(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
01 juin 2023 (01.06.2023)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2023/094699 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07H 15/12 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2022/083709

(22) Date de dépôt international :
29 novembre 2022 (29.11.2022)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
21306658.2 29 novembre 2021 (29.11.2021) EP

(71) Déposants : **UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE** [FR/FR] ; Chemin du Thil, 80000 AMIENS (FR). **UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL VAL DE MARNE** [FR/FR] ; 61, avenue du Général de Gaulle, 94000 CRETEIL (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)** [FR/FR] ; 3, rue Michel Ange, 75016 PARIS (FR).

(72) Inventeurs : **WADOUACHI, Anne** ; 49 avenue du Général Leclerc, 80136 RIVERY (FR). **PAPY GARCIA, Dulce** ; 3 Rue Pasteur, 91380 CHILLY MAZARIN (FR). **POURCEAU, Gwladys** ; Le Clos D'Artin, 72210 LOUPLANDE (FR). **CHANTEPIE, Sandrine** ; 18 rue des jonquilles, 91210 DRAVEIL (FR).

(74) Mandataire : **REGIMBEAU** ; 20, rue de Chazelles, 75847 PARIS CEDEX 17 (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :
— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17(iv))*

Publiée:
— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

WO 2023/094699 A1

(54) **Title:** INHIBITORS OF ABNORMAL PHOSPHORYLATION AND TAU PROTEIN AGGREGATION

(54) **Titre :** INHIBITEURS DE LA PHOSPHORYLATION ANORMALE ET DE L'AGRÉGATION DE LA PROTÉINE TAU

(57) **Abstract:** The present disclosure relates to lipid anionic oligosaccharides and to the uses thereof in medicine, especially in the treatment of the pathologies associated with abnormal hyperphosphorylation of tau protein, such as Alzheimer's disease.

(57) **Abrégé :** La présente divulgation concerne des oligosaccharides anioniques lipidiques et leurs utilisations en médecine, tout particulièrement dans le traitement des pathologies associées à une hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau, telles que la maladie d'Alzheimer.

Inhibiteurs de la phosphorylation anormale et de l'agrégation de la protéine TAU

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne des oligosaccharides anioniques lipidiques et leurs utilisations en médecine, tout particulièrement dans le traitement des pathologies associées à une hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau, telles que la maladie d'Alzheimer.

ARRIERE PLAN TECHNOLOGIQUE

La maladie d'Alzheimer (MA) est la démence liée à l'âge la plus courante dans le monde. Elle serait à l'origine de 60-70% des cas de démence selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Plus de 50 millions de personnes dans le monde sont touchées par la MA et chaque année 10 millions de nouveaux cas sont dénombrés. Selon les prévisions de l'OMS, le nombre total de personnes atteintes de démence devrait atteindre 82 millions en 2030 et 152 millions d'ici 2050.

Cette pathologie a non seulement un impact sur la santé et sur le moral des malades et de leur famille, mais elle constitue aussi un poids économique important sur la société.

La MA est caractérisée par une perte progressive des capacités cognitives liée à une dégénérescence sévère des neurones. Sur le plan histopathologique, la MA est caractérisée par deux types de lésions cérébrales : d'une part, des plaques séniles (ou amyloïdes) qui sont des agrégats extracellulaires de peptides beta-amyloïdes (Aβ) et d'autre part, des dépôts/dégénérescences neurofibrillaires (les DNFs) correspondant à l'accumulation intracellulaire de la protéine Tau (MAPT, microtubule-associated protein Tau) anormalement phosphorylée (P-Tau).

Malgré un effort majeur de la recherche académique et industrielle durant ces 20 dernières années, aucun traitement développé n'a permis de bloquer efficacement et durablement l'évolution de la neurodégénérescence.

L'implication des plaques amyloïdes et des DNFs faites de P-Tau dans les altérations fonctionnelles des cellules neuronales étant bien acceptée, la plupart des traitements développés ont notamment ciblé l'accumulation progressive de la protéine bêta-amyloïde et plus récemment de Tau. Cependant, les échecs thérapeutiques des stratégies ciblant les différents épisodes de la cascade amyloïde J3 (AJ3) ont indiqué que l'accumulation d'AJ3 n'est pas le processus pathologique central dans la maladie, mais que c'est peut-être la phosphorylation anormale et l'agrégation de Tau qui devraient être ciblées afin de lutter contre cette maladie.

La protéine Tau fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules (protéines MAP). Chez l'humain, un des rôles principaux de la protéine Tau est de stabiliser le cytosquelette des neurones via son interaction avec la tubuline permettant la stabilité axonale. Dans la MA, la phosphorylation anormale de Tau induit le détachement de la protéine du cytosquelette, la protéine Tau ainsi soluble s'agrège pour finalement former les DNFs caractéristiques de la MA. Une corrélation directe a été montrée entre l'évolution clinique de la pathologie et l'accumulation de la protéine Tau anormalement phosphorylée et agrégée sous forme d'enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) dans le cerveau.

