut être attaqué par la face supérieure ou par la face inférieure. Lorsque le groupe protecteur en C-2 est non participant, l'effet anomère favorise la formation du composé *1,2-cis*, plus stable thermodynamiquement. Dans le cas d'un groupement participant, l'ion oxocarbenium peut être stabilisé par assistance anchimérique par le groupe protecteur en O-2. Cette assistance par un groupe participant guide l'entrée du nucléophile par la face opposée et assure ainsi la formation d'une liaison glycosidique *1,2-trans*. Par exemple, un ester en position 2 forme une espèce de type **acyloxonium** (schéma 3-A). Diverses alternatives ont également été développées pour assurer la sélectivité de la formation de glycosides. L'une d'entre elles consiste à greffer un groupement stéréodirecteur en position 6. Demchenko et coll.² ont ainsi obtenu des composés *syn* (*1,2-trans*) grâce à l'action du groupement picolinyle. L'atome d'azote forme une liaison hydrogène avec le donneur, favorisant la réaction par la face supérieure du sucre. Ils ont nommé cet effet le HAD pour H-bond-mediated aglycon delivery, ou la délivrance d'aglycone

induite par liaison hydrogène (schéma 3-B). D'autres études ont tiré profit de l'encombrement stérique comme un avantage pour bloquer l'accès à une des faces du sucre et ainsi favoriser une des deux configurations.³ D'autres groupements protecteurs peuvent influencer la réactivité des espèces. Ainsi, l'utilisation de groupements donneurs d'électrons, stabilisant l'ion oxocarbenium (tableau 2) permet de favoriser la réaction glycosidique. Fraiser-Reid et coll.⁴ ont démontré que des donneurs armés peuvent être sélectivement activés en présence de donneurs désarmés, possédant donc des groupements protecteurs électroattracteurs.

Les solvants utilisés lors des réactions de glycosylation peuvent également jouer un rôle stéréodirecteur.⁵ Généralement, les solvants polaires favorisent la formation de glycosides β , et les peu polaires des glycosides α . Mais les solvants peuvent avoir un rôle participant, dans le cas de l'acétonitrile, l'ion nitrilium formé *in situ* s'oriente uniquement en axial, ce qui force l'attaque nucléophile en position équatoriale. L'éther diéthylique se positionne essentiellement en position équatoriale, ce qui mène à la formation d'un composé α (schéma 3-C).

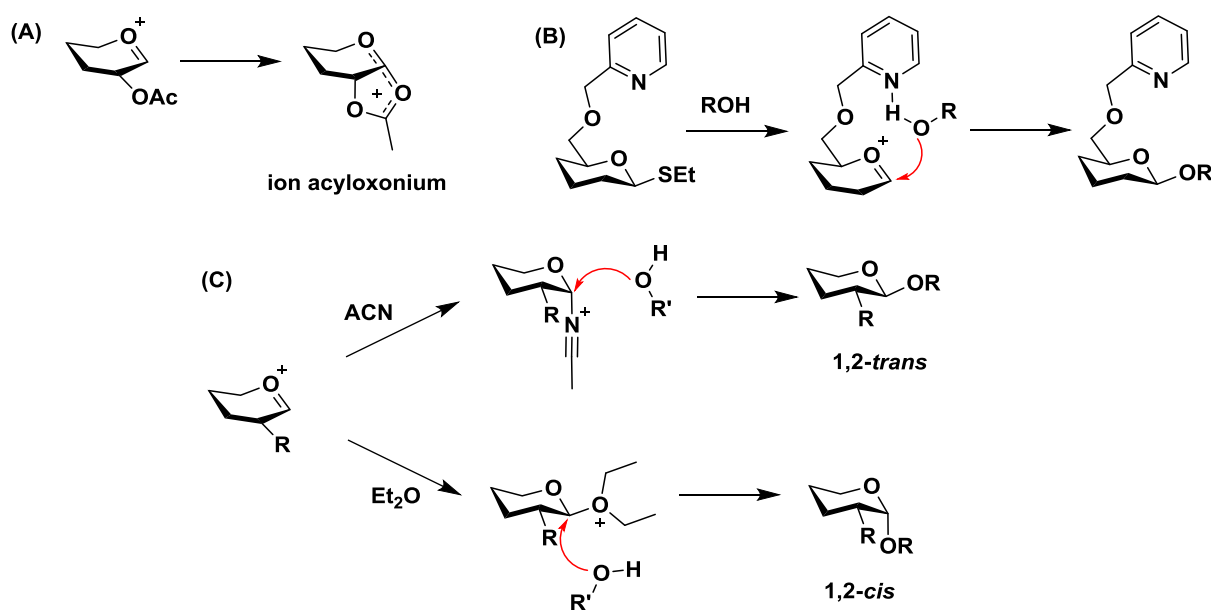


Schéma 3 : Moyens de contrôle de la stéréochimie d'une réaction de glycosylation par (A) l'utilisation de groupe participant, (B) HAD, (C) effet de solvant

2) Focus sur la synthèse des furanosides

Les furanoses ne représentent qu'une faible proportion de l'équilibre isomérique des sucres en solution.⁶ Un cycle à 5 chaînons n'est pas la forme thermodynamiquement favorisée par comparaison à un cycle à 6, ce qui implique de devoir se placer dans des conditions qui favorisent l'obtention de ce produit. Une fois le cycle figé sous la forme requise, les réactions de glycosylation

répondent aux mêmes conditions que celles décrites pour les pyranoses (tableau 2 et schéma 3). Par conséquent, le premier défi de la synthèse de composés furanosidiques est l'obtention du cycle à 5 chaînons.

a) Acylation à haute température

Les formes furanoses peuvent être obtenues en une étape à partir des sucres libres. En 1951, Ness et coll.⁷ ont décrit la synthèse du β -D-galactofuranose pentaacétylé avec un rendement de 17% à partir de D-galactose et d'anhydride acétique en présence de pyridine à reflux (schéma 4). Trente-deux ans plus tard, D'Accorso et coll.⁸ ont observé la formation d'un mélange α/β de galactofuranose pentabenzoylé (schéma 4). Le sucre libre a été solubilisé dans de la pyridine à 100 °C pendant une heure avant d'y ajouter du chlorure de benzoyle à 60 °C (rendement de 77% avant séparation des deux anomères). Ces deux voies de synthèse ont permis d'accéder à des composés furanosidiques totalement protégés en une étape unique. Cependant, la forme pyranose a été également obtenue lors de ces synthèses (proportions non précisées dans la littérature). La séparation entre composés pyranoses et furanoses, puis par la suite entre les deux anomères, peut être délicate, entraînant une chute du rendement. De plus, cette approche ne semble être efficace qu'à partir du D-galactose.



Schéma 4 : Formation de galactofuranosides par acylation à haute température

b) Silylation

Lee et coll.⁹ ont décrit en 1995 une nouvelle voie d'accès aux arabinofuranoses en passant par un intermédiaire totalement silylé. Pour cela, ils ont placé le D-arabinose en solution dans le DMF avec du chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle (TBSCl) et un excès d'imidazole pendant 2 heures à 70 °C. Le composé souhaité a été isolé par cristallisation avec un rendement de 65% (schéma 5).

En 2008, Baldoni et Marino¹⁰ ont repris cette voie de synthèse pour former des galactofuranoses. De la même manière que Lee, la réaction a lieu dans un mélange DMF/pyridine (préalablement chauffé à 100 °C pendant 2 heures) avant l'ajout d'imidazole et de TBSCl à 80 °C. Il se forme le 1,2,3,5,6-penta-*O*-*t*-butyldiméthylsilyl- β -D-galactofuranose avec un rendement de 79% après 3 heures de réaction. Des études menées au sein du laboratoire ont démontré que le choix du groupement silylé joue un rôle primordial dans l'obtention du cycle furanosidique. En effet, l'utilisation de groupements

moins encombrants tel que le triméthylsilyl ou le triisopropylsilyl a mené à la synthèse de pyranoses.¹¹

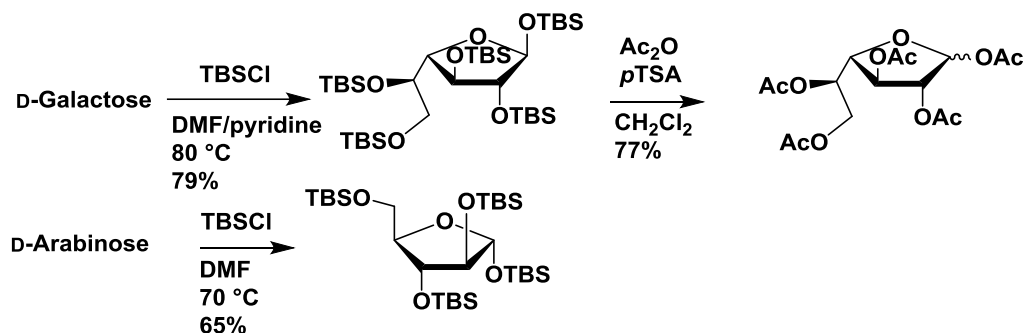


Schéma 5 : Formation de furanoses par silylation

Les composés silylés sont facilement convertibles en dérivés acétylés (anhydride acétique et acide *p*-toluène sulfonique en excès). Cette voie de synthèse donne donc accès à des donneurs de furanosyle en deux étapes seulement avec un rendement global de 61%. Cette méthode a pu être étendue à d'autres séries de sucres tels le L- et le D-fucose, le D-xylose, etc.¹¹ De manière générale, cette voie de synthèse ne permet pas de différencier les groupements hydroxyle pour une fonctionnalisation régiosélective. De plus, elle est efficace pour des sucres ayant des configurations relatives *trans* (Gal, Ara) mais conduit à des mélanges furano/pyrano dans les autres séries.

c) Réduction de lactone

Les furanoses peuvent également être obtenus par réduction de γ -furanolactones. Cette voie de synthèse a été mise au point par Lederkremer et coll.¹² durant les années 80. Après perbenzoylation, la réduction a été réalisée à l'aide du diisoamylborane avec un rendement de 91%. Seul le composé β a pu être isolé après cristallisation (schéma 6).¹²⁻¹⁴ Les limites de cette approche résident, d'une part, dans l'accès à une furanolactone et d'autre part dans la toxicité et le coût élevé des réducteurs de type borane. Cependant, plusieurs étapes de protections et de déprotections ont été mises en place avec cette technique afin de pouvoir, par la suite, différencier les différentes fonctions hydroxyles de la molécule.

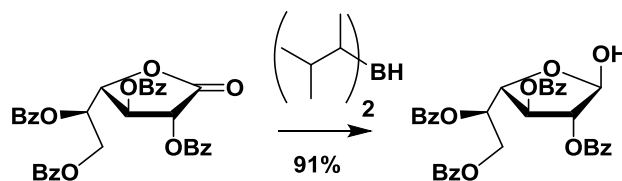


Schéma 6 : Formation de furanosides par réduction de lactone

d) Cyclisation à partir d'un dithioacétal

Cette méthode décrite durant les années 30 par Green et Pascu¹⁵ présente l'avantage de ne former que le cycle à 5 chaînons. Cependant, pour obtenir le dithioacétal, le sucre libre doit être mis en présence d'un excès de thiol et d'un acide. Ce thiol est souvent de faible masse moléculaire avec une forte pression de vapeur saturante, ce qui complique la mise en œuvre de la manipulation.¹⁶ Le dithioacétal est alors mis en réaction avec un alcool (schéma 7). La réaction peut être catalysée par un sel de mercure¹⁷ ou des agents halogénés électrophiles (iode,¹⁸ brome¹⁹). Un des avantages de cette méthode est qu'elle peut donner directement accès à des donneurs de type thioglycoside à partir du dithioacétal.²⁰

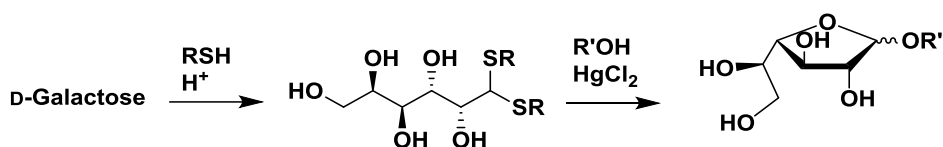


Schéma 7 : Formation de furanosides *via* un dithioacétal

e) Réarrangement pyranosides/furanosides

Récemment Nifantiev et *coll.*²¹ ont décrit un réarrangement de pyranoside en furanoside selon une méthode originale (schéma 8). Cette étude repose sur l'observation de la formation d'un sous-produit contenant un furanoside en position réductrice après la sulfatation d'un oligosaccharide uniquement pyranosidique. Le galactopyranoside d'allyle **27** a été sulfaté (SO₃.Pyr) en milieu acide fort (HOSO₂Cl, TfOH, H₂SO₄).²² Dans ces conditions seulement, le groupement sulfate en position 4 stabilise l'oxonium endocyclique **29** de sorte que la liaison O-5-C-1 est rompue. La contraction de cycle ainsi que le transfert du groupement sulfate de la position 4 à la position 5 s'opèrent ensuite quantitativement en 48 heures pour former le composé **30**. Ce protocole a pu être répété dans le cas d'entités galactoses et fucoses.

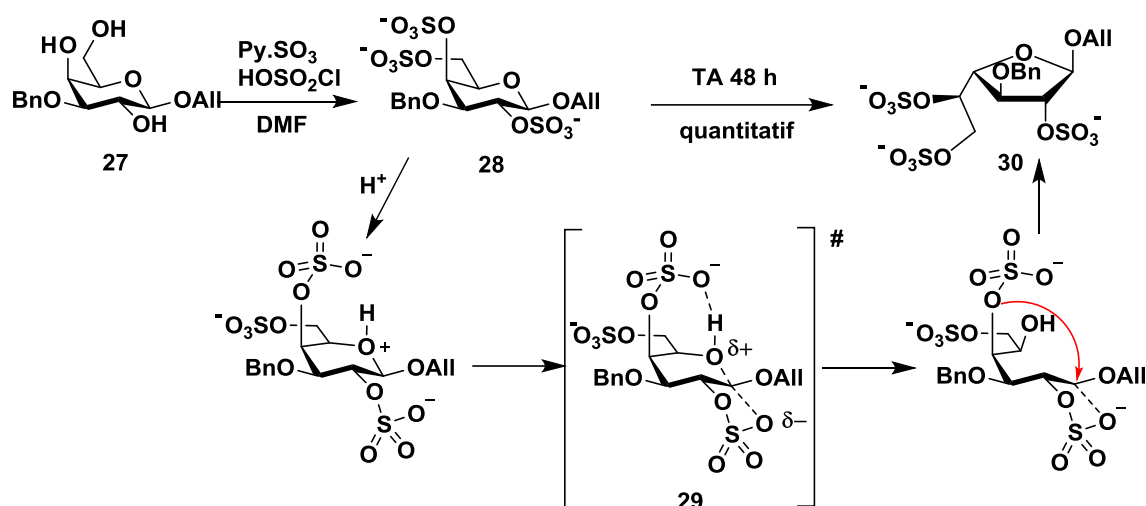


Schéma 8 : Formation de furanosides par réarrangement de pyranosides

f) Alkylation en milieu basique

Schmidt et Klotz²³ ont observé la formation d' α -D-galactofuranoside en partant du D-galactose dans la *N,N'*-diméthylpropylurée en présence d'un excès d'hydruide de sodium et de bromure d'allyle (schéma 9). Cependant, cette méthode n'a pas pu être étendue avec succès à toutes les séries sucre. Des résultats différents ont été obtenus en fonction du saccharide étudié, le glucose et le mannose n'ont permis de synthétiser que des pyranosides, l'arabinose a mené à la formation d'un mélange d' α -pyranoside et de β -furanoside d'allyle.

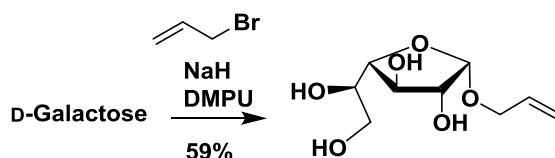


Schéma 9 : Synthèse de l' α -D-galactofuranoside par alkylation de la position anomère

g) Glycosylation de Fischer

La **glycosylation de Fischer** en milieu hétérogène et catalysée par les ions ferriques est la méthode la plus utilisée au sein de notre laboratoire.^{24,25} Elle consiste à faire réagir un alcool, en large excès dans le THF, sur un sucre libre en présence de FeCl_3 . L'apport des ions calcium, qui se complexeraient aux hydroxyles en position 5 et 6, favorise l'obtention des α - et β -furanosides (schéma 10). Cette approche s'est avérée efficace à partir de sucres neutres (glucose, galactose, mannose) et d'acides uroniques (acide galacturonique). Cette méthode est également applicable à des alcools de longueur de chaîne variée pouvant contenir une insaturation. L'intérêt pour des chaînes aliphatiques longues réside sur le fait que des composés amphiphiles, facilement extraits et/ou cristallisés sont ainsi

obtenus en une seule étape de synthèse. Par ailleurs, des travaux ultérieurs ont démontré qu'une chaîne octyle constitue un groupe protecteur intéressant du contre anomère.²⁶ Ainsi, le galactofuranoside d'alkyle est utilisé comme intermédiaire clé pour la synthèse multi-étape de petits oligosaccharides et de nucléotide-furanoses rares.

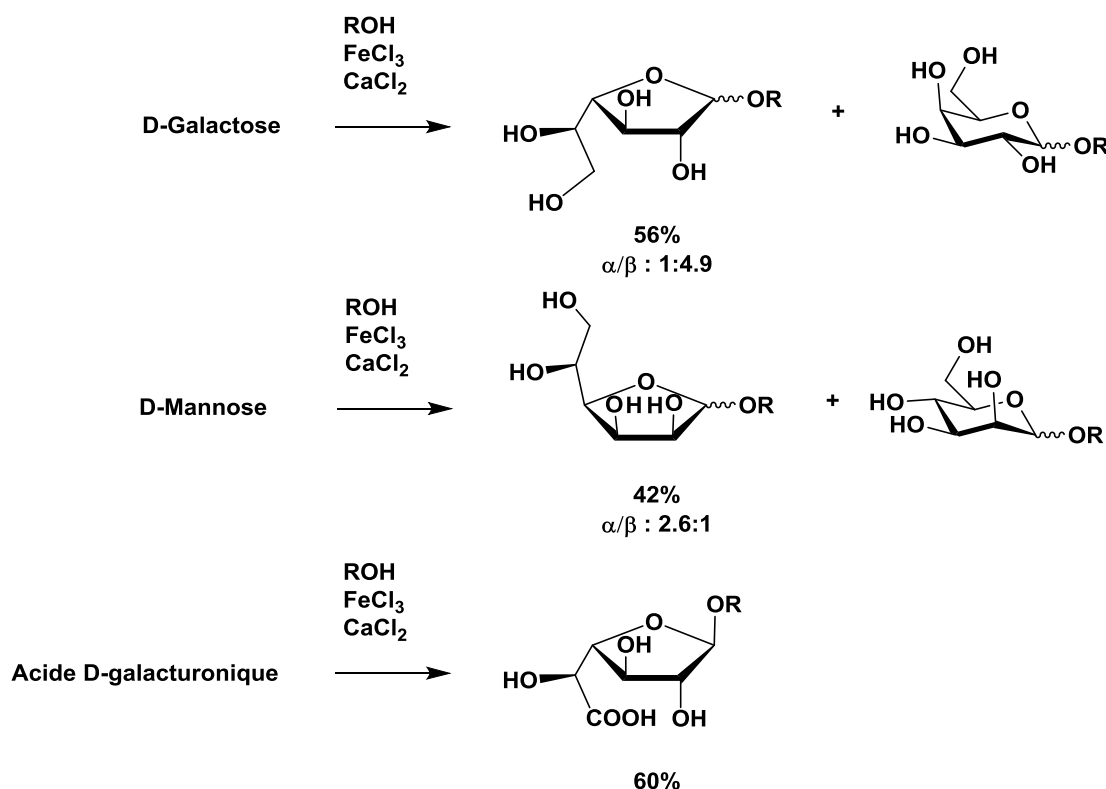


Schéma 10 : Formation de furanosides par glycosylation de Fischer

II Saccharides à synthétiser

Dans cette partie seront présentées les différentes entités glycosidiques que nous avons synthétisées dans le but de les greffer à la partie plateforme par cycloaddition 1,3-dipolaire. Afin d'évaluer l'impact de la distance entre le sucre et le triazole, la fonction azoture a été introduite soit directement sur le centre anomère, soit par l'intermédiaire d'une courte chaîne également greffée en C-1. Deux séries de sucre ont été retenues pour préparer les glycolipides tri-antennés, le D-mannose et le D-galactose, respectivement sous forme pyranose et furanose. Ils ont été choisis pour leur capacité à interagir avec certains récepteurs impliqués dans les cascades de réactions immunitaires.

1) Les mannopyranoses

En raison de leurs propriétés bien connues de **ciblage du MR**, il a été décidé de greffer des entités **mannopyranosyle** sur la molécule cible. Le composé final trimannosylé obtenu pourrait ainsi servir de référence vis-à-vis des autres cibles saccharidiques envisagées (furanosides) et de leur comportement face au MR. Un composé triantenné a déjà été synthétisé au sein du laboratoire. Il présente trois mannopyranosides liés à deux chaînes propylène glycol connectées au pentaérythritol (figure 33).²⁷ Cette structure triantennée est reliée à un oligoéthylène glycol par une fonction amide et enfin, à un lipide bicatenaire par une seconde fonction amide. Le composé **9** a été intégré au sein de liposomes et les tests biologiques ont démontré qu'il active les DCs ainsi que la réponse inflammatoire.

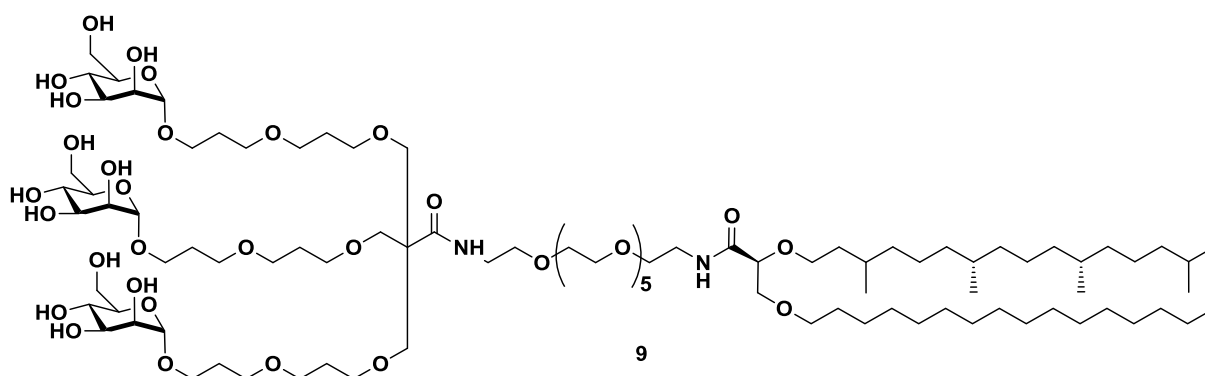


Figure 33 : Structure d'un trimannoside synthétisé au laboratoire

Selon le schéma rétrosynthétique 11 proposé, le mannoside **24** peut être synthétisé *via* le donneur **31** lui-même obtenu à partir du D-mannose. L'accès à l'azoture **25** est plus direct, en une seule étape, comme l'a récemment décrit Fairbanks.²⁸ Cette voie de synthèse s'inspire des travaux de Shoda et coll.²⁹ qui ont synthétisé des oxazolines à partir du chlorure de 2-chloro-1,3-diméthylimidazolium (DMC) dans l'eau. Fairbanks et coll. ont transposé cette méthodologie de synthèse aux azotures afin d'obtenir rapidement et facilement des composés prêts à être engagés dans des réactions click. Pour pallier à l'excès de réactif initialement utilisé, Fairbanks a préféré un dérivé du DMC, l'hexafluorophosphate de 2-azido-1,3-diméthylimidazolinium (ADMP) qui peut servir de donneur d'azoture et d'agent activant le carbone anomère du sucre. Cette réaction, menée à pH acide, a permis de réduire le nombre d'équivalents de donneur d'azoture à 3 et de réaliser la réaction de cycloaddition à la suite de la synthèse du saccharide supportant la fonction azoture (réaction one-pot). Le concept a été testé sur différents sucres (galactose, glucose, mannose, isomaltose) avec un azidoéthanol. Tous les sucres sont de configuration β , excepté le mannose (α) et ils ont été isolés avec des rendements supérieurs à 70%.²⁸

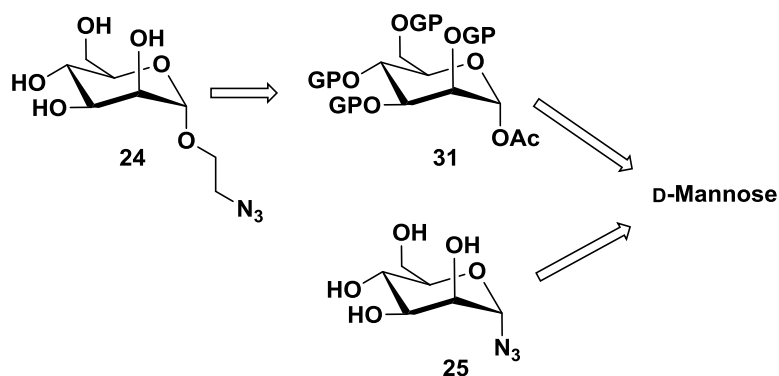


Schéma 11 : Schéma rétrosynthétique des cibles mannopyranoses

2) Les dérivés galactofuranosidiques

La présence des **galactofuranoses** dans la nature, notamment dans les membranes de pathogènes, ainsi que leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques tels que **DC-SIGN** nous ont encouragés à utiliser ce motif en tant agent de ciblage. Par ailleurs, des résultats préalables ont montré que mono- et difuranosides fluorés ou non sont capables d'induire la production de chimiokines. C'est pourquoi, plusieurs cibles ont été envisagées, **mono- et disaccharides, fluorées** ou non, avec **une chaîne lipidique** ou non (schéma 12). Le monosaccharide **15** constitue la structure la plus simple envisagée, afin de servir de témoin pour les tests biologiques. L'ajout d'un atome de fluor en position 6 est inspiré de résultats précédemment obtenus au laboratoire et le but est d'en mesurer l'influence sur les résultats biologiques. Des disaccharides ont également été envisagés pour poursuivre les travaux initiés au sein du laboratoire et tirer profit des résultats positifs observés à partir des disaccharides monofluorés. Les mêmes composés difluorés ont été synthétisés dans le but d'explorer l'impact d'un deuxième atome de fluor sur les propriétés biologiques.

L'azoture de β -D-galactofuranose **15** peut être synthétisé à partir du galactofuranose pentaacétylé, par glycosylation avec un azoture de triméthylsilyle en présence d'un acide de Lewis (schéma 12).

Les disaccharides ont été synthétisés en mettant en réaction l'accepteur de glycosyle **36** avec un donneur de glycosyle **34** et **35** dans le cas de disaccharides monofluorés, **32** ou **33** pour des disaccharides difluorés. Donneurs et accepteur fluorés peuvent tous être issus du même composé **37** fluoré en position 6, soit par activation du carbone anomère (**32** et **33**), soit par déprotection des hydroxyles (**36**). Les donneurs de glycosyle non fluorés sont directement obtenus à partir du D-Galf d'octyle **38**.

Une fois le donneur **37** synthétisé, l'accès au composé **16**, est aisé *via* une réaction de substitution similaire à celle mise en œuvre pour obtenir **15** (schéma 12).

L'atome de fluor, étant très électronégatif, il pourrait modifier la réactivité des groupements hydroxyle proches du carbone 6. L'effet inductif attracteur devrait renforcer la liaison entre le carbone et l'atome d'oxygène en position 5, diminuant ainsi la réactivité de cette fonction lors d'une réaction de glycosylation. Nous en avons déduit que seules les positions 2 et 3 de l'accepteur pourraient être assez nucléophiles pour former des liaisons glycosidiques. Afin d'étudier la sélectivité possible entre ces deux positions et éviter des étapes supplémentaires de protection et de déprotection, nous avons décidé d'étudier l'étape de glycosylation avec un accepteur **36** totalement déprotégé. De plus, il peut être intéressant d'obtenir les deux disaccharides liés soit en (1→2) soit en (1→3) afin de faire une comparaison des résultats biologiques entre ces deux composés.

Les dernières étapes consistent à greffer une chaîne grasse substituée par un azoture afin de pouvoir réaliser la réaction click.

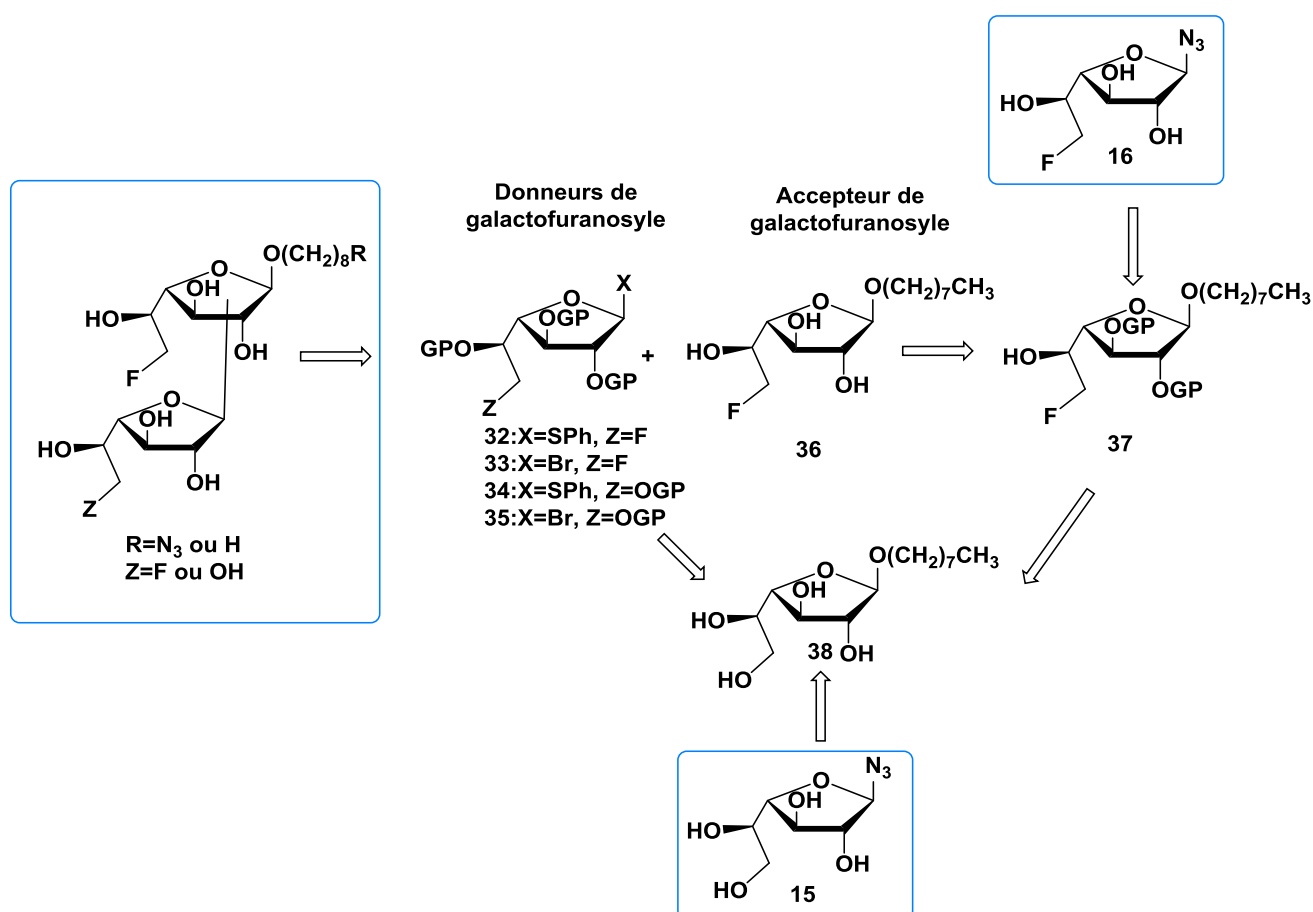


Schéma 12 : Schéma rétrosynthétique des furanosides cibles

III Synthèse des composés cibles

1) Synthèses des dérivés mannosylés

a) Synthèse de l' α -D-mannopyranoside d'azidoéthyle

La synthèse du dérivé mannopyranosidique **24** a été réalisée en deux étapes à partir du dérivé pentaacétylé commercial. Une réaction de glycosylation entre l'azidoéthanol et le mannose pentaacétylé **39**, en présence d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) (schéma 13), a permis d'obtenir le composé 1,2-*trans* **40** grâce à la présence du groupement participant acétate au niveau du carbone C-2. La déprotection dans les conditions de Zemplén des quatre fonctions hydroxyle a mené à l'obtention du composé **24** souhaité avec un rendement global de 59% sur les deux étapes.

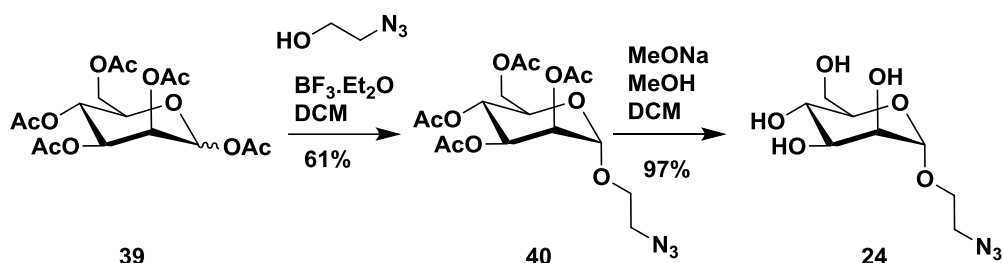


Schéma 13 : Synthèse de l' α -D-mannopyranoside d'azidoéthyle

b) Synthèse de l'azoture de mannopyranose

La synthèse du composé **25**, présentant la fonction azoture directement sur le carbone anomère, a été réalisée selon la procédure de Fairbanks²⁸. Lui et son équipe ont mis au point une réaction one-pot qui permet de synthétiser des azotures de glycosyle directement à partir de sucres non protégés et dans un mélange eau/ACN. Le donneur d'azoture le plus efficace, l'ADMP, active également la position anomère du sucre. Cette méthode de synthèse a permis d'obtenir les dérivés souhaités en série gluco-, galacto- et manno-, tous de configuration 1,2-*trans*. Cette voie de synthèse a l'avantage de ne pas utiliser de groupements protecteurs, évitant ainsi le recours à des étapes de protection/déprotection. De plus, elle permet de s'affranchir d'une étape de purification en poursuivant directement par la réaction click en one-pot.

La première étape de la réaction a été menée dans un mélange eau/acétonitrile à 0 °C. La triéthylamine puis l'ADMP (**41**) ont été successivement ajoutés et le mélange a été agité pendant 3 heures à température ambiante (schéma 14). Le composé a été extrait au DCM, puis après une neutralisation de la triéthylamine par une résine échangeuse de proton ($\text{IR } 120 \text{ H}^+$), celui-ci a été

intégré dans une réaction click (voir chapitre 4 : Synthèse de la plateforme et couplages aux parties glycosidiques et lipidiques).

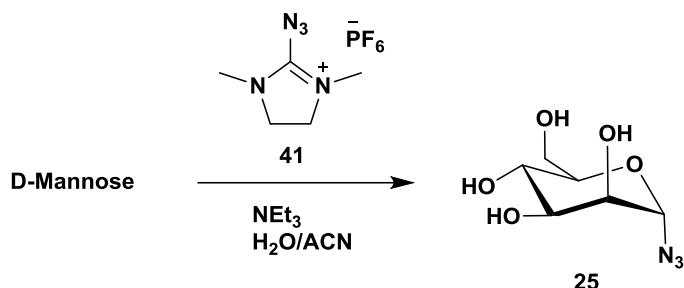


Schéma 14 : Synthèse de l'azoture de mannopyranosyle

2) Synthèse de l'azoture de galactofuranyle

La synthèse multiétapes du composé **15** est décrite sur le schéma 15 et a débuté par la formation du galactofuranoside d'octyle par glycosylation de Fischer. Pour cela, le D-galactose libre a été mis en solution dans du THF anhydre en présence de chlorure de calcium et d'octanol. Le chlorure de fer(III) a été ajouté par petites portions en veillant particulièrement à ce que la température du milieu n'excède pas 0 °C. Après 48 heures à température ambiante et des traitements acides (lavages par HCl 5%) pour éliminer les ions ferriques, l'anomère β a été isolé par cristallisation dans l'éther diéthylique avec un rendement de 32%. En effet, au cours de la réaction les deux anomères sont synthétisés mais seul le composé β cristallise dans l'éther diéthylique.²⁵

Cette réaction étant longue à mettre en place (plusieurs heures sont nécessaires pour les ajouts de FeCl₃), elle a rapidement été menée dans un réacteur et en engageant des quantités importantes de réactifs (20 g de D-galactose). L'utilisation d'un réacteur a permis de mieux contrôler l'agitation du milieu grâce à une pâle plutôt qu'à un barreau aimanté, ce qui a minimisé les problèmes d'augmentation de la température inhérent à chaque ajout de chlorure ferrique. Afin de s'assurer que la température n'excède pas 0 °C à l'intérieur du réacteur, nous avons fixé la température du liquide de refroidissement à -10 °C. Dans ces conditions, un rendement de 29% en produit **38** a pu être obtenu, correspondant au rendement observé à plus petite échelle.

Le composé **38** a ensuite été acétylé dans des conditions standards puis acétolysé en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré afin d'obtenir le composé **42** avec un rendement sur les deux étapes de 57%. Un mélange α/β de l'azoture **43** a été obtenu avec un rendement de 79% par action de l'azoture de triméthylsilyle en présence d'un acide de Lewis (TMSOTf). L'anomère β de **43** a pu être isolé du mélange α/β par chromatographie flash avec un

rendement de 48%. La dernière étape de la synthèse a consisté à déprotéger les fonctions hydroxyle dans les conditions de Zemplén (95% de rendement).

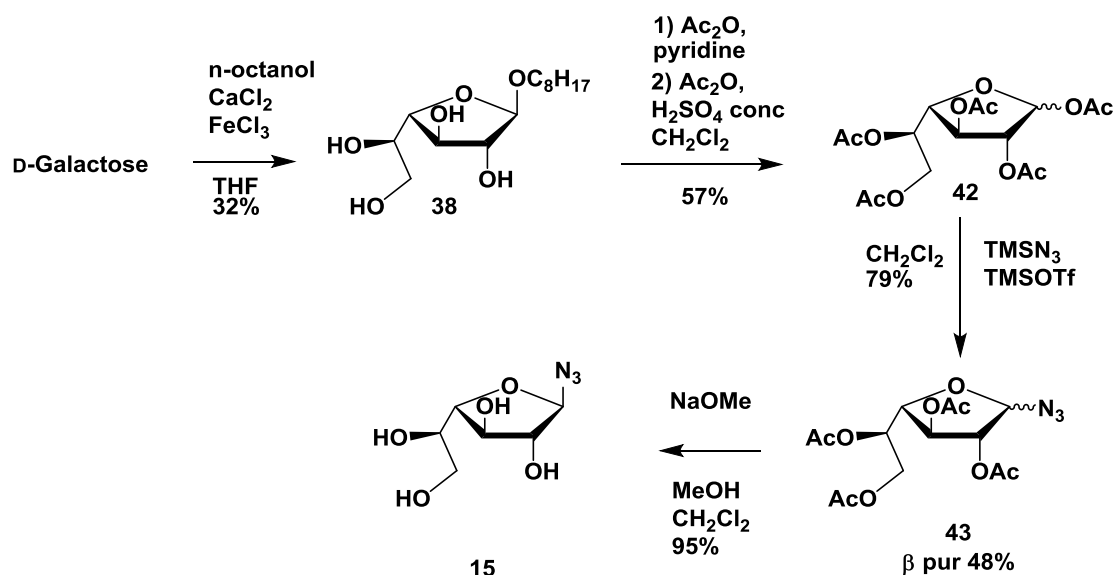


Schéma 15 : Synthèse de l'azoture de β-D-galactofuranosyle

3) Synthèse du monomère fluoré

Le galactoside fluoré en C-6 **48** constitue l'intermédiaire clé pour accéder aux différents composés fluorés. Il a été préparé en suivant une synthèse développée au sein de notre laboratoire.³⁰ Comme on peut le voir sur le schéma 16, les deux hydroxyles en 5 et 6 ont été différenciés des hydroxyles en 2 et 3 sous la forme d'un isopropylidène (**44**). Les fonctions libres en 2 et 3 ont ensuite été benzoylées afin de conduire au composé totalement protégé. L'acétal a été clivé en milieu acide aqueux pour former le furanoside **45** avec un rendement global de 67% sur les trois étapes à partir de **38**. Le choix de l'ester de benzoyle comme groupement protecteur s'est imposé pour son élimination simple dans les conditions de Zemplén. De plus c'est un groupement participant, assurant la formation de composés β pour la suite de la synthèse.

Afin d'introduire régiosélectivement l'atome de fluor, un groupement sulfate cyclique permettant à la fois la protection de la position 5 tout en activant la position 6 a été utilisé, essentiellement pour des raisons stériques.³¹

Le galactofuranoside **45** a été converti en sulfate 5,6-cyclique en deux étapes. La première étape a consisté en la formation d'un sulfite cyclique **46** par réaction de **45** avec le chlorure de thionyle. Ce composé a ensuite été oxydé en milieu biphasique par le tétraoxyde de sodium généré *in situ* afin de former le sulfate **47**. L'utilisation du chlorure de sulfuryle (SO₂Cl₂) à la place de SOCl₂, en milieu

basique a également été envisagée. Cependant, les rendements observés avec des sucres sont modérés comparativement à celui obtenu ici sur les deux étapes (76%).^{31,32}

L'ouverture du sulfate **47** par action de l'ion fluorure a conduit, après désulfatation acido-catalysée, au composé **48** avec un rendement de 84%.

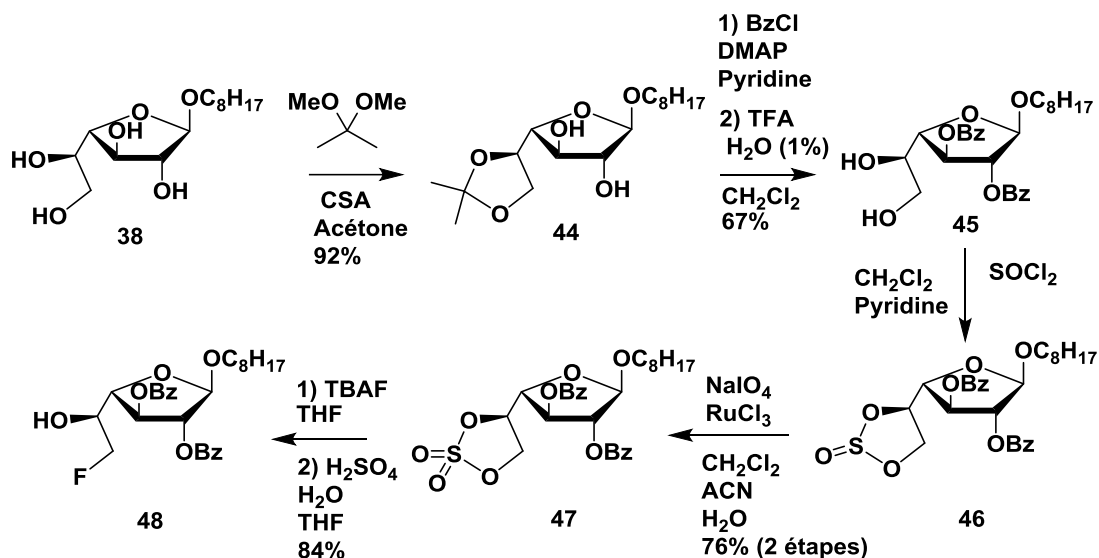


Schéma 16 : Synthèse du 2,3-O-benzoyl-6-fluoro-6-déoxy-β-D-galactofuranoside d'octyle

4) Synthèse de l'azoture fluoré

Afin d'accéder à l'azoture **16**, le carbone anomère du galactofuranoside **48** a été activé par acétolyse, ce qui a permis également la protection du groupement hydroxyle en position 5 (schéma 17). De la même manière que pour le composé **43**, l'azoture a été greffé en position anomère à l'aide d'un dérivé silylé en présence d'un acide de Lewis. Le composé **50** a ensuite été déprotégé dans les conditions de Zemplén. L'ester benzoïque formé a été éliminé *via* une co-évaporation par plusieurs lyophilisations successives d'une suspension du résidu réactionnel dans l'eau, permettant d'isoler le composé **16** avec un rendement de 29% sur les trois étapes. Les analyses MS (spectrométrie de masse) et RMN (raisonance magnétique nucléaire) ont permis de confirmer la structure de **16**. En effet, une masse de $[M+Na]^+$ de 229,9 correspond à un composé de formule brute $C_6H_{10}FN_3O_4Na$ en adéquation avec la formule brute du produit souhaité. De plus le déplacement chimique du proton anomère à 5,23 ppm, caractérisé par une constante de 2,1 Hz, a confirmé l'obtention du composé β.

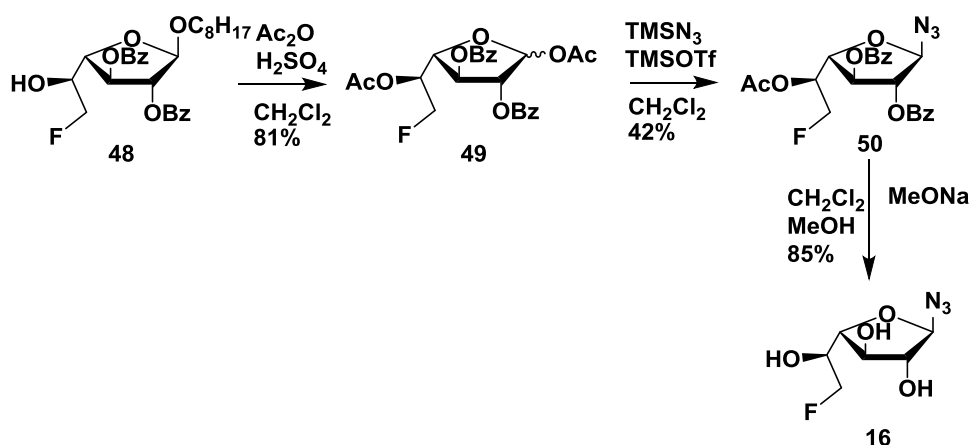


Schéma 17 : Synthèse de l'azoture fluoré

5) Synthèse des donneurs et accepteurs de la glycosylation

a) L'accepteur de glycosyle

Afin de mener des premiers essais de synthèse des disaccharides tout en minimisant le temps et les étapes de synthèse, nous avons décidé de tester les réactions de glycosylation avec un accepteur « modèle ». Cet accepteur, le 6-désoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside d'octyle **36**, possède une chaîne grasse à 8 atomes de carbone, mais sans azoture, normalement nécessaire pour la réaction click (figure 34). Cela nous a permis de réaliser les glycosylations à partir d'un produit issu d'une synthèse en 7 étapes contre 11 pour **51** (acétolyse de OH-1, glycosylation afin de greffer la chaîne liée à une fonction amine protégée, déprotection de l'amine et conversion en azoture). En outre, cet accepteur a ouvert l'accès à un grand nombre de composés de type glycolipides dont les structures ont été comparées à celles des produits issus de l'approche chimioenzymatique (**12**).³³ Les disaccharides accessibles par la glycosylation de cet accepteur ne diffèrent que d'un atome de fluor et éventuellement par l'emplacement de la liaison glycosidique (en 2, 3 ou 5). L'influence de ces deux paramètres sur les activités biologiques est donc intéressante à considérer.

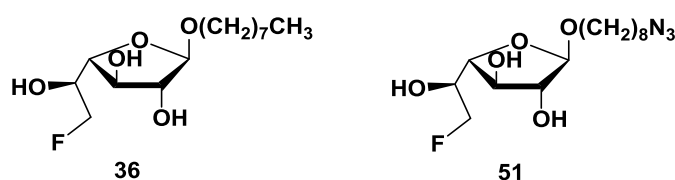


Figure 34 : Structures de l'accepteur modèle et de l'accepteur nécessaire pour une réaction click

L'accepteur modèle a été obtenu par simple déprotection dans les conditions de Zemplén du composé **48** avec un rendement de 88% (schéma 18).

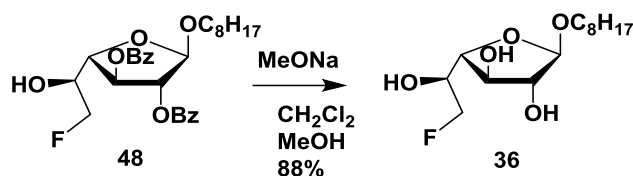


Schéma 18 : Synthèse de l'accepteur

b) Les donneurs de glycosyle

Les donneurs bromés figurent parmi les donneurs de glycosyle les plus réactifs car le brome est un très bon groupe partant. Cependant, ils se décomposent facilement à température ambiante par hydrolyse. Leur conservation sur le long terme est donc plus délicate et nécessite qu'ils soient fraîchement préparés avant de réaliser la glycosylation. De plus, les promoteurs impliqués dans les réactions de glycosylation avec un accepteur bromé sont des sels de métaux lourds (argent ou mercure) ce qui nous a amenés à envisager l'utilisation d'un second donneur de type thioglycoside.¹ Les thiosucres sont très largement utilisés dans les réactions de glycosylation car ils sont faciles à synthétiser et à utiliser, ils sont relativement stables.^{1,34,35}

Un premier **donneur thioglycosidique 52** (schéma 19) a été synthétisé à partir du composé **49** à l'aide de thiophénol et en présence d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). Après purification, il a été isolé avec un rendement de 90%. Le **donneur de galactosyle bromé** a été synthétisé à partir du même composé de base **49**, mais en présence d'un large excès d'acide bromhydrique dans l'acide acétique. L'obtention du composé **53**, de configuration β , a pu être confirmée par la faible valeur de la constante de couplages $J_{1,2}$ de 1,0 Hz, celle de **52** était même trop faible pour être déterminée (pic en RMN ^1H du proton anomère sous la forme d'un singulet large).

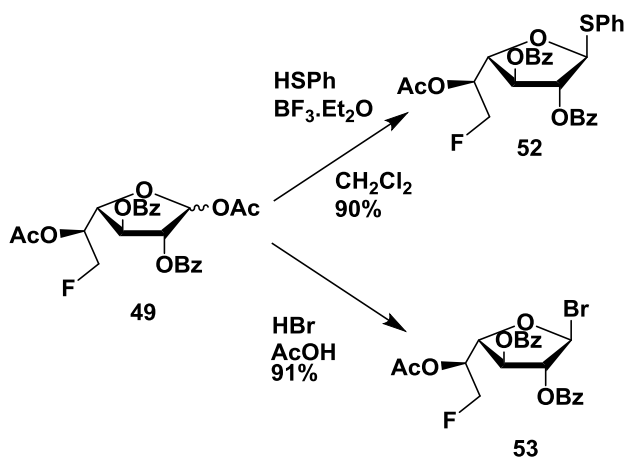


Schéma 19 : Synthèse du donneur bromé

6) Synthèse des donneurs de glycosyle non fluorés

Afin de pouvoir étudier l'influence de l'atome de fluor sur les propriétés des molécules et leur réactivité dans une réaction de glycosylation, nous avons synthétisé des disaccharides comportant un atome de fluor sur un seul des motifs sucre. Pour cela, l'accepteur fluoré **36** a été mis en réaction avec un **donneur non fluoré (56 ou 57)**.

Pour obtenir ces donneurs, les quatre hydroxyles libres du galactofuranose d'octyle **38** ont été protégés sous forme d'esters benzoïques, puis la position anomère a été acétolysée (schéma 20). Le composé **55** a été obtenu en deux étapes avec un rendement global de 94% et un ratio α/β de 1:4. A partir de **35**, les donneurs bromé et thiophényle ont été préparés dans les mêmes conditions que pour la synthèse de **52** et **53**, et isolés avec des rendements respectifs de 62 et 95%.

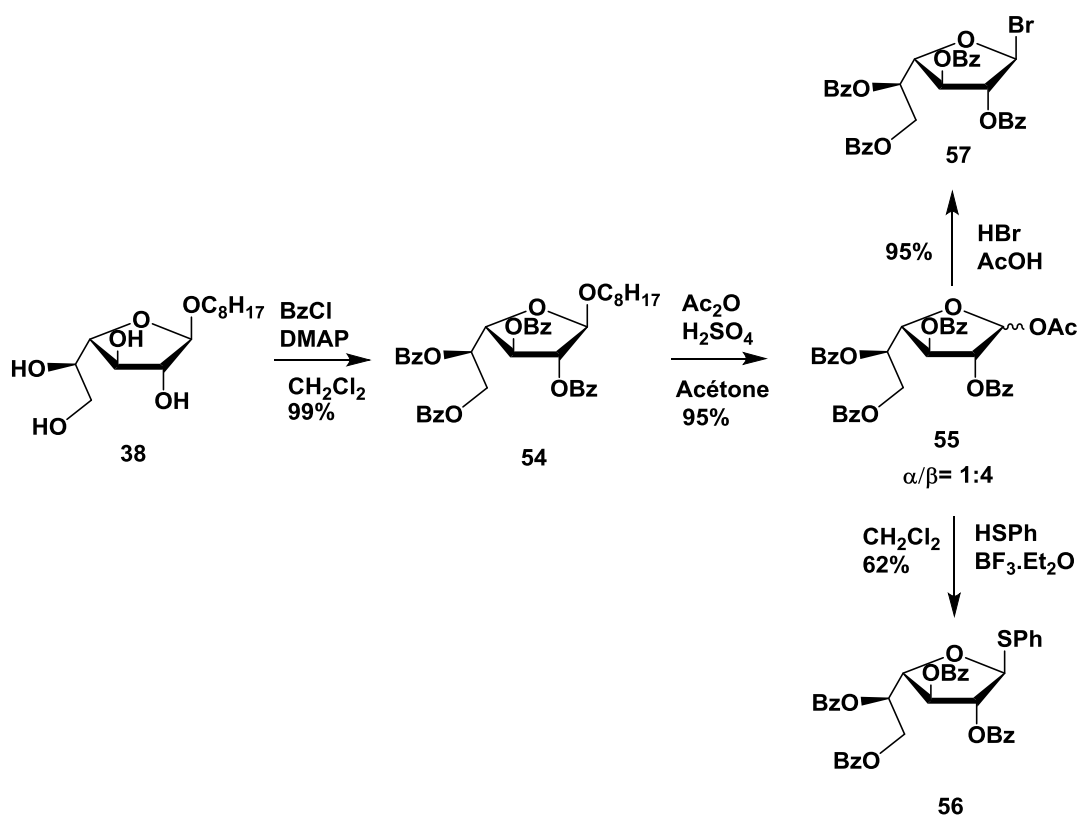


Schéma 20 : Synthèse des deux donneurs non fluorés thiophényle et bromé

IV Réactions de glycosylation et résultats

1) Réactions de glycosylation entre les donneurs et l'accepteur fluorés

Il est très largement reconnu que chaque réaction de glycosylation est différente, impliquant que les conditions doivent être constamment adaptées en fonction du type de donneur et d'accepteur. Ainsi, le promoteur utilisé, la température de la réaction, le solvant, la quantité d'accepteur ont été ajustés pour chaque type de glycosylation (schéma 21) dans le but d'optimiser ces réactions pour obtenir les disaccharides mono- et difluorés reliés en (1→2) et (1→3).

Trois positions (2, 3 et 5) sont disponibles sur l'accepteur de glycosyle **36** (schéma 21) pour former une liaison glycosidique. Comme expliqué précédemment, la position 5 est supposée être moins réactive en raison de la présence du fluor en position 6. Seuls les produits de glycosylation (1→2) et (1→3) sont donc attendus dans des proportions difficiles à prévoir à l'avance.

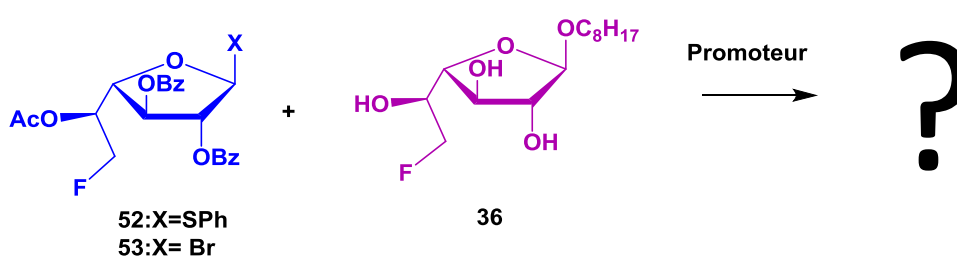


Schéma 21 : Réaction de glycosylation entre deux entités furanoses

a) Réactions avec le donneur thiophényle

Le premier donneur engagé dans la réaction de glycosylation a été le thioglycoside **51**, largement utilisé dans notre laboratoire. Le mode opératoire mis en place implique de solubiliser séparément l'accepteur et le donneur dans du dichlorométhane. Ainsi, le *N*-iodosuccinimide (NIS) et le triflate de triméthylsilyle ont été ajoutés à la solution d'accepteur **36** et le mélange correspondant a été laissé sous agitation, pendant 10 min, avant l'ajout de la solution de donneur de glycosyle **52**.

Le NIS est un donneur d'ion iodonium. Les doublets non liants de l'atome de soufre du donneur attaquent le NIS afin de former une liaison avec l'iode (schéma 22). L'ion sulfonium ainsi formé est converti en acyloxonium avec libération de PhSI. L'approche du nucléophile est dirigée sur la face β du donneur.

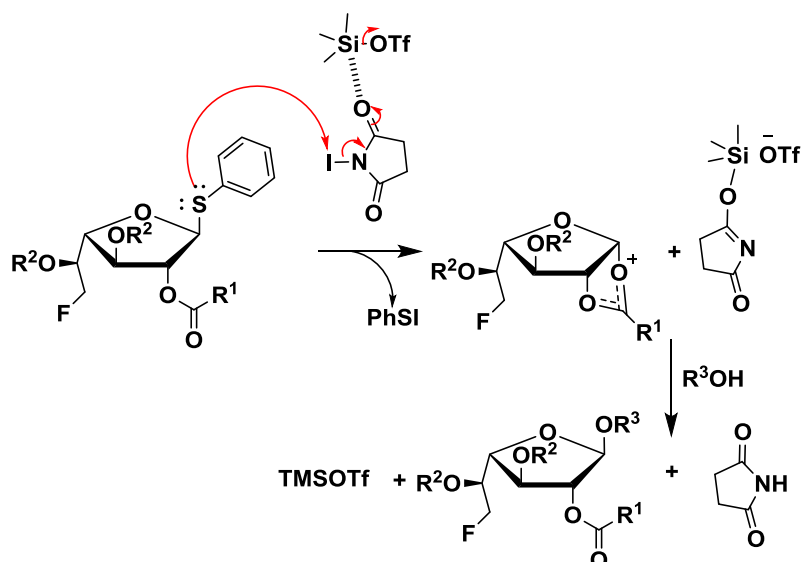


Schéma 22 : Réaction de glycosylation en présence du couple NIS/TMSOTf

Afin de maximiser le rendement, un léger excès de donneur a été engagé dans les réactions (tableau 3). Lors des premiers tests de glycosylation (tableau 3, entrées 1 et 2), un large excès de NIS (2,3 éq) ainsi qu'une quantité stoechiométrique d'acide de Lewis par rapport au donneur (1,2 éq) ont été utilisés. Après une purification sur colonne de gel de silice, un composé de masse moléculaire bien supérieure à celle du disaccharide a été isolé. L'analyse HRMS (spectrométrie de masse haute résolution) de ce composé a donné un signal de $[M+Na]^+$ de 1145,3971 correspondant à la masse molaire d'un trisaccharide (**58**). Cela nous a permis de calculer un rendement de 11%. Cette hypothèse a par la suite été confirmée par RMN avec l'observation de trois signaux fortement déblindés en RMN ^{13}C correspondant à trois carbones anomères (δ de 107,6, 107,2 et 98,7 ppm). Les deux disaccharides (1 $\rightarrow$ 2) et (1 $\rightarrow$ 3) étant nos cibles principales, nous avons décidé de diminuer la température à -30 °C (tableau 3, entrée 2) afin de ralentir la cinétique de la réaction, ce qui nous a permis d'isoler deux disaccharides **59**, **60** ($[M+Na]^+ = 731,28$) avec des rendements de 6% chacun. Ces deux composés, bien que de masse molaire identique, ont présenté des spectres RMN différents qui seront détaillés dans la partie 2 « Identification des produits formés ».

Dans le même objectif, nous avons réalisé la réaction de glycosylation en faisant varier les quantités en TMSOTf. A 0,2 éq, la quantité d'acide s'est avérée trop faible et la réaction de glycosylation n'a pas été amorcée. Avec 0,5 éq de TMSOTf, la quantité est devenue suffisante pour initier la réaction, et les rendements en disaccharides (**61**, **62**, **63**) ont été sensiblement améliorés entre la réaction de glycosylation menée à 0 °C et celle réalisée à -50 °C (tableau 3, entrées 3 et 4).

Nous avons également augmenté la quantité de donneur (1,6 éq) par rapport à l'accepteur (1 éq) pour vérifier l'impact de la quantité de **52** sur le rendement (tableau 3, entrée 5). Cependant, aucune

amélioration n'a été observée en termes de rendement global sur les produits isolés. Les quantités de disaccharides isolées ont même diminué, mais plus de trisaccharide **64** a pu être obtenu.

Tableau 3 : Conditions et résultats de la réaction entre le donneur **52 et l'accepteur **38** (structures présentées sur la figure 35)**

Entrée	Éq donneur (52)	Éq promoteur (NIS/TMSOTf)	Température (°C)	Produits formés (rendement)
1	1,2	2,3/1,2	0	58 (11%)
2	1,2	2,3/1,2	-30	59 (6%), 60 (6%), 58 (11%)
3	1,2	2,3/0,5	0	61 (7%), 62 (5%), 63 (1%), 64 (9%)
4	1,2	2,3/0,5	-50	61 (12%), 62 (5%), 63 (9%), 64 (11%)
5	1.6	2,3/0,5	-50	58 (34%), 59 (3%)

Afin de caractériser plus finement les disaccharides obtenus, des analyses RMN 1D et 2D (HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Connectivity, HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation, COSY - Correlated Spectroscopy) ont été réalisées. Les disaccharides **59** et **60** préparés selon les entrées 2 et 5 du tableau 3 possèdent un premier carbone anomère entre 98 et 99 ppm et un second entre 105 et 107 ppm. Pour les composés **61**, **62** et **63** obtenus selon les entrées 3 et 4, les deux carbones anomères possèdent un déplacement chimique de l'ordre de 105 à 107 ppm. Ainsi, deux produits ont été formés, le premier comprenant un motif pyranoside ($\delta=98-99$ ppm) et le second constitué uniquement d'entités furanosides ($\delta=105-107$ ppm). L'analyse structurale complète des molécules obtenues sera explicitée dans la partie «2) Identification des produits formés».

b) Réactions avec le donneur bromé

Au vu des rendements modérés obtenus avec le donneur thiophényle, nous avons testé le produit bromé **53**, donneur moins stable mais plus réactif que le glycoside de thiophényle.

Le triflate d'argent (AgOTf) a été utilisé comme promoteur pour cette glycosylation. L'argent peut complexer l'atome de brome du donneur, activant et libérant ainsi la position anomère pour l'attaque nucléophile de l'accepteur. Le sel d'argent (AgBr) alors formé précipite dans le milieu réactionnel et peut être éliminé par simple filtration. De la même manière que dans le cas du donneur thiophényle, le groupement participant benzoyle sur le C-2 assure la stéréochimie β pour la nouvelle liaison glycosidique. Les conditions de glycosylation à partir d'un donneur de glycosyle bromé nécessitent d'introduire des quantités stoechiométriques de donneur et d'accepteur. La première glycosylation (tableau 4, entrée 1) a cependant mis en évidence un problème d'hydrolyse

important du donneur **65**. Ainsi, nous avons essayé de la limiter par l'ajout de tamis moléculaire 4 Å, avec des résultats modérés (entrées 2 et 3). La synthèse glycosidique selon l'entrée 1 a également permis de former majoritairement le composé **66**, présentant à la fois des caractéristiques du donneur **52** et de la chaîne octyle présente sur l'accepteur **36**. Il sera par la suite appelé produit de transglycosylation.

Les différents produits obtenus selon les entrées du tableau 4 présentent les mêmes spectres RMN que ceux répertoriés dans le tableau 3, ce qui confirme que les mêmes composés ont été synthétisés. De la même façon que lors de l'utilisation du donneur **52**, l'analyse MS a permis d'identifier des composés de masse m/z égale à 731,28, mais avec des spectres RMN différents (tableau 3, entrée 1).

Afin de vérifier que la quantité de donneur n'influence pas les rendements, une réaction a été menée en présence de 2 éq de **53**, 2 éq d'AgOTf pour 1 éq de **36**. Cependant, aucun produit n'a pu être isolé (donnée non intégrée dans le tableau 4).

Tableau 4 : Conditions et résultats de la réaction entre le donneur 53 et l'accepteur 36 (structures présentées sur la figure 35)

Entrée	Éq donneur (53)	Éq promoteur AgOTf	Tamis moléculaire 4 Å	Produits formés (rendement)
1	1	1	Non	59 (8%), 65 (22%), 66 (64%)
2	1	1	Oui	61 (8%), 62 (8%), 63 (11%), 64 (1%), 65 (15%), 66 (20%)
3	2	2	Oui	66 (18%), mélange di/tri inséparable

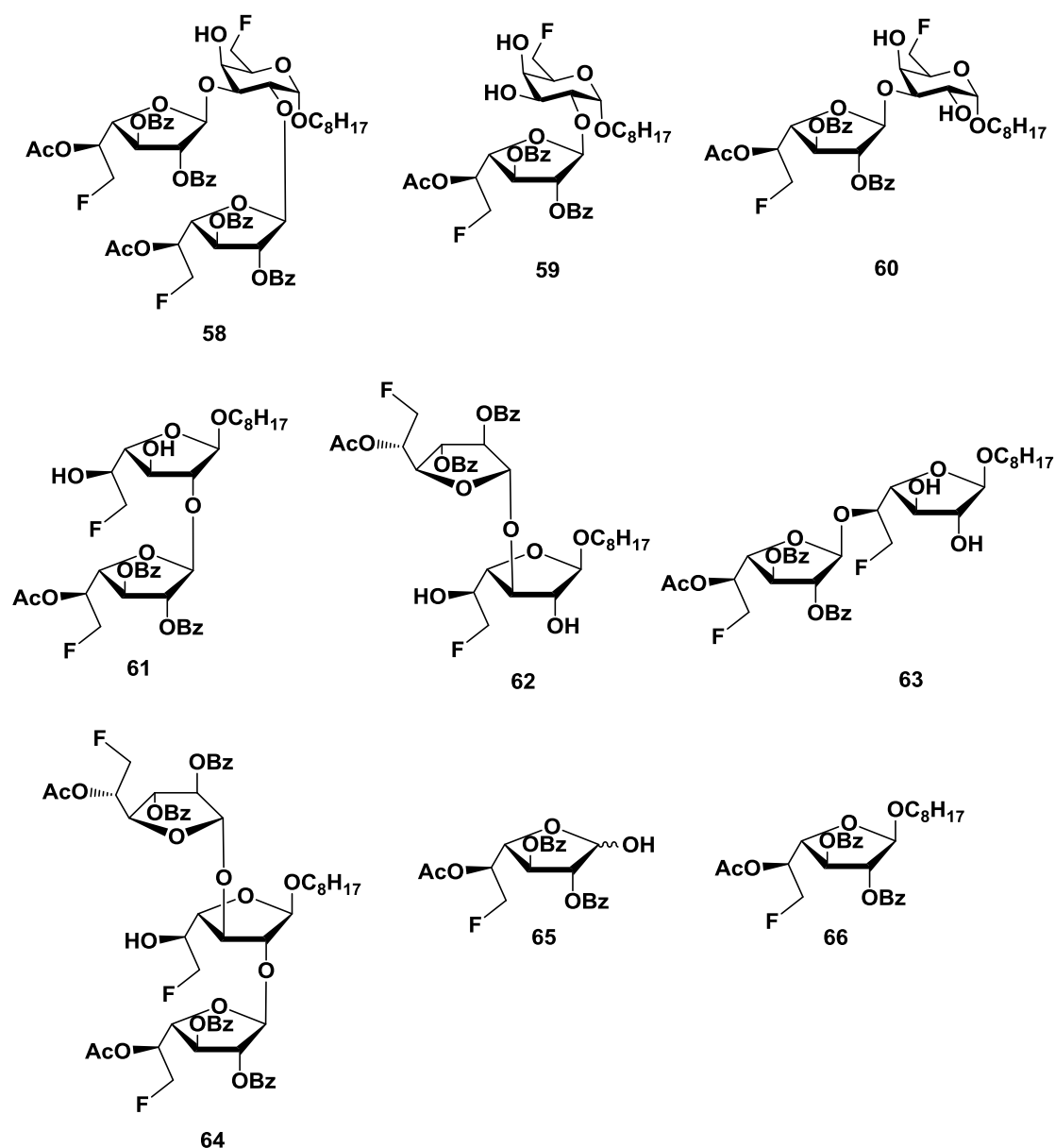


Figure 35 : Structures des différents produits obtenus lors des réactions de glycosylation entre accepteur et donneurs fluorés

2) Identification des produits formés

Les différents produits synthétisés au cours des réactions de glycosylation ont pu être identifiés grâce aux analyses MS et RMN. Les structures sont représentées sur la figure 35 ci-dessus. Pour plus de facilité de lecture, les structures sont également répertoriées sur une page dépliable à la fin de ce chapitre.

Tout au long de la discussion, l'unité réductrice des di- et trisaccharides est appelée « a » et l'entité non réductrice « b ». Dans le cas des trisaccharides, une troisième entité est introduite pour la seconde unité non réductrice appelée « c » (figure 36).

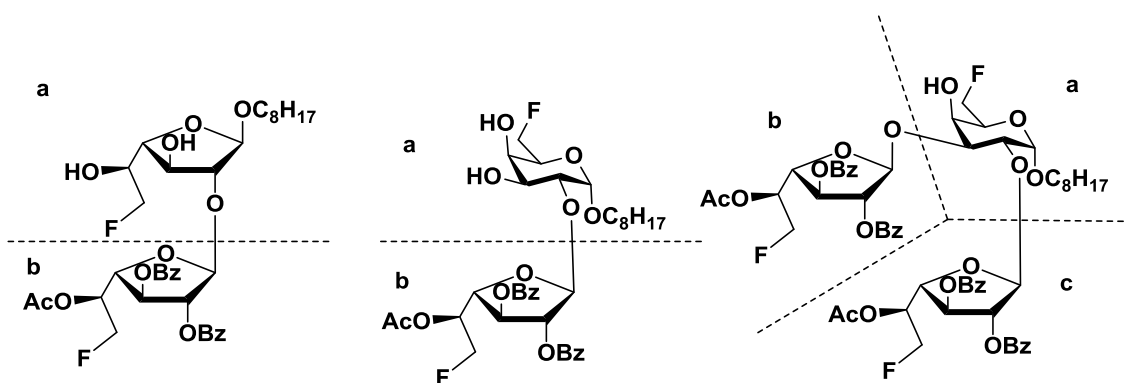


Figure 36 : Appellation des différentes entités des di- et trisaccharides

a) Produit d'hydrolyse du donneur (65)

L'hydrolyse du donneur de glycosyle est une réaction secondaire classique en synthèse glycosique. Il peut en résulter deux épimères α et β , tous deux identifiables dans un mélange par leur masse, $[M+Na]^+$ de 454,9 dans notre cas. De plus, l'analyse RMN du composé **65** a permis d'identifier la présence d'un sucre dont le carbone anomère ($\delta_{C-1}=101,1$ ppm) est lié à un proton ($\delta_{H-1}=5,65$ ppm) possédant une constante de couplage inférieure à 1 Hz. Cela confirme la formation du composé de configuration β pour le produit **65**. La présence de signaux caractéristiques des protons aromatiques et d'un singulet à 2,08 ppm a prouvé la présence des groupements benzoyle et acétyle.

b) Transglycosylation (66)

Le spectre RMN 1H du composé **66** (figure 37) nous a particulièrement surpris puisqu'il a mis très clairement en évidence la présence de protons aromatiques sous la forme de multiplets à des déplacements chimiques supérieurs à 6,8 ppm, d'un acétyle avec un singulet à 2,08 ppm mais également de la chaîne octyle. Cette chaîne est caractérisée par deux doublets de triplets (dt), (A) à 3,75 et 3,53 ppm, un multiplet entre 1,69 et 1,57 ppm, (B), un autre entre 1,44 et 1,01 ppm (C) et un triplet à 0,86 ppm (D). De plus, le spectre HMBC a montré le lien entre le OCH_2 de la chaîne grasse et le carbone anomère du sucre. La présence de l'atome de fluor a également pu être vérifiée *via* la présence de doublets sur le spectre RMN ^{13}C . En effet, les signaux correspondant aux carbones C-6, C-5 et C-4 possèdent respectivement des constantes de couplage $^{13}C,F$ de 173,2 Hz, 20,7 Hz et 5,7 Hz. De plus, le signal des protons H-6 en RMN 1H se présente sous la forme d'un doublet présentant une constante de couplage $^2J_{H,F}=46,6$ Hz, caractéristique d'une constante H,F.

L'hypothèse d'un produit issu du transfert de la chaîne alcooxyle de l'accepteur vers le carbone anomère du donneur a été confirmée par l'analyse HRMS avec la détection d'un ion $[C_{30}H_{37}O_8F+Na]^+$ de 567,2365 caractéristique du composé.

