

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

11 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

3 022 458

21 N° d'enregistrement national : 14 55818

51 Int Cl<sup>8</sup> : A 61 K 31/7028 (2013.01), A 61 P 31/18, 35/00

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 23.06.14.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 25.12.15 Bulletin 15/52.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE Etablissement public — FR et CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE BREST — FR.

72 Inventeur(s) : BERTHOU CHRISTIAN, BONDU STEPHANIE, DESLANDES ERIC, EL CHEIKH KHALED, MORERE ALAIN, BOUFFARD ELISE, FABRE MARIE-SOPHIE et ROUE-FOURMANTIN NATHALIE.

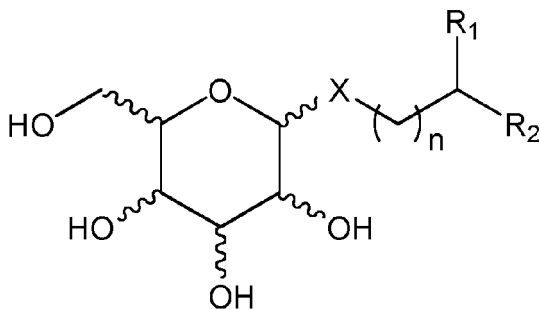
73 Titulaire(s) : UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE Etablissement public, CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE BREST.

74 Mandataire(s) : CABINET REGIMBEAU Société civile.

54 UTILISATION DU MANNOSYLGLYCERATE ET SES DERIVES COMME AGENT IMMUNOSTIMULANT.

57 La présente invention concerne des composés de formule générale (I)

(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, OR<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, et R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, leur procédé de fabrication et leur utilisation comme agent immunostimulant, notamment pour la prévention et le traitement de pathologies néoplasiques et infectieuse.



dans laquelle n représente un nombre entier compris entre 0 et 3, préférentiellement n représente 0; X représente O, NR<sub>3</sub> ou S, préférentiellement X représente O, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, P(O)(OR<sub>4</sub>)(OR<sub>5</sub>), P(O)(OR<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>, SO<sub>2</sub>(OR<sub>4</sub>) ou SO<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> représente H,

FR 3 022 458 - A1



La présente invention se rapporte de manière générale au domaine de l'immunostimulation.

En particulier, la présente invention concerne des composés ainsi que leur procédé de synthèse et un extrait d'algue ou des bactéries comprenant un de ces composés, utiles comme agent immunostimulant, notamment pour la prévention et le traitement de pathologies néoplasiques et infectieuses.

D'une manière spécifique, les composés et l'extrait d'algue ou des bactéries de la présente invention sont utiles comme agent immunostimulant pour la prévention vaccinale et le traitement de différents types de cancer et du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquis).

Pendant de nombreuses années, le rôle du système immunitaire dans la défense anti-tumorale est resté sujet à controverse. Les progrès substantiels permis par les radio- et chimiothérapies ont également eu tendance à faire oublier son implication dans le contrôle des pathologies cancéreuses durant plusieurs décennies.

Aujourd'hui, il est connu qu'un système immunitaire activé est capable de surveiller, reconnaître et détruire les cellules malignes *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cette capacité à combattre l'invasion tumorale est limitée par la variabilité, la complexité et la dynamique des cellules tumorales. En effet, ces cellules sont capables de moduler la réponse immunitaire dirigée contre elles et de modifier leur microenvironnement afin d'échapper à la surveillance de l'organisme.

Les avancées cognitives dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la reconnaissance immunitaire et de sa régulation ont ouvert la voie à de nouvelles approches immunothérapeutiques. Depuis la fin des années 1990, les plus courantes et les plus efficaces reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Mabs). A ce jour, six anticorps sont utilisés dans le traitement des hémopathies malignes (le rituximab (RTX), le gemtuzumab ozagamicin, l'yttrium-90 Ibritumomab-Tiuxetan, l'alemtuzumab, le tositumomab, l'ofatumumab). Ces molécules ciblent et tuent directement les cellules tumorales à la faveur des antigènes qu'elles expriment, de manière plus spécifique, plus efficace et avec moins d'effets secondaires que les chimiothérapies conventionnelles. Mais les taux de réponses à ces traitements sont très variables et des résistances, dues aux stratégies développées par les cellules tumorales afin d'échapper à la surveillance du système immunitaire, peuvent apparaître. De plus, leur utilisation en tant que monothérapie est marginale, et c'est encore associé aux chimiothérapies que ces anticorps présentent le meilleur bénéfice thérapeutique.

Aujourd'hui, une connaissance approfondie du domaine de l'immunologie fondamentale ainsi que de nombreuses données cliniques ont permis l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'agent ciblant, non plus la tumeur elle-même, mais son environnement, afin d'activer une immunité anti-tumorale défaillante. Il peut s'agir d'anticorps monoclonaux ciblant les cellules immunitaires, des cytokines ou des molécules naturelles ou chimiques. Ces molécules au fort potentiel immuno-stimulateur peuvent être utilisées dans le but de stimuler l'immunité naturelle et de potentialiser l'action des anticorps monoclonaux anti-tumoraux par le biais de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ou de la phagocytose. Des études cliniques récentes ont combiné ces agents immuno-stimulateurs avec un anticorps monoclonal, le RTX dans le but de proposer des solutions thérapeutiques aux patients atteints de pathologies résistantes, généralement associées à un mauvais pronostic (Hout *et al.*, Cancer Metastasis Rev, 2011). Certains essais cliniques présentés ne permettent pas d'évaluer le bénéfice clinique de la combinaison des drogues immuno-modulatrices avec le rituximab versus le rituximab seul (nombre de patients faibles, aucune randomisation, pas de bras avec le rituximab seul ou en comparaison). Le RTX seul a donné 48% de taux de réponse globale pour des patients LNH indolent (lymphome non hodgkinien) avec seulement 6% de réponse complète (Mc Laughlin *et al.*, J Clin Oncol, 1998). La combinaison, par exemple du Lenalidomide avec le RTX pour des patients LNH indolent a donné 74% de réponse objective, avec 44% de réponse complète Tuscano *et al.*, Br J Haematol, 2014).

Il subsiste néanmoins toujours un besoin de disposer de composés immunostimulants pouvant être utilisés soit en association avec d'autres agents anti-tumoraux, en particulier des anticorps monoclonaux anti-tumoraux, soit en monothérapie dans le cadre de pathologies néoplasiques.

Outre le besoin de disposer de composés immunostimulants dans le traitement anti-tumoraux, un besoin est également ressenti dans le cadre de la prévention anti-tumorale où de tels composés immunostimulants peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres agents de prévention.

Par ailleurs, même si durant ces dix dernières années, les progrès scientifiques et médicaux ont été remarquables en matière de prévention et de traitement de maladies infectieuses, en particulier, pour le SIDA, il subsiste toujours un besoin de disposer de composés immunostimulants de plus en plus efficaces et précis.

Le rôle du système immunitaire dans l'inflammation et la carcinogénèse est hautement influencé par le microenvironnement. Certaines maladies peuvent montrer des caractéristiques uniques où les processus immuno-régulateurs sont hautement bénéfiques pour l'hôte, mais dans

d'autres cas ils seront préjudiciables et prédisposeront à la persistance du pathogène et à l'augmentation du risque de cancer.

L'immunisation des individus sains avec un vaccin de l'hépatite B (HB) induit une réponse protectrice par anticorps. 1 à 10% des sujets ne répondent pas à l'immunisation et présentent de ce fait un risque d'infection. La production des anticorps anti-HB suivant la vaccination ou l'infection est dépendante des cellules T helper. Le système HLA joue un rôle important dans la réponse par anticorps aux antigènes de l'hépatite B. En effet de nombreuses études ont montré le rôle précis des cytokines dérivées des Th1 et Th2 dans la réponse immune à la vaccination contre l'hépatite B. Des analyses ont montré que des sujets adultes ne répondant pas à l'immunisation présentent de défauts dans les réponses Th1, Th2 ou dans les deux à la fois (Velu *et al.*, Worl J Gastroenterol,2008).

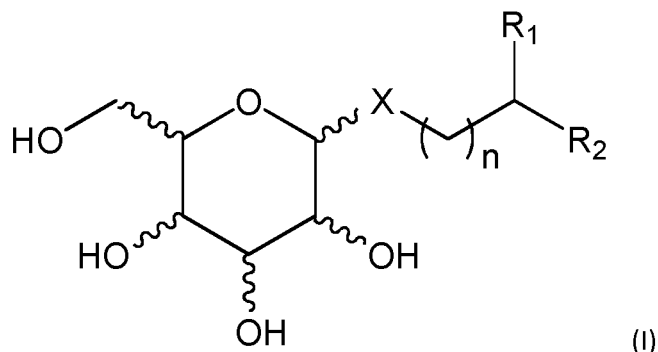
En outre, de nouvelles approches sont nécessaires dans la prophylaxie et la thérapie du virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) , qui complèteraient et synergiseraient avec les stratégies traditionnelles centrées sur la stimulation des réponses acquises. Le design du vaccin VIH a été jusqu'à présent principalement focalisé sur l'induction d'anticorps spécifiques au virus ou sur la réponse des cellules T. De nombreux essais cliniques ont montré des résultats avec des immunogènes ciblant les antigènes et les cellules T. Une protection de vie courte a également été observée dans la phase III la plus récente contre le VIH (Rerks-Ngarm *et al.*, N Engl J Med, 2009) De nombreux intervenants de la réponse innée peuvent soit inhiber l'infection des virus, soit accroître sa réplication. du virus. Il est difficile de trouver un juste milieu entre une bonne réponse immune conduisant à l'éradication du pathogène ou de la tumeur et une mauvaise réponse créant un environnement favorable à ces derniers.

Il est donc nécessaire de disposer de composés adjuvants dans un vaccin qui peuvent influencer le système immunitaire et notamment les cellules T CD4<sup>+</sup>, induisant une réponse Th1 ou Th2.

De manière surprenante, les inventeurs ont montré que les composés de formule générale (I) présentent des propriétés immunostimulatrices. En particulier, ils ont mis en évidence que l'utilisation de ces composés permet d'augmenter l'activité anti-tumorale des monocytes et des polynucléaires neutrophiles. Ainsi ces composés peuvent être utilisés pour la prévention et le traitement de pathologies néoplasiques.

Les inventeurs ont également mis en évidence que ces composées peuvent être utiles comme agents immunostimulants pour la prévention vaccinale des maladies infectieuses telle que le SIDA.

En outre, les inventeurs ont montré que cette molécule ne présente pas de toxicité ni vis-à-vis des cellules tumorales ni vis-à-vis des cellules saines. Ainsi selon un premier aspect, l'invention a pour objet un composé de formule (I) suivante :



5 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, notamment un mélange d'énantiomères tel qu'un mélange racémique,

dans laquelle :

- n représente un nombre entier compris entre 0 et 3, de préférence représente 0,
- 10 - X représente O, NR<sub>3</sub> ou S, de préférence O,
- R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, P(O)(OR<sub>4</sub>)(OR<sub>5</sub>), P(O)(OR<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>, SO<sub>2</sub>(OR<sub>4</sub>) ou SO<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>,
- R<sub>2</sub> représente H, (C1-C6)alkyle, OR<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, et
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou
- 15 (C1-C6)alkyle,

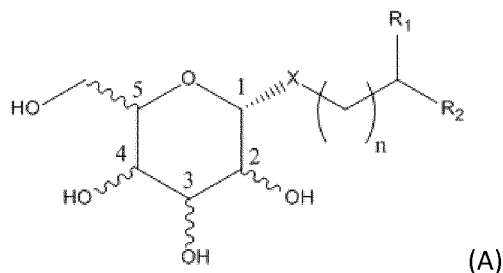
pour son utilisation en tant que médicament, préférentiellement en tant qu'immunostimulant ou pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

De manière préférée selon la présente invention, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>,  
20 C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>.

De manière plus préférée selon la présente invention, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, et de manière encore plus préférée, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>.

De manière préférée selon la présente invention, R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un composé de formule (A) suivante :



ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions,

dans laquelle :

- n représente un nombre entier compris entre 0 et 3, préférentiellement 0,
- X représente O, NR<sub>3</sub>, ou S, préférentiellement O,
- R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, P(O)(OR<sub>4</sub>)(OR<sub>5</sub>), P(O)(OR<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>, SO<sub>2</sub>(OR<sub>4</sub>) ou SO<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, préférentiellement R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>,
- R<sub>2</sub> représente H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, OR<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, préférentiellement R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub>, et
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle,

pour son utilisation en tant que médicament, préférentiellement en tant qu'immunostimulant ou pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (A), R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>.

De manière plus préférée selon la présente invention dans le composé de formule (A), R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, et de manière encore plus préférée, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>.

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (A),  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (A),  $n$  est égal à 0,  $X$  représente O,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

5 De manière préférée, le carbone n° 2 dans la formule (A) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 1, 2 et 3 dans la représentation ci-dessus de (A).

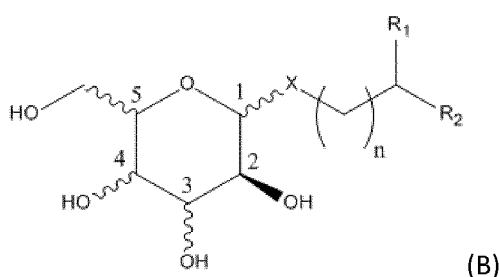
De manière préférée, le carbone n° 3 dans la formule (A) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 2, 3 et 4 dans la représentation ci-dessus de (A).

10 De manière préférée, le carbone n° 4 dans la formule (A) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par les carbones 3, 4 et 5 dans la représentation ci-dessus de (A).

De manière préférée, le carbone n° 5 dans la formule (A) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 4, 5 et l'oxygène du cycle pyranose dans la représentation ci-dessus de (A).

15 De manière préférée, dans la formule (A) et dans ses modes préférés de réalisation tels que définis ci-dessus,  $n$  est égal à 0,  $X$  représente O,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$ , dans lesquels  $R_4$ , et  $R_6$  représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou  $(C_1-C_6)$ alkyle.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un composé de formule (B) suivante :



20 ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions,

dans laquelle :

- $n$  représente un nombre entier compris entre 0 et 3, préférentiellement 0,
- $X$  représente O,  $NR_3$ , ou S, préférentiellement O,

- $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $COR_4$ ,  $CH_2OR_4$ ,  $C(O)NR_4R_5$ ,  $C(O)N(OR_5)R_4$ ,  $CH_2NR_4R_5$ ,  $P(O)(OR_4)(OR_5)$ ,  $P(O)(OR_4)R_5$ ,  $SO_2(OR_4)$  ou  $SO_2NR_4R_5$ , préférentiellement  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ , ,
- $R_2$  représente H,  $(C_1-C_6)$ alkyle,  $OR_6$ ,  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ , préférentiellement  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$ , et

- 5        -  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  et  $R_7$  représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou  $(C_1-C_6)$ alkyle,

pour son utilisation en tant que médicament, préférentiellement en tant qu'immunostimulant ou pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

- 10        De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (B),  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $COR_4$ ,  $CH_2OR_4$ ,  $C(O)NR_4R_5$ ,  $C(O)N(OR_5)R_4$ ,  $CH_2NR_4R_5$ .

De manière plus préférée selon la présente invention dans le composé de formule (B),  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $COR_4$ ,  $CH_2OR_4$ ,  $C(O)NR_4R_5$ ,  $C(O)N(OR_5)R_4$ , et de manière encore plus préférée,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ .

- 15        De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (B),  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (B), n est égal à 0, X représente O,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

- 20        De manière préférée, le carbone n° 1 dans la formule (B) est de configuration S, ou dit également  $\alpha$ , c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par l'oxygène du cycle pyranose et les carbones 1, et 2 dans la représentation ci-dessus de (B).

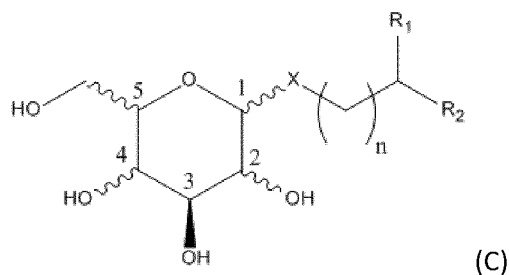
De manière préférée, le carbone n° 3 dans la formule (B) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 2, 3 et 4 dans la représentation ci-dessus de (B).

- 25        De manière préférée, le carbone n° 4 dans la formule (B) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par les carbones 3, 4 et 5 dans la représentation ci-dessus de (B).

De manière préférée, le carbone n° 5 dans la formule (B) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 4, 5 et l'oxygène du cycle pyranose dans la représentation ci-dessus de (B).

De manière préférée, dans la formule (B) et dans ses modes préférés de réalisation tels que définis ci-dessus, n est égal à 0, X représente O, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub>, dans lesquels R<sub>4</sub>, et R<sub>6</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle.

5 Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un composé de formule (C) suivante :



ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions,

dans laquelle :

- 10
- n représente un nombre entier compris entre 0 et 3, préférentiellement 0,
  - X représente O, NR<sub>3</sub>, ou S, préférentiellement O,
  - R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, P(O)(OR<sub>4</sub>)(OR<sub>5</sub>), P(O)(OR<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>, SO<sub>2</sub>(OR<sub>4</sub>) ou SO<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, préférentiellement R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>,
  - R<sub>2</sub> représente H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, OR<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, préférentiellement R<sub>2</sub> représente
- 15 CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub>, et
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle,

pour son utilisation en tant que médicament, préférentiellement en tant qu'immunostimulant ou pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les

20 pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (C), R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>.

De manière plus préférée selon la présente invention dans le composé de formule (C),  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $COR_4$ ,  $CH_2OR_4$ ,  $C(O)NR_4R_5$ ,  $C(O)N(OR_5)R_4$ , et de manière encore plus préférée,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ .