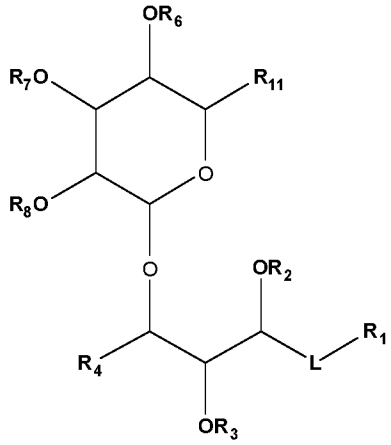
Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler Tau (cdK5, NCLK, la GSK-3β et MARK), mais ceci se fait d'une façon non spécifique puisque plusieurs autres protéines sont également leurs substrats. Ainsi, inhiber l'une des kinases n'empêchera pas l'action des autres. En accord avec ceci, et bien que de nombreux travaux aient été menés sur des inhibiteurs de kinases et également sur des phosphatases (également non spécifiques), considérées comme cibles thérapeutiques, aucun résultat positif permettant de stopper ou ralentir la maladie en inhibant l'activité de ces enzymes de façon individuelle n'a été obtenu à ce jour, que ce soient par des inhibiteurs de kinases, ou bien par des activateurs de phosphatases, ou par des agents de dissociation des DNFs.

A ce jour, les traitements en développement visant la protéine Tau sont majoritairement basés sur de l'immunothérapie au niveau extracellulaire. Les anticorps utilisés sont dirigés contre des fragments de Tau ayant pour but de diminuer les formes extracellulaires de la protéine Tau plus ou moins agrégées. Cependant, ces formes extracellulaires sont générées au niveau intracellulaire par la phosphorylation de la protéine Tau, après sécrétion au niveau extracellulaire ces formes agrégées de Tau semblent servir à la propagation de la pathologie dans le tissu cérébral. Actuellement, les immunothérapies ciblant la protéine Tau demeurent le principal espoir dans le domaine, avec les difficultés que l'immunothérapie porte, notamment sur l'inaccessibilité des anticorps au niveau intracellulaire pour arrêter le processus de phosphorylation anormale et l'agrégation de Tau, sur la stabilité de ces produits, la production d'anti-anticorps, et la nécessité de traitement en milieu hospitalier (Schroeder SK et al., Neuroimmune Pharmacol. **2016**, 11(1):9-25.). Il est donc globalement accepté que la meilleure stratégie sera celle qui puisse impliquer une petite molécule stable capable de bloquer l'hyperphosphorylation et agrégation de Tau et pouvant être administrée aux patients sous un régime classique en milieu non-hospitalier.

Ainsi, un besoin demeure pour la mise à disposition de composés capables de stopper ou de ralentir la progression des pathologies liées à une hyperphosphorylation de la protéine Tau, en particulier la maladie d'Alzheimer.

BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente invention porte sur des composés de formule (I) suivante :



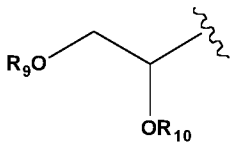
(I)

dans laquelle :

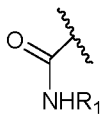
L est un groupement -C(=O)NH-, -C(=O)O- ou -C(=O)S- ;

R_1 est une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, optionnellement substituée en position terminale par un groupement choisi parmi -OH, -OR, -NH_2, -NHR, -NRR', -COOH, -COOR, -CONHR, -CONRR', -SR avec R et R' désignant indépendamment l'un de l'autre un groupement alkyle comprenant d'un à six atomes de carbone ;

R_4 est un groupement de formule (IIa) ou (IIb):



(IIa) ou



(IIb)

dans lequel :

R_9 et **R_{10}** sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_{12} est un groupement alkyle comprenant d'un à six atomes de carbone ;

R_{11} est un groupement -CH_2-O**R_5** ou -CONH**R_{13}** dans lequel :

R_5 est un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_{13} est un groupement alkyle comprenant d'un à six atomes de carbone ;

R_2, R_3, R_6, R_7 et **R_8** sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ; et

dans laquelle au moins un des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, de préférence au moins deux des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, sont un groupement sulfonate sous forme ionisée, pour leur utilisation en médecine, en particulier dans le traitement des tauopathies.

La présente invention porte également sur des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un composé de formule (I) tel que présentement décrit et un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables et leur utilisation dans le traitement des tauopathies.

D'autres aspects de l'invention sont tels que décrits ci-dessous et dans les revendications.