En conséquence, la réaction de **53** avec **36** en milieu acide se traduit majoritairement (64%, tableau 4, entrée 1) par une réaction de transglycosylation, *via* un transfert intermoléculaire d'aglycone.

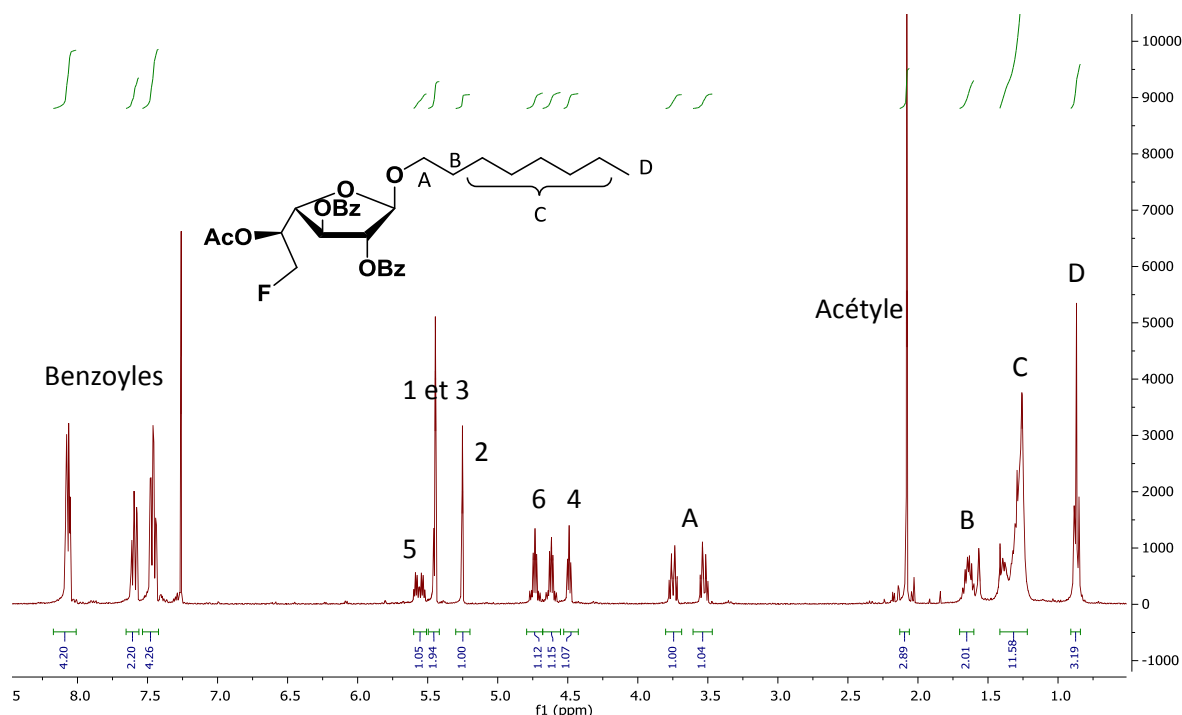


Figure 37: Spectre RMN ^1H du produit de transglycosylation **66** dans CDCl_3

c) Disaccharides furanosidiques (**61**, **62**, **63**)

La présence de disaccharides a pu être confirmée par HRMS *via* l'observation de pic de masse de m/z de valeur 731,28. Les analyses RMN nous ont permis de déterminer la régiosélectivité des couplages. Détaillons par exemple le cas du composé **61**. La première étape de l'identification a consisté à attribuer les signaux des différents protons et carbones des deux entités sucre qui composent le disaccharide grâce aux analyses RMN 2D classiques (COSY, HSQC, figure 38, spectres A et B). Le spectre HSQC a permis d'identifier les deux protons anomères grâce à leur corrélation avec les carbones anomères dont les déplacements chimiques sont très élevés en ^{13}C ($\delta_{\text{C-1a}} = 106,1$ et $\delta_{\text{C-1b}} = 105,7$ ppm). Le spectre COSY a permis de relier les protons entre eux ainsi que leur position sur le cycle saccharidique. L'analyse ^{13}C quant à elle, a facilement permis de mettre en évidence les carbones C-4, C-5 et C-6 des deux motifs sucre grâce aux constantes de couplage $^{13}\text{C},\text{F}$ de l'ordre de 160-170 Hz pour C-6,F, de 20 Hz pour C-5,F et de 5 Hz pour C-4,F (figure 38, spectre C). Grâce au spectre HSQC, les protons correspondants ont pu être associés à leurs signaux en RMN ^1H .

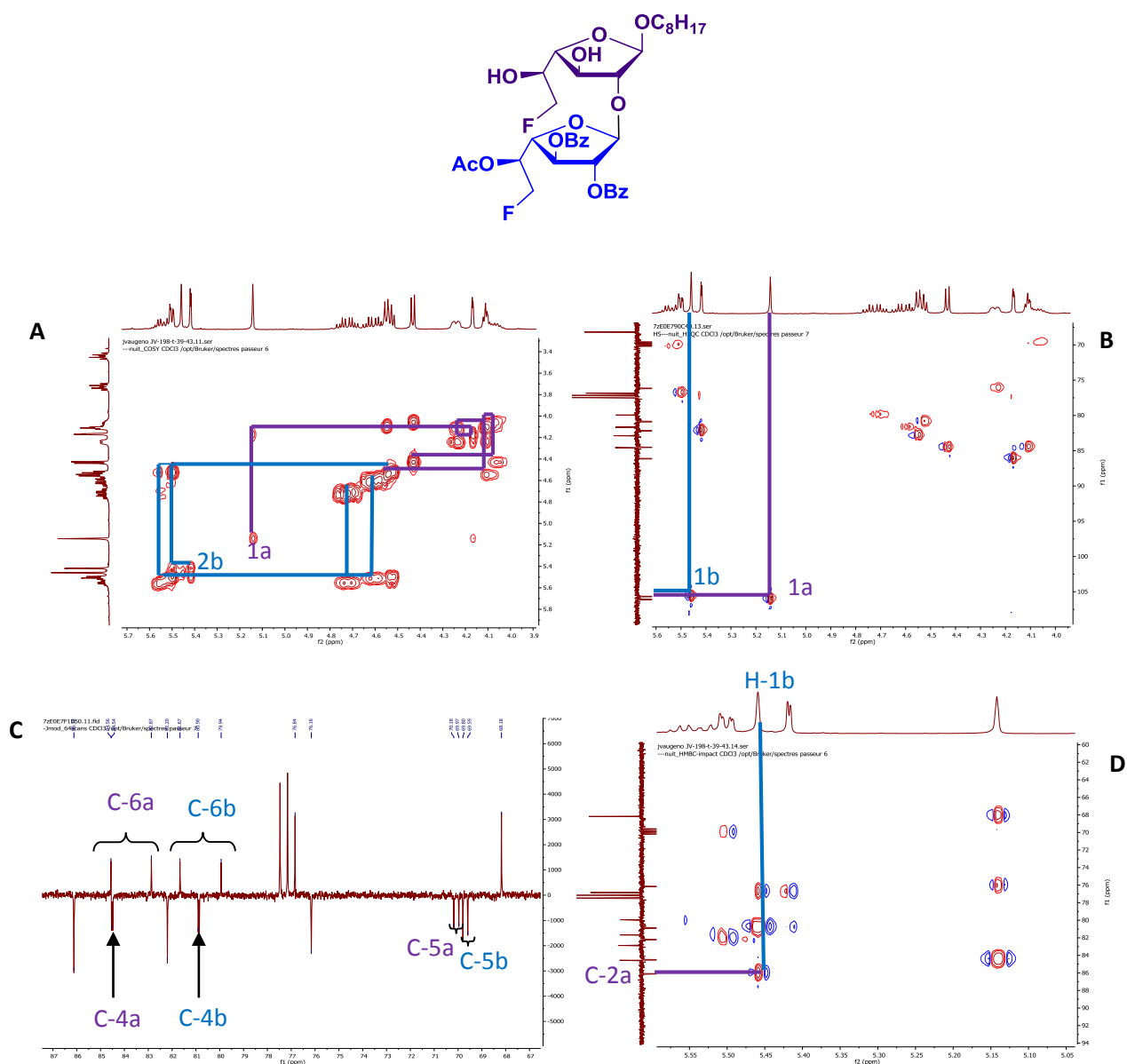


Figure 38 : Spectres RMN du disaccharide **61**. A : COSY, B : HSQC, C : ^{13}C , D : HMBC dans CDCl_3

Enfin une analyse HMBC de **61** a permis d'identifier l'entité portant la chaîne grasse en O-1 (entité a) ainsi que les interactions entre le proton anomère de l'entité b avec un carbone de l'unité a (spectre D). Nous pouvons ainsi déterminer la régiosélectivité du couplage. Sur la figure 38, on voit clairement la tâche de corrélation entre le proton anomère H-1b et le carbone C-2a. Cette régiosélectivité (1→2) est confirmée par une variation importante du déplacement chimique observée en RMN ^{13}C sur le carbone C-2a comparé à l'analyse de l'accepteur **36**. En effet, le signal de C-2a (78,9 ppm) est déplacé vers les champs faibles (86,1 ppm) dans le cas du disaccharide **61**, indiquant un changement de voisinage. Les autres carbones conservent des déplacements du même ordre de grandeur.

Tous les autres disaccharides **62**, **63**, **59**, **60** ont ainsi pu être caractérisés de la même façon. Pour le composé **62**, les spectres HSQC et COSY ont permis d'attribuer tous les signaux correspondant aux

protons et atomes de carbone des deux entités glycosidiques. Le déplacement chimique du carbone C-3a, de 84,3 ppm laisse supposer une liaison β -(1 $\rightarrow$ 3), hypothèse vérifiée par la présence d'une corrélation entre le carbone anomère C-1b et le proton H-3a (4,24 ppm-106,2 ppm).

Enfin, le composé difuranosidique (1 $\rightarrow$ 5) **63** a pu être identifié, notamment grâce à la valeur élevée du déplacement chimique de C-5a impliqué dans la liaison glycosidique. Il passe de 69 ppm pour **61** et **62** à plus de 75 ppm pour **63**. De plus, un doublet ($J_{C,F}$ =5,6 Hz) a été observé à 106,4 ppm, témoignant ainsi de la proximité du C-1b avec l'atome de fluor en C-6a. Ce signal à 106,4 ppm est corrélé (en HMBC) au H-5b à 4,33 ppm, ce qui démontre la stéréochimie β -(1 $\rightarrow$ 5) du composé **63**.

La configuration β des trois composés **61**, **62** et **63**, est confortée par une constante de couplage visible en RMN ^1H très faible (inférieure à 1 Hz) entre le proton anomère et le H-2b.

d) Différenciation pyranose/furanose et élucidation des structures de 59 et 60

Les analyses HRMS des composés **59** et **60** prouvent la présence de masses $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de 731,2847 et 731,2853 respectivement, ce qui appuie l'hypothèse de la synthèse de composés disaccharidiques. Les spectres COSY et HSQC ont permis d'attribuer les déplacements chimiques de chaque proton et chaque carbone des deux cycles. Que ce soit pour **59** ou **60**, un des deux motifs saccharidiques présente un déplacement chimique du carbone anomère de l'ordre de 98-100 ppm, valeurs largement moins élevées que celles observées dans les cas de **61** et **62** (105-107 ppm). Le second cycle, quant à lui, reprend toutes les caractéristiques des composés **61** et **62**. Les analyses HMBC ont permis de mettre en évidence des couplages entre les protons anomères H-1b et carbone C-2a dans le cas de **59** et C-3a dans le cas de **60**, ainsi que le lien entre les carbones anomères de déplacements chimiques proches de 99 ppm et les protons de la chaîne octyle. Si les différences de déplacements chimiques entre **59** et **61** sont visibles en RMN ^1H (tableau 5), elles le sont d'autant plus en RMN ^{13}C (tableau 6). Les déplacements chimiques des C-1a sont très largement déplacés vers les champs faibles dans le cas de la molécule **61**. Nous sommes donc bien en présence de deux composés différents.

Tableau 5 : Différences de déplacements chimiques observés en RMN ^1H entre pyranoside et furanoside (a correspond à l'entité réductrice et b l'entité non réductrice)

Composé	H-1b	H-2b	H-3b	H-4b	H-5b	H-6b	H-1a	H-2a	H-3a	H-4a	H-5a	H-6a
59	5,37	5,46	5,60	4,72 – 4,48	5,45 – 5,37	4,72 – 4,48	5,07	3,89	4,16 – 4,06	4,16 – 4,06	4,16 – 4,06	4,72 – 4,48
61	5,46	5,42	5,50	4,53	5,58 – 5,53	4,64 – 4,70	5,17	4,17	4,24	4,13 – 4,10	4,09 – 4,02	4,51

Tableau 6 : Différences de déplacements chimiques observés en RMN ¹³C entre pyranoside et furanoside

Composé	C-1b	C-2b	C-3b	C-4b	C-5b	C-6b	C-1a	C-2a	C-3a	C-4a	C-5a	C-6a
59	108,3	83,6	75,9	78,6	68,8	80,5	98,5	78,3	68,6	68,9	68,5	83,2
61	105,7	82,2	76,2	80,9	70,1	80,8	106,1	86,1	76,2	84,7	69,7	83,7

Les entités furanosyle possédant des carbones anomères avec des déplacements chimiques supérieurs à 100 ppm, nous avons émis l'hypothèse de la présence d'un résidu pyranosidique. Cette idée a été confortée en comparant les déplacements chimiques des deux C-4a passant de 68,9 ppm pour **59** à 84,7 ppm pour **61**. Ceci indique que dans le cas du deuxième composé, le C-4a est plus proche de l'oxygène du cycle que dans le cas de **59**. Enfin, la constante de couplage de 3,6 Hz entre H-1a et H-2a de **59** confirme définitivement la présence d'un cycle pyranosidique de configuration α lié au niveau de l'oxygène 2 du cycle furanosidique.

De la même manière, nous sommes arrivés à la conclusion que le composé **60** comprend un cycle pyranosidique relié en (1→3) à un cycle furanosidique et que **62** est composé de deux cycles furanosidiques liés en (1→3).

Tous les composés disaccharidiques peuvent ainsi être différenciés par le déplacement chimique ¹H et ¹³C de l'anomère de l'entité réductrice comme décrit dans le tableau 7 suivant.

Tableau 7 : Déplacements chimiques des protons et carbones anomères de l'entité réductrice

Composé	61	62	63	59	60
cycle	furanose	furanose	furanose	pyranose	pyranose
δ H-1a (ppm)	5,14	4,97	4,94	5,07	4,97
δ C-1a (ppm)	106,1	108,4	107,9	98,5	98,5

e) Identification des trisaccharides (58 et 64)

Les trisaccharides **58** et **64** ont été mis en évidence par analyse HRMS avec un pic de m/z de 1145,39. Cependant, l'interprétation des spectres RMN et l'attribution des signaux ont été plus complexes du fait que les composés n'ont pas pu être parfaitement purifiés après colonne de gel de silice. De plus, de nombreux pics se chevauchent dans la zone des 60-100 ppm en RMN ¹³C.

De la même manière que pour les disaccharides, un composé (**58**) contenant un résidu pyranosidique a pu être observé, notamment grâce au signal spécifique de C-1a en RMN ¹³C à 98 ppm. A l'aide des

corrélations du spectre COSY, il a été aisé de remonter aux protons H-2a à H-5a du cycle pyranosidique correspondant. Le spectre HSQC a permis d'identifier les protons et carbones anomères des deux autres entités sucres (b et c). L'analyse HMBC a alors confirmé que les carbones C-2a et C-3a du cycle pyranosyle sont corrélés avec les deux autres protons anomères présents comme on peut le voir sur la figure 39. Cela a validé la présence d'un trisaccharide branché à la fois en O-2a et en O-3a.

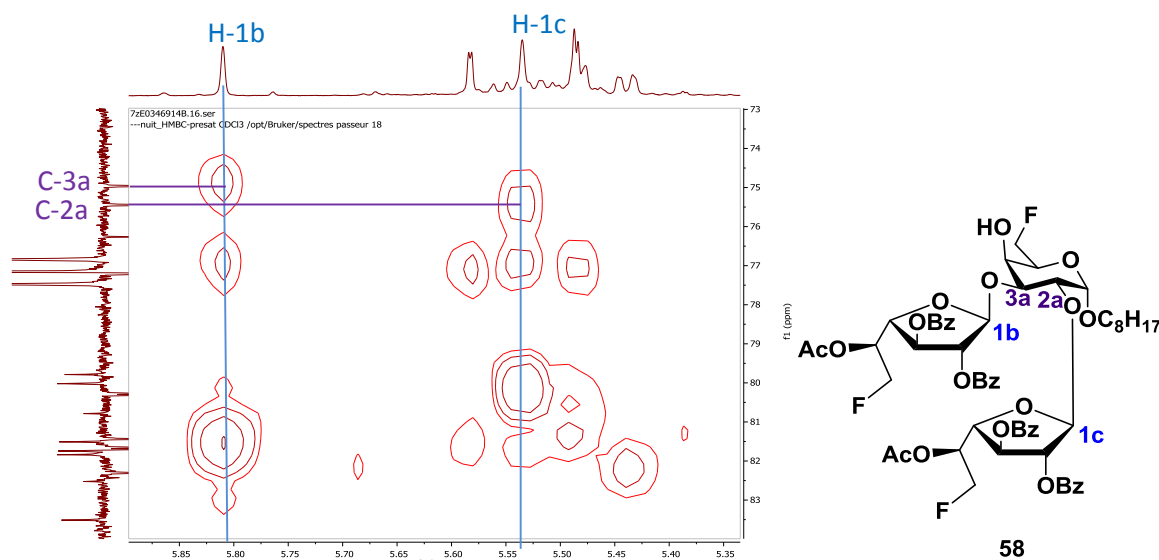


Figure 39 : Corrélation entre les protons anomères et C-2 et C-3 de l'entité réductrice sur le spectre HMBC du trisaccharide 58 dans CDCl_3

Si on décrit rapidement le cheminement que nous avons suivi pour le composé **58**, avec le spectre HMBC nous avons identifié les carbones C-2b et C-2c (corrélations avec les H-1b,c) des deux entités furanosyle, puis les H-3b,c (corrélations avec les C-2b,c) et les C-4b,c (corrélations avec les H-1b,c et vérification avec les constantes de couplages C,F). Les couples carbone-protons des trois C-5 et des trois C-6 ont été identifiés grâce à leur constante de couplage C,F. Le C-5a et le C-6a du pyranoside ont été attribués par analogie avec les disaccharides **59** et **60**. Les H-5b et H-5c et C-5b et C-5c des entités furanosidiques sont également semblables aux signaux équivalents sur les composés **59** et **60**. Pour les fonctions CH_2F , nous n'avons malheureusement pas pu les attribuer avec certitude à un cycle plutôt qu'à un autre. Les protons font partie d'un massif regroupant les 6 protons H-6. Les déplacements chimiques des carbones sont trop proches et ces atomes sont caractérisés par la même constante de couplage C,F. De plus, l'analyse HMBC ne nous a pas permis de remonter assez loin dans les liaisons dans les différents cycles puisque les protons H-5b et H-5c ainsi que H-4b et H-4c sont présents au sein des mêmes massifs.

Pour le composé trifuranosidique **64**, la quantité en composé isolé n'a pas permis une caractérisation complète de la molécule par RMN. L'analyse HMBC permet tout de même de statuer sur la régiosélectivité (1→2) et (1→3) des liaisons glycosidiques.

3) Réaction de glycosylation entre l'accepteur fluoré **36** et les donneurs non fluorés **56** et **57**

Afin de pouvoir étudier l'impact de l'atome de fluor en position 6 du donneur sur la synthèse de disaccharides, nous avons expérimenté ces réactions dans les conditions optimisées décrites précédemment sur des donneurs non fluorés possédant donc un groupement benzoyle en position primaire (tableau 8). Cela nous a également permis d'accéder à une librairie de glycolipides monofluorés potentiellement intéressants pour étudier leurs propriétés biologiques.

Comme pour les réactions de glycosylation entre un accepteur (**36**) et un donneur fluoré (**52** et **53**), lorsque que le donneur est benzoylé en position 6 (**56** et **57**), nous avons observé de nombreux produits de structures différentes (figure 40). Nous avons donc retrouvé les produits d'hydrolyse, de transglycosylation ainsi que plusieurs disaccharides comportant des cycles pyranosyle et/ou furanosyle et également des trisaccharides.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des réactions de glycosylation entre donneur non fluoré et l'accepteur **36 (structures figure 40)**

Entrée	Donneur (éq)	Promoteur (éq)	Température (°C)	Tamis moléculaire	Produits formés (rendement)
1	56 (1,2)	NIS/TMSOTf (2,3/0,5)	-50	Non	67 (57%), 68 (6%), 69 (5%), 70 (10%)
1'	56 (1,2)	NIS/TMSOTf (2,3/0,5)	-50	Non	71 (8%), 72 (4%), 73 (7%), 74 (44%)
2	57 (1)	AgOTf (1)	TA	Non	72 (7%), 75 (43%), 74 (45%)
3	57 (1)	AgOTf (1)	TA	Oui	68 (7%), 69 (5%), 70 (10%), 75 (42%), 74 (2%)
4	57 (1)	AgOTf (1)	-50	Oui	68 (7%), 69 (4%), 70 (8%), 75 (49%), 74 (8%)

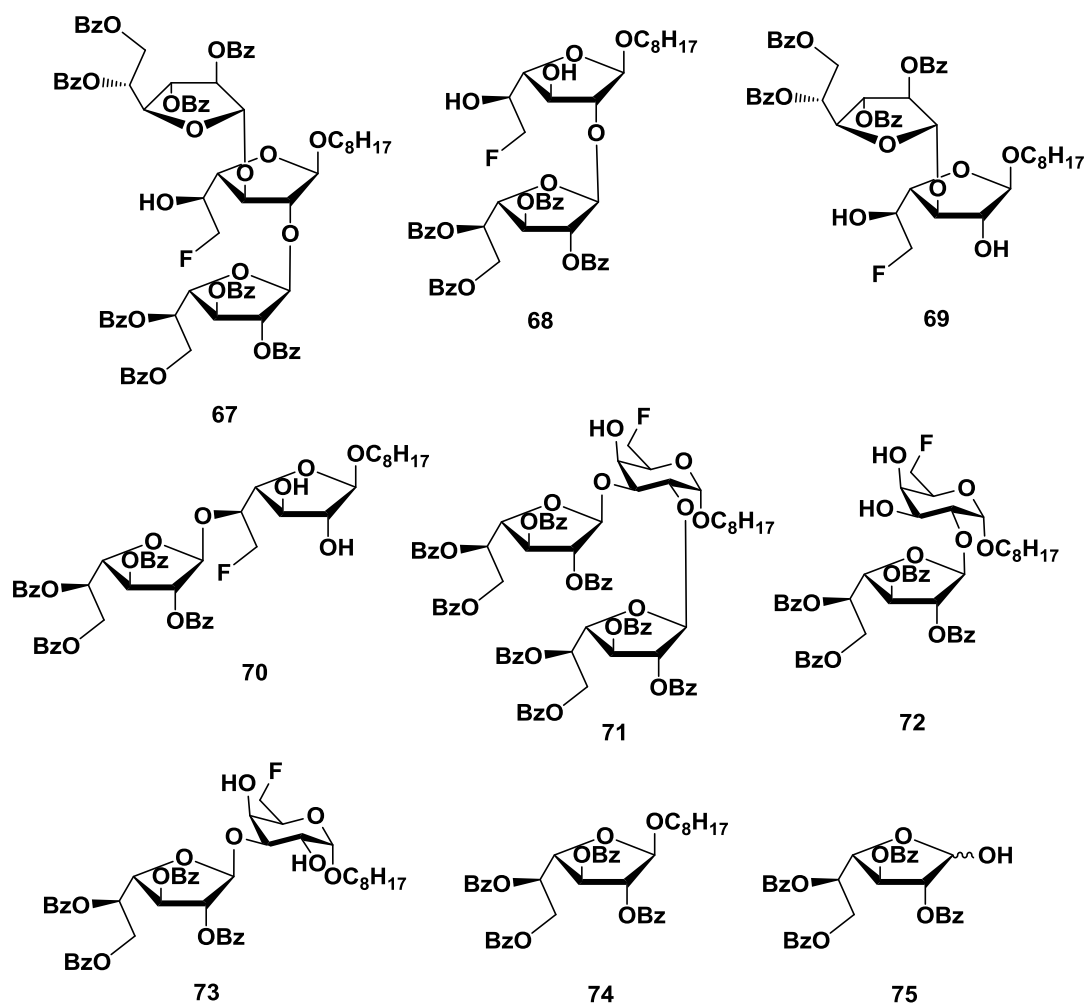


Figure 40 : Structures des composés issus de la glycosylation entre l'accepteur 36 et les donneurs non fluorés 56 et 57

a) Produit d'hydrolyse des donneurs 75

Malgré toutes les précautions prises afin de limiter l'hydrolyse du donneur (ajout de tamis moléculaire 4 Å, maîtrise de la température), le produit d'hydrolyse **75** a été obtenu en quantité importante à partir du donneur bromé **57** (tableau 8, entrées 3 et 4). Un ratio α/β d'environ 30/70 a été observé (calculé par rapport à la RMN ¹H). Ce composé a été facilement identifié grâce à la HRMS ($m/z=619,1576$) ainsi que par RMN.

b) Produit de la transglycosylation 74

La présence du composé **74** issu de la transglycosylation, qui présente à la fois les caractéristiques d'une chaîne grasse et celle de groupements benzoyle sur un unique motif sucre, a été observée en analyse HMBC. Nous sommes encore en présence du produit de transglycosylation issu du transfert de la chaîne octyloxy de l'accepteur sur le squelette du donneur. La configuration a été confirmée

grâce à l'absence de constante de couplage entre H-1 et H-2, caractéristique des composés β furanosidiques

c) Disaccharides 68, 69, 70, 72 et 73

De la même manière que décrit pour les composés difluorés **59** et **60**, des produits comportant un cycle pyranosidique ont été identifiés (tableau 8, entrées 1' et 2).

Nous avons observé que les déplacements chimiques des couples C,H anomères sont semblables pour les composés **59** à **63** à ceux de leurs équivalents monofluorés (**68-70, 72, 73**). On retrouve ainsi les mêmes caractéristiques RMN ^{13}C et ^1H pour la partie réductrice du disaccharide (a), les seuls changements significatifs entre **59** et **72** étant dus à la présence du groupement benzoyle en O-6b à la place de l'atome de fluor. Les protons H-5b sont déplacés vers les champs faibles ($\Delta\delta=0,5$ ppm). Il en est de même pour les signaux de H-4b et H-3b, mais dans de moindres proportions, comme on peut le voir sur les spectres ci-dessous (figure 41, en rouge le composé **59** difluoré et en bleu **72** monofluoré).

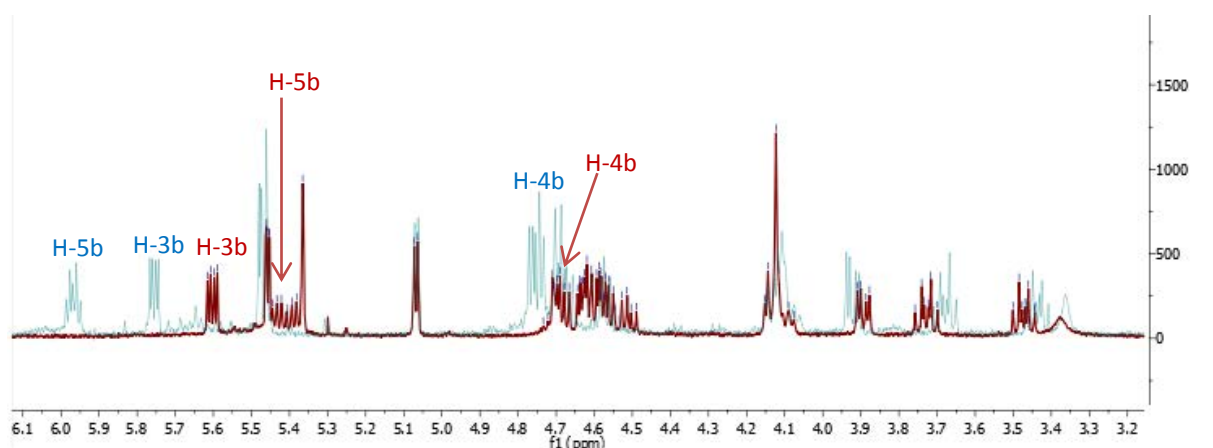


Figure 41 : Superposition des spectres ^1H des disaccharides dans CDCl_3 , en rouge le composé difluoré **59, en bleu le composé monofluoré **72****

A la différence des composés difluorés, les disaccharides monofluorés entièrement sous forme furanosidique (**68, 69, 70**) n'ont pas pu être séparés les uns des autres. Le spectre de masse ainsi que les spectres RMN nous ont permis de trancher entre deux possibilités : (i) la présence de trisaccharides ou (ii) la présence de plusieurs disaccharides. Le spectre HRMS révèle un pic de $m/z = 895,3315$ correspondant à la masse $[\text{M}+\text{Na}]^+$ d'un disaccharide, et la RMN confirme cette structure par la présence de trois doublets de $^2J_{\text{C,F}}$ environ égales à 170 Hz en ^{13}C . Cela signifie que nous sommes en présence de trois groupements CH_2F . Ainsi, nous avons obtenu un mélange de trois produits de couplage (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3) et (1 $\rightarrow$ 5). Malgré cette superposition de spectres, les résultats

des analyses RMN ^1H et ^{13}C sont facilement exploitables. On peut voir sur la figure 42, le spectre RMN ^1H du mélange des trois disaccharides, que les pics sont assez bien définis pour permettre une identification et une caractérisation des différents produits.

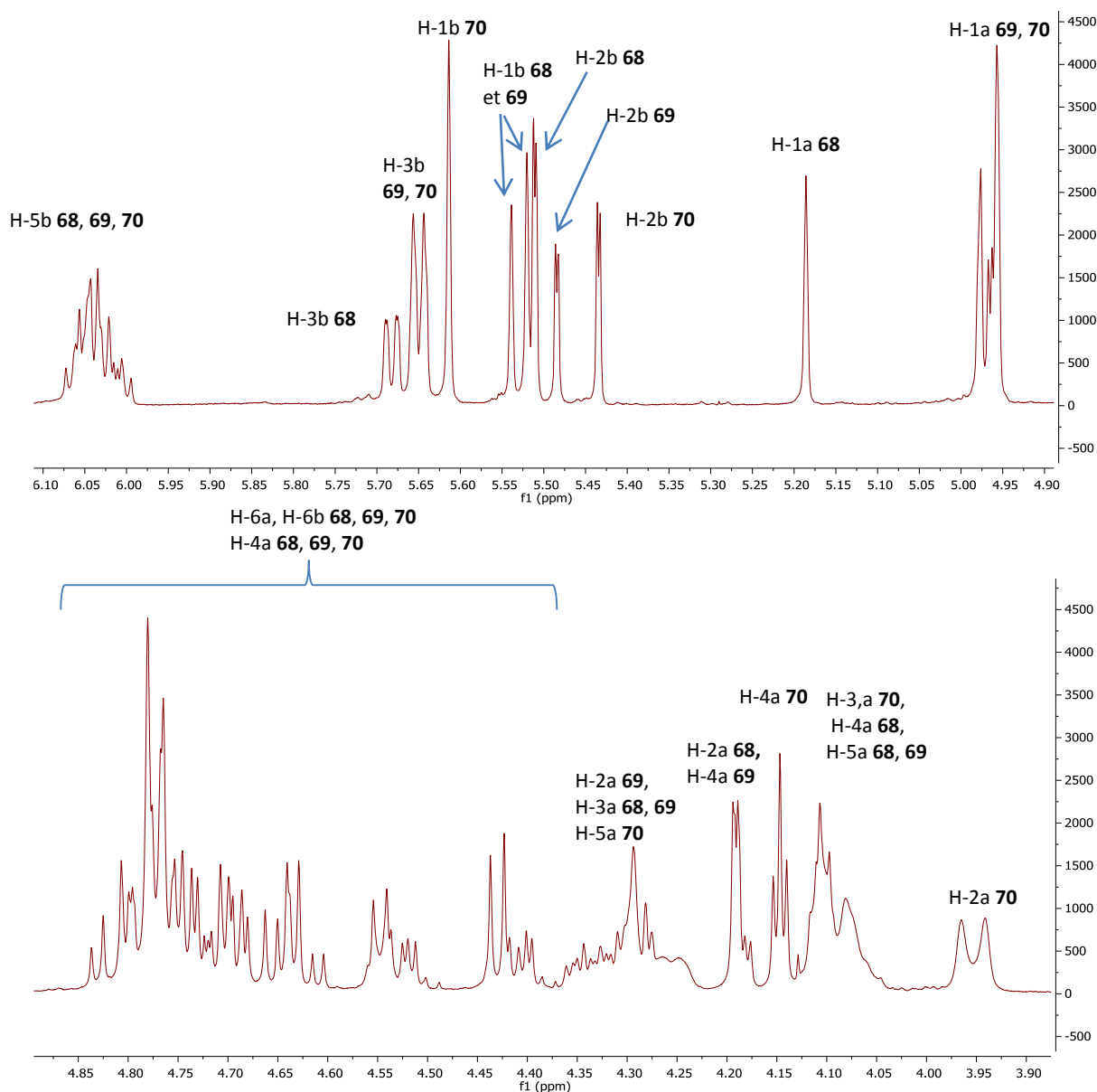


Figure 42 : Spectre ^1H (CDCl_3) du mélange des trois disaccharides monofluorés

Les six unités furanosidiques des trois disaccharides **68**, **69**, **70** ont été repérées *via* les déplacements chimiques de leur carbone et leur proton anomère dont les valeurs sont répertoriées dans le tableau 9. Les expériences COSY, HSQC et HMBC ont permis d'identifier chaque proton (figure 42) et carbone de chaque cycle. Enfin, l'analyse HMBC a également mis en évidence la régiosélectivité des liaisons glycosidiques. Les seules incertitudes restantes ont concerné les déplacements des C-5 (excepté pour le disaccharide (1 $\rightarrow$ 5) **70**) et des C-6-H-6. En effet, les protons H-5 présentent des déplacements chimiques semblables, on a observé un multiplet de 4,12 à 4,09 ppm pour les entités réductrices (a)

et un autre de 6,08 à 5,99 ppm pour les non réductrices (b), ce qui a limité l'identification des carbones C-5 avec le spectre HSQC. Les signaux de carbone ont donc été attribués en fonction de leurs intensités en posant l'hypothèse que les ratios observés en RMN ^1H sont respectés en ^{13}C (ratio **68/69/70** de 30:25:45). Ainsi, le pic le plus intense ($\delta=69,7$ ppm) a été attribué au C-5b du composé **68** et le signal de plus faible intensité ($\delta=69,2$ ppm) a été attribué au C-5b de **69**. De la même façon, les protons H-6 se trouvent tous dans un multiplet très étendu (de 4,85 à 4,60 ppm) et nous n'avons pas pu les distinguer. Pour l'attribution des signaux des carbones, le choix de l'identification en lien avec l'intensité du signal en carbone a encore été retenu. Ainsi, les pics en RMN ^{13}C les plus intenses ont été attribués aux C-6a et C-6b de **70** (63,5 et 83,6 ppm), les plus faibles aux C-6 de **69** (63,4 et 84,0 ppm) et les intermédiaires à ceux de **68** (63,3 et 83,7 ppm).

Tableau 9 : Récapitulatif des déplacements chimiques des protons et carbones anomères des disaccharides monofluorés **68 à **73****

Composé	68	69	70	72	73
δ H-1 (ppm)	5.18	4.98	4.95	5.07	4.96
δ C-1 (ppm)	106.0	108.5	107.9	98.5	98.5

d) Trisaccharides

Les équivalents trisaccharidiques des composés multifluorés **58** et **64** ont également pu être observés en série monofluorée (**71**, **67**). Cependant, si la purification ainsi que la caractérisation du produit comportant un résidu pyranosidique ont été aisées, le composé comportant trois cycles furanosidiques **67** n'a pas pu être isolé. Il est retrouvé dans un mélange contenant également les trois disaccharides possibles (**68**, **69** et **70**). L'analyse HRMS a permis d'identifier le trisaccharide avec une valeur de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de 1473,4891 (valeur théorique de 1473.48884) et un signal de m/z avec $z=2$ de 748,2388 (valeur théorique de 748,23903). Cependant, l'échantillon est également constitué de disaccharides ($[\text{M}+\text{Na}]^+=895,3301$). De plus, les spectres RMN sont trop semblables entre tri- et disaccharides pour pouvoir identifier spécifiquement les signaux de **67**.

Le composé **71**, comportant un cycle pyranosidique et deux cycles furanosidiques branchés en (1→2) et (1→3), a pu être isolé grâce à une purification sur colonne de gel de silice et les analyses RMN ont permis d'en faire une caractérisation complète en utilisant la même méthode que pour les autres composés.

4) Discussion

a) Analyse d'ensemble des résultats

Tout au long de nos différentes tentatives de synthèse des disaccharides, nous avons été confrontés à la **faible réactivité** des donneurs et de l'accepteur de glycoside. Les rendements obtenus lors des réactions de glycosylation sont restés modérés et n'ont pas dépassé 50% (somme des rendements des oligosaccharides). Malgré la recherche d'une optimisation des conditions de la réaction (nature du donneur, température, quantité de promoteur, nature du solvant), les rendements n'ont pas varié de manière significative et sont restés de l'ordre de 5 à 10% par di- et trisaccharide. Deux sous-produits ont été formés en quantités non négligeables, le produit d'**hydrolyse des donneurs** (**65** et **75**) et le **produit de transglycosylation** (**66** et **74**). Cependant, la taille du cycle ainsi que la formation de sous-produits (**66** et **74**) ont pu être maîtrisées. De plus, l'**isomérisation** de l'accepteur sous forme pyranose a posé des problèmes de reproductibilité des expériences.

b) Hydrolyse et transglycosylation

Malgré un contrôle des conditions de la réaction, et notamment de l'aspect anhydre des solvants, les donneurs bromés ont été constamment hydrolysés. Ce problème n'a pas été observé lors de l'utilisation du thioglycoside, moins sensible à l'hydrolyse. Le **produit d'hydrolyse** est un sous-produit très commun aux réactions de glycosylation et, bien qu'il ne soit pas toujours reporté dans les publications, il est presque constamment présent.³⁶ Cette hydrolyse est plus importante dans le cas du donneur **57** non fluoré. Elle a cependant été limitée par l'ajout de tamis moléculaire 4 Å. Il est à noter que l'ajout du tamis moléculaire a également pour effet de limiter l'obtention des produits de transglycosylation **66** et **74**.

D'un point de vue mécanistique, le **produit de transglycosylation** peut se former à partir d'un intermédiaire oxonium. Nous nous sommes alors demandé d'où pouvait provenir la chaîne octyloxy observée en position anomère des composés **66** et **74**. L'éventualité d'un reste d'octanol de la première étape de synthèse a rapidement été écartée. Une cristallisation et plusieurs purifications par chromatographie sur colonne de gel de silice ont été réalisées avant d'obtenir l'accepteur **36**. La présence d'octanol après toutes ces étapes de purification, avec des différences de polarité aussi importantes (entre le composé **38** et **45** par exemple) a donc été éliminée. La chaîne carbonée pourrait alors provenir, soit de l'hydrolyse de l'accepteur, soit de l'accepteur lui-même. Afin de vérifier si l'accepteur est hydrolysé, nous avons placé **36** dans les mêmes conditions que lors d'une réaction de glycosylation (solvant, promoteur, temps de réaction) mais en l'absence du donneur. Aucun produit d'hydrolyse n'a été obtenu, que ce soit le sucre libre en position anomère ou de

l'octanol. Cela signifie donc que **36** ne s'hydrolyse pas et que la chaîne octyle des produits **66** et **74** provient directement de l'accepteur **36** lui-même.

L'hypothèse proposée repose sur la **formation de liaisons faibles** entre les doublets non-liants des différents atomes d'oxygène des composés **52**, **53**, **56**, **57** et le carbocation oxocarbenium formé (sur le schéma 23 on peut voir les interactions possibles avec l'oxygène du cycle et O-1 mais il est possible également d'envisager une **interaction avec O-3**, **77**). La chaîne alcooxyle se trouve alors proche dans l'espace, la liaison C-1-O-1 est suffisamment affaiblie de sorte que le **transfert d'aglycone** de **36** vers **77** peut s'opérer.

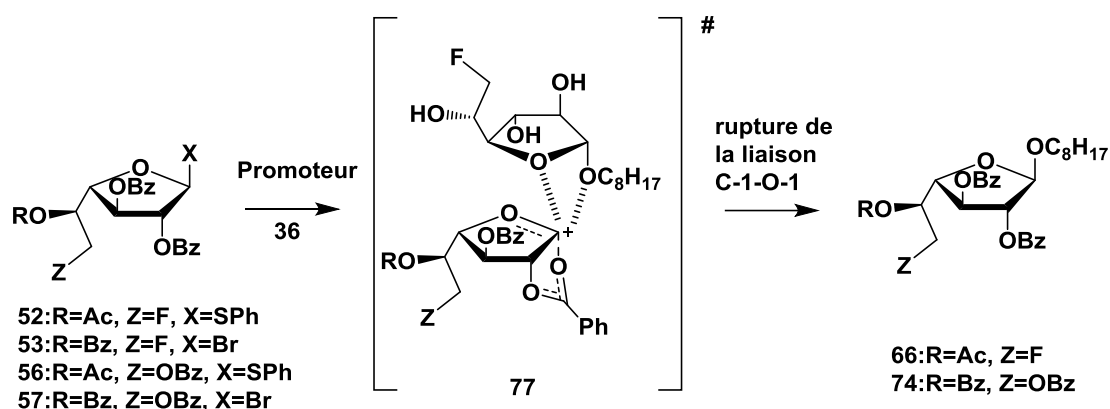


Schéma 23 : Hypothèse permettant d'expliquer la transglycosylation

Les quantités de produits de transglycosylation formés au cours des différentes réactions de glycosylation peuvent représenter jusqu'à 64% de rendement (tableau 4, entrée 1). Les composés **66** et **74** ont été obtenus, quelle que soit la nature du donneur ou celle du promoteur utilisé, quelle que soit la concentration de ce dernier dans le milieu réactionnel. Il est tout de même intéressant de noter que les plus grandes quantités de produits de transglycosylation ont été obtenues lorsque l'accepteur subit une extension de cycle. Ces deux processus peuvent donc être liés.

c) Ouverture de cycle

La formation des composés **58**, **59**, **60**, **71**, **72** et **73** est totalement surprenante. L'**ouverture du cycle furanosidique** a déjà été observée par Pedersen et coll.³⁷ au cours de la réaction de glycosylation entre un arabinofuranoside de méthyle par différents uraciles. En plus du produit souhaité, le produit acyclique a également été synthétisé. Comme dans le cas présent, le promoteur utilisé est le TMSOTf, mais la réaction est réalisée à température ambiante. En fonction de la nature des uraciles, 3 à 48% de produits acycliques ont été isolés. A -30 °C, ces produits ont été obtenus avec un rendement de 5% uniquement.³⁸ Selon ses travaux, Pedersen explique l'ouverture de cycle par la silylation de l'oxygène O-4 du furanose, ce qui favorise la formation d'un ion carbonium acyclique qui

peut alors subir une attaque nucléophile (schéma 24). Dans notre cas, le nucléophile ne peut être que la fonction hydroxyle en C-5.

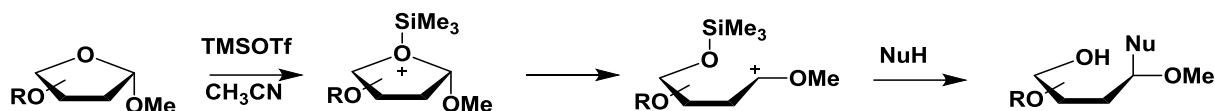
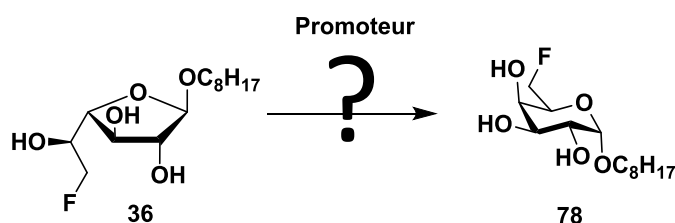


Schéma 24 : Ouverture du cycle furanose ³⁸

Afin d'identifier le paramètre influant sur l'ouverture du cycle furanose, nous avons placé l'accepteur **36** dans les conditions des réactions de glycosylation, en l'absence de donneur pendant 3 heures, durée de la réaction de glycosylation (récapitulatif des conditions dans le tableau 10).

Tableau 10 : Tableau des conditions testées pour isomériser l'accepteur **36**



Entrée	Promoteur	équivalent	Solvant	Tamis	Isomérisation
1	AgOTf	1	ACN	Non	Non
2	AgOTf	1	ACN	Oui	Non
3	AgOTf + H ₂ O	1	ACN	Non	Non
4	NIS/TMSOTf	2,3/1,2	DCM	Non	Non
5	TfOH	1	DCM	Non	Oui
6	TfOH	1	DCM	Oui	Non

L'évolution du milieu réactionnel a été suivie par RMN ¹³C puisque le signal du carbone anomère est déplacé vers les champs forts de 105 ppm à 100 ppm, entre le furanoside et le pyranoside. Comme nous l'avons supposé, au vu de nos résultats de glycosylation, aucune isomérisation n'a été observée avec AgOTf en présence de tamis moléculaire (tableau 10, entrée 2). Plus étonnant, aucune isomérisation n'a été obtenue en l'absence de tamis moléculaire (entrée 1). Afin de favoriser le plus possible l'ouverture de cycle, nous avons effectué ce même test en ajoutant 0,5 éq d'eau (entrée 3). Là encore, aucune isomérisation et aucune hydrolyse n'ont été observées. Cela signifie donc que le tamis ne sert qu'à limiter l'hydrolyse des donneurs mais qu'il n'a joué aucun rôle dans l'isomérisation

du cycle furanosidique. Pour ce qui est du couple NIS/TMSOTf, on peut remarquer dans les tableaux 3 et 8 que lorsque le TMSOTf est introduit en quantité catalytique (0,5 éq), les produits d'isomérisation n'ont pas été formés. Cependant, ils sont synthétisés lorsque cette quantité atteint 1,2 éq. Or, lorsque l'accepteur **36** a été placé dans ces conditions, aucune isomérisation n'a été observée (δ C-1=108 ppm) (tableau 10, entrée 4).

Cependant, les deux promoteurs utilisés (AgOTf et NIS/TMSOTf) engendrent la production d'**acide triflique** (TfOH). Nous avons donc décidé de tester la stabilité de l'accepteur **36** en présence de cet acide (tableau 10, entrée 5). En présence d'un équivalent de TfOH, **36** est effectivement isomérisé sous **forme pyranosidique 78** (δ C-1=98,9 ppm). Néanmoins, en présence de tamis moléculaire, cette isomérisation n'a pas lieu (entrée 6). Cela explique ainsi la formation des produits furanosidiques avec AgOTf lorsque le tamis est utilisé. Diminuer la quantité de TMSOTf de 1,2 à 0,5 éq a donc également réduit l'impact de TfOH.

Sur la base de cet ensemble d'observations, nous supposons que le donneur réagit avec le promoteur afin de former un carbocation stabilisé sous forme d'acyloxonium **77**. Ce dernier interagit ensuite avec l'accepteur par **liaisons hydrogène** (schéma 25). L'acide trifluorométhanesulfonique formé *in situ* ou l'acide de Lewis utilisé comme promoteur peuvent **coordonner l'oxygène 4** de l'accepteur (**79**), **affaiblissant ainsi la liaison O-4-C-1** jusqu'à l'ouverture de cycle. L'oxygène en position 5 peut ensuite attaquer le C-1 pour former un **cycle pyranosidique (80)**. Le composé résultant est enfin susceptible de réagir avec le donneur pour former des di- ou trisaccharides.

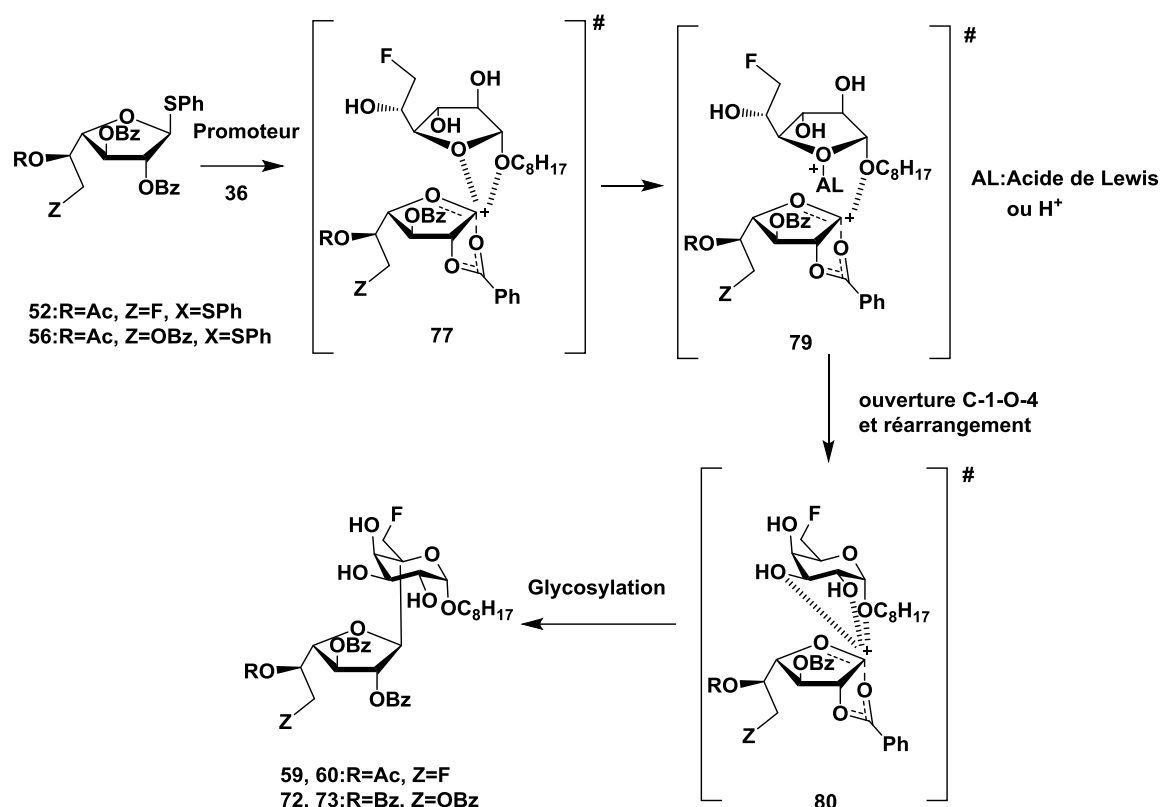


Schéma 25 : Proposition d'explication de l'isomérisation de l'accepteur **36** du donneur de glycoside

d) Influence du fluor

Avant d'expérimenter les réactions de glycosylation, plusieurs hypothèses ont été avancées :

- Le fluor étant très **électroattracteur**, il peut modifier la réactivité de l'hydroxyle en 5 de **36**, rendant ainsi l'oxygène moins nucléophile vis-à-vis du donneur. Nous n'attendons pas de disaccharide (1→5).
- Cet effet inductif pourrait se propager au-delà de C-5 et ainsi orienter la réaction de glycosylation soit en position 2, soit en position 3 de l'accepteur.
- Le fluor en C-6 du donneur pourrait influencer les réactions de glycosylation positivement ou négativement (en termes de rendements) comparé au donneur non fluoré.

Les résultats obtenus expérimentalement lors des réactions de glycosylation ont démontré que malgré l'électronégativité de l'atome de fluor, les **disaccharides (1→5)** ont bien été synthétisés (lorsqu'il n'y a pas d'isomérisation de l'accepteur). Les quantités obtenues sont non négligeables (jusqu'à 11% de rendement) et parfois même supérieures à celles des autres disaccharides (1→2) et (1→3) (tableaux 3 et 8). L'électronégativité du fluor n'influence donc pas sur la régiosélectivité de la réaction de glycosylation.

De la même manière, **aucune tendance particulière sur la régiosélectivité** de la liaison glycosidique n'a pu être mise en évidence à partir des résultats expérimentaux. Que ce soit pour les composés entièrement sous forme furanose ou pour les composés mixtes pyranose/furanose, les différents disaccharides ont été synthétisés dans des ordres de grandeur équivalents (15-20% de rendement). Dans le cas des trisaccharides, les résultats sont relativement inattendus. Il est donc difficile d'en tirer des conclusions quant à l'influence du fluor sur la réactivité d'un des oxygènes. De plus, aucun résultat n'a pu être trouvé dans la littérature sur la synthèse de tels glycosides. S'il existe de nombreuses références pour la fluoration des sucres sous forme de mono- ou d'oligomères,^{39,40} rares sont celles qui traitent de la réactivité de ces composés dans des réactions de glycosylation. Le fluor est en général utilisé pour substituer le groupement hydroxyle en position 2 du donneur afin d'orienter la glycosylation vers le produit 1,2-*trans*.^{41,42} Par ailleurs, les accepteurs étudiés n'étaient pas fluorés ou ne possédaient qu'un seul hydroxyle capable d'attaquer le donneur.⁴³ Ainsi, aucune étude n'a été menée afin de déterminer si le fluor influence la nucléophilie et la réactivité des différents hydroxyles d'un accepteur, d'autant plus en série furanose.

En comparant les rendements obtenus lors des glycosylations avec des donneurs fluorés et avec des donneurs non fluorés, on s'aperçoit que la présence du fluor n'a pas impacté les rendements en disaccharides. Il semblerait tout de même que la présence du fluor ait limité la réaction d'hydrolyse des donneurs bromés. On a observé une hydrolyse maximale avec un rendement de 20% de **53** contre 49% pour **57**. En outre, la présence du fluor sur les donneurs semble favoriser l'obtention de trisaccharides, isolés une seule fois dans le cas de donneur non fluoré (tableau 8, entrée 1), mais dans presque toutes les glycosylations mettant en jeu un donneur fluoré (tableau 3, entrées 1, 3, 4, 5).

e) Calculs théoriques

Afin d'appuyer nos résultats, nous avons évalué par le calcul le potentiel de l'accepteur **36** à réagir avec les différents donneurs (pour simplifier les calculs, la chaîne octyle de **36** a été remplacée par un simple méthyle, appelé alors **36'**). Pour cela, nous avons calculé les **indices de Fukui**.⁴⁴ La fonction de Fukui décrit la densité électronique d'un atome après avoir ajouté ou retiré un électron. Cela permet de déterminer les **sites les plus électrophiles** et les **plus nucléophiles** d'une molécule.

Les fonctions de Fukui peuvent être définies pour une attaque électrophile, f^- , quand un électron est retiré de l'atome étudié, ou une attaque nucléophile, f^+ , quand un électron est ajouté.

$$f^- = \rho(N) - \rho(N - 1)$$

$$f^+ = \rho(N + 1) - \rho(N)$$

ρ : densité électronique

$N - 1$: état cationique

N : état neutre

$N + 1$: état anionique

Ce travail peut également être fait à l'échelle atomique en calculant les fonctions de Fukui condensées.⁴⁵

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1)$$

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N)$$

q_k : charge atomique de l'atome K

Ces charges atomiques peuvent être calculées selon plusieurs modèles (Hirshfeld, Mulliken,⁴⁶ Voronoi, Bader,⁴⁷ etc).

Afin de déterminer la nucléophilie de chaque hydroxyle, la conformation de la molécule a dans un premier temps été optimisée. Deux conformations ont été retenues dans le cas de l'accepteur **36'** (figure 43). Elles correspondent toutes les deux à des minima locaux d'énergie (calculés par DFT : Density Functionnal Theory). Les calculs ont été menés *via* deux fonctionnelles différentes (B3LYP et M06-2X). La différence la plus importante entre ces deux conformations est l'orientation du bras C-4-C-5-C-6 supportant l'atome de fluor (figure 43). Les deux conformations sont presque iso-énergétiques avec le conformère A plus stable que le B de 0,03 eV selon B3LYP, alors que le résultat contraire est observé avec M06-2X. Bien que les valeurs obtenues soient différentes, les tendances sont les mêmes et seuls les résultats calculés avec B3LYP sont présentés ici (tableaux complets dans la partie expérimentale).

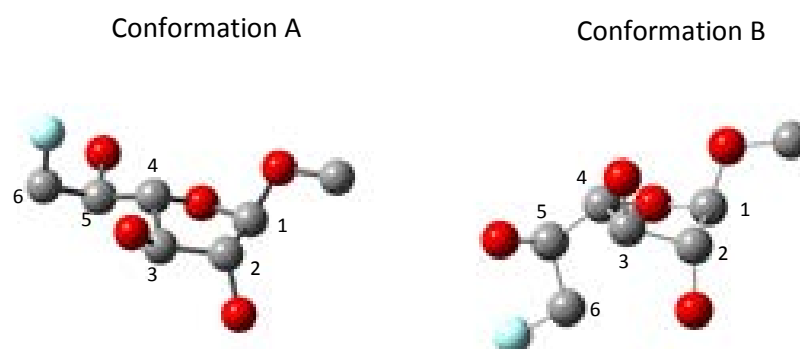


Figure 43 : Conformations les plus stables optimisées par DFT

Tableau 11: Valeurs des fonctions de Fukui condensées pour les deux conformations de l'accepteur

f_k^- : conformation A					f_k^- : conformation B				
	Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader
O-1	0.18	0.17	0.19	0.26	O-1	0.19	0.18	0.20	0.32
O-2	0.11	0.11	0.10	0.07	O-2	0.09	0.09	0.08	0.03
O-3	0.09	0.09	0.08	0.10	O-3	0.10	0.10	0.10	0.12
O-4	0.04	0.04	0.04	-0.02	O-4	0.05	0.04	0.05	0.03
O-5	0.03	0.03	0.03	0.02	O-5	0.02	0.02	0.02	0.01
f_k^+ : conformation A					f_k^+ : conformation B				
	Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader
O-1	0.01	0.01	0.01	0.00	O-1	0.01	0.01	0.01	-0.02
O-2	-0.06	0.15	0.09	0.27	O-2	-0.07	0.16	0.09	0.29
O-3	0.01	0.01	0.01	0.00	O-3	0.01	0.01	0.01	0.01
O-4	0.01	0.01	0.01	0.01	O-4	0.01	0.01	0.01	-0.02
O-5	0.00	0.00	0.00	-0.00	O-5	0.00	0.00	0.00	0.00

Les valeurs les plus importantes de f_k^- correspondent aux sites les plus nucléophiles de l'accepteur, donc les sites les plus à même de former une liaison glycosidique avec le donneur. Dans le tableau 11, on voit donc que les oxygènes en position 1, 2 et 3 sont les plus nucléophiles. Cela confirme une de nos hypothèses de base : les disaccharides (1→2) et (1→3) sont théoriquement plus attendus que le régioisomère (1→5). La différence de réactivité entre les deux est très faible, ce qui confirme également l'idée que nous ne pouvions pas prédire quel disaccharide serait favorisé par rapport à l'autre. Ce résultat met également en lumière la nucléophilie de l'oxygène O-1. Malgré son engagement dans le cycle, il reste, d'après les coefficients calculés, l'oxygène le plus nucléophile de la molécule. Cela pourrait donc expliquer le transfert de la chaîne octyloxy sur le donneur.

D'autre part, on observe que $f_{k\text{ O-5}}^-$ est la valeur la plus faible obtenue pour les atomes d'oxygène. Cela appuie notre hypothèse de départ d'une réactivité moindre de cet hydroxyle lors des réactions de glycosylation, même si les résultats expérimentaux ont démontré une nucléophilie non négligeable (glycosylation et expansion de cycle).

Les valeurs les plus importantes de f_k^+ quant à elles, indiquent les sites les plus électrophiles de **36'**. Ces derniers peuvent mettre en lumière une « fragilité » de la molécule. Le O-2 semble se détacher. Cependant, cette valeur ne permet pas d'expliquer l'isomérisation de l'accepteur observée et la formation de disaccharides de types pyranose-furanose.

Dans une seconde phase de l'approche théorique, nous avons également mené des calculs d'énergie pour les composés **59** et **61**, afin de vérifier si les résultats obtenus peuvent s'expliquer par des facteurs thermodynamiques. Comme nous nous y attendions, le disaccharide comprenant un résidu pyranosidique **59** présente une stabilité largement supérieure à celle de son isomère comprenant deux cycles furanosidiques **61** avec des énergies respectives de -0,44 eV et 0,07 eV.

En conclusion, les deux approches calculatoires tendent à confirmer, au moins partiellement, l'obtention de produit de transfert intermoléculaire d'aglycone, d'isomérisation de cycle mais ne permettant pas de trancher entre facteurs cinétiques ou thermodynamiques.

V Déprotection des oligosaccharides

Les disaccharides et trisaccharides formés ont été déprotégés selon la méthode de Zemplén. Après traitement par de la résine IR 120 H⁺ et évaporation des différents esters formés, nous avons obtenu les composés **81** à **87** sous forme de sucres déprotégés. Seuls ces composés répertoriés sur la figure 44 ont été obtenus dans des quantités suffisantes (quelques mg) pour permettre une caractérisation structurale aboutie.

Les quatre disaccharides **81**, **82**, **83** et **84** ont chacun été obtenus purs avec un rendement minimal de 88%. Au contraire, les composés **85**, **86** et **87** n'ont pas pu être séparés. Malgré cela, l'attribution des pics obtenus lors des analyses RMN a été possible. La déprotection a pu être validée par l'absence des signaux relatifs aux protons aromatiques en RMN ¹H et au signal du carbone de la fonction carbonyle en RMN ¹³C.

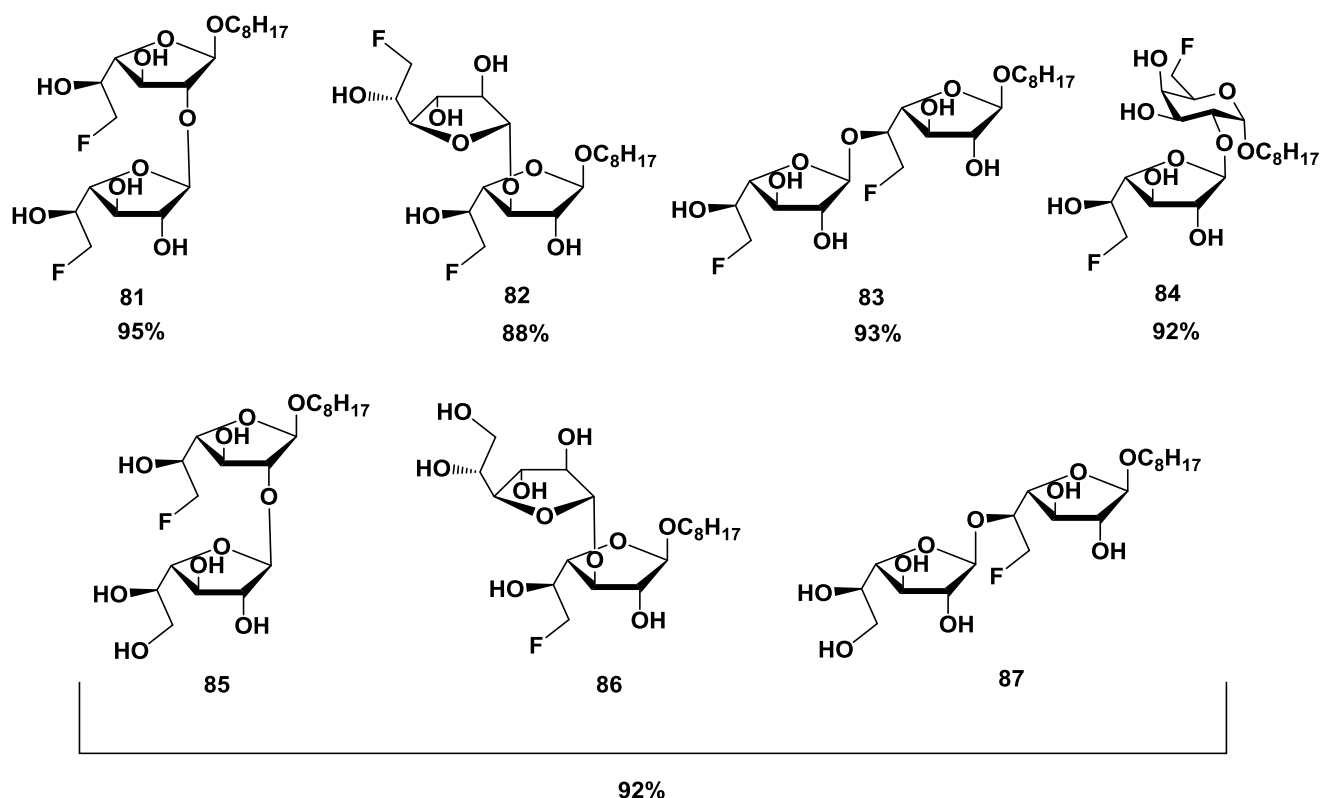


Figure 44 : Structures des sucres déprotégés isolés

Comme pour les disaccharides protégés, les spectres COSY, HSQC et HMBC ont permis d'attribuer tous les signaux obtenus lors des analyses ^1H et ^{13}C . Ainsi, pour les composés **81** et **82**, les deux protons anomères sont facilement identifiables, à plus de 5 ppm ainsi que les carbones anomères en RMN ^{13}C , avec des signaux à plus de 106 ppm. Les spectres COSY et HMBC ont mis en valeur les relations entre les différents protons de chaque entité furanose, ce qui a permis, grâce au spectre HSQC, d'attribuer les différents pics en RMN ^{13}C . La détermination des valeurs des constantes de couplage entre les atomes de carbone 4, 5 et 6 et les atomes de fluor a confirmé ces attributions ($^2J=169,6$ et $170,7$ Hz, $^3J=20,2$ et $18,3$ Hz, $^4J=6,6$ et $6,3$ Hz pour le composé **81**). Le spectre HMBC nous a permis d'identifier l'entité réductrice grâce à la corrélation entre le carbone anomère et le CH_2 de la chaîne carbonée, ainsi que de vérifier la localisation de la liaison glycosidique, en (1 $\rightarrow$ 2) pour **81** et (1 $\rightarrow$ 3) pour **82**. Le spectre de **83**, comme pour les composés protégés, est différent des spectres correspondant à **81** et **82**, en raison de la présence d'un doublet en RMN ^{13}C ($\delta=109,1$ ppm, $J_{\text{C,F}}=3,0$ Hz) pour le carbone anomère de l'entité non réductrice. Les configurations β ont pu être validées par les valeurs des constantes de couplage $J_{\text{H1,H2}}$, toutes inférieures ou égales à 2,0 Hz.

Le seul composé comprenant un résidu pyranosidique déprotégé **84** a facilement été caractérisé par la présence d'un signal à 99,7 ppm sur le spectre RMN ^{13}C , correspondant au carbone anomère du pyranose.

Les trois composés monofluorés **85**, **86** et **87** ont été analysés à partir d'un mélange de ces trois disaccharides. L'analyse HRMS de l'échantillon a confirmé la présence de disaccharides ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ de 481.2262) ainsi que l'absence de trisaccharide puisqu'aucun pic de m/z égale à 641 n'a été observée. Comme pour les composés difluorés, les analyses RMN 2D ont permis d'identifier clairement les différents pics des cycles furanose ainsi que les différents régioisomères.

VI Conclusion

L'objectif de cette partie a consisté à la synthèse de dérivés **mannopyranosylés** et **galactofuranosylés** « clickables » sur une plateforme acétylénique. Quatre monosaccharides ont été préparés : un composé **Man(OCH₂)₂N₃** possédant un court bras espaceur entre le résidu glucidique et la fonction azoture ; **trois azotures de glycosyle** (Manp, Galf, 6F-Galf). Dans tous ces cas, les synthèses se sont avérées efficaces de sorte que les composés ont été isolés avec de très bons rendements et en quantités appréciables (de 45 à 360 mg, tableau 12).

La partie relative à la préparation des **difuranosides** s'est avérée plus difficile. Les cibles n'ayant pas fait l'objet de synthèse par voie chimique, une approche visant à limiter le nombre d'étapes a été proposée non seulement pour produire des difuranosides mais également pour étudier la régiosélectivité de couplages glycosidiques en série furano. Si la réactivité des diverses fonctions hydroxyle est assez bien connue et relativement maîtrisée en série pyrano, il n'en est rien au départ de substrats furanosidiques. Sur la base de résultats du laboratoire, seule la position primaire a été modifiée par fluoration avant de tenter de glycosyler régioselectivement les hydroxyles libres restants. Deux réactions secondaires ont été observées : le **transfert intermoléculaire** de l'aglycone de l'accepteur vers le donneur (réaction pas encore décrite en série *O*-glycosidique) et une réaction **d'expansion de cycle** de l'accepteur. Dans ces deux conditions, sept disaccharides ont été préparés et parfaitement caractérisés (tableau 12). De plus, des mélanges de di- et de trisaccharides ont également été obtenus au cours de cette étude. Ces réactions modèles réalisées à partir de furanosides d'octyle devront être adaptées à la préparation de difuranosides comportant une chaîne azido-alkyle requise pour la conjugaison avec la plateforme lipidique.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des masses des saccharides déprotégés caractérisés

Composé	Masse (mg)
25	363
15	87
16	97
81	15
82	8
83	6
84	10
85+86+87	22

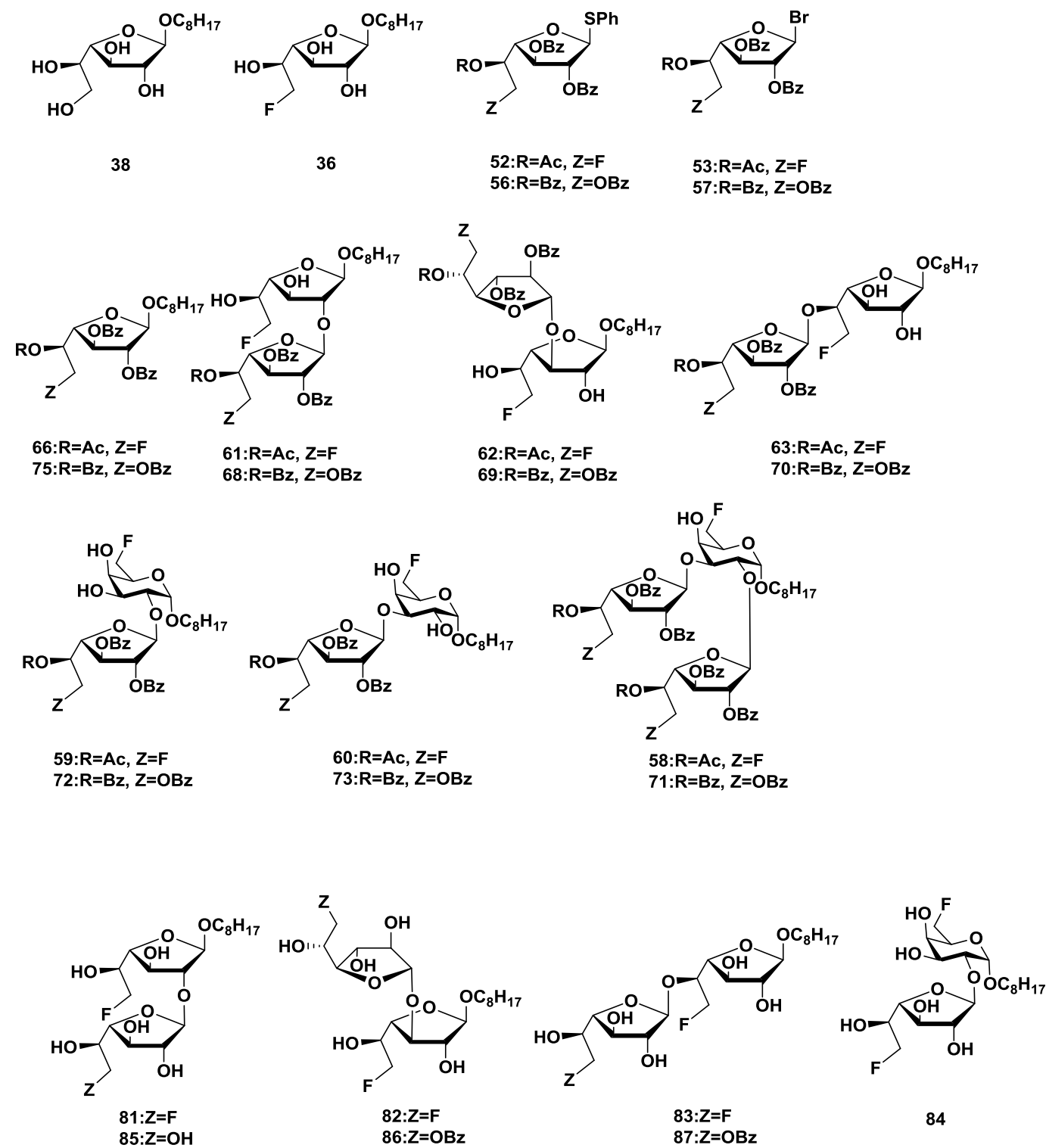


Figure 45 : Structure des réactifs et des produits des réactions de glycosylation

Experimental section

General Experimental Details. Reagents were purchased from commercial sources and were used without further, except octyl galactofuranoside. Dried solvents were purchased sealed. All reactions were monitored by TLC on Silica Gel 60 F254, and spots were detected under 254 nm UV-light and/or by staining with orcinol solution. Column chromatography was performed on Silica Gel (25 or 50 μ m). NMR spectra were recorded at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C . Chemical shifts are given in δ units (ppm) and referenced to either CDCl_3 or CD_3OD . Coupling constants J were calculated in Hertz (Hz). Proton and carbon NMR peaks were unambiguously assigned by COSY (double quantum filtered with gradient pulse for selection), HSQC (gradient echo-antiecho selection and shape pulse) and HMBC (echo-antiecho gradient selection, magnitude mode) correlation experiments. For each isolated compound, the reducing end was quoted as “a”, and nonreducing entity as “b”. High Resolution Mass spectra were recorded in positive mode using direct Electrospray ionization on a Bruker maXis 4G or a Thermo Fisher Q- Exactive spectrometer.