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (C),  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (C),  $n$  est égal à 0,  $X$  représente O,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

De manière préférée, le carbone n° 1 dans la formule (C) est de configuration S, ou dit également  $\alpha$ , c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par l'oxygène du cycle pyranose et les carbones 1, et 2 dans la représentation ci-dessus de (C).

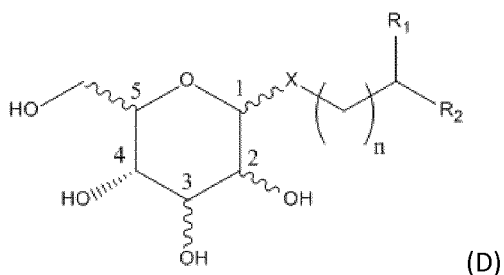
De manière préférée, le carbone n° 2 dans la formule (C) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 1, 2 et 3 dans la représentation ci-dessus de (C).

De manière préférée, le carbone n° 4 dans la formule (C) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par les carbones 3, 4 et 5 dans la représentation ci-dessus de (C).

De manière préférée, le carbone n° 5 dans la formule (C) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 4, 5 et l'oxygène du cycle pyranose dans la représentation ci-dessus de (C).

De manière préférée, dans la formule (C) et dans ses modes préférés de réalisation tels que définis ci-dessus,  $n$  est égal à 0,  $X$  représente O,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$ , dans lesquels  $R_4$ , et  $R_6$  représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou  $(C_1-C_6)$ alkyle.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un composé de formule (D) suivante :



ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions,

dans laquelle :

- n représente un nombre entier compris entre 0 et 3, préférentiellement 0,
- X représente O, NR<sub>3</sub>, ou S, préférentiellement O,
- R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>,  
5 P(O)(OR<sub>4</sub>)(OR<sub>5</sub>), P(O)(OR<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>, SO<sub>2</sub>(OR<sub>4</sub>) ou SO<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, préférentiellement R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, ,
- R<sub>2</sub> représente H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, OR<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, préférentiellement R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> , et
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-  
10 C<sub>6</sub>)alkyle,

pour son utilisation en tant que médicament, préférentiellement en tant qu'immunostimulant ou pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (D), R<sub>1</sub>  
15 représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>.

De manière plus préférée selon la présente invention dans le composé de formule (D), R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, et de manière encore plus préférée, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>.

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (D), R<sub>2</sub>  
20 représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>.

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (D), n est égal à 0, X représente O, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>.

De manière préférée, le carbone n° 1 dans la formule (D) est de configuration S, ou dit également α, c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par l'oxygène du cycle pyranose et les  
25 carbones 1, et 2 dans la représentation ci-dessus de (D).

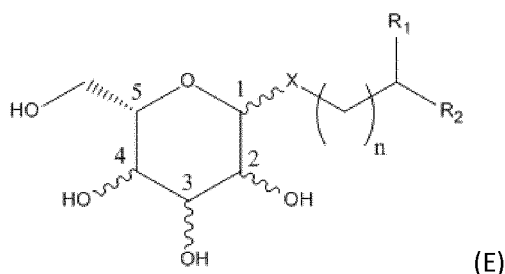
De manière préférée, le carbone n° 2 dans la formule (D) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 1, 2 et 3 dans la représentation ci-dessus de (D).

De manière préférée, le carbone n° 3 dans la formule (D) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 2, 3 et 4 dans la représentation ci-dessus de (D).

De manière préférée, le carbone n° 5 dans la formule (D) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 4, 5 et l'oxygène du cycle pyranose dans la représentation ci-dessus de (D).

De manière préférée, dans la formule (D) et dans ses modes préférés de réalisation tels que définis ci-dessus, n est égal à 0, X représente O, R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub>, dans lesquels R<sub>4</sub>, et R<sub>6</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un composé de formule (E) suivante :



ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions,

dans laquelle :

- 15
- n représente un nombre entier compris entre 0 et 3, préférentiellement 0,
  - X représente O, NR<sub>3</sub>, ou S, préférentiellement O,
  - R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, P(O)(OR<sub>4</sub>)(OR<sub>5</sub>), P(O)(OR<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>, SO<sub>2</sub>(OR<sub>4</sub>) ou SO<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, préférentiellement R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>,
  - R<sub>2</sub> représente H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, OR<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, préférentiellement R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub>, et
- 20
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle,

pour son utilisation en tant que médicament, préférentiellement en tant qu'immunostimulant ou pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (E),  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $COR_4$ ,  $CH_2OR_4$ ,  $C(O)NR_4R_5$ ,  $C(O)N(OR_5)R_4$ ,  $CH_2NR_4R_5$ .

De manière plus préférée selon la présente invention dans le composé de formule (E),  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $COR_4$ ,  $CH_2OR_4$ ,  $C(O)NR_4R_5$ ,  $C(O)N(OR_5)R_4$ , et de manière encore plus préférée,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ .

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (E),  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

De manière préférée selon la présente invention dans le composé de formule (E),  $n$  est égal à 0,  $X$  représente O,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

De manière préférée, le carbone n° 1 dans la formule (E) est de configuration S, ou dit également  $\alpha$ , c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par l'oxygène du cycle pyranose et les carbones 1, et 2 dans la représentation ci-dessus de (E).

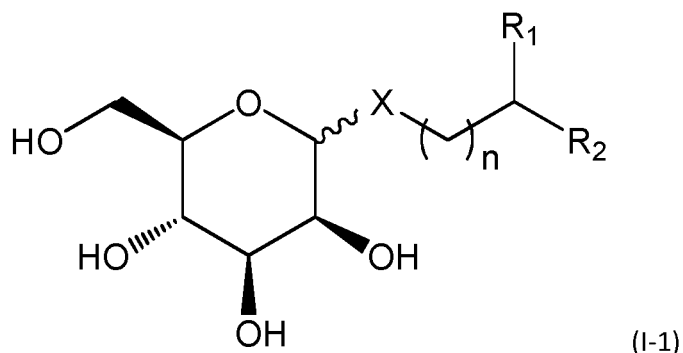
De manière préférée, le carbone n° 2 dans la formule (E) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 1, 2 et 3 dans la représentation ci-dessus de (E).

De manière préférée, le carbone n° 3 dans la formule (E) est de configuration S, c'est-à-dire la liaison est à l'avant du plan défini par les carbones 2, 3 et 4 dans la représentation ci-dessus de (E).

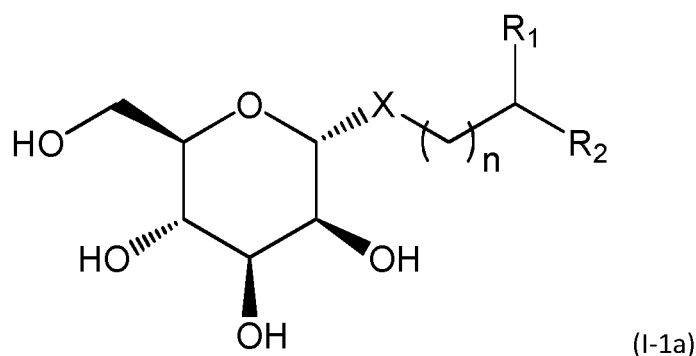
De manière préférée, le carbone n° 4 dans la formule (E) est de configuration R, c'est-à-dire la liaison est à l'arrière du plan défini par les carbones 3, 4 et 5 dans la représentation ci-dessus de (E).

De manière préférée, dans la formule (E) et dans ses modes préférés de réalisation tels que définis ci-dessus,  $n$  est égal à 0,  $X$  représente O,  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$ , dans lesquels  $R_4$ , et  $R_6$  représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou  $(C_1-C_6)$ alkyle.

En particulier, ledit composé répond à la formule (I-1) suivante :



5 Selon un mode de réalisation particulier, ledit composé répond à la formule (I-1a) suivante :



Selon un mode de réalisation particulier, dans les formules (I), (I-1) et (I-1a), n représente 0.

Selon un mode de réalisation particulier, dans les formules (I), (I-1) et (I-1a), X représente O.

10 Selon un mode de réalisation particulier, dans les formules (I), (I-1) et (I-1a), R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>.

Selon un mode de réalisation particulier, dans les formules (I), (I-1) et (I-1a), R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>.

Selon un mode de réalisation particulier, dans les formules (I), (I-1) et (I-1a) :

- 15
- n représente 0,
  - X représente O,

- R1 représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>,
- R2 représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, et

Selon un mode de réalisation particulier, dans les formules (I), (I-1) et (I-1a), R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub> ou C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, en particulier CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>.

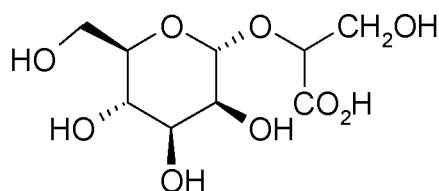
- 5 Selon un mode de réalisation particulier, dans les formules (I), (I-1) et (I-1a), R<sub>2</sub> représente CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub>.

On entend par « C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyle » dans le cadre de la présente invention, une chaîne hydrocarbonée saturée, linéaire ou ramifiée, comportant de 1 à 6 atomes de carbone, comme par exemple un groupement méthyle, éthyle, isopropyle, tertio-butyle, n-pentyle, etc.

- 10 On entend par « sel pharmaceutiquement acceptable » dans le cadre de la présente invention, tout sel approprié à une utilisation pharmaceutique. A titre d'exemples de sels pharmaceutiquement acceptables, on peut citer le benzène sulfonate, le bromhydrate, le chlorhydrate, le citrate, l'éthanesulfonate, le fumarate, le gluconate, l'iodate, l'iséthionate, le maléate, le méthanesulfonate, le méthylène-bis-b-oxynaphtoate, le nitrate, l'oxalate, le pamoate, le phosphate, le salicylate, le succinate, le sulfate, le tartrate, le théophyllinacéate et le p-toluènesulfate. En particulier, ledit sel pharmaceutiquement acceptable peut être un sel d'addition de base, notamment un sel de métal alcalin, tel qu'un sel de sodium ou de potassium.

Ainsi, ledit composé peut être sous la forme d'un sel d'addition de base, notamment sous la forme d'un sel de métal alcalin par exemple de sodium ou de potassium.

- 20 Plus particulièrement, ledit composé est le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate, encore nommé digénéaside, dont la structure chimique est la suivante :



- 25 Le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate (digénéaside) a été isolé pour la première fois de l'algue rouge *Polysiphonia fastigiata* (Colin *et al.*, Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1939) et sa structure moléculaire a été établie par la technique de méthylation. Le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate est un composé formé par un sucre mannose

lié à un glycérate en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2). Ce composé est chargé négativement à pH neutre et a une masse moléculaire de 268 g.mol<sup>-1</sup>. Sa structure chimique fut assignée sur les bases de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de la spectroscopie de masse (MS) par Ascensio et al. (Ascensio *et al.*, Carbohydrate Res, 2006).

5 Le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate (digénéaside) peut être obtenu par synthèse chimique ou à partir d'extraits d'algues comprenant ce composé telles que les algues appartenant à l'ordre des cérariales ou des bangiales selon des procédés d'extraction et de purification bien connus de l'homme du métier, tel que ceux décrits dans la partie « exemples » de la présente demande.

10 Le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate peut également être obtenu à partir des bactéries thermophiles et hyperthermophiles comme *Thermus thermophilus* et *Rhodothermus marinus*. Dans ce cas le terme utilisé pour désigner le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate est le mannosylglycérate.

15 Dans le cadre de la présente invention le terme « mannosylglycérate » est également utilisé pour désigner 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate obtenu par des techniques usuelles de chimie de synthèse.

Parmi ces techniques usuelles de chimie de synthèse, un procédé particulier (a1) a été mis au point dans le cadre de la présente invention.

20 Ainsi, un objet selon la présente demande de brevet concerne le procédé de synthèse (a1) de composés selon l'une quelconque des formules (I), (A), (B), (C), (D), (E), (I-1) et (I-1a), ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions caractérisées en ce que ce procédé comprend les étapes :

25 (1) formation d'un dimère d'hexopyranoses, dans lequel les deux hexopyranoses sont reliés entre eux par l'intermédiaire d'une liaison glycolique convenablement substituée et d'autre part, lesdits hexopyranoses sont convenablement protégés le cas échéant et préférentiellement identiques,

(2) coupure et oxydation de la liaison C-C du motif glycolique, et

30 (3) récupération des composés de formules (I), (A), (B), (C), (D), (E), (I-1) et (I-1a), après une éventuelle déprotection, formation de sel ou fonctionnalisation subséquente, le cas échéant.

Préférentiellement le procédé (a1) ci-dessus comprend au moins une étape de purification.

Dans le cadre de la présente invention, il est compris que lors de l'étape (2) l'expression «coupure et oxydation de la liaison C-C du motif glycolique », permet la coupure puis l'oxydation de la liaison C-C du motif glycolique reliant les deux hexopyranoses par l'insertion de deux atomes d'oxygène pour donner deux groupements carbonyles.

Ainsi, dans l'étape (2) d'oxydation de la liaison glycolique, les réactions typiques d'oxydation de cette liaison peuvent être appliquées telles que la réaction dite de « Criegee », de « Rigby », ou encore de « Malaprade », éventuellement suivies d'une oxydation supplémentaire pour obtenir l'acide carboxylique correspondant. Ainsi, tous les agents chimiques pouvant être utilisés dans les réactions de « Criegee », de « Rigby », ou encore de « Malaprade » sont susceptibles de produire l'effet escompté selon la molécule à scinder considérée. Des exemples d'agents oxydant sont Pb(OAc)<sub>4</sub>, NaBiO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HIO<sub>4</sub>, le TEMPO (2,2,6,6-tétraméthylpyridinyloxyde), l'AZADO(2-azaadamantane *N*-oxy/), le 1-Me-AZADO (1-méthyl-2-azaamandate *N*-oxy/).

Il est possible que les agents oxydants soient utilisés dans l'étape (2) en association avec un co-oxydant tel le BAIB (bis-acétoxyiodobenzène) selon la méthode décrite par Piancatelli G et al. (Piancatelli *et al.*, 2006) ou avec le PIFA (phenyliodine bis trifluoroacétate) selon Dohi T *et al.* (Dohi *et al.*, Green Chem, 2012) ou Shibuya M *et al.* (Shibuya *et al.*,2006). En particulier, la combinaison des réactifs hypervalents iodines (III) et TEMPO (ou ses dérivés) est spécifiquement connue pour promouvoir une oxydation efficace et chimiosélective des fonctions alcool pour accéder à des composés carbonylés hautement fonctionnalisés.

Avantageusement, les groupements hydroxyles que l'on souhaite préserver dans la molécule dans le procédé (a1) sont protégés par des groupements acétyles, qui sont retirés de manière classique en fin de synthèse, par exemple par une trans-estérification ou trans-amidification, telle que par l'utilisation d'hydroxyammonium en présence de méthanol.

L'obtention du dimère d'hexopyranoses selon le procédé (a1) ci-dessus peut se faire par une stratégie de protection/déprotection de la fonction glycol par l'intermédiaire du dérivé isopropylidène correspondant.

La formation du dimère d'hexopyranoses selon le procédé (a1) ci-dessus peut se faire par l'utilisation d'un ose convenablement protégé, préférentiellement comprenant une fonction glycol protégée par un isopropylidène. Préférentiellement, l'ose convenablement protégé permettant la dimérisation est un sucre-alcool convenablement protégé, tel que le mannitol convenablement

protégé. Plus préférentiellement, le mannitol convenablement protégé est le 1,6-di-O-acétyl-3,4-di-isopropylidène-D-mannitol.

Les hexopyranoses pouvant être utilisés dans le procédé (a1) ci-dessus sont ceux classiquement connus de l'homme du métier, et en particulier l'allose, l'altrose, le glucose, le mannose, le gulose, l'idose, le galactose et/ou le talose sous leurs formes D ou L, préférentiellement D.

Ainsi, un mode de réalisation particulier du procédé (a1), concerne un procédé de synthèse (a2), de composés selon l'une quelconque formule (I), (A), (B), (C), (D), (E), (I-1) et (I-1a), caractérisé en ce que ce procédé comprend les étapes :

- 10 (1') d'un couplage sélectif du OH du carbone anomérique d'un hexopyranose avec une fonction réactive telle qu'un hydroxyle activé d'un ose convenablement protégé au moins par un groupement isopropylidène couvrant une fonction glycol,
- (2') une déprotection sélective des groupements hydroxyles couverts par l'isopropylidène,
- (3') une coupure oxydante du glycol obtenu après l'étape (2'),
- 15 (4') une étape de déprotection finale, et
- (5') la récupération du produit de formule (I), (A), (B), (C), (D), (E), (I-1) et (I-1a), ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions.

Préférentiellement le procédé (a2) ci-dessus comprend au moins une étape de purification.

- 20 Avantageusement, les groupements hydroxyles que l'on souhaite préserver dans la molécule dans le procédé (a2) sont protégés par des groupements acétyles, qui sont retirés de manière classique en fin de synthèse, par exemple par une trans-estérification ou trans-amidification, telle que par l'utilisation d'hydroxyammonium en présence de méthanol.

- 25 L'obtention du dimère d'hexopyranoses selon le procédé (a2) ci-dessus peut se faire par une stratégie de protection/déprotection de la fonction glycol par l'intermédiaire du dérivé isopropylidène correspondant.

La formation du dimère d'hexopyranoses selon le procédé (a2) ci-dessus peut se faire par l'utilisation d'un ose convenablement protégé, préférentiellement comprenant une fonction glycol protégée par un isopropylidène. Préférentiellement, l'ose convenablement protégé permettant la

dimérisation est un sucre-alcool convenablement protégé, tel que le mannitol convenablement protégé. Plus préférentiellement, le mannitol convenablement protégé est le 1,6-di-O-acétyl-3,4-di-isopropylidène-D-mannitol.

5 Les hexopyranoses pouvant être utilisés dans le procédé (a2) ci-dessus sont ceux classiquement connus de l'homme du métier, et en particulier l'allose, l'altrose, le glucose, le mannose, le gulose, l'idose, le galactose et/ou le talose sous leurs formes D ou L, préférentiellement D dans leur forme pyranose. De manière préférée, le dimère d'hexopyranoses est un dimère de mannopyranosyl, en particulier dans sa forme D.