FIGURES

Figure 1 : Illustration du rôle des héparanes sulfates (HS).

Figure 2 : Western-blot montrant que la phosphorylation de Tau sur des sites caractéristiques de la maladie d'Alzeimer médiée par la GSK3β est dépendante de la présence d'héparine dans le mélange réactionnel (Sepulveda-Diaz JE et al., Brain. **2015** May;138(Pt 5):1339-54).

Figure 3 : Western-blot montrant que la phosphorylation anormale de Tau (P-Tau), révélée par les anticorps caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (AT270 et Ser199/202), est inhibée par la présence des maltobionamides C16 di-sulfatés (Mal16diS) après 3h de réaction in vitro.

Figure 4 : Western-blot montrant que la phosphorylation anormale de Tau (p-Tau), révélée par les anticorps caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (AT270, pSer199/202) est inhibée par la présence des maltobionamides C18 di-sulfatés (Mal18diS) après 3h de réaction.

Figure 5 : Western-blot comparant la capacité d'induction de la p-Tau (révélé par l'anticorps AT270) des composés dérivés du maltobionamide disulfatés en fonction de la longueur de la chaine hydrocarbonée (R_1) (Mal14diS à Mal20diS correspondant à des chaines de 14 à 20 carbones) et de l'héparine (« Hep ») après 3h de réaction.

Figure 6 : Western-blot évaluant la phosphorylation anormale de Tau (p-Tau), révélée par les anticorps caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (AT270 et Ser199/202) pour les différents dérivés selon leur disaccharide (mono ou disulfatés) et la longueur de chaine hydrocarbonée (14 à 20 carbones) après 3h de réaction.

Figure 7 : Western-blot comparant la capacité de protéger la protéine Tau de sa phosphorylation anormale induite par l'héparine, révélée par l'anticorps AT270, des maltobionamides disulfatées (Mal16diS, Mal18diS) par rapport aux formes oxydées à 16 (Mal16diOx) et 18 carbones (Mal18diOx).

Figure 8 : Western-blot comparant l'effet de la sulfatation (monoS et triS) du disaccharide sur la capacité des maltobionamides à 16 ou 18 carbones à protéger efficacement la Tau de sa

phosphorylation anormale induite par l'héparine, révélée par l'anticorps AT270 avec 2 lots de composés (Mal16monoS, Mal16triS pour Mal16 et Mal18monoS, Mal18triS pour Mal18).

Figure 9 : Western-blot comparant des molécules maltobionamides à 16 carbones persulfatées (Mal16perS) à leurs homologues disulfatés efficaces (Mal16diS, Mal18diS) dans leur capacité à protéger efficacement la Tau de sa phosphorylation anormale induite par l'héparine, révélée par l'anticorps AT270.

Figure 10 : Suivi de l'agrégation de la protéine Tau par intégration de la Thioflavine-T, composé fluorescent qui s'intègre aux agrégats, en présence de l'héparine (ratio massique Tau : Hep de 2 :1 ou 4 :1) ou du composé maltobionamide disulfaté à 16 carbones (Mal16diS) (ratio massique Tau : oligo, 4 :1). *n représente le nombre de répétitions.*

Figure 11 : Cytotoxicité des maltobionamides disulfatés à 16 carbones (Mal16diS) aux concentrations 0,1, 1, 10, ou 100 µg/ml.

Figure 12: Cytotoxicité du maltobionamide disulfaté à 18 carbones (Mal18diS) aux concentrations 0,1, 1, 1, 10 ou 100 µg/ml.

Figure 13 : Protection de la phosphorylation de Tau *in cellulo* par les composés maltobionamides disulfatés à 16 (Mal16diS) carbones aux concentrations 1, 10 ou 100 µg/ml. *t-test* : * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; nombre de réplicats ≥ 5.

Figure 14 : Protection de la phosphorylation de Tau *in cellulo* par les composés maltobionamides disulfatés à 18 (Mal18diS) carbones aux concentrations 1, 10 ou 100 µg/ml. *t-test* : * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; nombre de réplicats ≥ 5.

Figure 15 : Effet du Cell16diS sur la p-tau *in cellulo* dans le modèle SHSY5Y avec induction de tauopathie. *t-test* non significatif. nombre de réplicats ≥ 3.

Figure 16 : Effet du Lac16diS sur la p-tau *in cellulo* dans le modèle SHSY5Y avec induction de tauopathie. *t-test* : * $p < 0.05$; nombre de réplicats ≥ 3

Figure 17 : Diminution de la phosphorylation de Tau présente modérément (J14 de culture) dans les cellules corticales du modèle murin rTg4510 par les composés maltobionamides disulfatés à 16 (Mal16diS) carbones aux concentrations 0.1 ou 1 µg/ml. *t-test* : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; nombre de réplicats = 4.