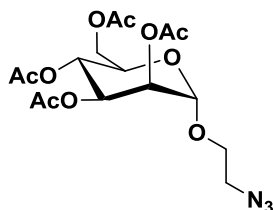
Glycosylation procedures: Yields were calculated from the acceptor quantity.

Glycosylation of acceptor 36 with brominated donors (A): To a solution of the acceptor **36** in dry acetonitrile (75 mM) was added a spoon of previously activated molecular sieves 4 Å. The mixture was left under agitation for 30 min. Donor and then AgOTf were added to the flask and the mixture was stirred at the desired temperature for 2 h. The reaction was quenched by adding Et_3N and silver salts were filtered over celite. Solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (CHex/AcOEt 100:0 up to 0:100) afforded the different products. Yields are given in table 1 .

Glycosylation of acceptor 36 with thioglycosides (B): To a solution of the acceptor **36** in dry CH_2Cl_2 (0.2 M) were added NIS (2.3 equiv) and TMSOTf. The mixture was stirred for 10 min. In another flask, of the thiofuranosidic donor (1.2 equiv.) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (0.2 M). The acceptor was put at the desired temperature and the donor solution was added. The mixture was then stirred for 2 h. The reaction was quenched with NaHCO_3 and solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (CHex/AcOEt 100:0 up to 0:100) afforded the different products. Yields are given in table 2.

General procedure for deacylation reaction (C): To a solution of the protected carbohydrate in dry $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1) (0.07 M) was added MeONa 5.4M (0.2 equiv). The mixture was stirred for 24h at room temperature. Then the solution was neutralized by the addition of IR 120- H^+ form resin. After filtration, the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residual solid was suspended in water and freeze dried in order to co evaporate methyl esters.

*1-Azidoethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside (40)*⁴⁸



To a solution of pentaacetyl- α -D-mannopyranose (2.0 g, 5.1 mmol) in dry DCM (20 mL) were added azido-ethan-1-ol (0.8 g, 9.1 mmol) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1.3 mL, 10.51 mmol). The reaction mixture was left stirring at 38 °C for 72 h. NaHCO_3 (20 mL) was added to the mixture. The organic layer was washed with NaHCO_3 (3 x 10 mL), dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 100:0 up to 50:50) afforded 1.32 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 61 %.

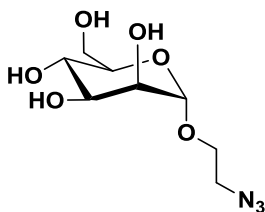
MW= 417.37 g/mol.

NMR in CDCl_3 :

^1H : 5.35 (d, $J_{2,5}=3.4$ Hz, 1H, H-3), 5.30 (d, $J_{4,5}=9.8$ Hz, 1H, H-4), 5.27 (dd, $J_{2,3}=3.3$ Hz, $J_{1,2}=1.8$ Hz, 1H, H-2), 4.86 (d, $J_{1,2}=1.8$ Hz, 1H, H-1), 4.28 (dd, $J_{6,6}=12.3$ Hz, $J_{5,6}=5.3$ Hz, 1H, H-6a), 4.12 (dd, $J_{6,6}=12.2$ Hz, $J_{5,6}=2.4$ Hz, 1H, H-6b), 4.04 (ddd, $J_{5,6}=5.4$ Hz, $J_{5,6}=2.5$ Hz, $J=0.7$ Hz, 1H, H-5), 3.86 (ddd, $^2J=10.6$ Hz, $^3J=6.8$ Hz, $^3J=3.8$ Hz, 1H, OCH_2), 3.66 (ddd, $^2J=10.6$ Hz, $^3J=6.0$ Hz, $^3J=3.7$ Hz, 1H, OCH_2), 3.52-3.39 (m, 2H, CH_2N_3), 2.15 (s, 3H, CH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3), 2.04 (s, 3H, CH_3), 1.98 (s, 3H, CH_3).

^{13}C : 170.7, 170.1, 169.9 (CO), 97.9 (C-1), 69.5 (C-2), 69.0 (C-3, C-5), 67.2 (OCH_2), 66.1 (C-4), 62.6 (C-6), 50.5 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 20.8 (4 x CH_3).

1-Azidoethyl α -D-mannopyranoses (24)



Monosaccharide **25** was obtained according to procedure C and isolated as a white solid (363 mg).

Yield: 97%.

MW= 249.22 g/mol.

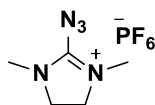
HRMS : Calcd for $C_8H_{15}N_3O_6Na$ $[M+Na]^+$ 272.08531; found 272.0853.

NMR in CD_3OD :

1H : 4.81 (d, $J_{1,2}=1.8$ Hz, 1H, H-1), 3.94-3.38 (m, 1H, OCH_2), 3.85 (d, $J_{1,2}=1.8$ Hz, 1H, H-2), 3.86-3.81 (m, 1H, H-6a), 3.76-3.70 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.67-3.60 (m, 1H, OCH_2), 3.64 (t, $J_{4,5}=9.4$ Hz, H-4), 3.60-3.54 (m, 1H, H-5), 3.40 (dd, $^3J=5.5$ Hz, $^3J=4.4$ Hz, 2H, CH_2N_3).

^{13}C : 101.5 (C-1), 74.4 (C-5), 72.2 (C-3), 71.7 (C-2), 68.2 (C-4), 67.4 (OCH_2), 62.6 (C-6), 51.5 (CH_2N_3).

*2-azido-1,3-dimethylimidazolinium hexafluorophosphate (ADMP) (41)*²⁸



To a solution of 2-chloro-1,3-dimethylimidazolinium chloride (10.6 g, 67.9 mmol) in dry acetonitrile (30 mL) was added potassium hexafluorophosphate (11.55 g, 67.9 mmol). The mixture was stirred for 10 min at room temperature then filtered through Celite. The filter cake was washed with acetonitrile (3 x 10 mL). The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in a small amount of acetonitrile (15 mL) and the solution was poured into diethyl ether (100 mL). The product precipitated as a white solid. The suspension was filtered and the solid dried under vacuum to afford 2-chloro-1,3-dimethylimidazolinium hexafluorophosphate as a white solid. The solid (16.9 g, 60.8 mmol) was dissolved in 62 mL of dry acetonitrile and sodium azide (5.9 g, 90 mmol), was added to the reaction mixture. The mixture was stirred 1.5 h, filtered through Celite and concentrated under reduced pressure. The product was crystallized in diethyl ether in the same way as 2-chloro-1,3-dimethylimidazolinium hexafluorophosphate to afford 18.0 g of the desired product as a white solid.

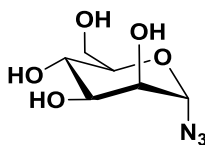
Yield: 93 %.

MW= 285.06 g/mol.

NMR in CD₃CN:

¹H: 3.59 (s, 4H, 2 x CH₂), 2.85 (s, 6H, 2 x CH₃).

*1-Azido-β-D-mannopyranose (25)*²⁸



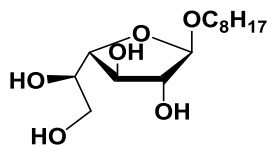
To a solution of D-mannose (0.8 g, 4.4 mmol) in water/acetonitrile (4/1 18 mL) at 0 °C, were successively added trimethylamine (3.3 mL, 23.8 mmol) and ADMP (2 g, 7.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 h and then quenched with water (50 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL) and then passed through Amberlyst IR-120 (ONa) and concentrated in the freeze dryer.

MW=228.06 g/mol.

R_f= 0.1 (CH₂Cl₂:AcOEt 8:2).

The crude was not isolated because the synthesis of the glycosyl azide and the click reaction were performed according to one pot procedure.

n-Octyl β-D-galactofuranoside (**38**)²⁴



To a solution of D-galactose (20.0 g, 111 mmol) in dry THF (170 mL) were added calcium chloride (18.5 g, 166 mmol) and *n*-octanol (26 mL, 167 mmol) at 0 °C and under nitrogen atmosphere. Then iron chloride (55.0 g, 333 mmol) was added by portion of 5 g every 5 min to keep the reaction under - 5 °C. The reaction mixture was left 48 h at room temperature and concentrated under reduced pressure. After dissolution in AcOEt (400 mL), the organic layer was washed with aqueous 5% HCl until discoloration, followed by 500 mL saturated brine and 500 mL water. The resulting organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Et₂O was added to the resulting orange paste and left 24 h in freezer to give 10.4 g of *n*-octyl β-D-galactofuranoside as a white solid.

The filtrate still contained octanol and α- and β-furanosides. Since further purification required preparative chromatography the filtrate was preserved but not considered in the present procedure.

Yield: 32%.

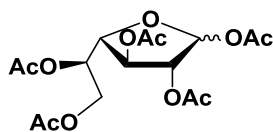
MW = 292.37 g/mol.

NMR in CD₃OD:

¹H: 4.85 (d, *J*_{1,2}=2.1 Hz, 1H, H-1), 4.00 (dd, *J*_{2,3}=6.7 Hz, *J*_{3,4}=4.0 Hz, 1H, H-3), 3.97-3.87 (m, 2H, H-2, H-4), 3.76-3.65 (m, 2H, H-5, OCH₂), 3.65-3.68 (m, 2H, H-6), 3.41 (dt, ²*J*=9.6 Hz, ³*J*=6.6 Hz, 1H, OCH₂), 1.57 (q, ²*J*=7.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.42-1.24 (m, 10H, 5 CH₂), 0.89 (t, ²*J*=6.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 109.4 (C-1), 84.1 (C-4), 83.4 (C-2), 78.7 (C-3), 72.40 (C-5), 68.9 (OCH₂CH₂), 64.6 (C-6), 33.0, 30.7, 30.5, 30.4, 27.2, 23.7 (5 CH₂), 14.4 (CH₃).

1,2,3,5,6-O-pentaacetyl-β-D-galactofuranose (42)



To a solution of **38** (5 g, 17 mmol) in dry pyridine (40 mL) was added Ac₂O (48.7 mL, 0.5mol). After 48 h stirring at room temperature, concentration under reduced pressure and co-distillation with toluene (3×10 mL), the crude oil was diluted with AcOEt (100 mL) and successively washed with 5% aqueous HCl (2×20 mL), saturated aqueous Na₂CO₃ (2×20 mL) and brine (20 mL). The resulting aqueous layers were extracted with AcOEt (3×10 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO₄. Solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 4:1) afforded 6.9 g of the desired product as a colorless oil.

To a solution of the previous compound (6.3 g, 13.6 mmol) in dry DCM (60 mL) were successively added Ac₂O (5.9 mL, 62.8 mmol) and H₂SO₄ (170 μL, mmol). After stirring at room temperature for 24 h, the reaction was quenched by adding Et₃N. The solvent was removed under reduced pressure and the crude residue purified by flash-chromatography (CHex/AcOEt, gradient from 4:1 to 3:2) to give mg of the desired product as colorless oil.

Yield : 57%.

MW=390.34 g/mol.

R_f=0.4 (CHex:AcOEt 6:4).

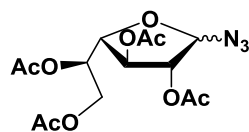
NMR in CDCl₃:

¹H: 6.32 (d, *J*_{1α,2α}=4.6 Hz, 1H, H-1α), 6.17 (bs, 1H, H-1β), 5.54 (dd, *J*_{2α,3α}=7.1 Hz, *J*_{3α,4α}=6.2 Hz, 1H, H-3α), 5.36 (ddd, *J*_{5β,6bβ}=6.2 Hz, *J*_{4β,5β}=*J*_{5β,6aβ}=4.1 Hz, 1H, H-5β), 5.32 (dd, *J*_{2α,3α}=7.1 Hz, *J*_{1α,2α}=4.6 Hz, 1H, H-2α), 5.27 (ddd, *J*_{5α,6bα}=6.2 Hz, *J*_{4α,5α}=*J*_{5α,6aα}=4.1 Hz, 1H, H-5α), 5.17 (dd, *J*_{2β,3β}=2.1 Hz, *J*_{1β,2β}=0.7 Hz, 1H, H-2β), 5.08 (dd, *J*_{3β,4β}=5.4 Hz, *J*_{2β,3β}=2.1 Hz, 1H, H-3β), 4.36 (dd, *J*_{3β,4β}=5.4 Hz, *J*_{4β,5β}=4.1 Hz, 1H, H-4β), 4.32 (dd, *J*_{6aβ,6bβ}=11.9 Hz, *J*_{5β,6aβ}=4.1 Hz, 1H, H-6aβ), 4.30 (dd, *J*_{6aα,6bα}=12.0 Hz, *J*_{5α,6aα}=4.1 Hz, 1H, H-6a), 4.22 (dd, *J*_{6aβ,6bβ}=11.9 Hz, *J*_{5β,6bβ}=6.2 Hz, 1H, H-6bβ), 4.18-4.11 (m, 2H, H-4α, H-6bα), 2.13, 2.12, 2.11, 2.09, 2.08, 2.05, 2.04 (7 s, 30 H, 10 CH₃).

^{13}C : 170.6, 170.4, 170.0, 169.9, 169.8, 169.4, 169.3, 169.1 (10 CO), 99.1 (C-1 β), 93.0 (C-1 α), 82.1 (C-4 β), 80.6 (C-2 β), 79.0 (C-4 α), 76.3 (C-3 β), 75.3 (C-2 α), 75.3 (C-3 α), 70.3 (C-5 α), 69.2 (C-5 β), 62.6 (C-6 β), 62.1, (C-6 α), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (10 CH₃).

Consistent with published literature.⁴⁹

1-Azido-2,3,5,6-O-tetraacetyl-D-galactofuranose (43)



To a solution of **42** (500 mg, 1.28 mmol) in dry DCM (15 mL) were added TMSN₃ (340 μ L, 2.56 mmol) and TMSOTf (690 μ L, 3.84 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction was stopped by the addition of NEt₃. Solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 9:1 to 6:4) afforded 230 mg of the desired β anomer as a white solid. 148 mg of a mixture α/β (2/1) were also isolated.

Yield : 48 % β , 31 % α/β (2/1).

MW= 373.32 g/mol.

R_f=0.2 (CHex:AcOEt 7:3).

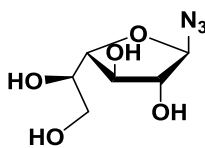
HRMS : Calcd for C₁₄H₁₉N₃O₉Na [M+Na]⁺ 396.10135; found 396.1016.

NMR in CDCl₃:

¹H : 5.40 (dd, $J_{1,2}$ =1.1 Hz, $J_{1,3}$ =0.6 Hz, 1H, H-1), 5.35 (dt, $J_{5,6b}$ =6.8 Hz, $J_{5,6a}$ =4.5 Hz, 1H, H-5), 5.03 (ddd, $J_{3,4}$ =5.1 Hz, $J_{2,3}$ =1.8 Hz, $J_{1,3}$ =0.7 Hz, 1H, H-3), 4.92 (dd, $J_{2,3}$ =1.8 Hz, $J_{1,2}$ =1.1 Hz, 1H, H-2), 4.35 (ddd, $J_{3,4}$ =5.1 Hz, $J_{4,5}$ =4.5 Hz, J =0.5 Hz, 1H, H-4), 4.31 (dd, $J_{6a,6b}$ =11.9 Hz, $J_{5,6a}$ =4.5 Hz, 1H, H-6a), 4.18 (dd, $J_{6a,6b}$ =11.9 Hz, $J_{5,6b}$ =6.8 Hz, 1H, H-6b), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃).

¹³C: 170.4, 169.9, 169.8, 169.5(CO), 94.2 (C-1), 82.1 (C-4), 81.0 (C-2), 76.4 (C-3), 69.2 (C-5), 62.4 (C-6), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6 (CH₃).

1-azo-β-D-galactofuranose (15)



Monosaccharide **43** was obtained according to procedure C and isolated as a white solid (87.9 mg).

Yield : 98%.

MW= 205.17 g/mol.

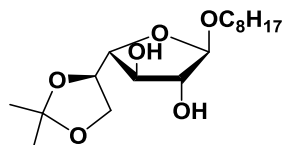
MS : Calcd for $C_6H_{11}N_3O_5Na$ $[M+Na]^+$ 228.16; found 227.8.

NMR in CD_3OD :

1H : 5.23 (dd, $J_{1,2}=2.1$ Hz, 1H, H-1), 4.09 (m, 2H, H-3, H-4), 3.87 (dd, $J_{2,3}=3.0$ Hz, $J_{1,2}=2.1$ Hz, 1H, H-2), 3.74 (ddd, $J_{5,6a}=6.8$ Hz, $J_{5,6b}=5.6$ Hz, $J_{4,5}=2.9$ Hz 1H, H-5), 3.63 (m, 2H, H-6).

^{13}C : 96.4 (C-1), 85.6 (C-4), 81.0 (C-2), 77.3 (C-3), 71.2 (C-5), 36.1 (C-6).

n-Octyl 5,6-O-isopropylidene- β -D-galactofuranoside (**44**)³⁰



To a solution of **38** (3 g, 10.2 mmol) in anhydrous acetone (50 mL) were successively added 2,2-dimethoxypropane (2.56 mL, 20.4 mmol) and camphor sulfonic acid (240 mg, 1.02 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight, then neutralized by addition of triethyl amine. The solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 100:0 up to 70:30) afforded 3.1 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 92%.

MW= 332.44 g/mol.

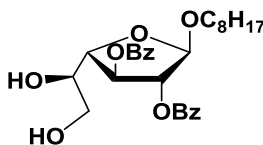
R_f= 0.5 (CHex:AcOEt 7:3).

NMR in CDCl₃:

¹H: 5.00 (s, 1H, H-1), 4.34 (dt, *J*_{4,5}=8.1 Hz, *J*_{5,6}=6.5 Hz, 1H, H-5), 4.12-3.91 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-6a+b), 3.72 (dt, ²*J*=9.6 Hz, ³*J*=6.8 Hz, 1H, OCH₂), 3.43 (dt, ²*J*=9.6 Hz, ³*J*=6.5 Hz, 1H, OCH₂), 1.66-1.48 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.56 (s, 3H, CH₃), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.36-1.17 (m, 10H, 5 CH₂), 0.87(t, ³*J*=6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 110.3 (C(CH₃)₂), 108.2 (C-1), 85.7 (C-4), 78.74 (C-2), 78.2 (C-3), 75.9 (C-5), 67.9 (OCH₂), 65.9 (C-6), 31.9 (OCH₂CH₂), 29.6, 29.4, 29.3, 26.2, 22.8 (5 CH₂), 25.7 (C(CH₃)₂), 14.2 (CH₃).

n-Octyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-galactofuranoside (**45**)³⁰



To a cooled (0 °C) solution of **44** (6.25 g, 18.8 mmol) in dry pyridine (48 mL) were added dropwise benzoyl chloride (11.0 mL, 95.0 mmol), then DMAP (229 mg, 1.9 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. Pyridine was co-evaporated with toluene (3 x 40 mL). The residue was dissolved in AcOEt (50 mL) and subsequently washed with 5% HCl (3 x 20 mL), aqueous saturated NaHCO₃ (3 x 20 mL), and brine (3 x 20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 100:0 up to 80:20) afforded the desired product as a colorless oil.

8.4 g (15.5 mmol) of the isolated compound were dissolved in CH₂Cl₂ (150 mL). TFA containing 1% H₂O (5.8 mL, 61.7 mmol) was added to the solution. The mixture was stirred 7 h at room temperature. CH₂Cl₂ (120 mL) was further added and the mixture was neutralized with NEt₃. The mixture was washed with aqueous saturated NaHCO₃ solution (3 x 70 mL) and brine (3 x 70 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex: AcOEt 90:10 up to 60:40) afforded 5.7 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 73%.

MW=500.59 g/mol.

HRMS: Calcd for C₂₈H₃₆O₈ [M+Na]⁺ 523.23024; found 523.2301.

R_f= 0.3 (CHex:AcOEt 6:4).

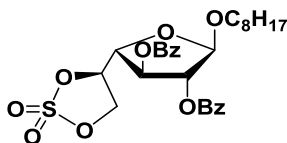
NMR in CDCl₃:

¹H: 8.08-7.99 (m, 4H, H_{arom}), 7.64-7.49 (m, 2H, H_{arom}), 7.49-7.36 (m, 4H, H_{arom}), 5.58 (dd, *J*_{3,4}=4.7 Hz, *J*_{2,3}=1.2 Hz, 1H, H-3), 5.49 (d, 1H, H-2), 5.25 (s, 1H, H-1), 4.32 (dd, *J*_{4,5}=3.3 Hz, 1H, H-4), 4.17-4.09 (m, 1H, H-5), 3.89-3.77 (m, *J*_{6a,6b}=11.6 Hz, *J*_{5,6a}=*J*_{5,6b}=5.1 Hz, 2H, H-6), 3.73 (dt, ²*J*=9.4 Hz, ³*J*=6.7 Hz, 1H,

OCH₂), 3.53 (dt, ²J=9.4 Hz, ³J=6.2 Hz, 1H, OCH₂), 1.71-1.53 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.44-1.10 (m, 10H, 5 CH₂), 0.85 (t, ³J=6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 166.2 (COPh), 165.5 (COPh), 133.7, 130.2, 130.0, 129.3, 129.2, 128.7, 128.5, 128.2 (C₆H₅), 105.9 (C-1), 84.4 (C-4), 81.4 (C-2), 78.1 (C-3), 70.8 (C-5), 67.9 (OCH₂CH₂), 64.5 (C-6), 32.0 (OCH₂CH₂), 29.7, 29.5, 29.4, 26.3, 22.8 (5 CH₂), 14.2 (CH₃).

n-Octyl 2,3-di-O-benzoyl-5,6-O-sulfonyl- β -D-galactofuranoside (**47**)³⁰



To a cooled (0 °C) solution of **45** (1.26 g, 2.5 mmol), in dry CH₂Cl₂ (6.8 mL) were added dropwise a solution of thionyl chloride (0.37 mL, 4.0 mmol) in dry CH₂Cl₂ (1.45 mL) and pyridine (0.85 mL). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. CH₂Cl₂ (20 mL) was further added and the mixture was washed with aqueous 5% HCl (3 x 20 mL), aqueous saturated NaHCO₃ solution (3 x 20 mL), and brine (3x 20 mL). The aqueous layers thus obtained were extracted with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The yellow oil thus obtained was diluted in a CH₂Cl₂/CH₃CN/H₂O mixture (1/1/2, 7.8 mL) before adding NaIO₄ (1.13 g, 5.3 mmol) and RuCl₃ (4.5 mg, 0.02 mmol). This mixture was vigorously stirred at room temperature for 1 h, and then diluted with CH₂Cl₂ (10 mL). After separation, the organic layer was washed with water (3 x 8 mL). The combined aqueous layers were extracted with CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CH₂Cl₂) afforded 1.1 g of the desired product as a slightly pink oil.

Yield: 76%.

MW=562.63 g/mol.

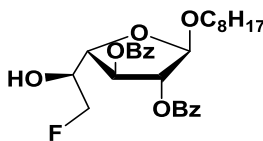
R_f= 0.4 (CH₂Cl₂:AcOEt 8:2).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.15-8.01 (m, 4H, H_{arom}), 7.67-7.55 (m, 2H, H_{arom}), 7.53-7.43 (m, 4H, H_{arom}), 5.66-5.57 (m, 2H, H-2, H-5), 5.37 (s, 1H, H-1), 5.34 (d, *J*_{2,3}=4.7 Hz, 1H, H-3), 4.82 (dq, *J*_{6a,6b}=8.7 Hz, *J*_{5,6}=7.1 Hz, 2H, H-6a, H-6b), 4.32 (dd, *J*=3.7 Hz, *J*_{4,5}=2.7 Hz, 1H, H-4), 3.74 (dt, ²*J*=9.6 Hz, ³*J*=6.7 Hz, 1H, OCH₂), 3.56 (dt, ²*J*=9.5 Hz, ³*J*=6.2 Hz, 1H, OCH₂), 1.67-1.56 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.48-1.16 (m, 10H, 5 CH₂), 0.85 (t, ³*J*= 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 166.4 (COPh), 165.5 (COPh), 134.1, 133.9, 130.2, 130.1, 129.9, 128.9, 128.8, 128.7 (C₆H₅), 106.3 (C-1), 82.3 (C-4), 80.4 (C-2), 80.3 (C-5), 78.3 (C-3), 69.3 (OCH₂), 68.2 (C-6), 31.9 (OCH₂CH₂), 29.6, 29.5, 29.4, 26.3, 22.8 (5CH₂), 14.2 (CH₃).

n-Octyl 2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactofuranoside (**48**)³⁰



To a solution of **47** (550 mg, 0.98 mmol) in acetone (5.5 mL) was added a 1 M solution of TBAF in THF (1.5 mL, 1.5 mmol). After stirring at room temperature for 1 h and concentration, the crude oil was diluted in THF (5.5 mL) before adding a solution of concentrated aqueous H₂SO₄ (152 μ L, 2.7 mmol) and H₂O (48.6 μ L, 2.7 mmol). The reaction media was stirred at room temperature for 20 min and then neutralized with Et₃N, concentrated under reduced pressure and partitioned between AcOEt (25 mL) and brine (7 mL). The organic layer was washed with aqueous saturated Na₂CO₃ solution and the aqueous layers extracted with AcOEt (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 100:0 up to 50:50) afforded 414 mg of the desired product as a colorless oil.

Yield: 84 %.

MW=502.58 g/mol.

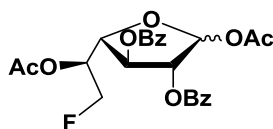
R_f=0.3 (CHex:AcOEt 5:1).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.11-8.03 (m, 4H, H_{arom}), 7.63-7.55 (m, 2H, H_{arom}), 7.50-7.40 (m, 4H, H_{arom}), 5.59 (ddd, *J*_{3,4}=4.5 Hz, *J*_{2,3}=1.3 Hz, *J*_{1,3}=0.7 Hz, 1H, H-3), 5.51 (d, *J*_{2,3}=1.3 Hz, 1H, H-2), 5.26 (s, 1H, H-1), 4.68-4.46 (m, 1H, H-6a), 4.40-4.27 (m, 1H, H-6b), 4.39-4.29 (m, H-4, H-5), 3.74 (dt, ²*J*=9.5 Hz, ³*J*=6.8 Hz, 1H, OCH₂), 3.53 (dt, ²*J*=9.5 Hz, ³*J*=6.2 Hz, 1H, OCH₂), 1.6 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.27 (m, 10H, 5 CH₂), 0.86 (t, ³*J*=6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 166.3 (CO), 165.5 (CO), 133.7, 130.1, 130.0, 129.2, 128.7, 128.6 (C₆H₅), 105.8 (C-1), 83.8 (d, *J*_{C-F}=171.4 Hz, C-6), 82.5 (d, *J*_{C-F}=5.2 Hz, C-4), 81.5 (C-2), 78.0 (d, *J*_{C-F}=1.4 Hz, C-3), 69.4 (d, *J*_{C-F}=20.4 Hz, C-5), 67.8 (OCH₂), 32.0 (OCH₂CH₂), 29.5, 29.4, 27.1, 26.3, 22.8 (5 CH₂), 14.2 (CH₃).

1,5-di-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-D-galactofuranose (49)



To a solution of **48** (150 mg, 0.28 mmol) in dry CH_2Cl_2 (1.5 mL) were added acetic anhydride (170 μL , 1.8 mmol) and sulfuric acid (31.5 μL , 0.58 mmol). The mixture was stirred 6 h at room temperature and then neutralized with Et_3N . CH_2Cl_2 (10 mL) was added to the mixture and washed with aqueous saturated NaHCO_3 solution (3 x 6 mL) and aqueous saturated NaCl solution (2 x 7 mL, until pH=7). Organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 100:0 up to 60:40) afforded 108 mg of the desired product as a colorless oil.

Yield: 81%.

MW= 474.44 g/mol.

HRMS: Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{FO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 497.12183; found 497.1221.

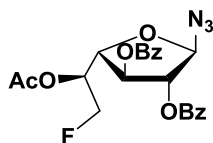
R_f = 0.5 (CHex:AcOEt 7:3).

NMR in CDCl_3 :

^1H : 8.15-7.97 (m, 4H, H_{arom}), 7.69-7.55 (m, 2H, H_{arom}), 7.54-7.43 (m, 4H, H_{arom}), 6.45 (s, 1H, H-1), 5.59 (d, $J_{2,3}$ =1.4 Hz, 1H, H-2), 5.58-5.50 (m, 2H, H-3, H-5), 4.78-4.69 (m, 1H, H-6a), 4.66-4.56 (m, 2H, H-6b, H-4), 2.18 (s, 3H, OCH_3), 2.04 (s, 3H, CH_3).

^{13}C : 170.1 (CO), 169.2 (CO), 165.5 (CO), 165.3 (CO), 134.0, 133.9, 130.1, 130.0, 129.0, 128.8, 128.7 (C_6H_5), 99.3 (C-1), 82.3 (d, $J_{\text{C-F}}$ =5.1 Hz, C-4), 81.1 (C-3), 80.9 (d, $J_{\text{C-F}}$ =173.5 Hz, C-6), 76.9 (C-2), 70.2 (d, $J_{\text{C-F}}$ =20.9 Hz, C-5), 21.2, 20.9 (2 CH_3).

1-Azido-5-di-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranose (50)



To a solution of **50** (500 mg, 1.05 mmol) in dry DCM (12 mL) were added TMSN₃ (280 μL, 2.11 mmol) and TMSOTf (570 μL, 3.17 mmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction was stopped by the addition of NEt₃. Solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 9:1 to 8:2) afforded 200 mg of the desired β anomer as a white solid.

Yield: 42%.

MW= 474.44 g/mol.

R_f=0.4 (CHex:AcOEt 7:3).

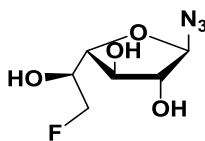
HRMS : Calcd for C₂₂H₂₀FN₃O₇Na [M+Na]⁺ 480.11775; found 480.1174.

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.10-8.05 (m, 4H, H_{arom}), 7.65-7.58 (m, 2H, H_{arom}), 7.52-7.44 (m, 4H, H_{arom}), 5.70(d, *J*_{1,2}=0.7 Hz, H-1), 5.57 (dq, *J*_{H-F}=17.8 Hz, *J*_{5,6}=5.1 Hz, 1H, H-5), 5.56 (ddd, *J*=5.2 Hz, *J*_{2,3}=1.4 Hz, *J*_{1,2}=0.8 Hz, 1H, H-2), 5.39 (t, *J*_{2,3}=1.1 Hz, 1H, H-3), 4.70 (dd, *J*_{H-F}=46.6 Hz, *J*_{5,6}=5.1 Hz, 2H, H-6), 4.67 (t, *J*_{4,5}=4.8 Hz, H-4), 2.09 (s, 3H, CH₃).

¹³C: 170.0, 165.5, 165.3 (CO), 1339.9, 133.8, 130.0, 129.9, 128.7, 128.6 (C₆H₅), 94.5 (C-1), 82.2 (d, *J*_{C-F}=5.4 Hz, C-4), 81.5 (C-2), 81.1 (d, *J*_{C-F}=171.9 Hz, C-6), 77.0 (C-3), 70.1 (d, *J*_{C-F}=20.8 Hz, C-5), 20.8 (CH₃).

1-azo-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranose (16)



Monosaccharide **16** was obtained according to procedure C and isolated as a white solid (45.8mg).

Yield : 85%.

MW= 207.16 g/mol.

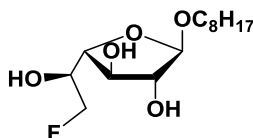
MS : Calcd for C₆H₁₀N₃O₄Na [M+Na]⁺ 230.15; found 229.9.

NMR in CD₃OD:

¹H : 5.23 (d, *J*_{1,2}=2.1 Hz, 1H, H-1), 4.59-4.34 (m, 2H, H-6), 4.13-4.07 (m, 2H, H-3, H-4), 4.0-3.93 (m, 1H, H-5), 3.87 (dd, *J*_{2,3}=1.8 Hz, *J*_{1,2}=2.1 Hz, 1H, H-2).

¹³C : 96.5 (C-1), 85.0 (d, *J*_{C4-F}=6.3 Hz, C-4), 83.8 (d, *J*_{C6-F}=169.8 Hz, C-6), 80.8 (C-2), 77.1 (C-3), 68.9 (d, *J*_{C5-F}=20.21 Hz, C-5).

n-Octyl 6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactofuranoside (**36**)



To a solution of **48** (2.3 g, 5.0 mmol) in dry CH_2Cl_2 (12.6 mL) and dry methanol (30 mL) was added sodium methanolate (5.4 M in MeOH) (180 μL , 1.0 mmol). The mixture was stirred 18 h at room temperature and then solvents were evaporated. The crude was dissolved in MeOH (12 mL) and IR 120 (H^+ form) was added. The mixture was left stirring until neutral pH. The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The colorless oil was stirred with water (2 mL) and freeze dried. This step was repeated three times in order to have 1.3 g of the pure product as a white solid.

Yield: 88 %.

MW= 294 g/mol.

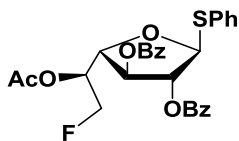
HRMS: Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{FO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 317.17347; found 317.1739.

NMR in CDCl_3 :

^1H : 4.84 (s, 1H, H-1), 4.59-4.46 (m, 1H, H-6b), 4.47-4.34 (m, 1H, H-6a), 4.04 (dd, $J_{3,4}=6.6$ Hz, $J_{2,3}=4.1$ Hz, 1H, H-3), 3.98-3.92 (m, 2H, H-5, H-2), 3.90 (dd, $J_{3,4}=6.6$ Hz, $J_{4,5}=2.8$ Hz, 1H, H-4), 3.70 (dt, $^2J=9.6$ Hz, $^3J=6.6$ Hz, 1H, OCH_2), 3.43 (dt, $^2J=11.0$ Hz, $^3J=6.3$ Hz, 1H, OCH_2), 1.58 (quint, $^3J=7.0$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 1.43-1.19 (m, 10H, 5 CH_2), 0.91 (t, $^3J=7.3$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C : 109.5 (C-1), 85.2 (d, $J=169.5$ Hz, C-6), 83.4 (C-2), 83.3 (d, $J=7.5$ Hz, C-4), 78.4 (C-3), 70.2 (d, $J=19.9$ Hz, C-5), 69.0 (OCH_2), 33.0 (OCH_2CH_2), 30.7, 30.5, 30.4, 27.2, 23.7 (6 CH_2), 14.4 (CH_3).

5-O-Acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-1-thio-β-D-galactofuranoside (52)



To a solution of **49** (40 mg, 0.08 mmol) in dry CH_2Cl_2 (0.20 mL) at -5°C , were added thiophenol (13 μL , 0.12 mmol) and $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (10.6 μL , 0.095 mmol). The mixture was left stirring at room temperature for 2 h. CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the mixture was quickly washed with iced water (2 x 5 mL) and aqueous iced saturated NaHCO_3 solution (2 x 5 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to afford 38 mg of the desired product as white foam.

Yield: 90 %.

MW=524.56 g/mol.

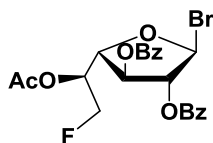
HRMS: Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{FO}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 547.11972; found 547.1198.

NMR in CDCl_3 :

^1H : 8.14-8.00 (m, 4H, H_{arom}), 7.67-7.54 (m, 4H, H_{arom}), 7.53-7.42 (m, 4H, H_{arom}), 7.38-7.27 (m, 3H, H_{arom}), 5.77 (br s, 1H, H-1), 5.65 (d, $J_{2,3}=1.6$ Hz, 1H, H-2), 5.64-5.51 (m, 2H, H-5, H-3), 4.77 (t, $J=4.8$ Hz, H-4), 4.75-4.68 (m, 1H, H-6a), 4.65-4.55 (m, 1H, H-6b), 2.08 (s, 3H, CH_3).

^{13}C : 170.3 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (CO), 133.9, 133.8, 133.3, 132.7, 130.2, 130.0, 129.2, 129.0, 128.7, 128.2 (C_6H_5), 91.3 (C-1), 82.2 (C-2), 81.2 (d, $J=172.4$ Hz, C-6), 80.4 (d, $J=5.2$ Hz, C-4), 77.4 (d, $J=1$ Hz, C-3), 70.1 (d, $J=20.9$ Hz, C-5), 20.9 (CH_3).

5-O-Acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl bromide (53)



To a solution of **49** (300 mg, 0.63 mmol) in acetic acid (2.2 mL) was added hydrogen bromide 30% in acetic acid (250 μ L, 1.3 mmol). The mixture was left under agitation at room temperature for 3 h. CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the mixture was washed with aqueous iced water (2 x 5 mL) and aqueous iced saturated NaHCO_3 solution (2 x 5 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to afford 340mg of the desired product as a beige solid.

Yield: 91%.

MW=595.30 g/mol.

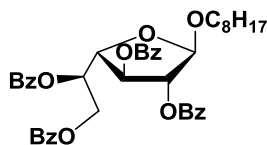
HRMS: Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{BrFO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 517.02686; found 517.0260.

NMR in CDCl_3 :

^1H : 8.15-8.10 (m, 2H, H_{arom}), 8.08-8.04 (m, 2H, H_{arom}), 7.66-7.58 (m, 2H, H_{arom}), 7.52-7.45 (m, 4H, H_{arom}), 6.59 (d, $J_{1,2}$ = 1 Hz, 1H, H-1), 5.88 (d, $J_{1,2}$ = 0.7 Hz, 1H, H-2), 5.67 (dq, $J_{\text{H-F}}$ = 17.2 Hz, $J_{4,5}$ = 4.9 Hz, 1H, H-5), 5.53 (dt, $J_{3,4}$ = 4.5 Hz, $J_{2,3}$ = 0.9 Hz, 1H, H-3), 4.80 (td, $J_{3,4}$ = 4.6, 0.8 Hz, 1H, H-4), 4.66 (dt, $J_{\text{H-F}}$ = 46.5 Hz, $J_{6a,6b}$ = 5.2 Hz, 2H, H-6), 2.08 (s, 3H, CH_3).

^{13}C : 169.9 (CO), 165.5 (CO), 165.0 (CO), 134.0, 133.9, 130.1, 129.9, 128.7 (C_6H_5), 87.9 (C-1), 85.3 (C-2), 83.7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 5.2 Hz, C-4), 80.8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 174.3 Hz, C-6), 76.3 (C-3), 69.5 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 21.1 Hz, C-5), 20.7 (CH_3).

n-Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl- β -D-galactofuranoside (**54**)⁵⁰



To a solution of **38** (2 g, 6.8 mmol) in anhydrous pyridine (14 mL) were successively added benzoyl chloride (7 mL, 60 mmol) and DMAP (150 mg, 1.2 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. Pyridine was co-evaporated four times using toluene. The crude was dissolved in 15 mL of CH₂Cl₂ and successively washed with aqueous 5% HCl solution (3 x 5 mL), aqueous saturated NaHCO₃ solution (3 x 5 mL) and aqueous saturated NaCl solution (3 x 5 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 100:0 up to 70:30) afforded 4.8 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 99%.

MW= 708.3 g/mol.

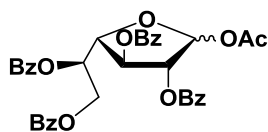
R_f= 0.6 (CHex:AcOEt 4:1).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.20-8.14 (m, 1H, H_{arom}), 8.10-8.02 (m, 4H, H_{arom}), 8.00-7.95 (m, 2H, H_{arom}), 7.93-7.89 (m, 2H, H_{arom}), 7.60-7.49 (m, 6H, H_{arom}), 7.45-7.27 (m, 9H, H_{arom}), 6.09 -6.04 (m, 1H, H-5), 5.63 (dt, *J*_{3,4}=5.3 Hz, *J*_{2,3}=1.0 Hz, 1H, H-3), 5.46 (d, *J*_{2,3}=1.2 Hz, 1H, H-2), 5.30 (s, 1H, H-1), 4.82-4.67 (m, 2H, H-6), 4.64 (dd, *J*_{3,4}=5.2 Hz, *J*_{4,5}=3.5 Hz, 1H, H-4), 3.75 (dt, ²*J*=9.6 Hz, ³*J*=6.8 Hz, 1H, OCH₂), 3.53 (dt, ²*J*=9.5 Hz, ³*J*=6.3 Hz, 1H, OCH₂), 1.67-1.57 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.41-1.14 (m, 10H, 5 CH₂), 0.86 (t, ³*J*=7.2 Hz, 3H, CH₃).

Consistent with published literature.⁵⁰

*1-O-Acetyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranose (55)*⁴⁹



To a solution of **54** (4.5 g, 6.3 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (40 mL) were added acetic anhydride (3.6 mL, 38 mmol) and sulfuric acid (0.7 mL, 13 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 6 h. The reaction mixture was neutralized with Et₃N and diluted with CH₂Cl₂ (40 mL), then washed with aqueous saturated NaHCO₃ solution (3 x 20 mL) and aqueous saturated NaCl solution (3 x 20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 100:0 up to 60:40) afforded 3.8 g of the desired product as a colorless oil.

α/β: 2/8.

Yield: 95%.

MW= 638.62 g/mol.

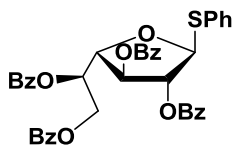
R_f= 0.5 (CHex:AcOEt 7:3).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.11-8.03 (m, 6H, H_{arom}), 8.02-7.93 (m, 6H, H_{arom}), 7.91-7.85 (m, 2H, H_{arom}), 7.63-7.27 (m, 21H, H_{arom}), 6.66 (d, *J*_{1,2}=4.8 Hz, 1H, H-1α), 6.51 (s, 1H, H-1β), 6.23 (dd, *J*_{2,3}=7.1 Hz, *J*_{3,4}=6.1 Hz, 1H, H-3α), 6.08 (dt, *J*_{5,6}=7.6 Hz, *J*_{4,5}=4.0 Hz, 1H, H-5β), 5.87 (td, *J*_{4,6}=5.9 Hz, *J*_{4,5}=3.8 Hz, 1H, H-5α), 5.75 (dd, *J*_{2,3}=7.0 Hz, *J*_{1,2}=4.8 Hz, 1H, H-2α), 5.71 (ddd, *J*_{3,4}=4.8 Hz, *J*_{2,3}=1.3 Hz, *J*_{1,3}=0.8 Hz, 1H, H-3β), 5.60 (d, *J*_{2,3}=1.3 Hz, 1H, H-2β), 4.85-4.65 (m, 5H, H-6α+β, H-4α+β), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 1H, CH₃).

¹³C: 169.2 (CO), 169.1(CO), 166.1(CO), 165.7(CO), 165.5(CO), 165.3(CO), 133.7, 133.5, 133.3, 133.1, 130.0, 129.7, 129.5, 129.3, 128.9, 128.5, 128.4, 128.3 (C₆H₅), 99.4 (C-1β), 93.4 (C-1α), 83.6 (C-4β), 81.3 (C-2β), 79.7 (C-4α), 77.4 (C-3β), 76.3 (C-2α), 74.3 (C-3α), 71.0 (C-5α), 70.2(C-5β), 63.6 (C-6α), 63.0 (C-6β), 21.1 (CH₃).

*Phenyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-1-thio-β-D-galactofuranoside (56)*⁵⁰



To a solution of **18** (0.7 g, 1.1 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL) cooled in an ice bath were added thiophenol (0.17 mL, 1.6 mmol) and BF₃·Et₂O (160 μL, 1.4 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was washed with aqueous saturated NaHCO₃ solution (3 x 5 mL) and water (3 x 5 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 100:0 up to 60:40) afforded 0.5 g of the desired product as a white foam.

Yield: 62%.

MW= 688.75 g/mol.

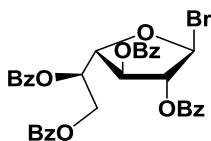
R_f= 0.8 (CHex:AcOEt 3:2).

NMR in CDCl₃:

¹H : 8.12-8.04 (m, 4H, H_{arom}), 8.00-7.94 (m, 2H, H_{arom}), 7.92-7.86 (m, 2H, H_{arom}), 7.64-7.42 (m, 7H, H_{arom}), 7.39-7.26 (m, 8H, H_{arom}), 6.11 (dt, *J*_{5,6a}=6.9 Hz, *J*_{4,5}=4.4 Hz, 1H, H-5), 5.84 (s, 1H, H-1), 5.72 (dt, *J*_{3,4}=5.0 Hz, *J*_{2,3}=1.2 Hz, 1H, H-3), 5.67 (t, 1H, H-2), 4.96 (t, 1H, H-4), 4.74 (qd, *J*_{6a,6b}=11.9 Hz, *J*_{5,6b}=5.7 Hz, 2H, H-6a).

Consistent with published literature.⁵⁰

*2,3,5,6-Tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl bromide (57)*⁴⁹



To a solution of **18** (1 g, 1.6 mmol) in glacial acetic acid (5 mL) was added hydrogen bromide 30% in acetic acid (3.7 mL, 18.8 mmol). The mixture was left under agitation at room temperature for 2 h. CH₂Cl₂ (20 mL) was added and the mixture was washed successively with iced water (2 x 5 mL) and iced saturated NaHCO₃ solution (2 x 5 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford 1 g of the desired product as beige solid.

Yield: 95%.

MW= 659.48 g/mol.

R_f= 0.6 (CH₂Cl₂:AcOEt 3:2).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.15-8.05 (m, 5H, H_{arom}), 7.98-7.93 (m, 2H, H_{arom}), 7.87-7.81 (m, 2H, H_{arom}), 7.65-7.58 (m, 1H, H_{arom}), 7.57-7.44 (m, 6H, H_{arom}), 7.39-7.29 (m, 5H, H_{arom}), 7.29-7.22 (m, 3H, H_{arom}), 6.65 (s, 1H, H-1), 6.20 (ddd, *J*_{5,6a}=6.6 Hz, *J*_{5,6b} = 5.0 Hz, *J*_{4,5}=3.5 Hz, 1H, H-5), 5.90 (d, *J*_{2,3}=0.7 Hz, 1H, H-2), 5.69 (dt, *J*_{3,4}=4.8 Hz, *J*_{2,3}=0.9 Hz, 1H, H-3), 4.97 (dd, *J*_{4,5}=4.8 Hz, *J*_{3,4}=3.5 Hz, 1H, H-4), 4.75-4.72 (m, 2H, H-6).

Consistent with published literature.⁴⁹

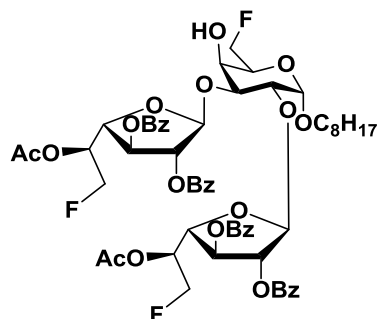
Tableau 13 : Table of conditions and yields of glycosylation reaction with brominated donors

Entry	Donor (eq)	Eq promotor (AgOTf)	Temperature (°C)	Molecular sieves	Compounds (Yield)
1	53 (1)	1	RT	No	59 (8%), 65 (22%), 66 (64%)
2	53 (1)	1	RT	Yes	61 (8%), 62 (8%), 63 (11%), 64 (1%), 65 (15%), 66 (20%)
3	53 (2)	2	RT	Yes	66 (18%), mélange di/tri inséparable
4	57 (1)	1	RT	no	72 (7%), 75 (43%), 74 (45%)
5	57 (1)	1	RT	Yes	68 (7%), 69 (5%), 70 (10%), 75 (42%), 74 (2%)
6	57 (1)	1	-50	yes	68 (7%), 69 (4%), 70 (8%), 75 (49%), 74 (8%)

Tableau 14 : Table of conditions and yields of glycosylation reaction with thiophenylated donors

Entry	Donor (eq)	Eq promotor (NIS/TMSOTf)	Temperature (°C)	Compounds (Yield)
1	52 (1.2)	2.3/1,2	0	58(11%)
2	52 (1.2)	2.3/1,2	-30	59 (6%), 60 (6%), 58(11%)
3	52 (1.2)	2.3/0.5	0	61 (7%), 62 (5%), 63 (1%), 64(9%)
4	52 (1.2)	2.3/0.5	-50	61 (12%), 62 (5%), 63 (9%), 64 (11%)
5	52 (1.6)	2.3/0.5	-50	58 (34%), 59 (3%)
6	56 (1.2)	2.3/0.5	-50	67 (57%), 68 (6%), 69 (5%), 70 (10%)
7	56 (1.2)	2.3/0.5	-50	71 (8%), 72 (4%), 73 (7%), 74 (44%)

Octyl 5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→3)-[5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→2)]-6-deoxy-6-fluoro-α-D-galactopyranoside (58)



Trisaccharide **58** was obtained according to procedure B (table 14, entries 1, 2 and 4) and isolated as a white solid.

MW=1123.13 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{58}H_{65}O_{19}F_3Na$ $[M+Na]^+$ 1145.39699; found 1145.3971.

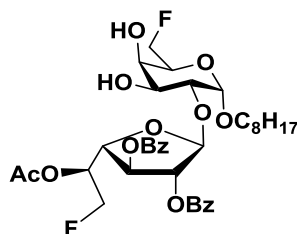
R_f=0.6 (CH₂Cl₂/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

¹H: 8.09-7.98 (m, 4H, H_{arom}), 7.96-7.88 (m, 3H, H_{arom}), 7.61-7.55 (m, 4H, H_{arom}), 7.55-7.40 (m, 5H, H_{arom}), 7.39-7.30 (m, 4H, H_{arom}), 3.70 (dt, ²J=9.5 Hz, ³J=7.0 Hz, 1H, OCH₂), 3.43 (dt, ²J=9.7 Hz, ³J=6.7 Hz, 1H, OCH₂), 2.08 (s, 3H, OCH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃), 1.62-1.50 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.32-1.13 (m, 10H, 5 CH₂), 0.86 (t, ³J=6.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 170.2 (CO), 170.1 (CO), 166.7 (CO), 166.5 (CO), 166.4 (CO), 166.3 (CO), 133.9, 133.7, 133.6, 133.5, 130.2, 130.0, 129.9, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4 (C₆H₅), 68.9 (OCH₂), 32.0 (OCH₂CH₂), 29.7, 29.5, 29.3, 26.3, 22.8 (5 CH₂), 20.9 (CH₃), 14.2 (CH₃).

n-Octyl 5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxy-6-fluoro- α -D-galactopyranoside (**59**)



Compound **59** was obtained according to procedure A (table 13, entry 1) and procedure B (table 14, entry 2 and 5) and isolated as a white solid.

MW=708.75 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{36}H_{46}O_{12}F_2Na$ $[M+Na]^+$ 731.28495; found 731.2847.

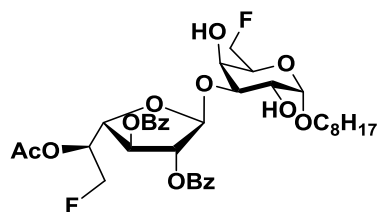
R_f=0.2 (CH₂Hex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

1H : 8.10-8.03 (m, 4H, H_{arom}), 7.63-.57 (m, 2H, H_{arom}), 7.50-7.43 (m, 4H, H_{arom}), 3.73 (dt, $^2J=9.7$ Hz, $^3J=6.9$ Hz, 1H, OCH₂), 3.47 (dt, $^2J=9.7$ Hz, $^3J=6.6$ Hz, 1H, OCH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.65-1.48 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.36-1.12 (m, 10H, 5 CH₂), 0.86 (t, $^3J=7.2$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C : 170.1 (CO), 166.5 (CO), 165.7 (CO), 134.0, 133.9, 130.2, 130.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6 (C₆H₅), 68.8 (OCH₂), 32.0 (OCH₂CH₂), 29.7, 29.5, 29.3, 26.4, 22.8 (5 CH₂), 20.9 (CH₃), 14.2 (CH₃).

Octyl 5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→3)-6-deoxy-6-fluoro-α-D-galactopyranoside (60)



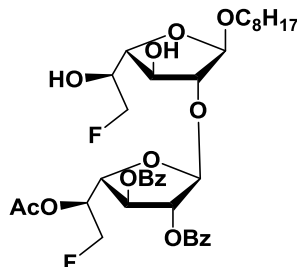
Compound **60** was obtained according to procedure B (table 14, entry 2) and isolated as a white solid.

MW=708.75 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{36}H_{46}O_{12}F_2Na$ $[M+Na]^+$ 731.28495; found 731.2853.

R_f=0.5 (CHex/AcOEt, 6:4).

Octyl 5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→2)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (61)



Compound **61** was obtained according to procedure A (table 13, entry 2) and procedure B (table 14, entries 3 and 4) and isolated as a white solid.

MW=708.75 g/mol.

HRMS: Calcd for C₃₆H₄₆O₁₂F₂Na [M+Na]⁺ 731.28495; found 731.2847.

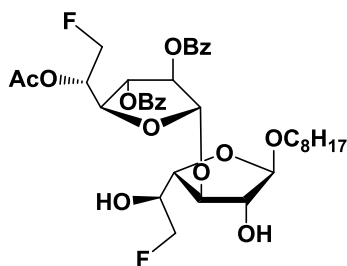
R_f=0.3 (CHex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

¹H: 8.09-8.03 (m, 4H, H_{arom}), 7.64-7.57 (m, 2H, H_{arom}), 7.50-7.44 (m, 4H, H_{arom}), 3.73 (dt, ²J=9.5 Hz, ³J=6.8 Hz, 1H, OCH₂), 3.44 (dt, ²J=9.7 Hz, ³J=6.6 Hz, 1H, OCH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.62-1.54 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.35-1.17 (m, 10H, 5 CH₂), 0.88 (t, ³J=7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 170.1 (CO), 166.7 (CO), 166.6 (CO), 134.0, 133.9, 130.1, 130.0, 128.9, 128.8, 128.7 (C₆H₅), 68.2 (OCH₂), 31.9 (OCH₂CH₂), 29.7, 29.4, 29.3, 26.2, 22.8 (5 CH₂), 20.9 (CH₃), 14.2 (CH₃).

Octyl 5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→3)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (62)



Compound **62** was obtained according to procedure A (table 13, entry 2) and procedure B (table 14, entries 3 and 4) and isolated as a white solid.

MW=708.75 g/mol.

HRMS : Calcd for $C_{36}H_{46}O_{12}F_2Na$ $[M+Na]^+$ 731.28495; found 731.2851.

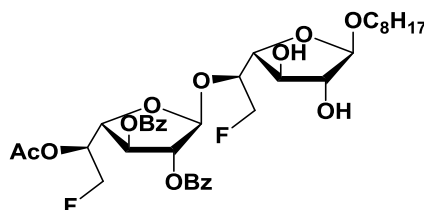
R_f=0.2 (CHex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

¹H: 8.08-8.02 (m, 4H, H_{arom}), 7.63-7.56 (m, 2H, H_{arom}), 7.50-7.41 (m, 4H, H_{arom}), 3.63 (dt, ²J=9.5 Hz, ³J=6.9 Hz, 1H, OCH₂), 3.41 (dt, ²J=9.6 Hz, ³J=6.6 Hz, 1H, OCH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.59-1.47 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.35-1.15 (m, 10H, 5 CH₂), 0.86 (t, ³J=7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 170.2 (CO), 166.7 (CO), 166.6 (CO), 133.9, 133.8, 130.1, 130.0, 129.0, 128.9, 128.7, 128.6 (C₆H₅), 68.0 (OCH₂), 31.9 (OCH₂CH₂), 29.6, 29.4, 29.3, 26.1, 22.8 (5 CH₂), 20.9 (CH₃), 14.2 (CH₃).

Octyl 5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→5)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (63)



Compound **63** was obtained according to procedure A (table 13, entry 2) and procedure B (table 14, entries 3 and 4) and isolated as a white solid.

MW=708.75 g/mol.

HRMS: Calcd for C₃₆H₄₆O₁₂F₂Na [M+Na]⁺ 731.28495; found 731.2847.

R_f=0.3 (CHex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

¹H: 8.12-8.03 (m, 4H, H_{arom}), 7.63-7.55 (m, 2H, H_{arom}), 7.50-7.41 (m, 4H, H_{arom}), 3.66 (dt, ²J=9.7 Hz, ³J=6.7 Hz, 1H, OCH₂), 3.40 (dt, ²J=9.6 Hz, ³J=6.5 Hz, 1H, OCH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.58-1.49 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.34-1.19 (m, 10H, 5 CH₂), 0.88 (t, ³J=6.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 170.2 (CO), 166.8 (CO), 166.4 (CO), 133.9, 133.8, 130.3, 130.0, 129.0, 128.9, 128.7, 128.6 (C₆H₅), 68.0 (OCH₂), 31.9 (OCH₂CH₂), 29.6, 29.4, 29.3, 26.2, 22.8 (5 CH₂), 20.9 (CH₃), 14.2 (CH₃).

Trifuranosides (64)

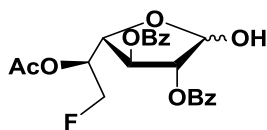
Trisaccharide **64** was obtained according to procedure A (table 13, entry 2) and procedure B (table 14, entries 3 and 4) and isolated as a white solid.

MW=1123.13 g/mol.

HRMS: Calcd for C₅₈ H₆₅ O₁₉ F₃ Na [M+Na]⁺ 1145.39644; found 1145.3969.

R_f=0.6 (CHex-AcOEt, 6-4).

5-O-Acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro- α,β -D-galactofuranose (65)



Compound **65** was obtained according to procedure A and isolated as a white solid (table 13, entries 1, 2).

MW=432.40 g/mol.

MS: Calcd for $C_{22}H_{21}O_8FNa$ $[M+Na]^+$ 455.4; found 454.9.

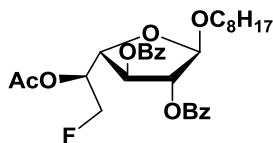
Rf=0.4 (Chex:AcOEt, 6:4).

NMR in $CDCl_3$:

1H : 8.11-8.02 (m, 4H, H_{arom}), 7.63-7.56 (m, 2H, H_{arom}), 7.49-7.41 (m, 4H, H_{arom}), 5.65 (s, 1H, H-1), 5.61-5.45 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 4.69 (t, $^3J=4.7$ Hz, 1H, H-4), 4.67 (ddd, $J_{6a, 6b}=46.7$ Hz, $J_{5,6}=5.1$ Hz, $J_{5,6}=1.7$ Hz, 2H, H-6), 2.08 (s, 3H, CH_3).

^{13}C : 170.2 (CO), 166.8 (CO), 166.6 (CO), 133.8, 130.1, 130.0, 129.1, 129.0, 128.7 (C_6H_5), 101.1 (C-1), 82.4 (C-2), 81.1 (d, $J_{C6-F}=176.3$ Hz, C-6), 80.8 (d, $J_{C4-F}=3.2$ Hz, C-4), 77.4 (C-3), 70.4 (d, $J_{C5-F}=20.7$ Hz, C-5), 20.9 (CH_3).

n-Octyl 5-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactofuranoside (**66**)



Compound **66** was obtained according to procedure A as a white solid (table 13, entries 1-3).

MW=544.62 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{30}H_{37}O_8FNa$ $[M+Na]^+$ 567.23647; found 567.2365.

Rf=0.9 (Chex:AcOEt, 6:4).

NMR in $CDCl_3$:

1H : 8.10-8.03 (m, 4H, H_{arom}), 7.62-7.56 (m, 2H, H_{arom}), 7.49-7.43 (m, 4H, H_{arom}), 5.57 (dq, $J_{5,6a}=16.9$ Hz, $J_{5,6b}=5.0$ Hz, 1H, H-5), 5.47-5.43 (m, 2H, H-2, H-3), 5.21 (s, 1H, H-1), 4.70 ($J=5.8$ Hz, 10.0 Hz, 46.6 Hz, 1H, H-6), 4.64 ($J=5.0$ Hz, 10.0 Hz, 46.6 Hz, 1H, H-6), 4.49 (t, $J=4.5$ Hz, H-4), 3.75 (dt, $^2J=9.4$ Hz, $^3J=7.2$ Hz, 1H, OCH_2), 3.53 (dt, $^2J=9.5$, $^3J=6.8$ Hz, 1H, OCH_2), 2.08 (s, 3H, CH_3), 1.69-1.57 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.44-1.01 (10H, 5 CH_2), 0.86 (t, $^3J=6.5$ Hz, 3H, CH_3)

^{13}C : 170.1 (CO), 165.6 (CO), 165.4 (CO), 133.6, 133.5, 129.9, 129.9, 129.2, 129.1, 128.5, 128.5 (C_6H_5), 106.7 (C-1), 82.0 (C-2), 81.1 (d, $J_{C6-F}=173.2$ Hz, C-6), 80.2 (d, $J_{C4-F}=5.7$ Hz, C-4), 77.3 (C-3), 70.4 (d, $J_{C5-F}=20.7$ Hz, C-5), 67.7 (OCH_2), 31.8 (OCH_2CH_2), 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 22.7 (5 CH_2), 20.8 (CH_3), 14.1 (CH_3).

Trifuranoside (67):

Trisaccharide **67** was obtained according to procedure A (table 13, entry 4) and procedure B (table 14, entry 2) and isolated as a white solid.

HRMS: Calcd for $C_{82}H_{79}O_{23}FNa$ $[M+Na]^+$ 1473.48884; found 1473.4891.

R_f=0.6 (CHex/AcOEt, 6:4).

Disaccharides **68**, **69** and **70** were obtained according to procedure A (table 13, entries 5 and 6) and procedure B (table 14, entries 6). Purification gave a mixture of the three compounds.

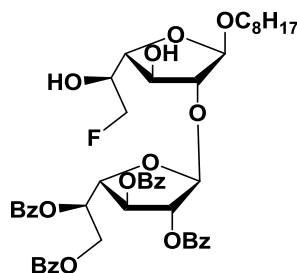
MW=872.94 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{48}H_{53}O_{14}FNa$ $[M+Na]^+$ 895.33116; found 895.3315.

R_f=0.6 (CH₂Cl₂/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

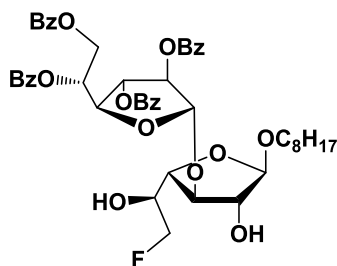
Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl-(1→2)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside
(**68**)



¹H: 8.12-7.96 (m, 6H, H_{arom}), 7.91-7.84 (m, 2H, H_{arom}), 7.60-7.48 (m, 4H, H_{arom}), 7.46-7.23 (m, 8H, H_{arom}), 3.70-3.60 (m, 1H, OCH₂), 3.45-3.31 (m, 1H, OCH₂), 1.58-1.49 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.33-1.19 (m, 10H, 5 CH₂), 0.91-0.83 (m, 3H, CH₃).

¹³C: 166.4-165.5 (CO), 133.8-128.3 (C₆H₅), 68.0 (OCH₂), 32.9 (OCH₂CH₂), 29.6-22.8 (5 CH₂), 14.2 (CH₃).

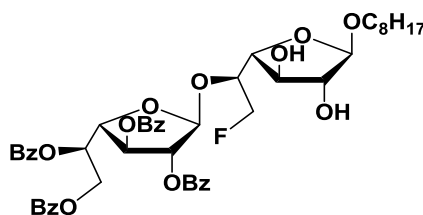
Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl-(1→3)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside
(69)



^1H : 8.12-7.96 (m, 6H, H_{arom}), 7.91-7.84 (m, 2H, H_{arom}), 7.60-7.48 (m, 4H, H_{arom}), 7.46-7.23 (m, 8H, H_{arom}), 3.70-3.60 (m, 1H, OCH_2), 3.45-3.31 (m, 1H, OCH_2), 1.58-1.49 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.33-1.19 (m, 10H, 5 CH_2), 0.91-0.83 (m, 3H, CH_3).

^{13}C : 166.4-165.5 (CO), 133.8-128.3 (C_6H_5), 68.0 (OCH_2), 321.9 (OCH_2CH_2), 29.6-22.8 (5 CH_2), 14.2 (CH_3).

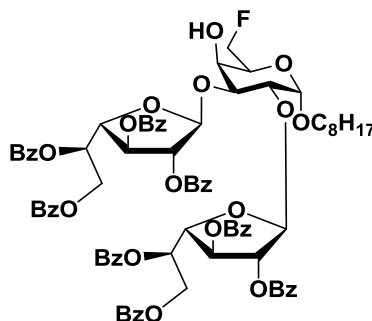
Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl-(1→5)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside
(70)



^1H : 8.12-7.96 (m, 6H, H_{arom}), 7.91-7.84 (m, 2H, H_{arom}), 7.60-7.48 (m, 4H, H_{arom}), 7.46-7.23 (m, 8H, H_{arom}), 3.70-3.60 (m, 1H, OCH_2), 3.45-3.31 (m, 1H, OCH_2), 1.58-1.49 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.33-1.19 (m, 10H, 5 CH_2), 0.91-0.83 (m, 3H, CH_3)

^{13}C : 166.4-165.5 (CO), 133.8-128.3 (C_6H_5), 68.0 (OCH_2), 321.9 (OCH_2CH_2), 29.6-22.8 (5 CH_2), 14.2 (CH_3).

Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl-(1→3)-[2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl-(1→2)]-6-deoxy-6-fluoro-α-D-galactopyranoside (71)



Trisaccharide **71** was obtained according to procedure B (table 14, entry 7) and isolated as a white solid.

MW=1451.5 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{82}H_{79}O_{23}FNa$ $[M+Na]^+$ 1473.48884; found 1473.4881.

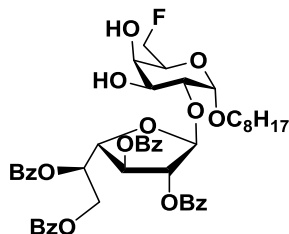
Rf=0.6 (CHex/AcOEt, 6:4).

NMR in $CDCl_3$, data in tables 15 and 16:

1H : 8.07-7.94 (m, 12H, H_{arom}), 7.77-7.69 (m, 4H, H_{arom}), 7.56-7.12 (m, 26H, H_{arom}), 3.62 (dt, $^2J=9.6$ Hz, $^3J=6.6$ Hz, 1H, OCH_2), 3.40-3.33 (m, 1H, OCH_2), 1.56-1.44 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.32-1.07 (m, 10H, 5 CH_2), 0.86 (t, $^3J=6.7$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C : 171.3 (CO), 165.8 (CO), 165.7 (CO), 166.6 (CO), 165.5 (CO), 133.9, 133.7-128.2 (C_6H_5), 68.9 (OCH_2), 32.0 (OCH_2CH_2), 29.7, 29.4, 29.3, 26.2, 22.8 (5 CH_2), 20.9 (CH_3), 14.2 (CH_3).

Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl-(1→2)-6-deoxy-6-fluoro-α-D-galactopyranoside
(72)



Disaccharide **72** was obtained according to procedure A (table 13, entry 4) and procedure B (table 14, entry 7) and isolated as a white solid.

MW=872.94 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{48}H_{53}O_{14}FNa$ $[M+Na]^+$ 895.33116; found 895.3315.

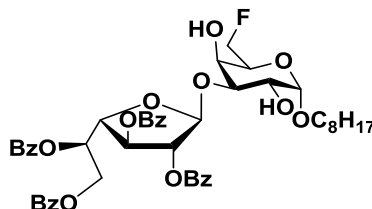
R_f=0.2 (CHex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

¹H: 8.10-7.91 (m, 8H, H_{arom}), 7.59-7.49 (m, 4H, H_{arom}), 7.43-7.29 (m, 8H, H_{arom}), 3.68 (dt, ²J=9.7 Hz, ³J=6.9 Hz, 1H, OCH₂), 3.44 (dt, ²J=9.7 Hz, ³J=6.6 Hz, 1H, OCH₂), 1.57-1.49 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.32-1.13 (m, 10H, 5 CH₂), 0.85 (t, ³J=6.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 166.5 (CO), 166.2 (CO), 165.7 (CO), 165.7 (CO), 133.9, 133.7, 133.5, 133.3, 130.1, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 129.0, 128.7, 128.6, 128.5 (C₆H₅), 68.9 (OCH₂), 32.0 (OCH₂CH₂), 29.8, 29.5, 29.3, 26.3, 22.8 (5 CH₂), 14.2 (CH₃).

Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl-β-D-galactofuranosyl-(1→3)-6-deoxy-6-fluoro-α-D-galactopyranoside
(73)



Disaccharide **73** was obtained according to procedure B (table 14, entry 7) and isolated as a white solid.

MW=872.94 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{48}H_{53}O_{14}FNa$ $[M+Na]^+$ 895.33116; found 895.3315.

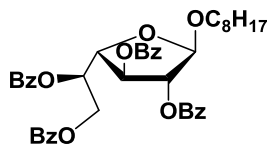
R_f=0.4 (CH₂Hex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃, data in tables 15 and 16:

¹H: 8.11-7.95 (m, 6H, H_{arom}), 7.93-7.88 (m, 2H, H_{arom}), 7.60-7.50 (m, 4H, H_{arom}), 7.45-7.28 (m, 8H, H_{arom}), 3.74 (dt, ²J=9.5 Hz, ³J=6.8 Hz, 1H, OCH₂), 3.49 (dt, ²J=9.9 Hz, ³J=7.2 Hz, 1H, OCH₂), 1.68-1.58 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.40-1.18 (m, 10H, 5 CH₂), 0.87 (t, ³J=7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 166.2 (CO), 165.9 (CO), 165.8 (CO), 165.7 (CO), 133.8, 133.7, 133.5, 133.4, 130.1, 130.0, 129.8, 129.5, 129.4, 129.3, 128.9, 128.7, 128.6 (C₆H₅), 68.7 (OCH₂), 32.0 (OCH₂CH₂), 29.6, 29.5, 29.3, 26.3, 22.8 (5 CH₂), 14.2 (CH₃).

n-Octyl 2,3,5,6-tetra-O-benzoyl- α,β -D-galactofuranose (**74**)



Compound **74** was obtained according to procedure A (table 13, entries 4-6) and procedure B (table 2, entry 7) and isolated as a white solid.

MW=708.90 g/mol.

HRMS : Calcd for $C_{42}H_{44}O_{10}Na$ $[M+Na]^+$ 731.28267; found 731.2829.

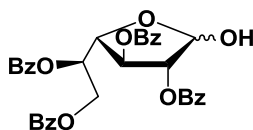
R_f=0.7 (CHex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.11-7.89 (m, 8H, H_{arom}), 7.60-7.49 (m, 4H, H_{arom}), 7.45-7.27 (m, 8H, H_{arom}), 6.08 (ddd, $J_{5,6a}=7.0$ Hz, $J_{5,6b}=4.6$ Hz, $J_{4,5}=3.5$ Hz, 1H, H-5), 5.64 (td, $J_{3,4}=5.2$ Hz, $J_{2,3}=0.9$ Hz, 1H, H-3), 5.47 (d, $J_{2,3}=1.1$ Hz, 1H, H-2), 5.31 (s, 1H, H-1), 4.82-4.71 (m, 2H, H-6), 4.65 (dd, $J_{3,4}=5.2$ Hz, $J_{4,5}=3.5$ Hz, 1H, H-4), 3.75 (dt, $^2J=9.5$ Hz, $^3J=6.3$ Hz, 1H, OCH₂), 3.54 (dt, $^2J=9.5$ Hz, $^3J=6.3$ Hz, 1H, OCH₂), 1.71-1.67 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.41-1.18 (m, 10H, 5 CH₂), 0.87 (t, $^2J=6.3$ Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 165.9 (CO), 165.6 (CO), 165.5 (CO), 165.3 (CO), 133.2, 133.1, 133.0, 132.9, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 128.9, 128.8 (C₆H₅), 105.4, (C-1), 81.9 (C-2), 81.0 (C-4), 77.4 (C-3), 70.1 (C-5), 67.5 (OCH₂), 63.3 (C-6), 31.6 (OCH₂CH₂), 29.3, 29.2, 29.1, 26.0, 22.5 (5 CH₂), 13.9 (CH₃).

2,3,5,6-tetra-O-benzoyl- α,β -D-galactofuranose (75)



Compound **75** was obtained according to procedure B (table 14, entries 4-6) and isolated as a white solid.

MW=596.59 g/mol.

HRMS : Calcd for $C_{34}H_{28}O_{10}Na$ $[M+Na]^+$ 619.15747; found 619.1576.

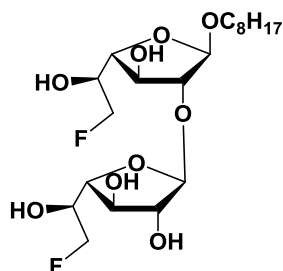
R_f=0.6 (CHex/AcOEt, 6:4).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.11-7.88 (m, 8H, H_{arom}), 7.58-7.46 (m, 4H, H_{arom}), 7.44-7.27 (m, 8H, H_{arom}), 6.10 (t, $J_{2\alpha-3\alpha}=5.1$ Hz, 0.3H, H-3 α), 6.06 (dt, $J_{4\beta-5\beta}=7.0$ Hz, $J_{5\beta-6\beta}=3.1$ Hz, 0.7H, H-5 β), 5.98 (td, $J_{4\alpha-5\alpha}=6.3$ Hz, $J_{5\alpha-6\alpha}=3.6$ Hz, 0.3H, H-5 α), 5.85 (d, $J_{1\alpha-2\alpha}=4.5$ Hz, 0.3H, H-1 α), 5.72 (s, 0.7H, H-1 β), 5.66 (ddd, $J_{3\beta-4\beta}=5.0$ Hz, $J_{2\beta-3\beta}=1.4$ Hz, $J_{1\beta-2\beta}=0.7$ Hz, 0.7H, H-3 β), 5.56 (dd, $J_{2\alpha-3\alpha}=5.4$ Hz, $J_{1\alpha-2\alpha}=4.4$ Hz, 0.3H, H-2 α), 5.52 (dd, $J_{2\beta-3\beta}=1.4$ Hz, $J_{1\beta-2\beta}=0.6$ Hz, 0.7H, H-2 β), 4.87 (dd, $J_{3\beta-4\beta}=5.0$ Hz, $J_{4\beta-5\beta}=4.0$ Hz, 0.7H, H-4 β), 4.82-4.68 (m, 2H, H-6 α , H-6 β), 4.56 (dd, $J_{4\beta-5\beta}=6.6$ Hz, $J_{3\alpha-4\alpha}=4.7$ Hz, 0.3H, H-4 α).