10 Dans le procédé (a2) ci-dessus, à l'étape (1'), l'ose convenablement protégé est de manière avantageuse le 1,6-di-O-acétyl-3,4-di-isopropylidène-mannitol, préférentiellement de forme D.

Un objet selon la présente demande de brevet concerne le produit susceptible d'être obtenu par l'un quelconque des procédés (a1) ou (a2) ci-dessus, ainsi que leurs modes de réalisations particuliers.

15 La présente invention a également pour objet un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, pour son utilisation en tant que médicament immunostimulant.

20 On entend par « médicament immunostimulant » au sens de la présente invention, tout médicament capable de stimuler la fonction des cellules impliquées dans les réponses immunitaires normales. Cette stimulation peut se traduire par l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires et par la potentialisation de l'activité cytotoxiques des cellules Natural Killer (NK) et des polynucléaires neutrophiles. A titre d'exemple, afin de déterminer l'efficacité d'un médicament immunostimulant, le taux d'une cytokine pro-inflammatoire, telle que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), peut-être déterminé  
25 comparaison à un sujet non traité. Une immunostimulation peut se traduire par une différence statistiquement significative du taux de cette cytokine pro-inflammatoire dans un échantillon biologique du sujet auquel le médicament immunostimulant a été administré.

30 En outre, les composés de la présente invention peuvent induire la libération d'autres cytokines comme l'Interleukine 12 (IL-12). Cette cytokine a pour rôle principal de potentialiser l'activité cytotoxique et de participer à la régulation de la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK. Elle induit la production de l'IFN- $\gamma$  et favorise la différenciation des cellules auxiliaires de type Th-1 et inhibe la différenciation des cellules T de type Th-2. Sa production se fait par les cellules

phagocytaires, les cellules dendritiques, les cellules B et les neutrophiles. L'administration de l'IL-12 *in vivo* stimule l'activité des NK et des cellules T cytotoxiques (CTL), avec une induction de la production de l'IFN- $\gamma$ , et une différenciation des cellules Th-1. Ainsi en tant qu'adjuvant lors d'une immunisation, l'IL-12 favorise la différenciation des cellules de type Th-1 et inhibe la différenciation des cellules productrices d'IL-4. L'administration d'IL-12 à des souris porteuses de tumeurs peut prolonger leur survie en inhibant de manière significative la progression tumorale (Lasek *et al.*, Cancer Immunol Immunother, 2014).

La présente invention a également pour objet un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

On entend par « pathologie néoplasique » au sens de la présente invention toute pathologie dans laquelle des cellules présentent une croissance anormale telle que par exemple une prolifération cellulaire non contrôlée. En particulier, les pathologies néoplasiques peuvent être comprises dans le groupe consistant en : les lymphomes, les leucémies, les cancers du sein, les cancers de l'utérus, les cancers du côlon, les cancers de la prostate, les cancers de la vessie, les carcinomes, les cancers bronchiques, les cancers oro-rhino-laryngées, les cancers de l'estomac et les tumeurs du cerveau.

On entend par « pathologie infectieuse » au sens de la présente invention toute pathologie causée par un agent infectieux tel qu'un virus, une bactérie, un champignon. En particulier, les pathologies infectieuses peuvent être comprises dans le groupe consistant en pathologies liées au VIH.

La présente invention a également pour objet un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques par une amplification vaccinale.

La présente invention a également pour objet un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie infectieuse liée au VIH.

On entend par « mélange d'énantiomères », dans le cadre de la présente invention, une composition qui comprend au moins un couple d'énantiomères en toutes proportions.

Plus particulièrement, on entend par « mélange racémique », un mélange de deux énantiomères dans lequel le ratio massique entre ces deux énantiomères est de 1:1,  $\pm 10\%$  en masse de chaque énantiomère. De manière avantageuse, le mélange des deux énantiomères est enrichi, c'est-à-dire que le ratio des deux énantiomères est différent de 1 : 1  $\pm 10\%$  en masse de chaque énantiomère. Préférentiellement, l'un des deux énantiomères est présent dans le mélange en un ratio massique supérieur à 60 % vis-à-vis de son homologue énantiomère. Plus préférentiellement, l'un des deux énantiomères est présent dans le mélange en un ratio massique supérieur à 80 % vis-à-vis de son homologue énantiomère. Encore plus préférentiellement, l'un des deux énantiomères est présent dans le mélange en un ratio massique supérieur à 90 % vis-à-vis de son homologue énantiomère. De manière toute préférentielle, l'un des deux énantiomères est présent dans le mélange en un ratio massique supérieur à 95 % vis-à-vis de son homologue énantiomère.

La présente invention a également pour objet un extrait d'au moins une algue appartenant à l'ordre des cérámiales ou des bangiales pour son utilisation en tant que médicament, ledit extrait comprenant du 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate (digénéaside). En particulier, ledit extrait comprend une teneur en 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate (digénéaside) comprise dans les plages de 0,1% à 2,0%, de préférence de 0,5% à 1,5% en poids par rapport au poids total de l'extrait, exprimé en extrait sec. La concentration maximale en teneur en digénéaside est en rapport avec la variation saisonnière de l'algue utilisée.

Ledit extrait d'au moins une algue appartenant à l'ordre des cérámiales (par exemple, les genres *Ceramium*, *Polysiphonia* et *Laurencia*) ou bangiales (genre *Bangia*) comprenant du 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate (digénéaside) peut être obtenu par toutes techniques bien connues de l'homme du métier, telles que par au moins une étape d'extraction.

En particulier, ces extraits peuvent être des extraits aqueux, des extraits éthanoliques ou bien des extraits hydro-alcooliques de type azéotrope (70/30) ou plus.

Classiquement ici, comme en phytothérapie, les solvants polaires sont largement utilisés puisque la molécule de digénéaside est de type glucidique.

Les solvants polaires pouvant être utilisés pour l'extraction peuvent être de nature minérale ou organique. Par exemple des solvants pouvant être utilisés sont choisis dans la liste consistant en l'eau, tout type d'alcool, tel que l'éthanol, le méthanol, le propanol, l'isopropanol, ou encore le butanol ; des solvants aromatiques tels que la pyridine, le toluène, le chlorobenzène ou encore le

xylène, ou des solvants carbonylés tel que l'acétone, le diméthyl formamide ou le méthyl pyrrolidone, des esters tels que l'éthyl acétate, des sulfoxydes tel que le diméthyle sulfoxyde, des nitriles tel que l'acétonitrile, des solvant halogénés, tels que le dichlorométhane, le dichloroéthane, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le chlorobenzène, ou encore des solvants éther-oxydes tels que le diéthylène glycol, le tétrahydrofurane, le diéthyle éther. De manière préférée, le solvant d'extraction est un solvant biologique, c'est-à-dire rencontré de manière naturelle tel que l'éthanol ou l'acétone. En outre, le solvant peut être choisi parmi les solvants de type alcool, préférentiellement l'éthanol.

Les extraits peuvent être également sous forme de poudre lyophilisée.

10 Généralement, ces extractions sont effectuées à partir de la plante entière.

La molécule de digénéaside peut être aussi co-extraite en quantité minoritaire avec la molécule de floridoside, d'isofloridoside appartenant à la même classe de molécules naturelles (Karsten *et al.*, Phycologia, 2007.) Il est ainsi possible d'extraire des mélanges des trois molécules naturelles dans l'ordre des gigartinales et dans l'ordre des gracilariales.

15 Il est possible de procéder à plusieurs extractions successives jusqu'à épuisement de la matière à extraire par le solvant considéré.

La durée d'extraction varie en fonction du solvant considéré, la température et éventuellement de la pression utilisée, pour aboutir à l'épuisement total d'extraction de la matière. En pratique, cette durée sera avantageusement limitée à moins de 2 heures pour une exploitation industrielle rentable.

Préalablement à l'étape d'extraction, ladite algue peut être lavée, broyée, coupée, écrasée et/ou séchée.

On entend par « extrait sec » au sens de la présente invention, la matière sèche qui subsiste après dessiccation d'un extrait, par exemple dans une étuve à 120°C pendant 2 heures.

25 La présente invention a également pour objet un extrait d'au moins une algue selon l'invention pour son utilisation en tant que médicament immunostimulant.

La présente invention a également pour objet un extrait d'au moins une algue selon l'invention, pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

La présente invention a également pour objet un extrait d'au moins une algue selon l'invention, pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention par amplification vaccinale d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques.

5 La présente invention a également pour objet un extrait d'au moins une algue selon l'invention, pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une maladie infectieuse liée au VIH.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique ou nutraceutique comprenant :

10 - au moins un composant choisi dans le groupe consistant en : un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, un stéréoisomère de celui-ci, un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, et un extrait d'au moins une algue selon l'invention tel que défini ci-dessus ; et

- un véhicule pharmaceutiquement ou nutraceutiquement acceptable.

15 On entend par « composition nutraceutique » au sens de la présente invention une composition relative à un produit fabriqué à partir des aliments (dans le cas de la présente invention il s'agit de l'extrait de l'algue ou de l'algue entière) et commercialisée sous forme de comprimé, de poudre ou de potion ayant un effet physiologique bénéfique contre des maladies chroniques.

20 On entend par « véhicule pharmaceutiquement acceptable » au sens de la présente invention, toute matière qui est appropriée à une utilisation dans un produit pharmaceutique. A titre d'exemple de véhicule pharmaceutiquement acceptable, on peut citer le lactose, l'amidon éventuellement modifié, la cellulose, l'hydroxypropylméthyl cellulose, le mannitol, le sorbitol, le xylitol, le dextrose, le sulfate de calcium, le phosphate de calcium, le lactate de calcium, les dextrans, l'inositol, le carbonate de calcium, la glycine, la bentonite et leurs mélanges.

25 On entend par « véhicule nutraceutiquement acceptable » au sens de la présente invention, toute matière qui est appropriée à une utilisation dans un produit nutraceutique. A titre de véhicule nutraceutiquement acceptable, on peut citer le phosphate dicalcique, l'alginate de calcium, la carbonate de magnésium, le talc, le stéarate de magnésium, le dioxyde de silicium le chlorure de calcium, ou autres.

30 La composition selon l'invention peut comprendre de 0,1% à 30% en poids d'au moins l'un des composés de l'invention par rapport au poids total de la composition.

En particulier la composition selon l'invention peut comprendre de 0,5% à 20%, plus particulièrement de 5% à 20% ou de 0,5% à 5%, en particulier de 0,5 à 1,5% d'au moins l'un des composés de l'invention, en poids par rapport au poids total de la composition.

5 Dans un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est une composition pharmaceutique pouvant comprendre de 0,1% à 30%, en particulier de 0,5% à 20%, plus particulièrement de 5% à 20% ou de 0,5% à 5%, en particulier de 0,5 à 1,5% d'au moins l'un des composés de l'invention, en poids par rapport au poids total de la composition.

10 Préférentiellement, la composition pharmaceutique selon l'invention comprend de 5% à 20% ou de 10% à 15% d'au moins l'un des composés de l'invention, en poids par rapport au poids total de la composition.

Dans un autre mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est une composition nutraceutique pouvant comprendre de 0,1% à 30%, en particulier de 0,5% à 20%, plus particulièrement de 5% à 20% ou de 0,5% à 5%, en particulier de 0,5 à 1,5% d'au moins l'un des composés de l'invention, en poids par rapport au poids total de la composition.

15 Préférentiellement, la composition nutraceutique selon l'invention comprend de 0,5% à 5%, plus préférentiellement de 1% à 1,5% d'au moins l'un des composés de l'invention, en poids par rapport au poids total de la composition.

20 La composition selon l'invention peut comprendre une teneur en véhicule pharmaceutiquement ou nutraceutiquement acceptable allant de 5 à 99%, en particulier de 10 à 99% et tout particulièrement de 20 à 75% en poids par rapport au poids total de la composition.

En particulier, ladite composition selon l'invention peut être une composition pharmaceutique comprenant en outre au moins un autre agent anti-tumoral.

25 On entend par « agent anti-tumoral » selon la présente invention, tout composé ayant un effet anti-tumoral. L'agent anti-tumoral peut avoir un effet de prévention ou d'inhibition de la formation ou de la croissance des tumeurs ou des cellules tumorales. Cet effet peut être un effet pro-apoptotique, anti-prolifératif, cytostatique ou cytotoxique. A titre d'exemple d'agent anti-tumoral, on peut citer les anti-métabolites, les inhibiteurs enzymatiques, les cytokines et les anticorps anti-tumoraux.

En particulier, ledit autre agent anti-tumoral peut être un anticorps anti-tumoral.

On entend par « anticorps anti-tumoral » selon la présente invention, tout anticorps ayant un effet anti-tumoral. En particulier, ledit anticorps anti-tumoral peut être compris dans le groupe consistant en le rituximab, le trastuzumab, le cétuximab, le bévacizumab, le gemtuzumab ozagamicin, l'yttrium-90 Ibritumomab-Tiuxetan, l'alemtuzumab, le tositumomab et l'ofatumumab.

5 La composition selon l'invention peut comprendre le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate et ledit autre agent anti-tumoral dans un rapport molaire allant de 10/1 à 1/10. En particulier, lorsque ledit autre agent anti-tumoral est un anticorps anti-tumoral, la composition selon l'invention peut comprendre le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate et ledit anticorps anti-tumoral dans un rapport de concentration allant de 4/1 à 13/1, en particulier de 5/1 à 10/1 et de manière préférée étant de  
10 6/1.

En particulier, ladite composition selon l'invention peut être une composition pharmaceutique comprenant en outre au moins un autre agent immunostimulateur.

On entend par « agent immunostimulateur » au sens de la présente invention tout agent capable de stimuler la fonction des cellules impliquées dans les réponses immunitaires normales. En  
15 particulier, ledit autre agent immunostimulateur peut être compris dans le groupe consistant en les cytokines, les polysaccharides et les adjuvants minéraux.

La composition selon l'invention peut comprendre le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate et ledit autre agent immunostimulateur dans un rapport molaire allant de 10/1 à 1/10.

En particulier, ladite composition selon l'invention peut être une composition pharmaceutique  
20 comprenant en outre au moins un autre agent anti-infectieux.

On entend par « agent anti-infectieux » au sens de la présente invention, tout agent permettant d'inhiber la croissance et/ou d'éliminer un agent infectieux. En particulier, ledit autre agent anti-infectieux peut être compris dans le groupe consistant en les anti-infectieux naturels tels que l'extrait de pépins de pamplemousse et l'extrait de ronce.

25 La composition selon l'invention peut comprendre le 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate et ledit autre agent anti-infectieux dans un rapport molaire allant de 10/1 à 1/10.

En particulier, ladite composition selon l'invention peut être une composition nutraceutique comprenant en outre des vitamines, des antioxydants, des agents conservateurs et des aliments tels que des céréales, des champignons (par exemple, le shiitake).

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique selon l'invention pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

5 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins une composition pharmaceutique selon l'invention telle que définie ci-dessus ou d'au moins un composant choisi dans le groupe consistant en :

- un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, un stéréoisomère de celui-ci, un mélange de stéréoisomères de  
10 celui-ci en toutes proportions, et un extrait d'au moins une algue selon l'invention tel que défini ci-dessus ;

pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses.

15 La présente invention a également pour objet une méthode pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses, ladite méthode comprenant une étape d'administration à un patient d'une dose thérapeutiquement efficace d'au moins une composition pharmaceutique selon l'invention telle que définie ci-dessus ou d'au moins un composant choisi dans le groupe consistant  
20 en :

un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, un stéréoisomère de celui-ci, un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, et un extrait d'au moins une algue selon l'invention tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un produit comprenant :

- au moins un composant choisi dans le groupe consistant en : un composé selon l'invention  
25 tel que défini ci-dessus, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, un stéréoisomère de celui-ci, un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, et un extrait d'au moins une algue selon l'invention tel que défini ci-dessus ; et
- au moins un autre agent anti-tumoral ;

en tant que produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie néoplasique.

En particulier, ladite pathologie néoplasique est comprise dans le groupe consistant en les lymphomes, les leucémies, les cancers du sein, les cancers de l'utérus, les cancers du côlon, les  
5 cancers de la prostate, les cancers de la vessie, les carcinomes, les cancers bronchiques, les cancers oro-rhino-laryngées, les cancers de l'estomac et les tumeurs du cerveau.

En particulier, ledit autre agent anti-tumoral est un anticorps anti-tumoral, tout particulièrement compris dans le groupe consistant en le rituximab, le trastuzumab, le cétuximab, le bévacizumab, le gemtuzumab ozagamicin, l'yttrium-90 Ibritumomab-Tiuxetan, l'alemtuzumab, le  
10 tositumomab et l'ofatumumab.

La présente invention a également pour objet un produit comprenant :

- au moins un composant choisi dans le groupe consistant en : un composé selon l'invention tel que défini ci-dessus, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, un stéréoisomère de celui-ci, un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, et un extrait d'au moins  
15 une algue selon l'invention tel que défini ci-dessus ; et

- au moins un autre agent anti-infectieux ;

en tant que produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie infectieuse.

La composition pharmaceutique, les médicaments et produits de combinaison selon l'invention sont administrables par différentes voies. A titre d'exemples de voies d'administration utilisables pour la composition pharmaceutique, les médicaments et produits de combinaison selon l'invention on peut citer la voie orale, la voie rectale, la voie cutanée, la voie pulmonaire, la voie nasale, la voie sublinguale, la voie parentérale notamment intradermique, la voie sous-cutanée, la voie intramusculaire, la voie intraveineuse, la voie intra-artérielle, la voie intra-rachidienne, la voie  
25 intra-articulaire, la voie intra-pleurale et la voie intra-péritonéale.