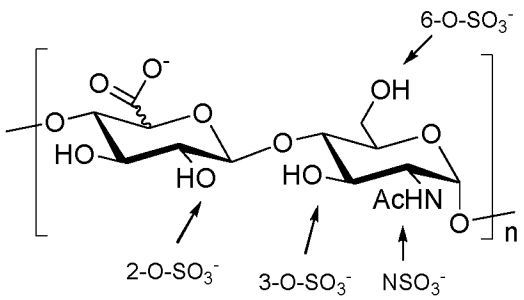
Figure 18 : Diminution de la phosphorylation de Tau présente sévèrement (J18 de culture) dans les cellules corticales du modèle murin rTg4510 par les composés maltobionamides disulfatés à 16 (Mal16diS) carbones aux concentrations 0.1 ou 1 µg/ml. *t-test* non significatif. ; nombre de réplicats = 4.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Il a été découvert que des oligosaccharides anioniques lipidiques tels que décrits ci-dessous (composés de formule (I)) sont capables de protéger la protéine Tau de son hyperphosphorylation anormale, de ne pas induire eux-mêmes l'hyperphosphorylation anormale de Tau et de réduire l'agrégation de la protéine Tau induite par l'héparine, prototype des héparanes sulfates hypersulfatés présents dans la maladie d'Alzeimer (Sepulveda-Diaz JE et al., Brain. **2015** May;138(Pt 5):1339-54).

Les oligosaccharides anioniques lipidiques de la présente invention se révèlent dès lors être utiles dans le traitement des pathologies associées à une hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau, et tout particulièrement dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Les composés peuvent s'avérer capables de stopper ou de ralentir la progression de la pathologie.

Ces oligosaccharides anioniques lipidiques miment certaines caractéristiques des héparanes sulfates. L'équipe des biologistes du Gly-CRRET (Holmes BB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **2013** Aug 13;110(33); Sepulveda-Diaz JE et al., Brain. **2015** May;138(Pt 5):1339-54 ; Maïza A et al , FEBS Lett. 2018 Dec;592(23):3806-3818), et d'autres équipes dans le monde (Goedert M et al., Nature. **1996** Oct 10;383(6600):550-3; Zhao J et al., Biophys J. **2017** Mar 14;112(5):921-932), ont montré que les héparanes sulfates sont critiques pour le développement et l'évolution de la pathologie :



acide uronique (β 1-4)D-glucosamine
(GlcA / IdoA) (GlcNH / GlcNHAc)

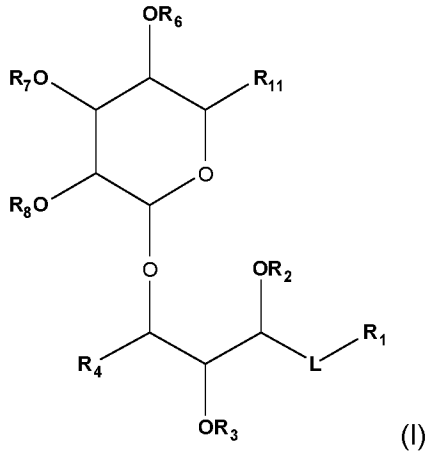
Les héparanes sulfates sont des copolymères d'acide uronique (D-glucuronique ou L-iduronique) et de D-glucosamine pouvant être N-acétylée et comportant des sites sulfatés.

Le laboratoire Gly-CRRET a notamment montré que le changement de conformation de Tau permettant son hyperphosphorylation anormale et son agrégation dans les cellules neuronales résulte de l'interaction de la protéine avec des chaines d'héparane sulfate (HS) internalisées dans les neurones des sujets malades. En jouant un rôle de chaperons moléculaires, les HS permettent ainsi à la protéine Tau d'acquérir une conformation qui favorise l'attaque de kinases, ce qui résulte dans l'hyperphosphorylation anormale et l'agrégation de la protéine (Figure 1).

De plus, les études réalisées par le Gly-CRRET et par d'autres équipes montrent que les HS sont des récepteurs des agrégats de Tau ('proteopathic seeds') à la surface des cellules et qu'ils participent centralement au transfert de fibrilles de Tau d'une cellule malade vers une cellule saine, processus connus comme 'spreading' (Holmes BB et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **2013** Aug 13;110(33);. Le spreading de Tau est actuellement considéré comme responsable de la propagation de la maladie entre cellules et entre différentes régions du cerveau. La présence des HS dans les inclusions de Tau *in vivo*, ainsi que leur capacité à déclencher la phosphorylation anormale de Tau, son agrégation et son 'spreading', suggèrent un rôle central de ces polysaccharides dans la mise en place et l'évolution du processus neurodégénératif.