¹³C: 166.4 (CO), 166.2 (CO), 166.2 (CO), 165.9 (5CO), 165.8 (CO), 165.8 (CO), 165.7 (CO), 165.6 (CO), 133.7, 133.6, 133.5, 133.4, 133.2, 130.1, 130.0, 129.8, 129.5, 129.6, 129.1, 128.9, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4 (C₆H₅), 101.2 (C-1 β), 96.2 (C-1 α), 82.8 (C-2 β), 81.8 (C-4 β), 79.5 (C-4 α), 77.8 (C-3 β), 77.7 (C-2 α), 76.0 (C-3 α), 72.4 (C-5 α), 70.7 (C-5 β), 63.7 (C-6 β), 63.3 (C-6 α).

Octyl 6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→2)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (81)



Disaccharide **81** was obtained according to procedure C and isolated as a white solid (6 mg).

Yield: 95%.

MW=458.50 g/mol.

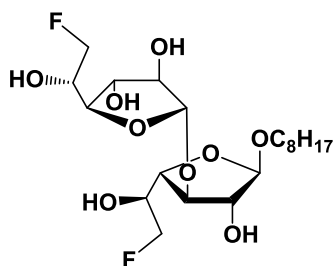
HRMS: Calcd for $C_{20}H_{36}O_{10}F_2Na$ $[M+Na]^+$ 481,22196; found 481.2222.

NMR in CD_3OD :

1H : 5.08 (d, $J_{1,2}=1.9$ Hz, 1H, H-1), 4.98 (d, $J_{1',2'}=1.6$ Hz, 1H, H-1'), 4.58-4.48 (m, 2H, H-6a, H-6a'), 4.46-4.35 (m, 2H, H-6b, H-6b'), 4.17 (dd, $J_{3',4'}=7.7$ Hz, $J_{2',3'}=4.1$ Hz, 1H, H-3'), 4.07 (dd, $J_{3,4}=6.3$ Hz, $J_{2,3}=3.9$ Hz, 1H, H-3), 4.00 (dd, $J_{2,3}=3.9$ Hz, $J_{1,2}=1.9$ Hz, 1H, H-2), 3.99 (dd, $J_{2',3'}=4.10$ Hz, $J_{1',2'}=1.6$ Hz, 1H, H-2'), 3.97-3.90 (m, 3H, H-4, H-5, H-5'), 3.85 (dd, $J_{3',4'}=7.7$ Hz, $J_{4',5'}=3.2$ Hz, 1H, H-4'), 3.68 (dt, $^2J=9.6$ Hz, $^3J=6.7$ Hz, 1H, OCH_2), 3.43 (dt, $^2J=9.6$ Hz, $^3J=6.5$ Hz, 1H, OCH_2), 1.64-4.55 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.41-1.25 (m, 10H, 5 CH_2), 0.91 (t, $^3J=6.3$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C : 109.8 (C-1), 108.0 (C-1'), 90.6 (C-2'), 85.2 (d, $J_{C-F}=171.2$ Hz, C-6), 85.1 (d, $J_{C-F}=169.9$, C-6'), 83.6 (d, $J_{C-F}=4.3$ Hz, C-4), 83. (C-2), 81.8 (d, $J_{C-F}=7.3$ Hz, C-4'), 78.3 (C-3), 77.2 (C-3'), 69.8 (d, $J_{C-F}=20.0$ Hz, C-5, C-5'), 68.9 (OCH_2), 33.0, 30.8, 30.5, 30.4, 27.3, 23.7 (6 CH_2), 14.4 (CH_3).

Octyl 6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→3)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (82)



Disaccharide **82** was obtained according to procedure C and isolated as a white solid (8 mg).

Yield: 88%.

MW=458.50 g/mol.

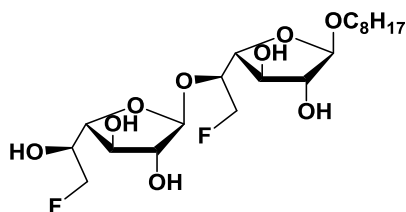
HRMS: Calcd for $C_{20}H_{36}O_{10}F_2Na$ $[M+Na]^+$ 481,22196; found 481.2220.

NMR in CD_3OD :

1H : 5.06 (d, $J_{1,2}=2.0$ Hz, 1H, H-1), 4.86 (d, $J_{1',2'}=1.6$ Hz, 1H, H-1'), 4.56-4.46 (m, 2H, H-6a, H-6a'), 4.43-4.34 (m, 2H, H-6b, H-6b'), 4.15-4.10 (m, 1H, H-3'), 4.08 (dd, $J_{2',3'}=3.2$ Hz, $J_{1',2'}=1.6$ Hz, 1H, H-2'), 4.06-3.99 (m, 3H, H-3, H-4', H-5), 4.0 (d, $J_{1,2}=2.1$ Hz, 1H, H-2), 3.98-3.89 (m, 2H, H-4, H-5'), 3.65 (dt, $^2J=9.7$ Hz, $^3J=6.7$ Hz, 1H, OCH_2), 3.41 (dt, $^2J=9.7$ Hz, $^3J=6.4$ Hz, 1H, OCH_2), 1.64-4.52 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.49-1.23 (m, 10H, 5 CH_2), 0.89 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C : 109.3 (C-1'), 109.1 (C-1), 85.2 (d, $J_{C-F}=169.6$ Hz, C-6'), 85.0 (d, $J_{C-F}=170.7$ Hz, C-6), 84.2 (C-3'), 83.5 (d, $J_{C-F}=6.3$ Hz, C-4), 83.0 (C-2), 82.1 (d, $J_{C-F}=6.6$ Hz, H-4'), 81.6 (C-2'), 78.0 (C-3), 67.8 (d, $J_{C-F}=18.3$ Hz, C-5), 69.7 (d, $J_{C-F}=20.2$ Hz, C-5'), 68.7 (OCH_2), 32.8, 30.5, 30.3, 30.2, 27.0, 23.5, (6 CH_2), 14.4 (CH_3).

Octyl 6-fluoro-β-D-galactofuranosyl-(1→5)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (83)



Disaccharide **83** was obtained according to procedure C and isolated as a white solid (6 mg).

Yield: 93%.

MW=458.50 g/mol.

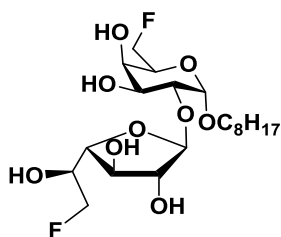
HRMS : Calcd for $C_{20}H_{36}O_{10}F_2Na$ $[M+Na]^+$ 481,22196; found 481.2220.

NMR in CD_3OD :

1H : 5.17 (s, 1H, H-1), 4.83 (d, $J_{1',2'}=1.7$ Hz, H-1'), 4.70-4.61 (m, 1H, H-6a'), 4.61-4.46 (m, 2H, H-6b', H-6a), 4.46-4.41 (m, 1H, H-6b), .21-4.10 (m, 1H, H-5'), 4.13 (dd, $J_{3,4}=4.5$ Hz, $J_{4,5}=3.4$ Hz, 1H, H-4), 4.05-3.98 (m, 3H, H-3', H-3, H-5), 3.97-3.90 (m, 3H, H-2', H-4', H-2), 3.69-3.60 (m, 1H, OCH_2), 3.46-3.36 (m, 1H, OCH_2), 1.61-1.50 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.38-1.20 (m, 10H, 5 CH_2), 0.87 (t, $^3J=5.4$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C : 109.1 (C-1, C-1'), 85.2 (d, $J_{C-F}=6.4$ Hz, C-4), 85.1 (d, $J_{C-F}=167.5$ Hz, C-6), 84.1 (d, $J_{C-F}=168.9$ Hz, C-6'), 83.0 (C-2, C-2'), 82.9 (d, $J_{C-F}=7.2$ Hz, C-4'), 78.2 (C-3'), 77.6 (C-3), 74.6 (d, $J_{C-F}=17.5$ Hz, C-5'), 70.5 (d, $J_{C-F}=19.9$ Hz, C-5), 69.9 (OCH_2), 32.7, 30.3, 30.2, 30.1, 26.9, 23.4 (6 CH_2), 14.4 (CH_3).

Octyl 6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (84)



Disaccharide **84** was obtained according to procedure C and isolated as a white solid (4 mg).

Yield: 92%.

MW=458.50 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{20}H_{36}O_{10}F_2 Na [M+Na]^+$ 481.22196; found 481.2213.

NMR in CD_3OD :

1H : 5.06 (d, $J_{1,2}=1.7$ Hz, 1H, H-1), 4.99 (d, $J_{1',2'}=3.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.65-4.35 (m, 4H, H-6, H-6'), 4.08 (dd, $J_{2,3}=3.8$ Hz, $J_{1,2}=1.8$ Hz, 1H, H-2), 4.03-4.01 (m, 1H, H-5), 4.01-3.92 (m, 1H, H-5'), 3.99 (dd, $J_{2,3}=3.8$ Hz, $J_{2,3}=3.1$ Hz, 1H, H-3), 3.97 (dd, $J_{3,4}=3.1$ Hz, $J_{4,5}=2.1$ Hz, 1H, H-4), 3.92 (dd, $J_{3',4'}=3.4$ Hz, $J_{4',5'}=1.3$ Hz, 1H, H-4'), 3.87 (dd, $J_{2',3'}=10.0$ Hz, $J_{3',4'}=3.4$ Hz, 1H, H-3'), 3.77 (dd, $J_{2',3'}=10.0$ Hz, $J_{1',2'}=3.7$ Hz, 1H, H-2'), 3.69 (dt, $^2J=9.6$ Hz, $^3J=6.9$ Hz, 1H, OCH_2), 3.45 (dt, $^2J=9.6$ Hz, $^3J=6.4$ Hz, 1H, OCH_2), 1.67-1.56 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.43-1.28 (10H, 5 CH_2), 0.91 (t, $^3J=6.7$ Hz, 3H, CH_3).

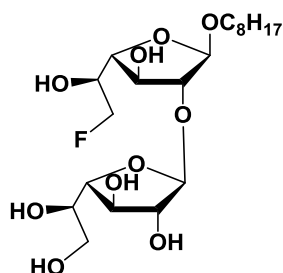
^{13}C : 110.9 (C-1), 99.7 (C-1'), 84.3 (d, $J_{C-F}=170.6$ Hz, C-6'), 84.0 (d, $J_{C-F}=5.6$ Hz, C-4'), 83.6 (d, $J_{C-F}=167.2$ Hz, C-6), 81.8 (C-2), 77.9 (C-3), 77.6 (C-2'), 70.2 (d, $J_{C-F}=21$ Hz, H-5), 70.2 (d, $J_{C-F}=6.2$ Hz, C-4'), 69.6 (d, $J_{C-F}=16.9$ Hz, C-5'), 69.5 (C-3'), 69.1 (OCH_2), 32.7, 30.3, 30.2, 30.1, 23.4 (5 CH_2), 14.4 (CH_3).

Disaccharides **85**, **86** and **87** were deacylated according to procedure C. Purification gave a mixture of the three compounds (15mg, 90%, ratio 30:26:44 for 25/26/27).

HRMS : Calcd for $C_{20}H_{37}O_{10}FNa$ $[M+Na]^+$ 479.2263; found 479.2262.

NMR assignment in CD_3OD for each disaccharide yielded to the following data:

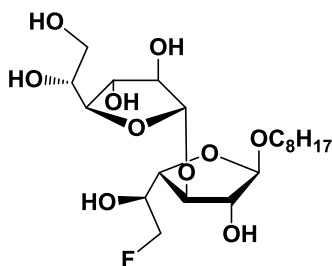
Octyl β-D-galactofuranosyl-(1→2)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (85)



1H : 5.07 (d, $J_{1,2}=1.6$ Hz, H-1), 4.99 (d, $J_{1',2'}=1.4$ Hz, H-1'), 4.54-4.47 (m, 1H, H-6a'), 4.41-4.34 (m, 1H, H-6b'), 4.13 (dd, $J_{3,4}=3.5$ Hz, $J_{2,3}=1.6$ Hz, H-3'), 4.05-4.02 (m, 1H, H-3), 4.01-3.96 (m, 2H, H-2, H-2'), 3.96-3.92 (m, 2H, H-5', H-4), 3.86 (dd, $J_{4,5}=7.3$ Hz, $J_{3,4}=3.1$ Hz, H-4'), 3.76-3.70 (m, 1H, H-5), 3.68-3.58 (m, 3H, H-6, OCH_2), 3.45-3.35 (m, 1H, OCH_2), 1.60-1.50 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.37-1.19 (m, 10H, 5 CH_2), 0.86 (t, $^3J=6.7$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C : 108.0 (C-1), 106.5 (C-1'), 88.5 (C-2'), 84.1 (d, $J_{C-F}=169.2$ Hz, C-6'), 83.9 (C-3), 81.5 (C-2), 80.9 (d, $J_{C-F}=6.2$ Hz, C-4'), 77.3 (C-3), 75.7 (C-3'), 71.0 (C-5), 68.5 (d, $J_{C-F}=19.9$ Hz, C-5'), 67.9 (OCH_2), 63.4 (C-6), 31.7, 29.4, 29.2, 29.1, 25.9, 22.4 (5 CH_2), 13.5 (CH_3).

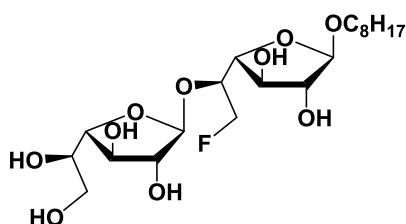
Octyl β-D-galactofuranosyl-(1→3)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (86)



^1H : 5.07 (d, $J_{1,2}=1.6$ Hz, H-1), 4.86 (d, $J_{1',2'}=1.6$ Hz, H-1'), 4.54-4.47 (m, 1H, H-6a'), 4.41-4.34 (m, 1H, H-6b'), 4.17-4.13 (m, 1H, H-3'), 4.07 (dd, $J_{2',3'}=3.2$ Hz, $J_{1',2'}=1.6$ Hz, H-2'), 4.09-4.05 (m, 1H, H-5'), 4.03-3.98 (m, 3H, H-4', H-2, H-3), 3.98-3.92 (m, 1H, H-4), 3.76-3.70 (m, 1H, H-5), 3.68-3.58 (m, 3H, H-6, OCH₂), 3.45-3.35 (m, 1H, OCH₂), 1.60-1.50 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.37-1.19 (m, 10H, 5 CH₂), 0.86 (t, $^3J=6.7$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C : 108.1 (C-1'), 107.6 (C-1), 84.1 (d, $J_{\text{C-F}}=169.2$ Hz, C-6'), 83.9 (C-4), 82.4 (C-3'), 81.5 (C-2), 80.9 (d, $J_{\text{C-F}}=6.6$ Hz, H-4'), 80.1 (C-2'), 77.3 (C-3), 70.9 (C-5), 68.3 (d, $J_{\text{C-F}}=19.7$ Hz, C-5'), 67.8 (OCH₂), 63.1 (C-6), 31.7, 29.4, 29.2, 29.1, 25.9, 22.4 (5 CH₂), 13.5 (CH₃).

Octyl β-D-galactofuranosyl-(1→5)-6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactofuranoside (87)



^1H : 5.16 (s, 1H, H-1), 4.83 (d, $J_{1',2'}=1.7$ Hz, H-1'), 4.66-4.63 (, 1H, H-6a'), 4.54-4.47 (m, 1H, H-6b'), 4.20-4.12 (m, 2H, H-4, H-5'), 4.05-.98 (m, 3H, H-2, H-3, H-3'), 3.96-3.92 (m, 2H, H-2', H-5'), 3.76-3.70 (m, 1H, H-5), 3.68-3.58 (m, 3H, H-6, OCH₂), 3.45-3.35 (m, 1H, OCH₂), 1.60-1.50 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.37-1.19 (m, 10H, 5 CH₂), 0.86 (t, $^3J=6.7$ Hz, 3H, CH₃).

^{13}C : 108.0 (C-1'), 107.8 (d, $J_{\text{C-F}}=2.4$ Hz, C-1), 84.4 (C-4), 83.6 (d, $J_{\text{C-F}}=170.1$ Hz, C-6'), 81.9 (C-2'), 81.7 (d, $J_{\text{C-F}}=7.2$ Hz, C-4'), 80.8 (C-2), 77.8 (C-3), 77.3 (C-3'), 73.2 (d, $J_{\text{C-F}}=18.6$ Hz, C-5'), 71.0 (C-5), 68.9 (OCH₂), 62.8 (C-6), 31.7, 29.4, 29.2, 29.1, 25.9, 22.4 (5 CH₂), 13.5 (CH₃).

Tableau 15 : ^1H NMR (CDCl_3) data [δ (J, Hz)].

Unit c								Unit b								Unit a							
H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'		
58	5.53	4.49-4.47	5.44 (5.4, 1.3)	4.55-4.50	5.57-5.50	4.75-4.55	5.81	5.81	5.58	5.49-5.47	4.55-4.50	5.57-5.50	4.75-4.55		5.03 (3.7)	4.12 (3.4)	4.26 (9.9)	4.12-4.07		4.75-4.55			
59								5.37 (1.0)	5.46 (3.3)	5.60 (7.0)	4.72-4.48	5.45-5.37	4.72-4.48		5.07 (3.6)	3.89 (9.0)	4.16-4.06	4.16-4.06	4.16-4.06	4.72-4.48			
60								5.68 (0.6)	5.58 (2.2)	5.54 (5.2)	4.49	5.50-5.42	4.80-4.50		4.97 (3.7)	4.16-4.02	3.96 (3.3, 9.7)	4.16-4.02		4.80-4.50			
61								5.46 (<i><1</i>)	5.42 (1.5)	5.50 (5.0)	4.53 (4.8)	5.58-5.53	4.64 (5.1, 9.6, 46.4)	4.70 (5.4, 9.7, 46.6)	5.14 (0.7)	4.17 (1.9)	4.24 (3.9, 10.1)	4.13-4.10	4.09-4.02	4.51 (5.4, 46.8)			
62								5.45 (<i><1</i>)	5.46	5.53-5.47	4.50 (4.8)	5.53-5.47	4.78-4.53		4.97 (1.1)	4.28 (1s)	4.24 (2.3, 4.9)	4.17-4.12		4.50 (5.4, 47.4)			
63								5.56 (<i><1</i>)	5.53-5.48	4.75 (4.9)	5.53-5.48	4.82-4.56	4.94 (<i><1</i>)		4.08-4.02	4.00-3.94	4.15 (2.7, 3.8)	4.33 (2.7, 4.4, 7.1, 14.0)	4.82-4.56				
68								5.52	5.43	5.68	4.71-	6.08-	4.84-4.67		5.18	4.19	4.32-	4.12-4.09		4.44-4.42			

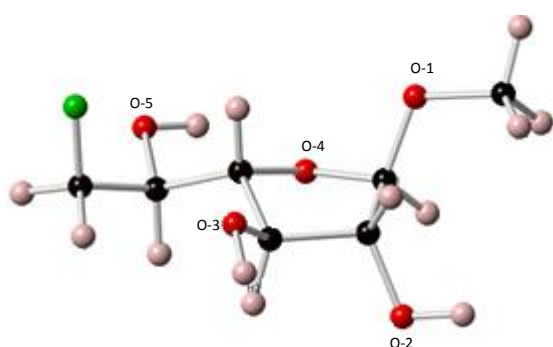
							(1.3)	(5.3)	4.67	5.99								(<1)	(2.0)	4.27	4.57-4.53		
69							5.54	5.48 (1.4)	5.66- 5.64	4.67- 4.60	6.08- 5.99	4.84-4.67	4.98	4.37- 4.23	4.31- 4.27	4.20- 4.17	4.12- 4.09	4.43-4.38					
														4.54-4.50									
70							5.61	5.41 (1.4)	5.65 (5.2)	4.99- 4.95	6.08- 5.99	4.84-4.67	4.95	3.95	4.12- 4.09	4.15	4.34- 4.23	4.84-4.69					
71	5.86	5.61 (1.0)	5.73- 5.65	4.86- 4.63	6.09- 6.04	4.86-4.63	5.65	5.53 (0.9)	5.73- 5.65	4.86- 4.63	6.09- 6.04	4.86-4.63	5.02 (3.7)	4.17 (9.9)	4.28 (3.4)	4.08-4.01		4.86-4.63					
72							5.46 (<1)	5.48 (2.5)	5.75 (6.2)	4.75	5.97 (6.8, 4.1)	4.78-4.64	5.07 (3.6)	3.95 (9.6)	4.16-4.03		4.69-4.56						
73							5.74	5.60 (0.8, 1.9)	5.70 (4.8)	4.76- 4.66	6.03- 5.96	4.81-4.71	4.96 (3.9)	4.10- 3.98	3.94 (9.7, 3.3)	4.10-3.98		4.76-4.66					
														4.55-4.46									

Tableau 16 : ^{13}C NMR (CDCl_3) data [δ ($J_{\text{C-F}}$, Hz)].

	Unit c						Unit b						Unit a					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
58	107.6	82.3	77.2	81.7 (5.0)	70.3 (20.5)	81.1 or 80.6 (173.4)	107.2	81.4	77.2	80.3 (4.4)	70.3 (20.5)	80.6 or 81.1 (173.4)	98.7	75.4	74.9	69.7 (6.4)	68.0 (22.5)	88.6 (168.9)
59							108.3	83.6	75.9	78.6 (6.3)	68.8 (21.1)	80.5 (173.9)	98.5	78.3	68.6	68.9 (4.9)	68.5 (24.3)	83.2 (164.5)
60							107.3	82.3	76.8	80.7 (5.0)	70.1 (20.2)	80.8 (173.6)	98.5	68.5	78.0	69.2 (6.5)	68.6 (21.0)	82.5 (167.5)
61							105.7	82.2	76.2	80.9 (4.6)	70.1 (21.1)	80.8 (173.6)	106.1	86.1	76.2	84.7 (5.2)	69.7 (20.6)	83.7 (170.7)
62							106.2	82.1	76.9	80.7 (5.2)	70.1 (20.9)	80.7 (173.9)	108.4	79.8	84.3	81.5 (6.2)	69.4 (19.9)	84.3 (169.9)
63							106.4 (5.6)	82.0	77.1	81.0 (7.9)	70.2 (21.1)	81.3 (172.8)	107.9	79.0	78.4	85.2 (3.9)	75.6 (19.0)	83.6 (170.8)
68							105.9	82.6	77.5	82.1	70.3	63.3	106.0	86.2	76.2	84.6 (6.7)	69.7 (20.9)	83.7 (172.6)
69							105.8	82.3	77.2	82.1	70.5	63.4	108.5	79.7	83.4	81.2 (5.8)	69.2 (20.3)	84.0 (169.3)
70							106.4 (3.5)	82.4	77.8	82.5	70.6	63.5	108.0	79.3	78.4	85.1 (2.7)	75.3 (19.2)	83.6 (171.4)
71	107.4	81.9	77.6	82.1	70.5	63.5	107.6	82.2	77.7	82.9	70.5	63.2	98.6	74.9	75.2	69.8 (7.3)	68.2 (22.1)	82.6 (162.6)
72							108.5	83.6	76.8	80.8	70.3	63.5	98.5	78.2	68.4	68.7 (5.6)	68.4 (22.8)	82.9 (167.1)
73							107.5	82.8	77.3	82.0	70.4	63.2	98.5	68.6	77.9	69.3 (7.1)	68.7 (19.9)	82.2 (167.3)

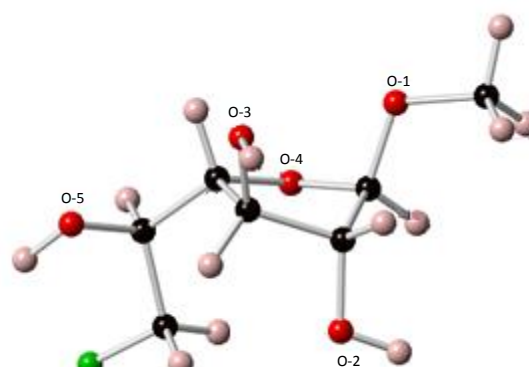
Computational details: All DFT calculations were carried with the Gaussian16 (version A.03) program, tightening self-consistent field convergence thresholds (10^{-10} au). For all calculations, the hybrid B3LYP functional has been used. For comparison, the 6-311G(2d,p) atomic basis set has been employed for geometry and frequency calculations. Solvent effects (solvent=acetonitrile) were included according to the Polarizable Continuum Model. Fukui and condensed Fukui functions have been calculated *via* Finite Difference method and are given for various atomic charges (Mulliken, Hirshfeld, Voronoi, Bader).

Configuration 1



Configuration

2



Energies

	Conf. 1	Conf.2
B3LYP	-750.67805361 a.u. (0.00 eV)	-750.67691425 a.u. (0.03 eV)
M06-2X	-750.40046472 a.u. (0.02 eV)	-750.40122725 a.u. (0.00 eV)

Configuration 1

B3LYP/6-311G(d)

Condensed Fukui minus functions:					Condensed Fukui plus functions:				
	Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader
O-4	0.04	0.04	0.04	-0.02	O-4	0.01	0.01	0.01	0.01
O-1	0.18	0.17	0.19	0.26	O-1	0.01	0.01	0.01	0.00
O-3	0.09	0.09	0.08	0.10	O-3	0.01	0.01	0.01	0.00
O-2	0.11	0.11	0.10	0.07	O-2	-0.06	0.15	0.09	0.27
O-5	0.03	0.03	0.03	0.02	O-5	0.00	0.00	0.00	-0.00

Local Fukui minus softness:					Local Fukui plus softness:				
	Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader
O-4	0.14	0.14	0.15	-0.08	O-4	0.03	0.03	0.03	0.02
O-1	0.61	0.57	0.65	0.88	O-1	0.04	0.04	0.04	0.02
O-3	0.31	0.31	0.29	0.36	O-3	0.03	0.03	0.03	0.01
O-2	0.39	0.38	0.36	0.25	O-2	-0.20	0.53	0.30	0.91
O-5	0.11	0.10	0.10	0.07	O-5	0.01	0.01	0.01	-0.00

M06-2X/6-311G(d)

Condensed Fukui minus functions:					Condensed Fukui plus functions:				
	Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader
O-4	0.04	0.04	0.04	0.04	O-4	0.01	0.01	0.01	-0.01
O-1	0.25	0.23	0.26	0.37	O-1	0.01	0.01	0.01	0.00
O-3	0.05	0.05	0.05	0.04	O-3	0.01	0.01	0.01	0.00
O-2	0.10	0.10	0.09	0.07	O-2	-0.06	0.16	0.09	0.25
O-5	0.01	0.01	0.01	0.01	O-5	0.00	0.00	0.00	0.00

Local Fukui minus softness:					Local Fukui plus softness:				
	Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfeld	Voronoi	Bader
O-4	0.11	0.10	0.11	0.10	O-4	0.02	0.02	0.02	-0.03
O-1	0.65	0.59	0.67	0.95	O-2	0.03	0.02	0.02	0.01
O-3	0.13	0.13	0.12	0.09	O-3	0.02	0.02	0.02	0.01
O-2	0.26	0.25	0.23	0.19	O-2	-0.17	0.40	0.23	0.64
O-5	0.04	0.03	0.03	0.03	O-5	0.01	0.01	0.01	0.01

Configuration 2

B3LYP/6-311G(d)

Condensed Fukui minus functions:					Condensed Fukui plus functions:				
	Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader
O-4	0.05	0.04	0.05	0.03	O-4	0.01	0.01	0.01	-0.02
O-2	0.09	0.09	0.08	0.03	O-2	-0.07	0.16	0.09	0.29
O-1	0.19	0.18	0.20	0.32	O-1	0.01	0.01	0.01	-0.02
O-3	0.10	0.10	0.10	0.12	O-3	0.01	0.01	0.01	0.01
O-5	0.02	0.02	0.02	0.01	O-5	0.00	0.00	0.00	-0.00

Local Fukui minus softness:					Local Fukui plus softness:				
	Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader
O-4	0.17	0.15	0.17	0.09	O-4	0.03	0.04	0.03	-0.07
O-2	0.29	0.29	0.27	0.12	O-2	-0.25	0.55	0.30	0.98
O-1	0.65	0.61	0.69	1.11	O-1	0.04	0.04	0.04	-0.07
O-3	0.35	0.35	0.33	0.41	O-3	0.03	0.05	0.04	0.02
O-5	0.07	0.07	0.06	0.05	O-5	0.01	0.01	0.01	-0.00

M06-2X/6-311G(d)

Condensed Fukui minus functions:					Condensed Fukui plus functions:				
	Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader
O-4	0.05	0.04	0.04	-0.02	O-4	0.01	0.01	0.01	0.02
O-2	0.08	0.07	0.07	0.05	O-2	-0.03	0.06	0.03	0.12
O-1	0.27	0.24	0.28	0.49	O-1	0.01	0.01	0.01	-0.04
O-3	0.06	0.06	0.05	0.06	O-3	0.01	0.01	0.01	0.01
O-5	0.01	0.01	0.01	0.01	O-5	-0.05	0.11	0.06	0.17

Local Fukui minus softness:					Local Fukui plus softness:				
	Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader		Mulliken	Hirshfied	Voronoi	Bader
O-4	0.12	0.10	0.11	-0.05	O-4	0.01	0.03	0.03	0.04
O-2	0.19	0.19	0.17	0.13	O-2	-0.07	0.16	0.09	0.29
O-1	0.68	0.61	0.70	1.23	O-1	0.01	0.01	0.01	-0.09
O-3	0.14	0.14	0.13	0.15	O-3	0.01	0.03	0.02	0.02
O-5	0.02	0.02	0.01	0.01	O-5	-0.13	0.27	0.16	0.43

Références

1. Yang, Y., Zhang, X., Yu, B. O-Glycosylation methods in the total synthesis of complex natural glycosides. *Nat. Prod. Rep.* **32**, 1331–1355 (2015).
2. Yasomane, J. P., Demchenko, A. V. Effect of Remote Picolinyl and Picoloyl Substituents on the Stereoselectivity of Chemical Glycosylation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20097–20102 (2012).
3. Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M. Di-tert-butyldisilylene-Directed α -Selective Synthesis of 4-Methylumbelliferyl T-Antigen. *Org. Lett.* **7**, 4415–4418 (2005).
4. Bohé, L., Crich, D. 6.01 Synthesis of Glycosides. in *Comprehensive Organic Synthesis* 1–33 (2014).
5. Demchenko, A. 1,2-cis O-Glycosylation: Methods, Strategies, Principles. *Curr. Org. Chem.* **7**, 35–79 (2003).
6. Mackie, W., Perlin, A. S. Pyranose-Furanose and anomeric equilibria : Influence of Solvent and Partial methylation. *Can. J. Chem.* **44**, 2039–2049 (1966).
7. Ness, R. K., Fletcher, H. G., Hudson, C. S. 1,4-Anhydro-D-galactitol. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3742–3744 (1951).
8. D'Accorso, N. B., Thiel, I. M. E., Schüller, M. Proton and C-13 nuclear magnetic resonance spectra of some benzoylated aldohexoses. *Carbohydr. Res.* **124**, 177–184 (1983).
9. Lee, R. E., Mikusova, K., Brennan, P. J., Besra, G. S. Synthesis of the Arabinose Donor .beta.-D-Arabinofuranosyl-1-monophosphoryldecaprenol, Development of a Basic Arabinosyl-Transferase Assay, and Identification of Ethambutol as an Arabinosyl Transferase Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11829–11832 (1995).
10. Baldoni, L., Marino, C. Facile Synthesis of per-O-tert-Butyldimethylsilyl- β -D-galactofuranose and Efficient Glycosylation via the Galactofuranosyl Iodide. *J. Org. Chem.* **74**, 1994–2003 (2009).
11. Dureau, R., Legentil, L., Daniellou, R., Ferrières, V. Two-Step Synthesis of per-O-acetylfuranoses: Optimization and Rationalization. *J. Org. Chem.* **77**, 1301–1307 (2012).
12. Varela, O., Marino, C., de Lederkremer, R. M. Synthesis of p-nitrophenyl β -D-galactofuranoside. A convenient substrate for β -galactofuranosidase. *Carbohydr. Res.* **155**, 247–251 (1986).
13. De Lederkremer, R. M., Litter, M. I. The formation of an unsaturated lactone derivative on benzylation of D-galactonolactone. *Carbohydr. Res.* **20**, 442–444 (1971).
14. Varela, O. J., Cirelli, A. F., De Lederkremer, R. M. β -Elimination in aldonolactones. Synthesis of 3,6-dideoxy L-arabino-hexose (ascarylose). *Carbohydr. Res.* **70**, 27–35 (1979).
15. Green, J. W., Pacsu, E. Glycofuranosides and Thioglycofuranosides. I. A Method of Preparation and its Application to Galactose and Glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1205–1210 (1937).
16. Imamura, A., Lowary, T. Chemical Synthesis of Furanose Glycosides. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **23**, 134–152 (2011).
17. McAuliffe, J. C., Hindsgaul, O. Use of Acyclic Glycosyl Donors for Furanoside Synthesis. *J. Org. Chem.* **62**, 1234–1239 (1997).
18. Completo, G. C., Lowary, T. L. Synthesis of Galactofuranose-Containing Acceptor Substrates for Mycobacterial Galactofuranosyltransferases. *J. Org. Chem.* **73**, 4513–4525 (2008).
19. Madhusudan, S. K., Misra, A. K. Facile exchange of glycosyl S,S-acetals to their O,O-acetals and preparation of glycofuranosides from acyclic glycosyl S,S-acetals under metal-free reaction conditions in the presence of 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin. *Carbohydr. Res.* **340**, 497–502 (2005).
20. Timmer, M. S. M., Stocker, B. L., Seeberger, P. H. De Novo Synthesis of Aceric Acid and an Aceric Acid Building Block. *J. Org. Chem.* **71**, 8294–8297 (2006).
21. Krylov, V. B., Argunov, D., Vinnitskiy, D., Verkhnyatskaya, S., Gerbst, A., Ustyuzhanina, N., Dmitrenok, A., Huebner, J., Holst, O., Siebert, H., Nifantiev, N. Pyranoside-into-Furanoside

- Rearrangement: New Reaction in Carbohydrate Chemistry and Its Application in Oligosaccharide Synthesis. *Chem. - Eur. J.* **20**, 16516–16522 (2014).
22. Krylov, V. B., Kaskova, Z., Vinnitskiy, D., Ustyuzhanina, N., Grachev, A., Chizhov, A., Nifantiev, N. Acid-promoted synthesis of per-O-sulfated fucooligosaccharides related to fucoidan fragments. *Carbohydr. Res.* **346**, 540–550 (2011).
 23. Klotz, W., Schmidt, R. R. Anomeric O-alkylation, 11. Anomeric O-Alkylation of O-Unprotected Hexoses and Pentoses – Convenient Synthesis of Decyl, Benzyl, and Allyl Glycosides. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 683–690 (1993).
 24. Ferrières, V., Bertho, J.-N., Plusquellec, D. A convenient synthesis of alkyl D-glycofuranosiduric acids and alkyl D-glycofuranosides from unprotected carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **311**, 25–35 (1998).
 25. Ferrières, V., Bertho, J.-N., Plusquellec, D. A new synthesis of O-glycosides from totally O-unprotected glycosyl donors. *Tetrahedron Lett.* **36**, 2749–2752 (1995).
 26. Peltier, P., Euzen, R., Daniellou, R., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V. Recent knowledge and innovations related to hexofuranosides: structure, synthesis and applications. *Carbohydr. Res.* **343**, 1897–1923 (2008).
 27. Barbeau, J., Lemiègre, L., Quelen, A., Malard, V., Gao, H., Gonçalves, C., Berchel, M., Jaffrès, P., Pichan, C., Midoux, P., Benvegna, T. Synthesis of a trimannosylated-equipped archaeal diether lipid for the development of novel glycoliposomes. *Carbohydr. Res.* **435**, 142–148 (2016).
 28. Lim, D., Brimble, M. A., Kowalczyk, R., Watson, A. J. A., Fairbanks, A. J. Protecting-Group-Free One-Pot Synthesis of Glycoconjugates Directly from Reducing Sugars. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 11907–11911 (2014).
 29. Noguchi, M., Tanaka, T., Gyakushi, H., Kobayashi, A., Shoda, S. Efficient Synthesis of Sugar Oxazolines from Unprotected *N*-Acetyl-2-amino Sugars by Using Chloroformamidinium Reagent in Water. *J. Org. Chem.* **74**, 2210–2212 (2009).
 30. Dureau, R., Robert-Gangneux, F., Gangneux, J., Nugier-Chauvin, C., Legentil, L., Daniellou, R., Ferrières, V. Synthetic UDP-furanoses inhibit the growth of the parasite *Leishmania*. *Carbohydr. Res.* **345**, 1299–1305 (2010).
 31. Byun, H.-S., He, L., Bittman, R. Cyclic Sulfites and Cyclic Sulfates in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **56**, 7051–7091 (2000).
 32. Fuentes, J., Angulo, M., Angeles Pradera, M. Completely regioselective synthesis of 5- and 6-amino and fluoro-hexofuranoses via cyclic sulphates. *Tetrahedron Lett.* **39**, 7149–7152 (1998).
 33. Chlubnová, I. Chemo-Enzymatic synthesis of bioactive furanosyl containing glycoconjugates. (2010).
 34. Davis, B. G. Recent developments in oligosaccharide synthesis. *J. Chem. Soc.* **14**, 2137–2160 (2000).
 35. Garegg, P. J. Thioglycosides as Glycosyl Donors in Oligosaccharide Synthesis. in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **52**, 179–205 (1997).
 36. Christensen, H. M., Oscarson, S., Jensen, H. H. Common side reactions of the glycosyl donor in chemical glycosylation. *Carbohydr. Res.* **408**, 51–95 (2015).
 37. Jørgensen, P. T., Pedersen, E. B., Nielsen, C. A Surprising Ring Opening Mechanism in the Formation of α -D-Arabinofuranosyl Nucleosides from 5-Substituted Uracils. *Synthesis* **1992**, 1299–1306 (1992).

38. Larsen, E., Kofoed, T., Pedersen, E. B. Synthesis of 2,3'-Anhydro-2'-deoxyuridines and 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxyuridines Using Polymer Supported Fluoride. *Synthesis* **1995**, 1121–1125 (1995).
39. Cheng, Y., Guo, A.-L., Guo, D.-S. Recent Progress in Synthesis and Applications of Fluorinated Carbohydrates. *Curr. Org. Chem.* **14**, 977–999 (2010).
40. Publisher, B. S. Fluorinated Carbohydrates. in *Advances in Organic Synthesis* **2**, 381–429 (2012).
41. Durantie, E., Bucher, C., Gilmour, R. Fluorine-Directed β -Galactosylation: Chemical Glycosylation Development by Molecular Editing. *Chem. - Eur. J.* **18**, 8208–8215 (2012).
42. Sadurní, A., Kehr, G., Ahlqvist, M., Wernevik, J., Sjögren, H., Kankkonen, C., Knerr, L., Gilmour, R. Fluorine-Directed Glycosylation Enables the Stereocontrolled Synthesis of Selective SGLT2 Inhibitors for Type II Diabetes. *Chem. - Eur. J.* **24**, 2832–2836 (2018).
43. Ito, Y., Hagihara, S., Arai, M. A., Matsuo, I., Takatani, M. Synthesis of fluorine substituted oligosaccharide analogues of monoglucosylated glycan chain, a proposed ligand of lectin-chaperone calreticulin and calnexin. *Glycoconj. J.* **21**, 257–266 (2004).
44. Morgenstern, A., Wilson, T. R., Eberhart, M. E. Predicting Chemical Reactivity from the Charge Density through Gradient Bundle Analysis: Moving beyond Fukui Functions. *J. Phys. Chem. A* **121**, 4341–4351 (2017).
45. Fuentealba, P., Pérez, P., Contreras, R. On the condensed Fukui function. *J. Chem. Phys.* **113**, 2544–2551 (2000).
46. Mao, J. Atomic Charges in Molecules: A Classical Concept in Modern Computational Chemistry. *PostDoc Journal* **2**, 15–18 (2014).
47. Fonseca Guerra, C., Handgraaf, J.-W., Baerends, E. J., Bickelhaupt, F. M. Voronoi deformation density (VDD) charges: Assessment of the Mulliken, Bader, Hirshfeld, Weinhold, and VDD methods for charge analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 189–210 (2004).
48. Yu, K., Kizhakkedathu, J. N. Synthesis of Functional Polymer Brushes Containing Carbohydrate Residues in the Pyranose Form and Their Specific and Nonspecific Interactions with Proteins. *Biomacromolecules* **11**, 3073–3085 (2010).
49. Legentil, L., Cabezas, Y., Tasseau, O., Tellier, C., Daligault, F., Ferrières, V. Regioselective Galactofuranosylation for the Synthesis of Disaccharide Patterns Found in Pathogenic Microorganisms. *J. Org. Chem.* **82**, 7114–7122 (2017).
50. Ferrières, V., Roussel, M., Gelin, M., Plusquellec, D. A new Approach to a disaccharidic hapten containing a galactofuranosyl entity. *J. Carbohydr. Chem.* **20**, 855–865 (2001).

Chapitre 3 : Synthèse de la partie lipidique

Chapitre 3 : Synthèse de la partie lipidique

La partie lipidique des glycolipides cibles s'inspire de celle des lipides membranaires d'espèces extrémophiles, les **Archaea**. Leur structure particulière leur confère une **grande stabilité** en milieu aqueux notamment. La présence de groupements (méthyle ou cyclopentane) sur la chaîne carbonée assure une grande fluidité ou rigidité. Cette balance entre **fluidité** et **rigidité** est une des raisons de la stabilité de ces composés en milieu extrême.¹ Lorsque ces lipides sont combinés à une tête polaire, ils peuvent également former des liposomes, aussi appelés **archaeosomes**, capables d'encapsuler des principes actifs et de cibler certaines cellules du système immunitaire.² Les archaéolipides peuvent être endocytés par les APCs *via* le mécanisme de phagocytose ou par l'interaction avec certains récepteurs (MR, DC-SIGN, TLR, etc) lorsqu'ils possèdent des têtes spécifiques (sucres, phosphatidylsérine). Après avoir été internalisés, ils induisent l'activation des LTs ainsi que la production de protéines de co-stimulation, ce qui indique une activation du système immunitaire.³ Les lipides d'Archaea peuvent donc être utilisés en tant qu'immunoadjuvants dans les vaccins sans pour autant déclencher de réponse à leur égard puisqu'ils ne sont pas immunogènes.⁴

I Les archaeolipides

1) Structure des lipides d'Archaea

Contrairement aux lipides membranaires des autres organismes vivants qui présentent le plus souvent des liaisons ester, les lipides d'Archaea sont liés à une structure de type glycérol par des **liaisons éther**.⁵ Les chaînes hydrocarbonées sont caractérisées par la répétition d'une unité isoprène. Cet enchaînement mène à la formation de chaînes ramifiées de longueurs différentes. Une des structures les plus rencontrées est composée de deux chaînes de 20 atomes de carbone liées à un motif glycérol, lui-même relié à la tête polaire (figure 46).⁶ La stéréochimie de ces glycéroéthers d'Archaea est différente de celle des eucaryotes et des procaryotes. En effet, on retrouve les éthers en position **sn-2,3** chez les Archaea contre des esters en position *sn*-1,2 pour les autres organismes (figure 46).⁷ Cette numérotation correspond à la représentation de Fischer des dérivés glycérol.

En fonction des espèces d'Archaea, des variations peuvent être observées dans les chaînes lipidiques. Ainsi, en plus du diéther commun C₂₀ *sn*-2,3-diphytanylglycérol, aussi appelé archaéol, des chaînes en C₂₅⁸ ou des diéthers macrocycliques⁹ ont été isolés à partir d'Archaea halophiles et thermophiles (figure 46). Les lipides d'Archaea peuvent également se présenter sous la forme de tétraéthers. Dans ce cas, les deux chaînes lipidiques sont liées de part et d'autre à des motifs glycérol.¹⁰ La structure tétraéther de l'archaéol (appelé caldarchaéol) correspond à une association de deux diéthers avec

Figure 1. The effect of the number of trials on the number of correct responses. The number of correct responses was significantly higher for the 10 trials condition than for the 5 trials condition. Error bars represent the standard error of the mean.

Van der Waals ou des interactions électrostatiques.¹³ Le rôle principal des membranes est de maintenir l'intégrité des cellules. Pour cela, les organismes adaptent la composition ainsi que la structure des lipides qui composent leur membrane. Les lipides doivent avoir une mobilité et une fluidité suffisante pour être à l'état de cristal liquide, état le plus propice au développement des microorganismes.⁷ Un des paramètres les plus importants est la température T_m , (transition midpoint) température à laquelle la membrane passe d'un état gel rigide à un cristal liquide. En dessous de T_m , les lipides s'alignent, ce qui rend la membrane imperméable. Au-dessus de T_m , les lipides, plus fluides, permettent de nombreux procédés biologiques tout en restant imperméables à certaines molécules (H_2O , CO_2).⁷

En fonction de leur composition (di- ou tétraéthers), les mélanges lipidiques des Archaea s'organisent sous la forme de **mono- ou de bicouches lipidiques** (figure 47). Les diéthers, comme les lipides des membranes bactériennes, forment des bicouches, les tétraéthers quant à eux forment des monocouches. En effet, ils possèdent déjà deux têtes polaires reliées par un macrocycle. Cela permet une incorporation transmembranaire des lipides au sein de la membrane. De la même manière que les bactéries, les Archaea adaptent la structure des lipides qui composent leur membrane en fonction des conditions extérieures (décrites plus en détail dans la partie suivante).¹⁴ La présence des tétraéthers est importante pour maintenir l'intégrité de la membrane, d'autant plus dans les milieux les plus extrêmes. Une étude a comparé la flexibilité des monocouches de tétraéthers aux bicouches des diéthers par simulation de la dynamique moléculaire (calcul de l'élasticité des membranes, de la perméabilité à l'eau, la trajectoire des lipides dans la membrane).¹⁵ Cela a confirmé l'importance des tétraéthers dans la stabilité des membranes. En effet, leur mobilité latérale et leur surface moléculaire sont inférieures à celles des diéthers. Les membranes composées de tétraéthers sont plus élastiques et moins perméables à l'eau, ce qui augmente leur stabilité comparées aux membranes composées d'une double couche de diéthers.

Des liposomes peuvent être formulés avec les archaéolipides, souvent en mélange avec des lipides plus communs (diesters de glycérol). Ces liposomes sont alors appelés **archaeosomes** (figure 47). Les archaeosomes sont très stables dans de nombreuses conditions (stress oxydatif, température élevée, pH acide ou basique, action d'enzyme).¹

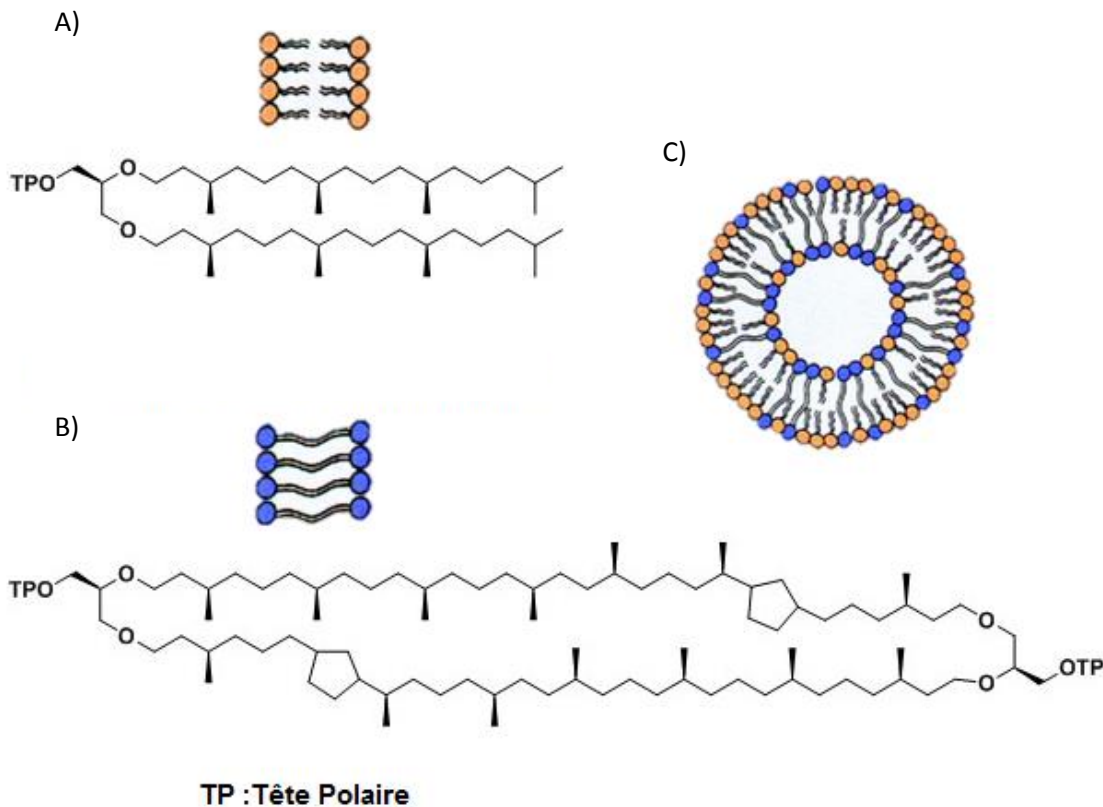


Figure 47 : Organisation des archaéolipides sous la forme de bicouche lipidique pour les diéthers (A), monocouche lipidique pour les tétraéthers (B) et archaeosome (C)

b) Propriétés physico-chimiques

Les lipides d'Archaea présentent de nombreuses ramifications telles que des **groupements méthyle** ou des unités **cyclopentane**. La présence des méthyles est à l'origine de **répulsions hydrophobes** entre les différentes chaînes aliphatiques. Cette spécificité assure la fluidité de la membrane des Archaea. Les méthyles favorisent également une certaine conformation de la chaîne lipidique puisqu'ils réduisent le degré de mouvement de ces lipides. Cela limite la cristallisation ainsi que la perméabilité de la membrane.^{16,17} En effet, les interactions de Van der Waals entre les chaînes assurent un empilement de ces dernières qui diminue la perméabilité de la membrane aux ions et aux molécules solubles.¹⁸ Ces structures sont notamment retrouvées dans les membranes d'acidophiles qui se développent à des pH inférieurs à 2,5 et dont l'imperméabilité doit être maximale.¹⁴

Contrairement aux groupements méthyle, les cyclopentanes assurent la rigidité de la membrane des Archaea. Plus ils sont nombreux, plus la rigidité augmente par diminution de la mobilité des régions hydrophobes. Les cycles permettent également de former une couche lipidique plus dense puisque l'empilement des lipides est plus compact. Cela bloque la rotation des chaînes carbonées, ce qui diminue la flexibilité des molécules et augmente la rigidité et la stabilité membranaire.^{19,20} De plus,

les cycles à 5 chaînons sont suspectés d'augmenter la solubilité des lipides dans les phases aqueuses. En effet, ils permettent de former des arrangements lamellaires deux à deux *via* la superposition des cycles des chaînes entre deux couches monolipidiques, ce qui crée des connections de type tunnel. Ainsi la position du cycle le long de la chaîne lipidique module les interactions entre les tétraéthers des membranes et l'environnement aqueux de la cellule, mais également les interactions entre deux éthers.²¹ Les tétraéthers possédant des cyclopentanes sont notamment très utilisés par les Archaea pour survivre à des températures élevées.²² Plus la température de croissance de l'Archaea est élevée, plus le nombre de cycles augmente, atteignant un maximum de huit par molécule pour une température de croissance de 121 °C.¹²

Les Archaea peuvent aussi se développer dans des milieux extrêmement froids (psychrophiles). Pour cela, lorsque la température du milieu de culture est très basse (-20 °C à 10 °C), ces microorganismes produisent des membranes riches en lipides insaturés.^{23,24}

La stabilité des archaéolipides est un atout pour les utiliser en tant que **véhicule** pour des nouveaux traitements ou même en tant qu'immunoadjuvants. Cependant, il ne faut pas qu'ils engendrent une réponse immunitaire ciblée contre eux. Pour le vérifier, plusieurs archaeosomes issus d'espèces différentes ont été injectés à des souris à une concentration de 2,5 mg/mL. Les résultats ne montrent aucune lyse des érythrocytes (globules rouges), ce qui prouve qu'ils peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques. Patel et coll. ont tout de même observé une potentielle toxicité. Cependant, il faut atteindre des doses de 140 mg/kg pendant 5 jours, doses bien supérieures à celles administrées lors de tests biologiques (ordre du µg).⁴

3) Extraction des archaéolipides naturels

Du fait de leur structure particulière, à l'origine de leur stabilité chimique et enzymatique, l'intérêt pour les lipides d'Archaea ne cesse d'augmenter. Cependant, l'extraction des archaéolipides des microorganismes est compliquée. Les Archaea doivent être cultivées puis récupérées afin d'en retirer les lipides. L'une des méthodes d'extraction les plus utilisées est celle de **Bligh-Dyer**.^{25,26} Les cellules d'Archaea sont placées après sonication dans un mélange DCM/MeOH/phase aqueuse, puis centrifugées, et le surnageant est transféré dans une ampoule à décanter afin de récupérer la phase organique. La phase aqueuse peut être un tampon phosphate (K₂HPO₄) ou acide (HCl). Une autre méthode, appelée **extraction par solvant accélérée** consiste à extraire les lipides d'une matrice, préparée à partir des microorganismes mélangés à du quartz. L'utilisation d'un solvant (DCM/MeOH 1:1) à 100 °C et sous pression permet l'extraction des produits d'intérêt.²⁷ Le **soxhlet** peut également être utilisé pour extraire les lipides avec un mélange DCM/MeOH à 60 °C.²⁸ Cependant, cette

méthode est plus lente que celle par solvant accéléré.²⁹ Afin d'obtenir des lipides de pureté élevée, les fractions obtenues doivent être purifiées par HPLC ou chromatographie sur colonne d'alumine. Une méthode utilisant du **CO₂ supercritique** a également été développée afin de limiter l'utilisation de solvant organique.^{30,31} Néanmoins, les quantités obtenues sont insuffisantes pour utiliser ces lipides comme matériel de départ dans une hémisynthèse (fonctionnalisation par introduction de têtes polaires) ou dans des formulations à grande échelle. Pour pallier ce problème, plusieurs équipes ont cherché à développer des synthèses enzymatiques ou chimiques.

4) Synthèses des archaéolipides

a) Biosynthèse

Les archaéolipides peuvent être synthétisés par des organismes qui n'appartiennent pas au règne des Archaea. En 2012, une équipe japonaise a obtenu des mimes de diéthers d'Archaea par voie **biologique** en utilisant des bactéries procaryotes. En insérant des gènes codant pour la synthèse de lipides d'Archaea au sein du génome de *E. coli*, ils ont pu reconstruire la **cascade enzymatique** qui produit les diéthers.³² Pour cela, quatre enzymes sont nécessaires : une déshydrogénase et trois synthases (schéma 26). A partir de précurseurs endogènes d'isoprénoïdes présents au sein du microorganisme, ici *E. coli*, et de ces quatre enzymes, le 2,3-di-*O*-géranylgéranyl-*sn*-glycérol-1-phosphate (DGGGP) a ainsi pu être synthétisé. Ces précurseurs endogènes sont le diphosphate de farnésyle (FPP), le diphosphate d'isopentényle (IPP) et le phosphate de dihydroxyacétone (DHAP). Le DHAP est substrat de la G-1-P déshydrogénase formant ainsi le G-1-P (*sn*-glycérol-1-phosphate). En parallèle, l'action de la GGPP synthase sur le FPP et l'IPP permet la production de GGPP (pyrophosphate de géranylgéranyle). G-1-P et GGPP sont utilisés par la GGPP synthase pour former le GGGP (3-*O*-géranylgéranyl-*sn*-glycérol-1-phosphate) qui est ensuite consommé par la DGGGP synthase afin d'obtenir le produit souhaité, le DGGGP.

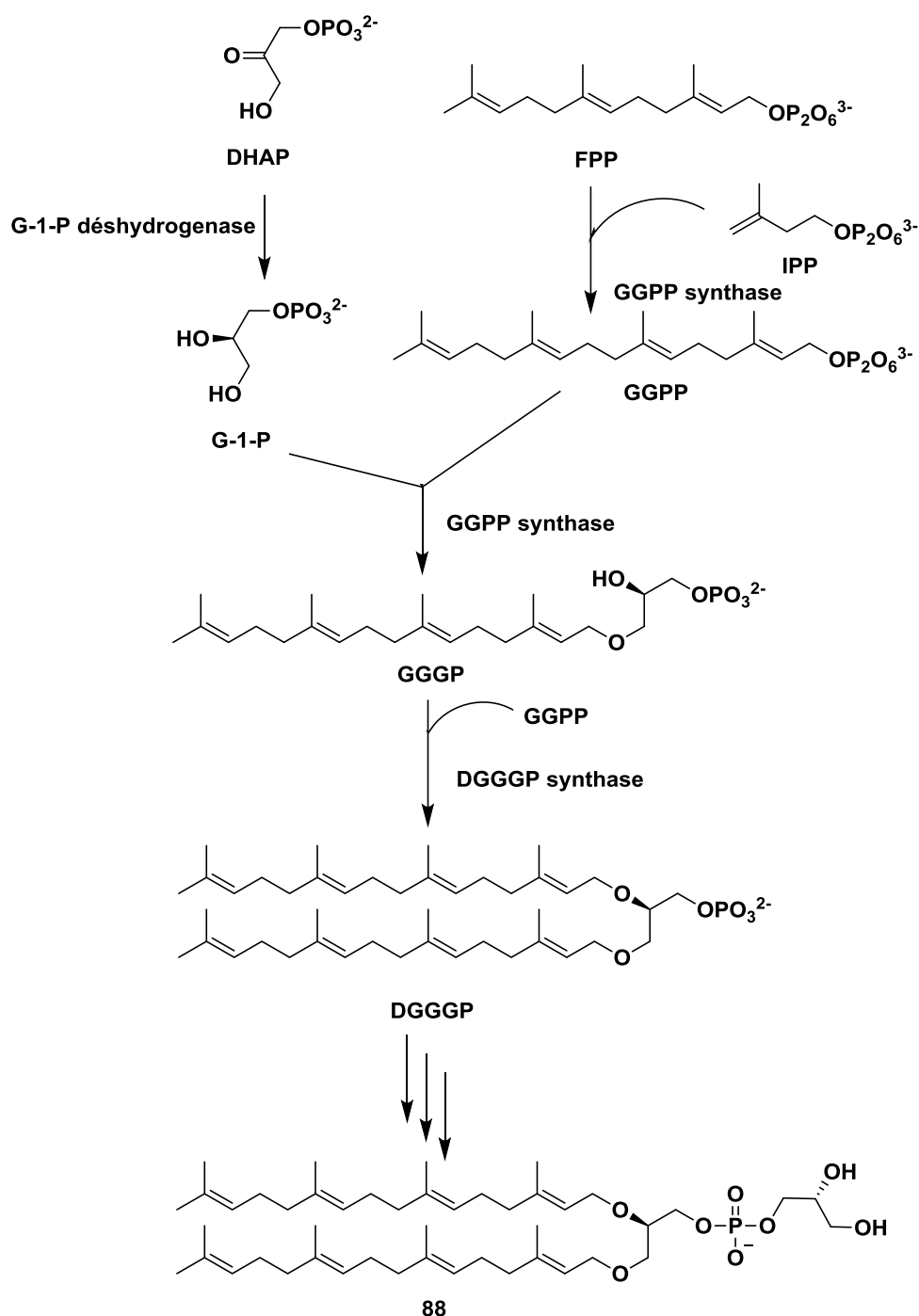


Schéma 26 : Synthèse enzymatique de diéthers d'Archaea ³²

Cependant, les quantités obtenues sont encore trop faibles pour envisager une utilisation de cette méthode à l'échelle industrielle. De plus, le composé final obtenu a été par la suite métabolisé sous la forme de diglycérol **88**. Le DGGGP présente des insaturations qui sont très rarement observées chez les lipides d'Archaea naturels. Pour obtenir une structure d'archaéolipide, il faudrait donc encore réduire les doubles liaisons par l'action d'une géranylgéranyl réductase par exemple. ^{32,33}

Une alternative possible à la production biologique d'archaéolipides consiste à synthétiser par **voie chimique** des analogues de ces lipides. Les éthers lipidiques sont ainsi conçus à façon en fonction des propriétés souhaitées pour la molécule, comme l'ajout de cyclopentanes pour obtenir une meilleure dispersion dans l'eau et une plus grande rigidité, ou de groupements méthyle pour apporter une meilleure fluidité.

b) Synthèses chimiques

La synthèse *de novo* des diéthers, possédant des chaînes lipidiques ramifiées, n'a pas été très développée. En effet, la plupart des synthèses mises en œuvre ont pour réactif de départ le **phytol**, qui une fois réduit donne accès au phytanol, chaîne lipidique de 16 carbones substituée par 4 groupements méthyle.^{34–37} Ainsi, déjà dans les années 80, Stewart et Kates³⁸ ont pu synthétiser des diéthers symétriques en utilisant le phytol comme réactif de départ (schéma 27). Ce composé, après réduction de la double liaison, a donné accès à une chaîne lipidique ramifiée **89**, semblable à celle des Archaea. Il est possible de contrôler la stéréochimie du carbone asymétrique en réalisant la réduction en présence d'un catalyseur au ruthénium ($\text{Ru}(\text{OAc})_2(\text{S})\text{BINAP}$) sous 40 bars de dihydrogène.³⁹ Cependant des études ultérieures ont permis de démontrer que cela n'impacte pas les propriétés biologiques des diéthers.³⁷

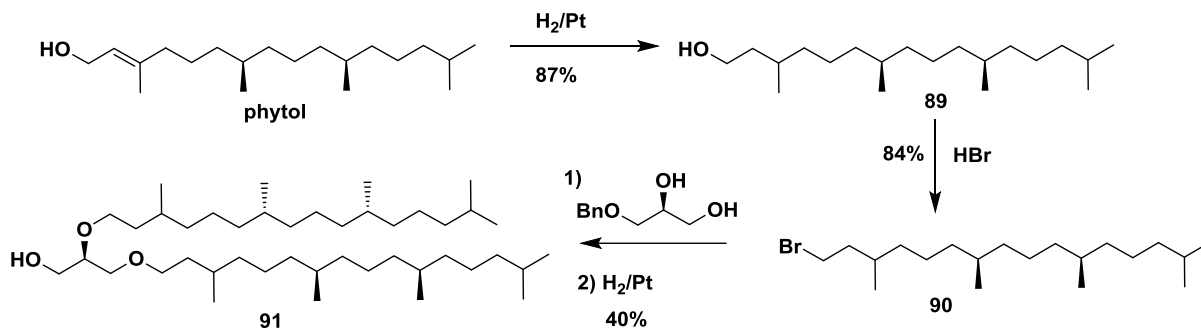


Schéma 27 : Synthèse de diéthers à partir du phytol

Marata et coll.^{40,41} ont développé une voie de synthèse totale pour insérer des atomes de deutérium sur les groupements méthyle de l'archaéol (schéma 28). Leur but était d'étudier la conformation des chaînes par RMN. Pour cela, cette équipe a développé une synthèse de l'archaéol énantio pur. L'unité de base **93** a été synthétisée à partir de la lactone **92**, par méthylation asymétrique grâce à une copule d'Evans. L'alcool **93** a été tosylé pour une réaction de couplage croisé en présence d'un magnésien, catalysée par du cuivre. Le groupement benzyle a pu être retiré et ces dernières étapes ont été répétées jusqu'à obtenir le lipide énantio pur de longueur souhaitée. Le tosylate **94** a par la suite été couplé avec le dérivé du glycérol **95**, dont une des fonctions hydroxyle est protégée par une

fonction benzyle.⁴⁰ Après déprotection, l'archaéol final **91** a ainsi été obtenu avec un rendement global de 7% sur les 16 étapes de la synthèse.

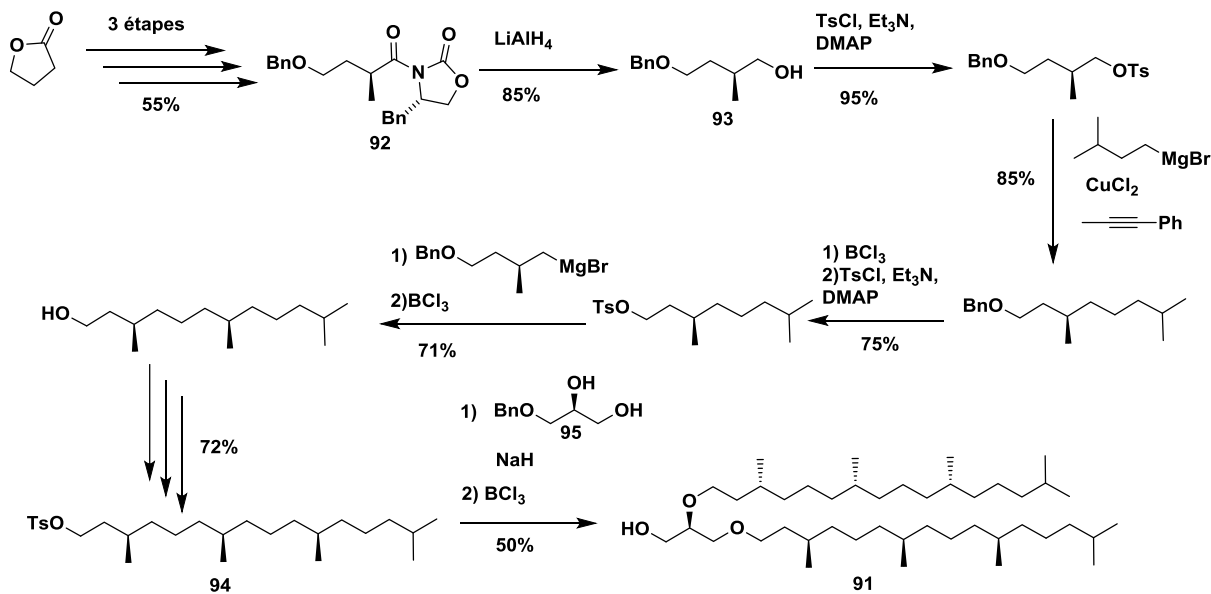


Schéma 28 : Synthèse de l'archaéol énantio pur

La synthèse organique des diéthers d'Archaea cycliques a été décrite dès les années 90.^{42,43} Dès 1994, Kakinuma et coll.³⁶ a publié la synthèse d'un **diéther cyclique** à 36 carbones inspiré d'un Archae thermophile. Comme on peut le voir sur le schéma 29, le (*R*)-3-hydroxy-2-méthylpropionate **96** a été réduit puis silylé afin de synthétiser deux monomères **97** et **98** qui ont réagi ensemble afin d'obtenir le fragment de la chaîne grasse méthylée **99**. L'opération a été répétée jusqu'à aboutir à la taille de chaîne souhaitée. L'hydroxyle terminal de la chaîne a ensuite été déprotégé puis activé pour former les liaisons éther caractéristiques des lipides d'Archaea. Les éthers silylés ont été hydrolysés en milieu acide et les alcools ont été oxydés en aldéhydes afin de pouvoir réaliser un couplage de McMurry. Le macrocycle **100** ainsi obtenu a été réduit et déprotégé en une seule étape par hydrogénation catalysée par du palladium.³⁶

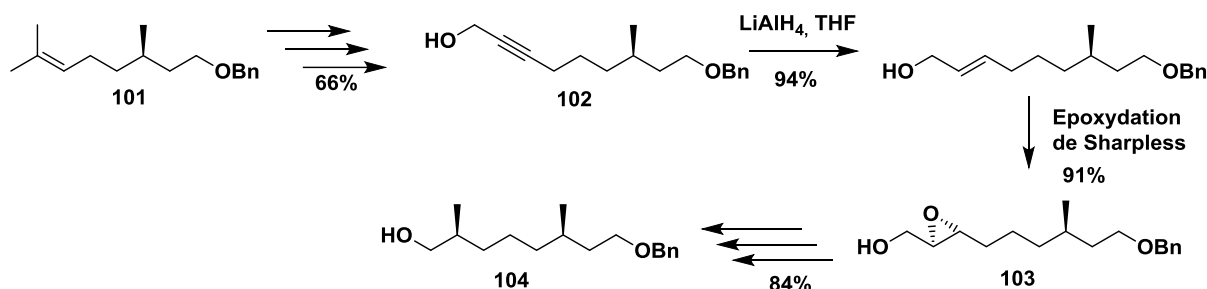


Schéma 30 : Synthèse de la chaîne ramifiée⁴⁴

Au sein de notre laboratoire, plusieurs di- et tétraéthers ont également été synthétisés afin d'étudier les propriétés physicochimiques.⁴⁶ Ces glycolipides possèdent notamment des **chaînes non ramifiées** (schéma 31). La synthèse du glycolipide **105** repose sur une étape de di-O-alkylation directe du glycérol benzylé **95** par un bromure d'alkyle. Après la déprotection de l'hydroxyle benzylé, suivie d'une réaction de glycosylation et la déprotection des alcools du saccharide, le composé **105** a été isolé avec un rendement global de 26%. Le composé diphytanylé **106** a également été synthétisé avec un rendement global de 33%. La comparaison des températures de transition de phase entre **105** et **106** a permis de mettre en évidence l'influence des ramifications sur la température de fusion (décrite précédemment). En effet, la présence des groupements méthyle défavorise les interactions entre les chaînes voisines et s'opposent à un empilement ordonné des chaînes. Les ramifications ont donc un effet fluidifiant qui se traduit par une diminution de la température de fusion des composés (70 °C pour **106** contre 125 °C pour **105**).