La composition pharmaceutique et les médicaments selon l'invention peuvent être administrés en une ou plusieurs fois ou en libération continue. De manière préférée, la composition pharmaceutique ou les médicaments selon l'invention sont administrés en libération continue, telle que sous la forme d'une perfusion ou par le biais d'une forme pharmaceutique, telle qu'une gélule  
30 ou un comprimé éventuellement enrobé, à libération prolongée et/ou retardée.

La composition pharmaceutique, les médicaments et produits de combinaison selon l'invention peuvent se présenter sous différentes formes en particulier sous une forme choisie dans le groupe consistant en les solutions injectables, les comprimés, les gélules, les dragées, les sirops, les suspensions, les solutions, les poudres, les granulés, les émulsions, les microsphères..., en particulier les solutions injectables, telles que des solutions pour perfusion sont préférées. En outre, des formes pharmaceutiques à libération prolongées telles que des gélules, ou des comprimés éventuellement enrobés pour libération prolongées seront préférées.

La composition nutraceutique selon l'invention est administrable notamment par voie orale, par exemple, sous forme de comprimés sécables ou non, pelliculés ou non, de granules, de capsules, de gélules, ou sous forme de poudres libres conditionnées de préférence en sachets unitaires, ou de poudre compressée.

Ces différentes formes peuvent être obtenues par des techniques bien connues de l'homme du métier.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront au regard des exemples qui suivent et qui font référence aux figures suivantes :

Figure 1 : Diagramme représentant la cytotoxicité des composés suivants : le digénéaside, le floridoside (F) et l'Isofloridoside (I), sur des cellules Daudi.

Figure 2 : Diagrammes représentant la cytotoxicité de la Firoin® sur des cellules de patient atteints de LLC-B (P024-5 figure 1a, P018-6 figure 2b).;

Figure 3 : Diagramme représentant la cinétique de production d'IFN- $\gamma$  par des PBMC traitées avec du LPS, du digénéaside ou du Floridoside.

Figure 4 : Western-Blot représentant l'expression des protéines STAT3 et STAT3 phosphorylée (pY705) sur des PBMC (Temps 4H et 24H figure 4a, temps 48H et 72H figure 4b).

Figure 5 : Graphique représentant l'action du digénéaside avec le RTX sur différents donneurs.

Figure 6 : Graphique représentant l'action du digénéaside (figure 6a) et de la Firoin® (figure 6b) avec le RTX.

Figure 7 : Graphique représentant les résultats du test du digénéaside (figure 7a) et de la Firoin® (figure 7b) avec l'anticorps HLA-DR.

Figure 8 : Graphique représentant l'impact de la Firoin® sur la population monocyttaire au bout de 5 jours.

Figure 9 : Diagramme représentant l'effet du digénéaside sur la phagocytose de bactéries FITC .

5 Figure 10 : Diagramme représentant la cinétique de phagocytose du dextran-FITC par les polynucléaires neutrophiles après 24H (figure 10a) et 48H (figure 10b) d'incubation en présence de la Firoin®.

10 Figure 11 : Diagramme représentant la courbe de survie de cinq groupes de souris immuno-déficientes SOPF/NOD.Cg-Prkdc Scid après inoculation des cellules tumorales suivie de différents traitements.

Figure 12 : Diagramme représentant la courbe de survie de souris immuno-compétentes SOPF/C57BL/6JRJ après inoculation des cellules tumorales et injection du RTX et de digénéaside (2mg et 4mg) seuls ou en combinaison;

15 Figure 13 : Coupes histologiques montrant l'expression de CD20 par immunohistochimie dans les poumons des souris SOPF/C57BL/6JRJ décédées dans les 40 premiers jours ;

Figure 14 : Coupes histologiques montrant l'expression de CD20 par immunohistochimie dans différents organes des souris SOPF/C57BL/6JRJ transfusées par une solution de digénéaside (2mg ou 4mg) et euthanasiées à J187.

20 Figure 15 : Coupes histologiques montrant l'expression de CD20 par immunohistochimie dans différents organes des souris SOPF/C57BL/6JRJ transfusées par une solution de RTX, de RTX+digénéaside (2mg ou 4mg) et euthanasiées à J187.

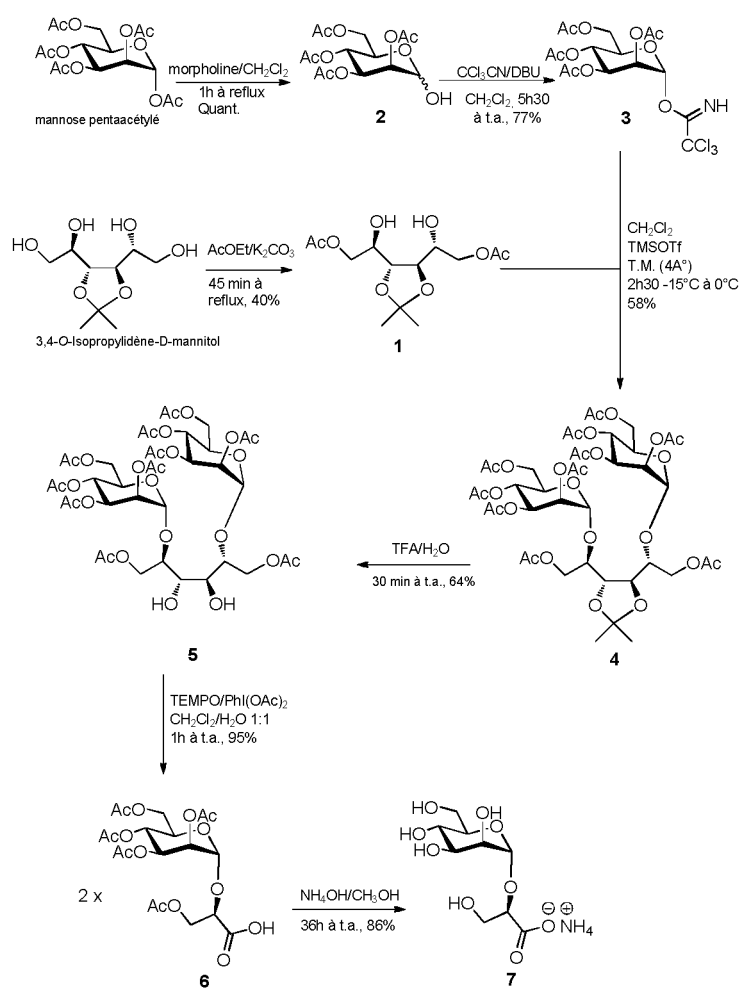
**EXEMPLES**

## EXEMPLES DE SYNTHÈSE ET D'EXTRACTION

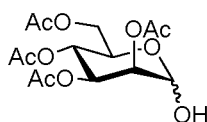
5

1. Synthèse chimique

La description de la synthèse chimique du mannosylglycérate est présentée sur le Schéma 1.



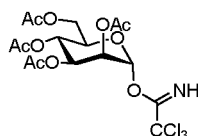
- 10 Réactifs : Le Trichloroacétonitrile ( $\text{CCl}_3\text{CN}$ ), le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU), le Trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf), l'Acide trifluoroacétique (TFA), le 2,2,6,6-Tetraméthyl-pipéridin-1-oxyde (TEMPO), le (Diacétoxyiodo)-benzène ( $\text{PhI(OAc)}_2$ ).
- Abréviations : Température ambiante (t.a.), Tamis moléculaire (T.M.)

**2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-D-mannose 2:**

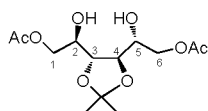
20 g (51,24 mmol) de D-mannose peracétylé (Mallesha *et al.*, J Chem Res, 2011) sont dissous dans 80 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre sous argon. 18 mL (205 mmol) de morpholine sont ajoutés et le mélange réactionnel est porté 1h à reflux. Le mélange réactionnel, ramené à température ambiante, est neutralisé par une solution d'HCl 1N (200 mL) puis lavé par 2x100 mL d'eau. La phase organique est alors séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée sous vide pour conduire au composé **2** (16,38 g) sous forme d'huile avec un rendement de 92%.

**Rf** = 0,36 [AcOEt/cyclohexane (5:5)]

10 **SM**, ESI<sup>+</sup> *m/z* : 371 [M+Na]<sup>+</sup>

**Trichloroacétimidate de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-α-D-mannopyranose 3:**

15 16,38 g (47,03 mmol) du composé **2** sont dissous, sous atmosphère inerte, dans 130 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> distillé. 47 mL (470,3 mmol) de trichloroacétonitrile ainsi que 2,11 mL (14,1 mmol) de DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène) sont ajoutés à 0°C. Le milieu réactionnel est agité 5h30 à température ambiante, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Cyclohexane/AcOEt, 6:4 + 1% Et<sub>3</sub>N) pour conduire au produit **3** avec un rendement de 77%.

**1,6-Di-O-acétyl-3,4-Di-O-isopropylidène-D-mannitol 1:**

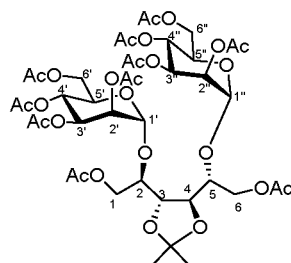
20 Le 3,4-Di-O-isopropylidène-D-mannitol (3,65 g, 16,42 mmol) et le carbonate de potassium (3,4 g, 24,63 mmol) sont suspendus dans 160 mL d'acétate d'éthyle. Après 1h sous agitation à 90°C, le mélange réactionnel est filtré sur fritté et rincé plusieurs fois avec du dichlorométhane. La purification par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O, 7:3) a conduit au mannitol diacétylé **1** (2,03 g, 6,63 mmol, 40%) sous forme d'huile incolore.

**SM**, ESI<sup>+</sup> *m/z* : 329,2 [M+Na]<sup>+</sup>

**RMN** <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K): δ ppm 4,45 (d, <sup>2</sup>J<sub>H1a-H1b</sub> = <sup>2</sup>J<sub>H6a-H6b</sub> = 12 Hz, 2H, H-1a, H-6a), 4,15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H6b-H5</sub> = <sup>3</sup>J<sub>H1b-H2</sub> = 4,4 Hz, 2H, H-1b, H-6b), 3,92 (s, 2H, OH), 3,85 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5), 2,12 (s, 6H, 2xAc), 1,37 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):**  $\delta$  ppm 172 (2C, 2C=O), 110,10 (1C,  $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$ ), 79,97 (2C, C-2, C-5), 71,81 (2C, C-3, C-4), 66,71 (2C, C-1, C-6), 26,96 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 21,07 (2C, 2x Ac).

**1,6-Di-*O*-acétyl-2,5-Di-*O*-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-3,4-Di-*O*-isopropylidène-D-mannitol 4:**



5

Le mannitol diacétylé **1** (2 g, 6,53 mmol) et le trichloacétimide **3** (9,65 g, 19,59 mmol) sont dissous dans 95 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre en présence de tamis moléculaire (4Å, 5g). Le mélange est laissé 30 min à température ambiante avant de l'ajuster à  $-15^\circ\text{C}$ . Le TMSOTf (0,71 mL in 5 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) est ensuite ajouté goutte à goutte. Après 50 min, la réaction est traitée par l'ajout de 15 mL d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . La phase organique est séparée et lavée 2 fois avec de l'eau (50 mL). Après évaporation des solvants, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice fine ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) pour donner **4** (3,67g, 58%) sous la forme d'une mousse blanche.

10

**SM, ESI $^+$   $m/z$  :** 989,6 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , 984,6 [ $\text{M}+\text{NH}_4$ ] $^+$

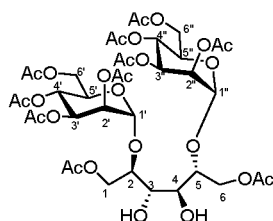
15

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):**  $\delta$  ppm 5,35 (dd,  $^3J_{\text{H}3'-\text{H}4'} = 10,0$  Hz,  $^3J_{\text{H}3'-\text{H}2'} = 3,6$  Hz, 2H, H-3', H-3''), 5,29 (m, 4H, H-2', H-2'', H-4', H-4''), 5,11 (d,  $^3J_{\text{H}-\text{H}} = 1,1$  Hz, 2H, H-1', H-1''), 4,38 (dd,  $^3J_{\text{H}1\alpha-\text{H}1\beta} = 12,1$  Hz,  $^3J_{\text{H}1\alpha-\text{H}2} = 3,5$  Hz, 2H, H-1a, H-6a), 4,28 (m, 4H, H-1b, H-6b, H-6'a, H-6''a), 4,26-4,18 (m, 4H, H-2, H-5, H-5', H-5''), 4,08 (dd,  $^2J_{\text{H}6'b-\text{H}6'a} = 12,2$  Hz,  $^3J_{\text{H}6'b-\text{H}5'} = 1,9$  Hz, 2H, H-6'b, H-6''b), 3,98 (m, 2H, H-3, H-4), 2,15, 2,11, 2,10, 2,04, 1,98 (5s, 30H, 10x Ac) 1,36 (s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ).

20

**RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K):**  $\delta$  ppm 170,92, 170,79, 170,09, 169,94, 169,90 (10C, 10xAc) 110,28 (1C,  $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$ ), 98,80 (2C, C-1', C-1''), 78,46 (2C, C-3, C-4), 77,43 (2C, C-2, C-5), 69,83 (2C, C-5', -5''), 69,26 (2C, C-2', C-2''), 68,96 (2C, C-3', C-3''), 66,33 (2C, C-4', C-4''), 63,62 (2C, C-1, C-6), 62,64 (2C, C-6', C-6''), 27,11 (2C,  $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 21,04, 20,90, 20,88, 20,85 (10C, 10x Ac).

**1,6-Di-*O*-acétyl-2,5-Di-*O*-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-D-mannitol 5:**



25

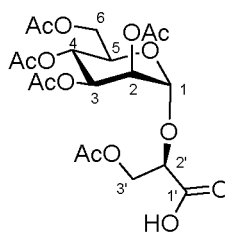
Le composé **4** (2,63 g, 2,72 mmol) est dissous dans 6,7 mL de TFA/H<sub>2</sub>O (16:1 v/v) et la solution obtenue est mise sous agitation à température ambiante. Après 30 min le mélange est dilué par 100 mL d'acétate d'éthyle puis neutralisé par une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (100 mL). Les deux phases sont séparées puis la phase organique est lavée une fois par de l'eau (50 mL). La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (2x50 mL). Les phases organiques sont combinées et séchées (MgSO<sub>4</sub>). Après filtration et concentration, le résidu brut obtenu est purifié via une chromatographie sur gel de silice (30% d'AcOEt dans Et<sub>2</sub>O) pour donner **5** (1,63 g, 1,76 mmol) sous la forme d'une mousse blanche (64%).

**SMHR**, TOF ES<sup>+</sup> calculée pour C<sub>38</sub>H<sub>54</sub>O<sub>26</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 949,2801; observée 949,2818

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):** δ ppm 5,26-5,35 (m, 4H, H-3', H-3'', H-4', H-4''), 5,17-5,25 (m, 2H, H-2', H-2''), 5,04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 1,4 Hz, 2H, H-1', H-1''), 4,47 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H1a-H1b</sub> = <sup>2</sup>J<sub>H6a-H6b</sub> = 12,5 Hz, 2H, H-1a, H-6a), 4,43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H1b-H2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>H6b-H5</sub> = 3,6 Hz, 2H, H-1b, H-6b), 4,29 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H6'a-H6'b</sub> = 12,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6'a-H5'</sub> = 5,4 Hz, 2H, H-6'a, H-6''a), 4,26-4,19 (m, 2H, H-5', H-5''), 4,12 (m, 2H, H-6'b, H-6''b), 3,96-3,90 (m, 2H, H-2, H-5), 3,90-3,81 (m, 2H, H-3, H-4), 2,15, 2,14, 2,10, 2,06, 2,0 (5s, 30H, 10x Ac)

**<sup>13</sup>C RMN (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K):** δ ppm 171,92, 170,81, 170,41, 170,10, 169,83 (10C, 10x C=O), 99,10 (2C, C-1', C-1''), 78,87 (2C, C-2, C-5), 69,79 (2C, C-2', C-2''), 69,31 (2C, C-5', C-5''), 69,23 (2C, C-3', C-3''), 67,98 (2C, C-3, C-4), 66,08 (2C, C-4', C-4''), 64,03 (2C, C-1, C-6), 62,58 (2C, C-6', C-6''), 21,08, 20,99, 20, 91, 20,89 (10C, 10x Ac).

**3'-O-acétyl-2'-O-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-α-D-mannopyranosyl)-D-glycérate 6 :**



À une solution de **5** (1,88 g, 2,03 mmol) dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (28 mL) refroidie à 0°C sont ajoutés le TEMPO (32 mg, 0,203 mmol) et le PhI(OAc)<sub>2</sub> (3,27g, 10,15 mmol). Après retour à température ambiante le mélange est laissé sous agitation pendant 1h. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec 150 mL d'acétate d'éthyle, puis est lavé plusieurs fois (7x50 mL) avec une solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> à 10%. Les phases aqueuses sont combinées et évaporées. Le solide blanc obtenu est repris dans 40 mL d'eau puis acidifié par 100 mL d'acétate d'éthyle contenant 6 mL d'HCl 1N. La phase aqueuse est extraite avec 2x100 mL d'acétate d'éthyle puis la phase organique est lavée avec 2x50 mL d'eau. Les phases organiques sont combinées, séchées et évaporées pour donner 1,85 g de **6** (95 %).