Oligosaccharides anioniques lipidiques

Les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention sont des composés de formule (I) suivante :



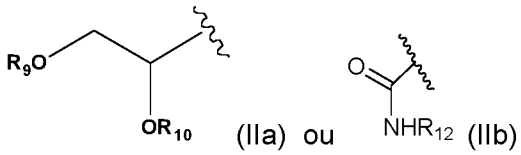
(I)

dans laquelle :

L est un groupement -C(=O)NH-, -C(=O)O- ou -C(=O)S- ;

R_1 est une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, optionnellement substituée en position terminale par un groupement choisi parmi -OH, -OR, -NH_2, -NHR, -NRR', -COOH, -COOR, -CONHR, -CONRR', -SR avec R et R' désignant indépendamment l'un de l'autre un groupement alkyle comprenant d'un à six atomes de carbone ;

R_4 est un groupement de formule (IIa) ou (IIb) :



(IIa) ou (IIb)

dans lequel :

R_9 et R_{10} sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_{12} est un groupement alkyle comprenant de un à six atomes de carbone ;

R_{11} est un groupement $-CH_2-OR_5$ ou $-CONHR_{13}$ dans lequel :

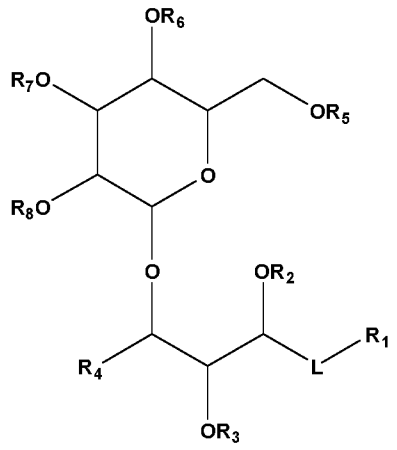
R_5 est un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_{13} est un groupement alkyle comprenant de un à six atomes de carbone ;

R_2, R_3, R_6, R_7 et R_8 sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ; et

dans laquelle au moins un des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, de préférence au moins deux des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10} sont un groupement sulfonate sous forme ionisée.

Plus particulièrement, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention sont des composés de formule (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

L est un groupement -C(=O)NH-, -C(=O)O- ou -C(=O)S- ;

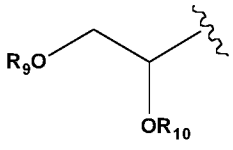
R_1 est une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, optionnellement substituée en position terminale par un groupement choisi parmi -OH, -OR, $-NH_2$, -NHR, -NRR', -COOH, -COOR, -CONHR, -CONRR', -SR avec R et

R' désignant indépendamment l'un de l'autre un groupement alkyle comprenant de un à six atomes de carbone ;

R_2 est un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_3 est un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_4 est un groupement de formule (IIa) :



(IIa)

dans lequel :

R_9 et R_{10} sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_5, R_7 et R_8 sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_6 est un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ; et

dans laquelle au moins un des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, de préférence au moins deux des groupements R_2, R_3, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, sont un groupement sulfonate sous forme ionisée.

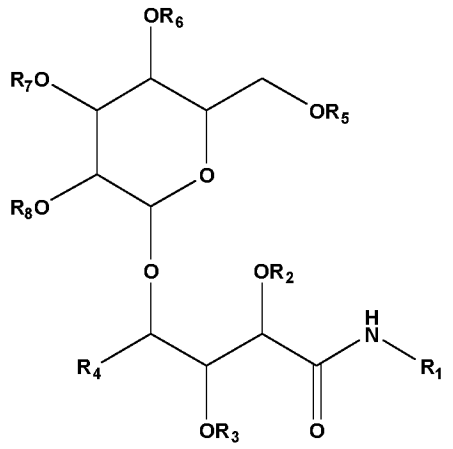
L'expression « groupement sulfonate sous forme ionisée » désigne le groupement $-SO_3^-$.

Les composés de formule (I) sont de préférence sous forme de sels, en particulier sous forme de sels de sodium. Ainsi les groupements sulfonates sous forme ionisée sont de préférence des groupements sulfonates de sodium ($-SO_3Na$).

Dans certains modes de réalisation, les composés de formule (I) présentent deux, trois, quatre, cinq, six, sept ou huit groupements sulfonates sous forme ionisée. Ainsi, deux, trois, quatre, cinq, six, sept ou l'ensemble des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10} sont des groupements sulfonates sous forme ionisée. Cependant, les composés fortement chargées pouvant induire une toxicité, les composés comprenant deux ou trois groupements sulfonates ionisés peuvent être préférés.

Dans certains modes de réalisation, **L** est un groupement -C(=O)NH-.