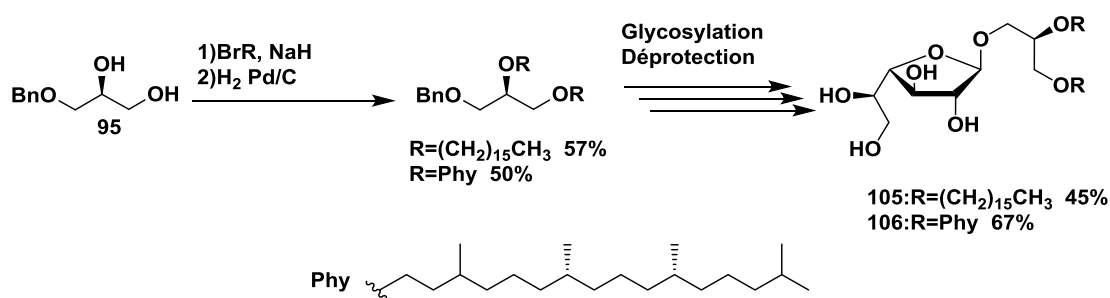


Schéma 31 : Voie de synthèse pour l'obtention de diéthers symétriques

5) L'utilisation des lipides d'Archaea synthétiques dans les immunoadjuvants

Les archaéolipides, comme leurs analogues diesters du glycérol, sont utilisés pour améliorer l'administration des médicaments. Ils ont cependant montré des capacités immunoadjuvantes

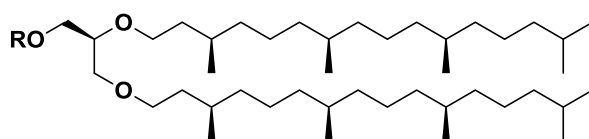
supérieures en permettant une réponse plus intense des anticorps face à un antigène véhiculé en leur présence.⁴⁷

Les lipides d'Archaea sont souvent utilisés à des fins thérapeutiques sous forme d'archaeosomes. Ces vésicules sont formées à partir d'un mélange d'archaéolipides naturels ou synthétiques et de lipides communément utilisés pour la formulation de liposomes (DMPC : dipalmyristoylphosphatidyl choline, DMPG : dipalmyristoylphosphatidyl glycérol, dicétyle phosphate, CHOL : cholestérol). Les archaeosomes possèdent donc les propriétés des lipides d'Archaea : organisation sous forme de bi- ou monocouches (dépendant de la présence de di- ou de tétraéthers), **résistance** sur une large gamme de pH et de température, **perméabilité** de la membrane, résistance aux phospholipases et aux hydrolases.¹ De plus, ils entraînent une augmentation de l'**activation des lymphocytes T CD8+** (cytotoxiques). En effet, il a été démontré que les lipides d'Archaea induisent une activité spécifique des CLRs ainsi que l'acquisition d'une mémoire spécifique des antigènes (lorsqu'ils servent de véhicules à des antigènes).⁴⁸ Ces deux propriétés ont été expliquées par une phagocytose plus importante des archaeosomes par les cellules phagocytaires. Cela prouve qu'ils sont internalisés, entre autre, par des macrophages. Cette facilité, bien que dépendante de la structure des lipides, est toujours supérieure à celles des liposomes conventionnels.^{4,49} De plus, les archaeosomes ont pu être utilisés dans différentes formulations pour différentes voies d'administration, telles que les injections intramusculaires ou sous-cutanées mais également, par voie orale ou transdermale. Certains archaeosomes ont pénétré les différentes couches de la peau plus profondément que les liposomes conventionnels. Ils permettraient donc de délivrer des antigènes à des couches inférieures de la peau.⁵⁰

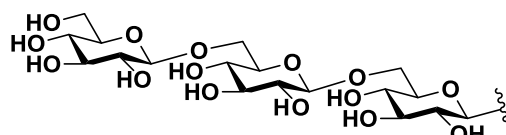
La première étude démontrant la capacité des archaeosomes à **vectoriser des antigènes**, et donc leurs propriétés immunoadjuvantes, a été publiée par l'équipe de Sprott⁴⁷ en 1997. Leurs travaux comparent l'intensité de la réponse humorale de souris face à une sous-unité de la toxine du choléra. Ils ont observé une sécrétion d'anticorps bien plus importante dans le cas où les souris avaient été immunisées *via* des antigènes formulés dans des archaeosomes par rapport à des liposomes classiques (DMPC:DMPG et DMPC:DMPG:CHOL). Ces résultats ont attesté de la capacité des archaeosomes à présenter des antigènes au système immunitaire et donc à activer la réponse immunitaire. Ces premières formulations d'archaeosomes étaient composées de lipides polaires directement extraits des Archaea, comme par exemple *Methanobrevibacter smithii*.⁴⁷ Les archaeosomes étaient donc formés d'un mélange de lipides différents, de composition variable et mal définie. Plus tard, la même équipe (Sprott et coll.)^{49,51} a mis au point plusieurs formulations à base de glycolipides semi-synthétiques reposant sur la structure des archaéols (figure 48). Ces composés ont démontré des propriétés d'activation du système immunitaire avec une **réponse**

cellulaire intéressante. Cette fois encore, les lipides ont été extraits des microorganismes. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des lipides anioniques et neutres (séparés par colonne de gel de silice) couplés aux motifs sucres synthétiques présentés sur la figure 48 (gentiotriosyle et mannotriosyle).^{49,51} Plus récemment, une formulation simplifiée à base de glycolipides comprenant un sucre sulfaté relié à un motif lipidique d'Archaea (sulfated lactosylarchaéol, SLA) mélangé à un glycolipide neutre (lactosyl archaéol, LA) a démontré posséder les mêmes propriétés d'activation des macrophages que les composés de Sprott (activation des DCs, lymphocytes Tc et B). Ces études ont ainsi mis en lumière la capacité des archaeosomes à **cibler** et à **activer** le système immunitaire **inné** ainsi qu'**adaptatif**. Ils pourraient donc être utilisés comme immunoadjuvants, et puisqu'ils possèdent une cavité interne, comme transporteurs de substances, telles que des antigènes ou de l'ADN. Cependant, indépendamment de la formulation (lipides extraits des Archaea, lipides semi-synthétiques et mélange SLA/LA), les archaeosomes présentent une faible capacité d'encapsulation des antigènes au sein des vésicules ainsi qu'un problème de reproductibilité des lots pour la formulation de vaccins finaux.^{50,52}

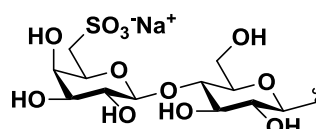
Archaeol



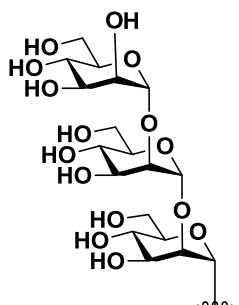
R



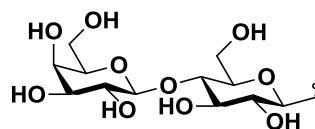
Gentiotriosyle



Lactosyle sulfaté



Mannotriosyle



Lactosyle

Figure 48 : Structures de lipides d'Archaea synthétiques

En 2019, McCluskie et coll.⁵³ ont prouvé, en comparant la production d'anticorps ainsi que l'activation des lymphocytes Tc pour trois formulations différentes, que l'encapsulation des antigènes au sein des archaeosomes (composés de SLA) n'est pas nécessaire à l'induction d'une réponse

immunitaire. Les trois formulations sont illustrées sur la figure 49 suivante. La première approche a consisté à encapsuler les antigènes dans les archaeosomes et à retirer les antigènes non encapsulés. Dans la seconde formulation, les antigènes non encapsulés ont été conservés dans l'échantillon et dans la troisième, les vésicules ont été formées en amont et mélangées directement avec les antigènes (il n'y avait donc pas d'antigène au cœur de l'archaeosome). Dans les trois cas, une forte **réponse humorale** a pu être détectée. Indépendamment de la formulation, les vaccins ont permis la production d'anticorps spécifiques à l'antigène préalablement injecté aux souris ainsi qu'une forte augmentation de la production et de l'activation de lymphocytes Tc spécifiques. Cela indique que les archaeosomes possèdent une activité immunostimulante qui ne dépend pas de l'internalisation des antigènes au sein de la vésicule. Ils ne sont pas de simples véhicules mais induisent eux-mêmes une activation du système immunitaire.²⁹

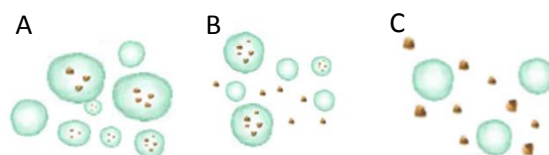


Figure 49 : Les différentes formulations d'archaeosomes et d'antigènes: A) les antigènes sont encapsulés dans les archaeosomes et les antigènes non encapsulés sont retirés, B) les antigènes sont encapsulés dans des archaeosomes mais les antigènes non encapsulés sont conservés, C) les archaeosomes sont vides et les antigènes non encapsulés.

Romero et coll.⁵⁴ ont récemment publié la formulation d'**archaeosomes ultradéformables** (AUDs). Les AUDs sont composés, en plus des lipides polaires d'Archaea, d'activateurs de surface, le plus souvent des détergents tels que le cholate de sodium. Dans cette formulation, les AUDs sont formés à partir d'un mélange d'archaéolipides extraits par la méthode de Bligh et Dyer, d'un ester lipidique (phosphatidylcholine) et de cholate de sodium (figure 50). Ces AUDs ont été internalisés de manière plus efficace par les macrophages que leurs analogues composés de phospholipides de type ester. Cela a entraîné une réponse systémique plus importante lors d'essais *in vivo*. Ils peuvent donc être utilisés en tant qu'adjuvants.⁵⁴ De la même manière que pour les archaeosomes plus classiques (sans activateur de surface), ces vésicules ont démontré avoir des propriétés adjuvantes même lorsque qu'aucun antigène n'est encapsulé à l'intérieur de la double couche lipidique. Un mélange des AUDs en présence des antigènes possède les mêmes propriétés d'activation du système immunitaire que lorsque les antigènes sont emprisonnés au sein de l'AUD.⁵⁵

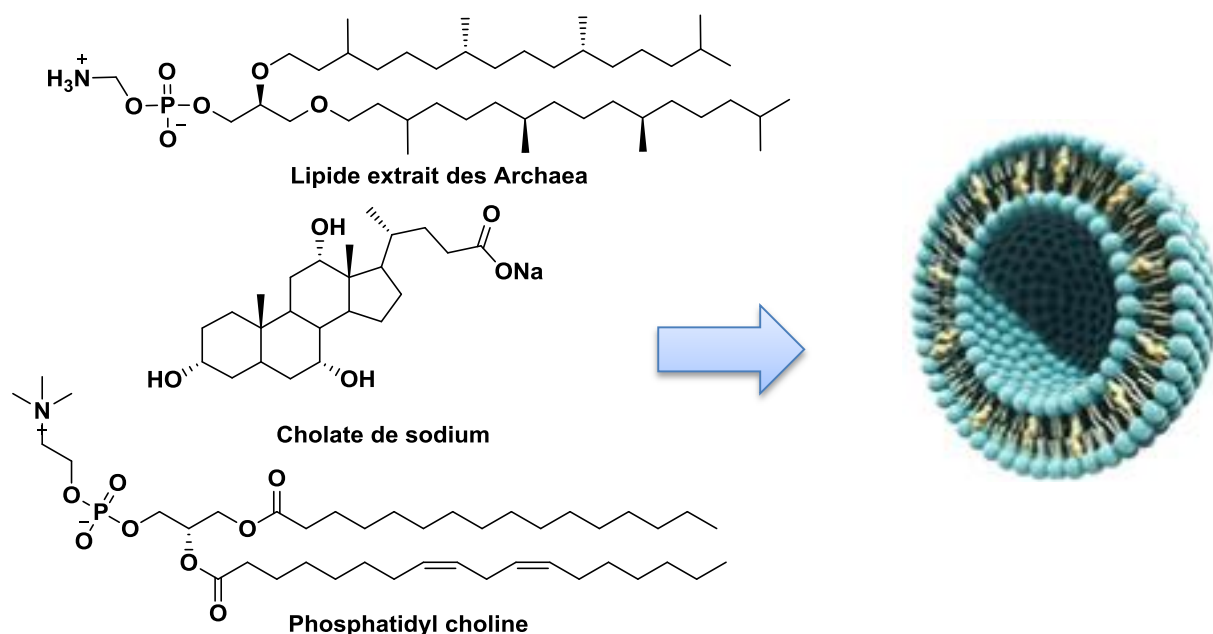


Figure 50 : Composition d'un archaeosome ultradéformable^{51,54}

Les éthers utilisés pour la formation des archaeosomes peuvent être fonctionnalisés. Au sein du laboratoire, un archaéolipide a ainsi été greffé à trois mannopyranosides à l'aide d'un motif pentaérythritol pour former **9** (figure 51).⁴⁶ L'objectif était de synthétiser un composé qui ciblerait les cellules du système immunitaire par des interactions entre le **MR** et les mannopyranosides. Le fait de présenter trois motifs sucre devait augmenter l'affinité du composé pour le MR (principe de la **multipréésentation**). La partie lipidique est composée d'un **diéther** comportant deux chaînes grasses différentes. L'une est ramifiée pour mimer l'archaéol, la seconde est une chaîne hexadécane. L'**hétérogénéité** permet d'obtenir un diéther à la fois **fluide** et **stable**. Ces glycolipides ont par la suite été incorporés au sein d'une formulation composée de trois lipophosphoramidates avec pour tête polaire un imidazolium, une histamine (figure 51) ou un groupement fluorescent (respectivement : 5%, 47,25%, 47,25% et 0,5%) et d'un polymère cationique. Des cellules dendritiques de souris ont été incubées avec le liposome contenant le composé trimannosylé. La sonde fluorescente a permis de suivre les interactions entre la vésicule et les cellules, démontrant la liaison entre les DCs et les liposomes. Cette interaction a été inhibée en présence de mannose, ce qui prouve l'implication du MR et des motifs mannopyranose. Le composé **9** possède des propriétés d'activation des DCs, cellules importantes pour la mise en place de l'immunité adaptative. Il constitue donc une piste intéressante pour la mise au point de nouveaux immunostimulants.

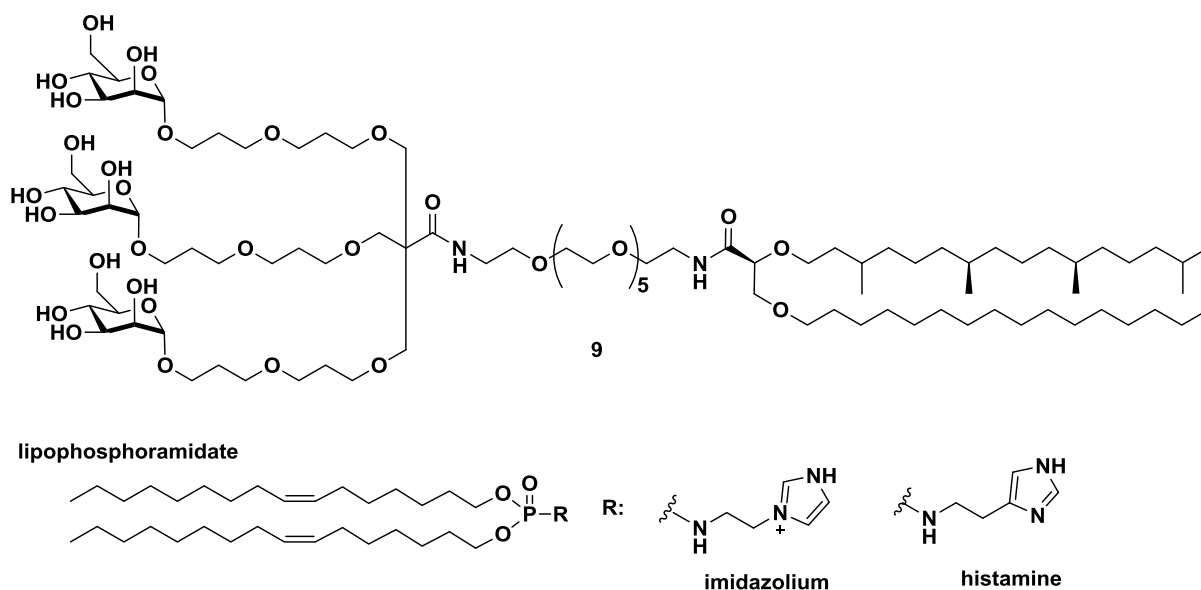


Figure 51 : Structure du composé trimannosylé synthétisé au laboratoire

Comme décrit précédemment, les lipides d'Archaea peuvent être conjugués à des sucres afin de former des glycolipides. Il a été observé qu'en plus de leur propriétés adjuvantes et stabilisantes, ces lipides conservent les propriétés de ciblage des récepteurs spécifiques des sucres. Les résultats obtenus sont donc différents en fonction de la nature de la chaîne lipidique, mais également des glycosides utilisés.^{49,51,56}

Bien que la structure **9** ait montré des propriétés immunoadjuvantes intéressantes, nous avons décidé de modifier la partie centrale. En effet, nous recherchons à synthétiser indépendamment chacune des trois parties de la molécule (partie saccharidique, partie plateforme et partie lipidique). Cette stratégie de synthèse convergente confère une grande modularité aux composés cibles, ce que la synthèse de **9** ne permet pas.⁴⁶

II Objectifs et stratégie de synthèse

La structure des molécules cibles a été conçue en s'inspirant de celle du composé trimannosylé **9**. La multiprésentation ainsi que la structure des archaéolipides semblent conférer des propriétés immunostimulantes à **9** que nous avons voulu conserver. Le lien entre les parties saccharidique et lipidique a cependant été modifié, afin de permettre une plus grande **modulation** des structures (des sucres comme des lipides). La partie lipidique que nous avons décidé de synthétiser s'intègre au sein de la molécule cible par une **liaison ester** au niveau de l'hydroxyle primaire en position *para*- du **dérivé phénolique** (schéma 32). Il fallait donc obtenir une fonction acide sur le glycérol (supportant les deux chaînes lipidiques) afin de pouvoir réaliser une réaction d'estérification. La fonction acide ne

pouvait pas être portée par le dérivé phénolique pour des raisons d'incompatibilité avec certaines conditions de réaction (voir chapitre 4 sur la synthèse de la partie plateforme). Le phénol a rapidement été couplé au **pentaérythritol**, puis chaque bras a été allongé par un groupement propylène glycol. La substitution nucléophile mise en place pour greffer ce motif nécessite un milieu réactionnel basique. Cela empêche une protection sous forme d'ester d'une éventuelle fonction acide sur le phénol. La fonction acide ne pouvait donc pas être supportée par le phénol, et il a été décidé de synthétiser un acide carboxylique porteur de deux chaînes grasses.

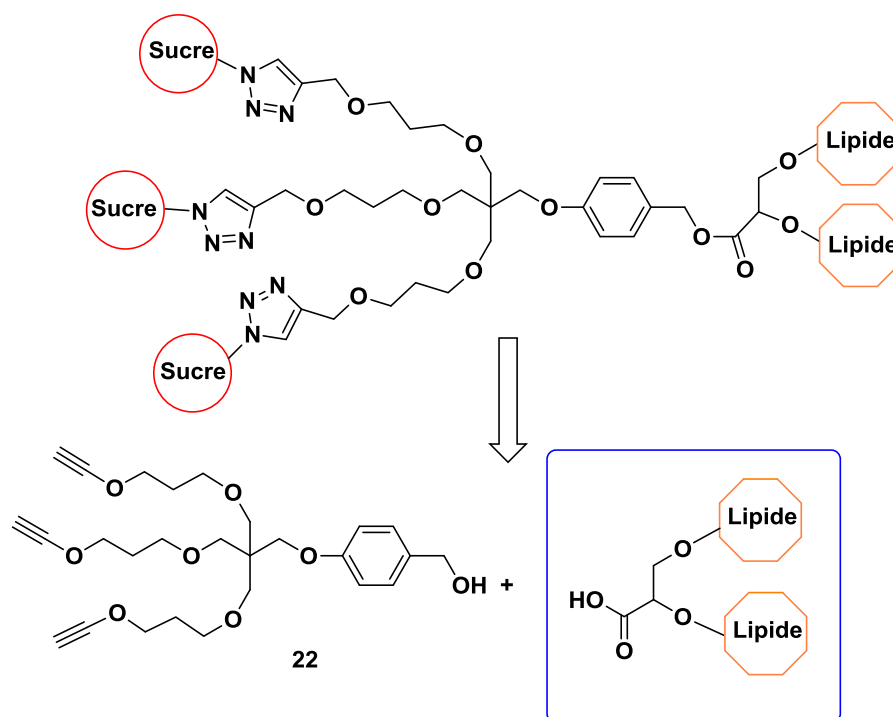


Schéma 32 : Schéma rétrosynthétique de la liaison entre partie lipidique et plateforme

En outre, l'oxydation d'un glycérol a déjà été mise en œuvre au sein du laboratoire. Au préalable, les deux hydroxyles du glycérol doivent être fonctionnalisés sous forme d'éthers lipidiques. Pour cela, l'hydroxyle primaire doit être protégé de manière sélective afin de pouvoir greffer des chaînes différentes sur les autres fonctions OH (voir schéma rétrosynthétique 33). Afin de mimer les archaéolipides, la **stéréochimie** des centres asymétriques de la chaîne grasse est importante. Ainsi, le phytol choisi présente une stéréochimie (*R, R, E*). Le glycérol est protégé sous forme de (*R*)-solketal afin d'assurer la configuration ***sn-2,3*** des archaéolipides.

Les avantages de cette voie de synthèse sont nombreux. Tout d'abord, les produits de départ, que ce soit le glycérol protégé sous la forme d'un acétal, la chaîne grasse ramifiée ou encore l'alcool gras, sont tous faciles d'accès et peu onéreux. Cette synthèse peut donc être engagée sur de grandes quantités. De plus, ces réactifs sont inspirés de produits naturels. Le phytol est présent dans les

plantes vertes puisqu'il est issu de l'hydrolyse de la chlorophylle.⁵⁷ Quant aux alcools gras, ils sont issus de la transformation de triglycérides extraits de plantes (palmier, colza, tournesol,...).⁵⁸ Enfin, cette approche offre l'opportunité de préparer une bibliothèque de composés. Les deux chaînes grasses peuvent facilement être modulées afin de synthétiser plusieurs modèles de lipides d'Archaea.

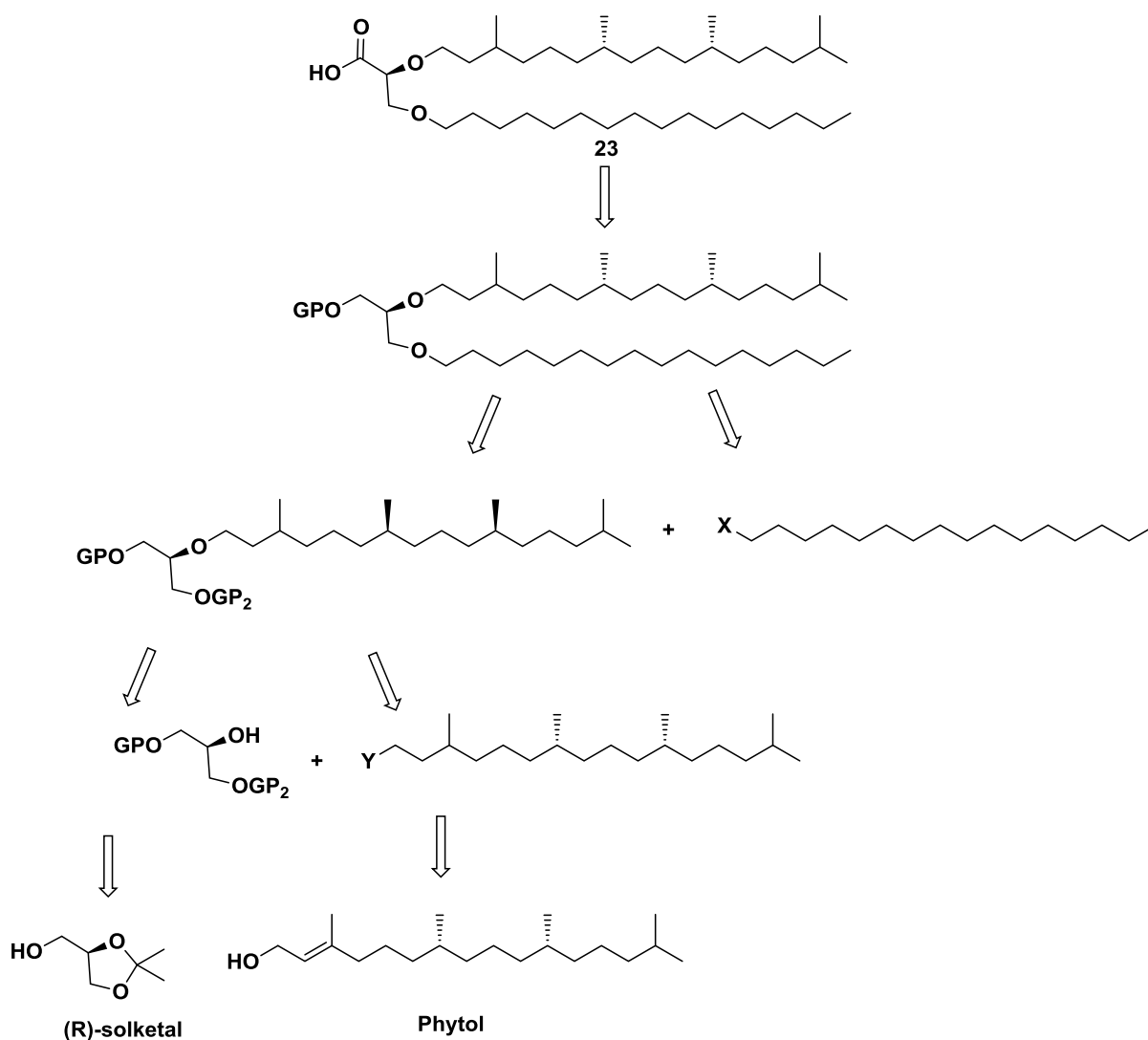


Schéma 33 : Schéma rétrosynthétique du diéther **23**

III Synthèse du diéther asymétrique

1) Activation de la chaîne lipidique ramifiée

A partir du phytol commercial, le bromure de phytanyle **91** a pu être obtenu en deux étapes (schéma 34). La première étape consiste en une hydrogénation de la double liaison, en présence de nickel de

Raney, amenant à la formation du phytanol **89**. Ce dernier a ensuite été bromé par de l'acide bromhydrique aqueux en présence d'acide sulfurique. Le bromure de phytanyle a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice et isolé avec un rendement de 81% sur les deux étapes.

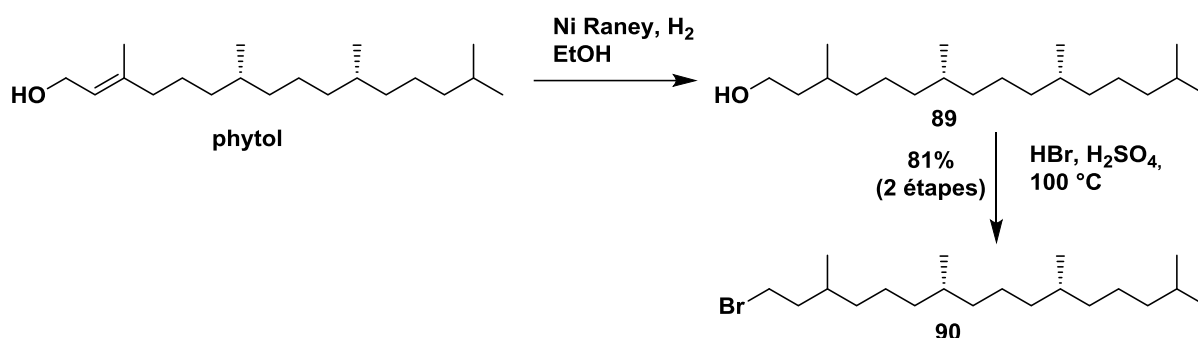


Schéma 34 : Synthèse du bromure de phytanyle **90**

2) Greffage de la première chaîne lipidique

La fonction hydroxyle du (*R*)-solketal a été protégée sous la forme d'un éther de benzyle (déprotection orthogonale à l'acétal) (schéma 35). Les deux autres hydroxyles du solketal benzylé ont ensuite été déprotégés en milieu acide grâce à une résine acide. Ces deux étapes ont permis d'isoler le produit **95** avec un rendement de 85%. L'hydroxyle primaire a été par la suite protégé sous la forme d'un éther de trityle **107** (rendement de 80%), facilement clivé en milieu acide. Seul l'hydroxyle en position 2, reste libre pour la suite de la synthèse.

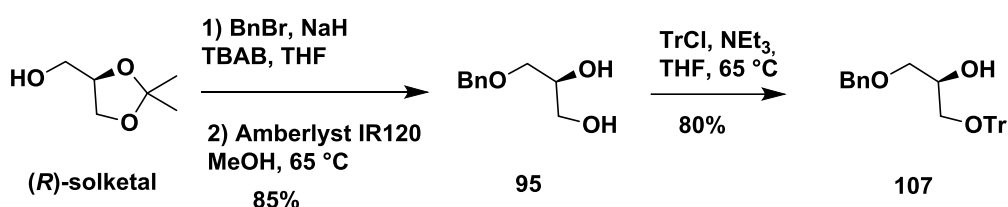


Schéma 35 : Isolement de l'hydroxyle secondaire

La fonction hydroxyle secondaire, une fois déprotonée par de l'hydrure de sodium, a été alkylée par le composé bromé **90**. La première liaison éther est ainsi obtenue avec un rendement de 63%. La fonction hydroxyle primaire a alors été déprotégée en présence de chlorure de fer hexahydraté afin de pouvoir greffer la seconde chaîne grasse (schéma 36). Le rendement global de ces deux étapes est modeste (36%) mais peut s'expliquer par un clivage difficile du trityle dans les conditions choisies. C'est cependant l'alternative la plus intéressante pour retirer le groupement protecteur sans risquer de rompre la première liaison éther tout en préservant l'éther benzylique.



Lors de la formation de la deuxième liaison éther, la seconde chaîne grasse devait être activée par un groupe partant encore plus nucléofuge qu'un halogène. En effet, lors d'un premier test avec un dérivé halogéné, le rendement obtenu n'a alors été que de 18%, bien trop faible pour une synthèse viable. Ce faible rendement s'explique par le manque de réactivité de la fonction hydroxyle libre, comparé à celle impliquée dans la première substitution, en raison de l'encombrement stérique important, dû à la présence d'une première chaîne carbonée. Ainsi, seul le triflate **110** a permis d'obtenir le composé **111** avec un rendement satisfaisant de 70% (schéma 37). Son utilisation a pallié le problème de réactivité mais a impliqué une mise en réaction immédiate après purification sous peine de le dégrader.



4) Oxydation de la fonction alcool en acide carboxylique

Le diéther **111** synthétise, l'éther benzylique a été clivé par hydrogénolyse pallado-catalysée avec un rendement de 65%. L'alcool **19** ainsi obtenu a été oxydé par le benzoate de TEMPO, en présence de bicarbonate de sodium et d'hypochlorite de calcium (schéma 38).

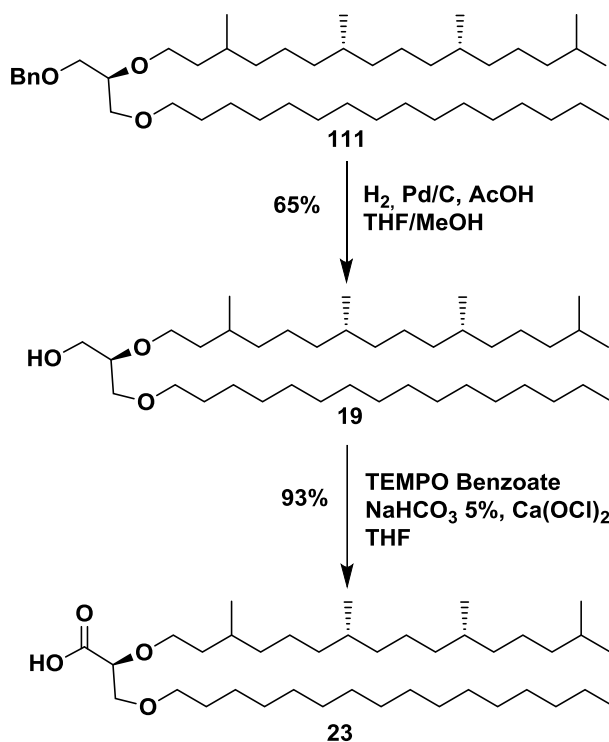


Schéma 38 : Synthèse de l'acide carboxylique 23

Ces conditions ont été établies lors de précédentes études au sein du laboratoire afin d'obtenir les meilleurs résultats (ici un rendement de 93%).^{35,56} Le choix de l'oxydant utilisé pour cette étape est d'une grande importance puisque l'oxydation d'un alcool primaire en acide carboxylique correspond en réalité à deux oxydations successives *via* la formation d'un aldéhyde. Des travaux du laboratoire³⁷ ont également démontré que l'utilisation de TEMPO ne permet pas cette double réaction et s'arrête à la formation de l'aldéhyde. L'oxydation au périodate de sodium, catalysée au ruthénium, a également été étudiée mais les rendements obtenus sont moins intéressants (52%) et avec des réactifs plus nocifs pour l'environnement. Afin d'optimiser le rendement avec le benzoate de TEMPO, une connaissance du mécanisme d'action est nécessaire, bien qu'il soit encore mal compris de nos jours. Selon le cycle catalytique proposé sur le schéma 39 suivant (basé sur les études de Zhao et coll.⁵⁹), le radical TEMPO benzoate serait oxydé en ion *N*-oxoammonium **112** par l'hypochlorite de calcium. L'alcool primaire s'additionnerait sur **112** afin de former une espèce zwitterionique **113** qui mènerait à l'obtention d'un aldéhyde **114** et de benzoate d'hydroxy TEMPO **116**. Comme la réaction

a lieu en milieu aqueux, l'aldéhyde serait en équilibre avec sa forme hydratée **115**. L'oxydation du benzoate d'hydroxy TEMPO par $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ conduirait au composé *N*-oxoammonium **112** qui pourrait alors réagir avec le composé hydraté **115** et former ainsi l'acide carboxylique.

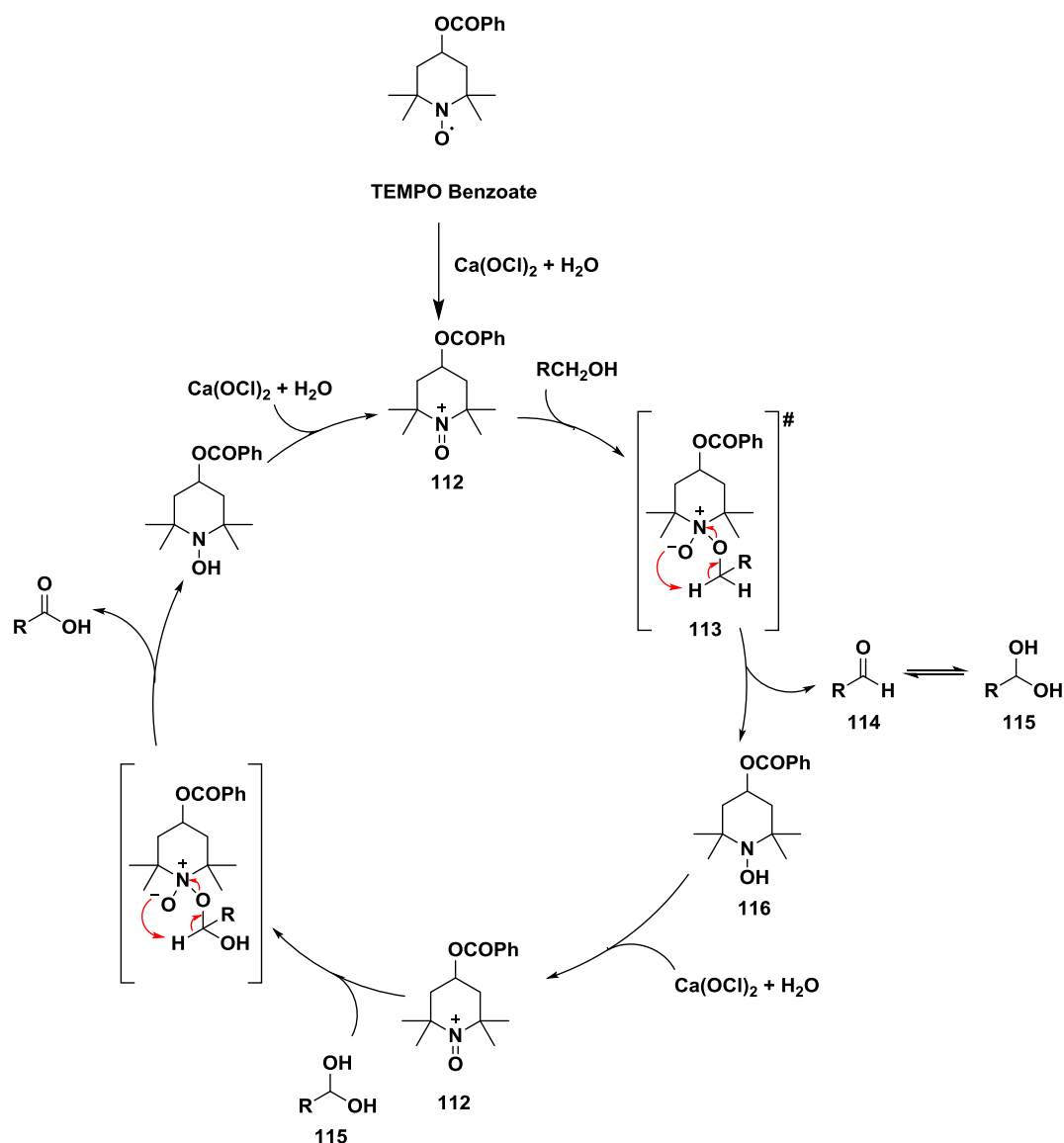


Schéma 39 : Mécanisme d'oxydation d'un alcool catalysée par le TEMPO benzoate

Ainsi le diéther inspiré des lipides d'Archaea a pu être synthétisé et isolé avec un rendement global de 13% sur les 8 étapes.

IV Conclusion

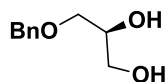
Le **lipide cible** mimant la structure des lipides d'Archaea a été **synthétisé avec succès** avec un rendement global de 8%. La voie de synthèse mise au point au sein du laboratoire a permis la production de plus de 500 mg d'acide gras **23**, quantité nécessaire à la réaction d'estérification pour

relier cette partie à la plateforme. Une tentative de greffage de la seconde chaîne grasse (linéaire) en passant par un composé halogéné n'a pas abouti, validant ainsi la nécessité de passer par un dérivé triflate.

Cette synthèse nous permet de pouvoir **moduler** la nature des deux chaînes lipidiques, le but étant de synthétiser une librairie de composés. Plusieurs types de modulations ont été envisagés pour la suite, telles que des doubles liaisons, l'ajout de cycles (cyclobutane, cyclopentane, cyclohexane) ou encore d'halogènes (fluor, brome ou chlore). Faut de temps, toutes des variations n'ont pas pu être apportées au squelette lipidique des molécules cibles.

Experimental section

*1-O-Benzyl-sn-glycerol (95)*⁵⁶



To a suspension of sodium hydride (3.75 g 60% in oil, 93.8 mmol) in dry THF (50 mL) at 0 °C was slowly added a solution of (*R*)-solketal (9.2 g 69.5 mmol) in dry THF (15 mL). A solution of benzyl bromide (9.9 mL, 83.4 mmol) in dry THF (6 mL) was added dropwise to the reaction mixture at 0 °C, followed by TBAB (2.57 g, 6.95 mmol), per portions. The mixture was left under agitation for 18 h at room temperature and quenched with iced water. Aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 25 mL). The combined organic layers were washed with an aqueous 0.1 N Na₂S₂O₃ solution (50 mL), dried over MgSO₄ and concentrated. The crude was dissolved in MeOH (75 mL) and Amberlyst-IR120 (7 g) was added. After 6 h of stirring at 65 °C, the reaction mixture was filtered and the filtrate concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (DCM:MeOH gradient from 100:0 up to 80:20) afforded 10.75 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 85 %.

MW = 182.22 g/mol.

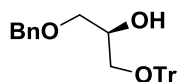
R_f = 0.5 (AcOEt).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.71-7.29 (m, 5H, H_{arom}), 4.55 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.93-3.86 (m, 1H, CHOH), 3.67 (dd, ²J=11.5 Hz, ³J=3.6 Hz, 1H, CH₂OH), 3.58 (dd, ²J=11.5 Hz, ³J=6.2 Hz, 1H, CH₂OH), 3.54-3.50 (m, 2H, OCH₂).

¹³C: 137.8, 128.5, 127.8 (C₆H₅), 73.5 (OCH₂Ph), 71.6 (OCH₂), 70.9 (CHOH), 64.0 (CH₂OH).

*1-O-Benzyl-3-O-trityl-sn-glycérol (107)*⁵⁶



To a solution of diol **95** (11.9 g, 65.3 mmol) in dry THF (90 mL) were added NEt₃ (36.4 mL, 261 mmol) and DMAP (0.8 g, 6.53 mmol). After complete dissolution, trityl chloride (19.1 g, 68.6 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 65 °C for 24 h. The reaction mixture was quenched with iced water. The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 50 mL). The combined organics layers were washed with brine (3 x 20 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 95:5 up to 80:20) afforded 22.2 g of the desired product as a white solid.

Yield: 80%.

MW = 424.53 g/mol.

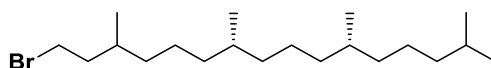
R_f = 0.2 (CHex:AcOEt 9:1).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.45-7.41 (m, 6H, H_{arom}), 7.32-7.20 (m, 14H, H_{arom}), 4.53 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.03-3.95 (m, 1H, CHOH), 3.63-3.53 (m, 2H, OCH₂), 3.27-3.18 (m, 2H, CH₂OTr), 2.43 (d, ³J=4.9 Hz, 1H, OH).

¹³C: 144.0 (C_q), 139.4 (C_q), 128.8, 128.5, 128.0, 127.8, 127.2 (C₆H₅), 86.8 (OC_qPh₃), 73.5 (OCH₂Ph), 71.7 (OCH₂), 70.1 (CHOH), 64.7 (CH₂OTr).

*1-Bromo-3,7R,11R,15-tetramethylhexadecane (90)*⁵⁶



To a solution of phytol 2 (25.0 g, 84.0 mmol) in EtOH (100 mL) was added Ni (6.25 g, 110 mmol) in 50% aqueous solution. After 48 h of stirring under hydrogen atmosphere, the reaction mixture was filtered through Celite and concentrated, affording phytanol in a mixture of stereoisomers ($R_f=0.2$ CHex:AcOEt 9:1).

To phytanol (25.0 g, 84 mmol) was added slowly and under vigorous stirring HBr (300 mL, 1.76 mol) in 48 % aqueous solution, followed by concentrated H_2SO_4 (1.0 mL, 8.4 mmol). The mixture was left stirring for 18 h at 100 °C then cooled down to room temperature and cyclohexane (100 mL) was added. The aqueous layer was extracted with cyclohexane (2 x 100 mL). The organic layers were combined and washed with 5% aqueous $NaHCO_3$ solution (3 x 50 mL) and brine (3 x 20 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 100:0 up to 80:20) afforded 24.6 g of the desired product as a yellow oil.

Yield: 81%.

MW = 361.44 g/mol.

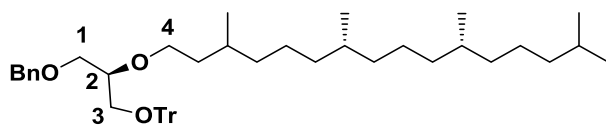
R_f = 0.9 (CHex:AcOEt 9:1).

NMR in $CDCl_3$:

1H : 3.50-3.36 (m, 2H, CH_2Br), 1.94-1.83 (m, 1H, $CHCH_2CH_2Br$), 1.73-1.60 (m, 2H, CH_2CH_2Br), 1.40-0.99 (m, 21H, 9 x CH_2 + 3 x CH), 0.93-0.81 (m, 15H, 5 x CH_3).

^{13}C : 40.3, 40.2, 39.1, 37.6, 37.5, 37.4, 37.0 (CH_2), 33.0, 32.9 (CH), 32.3 (CH_2Br), 31.9, 31.8 (CH), 28.2 (CH_3), 27.1, 25.0, 24.7, 24.6, 24.4 (CH_2), 22.9, 22.8, 19.9, 19.2, 19.1 (CH_3).

1-O-Benzyl-2-O-(3,7*R*,11*R*,15-tetramethylhexadecyl)-3-O-trityl)-sn-glycerol (**108**)⁵⁶



To a suspension of NaH (4.9 g 60% in oil, 202.4 mmol) in dry THF (40 mL) at 0 °C, was added dropwise a solution of the alcohol **107** (21.5 g, 50.6 mmol), in dry THF (30 mL). Then a solution of phytanyl bromide **90** (22.0 g, 60.8 mmol) in dry THF (30 mL) was added dropwise at room temperature. The reaction mixture was concentrated *via* Dean Stark and stirred 48 h at 130 °C. Diethyl ether (40 mL) was added and the excess of NaH was quenched with iced water. The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 x 40 mL). The organic layers were combined and washed with saturated NH₄Cl (20 mL) and brine (20 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 100:0 up to 90:10) afforded 22.5 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 63%.

MW = 705.06 g/mol.

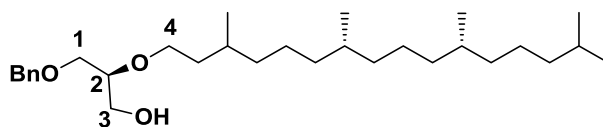
R_f = 0.5 (CHex:Et₂O 95:5).

NMR in CDCl₃ :

¹H: 7.49-7.43 (m, 5H, H_{arom}), 7.34-7.20 (m, 15H, H_{arom}), 4.57-4.48 (m, 2H, OCH₂Ph), 3.66-3.51 (m, 5H, H-1, H-2, H-4), 3.22 (d, ³J=4.2 Hz, 2H, H-3), 1.68-0.99 (m, 24H, 10 x CH₂, 4 x CH), 0.91-0.82 (m, 15H, 5 x CH₃).

¹³C: 144.1 (C_q), 138.5 (C_q), 129.1, 128.8, 128.3, 127.7, 127.5, 127.4, 126.9 (C₆H₅), 86.6 (OC_qPh₃), 78.4 (C-2), 73.3 (OCH₂Ph), 70.6 (C-1), 69.0 (C-4), 63.6 (C-3), 39.4, 37.6, 37.5, 37.3, 37.2 (CH₂), 32.86, 29.9, 28.0 (CH), 26.9, 24.8, 24.5, 24.4 (CH₂), 22.8, 22.7, 19.8, 19.7, 19.5 (CH₃).

*1-O-Benzyl-2-O-(3,7R,11R,15-tetramethylhexadecyl)-3-O-hydroxyl-sn-glycerol (109)*⁵⁶



To a solution of **108** (29.6 g, 42.0 mmol) in DCM (150 mL) was added hexahydrated FeCl₃ (22.8 g, 84.0 mmol). After 3 h stirring at 30 °C, the orange solution was diluted with water (70 mL) and dichloromethane (50 mL). The organic layers were washed with brine until discoloration from brown to yellow, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 100:0 up to 90:10) afforded 11.1 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 57%.

MW = 462.75 g/mol.

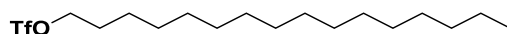
R_f = 0.4 (CHex:AcOEt 8:2).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.38-7.26 (m, 5H, H_{arom}), 4.55 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.79-3.49 (m, 7H, H-1, H-2, H-3, H-4), 2.09 (t, ³J=6.2 Hz, 1H, OH), 1.68-0.978 (m, 24H, 10 x CH₂, 4 x CH), 0.90-0.82 (m, 15H, 5 x CH₃).

¹³C: 138.2, 128.6, 127.8 (C₆H₅), 78.7 (C-2), 73.7 (OCH₂Ph), 70.2 (C-1), 68.9 (C-4), 63.0 (C-3), 39.5, 37.7, 37.5, 37.2 (CH₂), 33.0, 30.0, 29.9, 28.1 (CH), 25.0, 24.5 (CH₂), 22.8, 19.9, 19.8 (CH₃).

*Hexadecanyl triflate (110)*³⁷



To a solution of 2,6-lutidine (0.7 mL, 6 mmol) in dry DCM (10mL) at 0 °C was added dropwise triflic anhydride (1.01 mL, 6 mmol). The mixture was left stirring 10 min at 0 °C and then hexadecanol (1.2 g, 4.5 mmol) was added. The mixture was stirred during 1 h then quenched by iced water. The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with HCl 5% (3 x 20mL), NaHCO₃ 5% (3 x 20 mL) and brine (30 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 90:10) afforded 1.6 g of the desired product as a white solid.

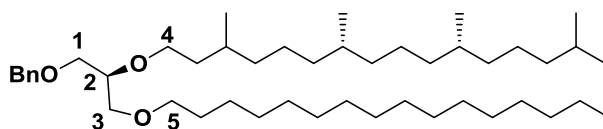
Yield: 97%.

MW = 374.50 g/mol.

NMR in CDCl₃:

¹H: 4.54 (t, ³J=6.6 Hz, 2H, CH₂O), 1.86-1.79 (m, 2H, CH₂CH₂Tf), 1.46-1.37 (m, 2H, CH₂), 1.36-1.20 (m, 24 H, 12 x CH₂), 0.87 (t, ³J=6.8 Hz, 3H, CH₃).

*1-O-Benzyl-2-O-(3,7R,11R,15-tetramethylhexadecyl)-3-O-hexadecane-sn-glycerol (111)*³⁷



To a suspension of the alcohol **109** (0.7 g, 1.5 mmol) in dry DCM (7.5 mL) under argon atmosphere was added 1,8-bis(dimethylaminonaphtalene) (975 mg, 4.5 mmol). Then a solution of the triflate **110** (1.7 g, 4.5 mmol) in dry DCM (1.8 mL) was added to the mixture. It was left stirring for 48 h under reflux. The reaction was stopped with the addition of 10 mL of a solution of HCl 5% and DCM. The aqueous phase was extracted with DCM (3 x 7 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 10 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 95:5) afforded 860 mg of the desired product as a brown oil.

Yield : 70 %.

MW = 686.56 g/mol.

HRMS: Calcd for C₄₆H₈₆O₃Na [M+Na]⁺ 709.64692; found 709.6472.

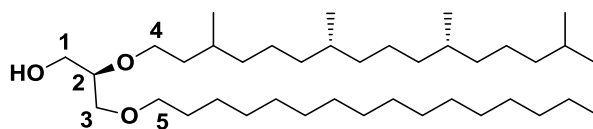
R_f = 0.7 (CHex:AcOEt 95:5).

NMR in CDCl₃:

¹H : 7.36-7.31 (m, 5H, H_{arom}), 4.56 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.67-3.33 (m, 7H, H-1, H-2, H-3, H-4), 1.67-95 (m, 52H, 24 x CH₂, 4 x CH), 0.91-0.81 (m, 18H, 6 x CH₃).

¹³C : 138.6, 128.4, 128.1, 127.7, 127.4 (C₆H₅), 78.1 (C₂), 73.5 (OCH₂Ph), 71.8 (C-3), 71.1 (C-4), 70.9 (C-5), 70.5, 69.4, 69.0 (C-1), 39.5, 37.7, 37.6, 37.5, 37.5, 37.3 (CH₂), 33.0, 32.9 (CH), 32.1, 32.1 (CH₂), 30.0 (CH), 29.9, 29.8, 29.6, 29.5 (CH₂), 28.1 (CH), 27.1, 26.4, 26.3, 25.0, 24.6, 24.5, 22.8 (CH₂), 22.9, 22.8, 19.9, 19.8, 14.3 (CH₃).

2-O-(3,7*R*,11*R*,15-tetramethylhexadecyl)-3-O-hexadecane-sn-glycerol (**19**)³⁷



To a solution of **111** (1.6 g, 2.33 mmol) in THF/MeOH (20 mL, 1/1) was added palladium on activated carbon (10% w/w) and few drops of acetic acid. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere during 5 h at room temperature. The suspension was filtered through Celite and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 95:5) afforded 0.5 g of the desired product as a colorless oil.

Yield : 65%.

MW = 597.07 g/mol.

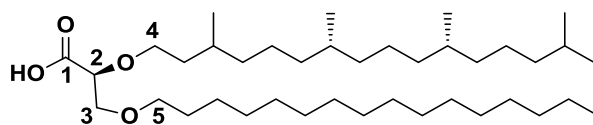
R_f = 0.2 (CHex:AcOEt 95:5).

NMR in CDCl₃:

¹H : 3.76-3.69 (m, 1H, H-1a), 3.69-3.58 (m, 2H, H-4a, H-1b), 3.58-3.46 (m, 4H, H-2, H-3, H-4a), 3.46-3.41 (dt, ²J=6.7 Hz, ³J=1.1 Hz, 2H, H-5), 2.15 (s, 1H, OH), 1.67-1.46 (m, 4H, 2 OCH₂CH₂), 1.42-0.99 (m, 48H, 20 CH₂, 4 CH), 0.92-0.81 (m, 18H, 6 CH₃).

¹³C : 78.2 (C-2), 71.9 (C-5), 70.9 (C-3), 68.6 (C-4), 63.1 (C-1), 39.4, 37.5, 37.4, 37.3, 37.2, 37.1 (9 CH₂), 32.8 (2 CH), 31.9 (CH₂), 29.8 (CH), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4 (4 CH₂), 28.0 (CH), 24.8, 24.5, 24.3, 24.1, 22.7 (5 CH₂), 22.7, 22.6, 19.8, 19.7, 19.6, 14.1 (6 CH₃).

*1-O-carboxyl-2-O-(3,7R,11R,15-Tetramethylhexadecyl)-3-O-hexadecane-sn-glycerol (23)*³⁷



To a solution of **19** (0.43 g, 0.7 mmol), in dry THF (25 mL) was added TEMPO benzoate (29 mg, 0.1 mmol). At 0 °C were added an aqueous solution of NaHCO₃ 5% (25 mL) and then calcium hypochlorite (826 mg, 5.8 mmol). The mixture was left stirring at 0 °C during 15 min and then at room temperature for 24 h. 5% HCl solution was added until there was no solid left in the flask. Aqueous layer was extracted with AcOEt (3 x 20mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 9:1) afforded 0.5 g of the desired product as a colorless oil.

Yield : 93%.

MW = 611.05 g/mol.

R_f = 0.2 (CHex:AcOEt 9:1).

NMR in CDCl₃:

¹H : 4.04 (dd, ²J=5.1 Hz, ³J=3.2 Hz, 1H, H-2), 3.81 (ddd, ²J=10.5 Hz, ³J=3.3 Hz, ⁴J=1 Hz, 1H, H-3a), 3.74-3.62 (m, 3H, H-3b, H-4), 3.54-3.41 (m, 2H, H-5), 1.75-0.99 (m, 52 H, 24 CH₂, 4 CH), 0.91-0.82 (m, 18H, 6 CH₃).

¹³C : 172.2 (C-1), 78.5 (C-2), 72.1 (C-5), 69.7 (C-3), 69.7 (C-4), 37.5, 37.4, 37.3, 36.6, 36.5 (7 CH₂), 32.8 (2 CH), 31.9 (CH₂), 29.8 (CH), 29.7, 29.5, 29.4, 29.3 (5 CH₂), 28.0 (CH), 25.6, 24.8, 24.5, 24.4, 22.7 (5 CH₂), 22.7, 22.6, 19.7, 19.6, 14.1 (6 CH₃).

Références

1. Benvegna, T., Lemiegre, L., Cammas-Marion, S. New Generation of Liposomes Called Archaeosomes Based on Natural or Synthetic Archaeal Lipids as Innovative Formulations for Drug Delivery. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **3**, 206–220 (2009).
2. Benvegna, T., Brard, M., Plusquellec, D. Archaeobacteria bipolar lipid analogues: structure, synthesis and lyotropic properties. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **8**, 469–479 (2004).
3. Haq, K., Jia, Y., Krishnan, L. Archaeal lipid vaccine adjuvants for induction of cell-mediated immunity. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 1557–1566 (2016).
4. Tolson, D. L., Latta, R. K., Patel, G. B., Sprott, G. D. Uptake of Archaeobacterial Liposomes and Conventional Liposomes by Phagocytic Cells. *J. Liposome Res.* **6**, 755–776 (1996).
5. Sprott, D., Patel, G., Krishnan, L. Archaeobacterial Ether Lipid Liposomes as Vaccine Adjuvants. *Methods Enzymol.* **373**, (2003).
6. De Rosa, M., Gambacorta, A. The lipids of archaeobacteria. *Prog. Lipid Res.* **27**, 153–175 (1988).
7. Siliakus, M. F., van der Oost, J., Kengen, S. W. M. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles* **21**, 651–670 (2017).
8. De Rosa, M., Gambacorta, A., Gliozzi, A. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol. Rev.* **50**, 70–80 (1986).
9. Comita, P. B., Gagosian, R. B., Pang, H., Costello, C. E. Structural elucidation of a unique macrocyclic membrane lipid from a new, extremely thermophilic, deep-sea hydrothermal vent archaeobacterium, *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **259**, 15234–15241 (1984).
10. Sprott, G. D., Agnew, B. J., Patel, G. B. Structural features of ether lipids in the archaeobacterial thermophiles *Pyrococcus furiosus*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanothermobacter fervidus*, and *Sulfolobus acidocaldarius*. *Can. J. Microbiol.* **43**, 467–476 (1997).
11. Langworthy, T. A. Long-chain diglycerol tetraethers from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **487**, 37–50 (1977).
12. Damsté, J. S. S., Schouten, S., Hopmans, E. C., van Duin, A. C. T., Geenevasen, J. A. J. Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *J. Lipid Res.* **43**, 1641–1651 (2002).
13. Quinn, P. J. Lipid–lipid interactions in bilayer membranes: Married couples and casual liaisons. *Prog. Lipid Res.* **51**, 179–198 (2012).
14. Caforio, A., Driessen, A. J. M. Archaeal phospholipids: Structural properties and biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1325–1339 (2017).
15. Shinoda, W., Shinoda, K., Baba, T., Mikami, M. Molecular Dynamics Study of Bipolar Tetraether Lipid Membranes. *Biophys. J.* **89**, 3195–3202 (2005).
16. Shinde, G., Kumbhani, P., Gophane, V., Bangale, G., Rajesh, K. S. Archaeosomes : modified potential liposomes (from archeal lipids). *Indo American Journal of Pharmaceutical Research* **5**, 3667–3673 (2015).
17. Febo-Ayala, W., Morera-Félix, S. L., Hrycyna, C. A., Thompson, D. H. Functional Reconstitution of the Integral Membrane Enzyme, Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase, in Synthetic Bolalipid Membrane Vesicles. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 14683–14694 (2006).
18. Shinoda, W., Mikami, M., Baba, T., Hato, M. Molecular Dynamics Study on the Effect of Chain Branching on the Physical Properties of Lipid Bilayers: Structural Stability. *J. Phys. Chem. B* **107**, 14030–14035 (2003).
19. De Rosa, M., Esposito, E., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Bu'Lock, J. D. Effects of temperature on ether lipid composition of *Caldariella acidophila*. *Phytochemistry* **19**, 827–831 (1980).

20. Gabriel, J. L., Chong, P. L. Molecular modeling of archaebacterial bipolar tetraether lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **105**, 193–200 (2000).
21. Brard, M., Richter, W., Benvegnu, T., Plusquellec, D. Synthesis and Supramolecular Assemblies of Bipolar Archaeal Glycolipid Analogues Containing a *cis* -1,3-Disubstituted Cyclopentane Ring. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10003–10012 (2004).
22. van de Vossenberg, J. L. C. M., Driessen, A. J. M., Konings, W. N. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**, 163–170 (1998).
23. Nichols, D., Miller, M., Davies, N., Goodchild, A., Raftery, M., Cavicchioli, R. Cold Adaptation in the Antarctic Archaeon *Methanococcoides burtonii* Involves Membrane Lipid Unsaturation. *J. Bacteriol.* **186**, 8508–8515 (2004).
24. Oger, P. M., Cario, A. Adaptation of the membrane in Archaea. *Biophys. Chem.* **183**, 42–56 (2013).
25. Bligh, E. G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
26. Sturt, H. F., Summons, R. E., Smith, K., Elvert, M., Hinrichs, K.-U. Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry—new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 617–628 (2004).
27. Huguet, C., Schimmelmann, A., Thunell, R., Lourens, L., Sinninghe Damsté, J., Schouten, S., A study of the TEX₈₆ paleothermometer in the water column and sediments of the Santa Barbara Basin, California: A high resolution record. *Paleoceanography* **22**, PA 3003 (2007).
28. Turich, C., Freeman, K., Bruns, M., Conte, M., Jones, A., Wakeham, S. Lipids of marine Archaea: Patterns and provenance in the water-column and sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **71**, 3272–3291 (2007).
29. Huguet, C., Martens-Habben, W., Urakawa, H., Stahl, D. A., Ingalls, A. E. Comparison of extraction methods for quantitative analysis of core and intact polar glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs) in environmental samples: Extraction methods for quantitative analysis of GDGTs. *Limnol. Oceanogr. Methods* **8**, 127–145 (2010).
30. Hanif, M., Atsuta, Y., Fujie, K., Daimon, H. Supercritical Fluid Extraction of Bacterial and Archaeal Lipid Biomarkers from Anaerobically Digested Sludge. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3022–3037 (2012).
31. Koga, Y., Morii, H. Special methods for the analysis of ether lipid structure and metabolism in archaea. *Anal. Biochem.* **348**, 1–14 (2006).
32. Yokoi, T., Isobe, K., Yoshimura, T., Hemmi, H. Archaeal Phospholipid Biosynthetic Pathway Reconstructed in *Escherichia coli*. *Archaea* **2012**, 1–9 (2012).
33. Isobe, K., Ogawa, T., Hirose, K., Yokoi, T., Yoshimura, T., Hemmi, H., Geranylgeranyl Reductase and Ferredoxin from *Methanosarcina acetivorans* are required for the synthesis of fully reduced Archaeal membrane lipid in *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **196**, 417–423 (2014).
34. Minamikawa, H., Hato, M. Phase Behavior of Synthetic Phytanyl-Chained Glycolipid/Water Systems. *Langmuir* **13**, 2564–2571 (1997).
35. Ballet, C. Vectorisation de galactosylcéramides par des archaeosomes et des liposomes en immunothérapie du cancer. (Rennes 1, 2014).
36. Eguchi, T., Terachi, T., Kakinuma, K. The first synthesis of an archaebacterial 36-membered macrocyclic diether lipid. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 137 (1994).

37. Lainé, C., Mornet, E., Lemiègre, L., Montier, T., Cammas-Marion, S., Neveu, C., Carmoy, N., Lehn, P., Benvegny, T. Folate-Equipped Pegylated Archaeal Lipid Derivatives: Synthesis and Transfection Properties. *Chem. - Eur. J.* **14**, 8330–8340 (2008).
38. Stewart, L. C., Kates, M. Synthesis and characterization of deuterium-labelled dihexadecylglycerol and diphytanylglycerol phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* **50**, 23–42 (1989).
39. Jacquemet, A., Lemiègre, L., Lambert, O., Benvegny, T. How the Stereochemistry of a Central Cyclopentyl Ring Influences the Self-Assembling Properties of Archaeal Lipid Analogues: Synthesis and CryoTEM Observations. *J. Org. Chem.* **76**, 9738–9747 (2011).
40. Cui, J., Kawatake, S., Umegawa, Y., Lethu, S., Yamagami, M., Matsuoka, S., Sato, F., Matsumori, N., Murata, M. Stereoselective synthesis of the head group of archaeal phospholipid PGP-Me to investigate bacteriorhodopsin–lipid interactions. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 10279–10284 (2015).
41. Yamagami, M., Tsuchikawa, H., Cui, J., Umegawa, Y., Miyazaki, Y., Seo, S., Shinoda, W., Murata, M. Average Conformation of Branched Chain Lipid PGP-Me That Accounts for the Thermal Stability and High-Salinity Resistance of Archaeal Membranes. *Biochemistry (Mosc.)* **58**, 3869–3879 (2019).
42. Thompson, D., Wong, K., Humphry-Baker, R., Wheeler, J., Kim, J., Ranavavare, S. Tetraether bolaform amphiphiles as models of archaebacterial membrane lipids: Raman spectroscopy, phosphorus-31 NMR, x-ray scattering, and electron microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9035–9042 (1992).
43. Menger, F. M., Chen, X. Y., Brocchini, S., Hopkins, H. P., Hamilton, D. Synthesis and thermotropic properties of macrocyclic lipids related to archaebacterial membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6600–6608 (1993).
44. Eguchi, T., Arakawa, K., Terachi, T., Kakinuma, K. Total Synthesis of Archaeal 36-Membered Macrocyclic Diether Lipid. *J. Org. Chem.* **62**, 1924–1933 (1997).
45. Eguchi, T., Ibaragi, K., Kakinuma, K. Total Synthesis of Archaeal 72-Membered Macrocyclic Tetraether Lipids. *J. Org. Chem.* **63**, 2689–2698 (1998).
46. Barbeau, J., Lemiègre, L., Quelen, A., Malard, V., Gao, H., Gonçalves, C., Berchel, M., Jaffrès, P., Pichan, C., Midoux, P., Benvegny, T. Synthesis of a trimannosylated-equipped archaeal diether lipid for the development of novel glycoliposomes. *Carbohydr. Res.* **435**, 142–148 (2016).
47. Sprott, G. D., Tolson, D. L., Patel, G. B. Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 17–22 (1997).
48. Krishnan, L., Dennis Sprott, G. Archaeosomes as Self-Adjuvanting Delivery Systems for Cancer Vaccines *. *J. Drug Target.* **11**, 515–524 (2003).
49. Sprott, G. D., Yeung, A., Dicaire, C. J., Yu, S. H., Whitfield, D. M. Synthetic Archaeosome Vaccines Containing Triglycosylarchaeols Can Provide Additive and Long-Lasting Immune Responses That Are Enhanced by Archaeidylserine. *Archaea* **2012**, 1–9 (2012).
50. Jia, Y., Mc Cluskie, M., Zhang, D., Monette, R., Iqbal, U., Moreno, M., Sauvageau, J., Williams, D., Deschatelets, L., Jakubek, Z., Krishnan, L. In vitro evaluation of archaeosome vehicles for transdermal vaccine delivery. *J. Liposome Res.* **28**, 305–314 (2018).
51. Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Côté, J.-P., Whitfield, D. M. Adjuvant potential of archaeal synthetic glycolipid mimetics critically depends on the glyco head group structure. *Glycobiology* **18**, 559–565 (2008).
52. Akache, B., Stark, F., Jia, Y., Deschatelets, L., Dudani, R., Harrison, B., Agbayani, G., Williams, D., Jamshidi, M., Krishnan, L., Mc Cluskie, M., Murthy, A. Sulfated archaeol glycolipids: Comparison with other immunological adjuvants in mice. *PLOS ONE* **13**, e0208067 (2018).

53. Jia, Y., Akache, B., Deschatelets, L., Qian, H., Dudani, R., Harrison, B., Stark, F., Chandan, V., Jamshidi, M., Krishnan, L., Mc Cluskie, M. A comparison of the immune responses induced by antigens in three different archaeosome-based vaccine formulations. *Int. J. Pharm.* **561**, 187–196 (2019).
54. Higa, L. H., Schilrreff, P., Perez, A., Iriarte, M., Roncaglia, D., Morilla, M., Romero, E. Ultradeformable archaeosomes as new topical adjuvants. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **8**, 1319–1328 (2012).
55. Caimi, A. T., Parra, F., de Farias, M., Portugal, R., Perez, A., Romero, E., Morilla, M. Topical vaccination with super-stable ready to use nanovesicles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **152**, 114–123 (2017).
56. Brard, M., Lainé, C., Réthoré, G., Laurent, I., Neveu, C., Lemiègre, L., Benvegny, T. Synthesis of Archaeal Bipolar Lipid Analogues: A Way to Versatile Drug/Gene Delivery Systems. *J. Org. Chem.* **72**, 8267–8279 (2007).
57. Gutbrod, K., Romer, J., Dörmann, P. Phytol metabolism in plants. *Prog. Lipid Res.* **74**, 1–17 (2019).
58. Heck, S., Klein, N., Komp, H., Bohr, C., Hubner, N., Westfichte, A. Preparation of unsaturated palm oil fatty alcohols by the distillation and hydrogenation of unsaturated palm fatty acid methyl esters. WO 9925673 (1998).
59. Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., Tschaen, D., Grabowski, E., Reider, P. Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids with Sodium Chlorite Catalyzed by TEMPO and Bleach. *J. Org. Chem.* **64**, 2564–2566 (1999).

Chapitre 4 : Synthèse de la plateforme et couplages aux parties glycosidiques et lipidiques

Chapitre 4 : Synthèse de la plateforme et couplages aux parties glycosidiques et lipidiques

Le rôle principal de la plateforme est de relier les deux autres structures précédemment décrites (saccharides et lipides) entre elles tout en apportant une valeur ajoutée à la molécule (multiprésentation). Elle permet, grâce à sa synthèse totalement indépendante, une grande modularité des motifs terminaux. Sa structure a été conçue sur la base d'études menées au sein du laboratoire, notamment sur la multiprésentation,¹ ainsi que par d'autres équipes (partie phénolique²) afin de maximiser le potentiel immunoadjuvant des glycolipides synthétisés. Pour cela, comme on peut le voir sur la figure 52, il a été choisi de relier un cœur phénolique à un pentaérythritol afin de créer une plateforme tri-antennée. La molécule plateforme a été conçue pour supporter trois triples liaisons dans le but de mener une réaction click avec des sucres déprotégés. En position *para* de ce bras, une fonction alcool permet de relier la plateforme à la partie lipidique *via* une liaison ester.

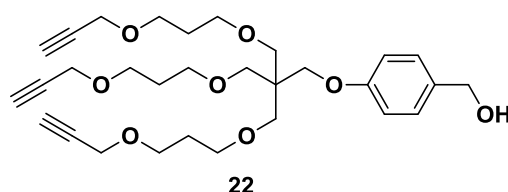


Figure 52 : Structure de la partie plateforme

Ce chapitre débutera par une partie bibliographique relatant les principaux avantages qu'offre la structure de cette plateforme. Le second paragraphe sera consacré à l'explication de la conception de cette structure. Ensuite les deux voies de synthèse envisagées pour l'obtention de cette molécule seront présentées. Enfin, dans une dernière partie, les couplages terminaux ainsi que la caractérisation des molécules finales obtenues seront décrits.

I Bibliographie

1) La multiprésentation ou l'effet cluster

La multivalence (figure 53) est un principe largement utilisé dans la conception de molécules bioactives pour augmenter l'affinité d'un ligand vis-à-vis de sa cible biologique. Dans la nature, les interactions ligand/récepteur sont faibles mais l'affinité ainsi que la spécificité de ces adhésions peuvent être décuplées par une présentation multiple (ou multiprésentation).³ Dans le cas des

sucres, le fait d'obtenir une augmentation de l'affinité d'un ligand saccharidique pour son récepteur en plaçant, sur une même molécule, plusieurs fois un motif saccharidique, se nomme le « glycoside cluster effect ».⁴

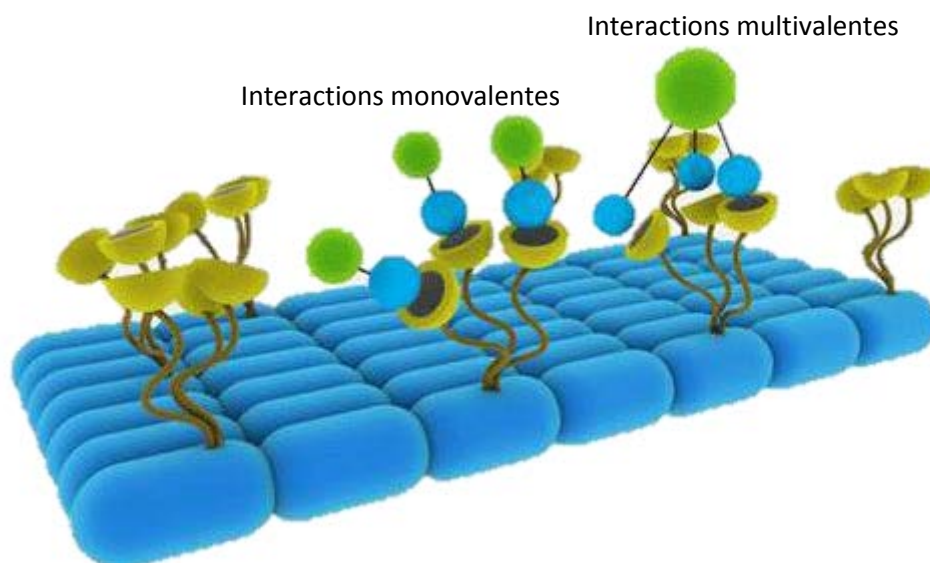


Figure 53 : Interactions mono- et multivalentes⁵

La multivalence doit être différenciée de la coopération. Lorsqu'un récepteur possède plusieurs sites d'interactions, un ligand se fixant sur un de ces sites peut influencer l'affinité des autres récepteurs pour ce ligand (c'est le cas lors de la fixation du dioxygène sur les quatre sites de l'hémoglobine).⁶ C'est le phénomène de coopérativité. Elle est liée à l'interdépendance de plusieurs récepteurs. Au contraire, dans le cas de la multivalence, il peut y avoir des interactions sur des récepteurs indépendants.

a) Le principe de la multiprésentation

Le principe de la multiprésentation repose sur le fait de présenter plusieurs motifs qui peuvent être, soit tous identiques, soit différents, au récepteur (figure 54). En 1983, Lee et coll.⁷ avaient déjà mis en évidence que l'affinité d'un ligand pour un récepteur (ici ASGP-R, un récepteur à galactose) était plus influencée par le nombre et l'orientation des motifs saccharidiques que par l'aglycone utilisée pour mimer le ligand naturel. Une amélioration de 10^6 de l'inhibition (IC_{50}) a été observée entre l'utilisation du ligand mono-antenné et celle du tétra-antenné. Lee a, par la suite, défini le *glycoside cluster effect* par l'effet multivalent reposant sur la détection de sucres.⁴ Il a observé que la capacité de détection de ces motifs seuls est faible mais augmente avec la valence jusqu'à atteindre un nombre optimal, correspondant à la valence de la cible.⁸ La multivalence est définie comme la capacité d'une particule (ou molécule) à se lier à une autre *via* de multiples interactions non covalentes simultanées. La valence d'une particule (ou molécule) est le nombre de fonctions liantes

du même type (ou similaires) connectées à cette entité.³ Grâce à la reconnaissance simultanée et immédiate des ligands, même si chacune prise séparément est faible, le complexe multivalent est caractérisé par une stabilité thermodynamique importante.

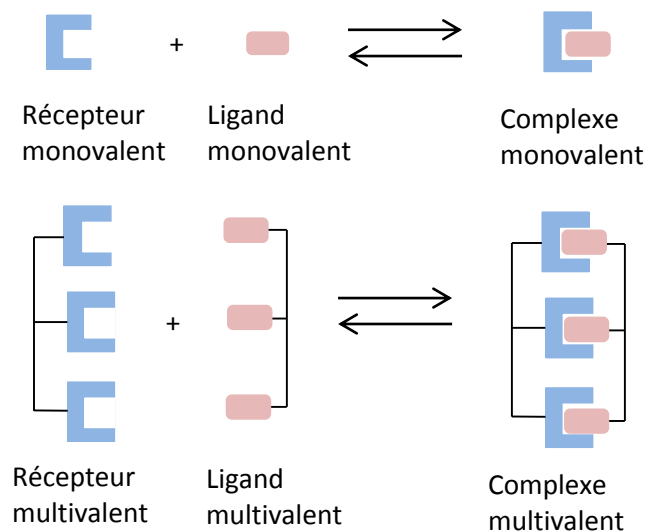


Figure 54 : Formation de complexes mono et multivalents

La multivalence était caractérisée à l'origine comme une conséquence de l'effet chélate qui est le gain d'énergie dû à la présence d'une ou plusieurs interactions intramoléculaires. L'effet chélate est induit par l'interaction simultanée de multiples ligands avec une substance multivalente possédant des sites de reconnaissance multimériques. Cependant, les facteurs allostériques (changement conformationnel dû à l'interaction entre le ligand et le récepteur) ou la coopérativité se sont avérés être des facteurs importants dans l'efficacité des interactions multivalentes.⁹ La multivalence est également souvent associée à une avidité favorable, un terme statistique qui représente la force cumulée de toutes les affinités des interactions individuelles.¹⁰

Dans la nature, les interactions multivalentes sont notamment impliquées dans les processus de reconnaissance entre les cellules. Ainsi, l'une des premières étapes d'une infection par un pathogène résulte de l'adhésion d'un virus, d'une bactérie, d'un champignon à la cellule hôte *via* des interactions multivalentes.¹¹ Ces propriétés d'interaction peuvent également être utilisées de deux manières différentes. La première consiste à cibler les agents pathogènes afin d'inhiber de manière compétitive leur adhésion aux cellules hôtes, la seconde, à synthétiser des ligands mimant les sucres à la surface des pathogènes, dans le but d'activer le système immunitaire.