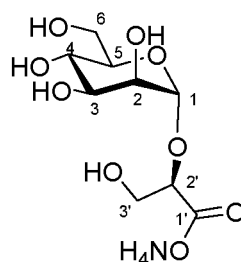
**SM**, ESI<sup>+</sup>  $m/z$  : 496,2 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, ESI<sup>-</sup>  $m/z$  : 477,3 [M-H]<sup>-</sup>

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 298 K)**:  $\delta$  ppm 5,40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2-H3</sub> = 3,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2-H1</sub> = 1,8 Hz, 1H, H-2), 5,29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H3-H4</sub> = 9,9 Hz, 1H, H-3), 5,25 (t, <sup>3</sup>J<sub>H4-H5</sub> = 9,9 Hz, 1H, H-4), 5,07 (d, 1H, H-1), 4,57 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H3'a-H3'b</sub> = 11,4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3'a-H2'</sub> = 3,0 Hz, 1H, H-3'a), 4,53 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2'-H3'b</sub> = 6,3 Hz, 1H, H-2'), 4,34 (dd, 1H, H-3'b), 4,25 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H6a-H6b</sub> = 12,4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6a-H5</sub> = 5,6 Hz, 1H, H-6a), 4,11-4,18 (m, 2H, H-6b, H-5), 2,14, 2,09, 2,07, 2,05, 1,96 (5s, 15H, 5Ac).

**<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 298 K)**:  $\delta$  ppm 172,51, 172,35, 171,67, 171,61, 171,55 (6C, C-1', 5xC=O), 98,06 (1C, C-1), 74,244 (1C, C-2'), 70,65 (2C, C-2, C-3), 70,53 (1C, C-5), 67,42 (1C, C-4), 65,33 (1C, C-3'), 63,77 (1C, C-6), 20,83, 20,78, 20,73, 20,70 (5C, 5Ac).

10

**(2R)-2'-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)glycérate d'ammonium 7:**



Le composé **6** (500 mg, 1,045mmol) est dissous dans 15 mL de méthanol puis 5 mL d'ammoniaque (35%) sont ajoutés. Après 36h d'agitation à température ambiante, les solvants sont évaporés à sec. Une chromatographie sur gel de silice avec comme éluant le mélange isopropanol/ammoniaque/eau (7/2/1) a permis d'obtenir **7** avec un rendement de 86%.

ESI<sup>+</sup>  $m/z$  : 286,2 [M+H]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K)**:  $\delta$  ppm 4.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 1.2 Hz, 1H, H-1), 4.21 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-2'), 4.09 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-2), 3.93 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-3), 3.79- 3.89 (m, 2H, H-3'a, H-6a), 3.78-3.68 (m, 3H, H-3'b, H-5, H-6b), 3.66 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4).

**<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K)**:  $\delta$  ppm 177.03 (1C, C-1'), 98.64 (1C, C-1), 78.08 (1C, C-2'), 73.06 (1C, C-5), 70.44 (1C, C-3), 70.18 (1C, C-2), 66.91 (1C, C-4), 63.13 (1C, C-3'), 61.10 (1C, C-6).

## 2. Extraction du digénéaside des alques rouges

Les macroalgues rouges *Solieria chordalis* (J. Agardh) C.Agardh (Rhodophyta) collectées au Tinduff (Plougastel-Daoulas) et *Ceramium botryocarpum* (Griffiths ex Harvey) fournies sous forme de poudres lyophilisées par le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie marines (LBCM), Université de  
5 Bretagne Sud, Lorient, France, ont été retenues pour l'extraction du digénéaside (Bondu *et al.*, J Appl Phycol, 2008)

Les algues fraîches, débarrassées de leurs épiphytes, sont lavées brièvement à l'eau douce et séchées. Après lyophilisation (Alpha 1-4, Christ), elles sont réduites à l'état de poudre à l'aide d'un  
10 broyeur à billes (5min, 300rpm, PM400, Retsch) puis conservées à l'abri de l'humidité.

### Extraction des composés hydrosolubles

Les extractions sont réalisées sur 5g de poudre d'algues mélangés à 10g de sable de  
15 Fontainebleau et l'ensemble, transféré en cellule, est placé dans un système d'extraction rapide par solvant (ASE 300 avec contrôleur de solvant Dionex). L'extraction est réalisée avec de l'éthanol 70% sous agitation magnétique pendant 2 à 7min à 40°C et 100 bars de pression. 50% du solvant est renouvelé entre les deux étapes.

20 Un deuxième cycle successif, permet d'effectuer un épuisement du matériel algal.

### Purification par chromatographie échangeuse d'ions

Les extraits hydro-alcooliques sont repris dans un minimum d'eau distillée et déposés par  
25 injection lente sur un système chromatographique automatisé (Biologic DuoFlow Chromatography System et la logiciel Bio-Rad associé). Cette technique repose sur la capacité d'un réseau de billes de résines, greffées de groupements fonctionnels, à pouvoir échanger les contre ions qu'elles contiennent avec les molécules chargées provenant de la solution déposée.

30 L'élution avec de l'eau à 0,5ml/min, sur 200mL de résine anionique (1X8, 100-200mesh, Cl- forme convertie sous forme OH-, Dowex-Fluka Chemika) permet l'élimination des molécules chargées positivement et des molécules neutres. Le digénéaside est recueilli avec élution de cette résine par 300ml NaOH 1N à 1ml/min.

### Dessalage des éluats

La technique d'élution de la résine anionique avec une solution de NaOH 1N nécessite un ajustement du pH à la neutralité par ajout d'acide chlorhydrique (60%). La réaction chimique engendre une formation importante de sel, éliminé par chromatographie sur gel d'exclusion (LPGPC : 5 Low Pressure Gel Permeation Chromatography). Selon leur volume hydrodynamique, les macromolécules éluées peuvent ou non pénétrer dans les billes poreuses du gel. Les plus petites molécules, comme le sel, sont retenues alors que les plus grosses, tel que les hétérosides, moins retenues, sont éluées plus rapidement. Pour se faire, les éluats lyophilisés sont repris dans un volume 10 d'eau distillée permettant la dissolution complète du sel (70mL) et ils sont dessalés par fraction de 10mL. La méthode utilisée ici est une colonne (25mm\*900mm) contenant 200mL de gel Sephadex G 10 (seuil de coupure  $\geq 700\text{Da}$ ). Les échantillons sont déposés par injection dans le système et la colonne soumise à un débit d'eau de  $0,3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . En sortie de colonne, un collecteur (BioFrac 15 Fraction collector Bio-Rad) répartit l'effluent dans des tubes par fractions de 3mL. L'élution est suivie par conductimétrie et spectrophotométrie (dosage manuel) permettant la détection du sel et du sucre dans chaque fraction. Les fractions contenant du sucre sont rassemblées et lyophilisées. Elles constituent l'échantillon de digénéside.

## II. EXEMPLES BIOLOGIQUES

### 20 1. Matériels et Méthodes

#### Réactifs

Les solutions suivantes sont utilisées pour la culture cellulaire : AIM V (31035-025, Gibco, France), RPMI 1640 (BE12-115F, Lonza, France), DMEM (BE17-516F, Lonza, France), Phosphate Buffer 25 Saline (PBS, BE17-516F, Lona, France), Pancoll (P04-60500, Pan Biotech, France), sérum de veau foetal (SVF, DE14-801F, Lonza, France), Versalyse lysing solution (A097777, Beckman Coulter, France), pénicilline 10 000UI/Steptomycine 10 000 $\mu\text{g}$  (DE17-602E, Lonza, France).

Les composés suivant sont également utilisés en culture : Rituximab (RTX, MabThera<sup>®</sup>, Roche, Suisse), HLA-DR (production en baculovirus), LPS (lipopolysaccharides from *Escherichia coli*, 0111:B4, 30 Sigma, France), IL-2 (interleukine-2, Proleukin, 18x106UI, WA1239C16, (Chiron, 5621563)), le Mannosyl Glycérate (Bitop AG, Allemagne), la Firoin<sup>®</sup> (Bitop AG, Allemagne), le Mannosyl Glycérate de synthèse (MGs, produit suivant la méthode décrite dans le document US2013085149A), le digénéside (produit suivant la méthode décrite par Bondu *et al.*, J Appl Phycol, 2008), le floridoside

et l'isofloridoside (purifiés selon la méthode décrite par Simon-Colin *et al.*, Carbohydr Res, 2002 et Simon-Colin *et al.*, Plant Physiol Biochem, 2004), Calceine-AM (CAM, ALX-610-026-M001, Enzo Life Sciences, France), Ethidium Homodimère-1 (EH-1, MGT-M1093-M001, Enzo Life Sciences, France).

Les kits suivant sont utilisés : Human IFN- $\gamma$  Standard ELISA development kit (900-K27, 5 Peprotech, France), Human IL-2 Standard ELISA development kit (900-K12, Peprotech, France), Human IL-10 Standard ELISA development kit (900-K21, Peprotech, France), PHAGOTEST™ (341060, Glycotope Biotechnology, Allemagne), Human CD14 Microbeads (130-050+201, Miltenyi Biotec, France), EasySep™ Human B Cell Enrichment Kit without CD43 depletion (19154, StemCell Technologies, France), Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, GE 10 HealthCare, France), Dextran-FITC (46946-100MG, Sigma, France), Annexine V/Iodure de Propidium (IP) (PN IM3546, Beckman Coulter, France).

Les anticorps suivant sont utilisés pour la cytométrie : anti-CD20-FITC (clone B9E9, A07772, Beckman Coulter, France), anti-CD4-PE (clone 13B8.2, A 07751, Beckman Coulter, France), anti-CD5- 15 PC7 (Clone BL1a, A21690, Beckman Coulter, France), anti-CD14-PC5 (Clone RMO52, A07765, Beckman Coulter, France), anti-CD16-PC7 ( Clone 3G8, 6607118, Beckman Coulter, France), anti-CD19-FITC (Clone J3-119, A07768, Beckman Coulter, France), anti-CD32-PE (Clone 2E1, 1935, Immunotech, France), anti-CD45-FITC (Clone J33, PN IM0782, Beckman Coulter, France), anti-CD56- 20 PC7 (Clone N901 (NKH-1), A21692, Beckman Coulter, France), IgG1-FITC (Clone 679.1Mc7, A07795, Beckman Coulter, France), IgG1-PE (Clone 679.1Mc7, A07796, Beckman Coulter, France), IgG1-PC5 (Ref), IgG1-PC7 (Clone 679.1Mc7, A6607099, Beckman Coulter, France), IgG2a-PC5 (Clone 7T4-1F5, A09148, Beckman Coulter, France), IgG2a-PC7 (Clone 7T4-1F5, A12692, Beckman Coulter, France), IgG2b-FITC (1267, Immunotech, France).

Les anticorps suivant sont utilisés pour l'analyse par Western-Blot : anti-STAT1 (51-9002093, 25 BD Transduction Laboratories, France), anti-STAT1(pY701) (51-9002099, BD Transduction Laboratories, France), anti-STAT3 (51-9002097, BD Transduction Laboratories, France), anti-STAT3(pY705) (51-9002095, BD Transduction Laboratories, France), anti- $\beta$ -actine (A5441-2ML, Sigma, France).

### Cellules

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées sur gradient de Pancoll ,  
obtenues à partir de donneurs sains ou atteints d'hémochromatose (Etablissement National Français  
5 du Sang, Brest). Elles sont lavées avec du RPMI puis reprises dans du milieu AIM V. Les donneurs ont  
donné leur consentement éclairé.

Les monocytes sont purifiés à partir des PBMC isolées par une sélection positive avec de  
l'anti-CD14 associé à des billes magnétiques suivant les recommandations du fabricant (Miltenyi  
Biotec).

10 Les cellules B de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC-B), de patients non traités, sont isolées  
sur gradient de Pancoll.. La pureté LLC-B est déterminée par phénotypage CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>. Elle doit être  
supérieure à 85%. Sinon, une purification des cellules LLC-B se fait par sélection négative sur des billes  
magnétiques selon les recommandations du fabricant (StemCell Technologies), afin d'obtenir une  
pureté supérieure à 85%.

15 La lignée cellulaire Daudi (lymphome à cellules B de Burkitt (ECACC)), est maintenue dans du  
milieu DMEM supplémenté par 20% de SVF et de la Pénicilline (1 000UI)/Streptomycine (1 000µg) à  
37°C sous 5% CO<sub>2</sub>.

Les cellules murines EL4-huCD20, gracieusement données par le Dr Loisel (Animalerie,  
Université de Bretagne Occidentale, Brest), sont utilisées.

20 Le phénotypage des cellules est effectué avec les fluorochromes suivants : anti-CD4-PE (Clone  
13B8.2), anti-CD5-PC7 (Clone BL1a), anti-CD14-PC5 (Clone RMO52), anti-CD16-PC7 (Clone 3G8), anti-  
CD19 (Clone J3-119), anti-CD32-PE (Clone 2E1), anti-CD45-FITC (Clone J33), anti-CD56 (Clone N901  
(NKH-1)), IgG1-FITC , IgG1-PE, IgG1-PC5, IgG1-PC7, IgG2a-PC5, IgG2a-PC7, IgG2b-FITC (Beckman  
Coulter, France).

25

### Dosage de Cytokines dans les surnageants de culture

Les variations de concentration en IFN- $\gamma$ , IL-2 et IL-10, en fonction du temps dans les  
surnageants de culture de PBMC, cultivées avec ou sans digénésine purifiée (10µM) sont dosées par  
30 une ELISA selon les recommandations du fabricant (Peprotech).

### Analyse par Western Blot

Les PBMC sont traitées avec ou sans digénéside purifié (10 $\mu$ M) à différents temps. Les cellules sont ensuite reprises dans du tampon Leammli, puis les protéines sont dénaturées 3 minutes à 95°C.

5 Après séparation des protéines sur SDS-PAGE (gel 8% tris-glycine), elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (0.45 $\mu$ m, Biorad, France). Ces membranes sont saturées pendant 1 heure avec une solution de saturation (Tampon TBS-T : 0.1% (v/v) Tween-20, 150mM NaCl, 200mM Tris-HCl pH7.5, contenant 5% de BSA pour les anticorps anti-phosphorylation ou 5% de lait pour les autres anticorps) à température ambiante sous agitation. Elles sont incubées la nuit à 4°C avec les

10 anticorps primaires suivants : anti-STAT1 (1:4 000), anti-STAT1(pY701) (1 :1 000), anti-STAT3 (1:10 000), anti-STAT3(pY705) (1:500), anti- $\beta$ -actine (1:20 000). Après cela, les membranes sont lavées 4 fois avec du tampon TBS-T et incubées avec l'anticorps secondaire approprié (anti-mouse Ig-HRP, 1:2 000, Cell Signaling), pendant une heure à température ambiante sous agitation. Les signaux sont révélés avec le kit ECL Prime Detection et quantifiés avec le logiciel Bio1D (Vilber-Lourmat, France).

15 Les signaux sont normalisés par rapport à la  $\beta$ -actine.

### La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

Les PBMC, obtenues après purification sur gradient de Pancoll, sont reprises dans du milieu

20 AIMV afin d'obtenir une concentration cellulaire de 1,5.10<sup>6</sup> cellules/ml. 200 $\mu$ l de cellules sont ensemencés dans une plaque 96 puits à fond rond. Elles sont cultivées en présence ou non de digénéside ou de Firoin® (10 $\mu$ M) pendant 5 jours à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. En parallèle, des cellules Daudi sont cultivées pour être utilisées comme cellules cibles dans le test de l'ADCC.

Après 5 jours de culture, les cellules Daudi sont récupérées et traitées avec 40 $\mu$ l de CAM

25 (1 $\mu$ g/ml) pour 10<sup>6</sup> cellules pendant 15 minutes. Elles sont ensuite lavées deux fois, et elles sont resuspendues dans du milieu AIMV à une concentration de 0,4.10<sup>6</sup> cellules/ml. 50 $\mu$ l de cellules Daudi marquées avec la CAM sont ajoutées aux puits contenant les PBMC avec un rapport cellules effectrices/cellules cibles de 15/1. Le RTX ou l'HLA-DR (300ng/ml) sont ajoutés afin de vérifier la potentialisation de la réponse du digénéside ou de la Firoin®. Les cellules sont incubées pendant 4

30 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. La cytotoxicité est évaluée par cytométrie en flux après l'ajout de 17 $\mu$ l d'EH-1 (1 $\mu$ g/ml) pendant 15 minutes à température ambiante. Les essais sont réalisés en triplicats (Papadopoulos *et al.*, J Immunol Methods, 1994).

Les contrôles utilisés au cours de cette expérience sont les cellules cibles non marquées, les cellules cibles marquées avec CAM, les cellules cibles qui ont subi un traitement au DMSO avant le marquage EH-1, les cellules effectrices non marquées et les cellules effectrices marquées avec EH-1.

#### 5 Détermination de la viabilité des cellules par marquage à l'Annexine V/IP

Les cellules sontensemencées pour que leur concentration lors du test Annexine V/IP soit comprise entre  $5.10^5$  et  $5.10^6$  cellules.

Le tampon Binding Buffer (BB) 1x est préparé en diluant le tampon BB 10x dans de l'eau. L'IP est reconstitué à  $250\mu\text{g/ml}$  en ajoutant 1ml de tampon BB 1x.

10 Lors du test Annexin V/IP, les cellules sont lavées avec du PBS froid et centrifugées 5 minutes à  $500g$  à  $4^\circ\text{C}$ . Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans  $100\mu\text{l}$  du tampon BB 1x.  $1\mu\text{l}$  d'Annexine V ( $25\mu\text{g/ml}$ ) et  $5\mu\text{l}$  d'IP ( $250\mu\text{g/ml}$ ) sont ajoutés pour  $100\mu\text{l}$  de cellules. Après 15 minutes d'incubation à  $0^\circ\text{C}$  à l'obscurité,  $400\mu\text{l}$  de tampon BB 1x froid sont ajoutés avant de procéder à l'analyse cytométrique.

15

#### Activité endocytaire

L'activité endocytaire des polynucléaires a été mesurée par l'intégration de Dextran-FITC (Sigma-Aldrich).

20  $100\mu\text{l}$  de sang total est mis à  $4^\circ\text{C}$  ou à  $37^\circ\text{C}$  avec ou sans digénésine. Au bout de 24 heures, sont ajoutés dans le sang total  $1\text{mg/ml}$  Dextran-FITC pour mesurer l'endocytose à  $37^\circ\text{C}$  et à  $4^\circ\text{C}$ . Après 30 minutes, 1 heure, 1 heure 30, 2 heures, 2 heures 30, les globules rouges sont éliminés par osmolyse, puis les cellules sont récupérées après centrifugation et 3 lavages respectifs en PBS  $\text{NaN}_3$  3% froid, PBS  $\text{NaN}_3$  1% BSA 1% froid, puis PBS BSA 1% froid. Les cellules dans du PBS froid sont  
25 analysées au cytomètre en flux.