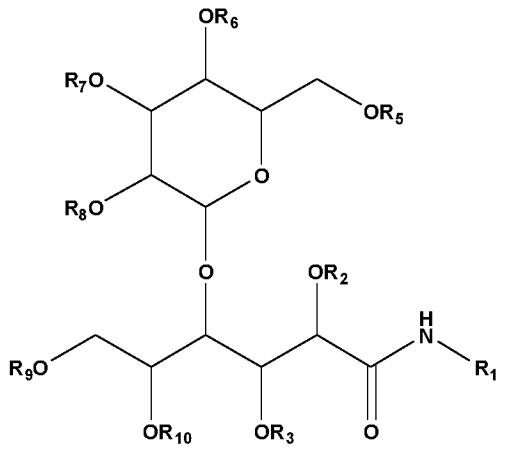
Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la formule (Ia) suivante :



(Ia)

dans laquelle R_1 à R_8 sont tels que décrits ci-dessus et dans laquelle au moins un des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, de préférence au moins deux des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, sont un groupement sulfonate sous forme ionisée.

Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la formule (Ib) suivante :



(Ib)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits ci-dessus ou ci-dessous et dans laquelle au moins un des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, de préférence au moins deux des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10}, sont un groupement sulfonate sous forme ionisée.

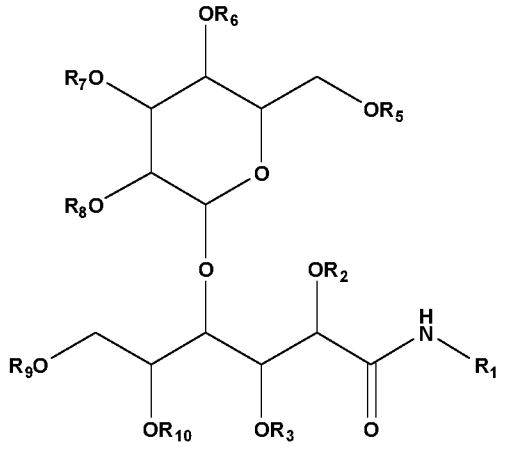
Dans les formules (I), (Ia) et (Ib), R_1 est de préférence une chaîne hydrocarbonée linéaire saturée comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, de préférence 16 et 18 atomes de carbone.

Dans les formules (I), (Ia) et (Ib), R_2, R_3 et R_{10} sont de préférence un atome d'hydrogène.

Dans les formules (I), (Ia) et (Ib), R_5 est de préférence un groupement sulfonate sous forme ionisée et R_6, R_7 et R_8 sont des atomes d'hydrogènes.

Dans les formules (I), (Ia) et (Ib), R_9 est de préférence un groupement sulfonate sous forme ionisée.

Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la formule (Ib) suivante :



(Ib)

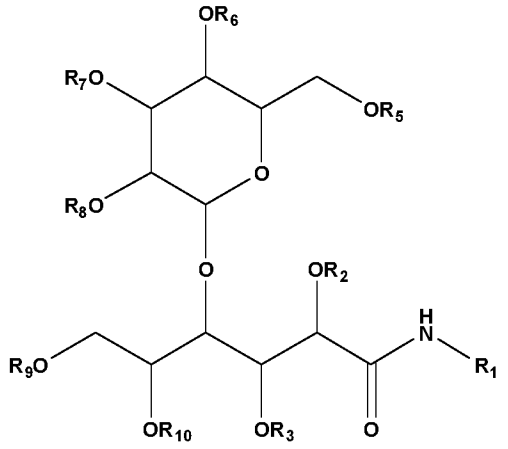
dans laquelle :

R_1 est une chaîne hydrocarbonée linéaire saturée comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, de préférence 16 ou 18 atomes de carbone ;

R_2, R_3, R_6, R_7, R_8 et R_{10} sont des atomes d'hydrogène, ou un seul des groupements R_2, R_3, R_6, R_7, R_8 et R_{10} est un groupement sulfonate sous forme ionisée et les autres groupements sont des atomes d'hydrogène ; et

R_5 et R_9 sont des groupements sulfonates sous forme ionisée.

Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la formule (Ib) suivante :



(Ib)

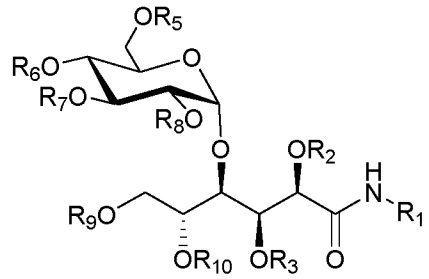
dans laquelle :

R_1 est une chaîne hydrocarbonée linéaire saturée comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, de préférence 16 ou 18 atomes de carbone ;

R_2, R_3, R_6, R_7, R_8 et R_{10} sont des atomes d'hydrogène ; et

R_5 et R_9 sont des groupements sulfonates sous forme ionisée.