Ces propriétés sont mises à profit dans la recherche de vaccins contre des virus tel que le VIH. Comme nous l'avons déjà vu, les cellules dendritiques du système immunitaire possèdent de nombreux récepteurs, dont DC-SIGN. Or ce récepteur lectinique interagit avec de nombreux virus qui

possèdent des glycoprotéines mannosylées ou fucosylées. Le VIH exprime à sa surface membranaire une protéine, la gp120, hautement mannosylée. Les CD reconnaissent donc le VIH, internalisent le virus et l'emmènent au sein des ganglions lymphatiques. Le virus est alors transféré aux LTs où il se réplique.¹² Dans le cadre du développement de vaccins anti-VIH, des ligands multivalents ont été synthétisés afin de mimer la surface du virus et rivaliser avec le ligand naturel. Le laboratoire de glycosystèmes, de l'Université de Séville, a initié en 2001 un programme de recherche durant lequel ils ont utilisé un polymère dendritique (Polymère de Boltorn ; BH20 et BH30) (figure 55) qu'ils ont habillé de motifs mannopyranosidiques. Ce dendrimère est articulé autour d'un pentaérythritol.¹³ Plusieurs générations de dendrimères ont ainsi été synthétisées supportant 16 ou 32 unités mannopyranose. L'affinité de ces composés pour DC-SIGN a été évaluée et a permis de mettre en évidence que celle-ci est calcium- et sucre-dépendante. Une IC_{50} de 50 μM a été déterminée pour BH30sucMan (figure 55), concentration à laquelle le composé inhibe l'interaction de la protéine gp120 avec les DCs.

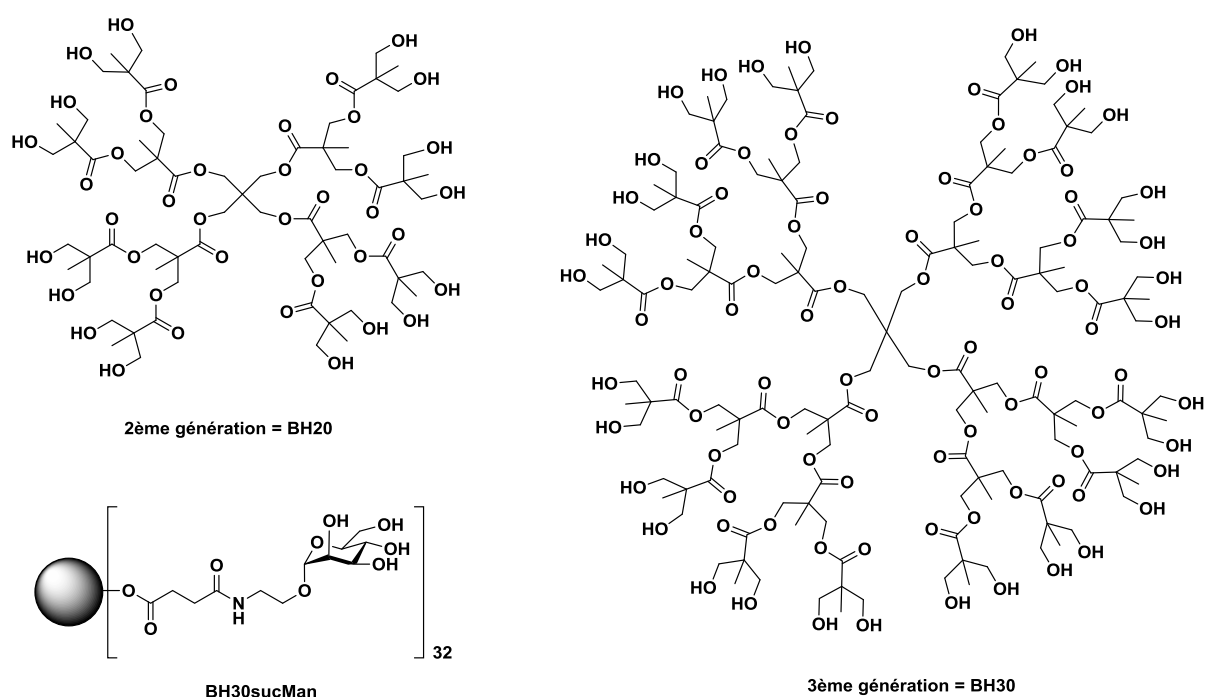


Figure 55 : Exemples de structures de dendrimères multivalents simples

Par la suite, le même type de structure a été synthétisé en utilisant des sucres plus complexes. Des études ont démontré que des dendrons tétravalents (figure 56) supportant quatre copies de trimannosides inhibent le processus de transfection du VIH entre DC-SIGN et les LTs.¹⁴ De plus, ce composé protège les cellules hôtes d'une infection potentielle en inhibant à 80% les interactions récepteur-virus.¹² Cette inhibition est notamment due à l'affinité des motifs sucre pour le récepteur mais également à l'avidité qui est assurée par la tétra-présentation du motif saccharidique.¹⁴ Dans

une autre étude, Penades et coll.¹⁵ ont greffé des disaccharides (α -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- α -Man) sur des nanoparticules d'or. Il en a résulté que les nanoparticules ont inhibé l'interaction de DC-SIGN avec les glycoprotéines du HIV 20 000 fois plus que le disaccharide seul.

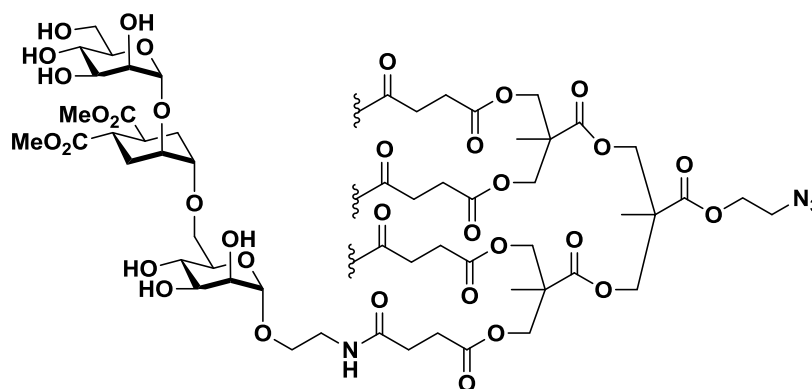


Figure 56 : Structure du dendron inhibant DC-SIGN¹⁴

Les interactions multivalentes sont également très largement étudiées afin de développer des vaccins contre le cancer. Les cellules cancéreuses surexpriment certains saccharides (sialyl Lewis X, A et Y, la 2,6- α -N-acétylgalactosamine) aussi appelés TACAs (Tumor Associated Carbohydrate Antigens).^{16,17} Leur grande hétérogénéité a encouragé le développement de vaccins multivalents hétérogènes, ce qui signifie qu'ils présentent des motifs saccharidiques différents. Des structures penta- et hexavalentes ont été mises au point par Ouerfelli et coll.¹⁸, démontrant une activité largement supérieure à celle de leurs homologues monovalents. Ce type de structure pourrait permettre de cibler plusieurs récepteurs différents, et ainsi plusieurs types de cellules cancéreuses assurant une polyvalence du vaccin et maximisant ainsi les possibilités d'interaction avec les cellules.¹⁸ Cependant, les tests cliniques ne sont pas encore probants, les composés ne permettant pas d'obtenir une réponse immunitaire suffisante pour la régression des tumeurs.¹⁹ Par ailleurs, plusieurs équipes ont conçu des vaccins basés sur l' α -GalNAc (antigène Tn). Huang et coll.,²⁰ par exemple, ont synthétisé un polymère supportant plusieurs unités Tn (figure 57) en faisant varier la densité ainsi que la valence du polymère. Il s'est avéré que la réponse immunitaire est extrêmement dépendante du nombre de motifs Tn supportés sur le polymère (40 unités pour une meilleure réponse). Cependant, la densité a également joué un rôle important, une chaîne polymérique plus courte diminuant drastiquement la réponse immunitaire.²⁰ Cameron et coll.,²¹ en associant des PEG supportant des motifs Tn à des nanoparticules d'or, ont pu obtenir une production importante, et sur une longue durée, d'anticorps sélectifs de ce motif saccharidique. Or, ces motifs Tn sont notamment présents sur les cellules du cancer du sein. Si, pour le moment, ces résultats n'ont été obtenus que sur des souris, ils restent encourageants pour le développement de nouveaux vaccins anticancéreux.

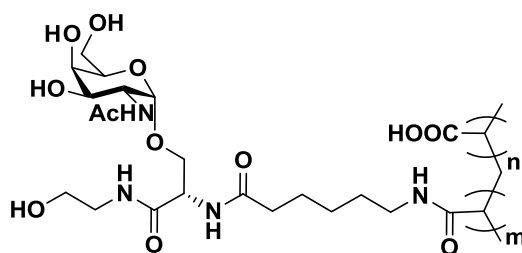


Figure 57 : Exemple d'un glycopolymère multivalent

L'effet cluster que produisent les ligands saccharidiques multivalents est également largement étudié dans l'objectif de trouver de nouveaux traitements à des maladies telles que la grippe, le choléra, les maladies auto-immunes, ...^{11,22}

b) Conception de ligands multivalents : le choix de l'espaceur et du noyau

Les glycoclusters sont souvent composés d'un noyau permettant de greffer plusieurs bras ou espaceurs, reliés eux-mêmes aux sucres. Ces noyaux peuvent avoir une valence relativement faible dans les cas des dérivés aromatiques,²³ des métaux de transition,^{15,24} des peptides²⁵ ou plus importante comme dans le cas des polymères,²⁶⁻²⁸ dendrimers^{29,30} ou les liposomes.^{1,31,32}

Deux des paramètres les plus importants dans la conception d'un espaceur sont (i) la distance entre le noyau et le sucre et (ii) le degré de liberté de chaque motif saccharidique. L'espaceur doit permettre une bonne mobilité du résidu sucre tout en conservant une distance proche de la distance réelle qui sépare les différents sites de liaison du récepteur.¹⁰ Afin de concevoir un ligand multivalent, il faut tenir compte de la longueur et de la rigidité de l'espaceur. Le positionnement des groupes liants sur le cœur central de la molécule a aussi son importance puisqu'il permet de présenter de façon optimale les ligands à la cible biologique.^{4,33,34} La figure 58 montre les différentes situations possibles lors de la synthèse de ligands multivalents. Lorsque le bras est correctement conçu, la longueur de ce dernier, et donc l'espacement entre deux motifs sucres, correspond au récepteur. En revanche, si l'espaceur est de taille trop petite, cela génère des contraintes enthalpiques défavorables. De la même manière, s'il est trop grand, la déformation nécessaire pour que deux entités sucres s'insèrent dans deux unités de reconnaissance du récepteur implique une perte de degré de liberté et donc une contribution entropique négative (la contribution entropique est l'apport énergétique nécessaire à la formation du complexe ligand/récepteur).⁸

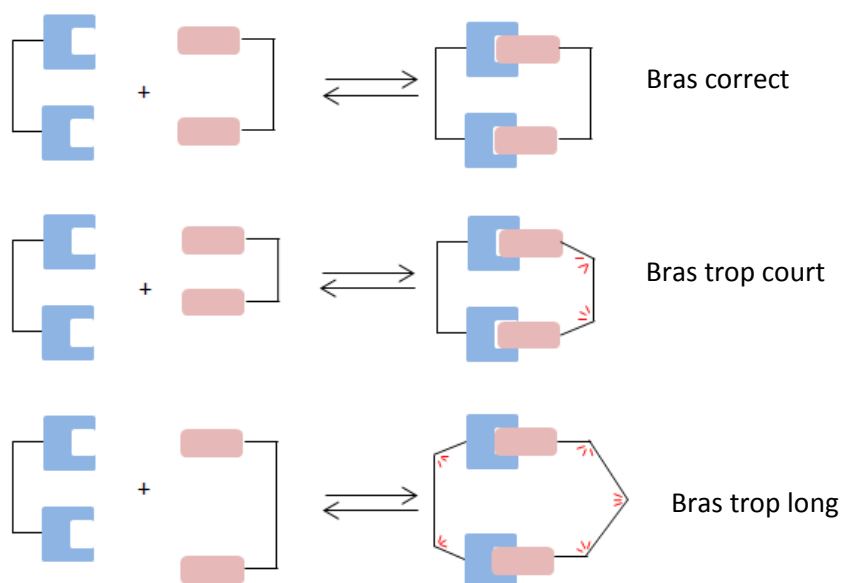


Figure 58 : Rôle de la longueur de l'espaceur dans la formation de complexes multivalents

2) La réaction click

Nous avons décidé de greffer les sucres aux différents bras de la plateforme *via* une réaction click. Les réactions click sont caractérisées par leur capacité à connecter deux composants de façon simple, sélective, avec un rendement élevé et avec peu, voire pas, de formation de sous-produits.³⁵

a) Avantages d'une réaction click

La réaction click ou cycloaddition 1,3-dipolaire, a été découverte par Huisgen en 1963. Elle consiste à mettre en réaction deux réactifs insaturés pour former une entité hétérocyclique à 5 chaînons. La réaction n'est alors pas régiosélective et il en résulte la formation d'un mélange de régioisomères 1,4 et 1,5. De plus, elle nécessite des températures élevées et des temps de réactions qui peuvent être longs.³⁵ La formation de triazole par réaction click catalysée au cuivre(I) a été découverte simultanément par les groupes de Meldal ainsi que ceux de Sharpless et Fokin en 2002.^{36,37} Les avantages de cette réaction sont nombreux : elle est facile à mettre en œuvre, avec des catalyseurs peu onéreux, les rendements sont généralement bons avec très peu de sous-produits formés. De plus, la méthode développée utilisant le cuivre(I) en tant que catalyseur permet d'obtenir le triazole disubstitué en 1,4, avec des rendements élevés, dans un laps de temps plus court et avec peu (ou pas) de chauffage.^{38,39} Le mécanisme supposé de la réaction click (schéma 40) passe par l'activation de la triple liaison par un atome de cuivre(I). Une seconde entité cuivre(I) forme alors un acétylure de cuivre. La formation d'une première liaison C-N est obtenue par l'attaque de la triple liaison sur l'atome d'azote terminal de l'azoture entraînant l'attaque du doublet non liant de l'atome d'azote

négativement chargé sur le cuivre. Un intermédiaire contenant les deux atomes de cuivre est alors obtenu. L'élimination réductrice est par la suite réalisée avec la formation d'une seconde liaison C-N menant au régiomère 1,4 du triazole.⁴⁰

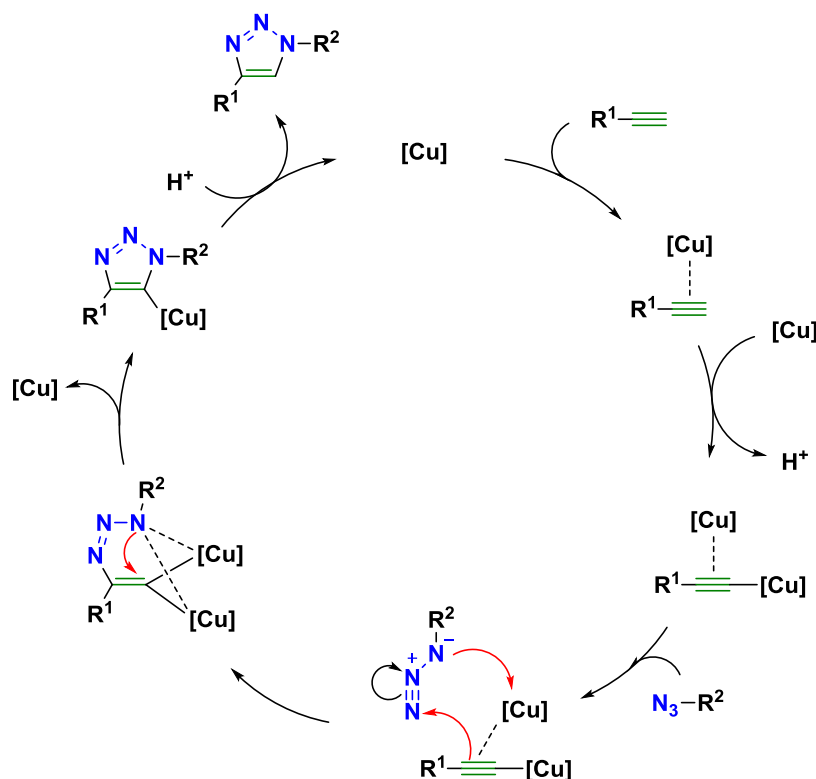


Schéma 40 : Mécanisme proposé de la réaction click catalysée au cuivre⁴⁰

b) Les triazoles dans les composés bioactifs

Les triazoles, du fait de la présence des trois atomes d'azote, sont des composés d'un grand intérêt en chimie médicinale. Ces dérivés ont démontré des propriétés anticancéreuses, antimicrobiennes, anti-infectieuses ou encore antioxydantes.⁴¹

Lors de la formation des triazoles, les deux réactifs (alcyne et azoture) peuvent être liés à des composés naturels afin de former des triazoles hybrides. Ainsi, en formant un triazole hybride avec le mélampomagnolide B (un anticancéreux majeur) **116** (figure 59), Janganati et coll.⁴² ont obtenu un composé ayant des propriétés anticancéreuses contre plusieurs lignées de cellules (colon, mélanome, rénal, ovaire, prostate, sein, leucémie).

Les azoles, et donc les triazoles, sont la source de plusieurs agents antimicrobiens et antibactériens. Le 1,2,3-triazole est devenu un pharmacophore antimicrobien majeur en empêchant la photogénèse des bactéries. Lal et coll.⁴³ ont par exemple démontré l'importance des triazoles en synthétisant une librairie de composés hybrides acide déshydroacétique-chalcone-triazole (composé **117**, figure 59).

Les premières études des activités antimicrobiennes ont révélé que certains de ces composés possèdent une activité biologique comparable, voire supérieure, à celle obtenue avec les traitements actuels. Tous les dérivés de triazoles comprenant un cycle benzénique substitué ont prouvé avoir des activités supérieures à celles de l'acide seul ou du composé acide-chalcone-alcyne, montrant ainsi l'importance du triazole. Ce n'est pas simplement un espaceur, mais le cycle joue bien le rôle d'activateur dans les activités biologiques des composés.⁴³

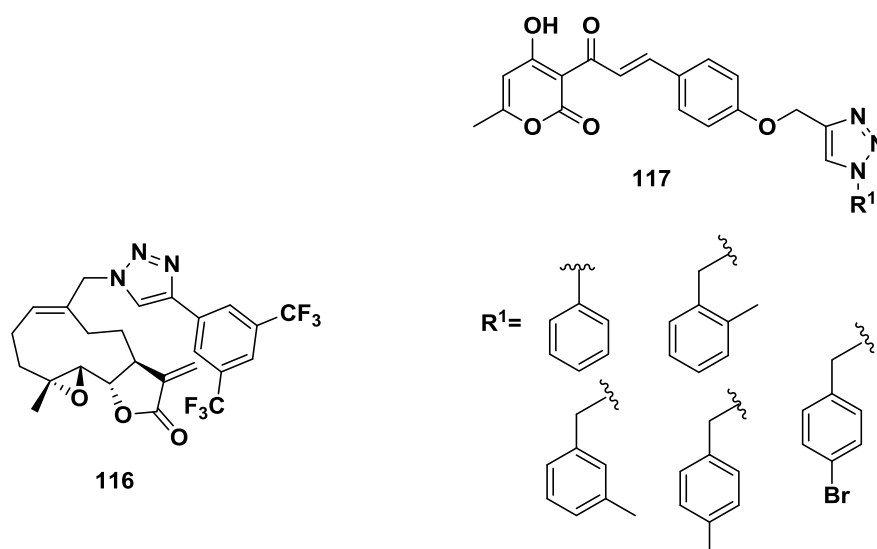


Figure 59 : Structures de différents composés bioactifs comportant un motif 1,2,3-triazole

Les triazoles possèdent également des propriétés antidiabétiques. En effet, certains composés comme la molécule **118** (figure 60) inhibent les α -glucosidases de manière compétitive. L'inhibition de cette enzyme est un bon moyen de contrôler l'hyperglycémie des patients diabétiques. En 2005, notre laboratoire a publié la synthèse ainsi que les tests d'inhibition des glucosidases et des glycosyltransférases de plusieurs composés triazoles substitués ou non par des motifs saccharidiques.⁴⁴ Le composé **118** tri-hydroxylé présente une inhibition moyenne mais très sélective des glucosidases. Dans le but d'améliorer cette inhibition, plusieurs composés ont été synthétisés en décorant le triazole central par des motifs saccharidiques inspirés d'un inhibiteur connu de cette enzyme, l'acarbose. La molécule **119** a démontré la plus grande capacité d'inhibition (constante d'inhibition K_i réduite de 294 μ M pour **118** à 73 μ M pour **119**). Plus récemment, Avula et coll.⁴⁵ ont publié la synthèse de plusieurs triazoles inhibiteurs d' α -glucosidases. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour le composé **120**, avec une IC₅₀ de 14.2 μ M.

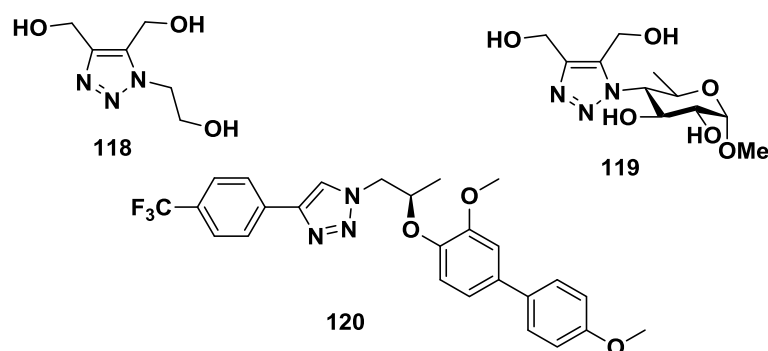


Figure 60 : Structures de composés inhibiteurs d' α -glucosidase

Comme décrit dans le chapitre bibliographique, le haut mannose Man_9 est un motif saccharidique complexe, composé de 9 monomères, retrouvé à la surface de certains pathogènes (figure 61). Ce composé est reconnu par les MRs des cellules du système immunitaire.⁴⁶ C'est donc un immunoadjuvant potentiel très intéressant mais sa synthèse reste complexe. Une famille de mimes a pu être synthétisée par réaction click au cuivre. Ces composés présentés sur la figure 61 ont prouvé agir comme des analogues du Man_9 .⁴⁷ Ils se sont ainsi liés aux mêmes récepteurs lectiniques, notamment les MRs des macrophages, avec des affinités comparables. Cela soutient l'hypothèse de la synthèse de véritables mimes de Man_9 et pas juste celle de mannoconjugués multivalents. Les études cristallographiques ont permis de conforter cette idée puisque la présentation des composés ainsi que les interactions avec les lectines sont les mêmes que celles observées pour le Man_9 .

Le fait de relier les motifs sucres que nous avons synthétisés à la plateforme par un triazole pourrait mimer la présentation de disaccharides dans le cas des monomères **15**, **16** et **24**.

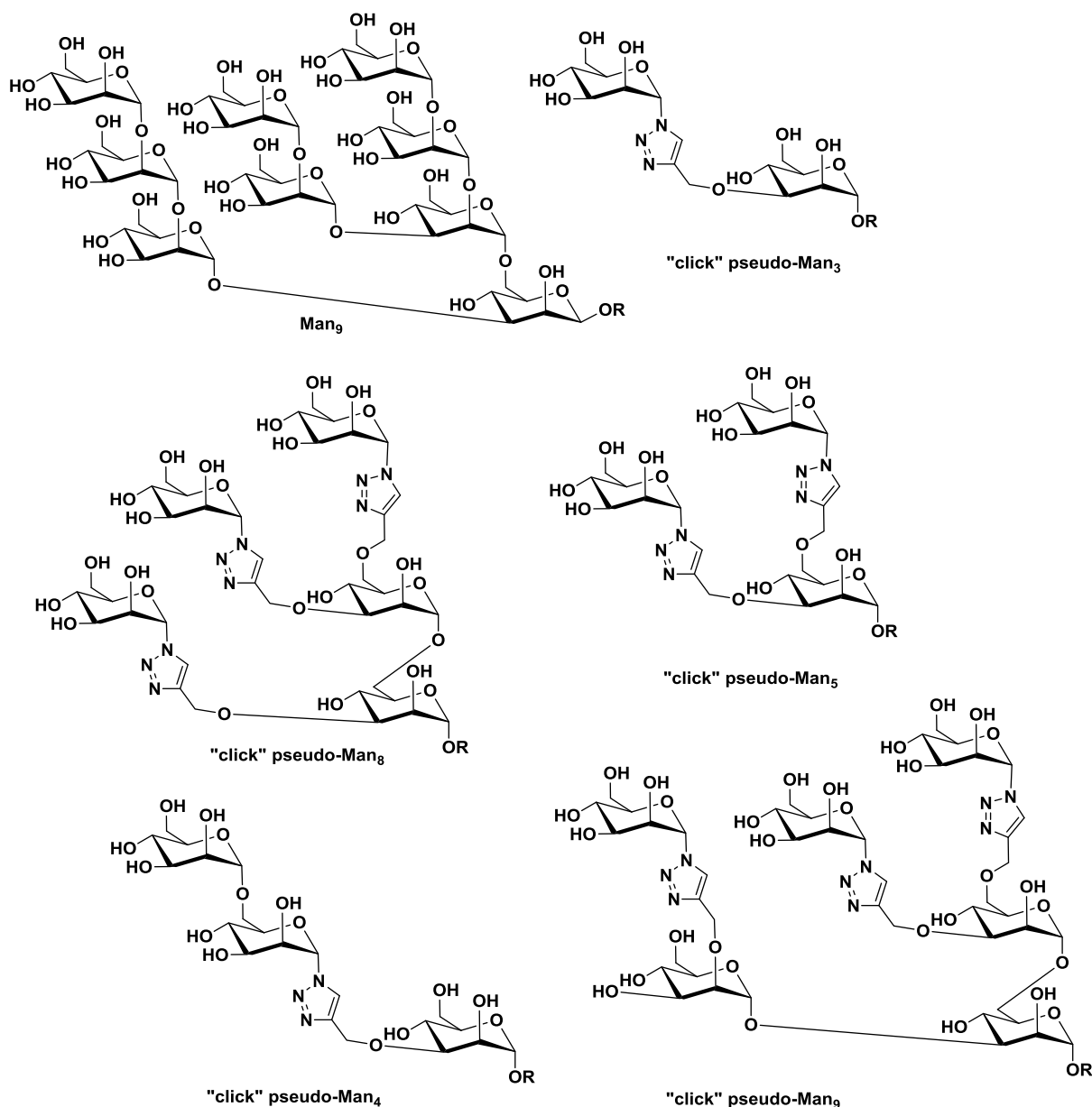


Figure 61 : Structures du Man₉ et des mimes obtenus par réaction click

II Conception de la plateforme

Au sein de notre équipe, nous avons travaillé sur l'utilisation du pentaérythritol comme support permettant la triprésentation des sucres.¹ Le composé glycolipidique **9** (figure 62) comporte trois mannopyranosides ainsi qu'une double chaîne lipidique inspirée des lipides d'Archaea. Il a présenté des résultats intéressants à différents tests d'immunostimulation.⁴⁸ En effet, intégré au sein d'une formulation composée de liposomes cationiques, d'un polymère cationique et d'ARN messager, **9** est capable de cibler les récepteurs de la surface des DCs de la rate.⁴⁹ Ce mélange a été injecté à des souris porteuses de tumeurs lors de tests précliniques. Une absence de croissance tumorale a été observée, et parfois même, une très forte régression. Cette vaccination semble être plus

prometteuse que celle obtenue par immunothérapie cellulaire (injection de DCs stimulées contre la tumeur).⁴⁸ Pour continuer dans cette voie, nous avons décidé de nous inspirer de la structure de cette molécule tout en y ajoutant des modifications permettant une fonctionnalisation plus facile.

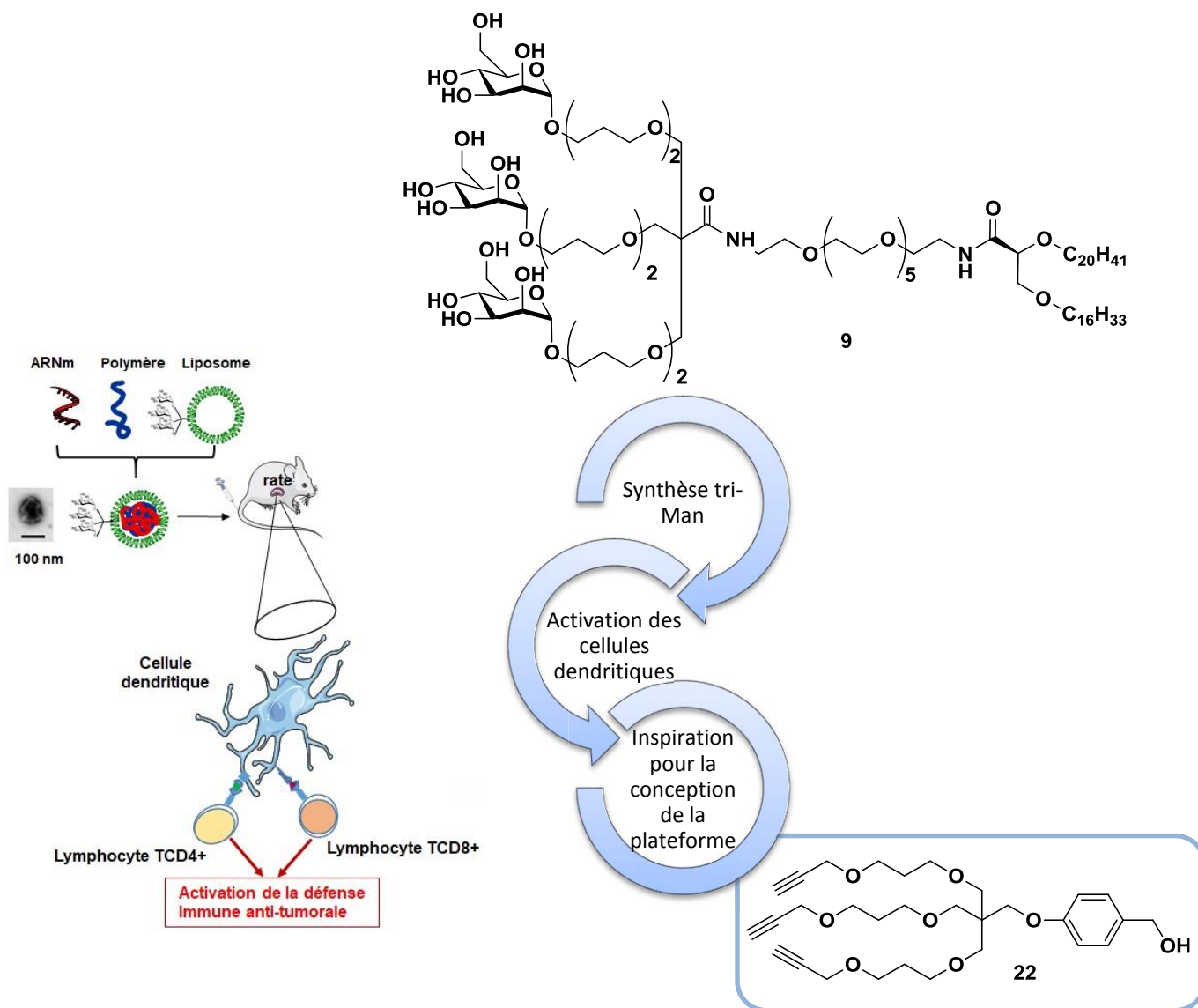


Figure 62 : Structure, formulation et résultats biologiques du composé trimannosylé **9 synthétisé au laboratoire inspirant la structure de la molécule plateforme **22****

Nous nous sommes donc inspirés des composés synthétisés au laboratoire et d'autres composés naturels retrouvés au sein de bactéries pour concevoir la structure de la plateforme. Celle-ci se compose d'un noyau phénolique relié à un motif pentaérythritol. Les trois bras de ce dernier sont allongés afin d'obtenir un écart suffisant entre les trois sucres (cf Introduction générale, IV. Les objectifs de la thèse). Un exemple de l'une des structures à synthétiser est présenté sur le schéma 41.

La cycloaddition 1,3-dipolaire a été choisie pour greffer la partie saccharidique à la plateforme (schéma 41). Cela nous permet de lier différents glycosides, *via* la même stratégie, en passant par des azotures (dont les synthèses sont en partie connues).^{50,51} Le fait de passer par une réaction click évite également une étape de déprotection des sucres une fois greffés sur la plateforme. Elle peut être réalisée avec des sucres libres, ce qui écarte tout problème de compatibilité des conditions de déprotection avec les fonctions de la molécule finale. Les extrémités des bras doivent donc être fonctionnalisées avec des triples liaisons (composé **121**, schéma 41) afin de pouvoir réaliser la cycloaddition lors de la dernière étape de la synthèse. La réaction click doit être l'étape finale pour limiter le risque de synthèse de co-produit dû à l'utilisation des sucres déprotégés.

A la seconde extrémité de la plateforme, le noyau aromatique doit supporter la partie lipidique. En s'inspirant de la structure du composé trimannosylé **9**, nous avons décidé de rattacher le diéther au noyau par une liaison ester (composé **121**, schéma 41). Afin de former cette liaison, le phénol doit donc posséder une seconde fonction alcool, la fonction acide étant supportée sur la partie lipidique (cf chapitre 3, II. Objectifs et stratégie de synthèse). Pour pouvoir différencier les deux fonctions hydroxyles, nous avons décidé de travailler sur une structure phénolique possédant un alcool primaire en *para* (limite l'encombrement stérique). Il était ainsi plus facile de protéger sélectivement la fonction primaire afin de greffer le pentaérythritol sur l'oxygène du phénol par une liaison éther.

Toutes ces différentes conditions : triples liaisons, présentation de trois motifs saccharidiques, utilisation du pentaérythritol, noyau aromatique substitué par un groupement hydroxyméthyle, ont mené à la conception de la structure de la plateforme **22** présentée sur le schéma suivant.

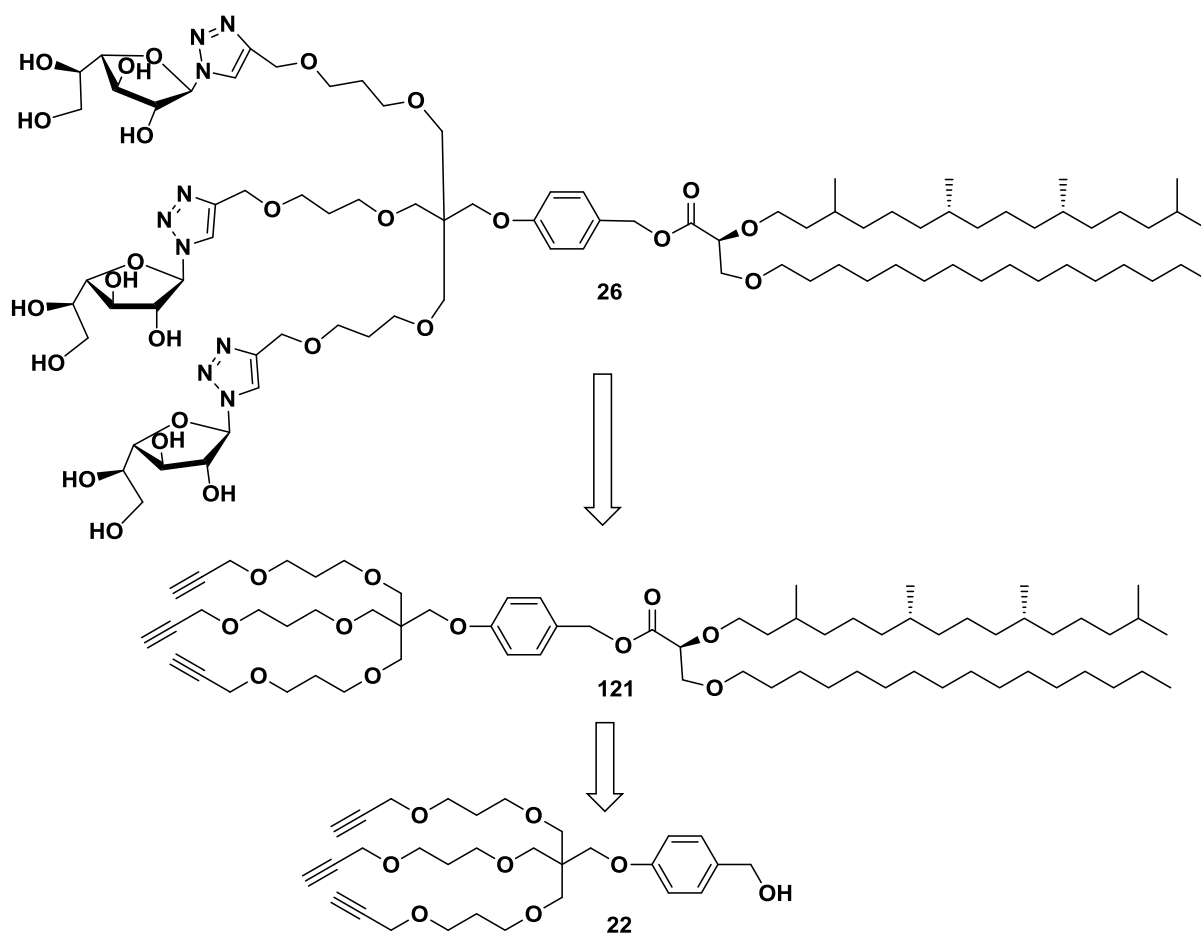


Schéma 41 : Rétrosynthèse des composés cibles

III Première voie de synthèse

La synthèse de la molécule plateforme **22** a été une étape clé dans l'accès à aux glycolipides cibles. Le schéma rétrosynthétique 42 présente la première stratégie de synthèse de la molécule plateforme **22**. Le composé **22** peut être obtenu par hydroxylation des doubles liaisons de **122** suivie d'une réaction de substitution avec un motif propargylique. La molécule **122** peut être synthétisée par substitution du dérivé activé du pentaéthritol **123** par le dérivé phénolique **124** protégé sur sa fonction benzylique.

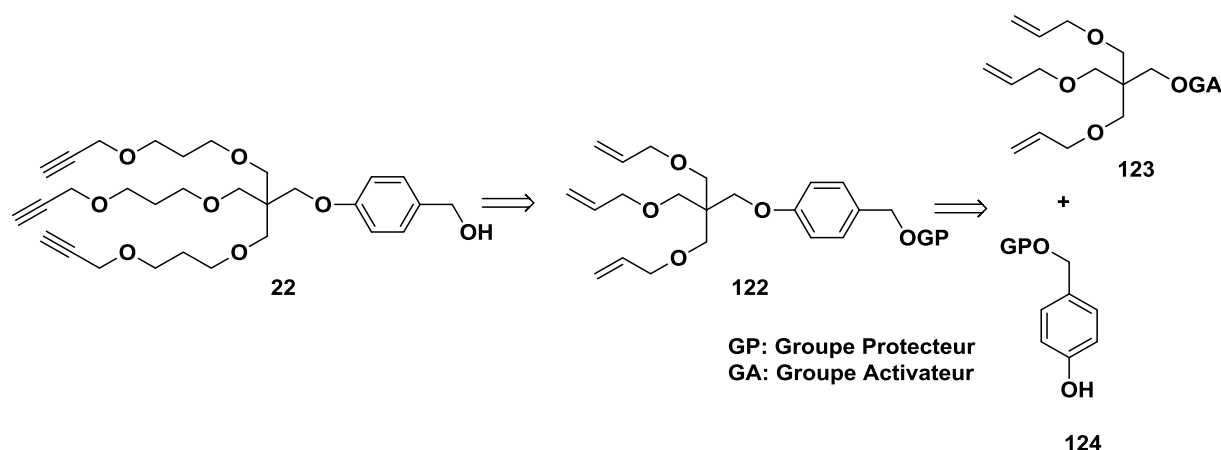


Schéma 42 : Rétrosynthèse de la partie plateforme

1) Partie phénolique

Nous avons fait le choix de protéger l'hydroxyle primaire de l'alcool *p*-hydroxybenzylique sous la forme d'un éther. Comme la déprotection de la fonction alcool doit être la dernière étape de la synthèse de la plateforme, il est nécessaire que les conditions de cette déprotection et les différentes fonctions de la molécule soient compatibles. Puisqu'une hydrogénolyse aurait rompu la liaison entre l'aromatique et le bras espaceur, la protection sous forme d'éther benzylique a été écartée. La protection doit, par ailleurs, résister aux conditions réactionnelles des différentes étapes de la synthèse. Les réactions d'élongation des chaînes du pentaérythritol étant prévues dans des conditions basiques, aucun groupement protecteur sensible en milieu basique ne peut être utilisé, ce qui élimine également l'utilisation des esters. La protection sous forme d'éther de trityle s'est donc imposée. En effet, aucune réaction en milieu acide n'est nécessaire pour la synthèse de la partie plateforme. De plus, les conditions de déprotection en milieu acide peu concentré n'impactent pas le reste de la molécule.

L'alcool *p*-hydroxybenzylique a donc été protégé sélectivement au niveau de sa position primaire sous la forme d'un éther de trityle. Pour cela, **125** a été placé en milieu basique en présence de chlorure de trityle fraîchement purifié par extraction liquide-liquide (NaOH 1 N) (tableau 17, entrée 1). Le suivi de la réaction par CCM a permis d'observer la formation de deux produits de $R_f=0.3$ et 0.1 (CHex:AcOEt 9:1). Après purification sur colonne de gel de silice et caractérisation par RMN et par MS, le produit le moins polaire a été identifié comme le composé **124** souhaité (pic moléculaire de $[M+Na]^+$ de 389.0 et des aromatiques intégrant pour 19 protons). Le composé le plus polaire a été caractérisé par une valeur de $[M+Na]^+$ de 631.8 et des intégrations pour les signaux des protons aromatiques (δ de 7,55 à 6,78 ppm) correspondant à plus de 30 protons : il s'agit du dérivé ditritylé **126**. Afin de minimiser la formation de ce produit doublement protégé, inutile pour la suite de la

synthèse, le temps de la réaction a été limité à deux heures (tableau 17, entrée 2). Cela a permis de limiter sa formation, et le produit cible monoprotégé a été isolé avec un rendement de 80%.

Tableau 17 : Protection de l'alcool primaire de l'alcool p-hydroxybenzylique

	Entrée	Durée (h)	124 (%)	126 (%)
	1	6	31	61
	2	2	80	5

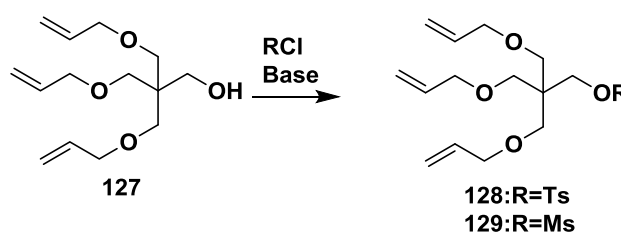
2) Couplage à l'éther triallylique de pentaérythritol

Il était nécessaire d'activer le carbone en alpha de l'hydroxyle de l'éther allylique de pentaérythritol (molécule **127**) avec un groupe partant afin d'obtenir l'éther **122** souhaité par substitution nucléophile. Pour cela, nous avons décidé d'activer l'alcool primaire sous forme d'un tosylate (tableau 18).

Afin de former le tosylate, plusieurs bases plus ou moins fortes ont été testées. La plus faible étant la pyridine avec un pKa de 5,2 et la plus forte, NaH dont le pKa est de 35. L'utilisation de la pyridine n'a pas permis de former le produit souhaité, probablement en raison de sa trop faible basicité. Cependant, même la triéthylamine, avec un pKa de 10,8, et l'hydrure de sodium, n'ont pas permis de synthétiser **123**. Le produit a été observé en MS mais n'a pas été récupéré suite à la purification sur colonne de gel de silice. Seul le carbonate de césium Cs_2CO_3 a conduit à la formation du tosylate avec un rendement supérieur à 50% (tableau 18). Le carbonate de césium possède un cation volumineux (comparé au rubidium, lithium, potassium et au sodium), ce qui permet aux ions d'être dissociés dans des solvants aprotiques polaires comme l'acétonitrile.⁵⁵ Cela facilite la déprotonation de la fonction hydroxyle, l'alcoolate réagissant alors plus efficacement avec le chlorure de tosyl. Le composé cible a été isolé avec un rendement de 55%.

Tableau 18 : Bases testées pour l'activation de la fonction hydroxyle

R	Base	pKa	Rdt (%)
Ts	Et_3N	10,8	-
Ts	NaH	35	-
Ts	Pyridine	5,2	-
Ts	Cs_2CO_3	10,3	55
Ms	Pyridine	5,2	88



La structure de la plateforme repose sur le couplage du dérivé phénolique protégé **124** avec **128** ou **129** (tableau 19). Pour réaliser ce couplage, nous avons testé deux conditions avec des bases pouvant déprotonner un phénol ($pK_a=10$) et des solvants différents. L'utilisation de K_2CO_3 associé à un éther couronne a été décrite dans la littérature.⁵⁶ Les auteurs décrivent le couplage entre un dérivé tosylé et un phénol. Dans notre cas cependant, après plusieurs essais, cette voie de synthèse s'est révélée infructueuse entre **128** et **124**. Nous avons donc décidé de changer la nature du solvant afin d'améliorer la disponibilité de la base dans le milieu (meilleure séparation des contre-ions) et avons opté pour le DMF. La base a également été modifiée au profit de la soude, afin d'avoir une espèce plus basique que le carbonate de potassium (tableau 19), mais cette modification n'a pas été fructueuse. Bien que l'analyse par spectrométrie de masse ait montré un pic de $m/z=627,2$ pouvant correspondre au produit d'intérêt, aucun nouveau produit n'a pu être observé après une purification sur colonne de gel de silice. L'utilisation du composé **129** mésylé n'a pas non plus permis d'isoler le composé **122** souhaité.

233

Ces tentatives n'ayant pas permis de préparer le composé cible, nous avons supposé qu'une fois encore l'encombrement de la partie pentaérythritol est trop important pour permettre l'obtention de la molécule **122**. Il a donc été décidé de réduire cet encombrement par l'utilisation d'un orthoester.

IV Deuxième voie de synthèse

Pour réduire l'encombrement au niveau du pentaérythritol, les trois bras hydroxyméthyles peuvent être maintenus ensemble, à l'opposé du centre électrophile, comme on peut le voir sur le schéma 43. Une protection sous la forme d'un orthoester remplit toutes les conditions. De plus, les orthoesters sont facilement retirés en milieu acide faible. Bien que l'éther de trityle soit également sensible aux milieux acides, les orthoesters le sont davantage. Ainsi, une déprotection en milieu acide faible, suffisamment dilué, devrait permettre de libérer les trois fonctions hydroxyle du pentaérythritol tout en conservant la protection sur l'alcool primaire du dérivé phénolique. Le composé **132** peut être issu du couplage entre le composé phénolique **124** protégé en position primaire et l'orthoester du pentaérythritol activé **133**. Selon le schéma 43, alkylation et élongation sont réalisées après connexion du résidu pentaérythritol au phénol **124**.

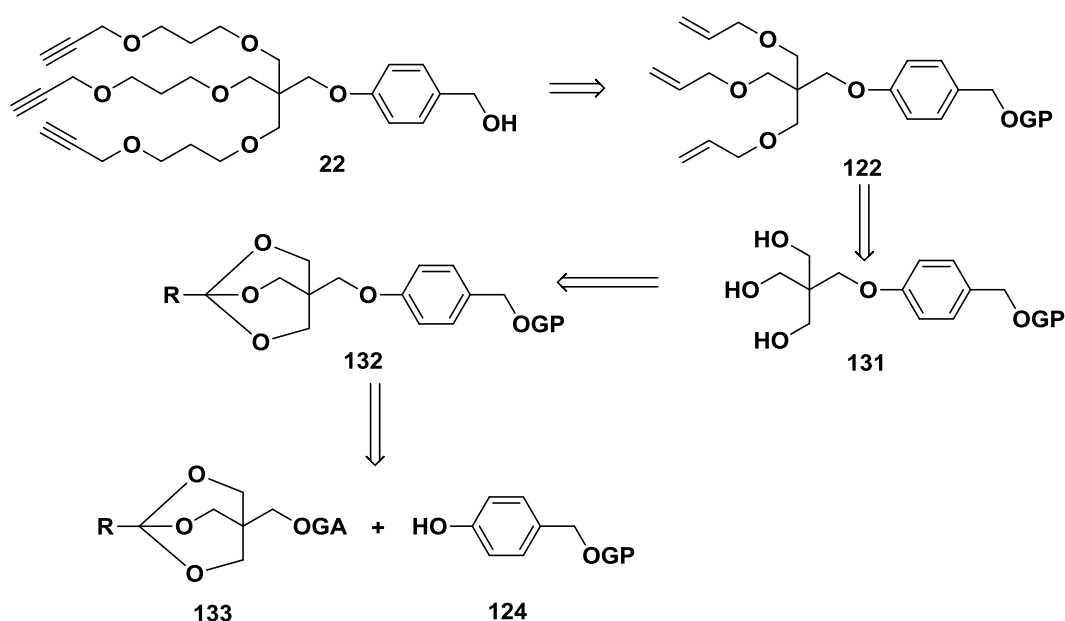


Schéma 43 : Schéma rétrosynthétique de la seconde voie d'accès à la plateforme

1) Couplage au pentaérythritol

La première étape de la synthèse de la plateforme a consisté à protéger trois des quatre fonctions hydroxyle du pentaérythritol, sous la forme d'un orthoester pour minimiser l'encombrement

stérique (schéma 44). Cette étape a largement été décrite dans la littérature.⁵⁷ Il s'agit de mettre le pentaérythritol en présence d'un acide et de l'orthoacétate de triéthyle. Nous avons suivi le protocole de Grubbs et *coll.*⁵⁸ qui ont utilisé l'acide *p*-toluène sulfonique comme catalyseur dans le toluène. Cependant, contrairement à ce qui était décrit, le temps de réaction a été très long pour cette première étape (plus d'une semaine à reflux comparé aux 48 heures annoncées par Grubbs et *coll.*). De plus, l'orthoester étant sensible aux conditions acides, il n'a pas été possible de purifier le composé **134** sur colonne de gel de silice (schéma 44). Après filtration à chaud du mélange pour retirer l'excédent de pentaérythritol, l'orthoester **134** a été obtenu par précipitation. Cependant, l'obtention d'une pâte orangée a été plus souvent observée que celle de cristaux blancs (attendus) lorsque le toluène a été utilisé comme solvant de cristallisation (selon le protocole de Grubbs). Cet aspect est dû à la présence d'orthoacétate de triéthyle dans le milieu. Or, ce dernier est soluble dans le cyclohexane contrairement au composé **134**. La pâte obtenue après filtration a donc été reprise au cyclohexane afin d'obtenir une poudre blanche. Le spectre RMN de ce produit présente les caractéristiques de la structure cible en tout point comparable avec celles de la littérature.⁵⁷

Pour minimiser le temps de réaction et maximiser le rendement, nous avons mené cette étape à plus grande échelle (5 à 10 g) en mettant l'orthoacétate de triéthyle en défaut. Après une semaine, le composé **134** a été isolé avec un rendement de 95%.

Plusieurs tentatives d'optimisation de la durée de la réaction ont été entreprises *via* l'utilisation de micro-ondes en faisant varier la puissance des ondes ou encore la température du milieu. Cependant, ces essais se sont révélés infructueux.

Une fois le composé **134** obtenu, le groupement hydroxyle libre a été activé sous forme d'un tosylate. La réaction a été réalisée dans le toluène anhydre en présence d'une base et de chlorure de tosyloxy (schéma 44). Cette fois-ci, l'hydrure de sodium a permis d'obtenir le produit cible **133** avec de meilleurs rendements (de l'ordre de 50%). Comme observé précédemment avec le composé **135**, le groupe orthoester a rendu la purification sur colonne de gel de silice délicate. Malgré l'ajout de triéthylamine dans l'éluant, nous n'avons récupéré que très peu de produit cible. Cependant, après avoir laissé le mélange réactionnel au réfrigérateur pendant une nuit, l'apparition de cristaux a pu être observée. Des paillettes blanches ont ainsi été obtenues et analysées par RMN. La présence du groupement tosyloxy a été confirmée par le déblindage du pic du CH_2OR passant de 3,45 ppm pour R=H (molécule **134**) à 3,78 ppm pour R=Ts (molécule **133**), ainsi que par la présence de protons aromatiques et d'un signal intégrant pour trois protons (2,47 ppm en RMN ^1H et 21,9 en RMN ^{13}C). Les deux signaux restants, un singulet intégrant pour 6 protons à 3,91 ppm et un singulet à 1,43 ppm, correspondent aux trois groupements CH_2O de la partie symétrique de la molécule, ainsi qu'au

groupement méthyle. Ces informations ont confirmé que les cristaux isolés correspondent au composé **133** souhaité, isolé avec un rendement de 89%. Le composé **133** activé est ainsi obtenu avec un rendement global sur les deux étapes de 85%.

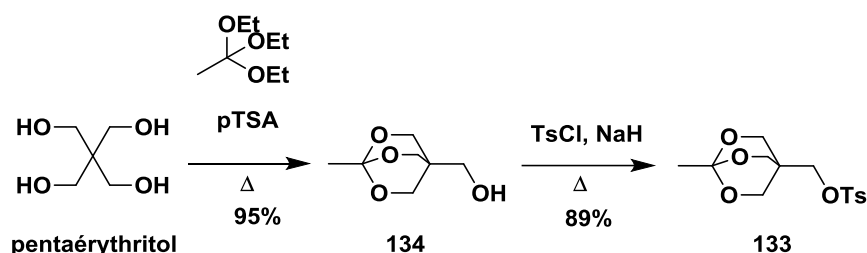


Schéma 44 : Synthèse de l'espèce nucléofuge

Une fois le composé tosylé obtenu, la réaction de substitution nucléophile a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, dans du DMF à reflux en présence d'une base (schéma 45).

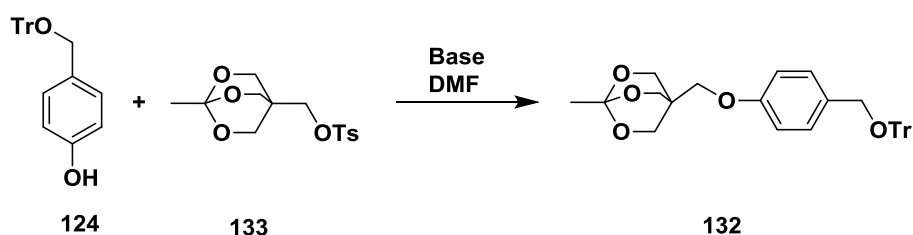


Schéma 45 : Synthèse de **132**

Plusieurs bases, répertoriées dans le tableau 20, ont été testées se différenciant par leur pKa, leur caractère plus ou moins nucléophile, la nature de leur contre-ion ou encore leur caractère organique ou minéral.

Comme on peut le voir dans le tableau 20, aucune base dont le pKa est trop proche de celui du phénol n'a permis d'obtenir le produit souhaité. Les bases ayant permis d'isoler le produit avec un rendement supérieur à 10% sont les hydrures ainsi que la soude et la potasse. Nous avons choisi NaH et KOH pour optimiser cette synthèse. Plusieurs paramètres ont été considérés, l'ordre d'ajout des réactifs, la température du milieu, la quantité de chaque réactif, et le temps de réaction. Dans les conditions optimales, 1,8 éq de dérivé phénolique réagissent avec 4,5 éq de KOH en poudre dans du DMF anhydre et sous atmosphère d'argon. Après 10 min d'agitation, le tosylate a été ajouté au mélange, et le milieu a été alors chauffé à 80 °C pendant 2 heures. Il s'est avéré que l'aspect physique de la base a joué un rôle important dans la réaction. En effet, l'utilisation de KOH sous la forme de paillettes n'a pas permis de dépasser 16% de rendement contrairement aux 87% obtenus

avec de la potasse en poudre. Le fait de travailler avec une poudre permet d'augmenter la surface totale de contact entre le réactif et la base insoluble dans le DMF. Cela entraîne donc la production plus importante et plus rapide de l'ion phénolate qui peut ensuite réagir sur l'électrophile.

Tableau 20 : Bases testées pour la réaction de couplage entre le dérivé phénolique 124 et le tosylate 133

Base	pKa	Rendement du couplage (%)
NaH	35	10-32
KH	35	5
DIPEA	10,7	-
DBU	11,5	8
LDA	35,7	-
NaOH	15,7	11
KOH en paillette	15,7	16
KOH en poudre	15,7	87
NaHCO ₃	10,3	-
K ₂ CO ₃	10,3	-

La purification du mélange réactionnel sur colonne de gel de silice a conduit à un sous-produit ne présentant pas la même symétrie que celle attendue pour le composé **132**. Ainsi, aucun signal intégrant pour 6 H n'a pu être identifié par RMN ¹H. Par comparaison avec les composés **133** et **134**, nous en avons déduit que les signaux à $\delta=4,09$ ppm et à 3,97 ppm correspondent respectivement à CH₂OTr et CH₂OPh. Le signal à 4,14 ppm, visible sur le spectre de **134**, a laissé place à un singulet à 4,31 ppm intégrant pour 2H et à un doublet de doublet de doublet (ddd) à 3,78 ppm pour 4H, ce qui signifie que deux des CH₂O sont identiques mais que le troisième porte une fonction différente. La présence d'un singulet intégrant pour 3H à 2,10 ppm est caractéristique de la présence d'un acétyle. Ainsi, deux des fonctions hydroxyles ont été déprotégées lors de la purification sur gel de silice, la troisième étant engagée dans une liaison ester. Cette hypothèse a pu être vérifiée par RMN du carbone par la présence d'un signal dans la zone des carbonyles (172,2 ppm) et par MS ([M+Na]⁺=549,1) qui correspond à la masse molaire du composé **135** sur la figure 63. Un pourcentage variant de 5 à 10% de **135** a été obtenu après la purification sur colonne de gel de silice.

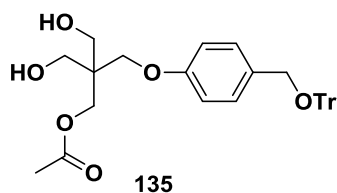


Figure 63 : Structure du produit **135** issu de la dégradation de **132** lors de la purification sur colonne de gel de silice

2) Déprotection des hydroxyles

Une fois le composé **132** obtenu, l'étape suivante a consisté à déprotéger les trois fonctions hydroxyle du pentaérythritol afin de pouvoir allonger les différentes chaînes.

Les orthoesters étant plus sensibles que les éthers trityliques aux conditions acides, le composé **132** a été placé en présence d'acide acétique ($7 \cdot 10^{-2}$ M) et d'un large excès d'eau. Cependant, le composé **131** n'a pas été obtenu mais, comme pour la déprotection sur colonne de gel de silice lors de l'étape de synthèse précédente, l'ester **135** a été obtenu (schéma 46). Une seconde étape de déprotection a alors été nécessaire pour libérer le dernier hydroxyle protégé. Pour cela, le composé **135** a été placé dans les conditions de Zemplén. Ces deux étapes ont permis la synthèse du produit **131** avec un rendement global de 54% sur les deux étapes.

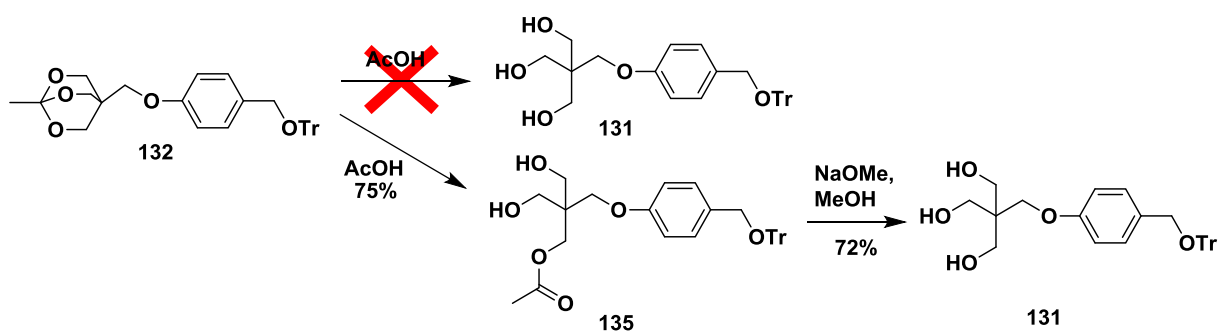


Schéma 46 : Déprotection des trois hydroxyles de **132**

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont confirmé l'obtention d'un produit symétrique au vu du nombre très restreint de signaux. Ceux à 4,31 ppm et 3,78 ppm n'apparaissent plus sur le spectre, les 6 protons des trois CH_2 sont intégrés sous un singulet à 3,85 ppm. De plus, aucun signal relatif à un acétyle n'est visible sur les spectres, attestant de la synthèse du composé **131** souhaité. Ces données ont été confirmées par l'obtention d'une masse $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de 507,1 en MS.

3) Elongation du bras

Avec le composé trihydroxylé **131** à disposition, alkylation et élongation des chaînes ont été réalisées. Pour rappel, la longueur de la chaîne a été choisie pour avoir des distances et des mobilités optimales entre les trois motifs saccharidiques.

Le triol **136** a été obtenu après une triple réaction de *O*-alkylation du composé **131** par du bromure d'allyle (en très large excès) en présence d'hydruure de potassium. Le composé **122** a été isolé avec un rendement de 75%, les 25% restant correspondant aux composés mono- et disubstitués. En effet, les spectres de masse confirment l'obtention de trois produits, de $m/z=546,9$, $587,1$ et $627,2$. Une différence de masse de 40 entre chacun de ces trois pics est calculée, ce qui correspond à la masse molaire d'un groupement $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$. Les fractions comprenant ces sous-produits de mono- et di-*O*-allylation ont pu être remises en réaction afin d'obtenir le composé **122** trialkylé (schéma 47). **122** a été analysé par RMN afin de confirmer la structure de la molécule. Trois nouveaux signaux sont observables, un à 5,88 ppm et un à 5,26 ppm intégrant chacun respectivement pour 3 et 6 protons qui correspondent aux trois fonctions éthyléniques, et le dernier signal à 3,97 ppm pour les trois CH_2O .

Le composé **122** a été transformé en triol **136** par hydroboration par action du 9-BBN (9-borobicyclo[3.3.1]nonane) suivie d'une oxydation en présence d'eau oxygénée et de soude (schéma 47) avec un rendement global de 62% sur les deux étapes.

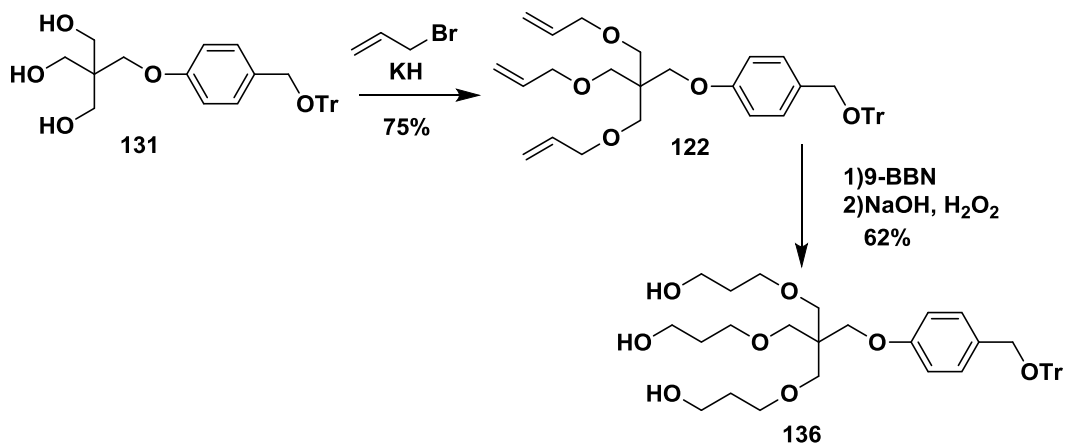


Schéma 47 : Schéma réactionnel de l'élongation des chaînes du bras de la plateforme

La transformation du composé **122** triallylé en dérivé trihydroxylé **136** a été confirmée par RMN puisque les signaux spécifiques du groupement allylique ont été remplacés par deux triplets et un quintuplet. Les deux triplets correspondent aux deux CH_2O et le quintuplet au CH_2 central de la chaîne propyle.

Le composé **136** obtenu a pu alors être utilisé dans une seconde réaction de substitution, cette fois-ci avec du bromure de propargyle, dans les mêmes conditions que lors de la première élongation. Le composé **137** est obtenu avec un rendement de 89% sur cette dernière étape (schéma 48) et un rendement global de 13% sur les 9 étapes de synthèse. L'élongation de la chaîne a été confirmée par analyse RMN. En RMN ^1H , on peut voir un singulet à 4,08 ppm intégrant pour 6 protons et un triplet à 2,23 ppm, correspondant aux trois protons des alcynes vrais. En RMN ^{13}C , les pics à 80,1 et 74,3 ppm ont confirmé la présence des trois triples liaisons du composé **137**.

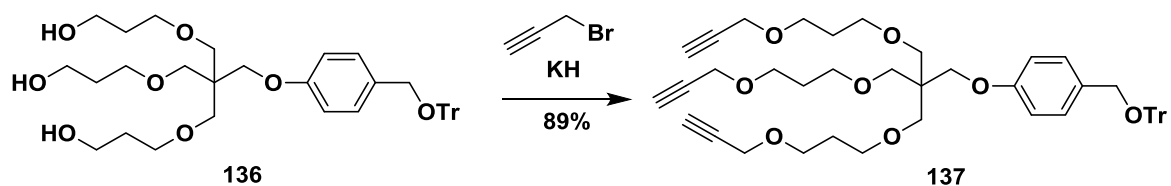


Schéma 48 : Synthèse du composé **137**

La dernière étape de la synthèse de la plateforme a consisté en une déprotection de l'hydroxyle en *para* de la partie phénol. Nous avons décidé d'utiliser, comme dans la synthèse des sucres, le TFA comme source de proton (schéma 49). L'analyse par spectrométrie de masse du brut de réaction a mis en évidence la synthèse d'une espèce de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de 649 qui pouvait correspondre à l'ester triflique du composé **22**. Cet ester, très instable a été hydrolysé au cours de la purification sur colonne de gel de silice, ce qui a conduit au composé **22** souhaité avec un rendement de 78%. Le produit a été facilement identifié par RMN ^1H avec la présence d'un singulet à 4,60 ppm intégrant pour 2 protons (initialement à 4,09 ppm dans le composé **137** protégé).

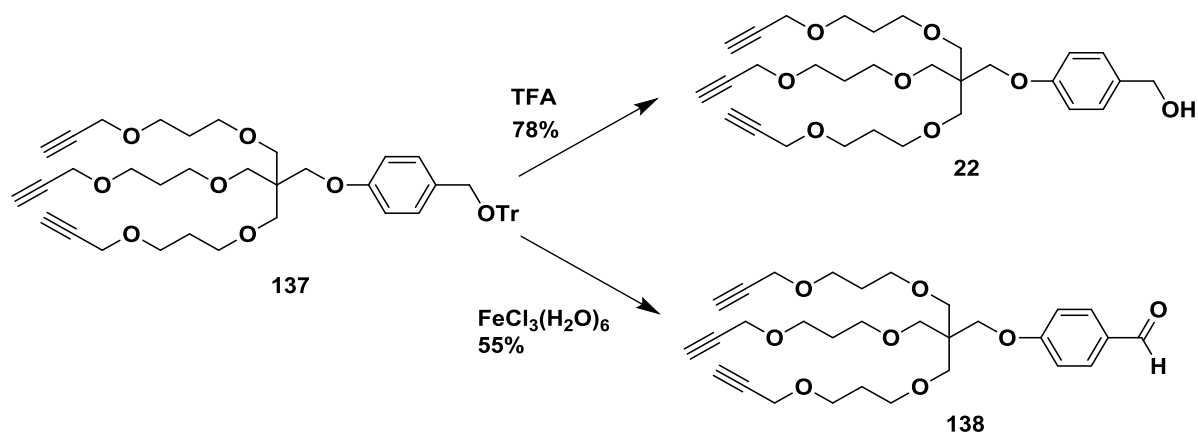


Schéma 49 : Déprotection de l'hydroxyle tritylé

Des tests ont été réalisés avec le chlorure de fer(III) hexahydraté ($\text{FeCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$), de la même manière que lors de la déprotection de l'hydroxyle de la partie lipidique. Cependant, à la place de l'alcool **22**, le produit synthétisé est l'aldéhyde **138**, identifiable par une analyse HRMS de 551.2614 et un pic en

RMN du proton à 9,88 ppm (comparé à 4,60 ppm pour CH₂OH). En présence de fer(III), en plus de la déprotection de l'hydroxyle, a eu lieu une oxydation du carbone en alpha du cycle aromatique avec un rendement de 55% (schéma 49).

V Couplages des trois différentes parties

Dans cette dernière partie, nous allons présenter les deux couplages finaux, le premier forme un ester reliant la partie plateforme à la partie lipidique, le second greffe les sucres à la molécule par cyclo-addition [3+2]. La réaction click permet d'utiliser des sucres déprotégés, c'est la raison pour laquelle elle a été envisagée pour la fin de la synthèse. En effet, la déprotection des glycosides impliquerait des conditions basiques qui risqueraient de rompre la liaison entre le phénol et le reste de la plateforme. De plus, si les sucres déprotégés avaient été introduits avant la partie lipidique, il aurait fallu purifier des composés supportant trois sucres déprotégés, ce qui n'est pas aisé. Les saccharides devaient donc être les derniers à être insérés sur la molécule.

Vous pouvez retrouver l'ensemble des molécules utilisées lors de ces couplages à la page 287 de ce manuscrit.

1) Couplage de la partie lipidique sur la plateforme

Pour réaliser le couplage de la partie lipidique sur la plateforme, deux voies ont été envisagées. La première présentée sur le schéma 50 repose sur une réaction d'estérification en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) ; la seconde passe par la formation d'un chlorure d'acyle afin d'augmenter la réactivité du carbonyle de **23**.

L'utilisation du couple DCC/DMAP a permis d'obtenir le composé **121** souhaité mais avec des rendements très variables de 16 à 53%. Après purification sur colonne de gel de silice, le produit **121** a été caractérisé par RMN. Un déblindage très important a été observé pour le signal des deux protons en α du phényle, passant de 4,60 ppm pour l'alcool **22** à 5,13 ppm pour l'ester **121**. Les résultats de l'analyse HRMS ont donné une masse $[M+Na]^+$ de 1145.8568 correspondant à la masse molaire du composé **121** souhaité.

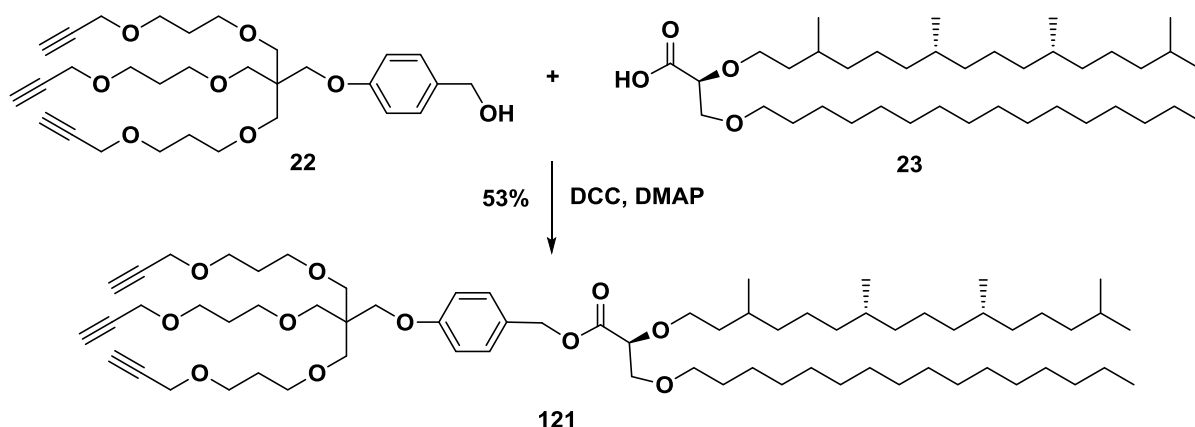


Schéma 50 : Couplage de la plateforme à la partie lipidique

La seconde voie de synthèse envisagée passe par un intermédiaire de type chlorure d'acyle (schéma 51). Pour cela, l'acide a été dissous dans du toluène anhydre et mis en réaction avec un excès de chlorure de thionyle (SOCl_2) pendant 8 heures (dont 6 à 70 °C). Le toluène a ensuite été évaporé et SOCl_2 co-évaporé trois fois à l'aide de toluène. A 0 °C, une solution de l'alcool **22** dans du dichlorométhane anhydre a été ajoutée au brut de la première étape de la réaction, suivi d'un léger excès de triéthylamine. A la suite d'une purification sur colonne de gel de silice, le composé **121** a été isolé avec un rendement de 10%, inférieur à celui obtenu avec le couple DCC/DMAP. Cette voie de synthèse étant plus compliquée à mettre en œuvre, elle n'a pas été optimisée et nous avons préféré suivre la première approche.