#### Phagocytose

Le kit de diagnostic PHAGOTEST™ est utilisé pour évaluer la phagocytose dans un échantillon  
30 de sang périphérique, prélevé sur héparine, selon les recommandations du fabricant.

### Modèles animaux

Des souris femelles immuno-déficientes SOPF/NOD.Cg-Prkdc Scid de 7 semaines sont en provenance de l'élevage Charles River (L'Arbresle, France). Des souris mâles immuno-compétentes SOPF/C57BL/6JRJ sont âgées de 7 semaines avec un poids de 23-25g au début de l'étude et sont en provenance de l'élevage Janvier (L'Arbresle, France).

Les conditions du protocole sont conformes aux exigences européennes (directive EEC/86/609), et aux recommandations énoncées dans le Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Dans toutes les expériences avec l'inoculation de la tumeur, les souris mâles de souche SOPF/C57BL6JRJ (Elevage Janvier, L'Arbresle, France) âgées de 7 semaines avec un poids de 23-25g au début de l'étude, reçoivent une injection intraveineuse avec  $8 \times 10^3$  cellules EL4-huCD20 dans 100 $\mu$ l de tampon phosphate physiologique 5PBS à jour 0. Avant chaque expérience, la stabilité de l'expression hu-CD20 a été vérifiée en analyse cytométrique.

Au 13<sup>ème</sup> jour (13 jours est le temps nécessaire pour une croissance quantifiable de la tumeur), une dose unique de Rituximab 12mg/kg (ch-IgG1k anti-CD20, ch-C2B8a été injectée par voie intraveineuse. Les souris sont réparties en 6 groupes de 8 individus. La molécule de digénésaside a été diluée dans de l'eau stérile pour une concentration mère de 50mg/ml. Deux autres solutions sont préparées à partir de la solution mère afin de charger les pompes ALZET aux doses de 2mg/souris et 4mg/souris. Le digénésaside est perfusé pendant 28 jours à dater du jour 13. Les 48 pompes ALZET ont été chargées avec 200 $\mu$ l d'eau stérile ou de digénésaside selon la procédure de remplissage décrite par le fournisseur, puis ont été implantées en sous-cutanée à partir du 13<sup>ème</sup> jour après l'implantation des cellules tumorales.

Les pompes ALZET ont été retirées 35 jours après implantation selon les recommandations du fournisseur. Les animaux du groupe 1 reçoivent uniquement de l'eau avec la pompe sur 28 jours ; le groupe 2 reçoit uniquement la molécule de digénésaside à une concentration de 2mg/souris pendant 28 jours ; le groupe 3 reçoit uniquement la molécule de digénésaside à une concentration de 4mg/souris pendant 28 jours ; le groupe 4 reçoit uniquement une injection de Rituximab et de l'eau stérile avec la pompe pendant 28 jours ; le groupe 5 reçoit une injection de Rituximab et de la molécule de digénésaside à une concentration de 2mg/souris pendant 28 jours ; le groupe 6 reçoit une injection de Rituximab et de digénésaside à une concentration de 4mg/souris pendant 28 jours.

Les animaux sont observés quotidiennement pour détecter la mortalité et la morbidité. Le poids corporel est enregistré 1-2 fois par semaine ou plus au début de l'étude.

Le Buprécare (Axienc, 03760087151244) a été administré pour assurer l'analgésie pendant les 3 jours suivant l'implantation de la pompe. Lors des premiers symptômes de paralysie des membres inférieurs, les souris sont euthanasiées. Toutes les souris encore vivantes sont euthanasiées à J187, et les organes sont collectés, pesés et analysés au laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU Morvan.

5

Les expérimentations effectuées avec les souris immuno-déficientes ont été réalisées selon le même procédé.

#### Examen anatomo-pathologique

10

Le foie, le cœur, les poumons, la rate, l'intestin et les reins des souris traitées ou non traitées par le Rituximab et le digénéaside sont collectées à chaque euthanasie et fixés au formol tamponné. Ces organes font l'objet d'un examen macroscopique permettant de prélever les zones d'intérêt pour l'étude histologique. Ces fragments d'organes sont ensuite inclus en bloc de paraffine. Des coupes au microtome sont réalisées à partir de ces blocs, puis colorées à l'hémalum-éosine-safran. L'expression de CD20 (Clone L26-Dako-Danemark) est évaluée par technique immunohistochimique sur ces coupes de tissus fixés et inclus en paraffine (automate Ventana-Benchmark).

15

## 20 **2. Effet thérapeutique du digénéaside seul ou en présence d'un autre agent immunostimulant démontré *in vitro***

#### Etude de la cytotoxicité du digénéaside sur des cellules saines et des LLC-B

25

Des cellules Daudi ont été mises en culture avec du digénéaside (10mM).

Comme cela est montré sur la Figure 1, le digénéaside (67,7%), le Floridoside (71,2%) et l'isofloridoside (79,3%) sont non toxiques à une dose de 10mM sur des cellules Daudis à 24H (AnnexineV/IP). Leur viabilité est proche de celle des cellules témoins (78,2%). Le témoin positif est l'actinomycine D (10,2%).

30

Ainsi, après 24H la viabilité des cellules traitées (sauf témoin positif) est similaire aux cellules Daudi non traitées.

Des résultats similaires sont obtenus pour la cytotoxicité de la Firion® (mannosylglycérate issu des bactéries). Son impact sur la survie des cellules de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) est peu important (figure 2).

#### Sécrétion de cytokines

10 La modulation du profil cytokinique des PBMC en culture a été évaluée par la technique ELISA. Les variations de concentrations en IL-2, IL-10 et IFN- $\gamma$  sont déterminées dans les surnageants de culture des PBMC incubées avec le digénéaside et le Floridoside à une concentration de 10 $\mu$ M, et/ou par 10 $\mu$ g/ml de LPS pendant 6 jours.

15 Une augmentation de la libération de l'IFN- $\gamma$  dans les surnageants avec le digénéaside est observée (figure 3).

Les PBMC acquièrent la capacité à sécréter l'IFN- $\gamma$  de manière dépendante du temps (Figure 3). En effet, à partir de 5 jours de culture, les PBMC activées par le digénéaside sécrètent un taux 7,5 fois plus élevé d'IFN- $\gamma$  par rapport aux PBMC seules (470,33pg/ml vs 62,41pg/ml, respectivement).

La méthode statistique utilisée pour discriminer les moyennes des différents groupes est la procédure des différences significatives minimales de Fisher (LSD) au niveau de confiance de 95,0%. Il n'existe pas de différence significative entre la quantité d'IFN- $\gamma$  sécrétée sous l'action du digénéaside et celle sécrétée sous l'action du LPS à J5.

#### Analyse de l'impact du digénéaside et de la Firion® sur les PBMC

Pour analyser le signal transmembranaire du digénéaside et de la Firion® sur les PBMC, l'expression des protéines STAT1 et STAT3 a été étudiée par Western Blots. La cinétique de l'expression a été étudiée après 4 heures, 24 heures, 48 heures, et 72 heures avec les deux composés et du LPS.

Le digénéaside stimule l'activation de la protéine STAT3 (figure 4a et figure 4b) mais pas de STAT1 (résultats non montrés). Au cours du temps, on remarque une variation de l'expression de

STAT3 phosphorylée (figure 4a et figure 4b). A 4 heures et 48 heures, l'expression de STAT3 phosphorylée est observée pour la Firoin® et le digénéaside. A 24 heures et 72 heures, l'intensité des bandes diminue traduisant une expression plus faible de STAT3 phosphorylée. L'actine sert de contrôle de la manipulation.

5

La phosphorylation de STAT3 est une voie qui mène à la production d'IFN- $\gamma$ .

#### La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ADCC

10 L'ADCC est un mécanisme de l'immunité à médiation cellulaire, au cours duquel une cellule effectrice détruit activement une cible préalablement recouverte d'anticorps spécifique. Ce mécanisme est induit principalement par les cellules NK, mais les monocytes et les polynucléaires neutrophiles peuvent également jouer ce rôle.

15 Les conditions expérimentales ont été définies comme suit : 15 PBMC/cible/ 300ng/ml RTX pendant 4 heures d'incubation. Le protocole suivi est décrit par Papadopoulos et al. (Papadopoulos et al. Immunol Methods, 1994). Ce protocole est basé sur l'utilisation de sondes fluorescentes CAM (FL1) et l'EH-1 (FL3). Quatre populations cellulaires sont étudiées, les cellules effectrices intactes (CAM-/EH-1-), les cibles vivantes (CAM+/EH-1-), les cellules effectrices mortes (CAM-/EH-1+) et les cibles mortes (CAM+/EH-1+).

20

La première étude portant sur l'action du digénéaside avec le RTX (figure 5), montre un effet de la molécule au niveau des cellules. Une augmentation de la lyse des cellules cible est observée. De même, la Firoin® induite, elle aussi, une augmentation de la lyse des cellules par les PBMC (figure 6b). Les valeurs de base (figure 6b) de 10,5% (1,4% d'écart-type), montrent l'action de lyse de l'anticorps seul sur les cellules effectrices et les cellules cibles. Quand on ajoute le digénéaside (figure 6a), la lyse monte à 15,7% (3,4% d'écart-type) et à 15,8% pour la Firoin® (0,4% d'écart-type) (figure 6b). Une homogénéité des valeurs est remarquée entre le digénéaside et la Firoin®. Dans le cadre d'un second donneur la valeur de base de lyse est de 74,9% (2,1% d'écart-type) tandis qu'avec la Firoin®, elle est de 84,2% (1,4% d'écart-type) (Figure 6b).

30

### Activation des monocytes en présence de Mannosylglycérate

L'impact du mannosylglycérate à 10 $\mu$ M sur la population de monocytes activés a été étudié durant 5 jours sur différentes cellules du sang total. La figure 8 montre que cette population de cellules se porte bien au bout de 5 jours, passant du 13,9% (sans Firoin®) à 21,9% de monocytes (avec la Firoin®).

### Phagocytose

10 La capacité des cellules présentes dans le sang périphérique total à phagocyter des bactéries fluorescentes a été étudiée. La méthode a été visualisée en cytométrie en flux.

La phagocytose de bactéries fluorescentes par les leucocytes présents dans un échantillon de sang périphérique prélevé sur héparine a été évaluée par le Kit PHAGOTEST™. Le pourcentage de phagocytes ayant ingéré des bactéries est donné par lecture en cytométrie en flux. Le sang hépariné est incubé avec les bactéries *Escherichia coli*-FITC à 37°C, un échantillon est conservé à 4°C et sert de 15 contrôle négatif. Différents composés (le Floridoside, l'Isofloridoside et le digénéaside) à une concentration de 10mM ont été testés par cette méthode. Sur des résultats en duplicats, des tests ont été effectués avec les cellules seules (42,5% de phagocytose), le Floridoside (47,6%), l'Isofloridoside (51,2%) et le digénéaside (77,4%).

20 Le Floridoside ainsi que l'Isofloridoside augmente un peu le pouvoir de phagocytose des granulocytes (figure 9).

Une expérience a été réalisée avec le Dextran-FITC. L'échantillon sanguin est en présence de 25 10 $\mu$ M de Firoin® pendant 24h à 4°C (contrôle négatif) et à 37°C (essai). Au bout des 24h, une solution de Dextran-FITC (1mg/ml) est ajoutée, et les échantillons sont prélevés après 1H, 2H, 3H, 4H, 5H d'incubation. Après la lyse des globules rouges et les lavages pour retirer l'excès de Dextran-FITC, les échantillons sont lus en cytométrie en flux. Les phagocytes sont la population sélectionnée.

La figure 10a montre que l'intégration du Dextran-FITC, dans les polynucléaires traités pendant 30 24 heures avec la Firoin®, commence après 2 heures d'incubation avec celui-ci pour atteindre 90,7% après 5 heures d'incubation. D'après la figure 10b, l'intégration du dextran-FITC, dans les

polynucléaires traités pendant 48 heures avec la Firoin®, est plus rapide qu'à 24 heures, puisqu'elle atteint un maximum de 82,5% à 2 heures 30.

Ainsi, la figures 10 montre une augmentation du pouvoir d'ingestion des polynucléaires en présence de Mannosylglycérate, et ce dès 24H. L'ingestion est montréé sur des bactéries et sur du Dextran-FITC.

### 3. Effet thérapeutique du digénéaside seul ou en présence d'un autre agent immunostimulant démontré *in vivo*

Pour observer l'effet immunomodulateur *in-vivo* sur le développement d'une tumeur transplantée, le digénéaside a été inoculé conjointement dans des souris immuno-compétentes SOPF/C57BL/6JRJ et des souris immuno-déficientes SOPF/NOD.Cg-Prkdc Scid. Les souris ont été observées quotidiennement et euthanasiées en cas de paralysie. Les souris SOPF/C57BL/6JRJ ont été autopsiées.

#### • Modèle de souris immuno-déficientes

Les souris immuno-déficientes ont été inoculées par  $3 \cdot 10^6$  cellules de la lignée Daudi dans 100µl par voie intra-veineuse. Au bout de 5 jours, les souris ont été réparties en 5 groupes : un groupe placebo recevant du PBS, un groupe recevant 40µg de RTX, un groupe recevant 40µg de RTX et les  $4 \cdot 10^6$  cellules effectrice ( $1,5 \cdot 10^6$  cellules NK et  $2,5 \cdot 10^6$  monocytes), un groupe recevant 40µg de RTX et  $4 \cdot 10^6$  cellules effectrices associé à une injection continue de digénéaside pendant 14 jours, un groupe recevant 40µg de RTX et  $4 \cdot 10^6$  cellules effectrices associé à une injection en intra péritonéale de 2µg d'IL-2 et une injection continue de digénéaside pendant 14 jours.

La posologie de d'IL-2 a été choisie afin de favoriser la transformation de ces cellules NK en LAK.

Les résultats obtenus montrent que le RTX permet d'améliorer la survie des animaux greffés par un lymphome humain. L'ajout du digénéaside permet de retarder les décès précoces (Figure 11).

#### • Modèle de souris immuno-compétentes

*Effets thérapeutiques du Rituximab et du digénéaside*

Le protocole suivi pour le traitement avec le RTX est le même que celui décrit par Daydé et *al.* (Daydé et al., Blood, 2009).

5

Ainsi, le même nombre de cellules EL4-huCD20 a été injecté aux souris et elles ont été traitées avec une dose de RTX (12mg/kg) jugée optimale.

Pour l'ensemble des souris, l'injection de  $8.10^3$  cellules EL4-huCD20 conduit au développement de tumeurs impliquant des ganglions lymphatiques, touchant la rate, le foie et la moelle épinière.

10

Des analyses de bioluminescence ont montré une augmentation exponentielle de l'activité correspondant à la croissance *in vivo* des tumeurs lymphatiques avec 73% au jour 9 et 100% à jour 13 des souris ayant un développement lymphatique. L'équipe de Daydé a montré une médiane de survie de 22 jours chez les souris n'ayant reçu aucun traitement. Dans le cas de la présente invention une médiane de survie de 38 jours a été obtenue. L'injection du RTX et du digénéaside a été effectuée au jour 13, qui est jugé comme le jour maximal pour le développement de la tumeur.

15

Dans le cas de la présente invention, la médiane de survie pour la dose de 12mg/kg est de 41 jours (figure 12).

20

Au 13<sup>ème</sup> jour, après le transfert des cellules tumorales, 12mg/kg de RTX ont été injecté en une dose unique, puis les souris ont été perfusées pendant 28 jours avec une dose de digénéaside de 2mg/souris ou 4mg/souris. Il a été observé une médiane de survie pour le RTX seul de 41 jours. Une souris a survécu et a été euthanasiée par la suite. Une légère différence a été observée entre les deux bras représentant le traitement avec le digénéaside seul, à une concentration de 2mg et de 4mg. La médiane de survie est homogène de 56 jours à 53 jours.

25

Dans les deux bras associant le RTX et le digénéaside, de nouveau aucune différence n'a été observée. Dans les deux cas, deux souris sont décédées seulement. Pour la dose de 4mg, elles sont mortes plus tôt aux jours 36 et 38, tandis que pour la dose de 2mg, les deux souris sont décédées aux jours 46 et 73.

30

L'ensemble des souris du groupe contrôle est décédé au bout de 96 jours. Les groupes traités avec la molécule de digénésaside seule ont un bénéfice de survie de 37,5% et 50% à 187 jours après inoculation des cellules tumorales, par rapport au groupe contrôle.

5 Les souris du groupe traité par le RTX seul présentent un bénéfice de survie de 25% par rapport au groupe contrôle. Les souris du groupe traité par l'association RTX-digénésaside présentent un meilleur taux de survie, puisque 75% des animaux survivent 187 jours après l'inoculation des cellules tumorales et ce quel que soit la dose injectée.

#### 10 *Examen anatomo-pathologique*

Les cellules EL4-huCD20 ont été analysées en cytométrie en flux et montrent le marquage CD20-FITC.

15 Dans l'étude anatomo-pathologique, ont été tout d'abord différenciées les souris décédées dans les premiers 40 jours (figure 13).

Dans le cas du groupe de souris n'ayant reçu aucune injection, deux souris sur trois présentent une tumeur générale avec, à l'examen macroscopique, un envahissement du hile hépatique, des reins et du péritoine. A l'examen histologique, les poumons sont infiltrés massivement par une tumeur exprimant le CD20 en immunohistochimie.

20 Dans le groupe ayant reçu une dose unique de RTX, une souris sur deux présente une tumeur volumineuse pulmonaire exprimant massivement l'antigène CD20, avec aucune infiltration des autres organes.