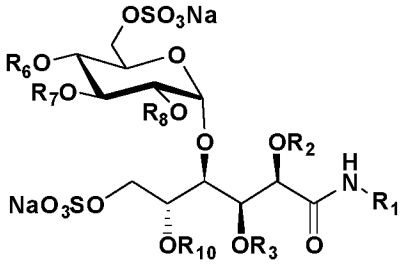
Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la structure (Ic) suivante :



(Ic)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits ci-dessus.

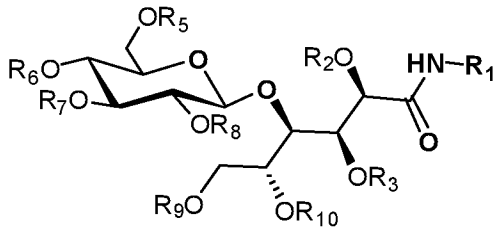
Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la structure (Id) suivante :



(Id)

dans laquelle R_1, R_2, R_3 et R_6 à R_8 et R_{10} sont tels que décrits ci-dessus.

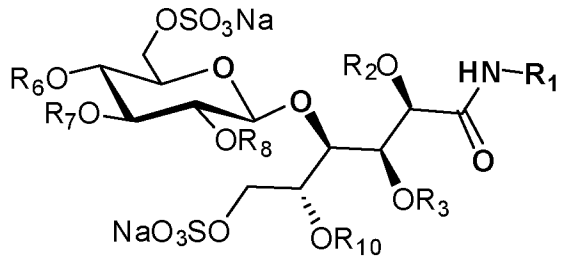
Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la structure (Ie) suivante :



(Ie)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits ci-dessus.

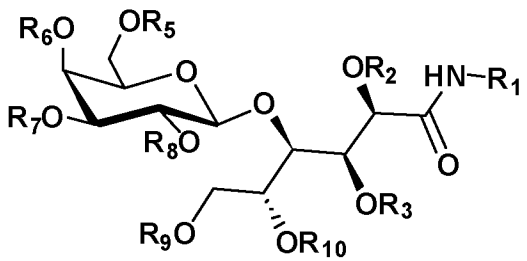
Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la structure (If) suivante :



(If)

dans laquelle R_1, R_2, R_3 et R_6 à R_8 et R_{10} sont tels que décrits ci-dessus.

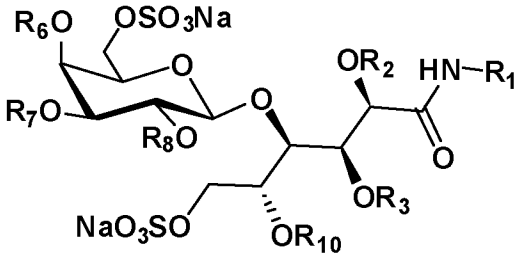
Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la structure (Ig) suivante :



(Ig)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits ci-dessus.

Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention ou utiles dans le cadre de la présente invention présentent la structure (Ih) suivante :



(Ih)

dans laquelle R_1, R_2, R_3 et R_6 à R_8 et R_{10} sont tels que décrits ci-dessus.

Dans certains modes de réalisation, les composés de la présente invention sont des composés de formule (I) à la condition que le composé n'est pas le sodium hexadecyl D-lactobionamide(2,5)sulfate, c'est-à-dire le sodium hexadecyl D-lactobionamide disulfate, le sodium hexadecyl D-lactobionamide trisulfate et leurs mélanges.

Des exemples non limitatifs de composés de formule (I) incluent les composés de formule (I) présentés dans le tableau 1 de la section « Exemples ».

Procédé de préparation des composés de formule (I)

Le schéma et les procédures décrites ci-dessous illustrent des voies de synthèse pour les composés de formule (I) et ne doivent pas être considérés comme limitatifs.

Les composés de formule (I) peuvent être préparés en 3 étapes à partir d'un disaccharide, tel qu'un maltose, cellobiose ou lactose. Le procédé comprend les étapes suivantes :

(étape 1) oxydation de la position anomère du disaccharide ;

(étape 2) synthèse de l'ester méthylique et aminolyse pour greffer la chaîne hydrocarbonée (R_1) en condition sans solvant par mécanosynthèse ;

(étape 3) sulfatation sélective des groupements hydroxyles primaires ou persulfatation.

Un tel procédé est illustré sur le schéma réactionnel ci-dessous (Schéma 1) dans lequel le disaccharide est le maltose. Il est entendu que le maltose peut être remplacé par n'importe quel disaccharide approprié.