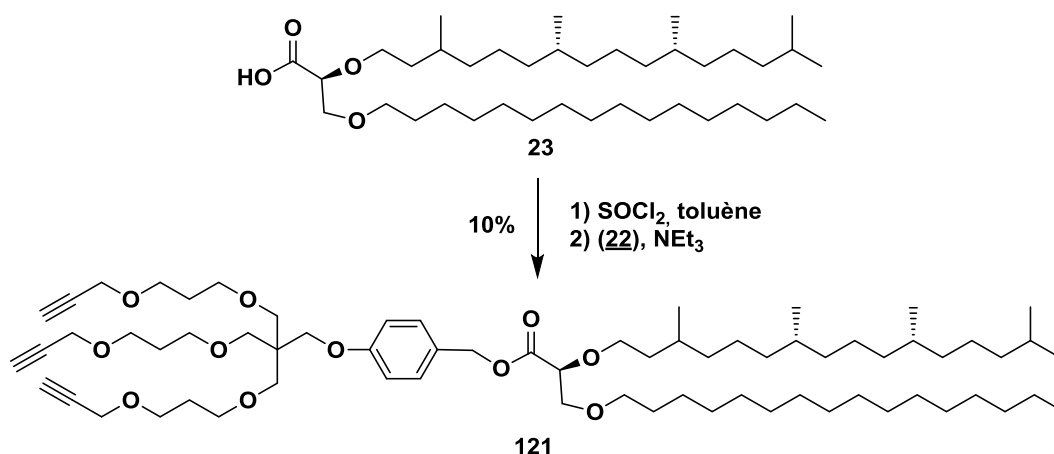


Schéma 51 : Couplage de la plateforme à la partie lipidique par utilisation du SOCl_2

2) Couplage des glycosides sur la plateforme

Le produit **121** ayant été obtenu avec succès, la dernière étape de la synthèse a consisté à lier la structure plateforme/lipide à trois motifs sucres identiques. Comme il n'a pas été possible

d'optimiser la synthèse des disaccharides azoturés, seuls les monomères ont été utilisés pour la réaction click. Deux galactofuranosides, l'un fluoré en position 6 (**16**) et l'autre pas (**15**), ainsi que le mannopyranoside **24** possédant un bras en position anomère, ont été mis en réaction avec le triyne **121**. La réaction click a été réalisée dans un milieu constitué d'eau, de *t*-butanol et de DCM. Les azotures et les saccharides ont été préalablement dissous dans ce mélange biphasique, puis le sel de cuivre (Cu(OAc)₂) ainsi que l'ascorbate de sodium ont été ajoutés. Après deux heures de réaction, le mélange a été filtré et le résidu obtenu après évaporation des solvants est purifié sur colonne de gel de silice (DCM :MeOH gradient de 100:0 à 50:50).

Une quatrième réaction a été lancée en suivant la méthode de Fairbanks⁵⁹ selon laquelle le mannose est azoturé en position 1 puis clické sur la plateforme, le tout en one-pot. Cependant, le composé cible n'a pas pu être obtenu. Etant donné que la réaction a lieu en one-pot, sans vérification de l'obtention de l'intermédiaire, nous ne pouvons pas savoir si c'est la formation de l'azoture ou la formation des triazoles qui a été problématique.

Néanmoins, la réaction click entre le mannopyranoside **24** et la partie plateforme a permis de synthétiser les composés **139** et **140** avec des rendements respectifs de 53 et 37% (schéma 52). Malgré la présence de deux chaînes lipidiques, la purification de ces produits s'est montrée délicate. En effet, il a fallu augmenter de manière drastique la proportion de méthanol, jusqu'à 50% de l'éluant, afin d'éluer le composé cible très polaire, sur la colonne de gel de silice.

Le composé **139** a été obtenu mais la masse [M+Na]⁺ de **139** n'est pas conforme à celle attendue. La différence de masse correspond à un motif sucre-triazole en moins (structure proposée sur la schéma 52). Un signal à 7,82 ppm, intégrant pour deux protons, est visible sur le spectre RMN ¹H de ce composé. Hors ce pic, absent des spectres des réactifs, est spécifique des triazoles,⁶⁰ ce qui confirme la présence de deux triazoles au lieu des trois attendus. De plus, seuls deux protons anomères sont observés, confirmant la présence de deux motifs saccharidiques sur les trois souhaités. Cependant, le signal à 2,39 ppm, caractéristique des alcynes vrais, n'est plus visible. D'après le résultat de l'analyse HRMS, toute la partie propargylique n'est pas présente sur la molécule.

Suite à la purification sur colonne de gel de silice, un second produit **140** a été isolé et caractérisé par une valeur de *m/z* de 1893.1469 par HRMS, conformément à ce qui était attendu pour une triprésentation de saccharides (schéma 52). La formation des triazoles a pu être prouvée facilement par la présence d'un singulet à 7,77 ppm en RMN ¹H intégrant pour 3 protons, ainsi que par la disparition du signal des alcynes vrais à 2,39 ppm présent sur le spectre de la partie plateforme **121**. Toutes les caractéristiques des trois motifs mannopyranosides sont présentes, les protons des sucres

ainsi que la chaîne courte O-CH₂-CH₂-N. Les chaînes lipidiques sont également facilement repérables avec les multiplets blindés entre 1,54 et 0,80 ppm. Enfin, la présence de la plateforme est confirmée par les signaux des protons aromatiques entre 7,28 et 6,84 ppm, par les différents signaux déblindés des protons en alpha d'atomes d'oxygène (triplet à 3,55 ppm et massif entre 3,50 et 3,40 ppm) ainsi que par le quintuplet à 1,81 ppm. Ce composé a été obtenu avec un rendement modéré de 37%, qui s'explique en partie par la formation du co-produit **139** (schéma 52). L'excès de motif saccharidique a pu être récupéré sans aucune dégradation ainsi que le composé **121** qui n'a pas réagi.

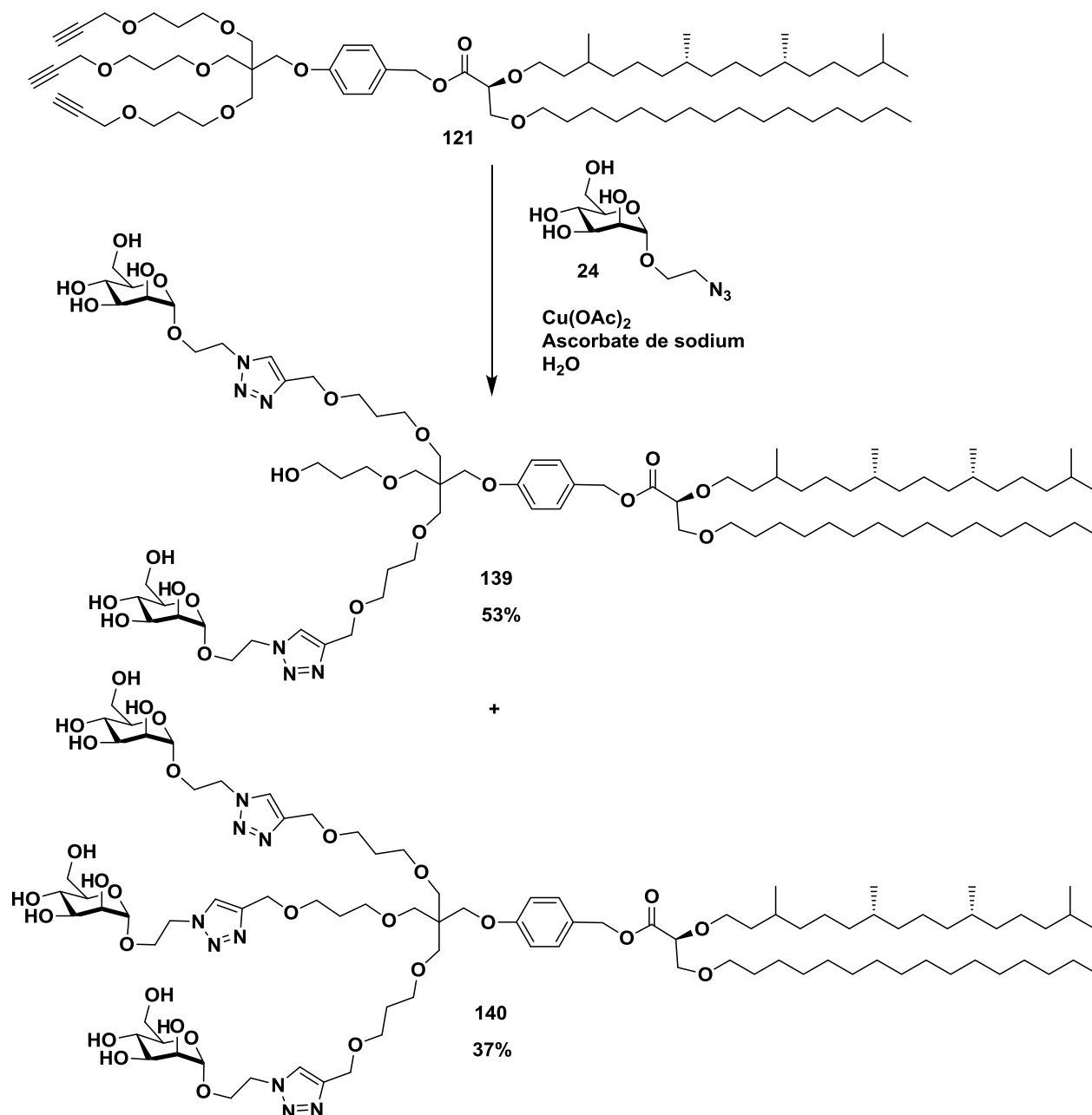


Schéma 52 : Réaction click entre **121** et **24**

Suite à la validation de la réaction click avec le dérivé mannopyranosidique, nous avons effectué, en suivant le même protocole, la cycloaddition à partir des dérivés galactofuranosidiques **15** et **16**.

Avec le composé non fluoré **15**, nous avons pu obtenir 8,3 mg de produit **26** (figure 64) ce qui représente un rendement de 13%. Les réactifs de départ ont cependant pu être recyclés. Cette différence de réactivité peut s'expliquer par la présence de l'azoture directement sur le cycle saccharidique contrairement au composé **24** qui présente la fonction azoture à l'extrémité d'un bras. De la même manière que pour les composés **139** et **140**, nous avons pu confirmer l'obtention du composé **26** par MS avec un $[M+Na]^+$ de 1760,7 ainsi que par l'exploitation de spectres RMN. Ainsi, le singulet du triazole à 8,00 ppm intègre pour 3 protons. Le cycle aromatique est également facilement repérable avec les deux multiplets entre 7,30 et 6,80 ppm. Le spectre COSY a permis ainsi de facilement identifier chaque pic du sucre. Les autres déplacements chimiques de la plateforme lipidique possèdent des déplacements similaires à ceux obtenus pour le composé **121**.

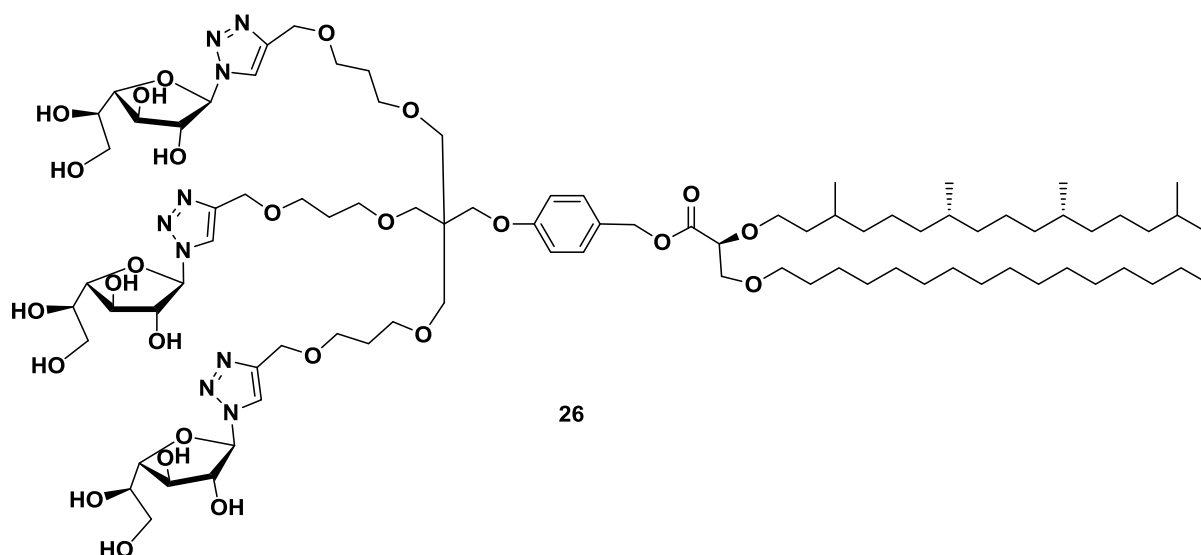


Figure 64 : Composé **26** issu de la réaction click entre **15** et **121**

La même réaction click, dans les mêmes conditions de temps, de température, et à partir des mêmes réactifs a été menée avec le dérivé galactofuranosidique **16**, fluoré en position 6. Cependant, la réaction n'a pas été concluante et la formation d'aucun composé fluoré n'a pu être observée. Le saccharide **16** a été isolé après purification du milieu réactionnel. L'absence de réaction pourrait être due à la présence du fluor, susceptible de diminuer la réactivité de l'azoture.

Un second essai a été mené, cette fois-ci en laissant la réaction 24 heures à 50 °C. Après purification, le composé **141** tri-antenné (figure 65) a été isolé avec un rendement de 16%. Comme lors de la synthèse du produit mannosylé **140**, 6% de co-produit di-substitué **142** (figure 65) a été isolé,

identifié par MS avec une masse $[M+Na]^+$ de 1521. De plus, l'intégration du signal caractéristique des triazoles en RMN 1H , d'une valeur de 3 protons à 8,01 ppm dans le cas de **141** et d'une valeur de 2 à 7,98 ppm pour **142**, certifie le nombre d'hétérocycle par molécule.

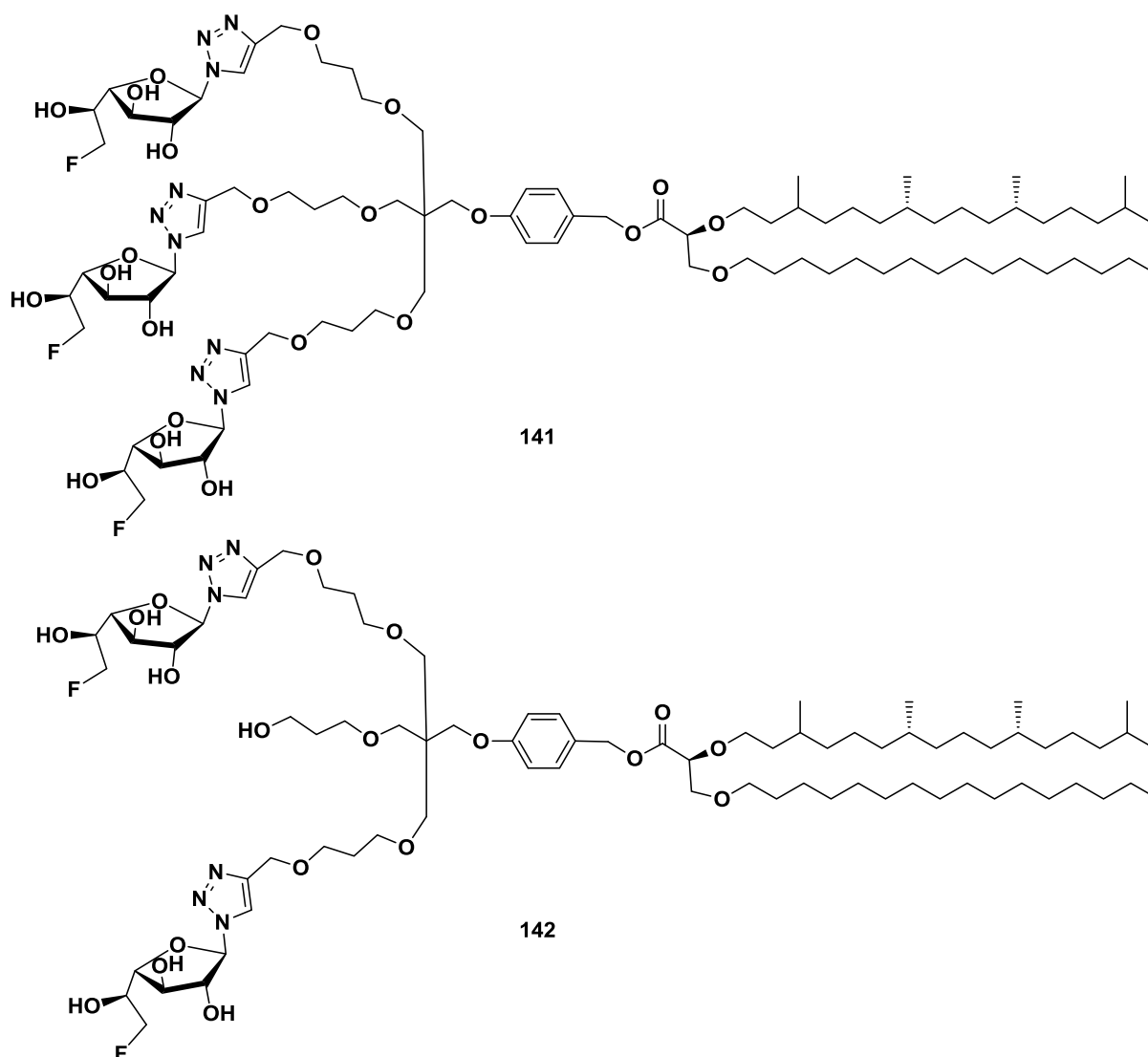


Figure 65 : Composés **141** et **142** issus de la réaction click entre le Galf fluoré **16** et **121**

VI Conclusion

Après une optimisation de la voie de synthèse, la molécule plateforme **22** a été obtenue avec succès après 9 étapes de synthèse et avec un rendement global de 13%. Les problèmes de réactivité dus à l'encombrement des molécules ont pu être surmontés grâce à l'utilisation d'une protection du pentaérythritol sous la forme d'un orthoacétal. Les conditions de couplage de la partie phénolique à l'espaceur ont également demandé un travail d'optimisation qui a permis de passer d'un rendement

de 10 à 87% grâce, notamment à un changement de solvant et à l'utilisation d'une base minérale sous forme de poudre.

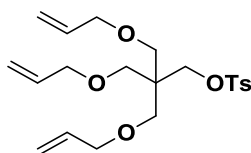
Suite à l'obtention de **22**, le couplage avec l'acide lipidique **23** a été mené afin d'obtenir le composé **121**. Bien que le composé cible ait été isolé en quantité suffisante pour la suite de la synthèse, une optimisation de la réaction d'estérification reste nécessaire afin d'améliorer le rendement de cette réaction (53%).

Trois réactions click ont été conduites avec succès et ont mené à la synthèse de trois composés cibles **140**, **26** et **141**. Deux autres produits issus d'une double cycloaddition ont pu être isolés, dont un en quantité non négligeable (53%) qui sera également testé pour ses propriétés immunoadjuvantes. L'origine de ces co-produits reste à déterminer. La molécule plateforme **121** semble être stable, ce qui signifie que l'hydrolyse du groupement propargylique aurait lieu dans les conditions de la réaction click. Des études de l'évolution de **121** dans l'eau et en présence de cuivre sont donc à prévoir afin de limiter la synthèse de ce type de composé.

Etonnamment, les rendements de la réaction click n'ont pas été aussi élevés que ceux que nous attendions. Cependant, nous pouvons constater que la réactivité du dérivé mannopyranodidique semble être supérieure à celles des trois composés présentant une fonction azoture directement liée au centre anomère. Cela peut s'expliquer par la présence d'un bras en C-1 du mannopyranose permettant une meilleure présentation de l'azoture que lorsqu'il est directement relié au carbone anomère. La présence de l'atome de fluor semble également être un frein à la dernière étape de cette synthèse puisqu'il a été nécessaire de chauffer le milieu pour obtenir le composé **141**.

Experimental section

Triallyl-tosyloxy-pentaerythritol (128) ⁶¹



To a solution of pentaerythritol (1 g, 3.9 mmol) in dry acetonitrile (30 mL) were added tosyl chloride (1.5 g, 7.8 mmol) and cesium carbonate (25 mg, 0.076 mmol). The mixture was stirred at 100 °C for 24 h. The mixture was washed with saturated NaHCO₃ (2 x 10 mL), brine (3 x 10 mL), and dried over MgSO₄. Solvents were removed under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt 100:0 up to 80:20) afforded 920 mg of the desired product as a slightly yellow solid.

Yield: 55 %.

MW= 410.53 g/mol.

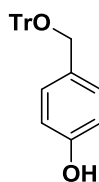
R_f= 0.1 (CHex:AcOEt 95:5).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.79-7.75 (m, 2H, H_{arom}), 7.34-7.30 (m, 2H, H_{arom}), 5.79 (ddt, ³J=17.3 Hz, ³J=10.6 Hz, ³J=5.4 Hz, 3H, 3 CH=CH₂), 5.18 (dq, ³J=17.3 Hz, ⁴J=1.7 Hz, 3H, 3 CH_{2α}=CH), 5.11 (dq, ³J=10.4 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 3H, 3 CH_{2β}=CH), 4.06 (s, 2H, CH₂OSO₂), 3.86 (dt, ³J=5.4 Hz, ⁴J=1.5 Hz, 6H, 3 CHCH₂O), 3.38 (s, 6H, 3 CH₂OCq), 2.44 (d, ⁴J=0.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C: 144.7 (C₆H₄), 134.9 (3 CH=CH₂), 133.0, 129.9, 128.1 (C₆H₄), 116.5 (3 CH₂=CH), 72.3 (3 CH₂O), 69.9 (CH₂OTs), 68.3 (3 CH₂C_q), 44.9 (C_q), 21.8 (CH₃).

4-((Trityloxy)methyl)phenol (124)



To a solution of *p*-hydroxybenzyl alcohol (5.0 g, 40.3 mmol) in dry pyridine (50 mL) was added trityl chloride (17.3 g, 60.5 mmol). The reaction mixture was left 2 h at 20 °C. Ice and Et₂O (100 mL) were added to the mixture to stop the reaction. The aqueous phase was extracted with Et₂O (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 50 mL) and dried over MgSO₄. Solvents were removed under reduced pressure. Flash chromatography (DCM:MeOH 95:5) afforded 11.8 g of the desired product as a white solid.

Yield: 80%.

MW= 366.46 g/mol.

HRMS: Calcd for C₂₆H₂₂O₂Na [M+Na]⁺ 389.15120; found 389.1511.

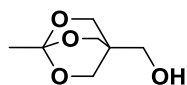
R_f= 0.4 (CHex:AcOEt 8:2).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.57-7.51 (m, 6H, H_{arom}), 7.36-7.30 (m, 6H, H_{arom}), 7.2-7.25 (m, 5H, H_{arom}), 6.84–6.80 (m, 2H, H_{arom}), 4.09 (s, 2H, CH₂OTrt).

¹³C: 157.8, 144.3, 131.5, 129.1, 128.8, 128.0, 127.1, 115.2 (C₆H₅), 87.1 (OCPh₃), 65.6 (CH₂OTr).

*Pentaérythritol orthoacetate (134)*⁵⁷



To a solution of pentaerythritol (6.4 g, 4.9 mmol) in dry toluene (60 mL) was added *p*-toluene sulfonic acid (112.0 mg, 0.6 mmol). The mixture was heated to 100 °C and triethyl orthoacetate (7.5 mL, 40.9 mmol) was added. The mixture was stirred under reflux for one week. Triethylamine was added to neutralize the media and the mixture was filtered while still hot. After removal of the solvents, the obtained crude was suspended in cyclohexane and filtered to afford 5.77 g of desired product as a white solid.

Yield: 95 %.

MW= 160.17 g/mol.

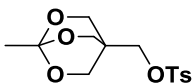
R_f= 0.7 (Chex:AcOEt 7:3).

NMR in CDCl₃:

¹H: 4.01 (s, 6H, 3 CH₂O), 3.45 (s, 2H, CH₂OH), 1.45 (s, 3H, CH₃).

¹³C: 108.6 (C_qO₃), 69.4 (3 CH₂O), 61.4 (CH₂OH), 35.7 (C_qCH₂OH), 23.5 (CH₃).

1-Methyl-4-(tosyloxymethyl)-2,6,7-trioxabicyclo-[2.2.2]-octane (133)



To a suspension of NaH (60% in oil, 1.8 g, 45 mmol) in dry toluene (60 mL) was added **134** (4.0 g, 25 mmol). The mixture was stirred 10 min and then tosyl chloride (9.5 g, 49.8 mmol) was added. The mixture was stirred at reflux during 24 h. The reaction media was quenched with isopropanol and filtered through celite while still hot. The liquid part was left in the fridge for crystallization and filtrate to give 3.82 g of the desired compound as a white solid.

Yield: 89%.

MW= 314.35 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{14}H_{18}O_6SK$ $[M+K]^+$ 353.10293; found 353.1033.

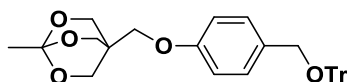
R_f= 0.4 (Chex:AcOEt 7:3).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.78-7.73 (m, 2H, H_{arom}), 7.40-7.35 (m, 2H, H_{arom}), 3.91 (s, 6H, 3 CH₂O), 3.78 (s, 2H, CH₂OTs), 2.47 (s, 3H, PhCH₃), 1.43 (s, 3H, CH₃).

¹³C: 145.7, 137.6, 130.3, 128.1 (C₆H₄), 68.5 (3 CH₂O), 67.3 (CH₂OTs), 34.4 (C_q), 23.3 (C_qCH₃), 21.9 (CH₃Ph).

1-Methyl-4-[(p-trityloxymethyl)phenoxyethyl]-2,6,7-trioxabicyclo-[2.2.2]-octane (132)



To a suspension of KOH (318 mg, 6.5 mmol) in powder in dry DMF (30 mL) was added **124** (1.0 g, 2.7 mmol). The mixture was stirred 10 min before the addition of **133** (0.475 g, 1.5 mmol). The mixture was stirred under reflux for 2 h. The media was left warming up to room temperature and diluted with DCM (30 mL) and water (30 mL). The aqueous phase was extracted with DCM (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (4 x 20 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash-chromatography (DCM) afforded 0.67 g of the desired product as a white solid.

Yield: 87 %.

MW= 508.61 g/mol.

HRMS: Calcd for C₃₃H₃₂O₅Na [M+Na]⁺ 531.21419; found 531.21419.

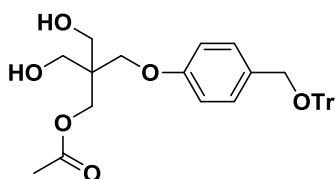
R_f= 0.9 (DCM).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.53-7.48 (m, 6H, H_{arom}), 7.38-7.20 (m, 11H, H_{arom}), 6.84-6.80 (m, 2H, H_{arom}), 4.14 (s, 6H, 3 CH₂O), 4.09 (s, 2H, CH₂OTr), 3.73 (s, 2H, CH₂OPh), 1.50 (s, 3H, CH₃).

¹³C: 157.5, 144.2, 132.3, 128.8, 128.7, 127.9, 127.1, 114.1 (C₆H₅, C₆H₄), 108.8 (C_qCH₃), 69.4 (3 CH₂O), 66.4 (CH₂OPh), 65.4 (CH₂OTr), 34.9 (C_qCH₂O), 23.5 (CH₃).

(Acetyl)-[(p-trityloxymethyl)phenyl]-pentaerythritol (**135**)



To a solution of **132** (0.9 g, 1.8 mmol) in DCM (10 mL) were added AcOH (51 μ L, 0.9 mmol) and water (0.97 mL, 54 mmol). The mixture was left stirring during 24 h at room temperature. The mixture was quenched by addition of 10 mL of DCM and washed with water until pH=7. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (DCM) afforded 0.71 g of the desired product as colorless oil.

Yield: 75 %.

MW= 526.63 g/mol.

HRMS: Calcd for C₃₃H₃₄O₆Na [M+Na]⁺ 549.22476; found 549.2249.

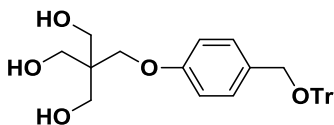
R_f= 0.2 (CH₂Cl₂:AcOEt 6:4).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.53-7.48 (m, 6H, H_{arom}), 7.36-7.21 (m, 11H, H_{arom}), 6.92-6.87 (m, 2H, H_{arom}), 4.31 (s, 2H, CH₂OCO), 4.09 (s, 2H, CH₂OTr), 3.97 (s, 2H, CH₂OPh), 3.78 (dd, *J*=26.8 Hz, ²*J*=11.4 Hz, 4H, 2 CH₂OH), 2.10 (CH₃).

¹³C: 172.2 (CO), 158.4, 144.4, 131.8, 128.9, 128.8, 128.0, 127.2, 114.6 (C₆H₅, C₆H₄), 87.3 (C_qPh₃), 67.0 (CH₂OPh), 65.7 (CH₂OTr), 63.5 (CH₂OCO), 62.1 (2 CH₂OH), 44.9 (C_q), 20.9 (CH₃).

[(p-Trityloxymethyl)phenyl]-pentaerythritol (131)



To a solution of **135** (0.28 g, 0.5 mmol) in 6 mL of a mixture of dry DCM and dry MeOH (1/1) was added a solution of sodium methanolate in methanol (5.4 M, 300 μ L). The mixture was left stirring for 3 h at room temperature. A spoon of cationic resin IR-120 (H^+ form) was added to the medium and the pH was checked until the medium was neutralized. The mixture was filtered and solvents were removed under reduced pressure. Flash chromatography afforded 0.174 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 72 %.

MW= 484.59 g/mol.

MS: Calcd for $C_{31}H_{32}O_5Na$ $[M+Na]^+$ 507.21; found 507.1.

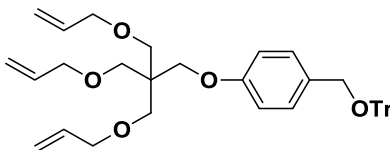
R_f= 0.5 (DCM:MeOH 9:1).

NMR in $CDCl_3$:

1H : 7.53-7.47 (m, 6H, H_{arom}), 7.34-7.21 (m, 11H, H_{arom}), 6.93-6.87 (m, 2H, H_{arom}), 4.09 (s, 2H, CH_2OTr), 4.01 (s, 2H, CH_2OPh), 3.85 (s, 6H, 3 CH_2OH), 2.43 (s, 3H, 3 OH).

^{13}C : 157.8, 144.1, 134.0, 128.7, 128.6, 127.8, 127.0, 114.3 (C_6H_5 , C_6H_4), 87.0 (C_qPh_3), 68.9 (CH_2OPh), 65.4 (CH_2OTr), 64.6 (3 CH_2OH), 45.1 ($C_q(CH_2OH)_3$).

Triallyl-[(p-trityloxymethyl)phenyl]-pentaerythritol (122)



To a suspension of KH (30 % in oil, 0.19 g, 1.7 mmol) in dry DMF (5 mL) was added at 0 °C a solution of **131** (0.4 g in 5 mL of dry DMF, 0.83 mmol). The mixture was allowed to heat up at room temperature and stirred for 10 min. Allyl bromide (0.83 mL, 16.6 mmol) was added to the flask. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. KH was quenched by slowly adding of water at 0 °C. The aqueous layer was extracted with Et₂O (3 x 5 mL). The combined layers were washed with brine (15 mL), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (DCM:MeOH 98:2) afforded 0.375 g of the desired product as a slightly brown solid.

Yield: 75 %.

MW= 604.79 g/mol.

HRMS: Calcd for C₄₀H₄₄O₅Na [M+Na]⁺ 627.08531; found 627.0853.

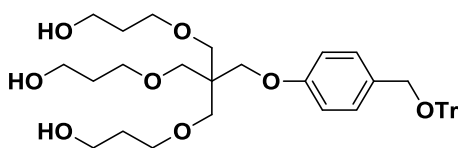
R_f= 0.8 (DCM).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.55-7.49 (m, 6H, H_{arom}), 7.35-7.21 (m, 11H, H_{arom}), 6.93-6.87 (m, 2H, H_{arom}), 5.88 (ddt, ³J=17.3 Hz, ³J=10.6 Hz, ³J=5.4 Hz, 3H, 3 CH), 5.26 (dq, ³J=17.3 Hz, ⁴J=1.8 Hz, 3H, 3 CH₂CH), 5.14 (dq, ³J=10.4 Hz, ³J=1.7 Hz, 3H, 3 CH₂CH), 4.08 (s, 2H, CH₂OTr), 4.01 (s, 2H, CH₂OPh), 3.97 (dt, ³J=5.4 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 6H, CH₂CH x 3), 3.58 (s, 6H, CH₂O x 3).

¹³C: 157.8, 144.4, 135.3 (3 CH), 131.3, 128.9, 128.5, 127.9, 127.1, 114.6 (C₆H₅, C₆H₄), 116.4 (3 CH₂CH), 87.0 (C_qPh₃), 72.4 (3 CHCH₂O), 69.1 (3 CH₂O), 67.2 (CH₂OPh), 65.7 (CH₂OTr), 45.4 (C_q).

Tri-(3-hydroxypropyl)-[(p-trityloxymethyl)phenyl]-pentaerythritol (136)



To a solution of **122** (0.3 g, 0.5 mmol) in dry 1,4-dioxane (0.5 mL) was added at 0 °C 9-BBN (0.5 mL, 0.5 M). The mixture was stirred for 24 h. At 0 °C, NaOH (0.9 mL, 3 M) and H₂O₂ (0.2 mL, 10 M) were successively added. The mixture was stirred 48 h at room temperature. Solvents were removed under reduced pressure. The crude was extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt:MeOH gradient from 50:50:0 to 0:100:0 and then 0:85:15) afforded 0.2 g of the desired product as a colorless oil.

Yield: 62 %.

MW= 658.83 g/mol.

HRMS: Calcd for C₄₀H₅₀O₈Na [M+Na]⁺ 681.3397; found 881.3399.

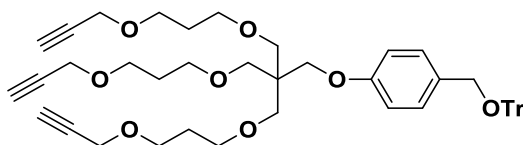
R_f= 0.3 (DCM:MeOH 9:1).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.53-7.48 (m, 6H, H_{arom}), 7.34-7.21 (m, 11H, H_{arom}), 6.92-6.86 (m, 2H, H_{arom}), 4.08 (s, 2H, CH₂OTr), 3.94 (s, 2H, CH₂OPh), 3.74 (t, ³J=5.4 Hz, 6H, 3 CH₂O), 3.60 (t, ³J=5.2 Hz, 6H, 3 CH₂O), 3.53 (s, 6H, 3 CH₂O), 1.80 (quint, ³J=5.8 Hz, 6H, 3 OCH₂CH₂).

¹³C: 158.4, 144.3, 131.5, 128.9, 128.8, 128.6, 127.9, 127.1, 114.5 (C₆H₅, C₆H₄), 87.0 (C_qPh₃), 70.7 (3 CH₂O), 70.4 (3 CH₂O), 67.6 (CH₂OPh), 65.6 (CH₂OTr), 61.4 (3 CH₂O), 44.8 (C_q), 31.9 (3 HOCH₂CH₂).

Tri-(3-oxypropyn)-[(p-trityloxymethyl)phenyl]-pentaerythritol (137)



To a solution of **136** (100mg, 0.15 mmol) in dry DMF (1.5 mL) at 0 °C were successively added propargyl bromide (114 μ L, 1.5 mmol) and sodium hydride 60% in oil (30 mg, 0.75 mmol). The mixture was stirred for 5 h. At 0 °C, water was slowly added. The mixture was extracted with AcOEt (4 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (3 x 10 mL) and brine (10 mL), dried over MgSO_4 , and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (DCM) afforded 18.6 mg of the desired product as a slightly brown solid.

Yield: 89 %.

MW= 772.98 g/mol.

HRMS: Calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 795.38674; found 795.3872.

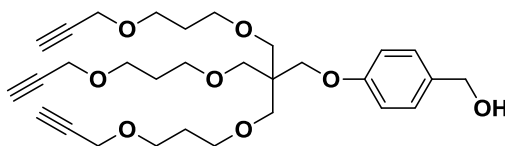
R_f = 0.1 (DCM).

NMR in CDCl_3 :

^1H : 7.54-7.48 (m, 6H, H_{arom}), 7.36-7.21 (m, 11H, H_{arom}), 6.92-6.86 (m, 2H, H_{arom}), 4.09 (s, 2H, CH_2OTr), 4.08 (s, 6H, 3 CH_2CCH), 3.95 (s, 2H, CH_2OPh), 3.56 (t, $^3J=6.4$ Hz, 6H, 3 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.51 (s, 6H, 3 CqCH_2O), 3.48 (t, $^3J=6.2$ Hz, 6H, 3 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.39 (t, $^4J=2.4$ Hz, 3H, 3 CH), 1.93 (quint, $^3J=6.3$ Hz, 6H, 3 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

^{13}C : 158.8, 144.4, 131.1, 128.9, 128.6, 127.9, 127.2, 114.6 (C_6H_5 , C_6H_4), 87.0 (C_qPh_3), 80.1 (3 C_qCH), 74.3 (3 CH), 69.6 (3 CH_2O), 68.2 (3 CH_2O), 67.4 (3 CH_2O), 67.2 (CH_2OPh), 65.6 (CH_2OTr), 58.2 (3 CH_2CCH), 45.4 (C_q), 30.0 (3 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

Tri-(3-oxypropyn)-[(p-hydroxyoxymethyl)phenyl]-pentaerythritol (22)



To a solution of **137** (420 mg, 0.54 mmol) in DCM (13 mL) was added slowly added TFA (83 μ L, 1.1 mmol). The mixture was stirred for 30 min at room temperature. Solvents were removed under reduced pressure and the crude was co-evaporated three times with toluene. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 8:2 to 5:5) afforded 224 mg of the desired product as a white solid.

Yield: 78 %.

MW= 530.66 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{30}H_{42}O_8Na$ $[M+Na]^+$ 553.24419; found 553.2770.

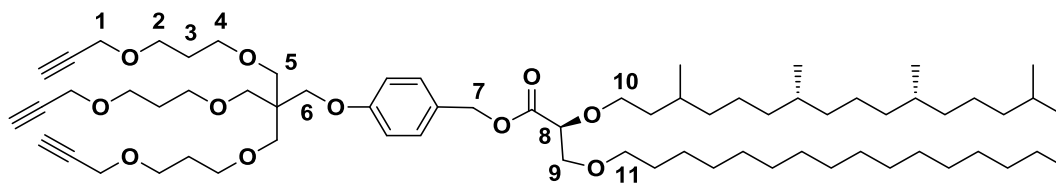
Rf=0.4 (CHex:AcOEt 8:2).

NMR in $CDCl_3$:

1H : 7.33-7.25 (m, 2H, H_{arom}), 6.94-6.910 (m, 2H, H_{arom}), 4.60 (s, 2H, CH_2OH), 4.07 (s, 6H, 3 $CHCqCH_2O$), 3.95 (s, 2H, $CqCH_2OPh$), 3.54 (t, $^3J=6.5$ Hz, 6H, 3 OCH_2CH_2), 3.49 (s, 6H, 3 OCH_2Cq), 3.48 (t, $^3J=6.3$ Hz, 6H, 3 OCH_2CH_2), 2.40 (t, $^4J=2.4$ Hz, 3H, 3 CH), 1.82 (quint, $^3J=6.3$ Hz, 6H, 3 $OCH_2CH_2CH_2O$).

^{13}C : 159.2, 133.1, 128.9, 128.7, 114.8 (C_6H_4), 74.3 (3 CH), 69.5 (3 CH_2O), 68.2 (3 CH_2O), 67.3 (CH_2OPh , 3 CH_2O), 65.2 (CH_2OH), 58.2 (3 CH_2CCH), 45.4 (C_q), 30.1 (3 $OCH_2CH_2CH_2O$).

Tri(3-allyloxypropyn)-[(p-methyl-(2S)-2-((3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)oxy)-1-hexadecyloxy propanoate)phenyl]-pentaerythritol (121)



To a solution of acid **23** (140 mg, 0.23 mmol) in dry DCM (1.5 mL) was added DMAP (39 mg, 0.32 mmol). At 0°C, a solution of alcohol **22** (99 mg, 0.19 mmol) in dry DMC (2.5 mL) was slowly added to the mixture followed by 88 mg of DCC (0.42 mmol). The mixture was first stirred for 5 min at 0°C then 24 h at room temperature. DCM was added to the mixture which was then extracted with HCl 5% (2 x 10 mL), NaHCO₃ (2x 10 mL) and brine (10mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (CHex:AcOEt gradient from 10:0 to 9:1) afforded 137 mg of the desired product as a slightly orange solid.

Yield: 53 %

MW= 1123.69 g/mol

HRMS: Calcd for C₃₀H₄₂O₈Na [M+Na]⁺ 1145.5866; found 1145.8568.

R_f= 0.1 (DCM:MeOH 9:1)

NMR in CDCl₃:

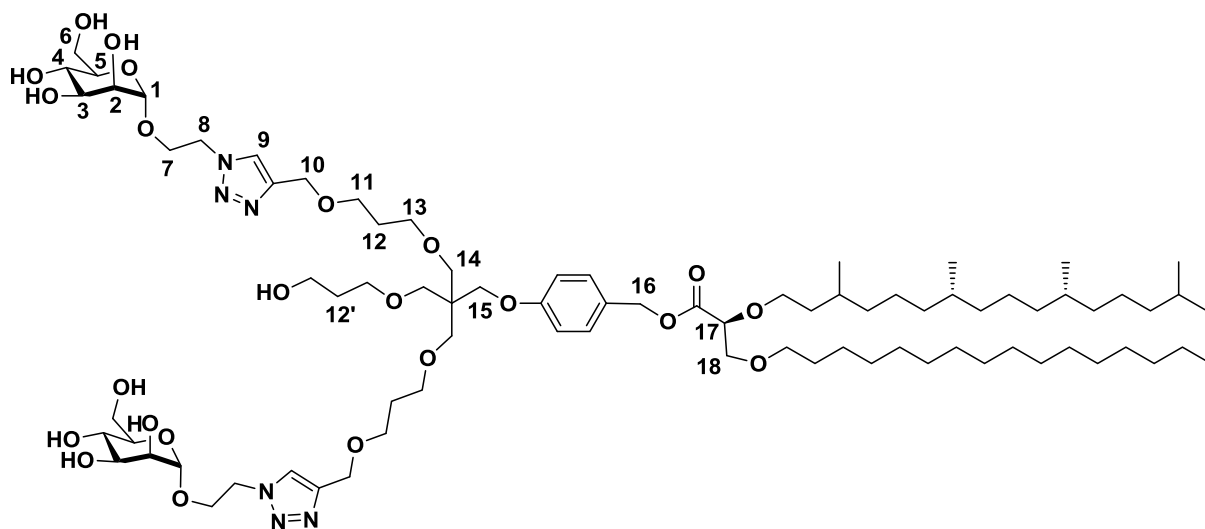
¹H: 7.29-7.24 (m, 2H, H_{arom}), 6.91-6.86 (m, 2H, H_{arom}), 5.13 (d, ⁴J=3.9 Hz, 2H, H-7), 4.08 (d, ⁴J=2.4 Hz, 6H, 3 H-1), 4.09-4.04 (m, 1H, H-8), 3.95 (s, 2H, H-6), 3.70-3.62 (m, 4H, H-9, H-10), 3.56 (t, ³J=6.4 Hz, 6H, 3 H-4), 3.50 (s, 6H, 3 H-5), 3.48 (t, ³J=6.0 Hz, 6H, 3 H-2), 3.47-3.41 (m, 2H, H-11), 2.39 (t, ⁴J=2.4 Hz, 3H, 3 CH), 1.82 (quint, ³J=6.3 Hz, 6H, 3 H-3), 1.58-1.53 (quint, ³J=6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.42-1.03 (m, 50 H, 23 CH₂, 4 CH), 0.92-0.82 (m, 18H, 6 CH₃)

¹³C: 171.1 (CO), 159.6, 130.0, 127.7, 114.6 (C₆H₄), 80.0 (3 C_qCH), 79.2 (C-8), 74.3 (3 CH), 72.0 (C-11), 71.4 (C-9), 69.6 (C-10), 69.4 (3 C-5), 68.2 (3 C-4), 67.3 (C-6), 67.3 (3 C-2), 66.5 (C-7), 58.2 (3 C-1), 45.3 (C-6), 39.5, 37.6, 37.5, 37.4 (CH₂), 32.9 (2 CH), 32.0, 29.9 (CH₂), 29.8 (CH), 29.7 (3 C-3), 29.6, 29.4 (CH₂), 28.1 (CH), 26.1, 24.9, 24.4 (CH₂), 22.8, 22.7, 19.8, 14.2 (6 CH₃)

General procedure for click chemistry (D):

Azido carbohydrates derivatives (4 eq) and compound **121** (40 mg, 0.035 mmol) were dissolved in 3 mL of a mixture of DCM, *t*-butanol and H₂O (1:1:1). Cu(OAc)₂ (7.2 mg, 0.035 mmol) and sodium ascorbate (15 mg, 0.075 mmol) were successively added. The mixture was vigorously stirred for 2 h. The mixture was filtered through celite. Solvents were removed under reduced pressure and water was co-evaporated with toluene. Flash chromatography (DCM:MeOH 100:0 up to 50:50) afforded the different products as colorless oils.

(139)



Compound **139** was obtained following the general procedure D with azide **24**.

Yield: 53%.

MW= 1583.09 g/mol

HRMS: Calcd for $C_{82}H_{146}N_6O_{23}Na$ $[M+Na]^+$ 1606.03316; found 1606.0341.

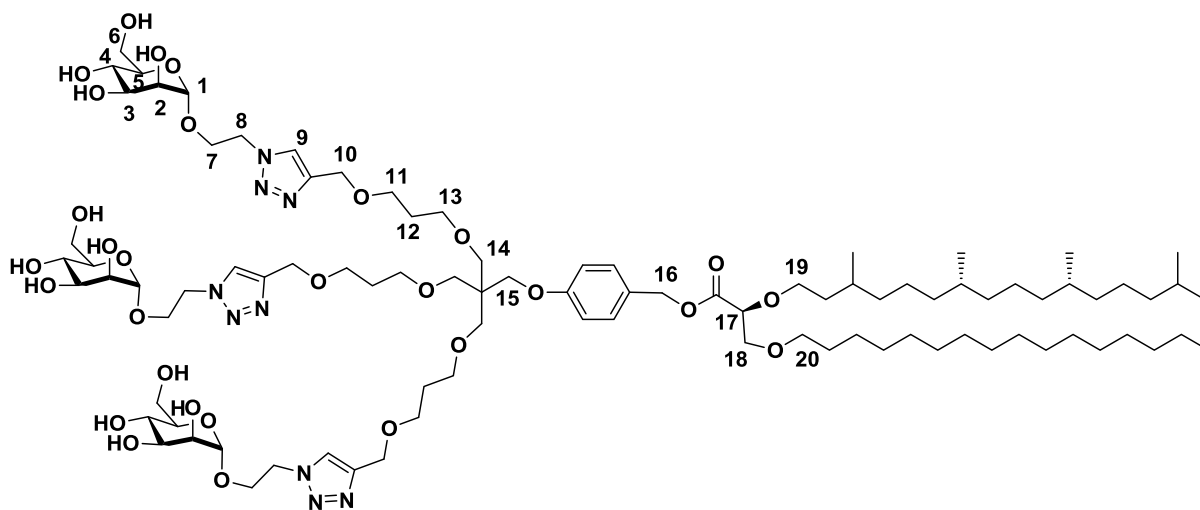
R_f= 0.3 (DCM:MeOH 8:2)

NMR in CDCl₃:18

¹H: 7.82 (s, 2H, 2 H-9), 7.28-7.20 (m, 2H, H_{arom}), 6.92-6.83 (m, 2H, H_{arom}), 5.08 (d, ⁴J=5.4 Hz, 2H, H-16), 4.71 (d, ¹J_{1,2}=1.5 Hz, 2H, 2 H-1), 4.63-4.48 (m, 8H, 2 H-8, 2 H-10), 4.11-3.99 (m, 3H, 2 H-7a, H-17), 3.91 (s, 2H, H-15), 3.86-3.77 (m, 2H, 2 H-7b), 3.77-3.73 (m, 2H, 2 H-2), 3.70 (dd, ¹J_{5,6a}=8.9 Hz, ¹J_{5,6b}=3.5 Hz, 4H, 2 H-6), 3.67-3.53 (m, 10H, 3 H-11, 2 H-3, 2 H-4), 3.53-3.36 (m, 14H, 3 H-13, H-18, 3 H-14), 3.20-3.12 (m, 2H, 2 H-5), 1.86-1.79 (m, 4H, 2 H-12), 1.75 (quint, ³J=6.1 Hz, 2H, H-12'), 1.55-1.43 (m, 4H, 2 OCH₂CH₂), 1.41-0.98 (m, 50 H, 23 CH₂, 4 CH), 0.87-0.77 (m, 18H, 6 CH₃).

¹³C: 159.9 (CO), 142.5 (C_q), 130.4, 128.1, 115.0 (C₆H₄), 100.6 (2 C-1), 79.6 (C-17), 73.5 (C-5), 72.3 (C-20), 71.6 (2 C-3), 71.5 (C-18), 70.8 (2 C-2), 70.0 (C-19), 69.9 (3 C-14), 69.6 (3 C-13), 68.6 (C-11'), 68.3 (2 C-11), 67.6 (C-15), 67.4 (2 C-4), 67.0 (C-16), 65.9 (C-7), 64.2 (2 C-10), 61.8 (2 C-6), 50.7 (C-8), 45.6 (C_q), 39.8, 37.9, 37.8, 37.7, 36.9 (CH₂), 33.4 (2 CH), 32.6 (CH₂), 32.3 (C-12'), 30.2 (CH), 30.1 (C-12), 30.0 (OCH₂CH₂), 29.8, 29.7 (CH₂), 28.3 (CH), 25.4, 25.0, 24.8, 24.7 (CH₂), 23.0, 22.9, 22.8, 20.0, 19.8, 14.3 (6 CH₃).

(140)



Compound **140** was obtained following the general procedure D with azide **24**.

Yield: 37%.

MW= 1870.16 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{96}H_{163}N_9O_{29}Na$ $[M+Na]^+$ 1893.14489; found 1893.1469.

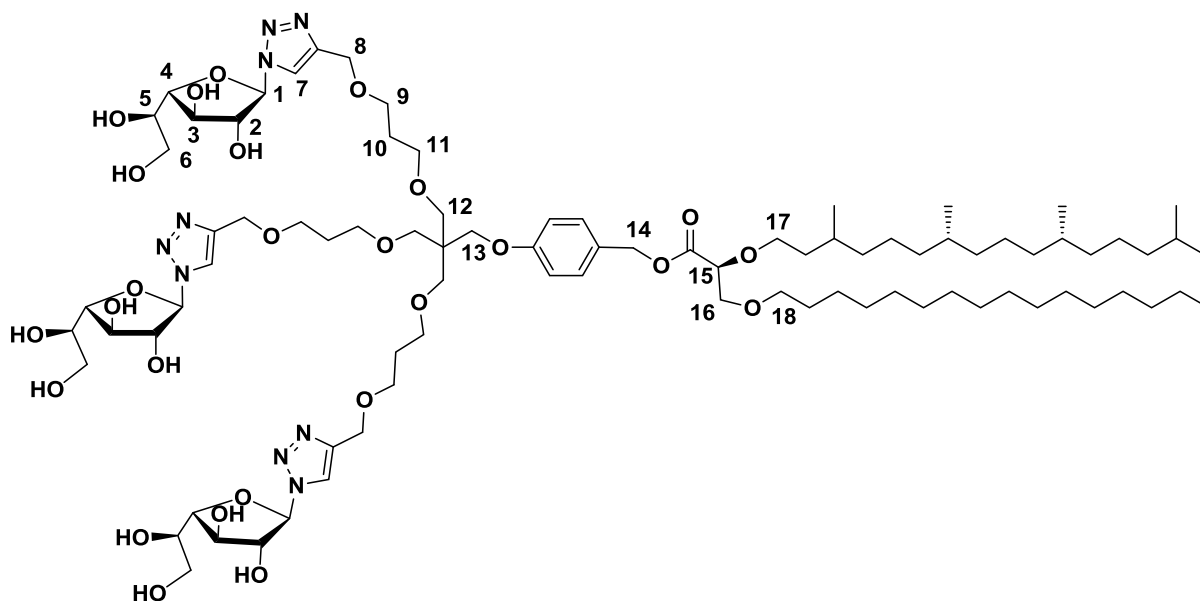
R_f= 0.1 (DCM:MeOH 7:3).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.77 (s, 3H, 3 H-9), 7.28-7.23 (m, 2H, H_{arom}), 6.89-6.84 (m, 2H, H_{arom}), 5.08 (d, ⁴J=5.2 Hz, 2H, H-16), 4.72 (s, 3H, 3 H-1), 4.62-4.52 (m, 6H, 3 H-10, 3 H-8), 4.10-4.00 (m, 5H, 3 H-7a, H-17), 3.91 (s, 2H, H-15), 3.81 (ddd, ²J=10.6 Hz, ³J=6.4 Hz, ⁴J=3.9 Hz, 3H, 3 H-7b), 3.76 (d, ²J=2.8 Hz, 3H, 3 H-2), 3.73-3.63 (m, 6H, 3 H-6), 3.62-3.58 (m, 6H, 3 H-3, 3 H-4), 3.55 (t, ³J=6.5 Hz, 6H, 3 H-11), 3.49-3.41 (m, 14H, 3 H-13, 3 H-14, H-18), 3.21-3.13 (m, 3H, 3 H-5), 1.81 (quint, ³J=6.5 Hz, 6H, 3 H-12), 1.54-1.45 (m, 4H, 2 OCH₂CH₂), 1.40-0.98 (m, 50H, 23 CH₂, 4 CH), 0.87-0.80 (m, 18H, 6 CH₃).

¹³C: 171.8 (CO), 160.0, 148.0 (C_q), 130.5, 128.3 (C₆H₄), 124.8 (3 C-9), 115.1 (C₆H₄), 100.6 (3 C-1), 79.7 (C-17), 73.7 (3 C-5), 72.4 (C-20), 71.7 (3 C-3), 71.6 (C-18), 70.9 (3 C-2), 69.9 (3 C-14), 69.8 (C-19), 68.7 (3 C-13), 68.3 (3 C-11), 67.6 (3 C-4), 67.5 (C-15), 67.1 (C-16), 66.0 (3 C-7), 64.4 (3 C-10), 61.9 (3 C-6), 50.6 (3 C-8), 45.7 (C_q), 39.8, 39.9, 37.8 (CH₂), 33.2 (2 CH), 32.4 (CH₂), 30.2 (3 C-12), 30.1 (CH), 30.0, 29.9, 29.8 (CH₂), 28.4 (CH), 26.4, 25.2, 24.9, 24.8, 23.2, 23.1 (CH₂), 22.9, 22.8, 20.0, 19.8, 14.3 (6 CH₃).

(26)



Compound **26** was obtained following the general procedure D with azide **15**.

Yield: 13%.

MW= 1739.20 g/mol.

MS: Calcd for $C_{87}H_{151}N_9O_{26}Na$ $[M+Na]^+$ 1761.07; found 1760.7.

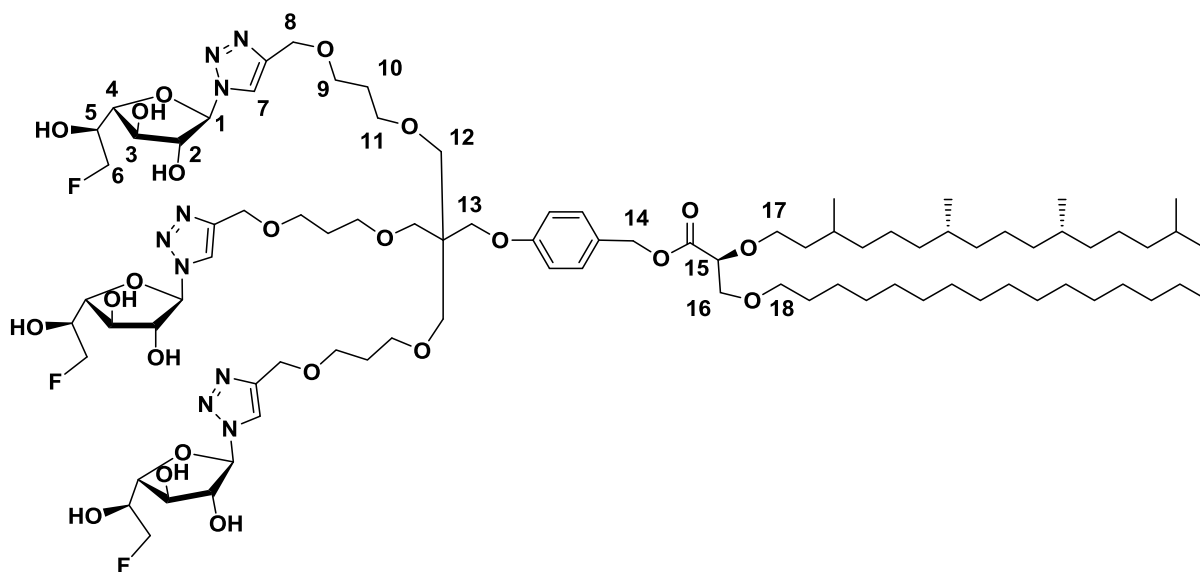
R_f=0.6 (DCM:MeOH 8:2).

NMR in $CDCl_3$:

1H : 8.00 (s, 3H, 3 H-7), 7.27-7.22 (m, 2H, H_{arom}), 6.89-6.84 (m, 2H, H_{arom}), 6.05 (d, $J_{1,2}$ =2.9 Hz, 3H, 3 H-1), 5.09 (d, 4J =6.3 Hz, 2H, H-14), 4.54 (t, $J_{2,3}$ =3.2 Hz, 3H, 3 H-2), 4.53-4.47 (m, 6H, 3 H-8), 4.30-4.25 (m, 6H, 3 H-3, 3 H-4), 4.02 (ddd, 3J =6.2 Hz, 4J =4.0 Hz, 4J =2.3 Hz, 1H, H-15), 3.90 (s, 2H, H-13), 3.78 (td, J =6.3 Hz, J =2.2 Hz, 3H, 3 H-5), 3.67-3.60 (m, 8H, 3 H-6, H-17), 3.44 (t, J =6.4 Hz, 6H, 3 H-9), 3.49-3.37 (m, 16H, 3 H-11, 3 H-12, H-16, H-18), 1.79 (quint, J =6.3 Hz, 6H, 3 H-10), 1.54-1.45 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.40-0.99 (m, H, 24 CH_2 , 4 CH), 0.87-0.78 (m, 18H, 6 CH_3).

^{13}C : 171.8 (CO), 130.5, 129.0(C_6H_4), 123.2 (C-7), 115.0 (C_6H_4), 95.1 (C-1), 87.2 (C-3), 81.8 (C-2), 79.6 (C-15), 77.7 (C-4), 72.4 (C-16), 71.8 (C-5), 71.6 (C-9), 70.1 (C-17), 69.7 (C-11), 68.6 (C-12), 68.3 (C-8), 67.5 (C-14), 67.4 (C-18), 67.1 (C-13), 64.3 (C-9), 63.5 (C-6), 45.7 (C_q), 39.8, 37.9, 37.7, 33.2 (2 CH), 32.4, 30.2 (CH_2), 30.1 (C-10), 30.0, 29.9, 29.8 (CH_2), 28.4 (CH), 26.4, 25.2, 24.9, 24.8, 23.1 (CH_2), 22.9, 22.8, 20.0, 19.8, 14.3 (6 CH_3).

(141)



Compound **141** was obtained following the general procedure D with azide **16**.

Yield: 16%.

MW= 1745.18 g/mol.

MS: Calcd for $C_{87}H_{148}F_3N_9O_{23}Na$ $[M+Na]^+$ 1767.05; found 1767.5.

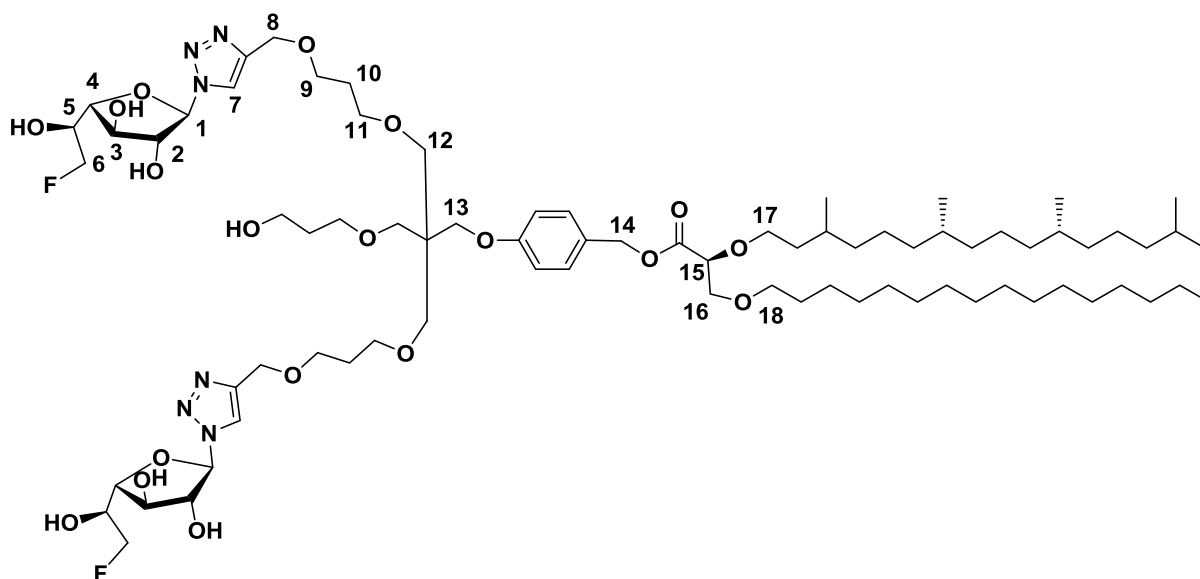
R_f=0.5 (DCM:MeOH 8:2).

NMR in CDCl₃:

¹H: 8.01 (s, 3H, 3 H-7), 7.28-7.22 (m, 2H, H_{arom}), 6.89-6.84 (m, 2H, H_{arom}), 6.05 (d, *J*_{1,2}=3.2 Hz, 3H, 3 H-1), 5.14-5.03 (m, 2H, H-14), 4.59-4.56 (m, 3H, 3 H-2), 4.54-4.48 (m, 9H, 3 H-6a, 3 H-8), 4.44-4.36 (m, 3H, 3 H-6b), 4.33-4.25 (m, 6H, 3 H-3, 3 H-4), 4.05-3.97 (m, 4H, 3 H-5, H-15), 3.90 (s, 2H, H-13), 3.68-3.60 (2H, H-17), 3.54 (t, ²*J*=6.4 Hz, 6H, 3 H-9), 3.48-3.39 (m, 16H, 3 H-11, 3 H-12, H-16, H-18), 1.80 (p, ²*J*=6.4 Hz, 6H, 3 H-10), 1.54-1.44 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.41-0.99 (m, 52H, 24 CH₂, 4 CH), 0.89-0.80 (m, 18H, 6 CH₃).

¹³C: 171.4 (CO), 133.7, 130.9 (C₆H₄), 123.0 (C-7), 115.1 (C₆H₄), 95.1 (C-1), 83.3 (d, *J*_{C,F}=6.0 Hz, C-4), 84.2 (d, *J*_{C,F}=170.0, C-6), 81.8 (C-2), 79.7 (C-15), 77.4 (C-3), 72.5 (C-16), 71.7 (C-18), 69.8 (C-17, C-12), 69.7 (C-11), 68.4 (C-9), 69.6 (d, *J*_{C,F}=19.8 Hz, C-5), 67.5 (C-13), 67.2 (C-14), 64.4 (C-8), 45.8 (C_q), 39.9, 38.0, 37.8, 33.3 (2 CH), 32.4, 30.3 (CH₂), 30.2 (C-10), 30.1, 29.9, 29.8 (CH₂), 28.4 (CH), 26.5, 25.3, 24.9, 24.8, 23.1 (CH₂), 23.0, 22.9, 20.1, 20.0, 19.8, 14.3 (6 CH₃).

(142)



Compound **142** was obtained following the general procedure D with azide **16**.

Yield: 6%.

MW= 1499.97 g/mol.

HRMS: Calcd for $C_{78}H_{136}F_2N_6O_{19}Na$ $[M+Na]^+$ 1521.97; found 1521.5.

R_f=0.6 (DCM:MeOH 8:2).

NMR in CDCl₃:

¹H: 7.98 (s, 2H, 2 H-7), 7.27-7.21 (m, 2H, H_{arom}), 6.89-6.83 (m, 2H, H_{arom}), 6.05 (d, *J*_{1,2}=3.0 Hz, 2H, 2 H-1), 5.13-5.05 (m, 2H, H-14), 4.57-4.54 (m, 2H, 2 H-2), 4.55-4.46 (m, 6H, 2 H-6a, 3 H-8), 4.44-4.37 (m, 2H, 2 H-6b), 4.32-4.25 (m, 4H, 2 H-3, 2 H-4), 4.05-3.97 (m, 3H, 3 H-5, H-15), 3.90 (s, 2H, H-13), 3.65-3.63 (2H, H-17), 3.61 (t, ²*J*=6.2 Hz, H-9'), 3.54 (t, ²*J*=6.5 Hz, 4H, 2 H-9), 3.51-3.36 (m, 16H, 3 H-11, 3 H-12, H-16, H-18), 1.83-1.72 (m, 6H, 2 H-10, H-10'), 1.54-1.44 (m, 4H, 2 OCH₂CH₂), 1.41-0.99 (m, 50H, 23 CH₂, 4 CH), 0.89-0.80 (m, 18H, 6 CH₃).

¹³C: 130.9 (C₆H₄), 123.0 (C-7), 114.9 (C₆H₄), 94.8 (C-1), 86.0 (C-4), 83.6 (d, *J*_{C,F}=168.2, C-6), 81.1 (C-2), 79.2 (C-15), 76.9 (C-3), 72.5 (C-16), 71.2 (C-17), 69.3 (C-18, C-12), 68.3 (C-11), 67.7 (C-9), 69.1 (d, *J*_{C,F}=19.1 Hz, C-5), 67.0 (C-13), 66.6 (C-14), 63.8 (C-8), 43.0 (C_q), 39.2, 37.3, 37.2, 32.7 (2 CH), 31.8, 39.6 (CH₂), 29.6 (C-10), 29.5, 29.3, 29.2 (CH₂), 27.9 (CH), 25.9, 24.7, 24.2, 22.8, (CH₂), 20.7, 19.5, 18.2, 15.7 (6 CH₃).

Références

1. Barbeau, J., Lemiègre, L., Quelen, A., Malard, V., Gao, H., Gonçalves, C., Berchel, M., Jaffrès, P., Pichan, C., Midoux, P., Benvegna, T. Synthesis of a trimannosylated-equipped archaeal diether lipid for the development of novel glycoliposomes. *Carbohydr. Res.* **435**, 142–148 (2016).
2. Leão, P., Nakamura, H., Costa, M., Pereira, A., Martins, R., Vasconcelos, V., Gerwick, W., Balskus, E. Biosynthesis-Assisted Structural Elucidation of the Bartolosides, Chlorinated Aromatic Glycolipids from Cyanobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 11063–11067 (2015).
3. Mammen, M., Choi, S.-K., Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **37**, 2754–2794 (1998).
4. Lee, Y. C., Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **28**, 321–327 (1995).
5. <http://akhaag.userpage.fu-berlin.de/multivalent01.html>, consulté le 30/08/2019.
6. Hunter, C. A., Anderson, H. L. What is Cooperativity? *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 7488–7499 (2009).
7. Lee, Y., Townsend, R., Hardy, M., Lönngren, J., Arnap, J., Haraldsson, M., Lönn, H. Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *J. Biol. Chem.* **258**, 199–202 (1983).
8. Sansone, F., Casnati, A. Multivalent glycocalixarenes for recognition of biological macromolecules: glycocalyx mimics capable of multitasking. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4623 (2013).
9. Ercolani, G., Schiaffino, L. Allosteric, Chelate, and Interannular Cooperativity: A Mise au Point. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 1762–1768 (2011).
10. Kitov, P. I., Bundle, D. R. On the Nature of the Multivalency Effect: A Thermodynamic Model. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16271–16284 (2003).
11. Bhatia, S., Dimde, M., Haag, R. Multivalent glycoconjugates as vaccines and potential drug candidates. *Med Chem Commun* **5**, 862–878 (2014).
12. Berzi, A., Reina, J., Ottria, R., Sutkeviciute, I., Antonazzo, P., Sanchez-Navarro, M., Chabrol, E., Biasin, M., Trabattoni, D., Cetin, I., Rojo, J., Fieschi, F., Bernardi, A., Cleici, M. A glycomimetic compound inhibits DC-SIGN-mediated HIV infection in cellular and cervical explant models: *AIDS* **26**, 127–137 (2012).
13. Reina, J. J., Rojo, J. Glycodendritic structures: tools to interact with DC-SIGN. *Braz. J. Pharm. Sci.* **49**, 109–124 (2013).
14. Sattin, S., Daggetti, A., Thépaul, M., Berzi, A., Sánchez-Navarro, A., Tabarani, G., Rojo, J., Fieschi, F., Clerici, M., Bernardi, A. Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV Infection by a Linear Trimannoside Mimic in a Tetravalent Presentation. *ACS Chem. Biol.* **5**, 301–312 (2010).
15. Martínez-Ávila, O., Hijazi, K., Marradi, M., Clavel, C., Campion, C., Kelly, C., Penadés, S. Gold Manno-Glyconanoparticles: Multivalent Systems to Block HIV-1 gp120 Binding to the Lectin DC-SIGN. *Chem. - Eur. J.* **15**, 9874–9888 (2009).
16. Amon, R., Grant, O., Leviatan Ben-Arye, S., Makeneni, S., Nivedha, A., Marchanski, T., Norn, C., Yu, H., Glushka, J., Fleishman, S., Chen, X., Woods, R., Padler-Karavani, V. A combined computational-experimental approach to define the structural origin of antibody recognition of sialyl-Tn, a tumor-associated carbohydrate antigen. *Sci. Rep.* **8**, 10786 (2018).
17. Buskas, T., Thompson, P., Boons, G.-J. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate-based vaccines. *Chem. Commun.* 5335 (2009). doi:10.1039/b908664c
18. Ragupathu, G., Koide, F., Livingston, P., Cho, Y., Endo, A., Wan, Q., Spassova, M., Keding, S., Allen, J., Ouerfelli, O., Wilson, R., Danishefsky, S. Preparation and evaluation of unimolecular

- pentavalent and hexavalent antigenic constructs targeting prostate and breast cancer: a synthetic route to anticancer vaccine candidates. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2715–2725 (2006).
19. Slovin, S., Ragupathi, G., Fernandez, C., Diani, M., Jefferson, M., Wilton, A., Kelly, W., Morris, M., Solit, D., Clausen, H., Livingston, P., Scher, H. A polyvalent vaccine for high-risk prostate patients: 'are more antigens better?' *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1921–1930 (2007).
 20. Qin, Q., Yin, Z., Wu, X., Haas, K. M., Huang, X. Valency and density matter: Deciphering impacts of immunogen structures on immune responses against a tumor associated carbohydrate antigen using synthetic glycopolymers. *Biomaterials* **101**, 189–198 (2016).
 21. Parry, A., Clemson, N., Ellis, J., Bernhard, S., Davis, B., Cameron, N. 'Multicopy Multivalent' Glycopolymer-Stabilized Gold Nanoparticles as Potential Synthetic Cancer Vaccines. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 9362–9365 (2013).
 22. Lu, W., Du, W., Somovilla, V., Yu, G., Haksar, D., de Vries, R., Boons, G., de Vries, R., de Haans, C., Pieters, R. Enhanced Inhibition of Influenza A Virus Adhesion by Di- and Trivalent Hemagglutinin Inhibitors. *J. Med. Chem.* **62**, 6398–6404 (2019).
 23. Branderhorst, H. M., Liskamp, R. M. J., Visser, G. M., Pieters, R. J. Strong inhibition of cholera toxin binding by galactose dendrimers. *Chem. Commun.* **47**, 5043–5045 (2007).
 24. Khan, S. A., Adak, A., Vasudeva Murthy, R., Kikkeri, R. Recent advances in the metallo-glycodendrimers and its potential applications. *Inorganica Chim. Acta* **409**, 26–33 (2014).
 25. Pifferi, C., Berthet, N., Renaudet, O. Cyclopeptide scaffolds in carbohydrate-based synthetic vaccines. *Biomater. Sci.* **5**, 953–965 (2017).
 26. Otsuka, I., Blanchard, B., Borsali, R., Imbert, A., Kakuchi, T. Enhancement of Plant and Bacterial Lectin Binding Affinities by Three-Dimensional Organized Cluster Glycosides Constructed on Helical Poly(phenylacetylene) Backbones. *ChemBioChem* **11**, 2399–2408 (2010).
 27. Fasting, C., Schalley, C., Weber, M., Seitz, O., Hecht, S., Koks, B., Dornedde, J., Graf, C., Knapp, E., Haag, R. Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 10472–10498 (2012).
 28. Diwan, D., Shinkai, K., Tetsuka, T., Cao, B., Arai, H., Koyama, T., Hatano, K., Matsuoka, K. Synthetic Assembly of Mannose Moieties Using Polymer Chemistry and the Biological Evaluation of Its Interaction towards Concanavalin A. *Molecules* **22**, 157 (2017).
 29. Kolomiets, E., Johansson, E. M. V., Renaudet, O., Darbre, T., Reymond, J.-L. Neoglycopeptide Dendrimer Libraries as a Source of Lectin Binding Ligands. *Org. Lett.* **9**, 1465–1468 (2007).
 30. Ganneau, C., Simenel, C., Emptas, E., Courtiol, T., Coïc, Y., Artaud, C., Dériaud, E., Bonhomme, F., Delepierre, M., Leclerc, C., Lo-Man, R., Bay, S. Large-scale synthesis and structural analysis of a synthetic glycopeptide dendrimer as an anti-cancer vaccine candidate. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 114–123 (2017).
 31. Deng, S., Bai, L., Reboulet, R., Matthew, R., Engler, D., Teyton, L., Bendelac, A., Savage, P. A peptide-free, liposome-based oligosaccharide vaccine, adjuvanted with a natural killer T cell antigen, generates robust antibody responses in vivo. *Chem Sci* **5**, 1437–1441 (2014).
 32. Brard, M., Richter, W., Benveniste, T., Plusquellec, D. Synthesis and Supramolecular Assemblies of Bipolar Archaeal Glycolipid Analogues Containing a *cis* -1,3-Disubstituted Cyclopentane Ring. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10003–10012 (2004).
 33. Kitov, P., Sadowska, J., Mulvey, G., Armstrong, G., Ling, H., Pannu, N., Read, R., Bundle, D. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature* **403**, 669–672 (2000).