25 Dans le groupe ayant reçu l'injection en continu de digénésaside 2mg, les deux souris n'ont pas de tumeurs évidente observée de façon macroscopique, mais à l'étude immunohistochimique, montre une infiltration interstitielle pulmonaire ou lymphomateuse du foie et du hile pancréatique, par des éléments CD20 positifs a été observée.

30 Dans le groupe ayant reçu du digénésaside 4mg, trois souris sont étudiées. Elles ne présentent aucune anomalie macroscopique évidente. A l'étude immunohistochimique, a été observée une infiltration des ganglions hilaires pulmonaires marqués à l'anticorps anti-CD20, sans constitution de tumeur. En revanche, ces deux souris présentent un foyer tumoral au niveau de la graisse du hile rénal et l'autre une masse lymphomateuse péri-rénale. La 3<sup>ème</sup> présente un gros médiastin et une tumeur mésentérique volumineuse. En histologie, elle présente une infiltration massive cardiaque et

de la hilare pulmonaire par une population lymphomateuse CD20 positive. Enfin, deux souris du groupe RTX-digénésaside 4mg sont décédées dans les 40 premiers jours. L'une d'entre elles ne présenter aucune anomalie macroscopique avec quelques éléments CD20 positifs dispersés au niveau de la rate et un nodule tumoral au contact du pancréas. La seconde souris présente une tumeur médiastinale-pulmonaire exprimant l'antigène CD20.

Les souris sans traitement sont toutes décédées au bout du 96ème jour. Toutes les autres souris ont été euthanasiées au jour 187 (figure 14).

Sur les 3 souris ayant reçu une injection de digénésaside 2mg, une seule souris montre un foie ecchymotique, deux autres auront un aspect normal en macroscopie avec quelques cellules CD20<sup>+</sup> dans les ganglions hilaires du poumon.

Sur les 4 souris ayant reçu une injection de digénésaside 4mg, une seule souris montrera des infiltrats lymphoïdes interstitiels et périvasculaires dans le foie et le rein. Les autres ont un aspect normal en macroscopie avec quelques cellules CD20<sup>+</sup> dans les poumons et les ganglions hilaires du poumon. La figure 15 montre des infiltrats lymphoïdes hilaires dans le poumon ainsi que des infiltrats lymphoïdes suspects interstitiels et périvasculaires dans le foie et le rein, selon la coloration HES. Sur les images avec l'anti-CD20, sont observées quelques cellules CD20<sup>+</sup> dans le poumon et les ganglions, ainsi que dans la rate et le foie.

Les deux souris ayant reçu qu'une injection de RTX, ont un aspect normal en macroscopie avec quelques cellules CD20<sup>+</sup> dans les ganglions hilaires du poumon.

Sur les 6 souris ayant reçu une injection de digénésaside 2mg en continu et une injection unique de Rituximab, une souris montre des infiltrats lymphoïdes interstitiels et périvasculaires au foie et une au rein. Sinon toutes les six présentent un aspect normal en macroscopie avec quelques cellules CD20<sup>+</sup> dans les ganglions hilaires du poumon, une en aura à la rate.

Enfin sur les six souris ayant reçu une injection de digénésaside 4mg en continu et une injection unique de Rituximab, une seule souris montre des infiltrats lymphoïdes interstitiels et périvasculaires au foie et au rein. Sinon toutes ont un aspect normal en macroscopie avec quelques cellules CD20<sup>+</sup> dans les ganglions hilaires du poumon et une, dans les espaces interstitiels intra pulmonaires.

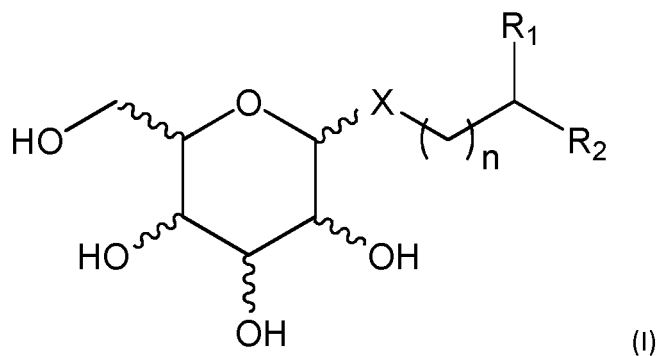
Le développement tumoral chez les souris euthanasiées au jour 187 est sous contrôle du système immunitaire. Dans ce modèle de souris immuno-compétente, l'action du RTX est renforcé par l'action immunostimulante du digénésaside.

Ces résultats montrent clairement que chez la souris immuno-compétente l'association entre le RTX et le digénésine ralentit le développement de la tumeur au sein des tissus. Les coupes anatomo-pathologiques montrent l'apparition d'un équilibre entre le système immunitaire et la tumeur. Aucun agrégat n'est présent. Les cellules immunitaires présentent la capacité de se coller sur les cellules tumorales.

Les exemples ci-dessus sont donnés à titre illustratif et non limitatif.

## REVENDEICATIONS

1. Composé de formule (I) suivante :



5

ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, tel que sous la forme d'un sel d'addition de base, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions,

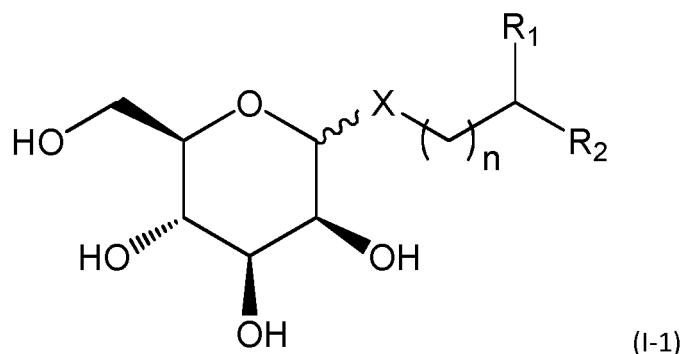
10 dans laquelle :

- n représente un nombre entier compris entre 0 et 3, préférentiellement n représente 0,
- X représente O, NR<sub>3</sub> ou S, préférentiellement X représente O,
- R<sub>1</sub> représente CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub>, COR<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub>, C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, C(O)N(OR<sub>5</sub>)R<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, P(O)(OR<sub>4</sub>)(OR<sub>5</sub>),  
15 P(O)(OR<sub>4</sub>)R<sub>5</sub>, SO<sub>2</sub>(OR<sub>4</sub>) ou SO<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>,
- R<sub>2</sub> représente H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle, OR<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>OR<sub>6</sub> ou CH<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, et
- R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> et R<sub>7</sub> représentent chacun, indépendamment les uns des autres, H ou (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyle,

pour son utilisation en tant que médicament.

20

2. Composé pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I-1) suivante :



ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

3. Composé pour son utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que  $R_1$  représente  $CO_2R_4$ ,  $COR_4$ ,  $CH_2OR_4$ ,  $C(O)NR_4R_5$ ,  $C(O)N(OR_5)R_4$  ou  $CH_2NR_4R_5$ , préférentiellement  $CO_2R_4$ ,  
 5 et/ou en ce que  $R_2$  représente  $CH_2OR_6$  ou  $CH_2NR_6R_7$ .

4. Composé pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il s'agit du 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate ou d'un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

10

5. Composé, ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, tel que sous la forme d'un sel d'addition de base, ou un stéréoisomère de celui-ci, ou un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour son utilisation en tant que médicament immunostimulant ou pour la prévention et/ou le traitement  
 15 d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques, en particulier pour la prévention des pathologies néoplasiques par voie d'amplification vaccinale, et/ou les pathologies infectieuses, en particulier pathologie liée au VIH.

20

6. Extrait d'au moins une algue appartenant à l'ordre des céramiales ou bangiales pour son utilisation en tant que médicament, en particulier médicament immunostimulant et/ou pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie comprise dans le groupe consistant en les pathologies néoplasiques et les pathologies infectieuses, ledit extrait comprenant une teneur en 2-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-D-glycérate comprise dans les plages de 0,1% à 2,0%, de préférence de 0,5% à 1,5% en poids par rapport au poids total de l'extrait, exprimé en extrait sec.

7. Extrait selon la revendication 6, pour son utilisation en tant que médicament pour la prévention des pathologies néoplasiques par voie d'amplification vaccinale ou en tant que médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie infectieuse qui est une pathologie liée au VIH.

5

8. Procédé de synthèse de composés tels que définis selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes :

10 (1) formation d'un dimère d'hexopyranoses, dans lequel les deux hexopyranoses sont reliés entre eux par l'intermédiaire d'une liaison glycolique convenablement substituée et d'autre part, lesdits hexopyranoses sont convenablement protégés le cas échéant et préférentiellement identiques,

(2) coupure et oxydation de la liaison C-C du motif glycolique; et

(3) récupération des composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, après une éventuelle déprotection, formation de sel ou fonctionnalisation subséquente, le cas échéant.

15

9. Composition pharmaceutique ou nutraceutique comprenant :

20 - au moins un composant choisi dans le groupe consistant en : un composé, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, un stéréoisomère de celui-ci, un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et un extrait tel que défini selon la revendication 6 ;

- un véhicule pharmaceutiquement ou nutraceutiquement acceptable, et

- optionnellement au moins un autre agent anti-tumoral.

10. Produit comprenant :

25 - au moins un composant choisi dans le groupe consistant en : un composé, un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci, un stéréoisomère de celui-ci, un mélange de stéréoisomères de celui-ci en toutes proportions, tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et un extrait tel que défini selon la revendication 6 ; et

- au moins un autre agent anti-tumoral ;

en tant que produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention et/ou le traitement d'une pathologie néoplasique.

- 5 11. Produit pour son utilisation selon la revendication 10, ledit autre agent anti-tumoral étant un anticorps anti-tumoral étant compris dans le groupe consistant en le rituximab, le trastuzumab, le cétuximab, le bévacizumab, le gemtuzumab ozagamicin, l'yttrium-90 Ibritumomab-Tiuxetan, l'alemtuzumab, le tositumomab, l'ofatumumab.