34. Imberty, A., Chabre, Y. M., Roy, R. Glycomimetics and Glycodendrimers as High Affinity Microbial Anti-adhesins. *Chem. Eur. J.* **14**, 7490–7499 (2008).
35. Gomes, R. S., Jardim, G. A. M., de Carvalho, R. L., Araujo, M. H., da Silva Júnior, E. N. Beyond copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition: Synthesis and mechanism insights. *Tetrahedron* **75**, 3697–3712 (2019).
36. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41**, 2596–2599 (2002).
37. Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002).
38. Shyam Shankar, E. P., Damodaran, B. Chemistry, Chemical Biology and Photophysics of Certain New Chromene-Triazole-Coumarin Triads as Fluorescent Inhibitors of CDK2 and CDK4 Induced Cancers. *New J. Chem.* **35**, 13863-13872 (2019).
39. Lipeeva, A. V., Zakharov, D., Burova, L., Frolova, T., Baev, D., Shirokikh, I., Evstropov, A., Sinitsyna, O., Tolsikova, T., Shults, E. Design, Synthesis and Antibacterial Activity of Coumarin-1,2,3-triazole Hybrids Obtained from Natural Furocoumarin Peucedanin. *Molecules* **24**, 2126 (2019).
40. Worrell, B. T., Malik, J. A., Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **340**, 457–460 (2013).
41. Bozorov, K., Zhao, J., Aisa, H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorg. Med. Chem.* **27**, 3511–3531 (2019).
42. Janganati, V., Ponder, J., Balasubramaniam, M., Bhat-Nakshatri, P., Bar, E., Nakshatri, H., Jordan, C., Crooks, P. MMB triazole analogs are potent NF- κ B inhibitors and anti-cancer agents against both hematological and solid tumor cells. *Eur. J. Med. Chem.* **157**, 562–581 (2018).
43. Lal, K., Yadav, P., Kumar, A., Kumar, A., Paul, A. K. Design, synthesis, characterization, antimicrobial evaluation and molecular modeling studies of some dehydroacetic acid-chalcone-1,2,3-triazole hybrids. *Bioorganic Chem.* **77**, 236–244 (2018).
44. Périon, R., Ferrières, V., Isabel Garcia-Moreno, M., Ortiz Mellet, C., Duval, R., Garcia Fernández, J., Plusquellec, D. 1,2,3-Triazoles and related glycoconjugates as new glycosidase inhibitors. *Tetrahedron* **61**, 9118–9128 (2005).
45. Avula, S. K., Khan, A., Rehman, N., Anwar, M., Al-Abri, Z., Wadood, A., Riaz, M., Csuk, R., Al-Harrasi, A. Synthesis of 1H-1,2,3-triazole derivatives as new α -glucosidase inhibitors and their molecular docking studies. *Bioorganic Chem.* **81**, 98–106 (2018).
46. Adams, E. W., Ratner, D. M., Seeberger, P. H., Hacohen, N. Carbohydrate-Mediated Targeting of Antigen to Dendritic Cells Leads to Enhanced Presentation of Antigen to T Cells. *ChemBioChem* **9**, 294–303 (2008).
47. François-Heude, M., Méndez-Ardoy, A., Cendret, V., Lafite, P., Daniellou, R., Ortiz Mellet, C., Garcia-Fernández, J., Moreau, V., Djedaïni-Pilard, F. Synthesis of High-Mannose Oligosaccharide Analogues through Click Chemistry: True Functional Mimics of Their Natural Counterparts Against Lectins? *Chem. - Eur. J.* **21**, 1978–1991 (2015).
48. Le Moignic, A., Malard, V., Benvegna, T., Lemiègre, L., Berchel, M., Jaffrès, P., Baillou, C., Delost, M., Macedo, R., Rochefort, J. Preclinical evaluation of mRNA trimannosylated lipopolyplexes as therapeutic cancer vaccines targeting dendritic cells. *J. Controlled Release* **278**, 110–121 (2018).
49. Van der Jeught, K., De Koker, S., Bialkowski, L., Heirman, C., Tjok Joe, P., Perche, F., Maenhout, S., Bevers, S., Broons, K., Deswarte, K. Dendritic Cell Targeting mRNA Lipopolyplexes Combine

- Strong Antitumor T-Cell Immunity with Improved Inflammatory Safety. *ACS Nano* **12**, 9815–9829 (2018).
50. Nisic, F., Bernardi, A. Stereoselective synthesis of N-galactofuranosyl amides. *Carbohydr. Res.* **346**, 465–471 (2011).
 51. Štimac, A., Kobe, J. Studies on the origin of stereoselectivity in the synthesis of 1,2-trans glycofuranosyl azides. *Carbohydr. Res.* **324**, 149–160 (2000).
 52. Espuelas, S., Thumann, C., Heurtault, B., Schuber, F., Frisch, B. Influence of Ligand Valency on the Targeting of Immature Human Dendritic Cells by Mannosylated Liposomes. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2385–2393 (2008).
 53. Bock, K., Arnarp, J., Lonngren, J. The Preferred Conformation of Oligosaccharides Derived from the Complex-Type Carbohydrate Portions of Glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **129**, 171–178 (1982).
 54. Marcus, Y. *The properties of solvents*. (1998).
 55. Rabie, R., Hammouda, M. M., Elattar, K. M. Cesium carbonate as a mediated inorganic base in some organic transformations. *Res. Chem. Intermed.* **43**, 1979–2015 (2017).
 56. Chappie, T., Helal, C., Kormos, B., Tuttle, J., Verhoest, P. Imidazo-triazine derivatives as PED10 inhibitors. WO/2014/177977 (2014).
 57. Shmakov, S. N., Jia, Y., Pinkhassik, E. Selectively Initiated Ship-In-A-Bottle Assembly of Yolk–Shell Nanostructures. *Chem. Mater.* **26**, 1126–1132 (2014).
 58. Gorodetskaya, I. A., Choi, T.-L., Grubbs, R. H. Hyperbranched Macromolecules via Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12672–12673 (2007).
 59. Lim, D., Brimble, M. A., Kowalczyk, R., Watson, A. J. A., Fairbanks, A. J. Protecting-Group-Free One-Pot Synthesis of Glycoconjugates Directly from Reducing Sugars. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 11907–11911 (2014).
 60. Creary, X., Anderson, A., Brophy, C., Crowell, F., Funk, Z. Method for Assigning Structure of 1,2,3-Triazoles. *J. Org. Chem.* **77**, 8756–8761 (2012).
 61. Walter, M., Wiegand, M., Lindhorst, T. K. Synthesis of Cluster Mannosides Carrying a Photolabile Diazirine Group. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 719–728 (2006).

Chapitre 5 : Propriétés immunostimulantes des composés finaux

Chapitre 5 : Propriétés immunostimulantes des composés finaux

Les composés **26**, **139**, **140**, et **141** ont été synthétisés dans le but d'interagir avec les récepteurs des cellules du système immunitaire afin de l'activer. Les molécules ont ainsi été confiées à l'équipe de Karin Tarte du laboratoire de l'unité INSERM U1236 (Microenvironnement, Cell differentiation, Immunology and Cancer) de Rennes afin de vérifier si elles possèdent une activité immunoadjuvante. Les tests ont été menés sur des monocytes différenciés en macrophages et plus particulièrement, les interactions recherchées sont celles avec le récepteur DC-SIGN. Pour rappel, les macrophages forment un groupe hétérogène de cellules qui exercent de nombreuses fonctions immunitaires au sein des tissus. Certains d'entre eux expriment DC-SIGN et peuvent ainsi reconnaître des glycoprotéines ou des agents pathogènes (figure 66).

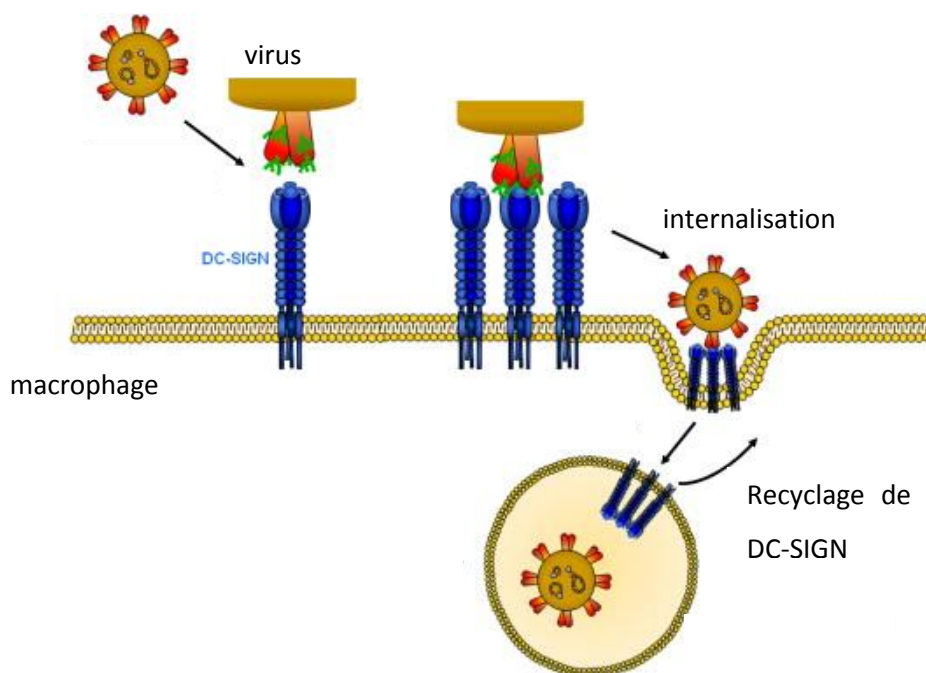


Figure 66 : Mécanisme d'intégration des pathogènes au sein des macrophages *via* DC-SIGN¹

I DC-SIGN

DC-SIGN signifie « dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin » puisque ce récepteur se trouve à la surface des cellules dendritiques et qu'il peut interagir avec les lymphocytes T *via* l'ICAM-3 (une protéine d'adhésion transmembranaire) sans utiliser les récepteurs (les intégrines). On le retrouve majoritairement à la surface des DCs et des macrophages.²

DC-SIGN appartient à la famille des lectines de type C (calcium dépendantes). Dans le système immunitaire, les lectines de types C interviennent dans l'adhésion et dans la reconnaissance des pathogènes. Le plus souvent, les sélectines assurent l'adhésion cellulaire et les collectines la reconnaissance des pathogènes.³ Cependant, DC-SIGN est une lectine responsable à la fois de l'adhésion (interaction avec ICAM-3 qui établit le contact entre DC et LT) et de la reconnaissance des pathogènes. DC-SIGN interagit avec de nombreux ligands.⁴ De par sa structure de CLR, il devrait être spécifique des motifs oligosaccharidiques riches en Mannoses. Cependant, il est également le récepteur de plusieurs glycoprotéines, telles que la gp120 présente dans l'enveloppe virale du VIH, mais aussi avec les glycoprotéines du virus de l'hépatite C,⁵ d'Ebola,⁶ de la Dengue,⁷ etc.

En plus du rôle de récepteur, DC-SIGN est nécessaire pour la migration et l'adhésion des DCs, la mise en place de la réponse inflammatoire, l'activation des LTs et donc l'initiation d'une réponse immune adaptative.⁴

1) Structure de DC-SIGN

DC-SIGN est un récepteur transmembranaire ce qui signifie qu'une partie de la protéine se trouve à l'intérieur de la cellule. Un segment la relie à la partie extracellulaire constituée de la région « neck » et de CRDs permettant la reconnaissance des oligosaccharides⁸ (CRD : carbohydrate recognition domain) (figure 67). Les CRDs contiennent deux hélices α , douze feuillets β et quatre ponts disulfures. Ils possèdent trois sites de fixation du calcium, dont l'un est responsable de l'interaction avec les glycosides (Ca^{2+} n°2, figure 67).⁹ Le cation se coordine aux hydroxyles 3 et 4 du mannose ce qui permet la formation de liaisons hydrogène entre les fonctions alcools des sucres et les acides aminés du récepteur. L'affinité des sucres pour DC-SIGN est assez faible (de l'ordre du mM). Cependant la structure tétramérique du récepteur permet d'augmenter l'affinité avec les ligands (nM) par effet cluster.¹⁰

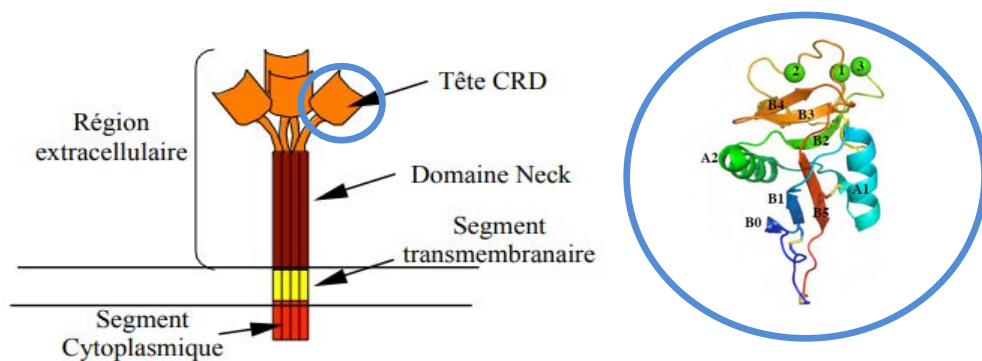


Figure 67 : Présentation schématique de la structure de DC-SIGN et structure du CRD (Ca^{2+} représentées sous la forme de boules vertes)

2) Rôles de DC-SIGN

a) Migration des cellules dendritiques et interaction avec les LTs

L'interaction de DC-SIGN avec une glycoprotéine des cellules endothéliales induit la différenciation des DCs.¹¹ Cela entraîne leur migration vers les ganglions lymphatiques afin d'initier la réponse immunitaire. Cependant l'interaction DC-SIGN/antigène ne conduit pas directement à la maturation des DCs, mais à l'induction de signaux intracellulaires. Ils permettent de phosphoryler plusieurs espèces et de stimuler l'augmentation de la concentration de calcium dans le cytoplasme des DCs, ce qui module leur activation.¹² Une fois dans les ganglions lymphatiques, les DCs présentent les antigènes aux LTs. C'est l'interaction de DC-SIGN avec ICAM-3 (une protéine présente à la surface des LTs) qui permet aux DCs de se lier aux LTs.¹¹ L'activation des LTs est ensuite complétée par les interactions avec les protéines de co-stimulation (CD40, CD80, CD86, etc).

b) DC-SIGN une porte d'entrée pour les pathogènes

Bien que les fonctions de DC-SIGN soient de détecter les pathogènes pour les internaliser au sein des DCs afin d'activer le système immunitaire, plusieurs l'utilisent comme une porte d'entrée pour contourner le système immunitaire.⁸

L'un des exemples le plus connu est le cas du VIH. C'est d'ailleurs en étudiant comment le VIH infectait le corps humain que DC-SIGN a été découvert.² L'une des protéines de l'enveloppe virale du VIH (gp120) possède une grande affinité pour DC-SIGN. Le virus est donc internalisé dans les DCs et transporté jusqu'aux organes lymphoïdes où il est transmis aux lymphocytes T (figure 68).⁸ Contrairement aux autres virus, le VIH n'est pas dégradé au sein des DCs et DC-SIGN n'interagit pas avec l'ICAM-3 des LTs. Il semble même que l'interaction avec DC-SIGN favorise la survie du VIH au sein des DCs, ce qui lui permet de contaminer les LTs même après plusieurs jours.¹³ De nombreuses études sont menées afin de synthétiser des agonistes de la gp120 afin d'inhiber l'interaction avec DC-SIGN.^{14,15}

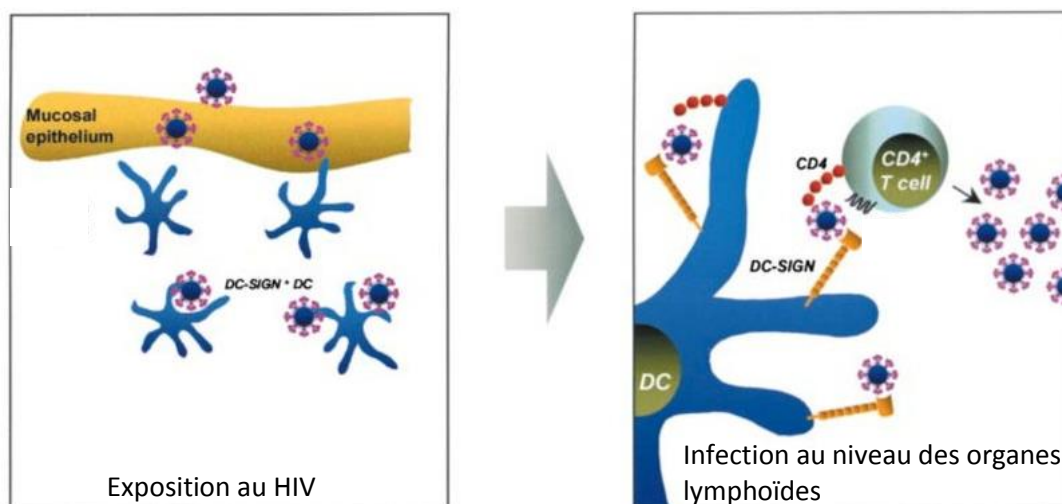


Figure 68 : Implication de DC-SIGN dans la propagation du VIH¹¹

DC-SIGN participe également à la tolérance des cellules cancéreuses. L'interaction de DC-SIGN avec les cellules tumorales, au lieu d'engendrer une réponse immunitaire, induit une suppression de la maturation des DCs ce qui leur permet d'échapper à la surveillance du système immunitaire.¹⁶

II Les travaux du laboratoire MICMAC

Le laboratoire MICMAC travaille notamment sur le lymphome folliculaire qui résulte de l'accumulation de centres germinatifs cancéreux de cellules B.¹⁷⁻¹⁹ Comme les cellules cancéreuses sont issues des cellules B, elles possèdent des BCRs. La partie variable de ces BCRs de cellules cancéreuses est hautement mannosylée, ce qui explique qu'ils interagissent avec DC-SIGN. Cela signifie que DC-SIGN se lie spécifiquement aux cellules cancéreuses et pas aux LBs non cancéreux. Cette interaction entraîne l'agrégation des BCRs et envoie un signal de survie aux cellules tumorales. L'inhibition de DC-SIGN par un anticorps antagoniste diminue la liaison entre les cellules cancéreuses et les macrophages (qui possèdent ce récepteur). Bloquer cette communication permet donc de relancer l'activité des macrophages à l'encontre des cellules cancéreuses. La synthèse d'inhibiteur de DC-SIGN est donc une piste intéressante pour la mise au point d'un traitement contre ce lymphome.¹⁸

III Les tests réalisés sur les composés 26, 139, 140, 141

Le but des tests menés au sein du laboratoire MICMAC de Rennes, est de démontrer une interaction entre les composés synthétisés et les récepteurs DC-SIGN présents sur les macrophages. Si les composés se lient aux récepteurs des macrophages, ils devraient également interagir avec les

récepteurs présents sur les DCs. Ils représentent donc un bon modèle de l'activation du système immunitaire.

Pour mener les tests, des monocytes ont été extraits d'échantillon de sang humain et purifiés. Ces derniers ont été mis en culture dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal et les cytokines G-MCF et IL4 pour induire une polarisation Macrophage M2. Après 6 jours de culture, le milieu est remplacé par un milieu contenant du sérum de veau fœtal, du calcium, du magnésium ainsi que l'une des molécules **26**, **139**, **140** ou **141** (figure 69). Le sérum de veau contient les protéines nécessaires à la survie des monocytes. Le calcium et le magnésium sont ajoutés au milieu de culture afin de favoriser la fixation des ligands sur DC-SIGN (comme il a été décrit précédemment, le calcium joue un rôle crucial dans l'interaction entre le ligand et le récepteur).

Après 24 heures en présence des molécules, les monocytes ont ensuite été récupérés, puis mélangés à un cocktail d'immunoglobulines humaines qui se lient aux récepteurs qui fixent les parties constantes des anticorps. Cette étape permet de saturer tous les récepteurs non spécifiques des anticorps de souris utilisés par la suite pour mettre en avant une activation de DC-SIGN. Trois anticorps spécifiques différents ont été utilisés afin de cibler trois récepteurs CD80, CD86 et HLA-DR (figure 69). L'expression de ces récepteurs est augmentée lors de la polarisation. Chacun de ces anticorps est lié à un fluorochrome différent afin de connaître le niveau d'expression de chaque récepteur.

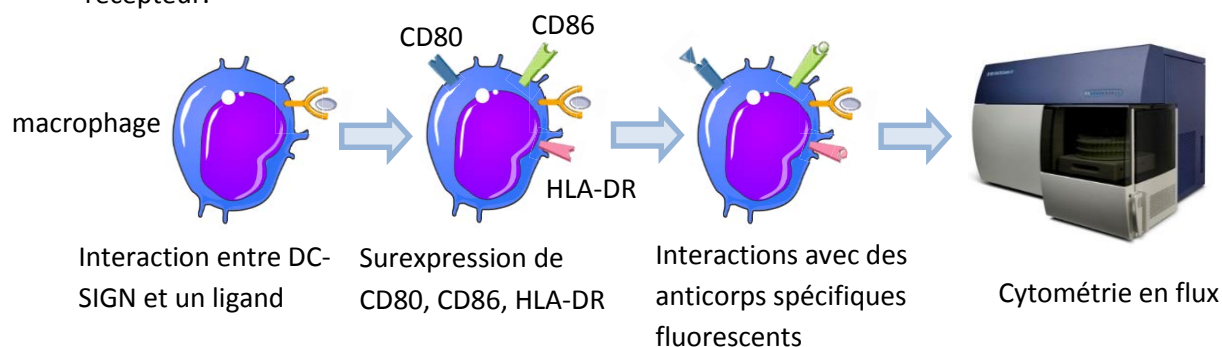


Figure 69 : Tests biologiques menés sur les molécules 26, 139 et 140

Les résultats sont obtenus par cytométrie en flux. La cytométrie est une méthode d'analyse qui consiste à faire passer des cellules marquées par des sondes fluorescentes devant un faisceau laser afin de les exciter. Dans notre cas si les anticorps se sont fixés sur les récepteurs alors une fluorescence devrait être observée.²⁰

Les produits **26**, **139**, **140** et **141** ont été testés à des concentrations de 1 et 10 µg/mL. La figure 70 présente les résultats observés par cytométrie en flux sur les composés **26**, **139** et **140** à la concentration la plus importante (10 µg/mL). En comparant les courbes obtenues pour chaque milieu

de culture avec le contrôle négatif, on peut conclure qu'aucune variation de l'expression des récepteurs CD80, CD86 et HLA-DR n'a été observée en présence des molécules **26**, **139** et **140**. Les composés n'auraient donc pas interagit avec DC-SIGN. Ces résultats sont toutefois à nuancer, en effet, les composés ne se sont pas solubilisés de manière efficace dans le milieu. Nous ne pouvons donc pas être sûrs des quantités de produits qui ont été réellement placées dans le milieu de culture. Des études de solubilité des composés sont donc à prévoir afin d'optimiser ces résultats et de pouvoir conclure sur leur propriétés immunoadjuvantes.

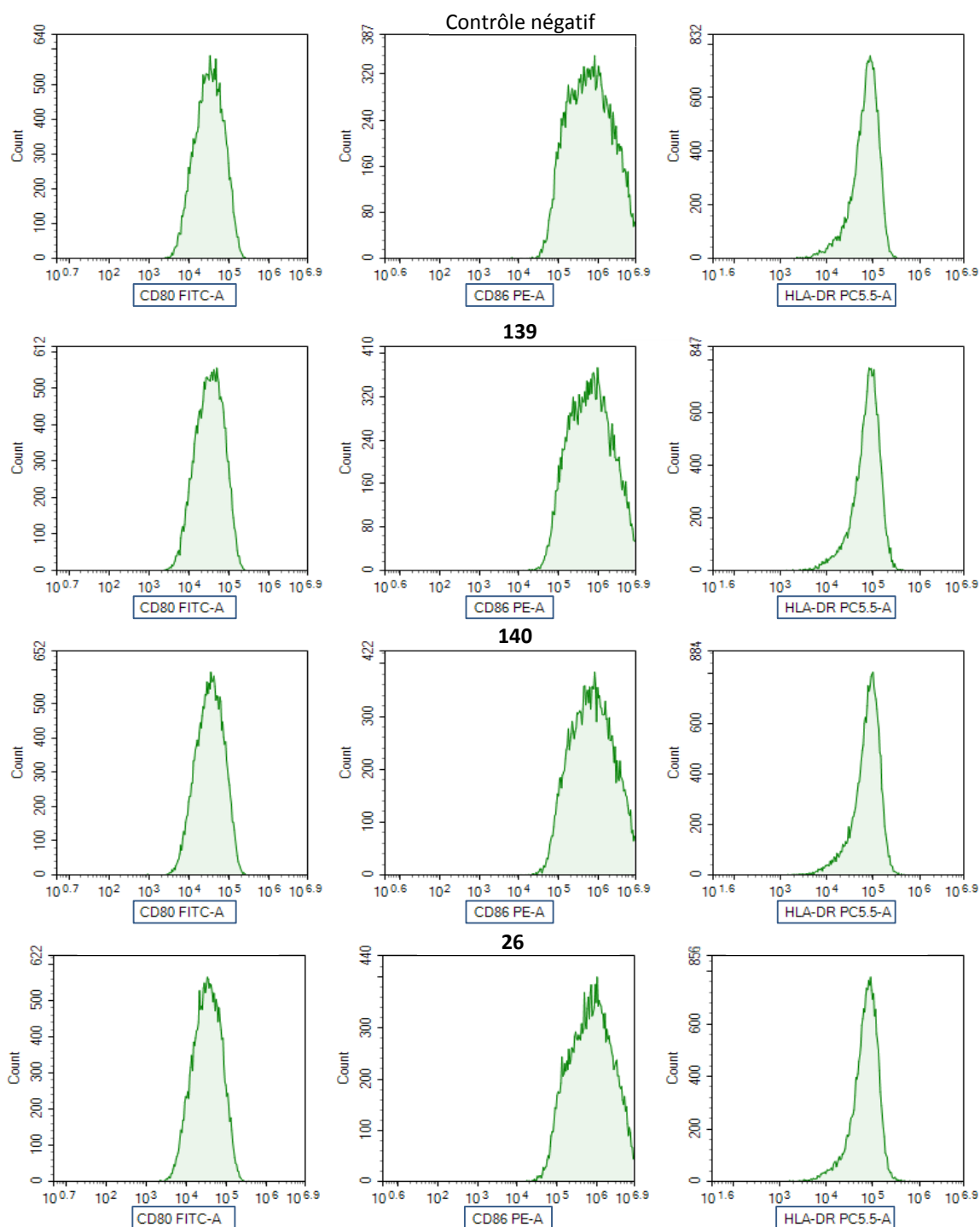


Figure 70 : Fluorescence observée suite à l'interaction de DC-SIGN avec les composés 26, 139 et 140

Lors d'une seconde série de tests, le composé **141** a été mis en présence des cellules dendritiques. Cela explique que l'élure des courbes du contrôle négatif soit différents sur les figures 70 et 71. La capacité de **141** à interagir avec DC-SIGN a d'abord été testée pour une concentration de 10 µg/mL. La fluorescence observée par cytométrie en flux pour les trois marqueurs CD80, CD86 et HLA-DR est reportée sur la figure 71. En superposant les courbes obtenues en présence de **141** et celles du contrôle négatif, on peut observer une augmentation du nombre de cellules présentant une fluorescence spécifique de CD86 et de HLA-DR. Cela signifie donc que le composé **141** a interagit avec DC-SIGN, malgré les problèmes de solubilisation identiques à ceux observés pour **26**, **139** et **140**.

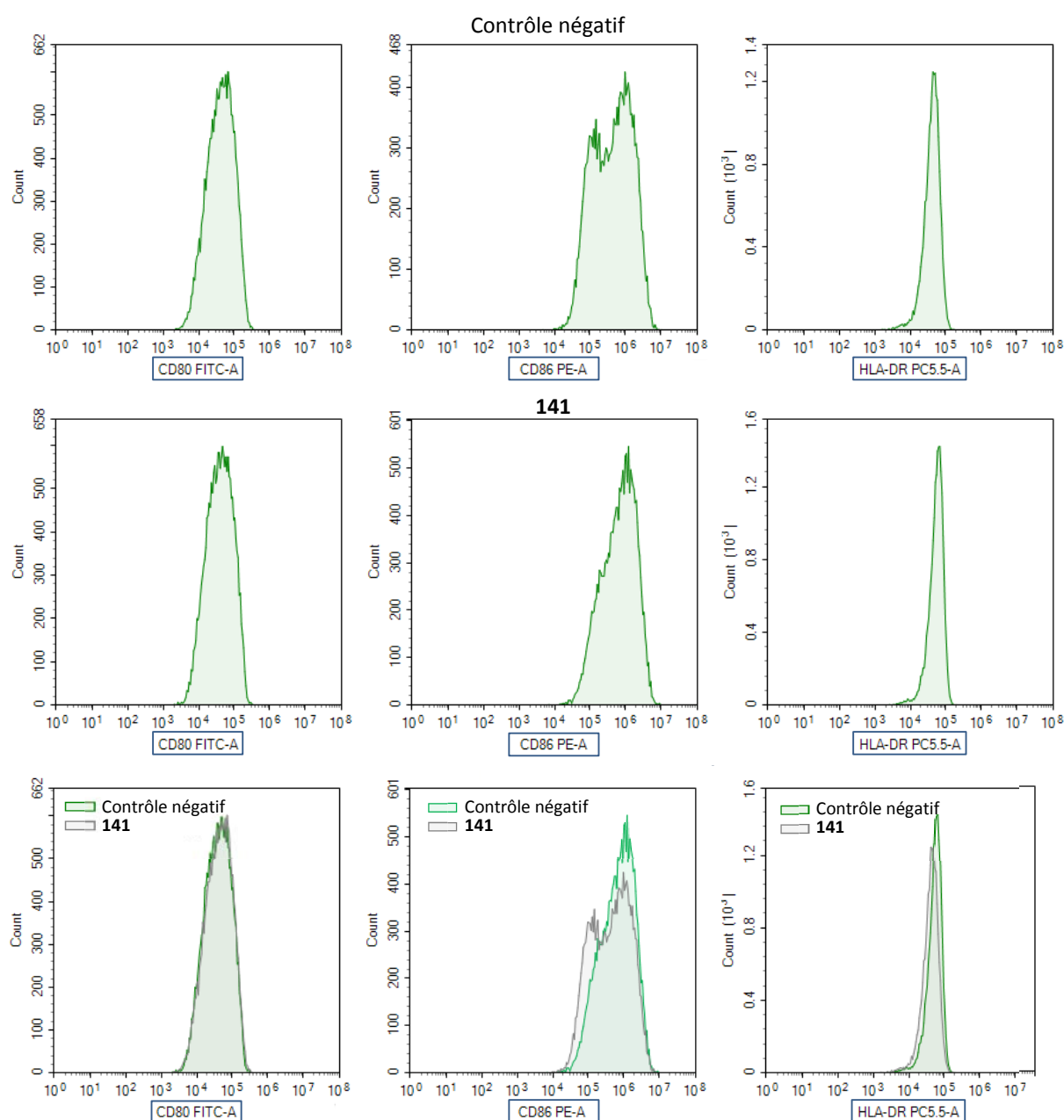


Figure 71 : Fluorescence observée suite à l'interaction de DC-SIGN avec les composés **141**

Suite à ces résultats encourageants, **141** a été testé à une concentration de 1 µg/mL (figure 72). Cette fois encore une augmentation de la fluorescence a été observée pour CD86 et HLA-DR, indiquant que le composé fluoré **141** interagit avec DC-SIGN même à faible concentration. Etrangement, cette interaction est même plus importante que celle observée à 10 µg/mL de **141**.

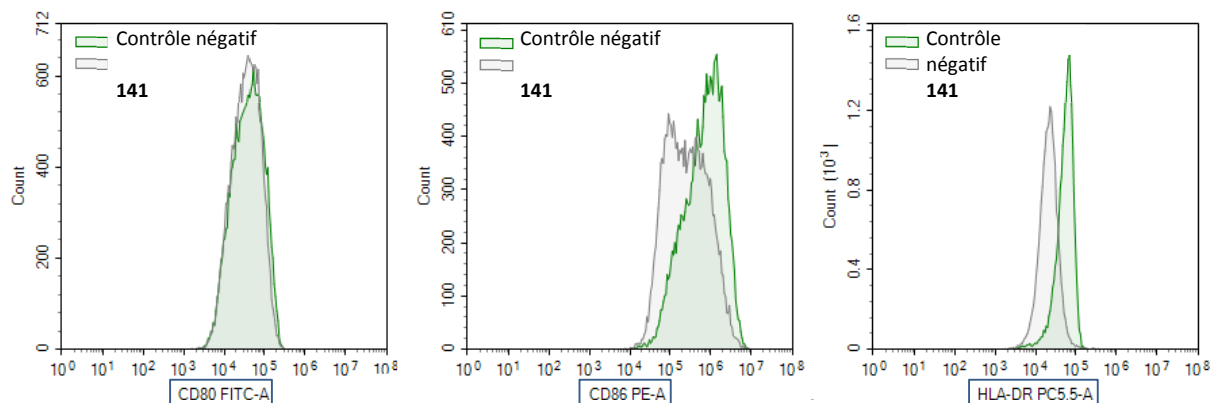


Figure 72 : Comparaison de la fluorescence observée suite à l'interaction de DC-SIGN avec les composés **141 avec celle du contrôle négatif**

IV Conclusion

Quatre composés **26**, **139**, **140** et **141** ont été testés sur des macrophages humains au laboratoire MICMAC de Rennes. Les composés galactofuranosylés (non fluoré) et mannopyranosylés ne semblent pas interagir avec DC-SIGN. Seul le composé **141**, supportant trois motifs galactofuranosides fluorés, a montré une activation des récepteurs des macrophages. Cela démontre l'impact des atomes de fluor sur la reconnaissance des molécules par les récepteurs DC-SIGN.

De plus, l'interaction entre **141** et DC-SIGN semble être plus importante pour une concentration en molécules actives de 1 µg/mL qu'à 10 µg/mL.

Les résultats négatifs sont toutefois à nuancer. Des problèmes de solubilités des composés dans le milieu de culture peuvent être à l'origine de cette absence d'interaction entre les composés **26**, **139**, **140** et les récepteurs DC-SIGN. La présence de la double chaîne lipidique augmente l'hydrophobie des molécules et diminue ainsi leur solubilité dans les milieux aqueux utilisés pour réaliser les tests biologiques. Résoudre cette problématique pourrait ainsi permettre d'obtenir des résultats différents.

L'absence d'interaction entre **140** et DC-SIGN est surprenante au vu des résultats obtenus précédemment au sein du laboratoire avec le composé trimannosylé **9**. Cependant ces glycolipides avaient été testés une fois formulés sous la forme de liposome, ce qui pourrait expliquer cette différence de réactivité. Cela pourrait également être à l'origine de l'absence d'interaction entre les

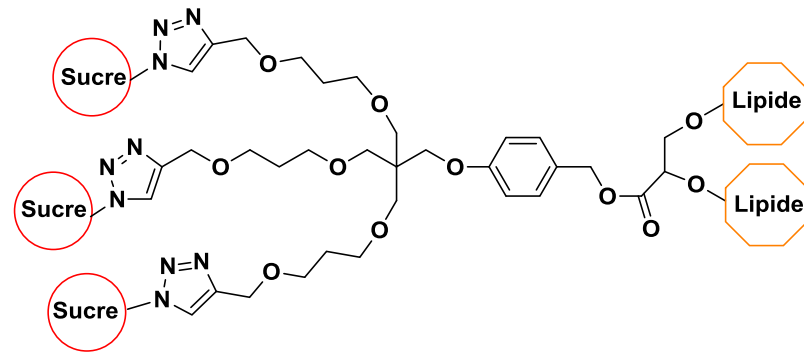
composés **26** et **139** avec les récepteurs. L'utilisation du fluor serait donc à l'origine des résultats positifs observés pour **141**. Il serait donc intéressant de pouvoir mener des tests similaires sur une formulation composée de liposomes des différents glycolipides synthétisés au cours de ce travail de thèse.

Références

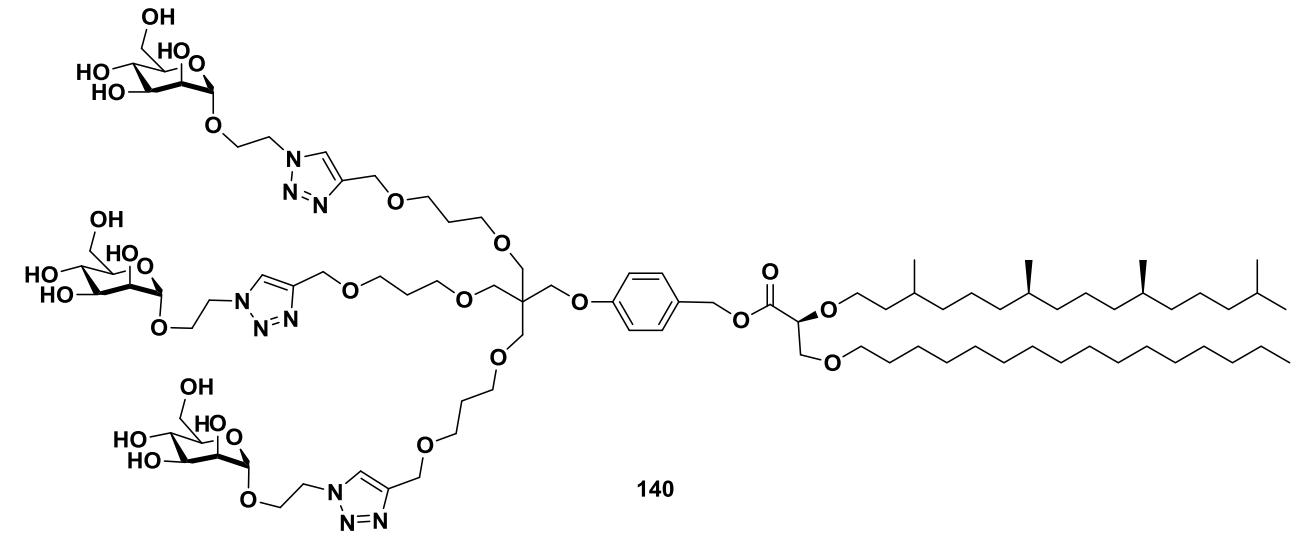
1. Hofmann, H., Pöhlmann, S. DC-SIGN: Access Portal for Sweet Viral Killers. *Cell Host Microbe* **10**, 5–7 (2011).
2. Soilleux, E. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related DCSIGNR: Friend or foe? *Clin Sci (Lon)*. **4**, 437–446 (2003).
3. Weis, W. I., Taylor, M. E., Drickamer, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* **163**, 19–34 (1998).
4. Geijtenbeek, T. B., den Dunnen, J., Gringhuis, S. I. Pathogen recognition by DC-SIGN shapes adaptive immunity. *Future Microbiol.* **4**, 879–890 (2009).
5. Zeisel, M. B., Barth, H., Schuster, C., Baumert, T. F. Hepatitis C virus entry: molecular mechanisms and targets for antiviral therapy. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **14**, 3274–3285 (2009).
6. Alvarez, C. P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A., Delgado, R. C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J. Virol.* **76**, 6841–6844 (2002).
7. Tassaneetrithep, B., Burgess, T., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D., Steinman, R., Schlesinger, S., Marovich, M. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **197**, 823–829 (2003).
8. Celerino da Silva, R., Segat, L., Crovella, S. Role of DC-SIGN and L-SIGN receptors in HIV-1 vertical transmission. *Hum. Immunol.* **72**, 305–311 (2011).
9. Feinberg, H. Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **294**, 2163–2166 (2001).
10. Berzi, A., Ordanini, S., Joosten, B., Trabattoni, D., Cambi, A., Bernardi, A., Clerici, M. Pseudo-Mannosylated DC-SIGN Ligands as Immunomodulants. *Sci. Rep.* **6**, 35373 (2016).
11. Engering, A., Geijtenbeek, T., van Vliet, S., Wijers, M., van Liemp, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Frigdor, C., Piguet, V., van Kooyk, Y. The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *J. Immunol.* **168**, 2118–2126 (2002).
12. Caparrós, E., Munoz, P., Sierra-Filardi, E., Serrano-Gomez, D., Puig-Kröger, A., Rodríguez-Fernández, J., Mellado, M., Sancho, J., Zubiaur, M., Corbi, A. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* **107**, 3950–3958 (2006).
13. Turville, S., Wilkinson, J., Cameron, P., Dable, J., Cunningham, A. L. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 710–718 (2003).
14. Berzi, A., Reina, J., Ottria, R., Sutkeviciute, I., Antonazzo, P., Sanchez-Navarro, M., Chabrol, E., Biasin, M., Trabattoni, D., Cetin, I., Rojo, J., Fieschi, F., Bernardi, A., Clerici, M. A glycomimetic compound inhibits DC-SIGN-mediated HIV infection in cellular and cervical explant models: *AIDS* **26**, 127–137 (2012).
15. Sattin, S., Daggetti, A., Thépaut, M., Berzi, A., Sánchez-Navarro, M., Tabarani, G., Rojo, J., Frieschi, F., Clerici, M., Bernadi, A. Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV Infection by a Linear Trimannoside Mimic in a Tetravalent Presentation. *ACS Chem. Biol.* **5**, 301–312 (2010).
16. van Gisbergen, K. P. J. M., Aarnoudse, C. A., Meijer, G. A., Geijtenbeek, T. B. H., van Kooyk, Y. Dendritic Cells Recognize Tumor-Specific Glycosylation of Carcinoembryonic Antigen on Colorectal Cancer Cells through Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin. *Cancer Res.* **65**, 5935–5944 (2005).
17. Tarte, K. Role of the microenvironment across histological subtypes of NHL. *Hematology* **2017**, 610–617 (2017).

18. Amin, R., Mourcin, F., Uhel, F., Panault, C., Ruminy, P., Dupré, L., Guirrec, M., Marchand, T., Fest, T., Lamy, T., Tarte, K. DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood* **126**, 1911–1920 (2015).
19. Amé-Thomas, P., Tarte, K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: Role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin. Cancer Biol.* **24**, 23–32 (2014).
20. Roubinet, F., Cassar, G., Gleizes, B. Principes de la cytométrie en flux. *Annales de Recherches Vétérinaires* **20**, 221–222 (1989).

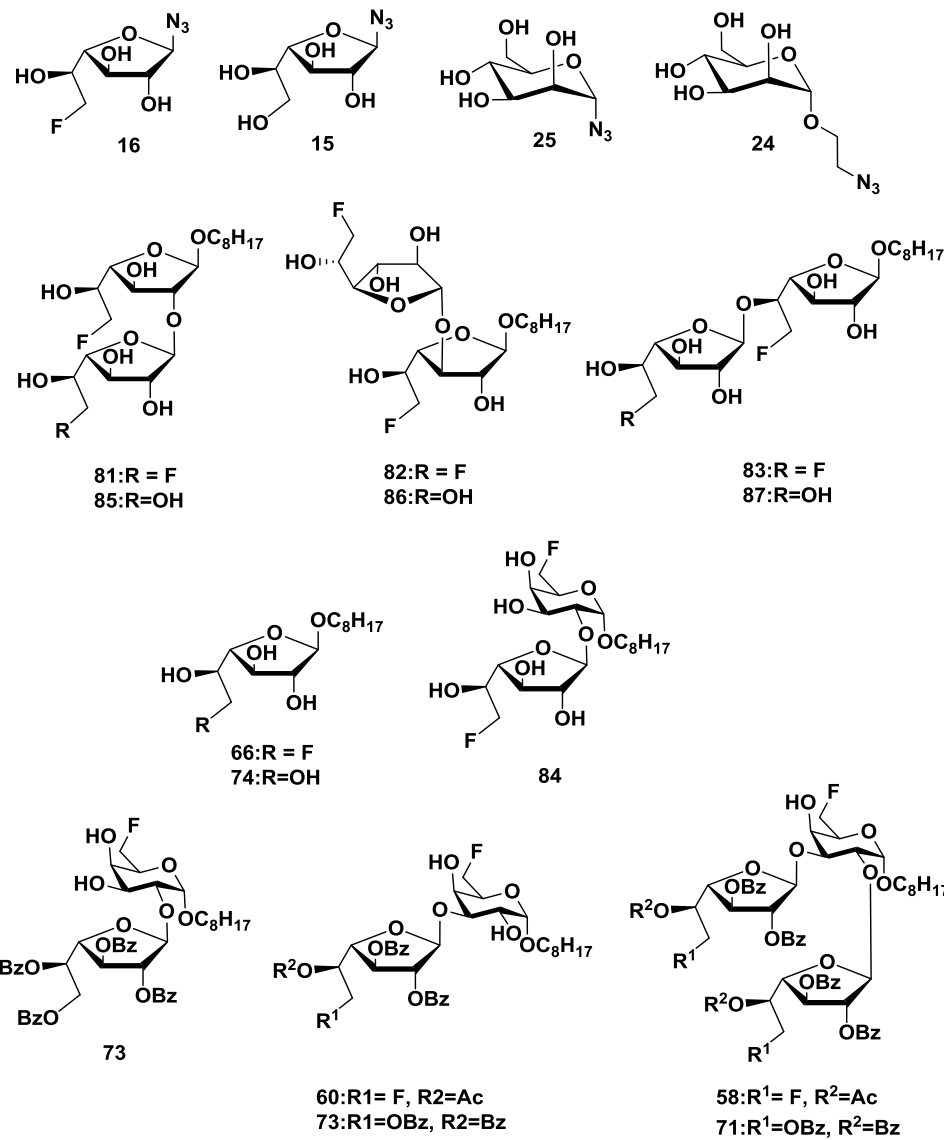
MOLECULE CIBLE



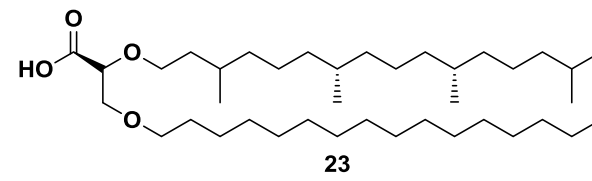
COMPOSES FINAUX



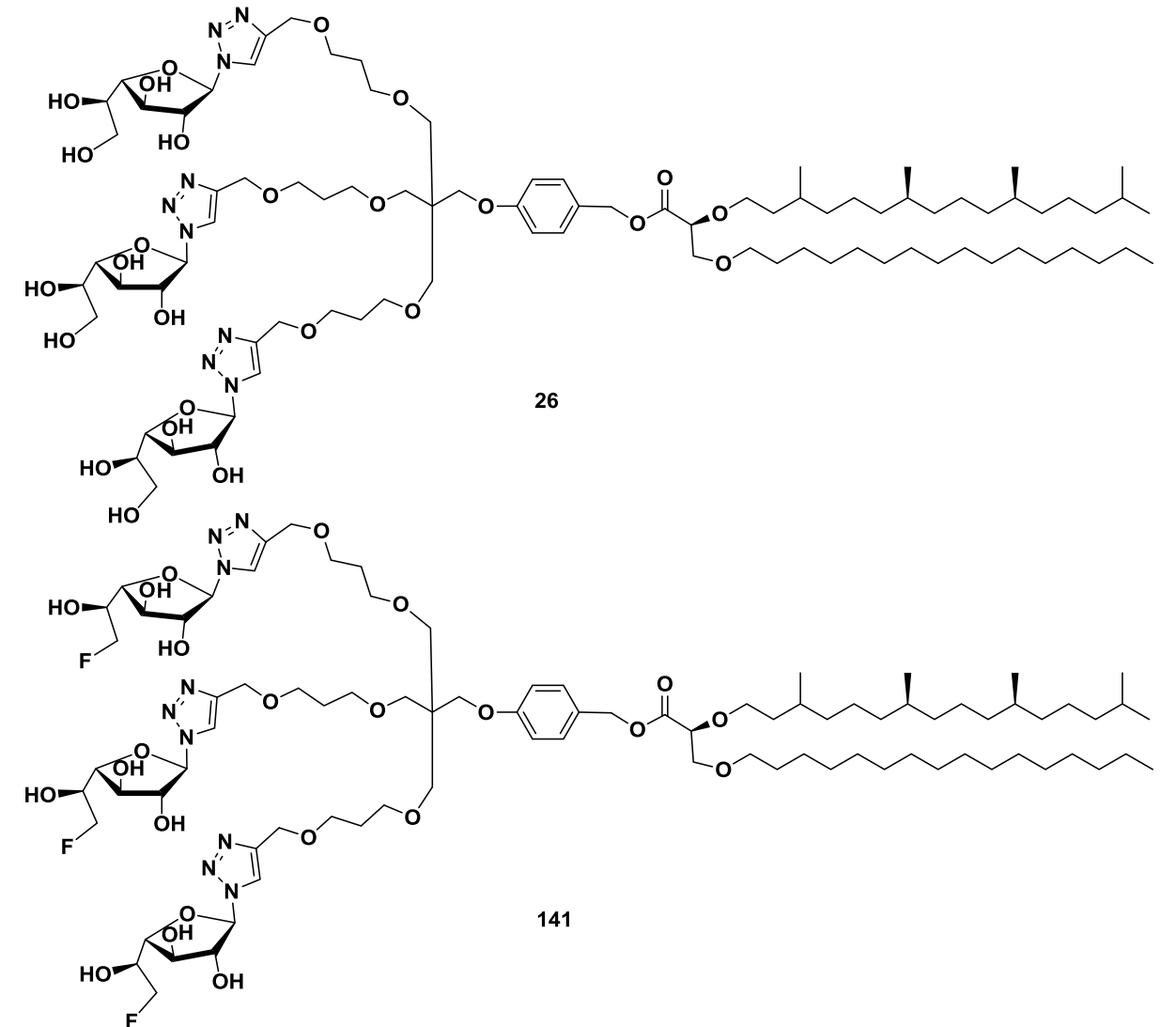
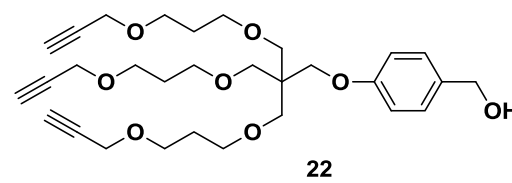
LES SUCRES



LE LIPIDE



LA PLATEFORME



Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ce travail de thèse a consisté à développer et optimiser la synthèse de **glycolipides modulables** (figure 73) grâce à une molécule plateforme. Ces composés ont été conçus dans le but de tester leur capacité à interagir et à activer les cellules du système immunitaire (cellules dendritiques et macrophages) *via* des récepteurs spécifiques (récepteur à mannose et DC-SIGN). Les molécules visées ont été divisées en trois fractions distinctes (saccharidique, lipidique et plateforme) afin de suivre une stratégie de synthèse convergente. Chaque partie a été choisie afin de conférer des propriétés immunoadjuvantes aux composés.

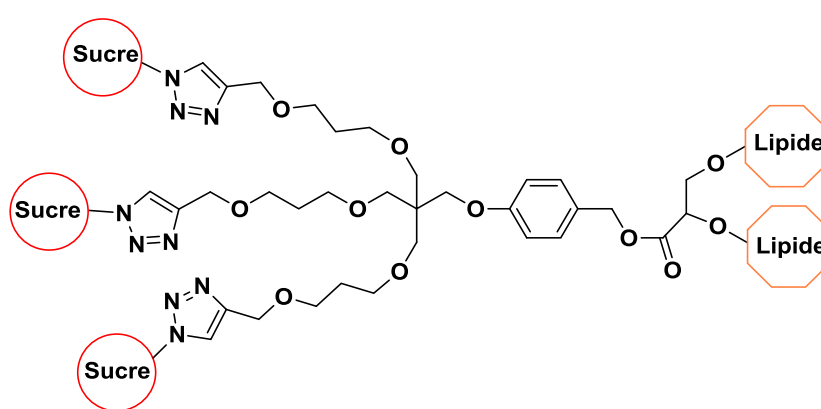


Figure 73 : Structure des molécules cibles

La **plateforme** a été conçue pour relier la partie lipidique à la partie saccharidique. Sa structure est inspirée de celle de composés naturels, des bartolosides issus de bactéries marines. Elle s'articule autour d'un motif phénolique relié à un pentaérythritol. La structure ramifiée du pentaérythritol permet de mettre à profit le concept de la multiprésentation. La multiprésentation des sucres est utilisée afin d'augmenter l'affinité de la molécule pour les récepteurs biologiques. De nombreuses études ont mis en évidence que les ligands multivalents interagissent de manière plus importante avec les récepteurs que leurs analogues monovalents. Les trois bras du pentaérythritol ont été allongés d'une courte chaîne se terminant par une triple liaison afin de coupler la plateforme aux motifs saccharidiques par une cycloaddition 1,3-dipolaire. Des problèmes de réactivité dus à l'encombrement de l'éther triallylique de pentaérythritol nous ont orientés vers la synthèse de l'intermédiaire **133**, afin de pouvoir réaliser la substitution nucléophile de ce dernier par le dérivé phénolique et obtenir l'intermédiaire clé **124** (schéma 53). Ce composé, après déprotection des fonctions hydroxyles et élongation des chaînes, a mené à la synthèse du composé **22** avec un rendement global de 13%.

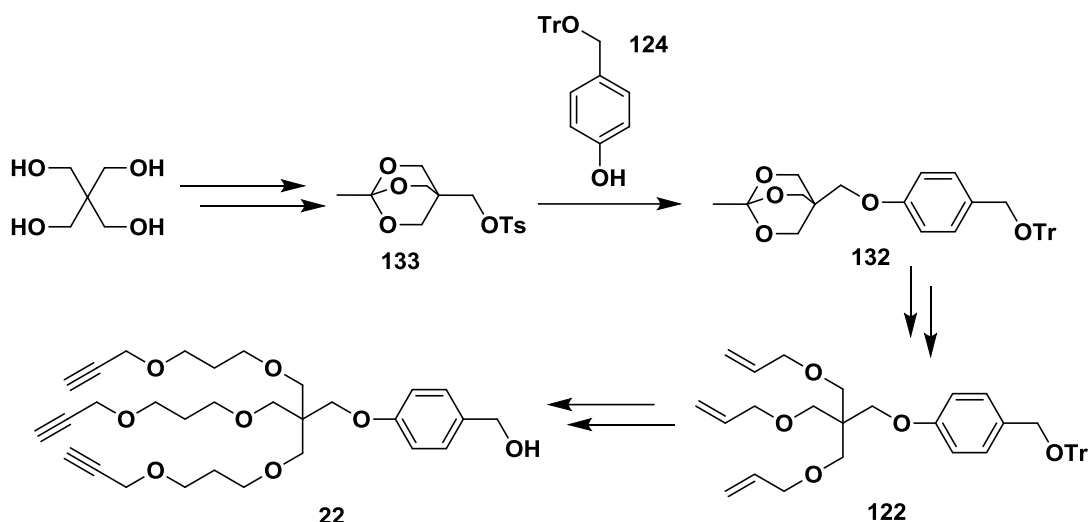


Schéma 53 : Synthèse de la plateforme

La **partie lipidique** a été choisie d'après des travaux antérieurs menés au laboratoire sur des lipides particuliers, issus des Archaea. Ces composés confèrent une grande stabilité aux membranes des microorganismes de par leur structure ramifiée. Ils sont largement étudiés pour leur propriétés immunoadjuvantes et leur capacité à véhiculer des molécules bioactives. En partant du (*R*)-solketal nous avons pu sélectivement greffer une chaîne phytanyle sur l'hydroxyle secondaire. Dans un second temps, une chaîne linéaire a été ajoutée par substitution nucléophile sur l'hydroxyle secondaire (schéma 54). Le dérivé du glycérol obtenu a alors pu être déprotégé et la fonction alcool oxydé pour obtenir l'acide carboxylique **23** avec un rendement de 8%.

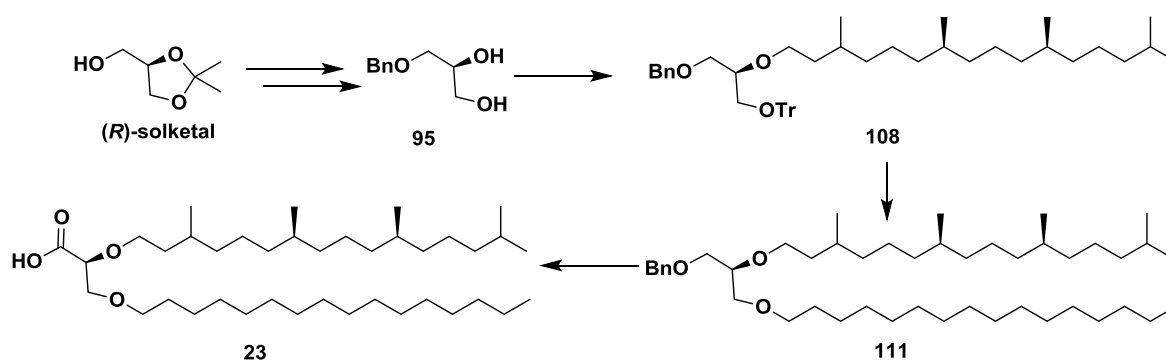


Schéma 54 : Synthèse de la partie lipidique

Deux séries de **sucres** ont été retenues : le **mannose** sous forme pyranosidique et le galactose sous forme furanosidique. Le premier est connu pour interagir avec les récepteurs à mannose, présents notamment sur les cellules dendritiques. Le **galactofuranose** n'est pas présent chez les mammifères. Il est donc reconnu comme molécule extérieure au Soi par les cellules du système immunitaire. Cette détection passe par le récepteur lectinique DC-SIGN. Plusieurs motifs galactofuranosidiques ont été

imaginés, mono- ou disaccharides ainsi que la substitution de l'hydroxyle en position 6 par un atome de fluor. Trois monosaccharides **15**, **16**, **24** ont pu être obtenus dans des quantités suffisantes pour poursuivre la synthèse des molécules cibles (figure 74).

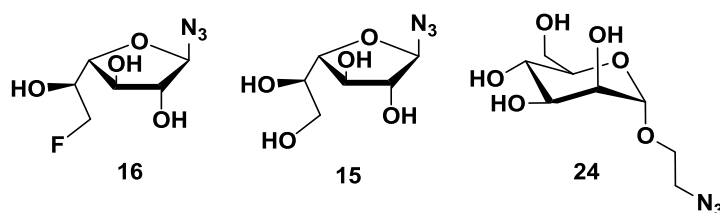


Figure 74 : Structures des azotures saccharidiques synthétisées

La partie plateforme a ainsi pu être couplée à la partie lipidique *via* une **estérification** puis aux saccharides par une **réaction click catalysée au cuivre**. Ces deux dernières étapes ont permis d'obtenir trois molécules cibles (figure 75). Ces trois composés ont été ou sont actuellement testés pour leurs **propriétés d'activation des macrophages** au laboratoire MICMAC du CHU Pontchaillou de Rennes.

Bien que les molécules cibles aient été synthétisées avec succès, certaines étapes de notre approche restent à être optimisées, notamment les deux derniers couplages. L'estérification ne présente qu'un rendement de 18% et la réaction click des rendements de 6 à 37%.

Les molécules **26**, **139**, **140** et **141** ont été testées au laboratoire MICMAC sur des macrophages. Les trois premiers composés ne semblent pas interagir avec le récepteur DC-SIGN. Cependant, ces résultats sont à nuancer puisque les composés ne sont pas solubles dans le milieu de culture. La formulation des molécules sous forme de **liposome** pourrait permettre de pallier ce problème de solubilité en milieu aqueux. Une activité encourageante a pu être observée dans le cas du composé **141**, démontrant l'intérêt de l'atome de fluor sur la molécule. Des investigations supplémentaires doivent être menées afin de confirmer et étudier le type d'interaction de **141** avec les cellules du système immunitaire et plus particulièrement DC-SIGN.

De nombreuses autres variations de la partie lipidique avaient été envisagées afin d'étudier l'influence de la structure des chaînes sur les propriétés biologiques des composés. La synthèse de diéthers comportant les **deux chaînes grasses identiques** (ramifiées ou linéaires) serait intéressante, tout comme l'incorporation de **cycles** afin de mimer d'autres structures d'archaéolipides. L'ajout d'halogènes, notamment d'atomes de **chlore** au sein de la chaîne comme c'est le cas dans certains microorganismes, est également une idée intéressante à développer.

La partie saccharidique peut également être modulée, aucune **structure disaccharidique** portant une fonction azoture n'a pu être synthétisée au cours du projet. Il serait intéressant de poursuivre cet objectif afin de pouvoir étudier l'influence d'un second motif osidique sur les propriétés biologiques.

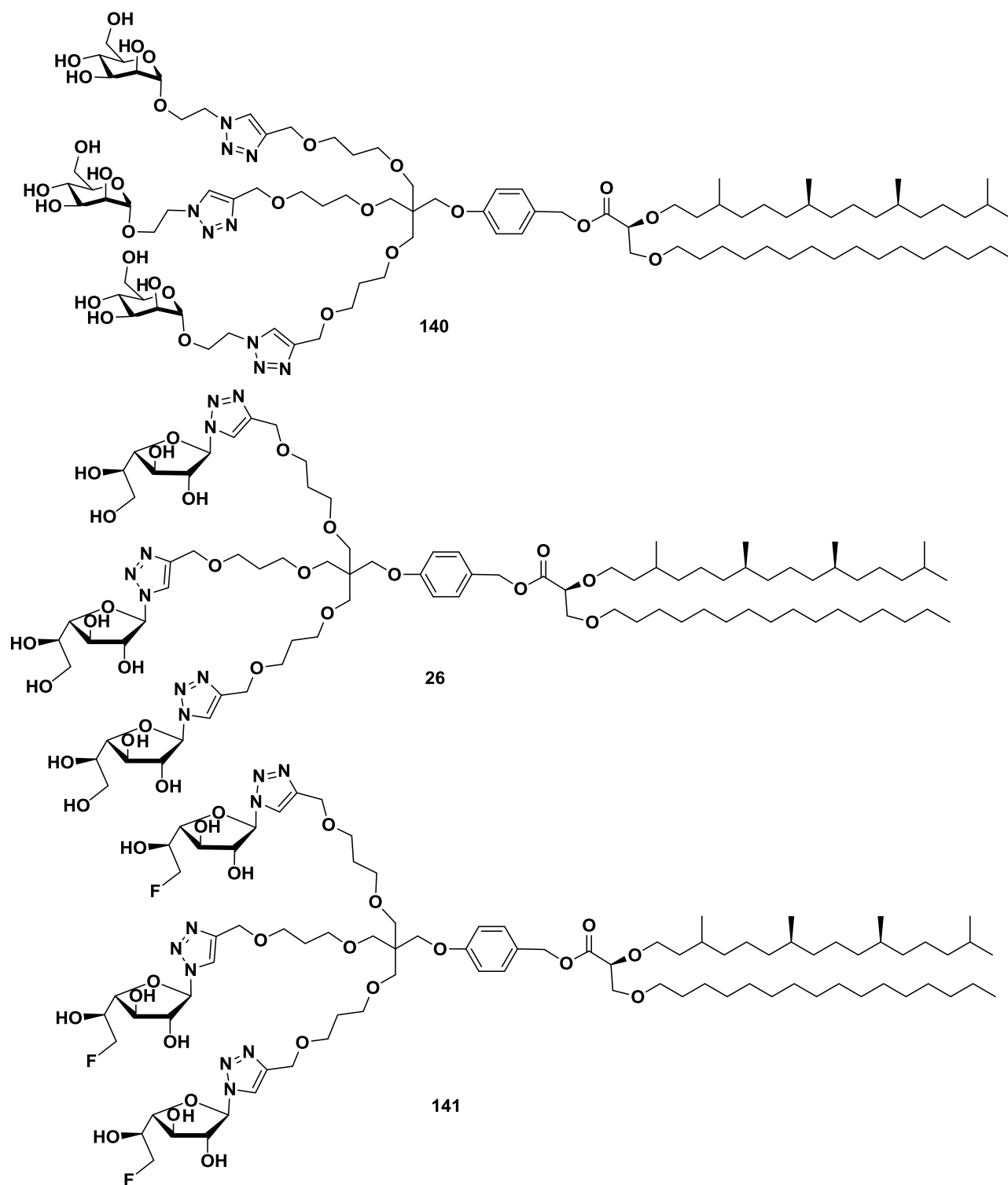


Figure 75 : Structure des molécules finales synthétisées

La synthèse des différents difuranosides nous a donné l'opportunité de pouvoir étudier l'influence de l'atome de fluor sur la réactivité et sur la régiosélectivité du couplage glycosidique. Une synthèse modèle a été mise en place mettant en réaction un donneur (fluoré ou non) et un accepteur de glycosyle fluoré en position 6 (figure 76).

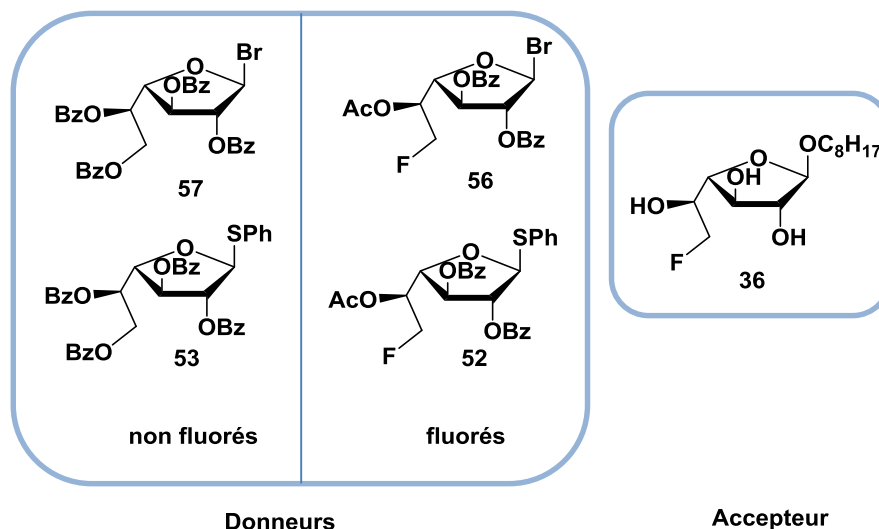


Figure 76: Donneurs et accepteur de glycosyle synthétisés

Les donneurs fluorés possèdent une réactivité plus faible que les non fluorés. Les difuranosides substitués en (1→2) et (1→3) ont pu être synthétisés, ainsi que de nombreux produits plus surprenants. Parmi ces produits ont été caractérisés :

- les composés **66** et **74** issus du transfert de l'aglycone de l'accepteur vers le donneur de glycosyle,
- les dérivés pyranosidiques substitués en (1→2) et (1→3), provenant de l'isomérisation de l'entité réductrice,
- les composés difuranosidiques greffés en (1→5),
- les trisaccharides.

L'optimisation de ces réactions de glycosylation a permis de limiter la formation de certains co-produits sans pour autant parvenir à améliorer significativement les rendements. D'autres familles de donneurs telles que les trichloroacétimides pourraient être testées. La réaction pourrait également être tentée avec un accepteur non fluoré en position 6, afin de vérifier si ce dernier influe sur la réactivité. Une seconde voie d'accès aux difuranosides difluorés a été envisagée mais n'a pas pu être réalisée faute de temps. Elle passe par la synthèse d'un donneur et d'un accepteur de glycosyle non fluorés. La fluoration sera menée après la réaction de glycosylation entre les deux entités (schéma 55).

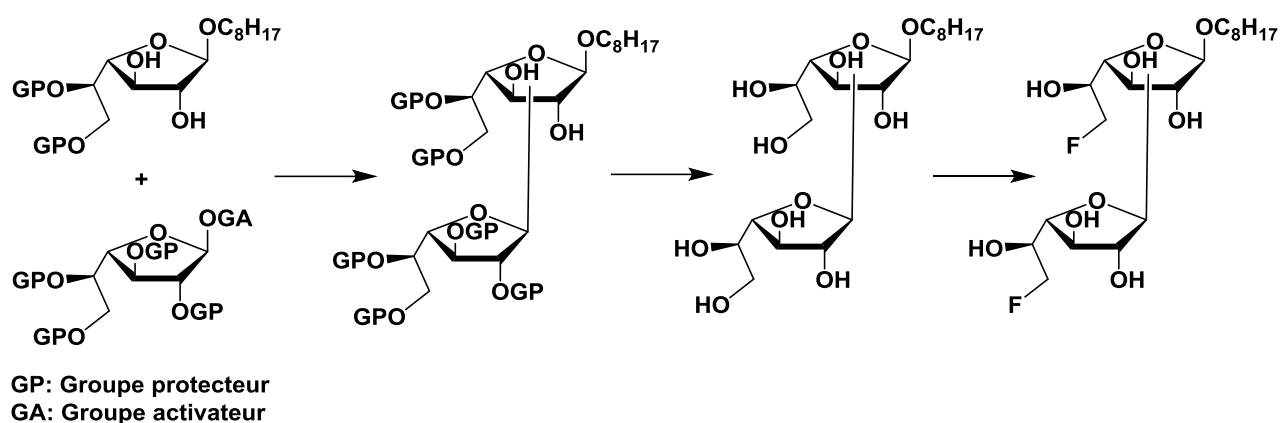


Schéma 55: Alternative pour la synthèse des disaccharides fluorés

Ces travaux de thèse ont été présentés lors de plusieurs congrès nationaux et internationaux :

- International Capirinha Christmas Congress in Translational Chemistry 2017 à Lisbonne. Poster et flash communication (prix de la flash communication).
- Congrès National de la Société Chimique de France 2018 à Montpellier. Communication orale.
- Eurocarb 2019 à Leiden. Poster et flash communication.

Une publication sur les travaux de synthèse est en cours de soumission.

Titre : Plateforme modulable pour le développement de glycolipide à potentiel immunoadjuvant

Mots clés : glycolipides, archaéolipides, mannopyranoside, galactofuranoside, multiprésentation, immunoadjuvant

Résumé : L'évolution constante des vaccins a mené les chercheurs à se concentrer sur l'injection de fragments antigéniques toujours plus petits. Des immunoadjuvants sont ajoutés aux formulations dans le but d'augmenter l'intensité et la durée de la réponse immunitaire.

Les glycolipides sont des composés qui possèdent des propriétés immunoadjuvantes puisqu'ils peuvent transporter des agents thérapeutiques et/ou interagir avec les cellules du système immunitaire. Les lipides d'Archaea sont connus pour leur grande stabilité et leur capacité à former des archaeosomes qui activent

les réponses immunitaires. Les sucres, notamment les mannopyranosides et les galactofuranosides ont la capacité de cibler et d'interagir avec les

récepteurs présents sur les cellules dendritiques (récepteur à mannose, DC-SIGN). Ces récepteurs étant multivalents, les glycolipides possédant plusieurs unités sucres possèdent une affinité supérieure aux composés monovalents. L'objectif de ce projet de thèse était de synthétiser des molécules aisément modulables qui combinent les propriétés des archaéolipides, des sucres et de la multiprésentation. Trois composés finaux ont ainsi pu être synthétisés et sont actuellement soumis à des tests biologiques. En parallèle, ce travail a également permis d'étudier la régiosélectivité de couplages glycosidiques en présence d'un atome de fluor.

Title : Modulable platform for the development of potent immunoadjuvant glycolipids

Keywords : glycolipid, archaeolipid, mannopyranoside, galactofuranosides, multiprésentation

Abstract : The constant evolution of vaccines led research teams to focus on the injection of smaller antigenic patterns. Immunoadjuvants are added to formulations in order to have better and longer lasting immune response.

Glycolipids are compounds having immunoadjuvant properties since they can act as vehicle for therapeutic agents and/or interact with the immune system cells. Archaea' lipids are known for their great stability and their capacity to form archaeosome that activate immune responses. Carbohydrates, like mannopyranosides and galactofuranosides can target and interact with receptors on dendritic cells (mannose receptor,

DC-SIGN). These receptors are multivalent so glycolipids having several carbohydrate patterns possess a greater affinity compared to monovalent ones. This thesis goal was to synthesize molecules that can be easily modified combining properties of the archaeolipids, the carbohydrates and the multivalency. Three final compounds were synthesized and are tested for their biological properties. In the same time, we had the opportunity to study the influence of fluorine atom on the regioselectivity of glycosylation reactions.