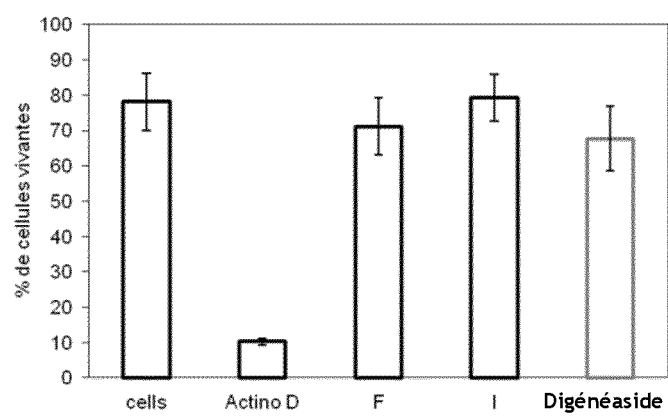


Figure 1

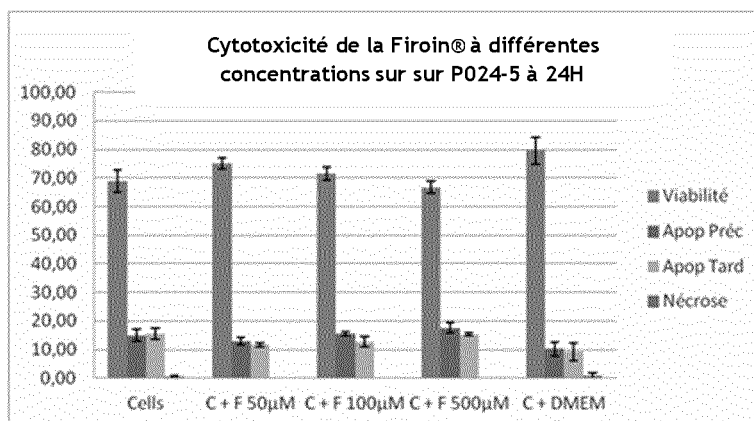


Figure 2a

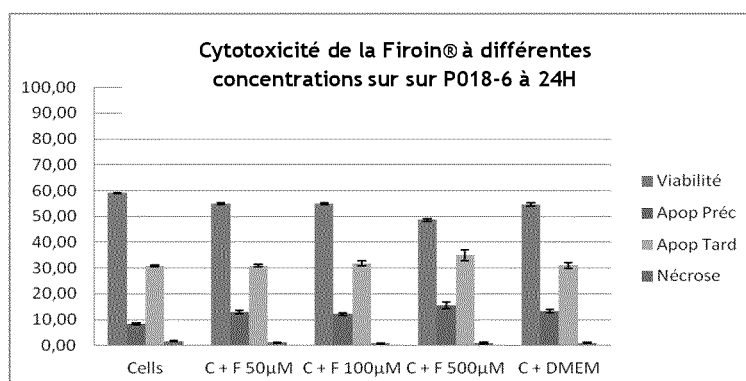


Figure 2b

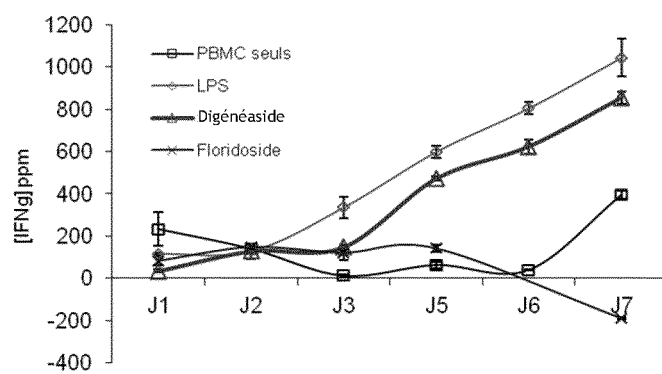


Figure 3

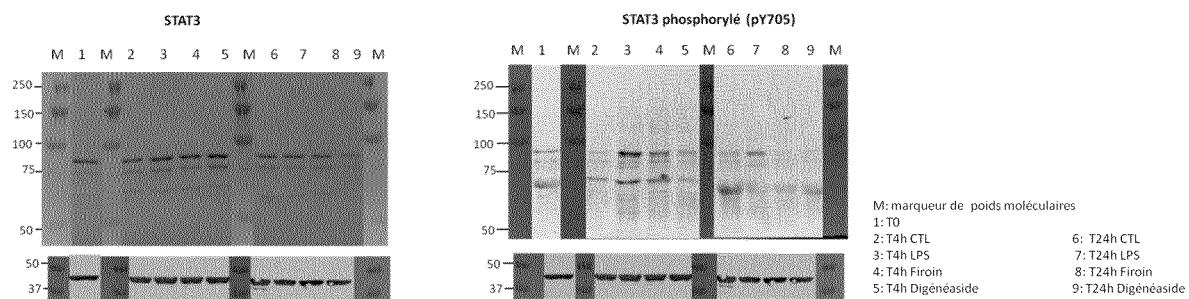


Figure 4a

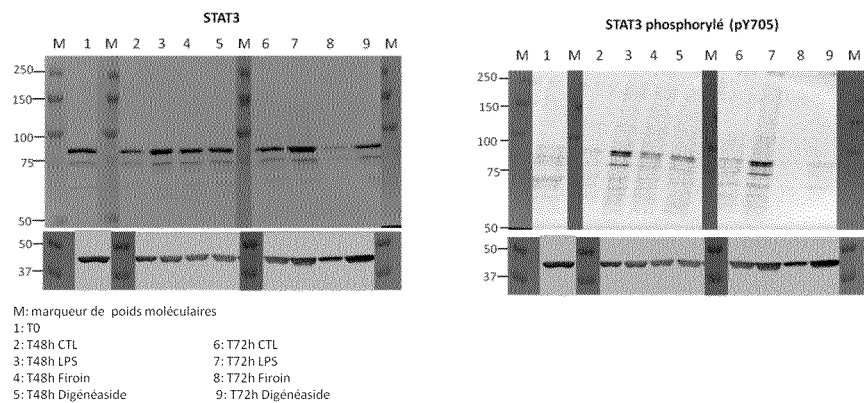


Figure 4b

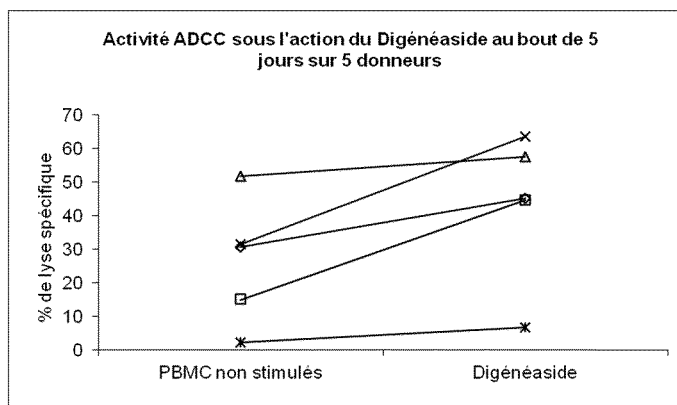


Figure 5

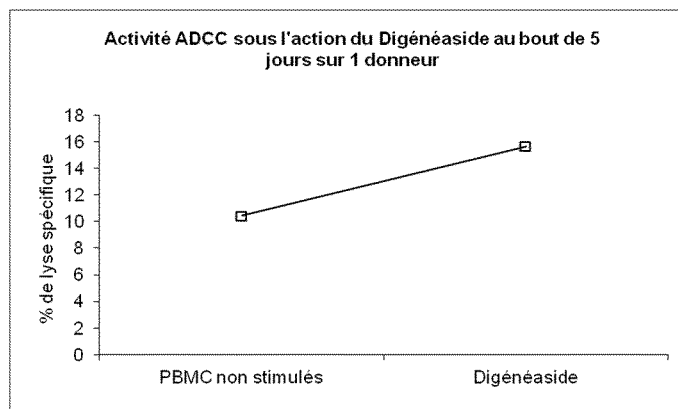


Figure 6a

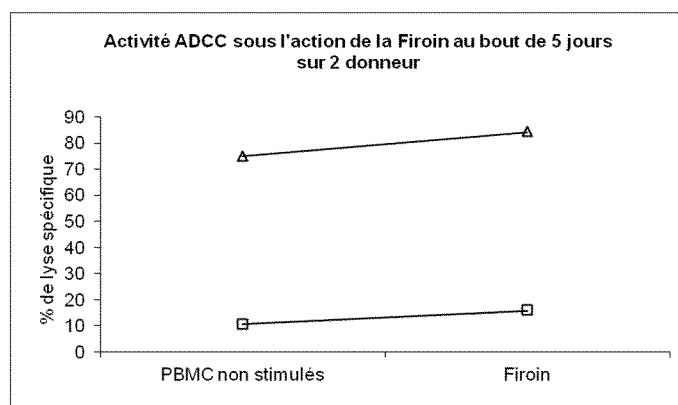


Figure 6b

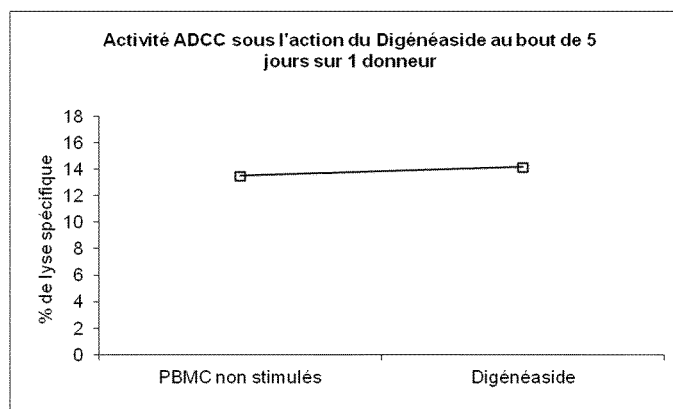


Figure 7a

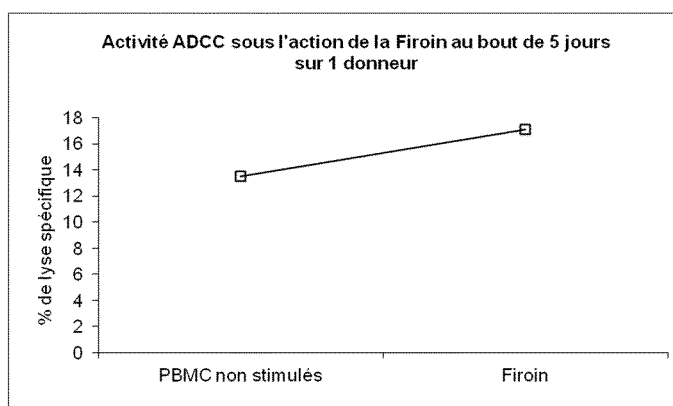


Figure 7b

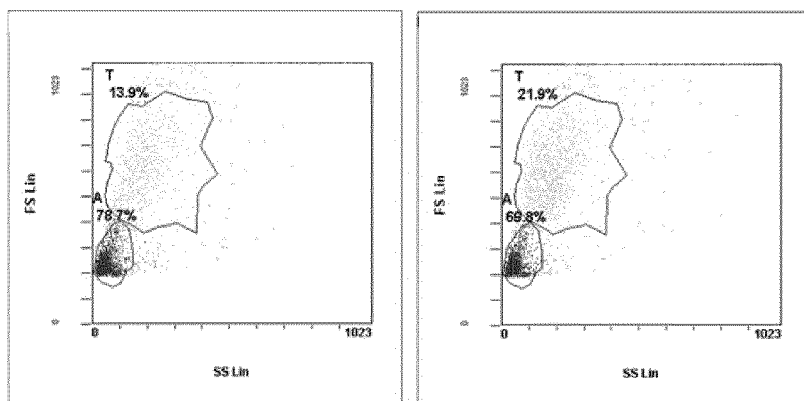


Figure 8

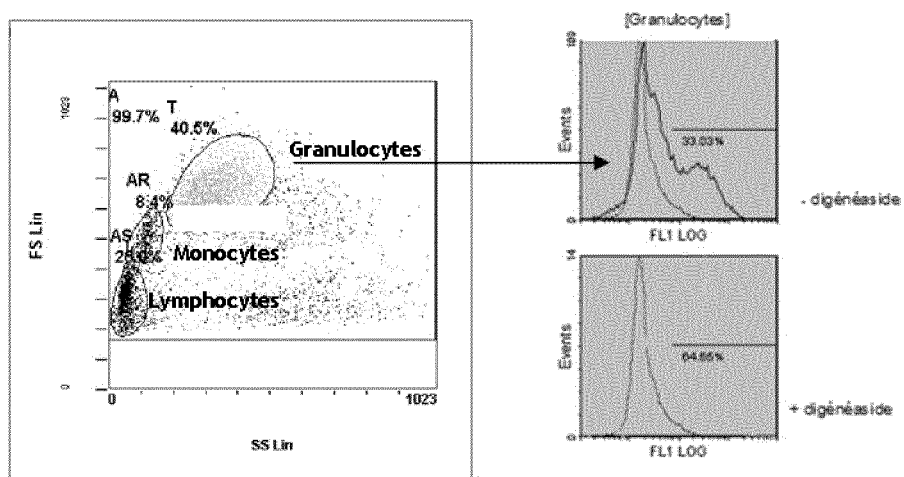


Figure 9

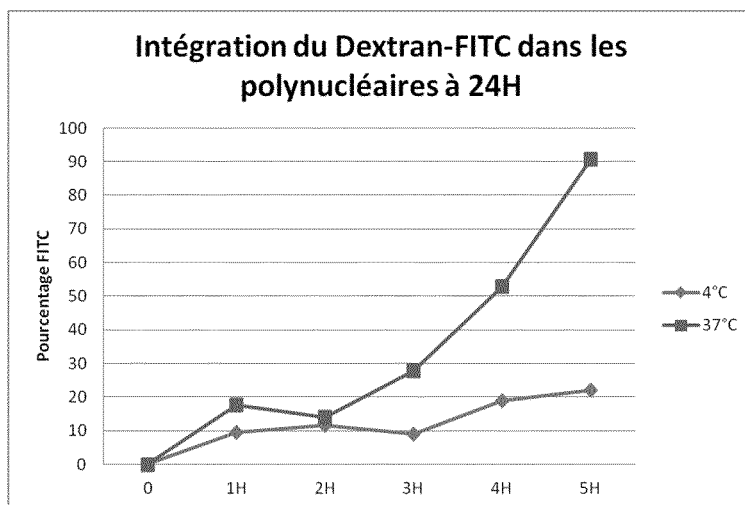


Figure 10a

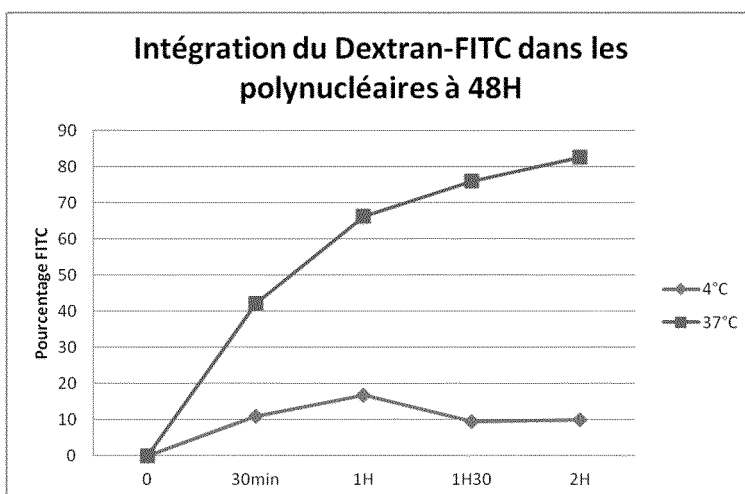


Figure 10b

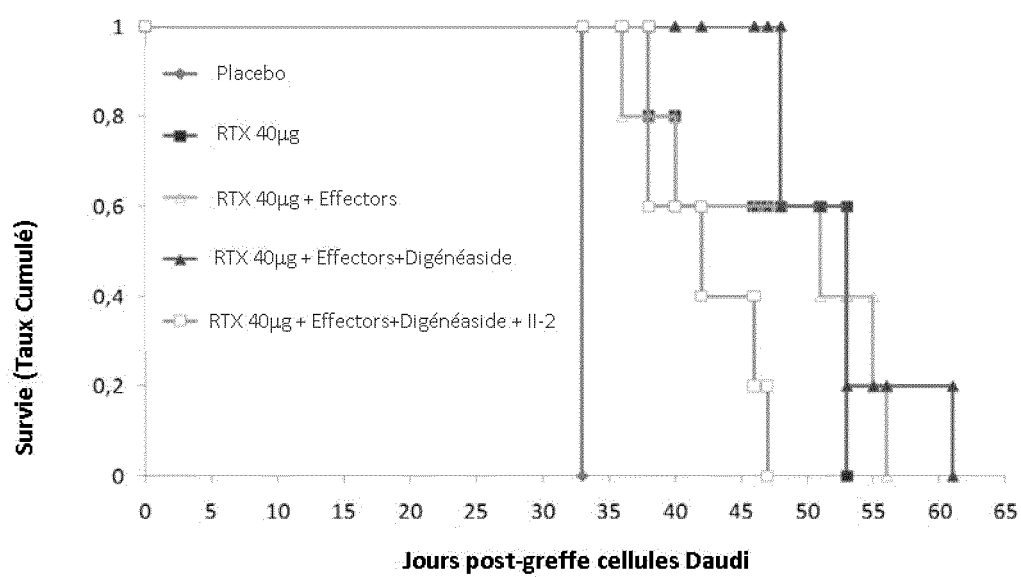


Figure 11

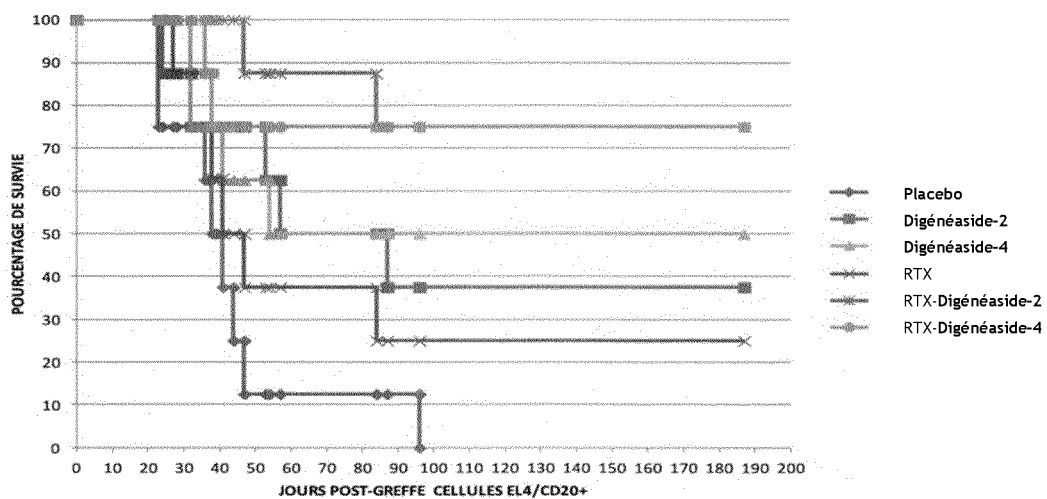


Figure 12





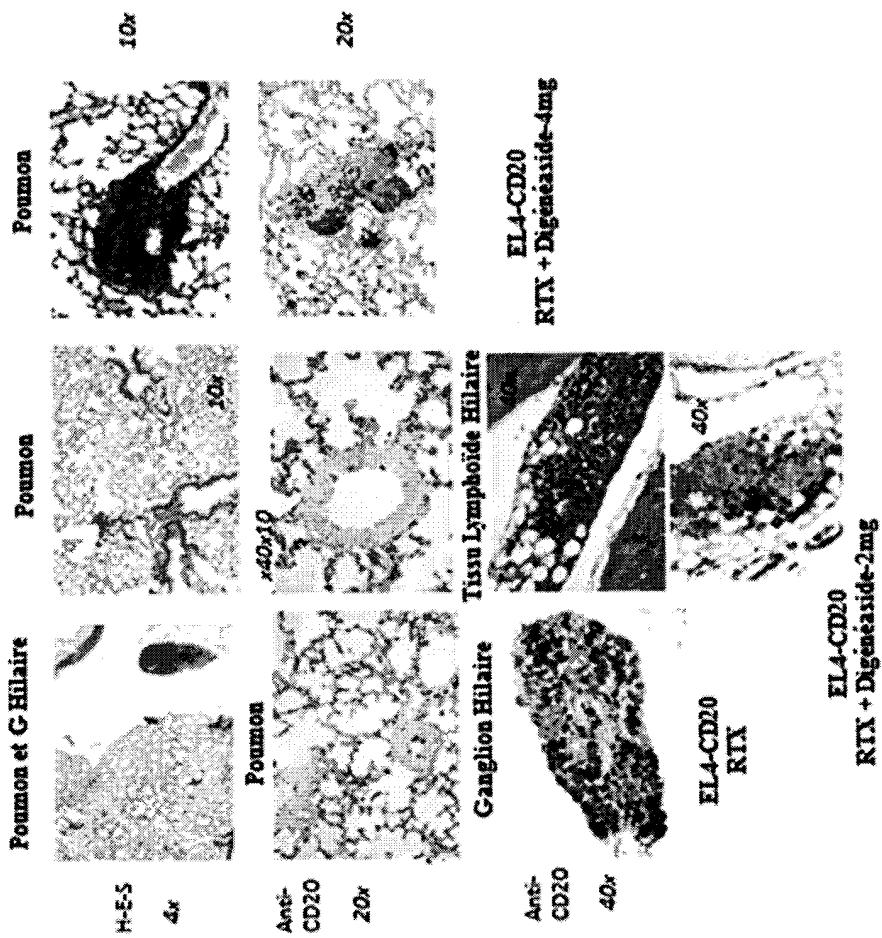


Figure 15



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FA 798578  
FR 1455818

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS   |   | Revendication(s) concernée(s)  | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|---|---|--|--|
| Catégorie   | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes   |  |  |
| X   | WO 2006/097263 A2 (BITOP AG FUER BIOTECHNISCHE OP [DE]; SCHWARZ THOMAS [DE]; LENTZEN GEOR)<br>21 septembre 2006 (2006-09-21)<br>* page 2; composé firoin *<br>* page 5, ligne 3 - ligne 5 *<br>-----  | 1-4,6,7,9  | A61K31/7028<br>A61P31/18<br>A61P35/00        |
| X   | WO 2005/002556 A1 (BITOP AG FUER BIOTECHNISCHE OP [DE]; KRUTMANN JEAN [DE])<br>13 janvier 2005 (2005-01-13)<br>* revendication 3 *<br>-----   | 1-4,6,7,9  |  |
| X   | WO 01/66100 A2 (HENDERSON MORLEY RES & DEV LTD [GB]; PARDOE IAN STUART [GB]; HARTLEY C) 13 septembre 2001 (2001-09-13)<br>* le document en entier *<br>-----  | 1-3,5,9-11   |  |
| A   | Stéphanie Bondu: "Thèse de doctorat: Analyses structurales des carbohydrates de l'algue Solieria chordalis... Possibilités d'application dans le domaine de la cancérologie-immunologie"<br>In: Stéphanie Bondu: "Thèse de doctorat", 2 juin 2009 (2009-06-02), Université de Bretagne, Brest (France), XP002737036, pages 247-272,<br>* le document en entier *<br>----- | 1-11   | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)<br>A61K |
| A   | WEIWER ET AL.: "SYNTHESIS OF FLORIDOSIDE", JOURNAL OF CARBOHYDRATE CHEMISTRY, vol. 27, 2008, pages 420-427, XP002737037,<br>* le document en entier *<br>-----  | 8  |  |
| Date d'achèvement de la recherche   |   | Examineur  |  |
| 10 mars 2015  |   | Trifilieff-Riolo, S  |  |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS   |   | T : théorie ou principe à la base de l'invention   |  |
| X : particulièrement pertinent à lui seul   |   | E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. |  |
| Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie |   | D : cité dans la demande   |  |
| A : arrière-plan technologique  |   | L : cité pour d'autres raisons   |  |
| O : divulgation non-écrite  |   | .....  |  |
| P : document intercalaire   |   | & : membre de la même famille, document correspondant  |  |

2  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1455818 FA 798578**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **10-03-2015**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 2006097263 A2                                | 21-09-2006             | EP 1858519 A2                           | 28-11-2007             |
|   |                        | JP 2008537734 A                         | 25-09-2008             |
|   |                        | US 2009060876 A1                        | 05-03-2009             |
|   |                        | WO 2006097263 A2                        | 21-09-2006             |
| -----   |                        |   |                        |
| WO 2005002556 A1                                | 13-01-2005             | AT 481100 T                             | 15-10-2010             |
|   |                        | DE 10330768 A1                          | 24-02-2005             |
|   |                        | EP 1641442 A1                           | 05-04-2006             |
|   |                        | EP 2253312 A2                           | 24-11-2010             |
|   |                        | ES 2353962 T3                           | 08-03-2011             |
|   |                        | JP 2009513509 A                         | 02-04-2009             |
|   |                        | US 2006246007 A1                        | 02-11-2006             |
|   |                        | US 2011152294 A1                        | 23-06-2011             |
| WO 2005002556 A1                                | 13-01-2005             |   |                        |
| -----   |                        |   |                        |
| WO 0166100 A2                                   | 13-09-2001             | AU 3586401 A                            | 17-09-2001             |
|   |                        | EP 1408936 A2                           | 21-04-2004             |
|   |                        | JP 2003525898 A                         | 02-09-2003             |
|   |                        | US 2003181394 A1                        | 25-09-2003             |
|   |                        | WO 0166100 A2                           | 13-09-2001             |
| -----   |                        |   |                        |