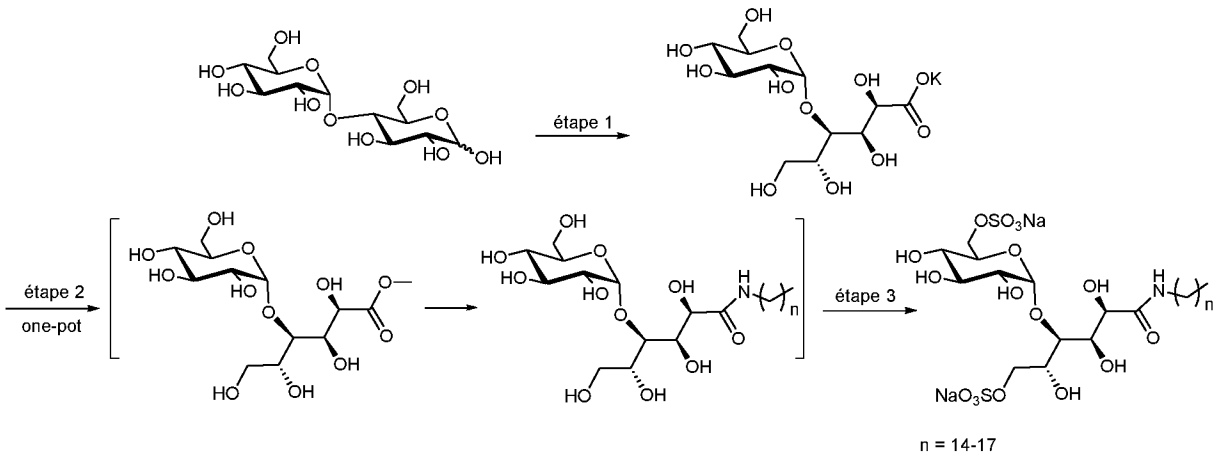


Schéma 1 : voie de synthèse des composés de formule (I) à partir du maltose

Etape 1 :

L'oxydation de la position anomère du disaccharide peut être réalisée selon des méthodes bien connues, telle que par exemple par la méthode A décrite dans *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2016,** 4(4), 2432-2438.

De manière alternative, le maltobionate de sodium peut être préparé par photocatalyse (Omri M. et al., *ACS Catalysis* **2018**) avec un même taux de conversion : >99%, sélectivité : >95 % (estimée par RMN).

Etape 2 : synthèse one-pot de dérivé *N*-alkyl D-maltobionamide

Elle est réalisée par un procédé de mécanosynthèse sans solvant. Le glycobionate de potassium est broyé en présence d'un catalyseur acide supporté (H_2SO_4/SiO_2) et de méthanol (en quantité juste nécessaire pour méthyler l'acide carboxylique formé) dans un broyeur à billes, puis dans un second temps avec l'alkylamine ajoutée après conversion totale du glycobionate en ester. Des taux de conversion quantitatifs pour l'étape 2, typiquement supérieur à 85%, peuvent être obtenus pour l'ensemble des deux étapes.

Etape 3 : L'étape de sulfatation est réalisée selon un protocole de la littérature en milieu pyridine en présence d'un agent sulfatant, le SO_3-pyridine (Tetrahedron. 2010 Apr 17; 66(16): 2907–2918).

Dans la suite, l'expression « un composé de formule (I) » désigne un composé de formule (I) tel que décrit ci-dessus, incluant les composés décrits dans la section « Exemples ». L'expression « un composé de formule (I) » désigne un seul composé de formule (I) ou un mélange de deux ou plusieurs composés de formule (I).

Applications thérapeutiques

Il a été montré que les composés de formule (I) protègent efficacement la protéine Tau de son hyperphosphorylation anormale induite par l'héparine, induisent faiblement la phosphorylation de la protéine Tau et réduisent l'agrégation de la protéine Tau induite par l'héparine. Les composés de formule (I) se révèlent dès lors être utiles en médecine, tout particulièrement dans le traitement des pathologies liées à une hyperphosphorylation ou phosphorylation anormale de la protéine Tau (Tauopathie), et tout particulièrement dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Les composés de formule (I) permettraient d'agir en inhibant la phosphorylation anormale de Tau, non pas en inhibant les kinases mais en protégeant Tau de leur attaque, et ceci en amont du processus d'agrégation et de propagation des agrégats.

Ainsi, la présente invention porte sur un composé de formule (I) pour son utilisation en médecine ou, formulé différemment, en tant que médicament.

Plus spécifiquement, la présente invention porte sur un composé de formule (I) pour son utilisation dans le traitement des pathologies liées à une hyperphosphorylation ou phosphorylation anormale de la protéine Tau, communément désignées par le terme « tauopathies ». Des exemples non limitatifs de tauopathies incluent la maladie d'Alzheimer, la démence frontotemporale avec parkinsonisme en chromosome 17 (DFTP17), la maladie de Pick, la dégénérescence corticobasale, la paralysie supranucléaire progressive (PSP).

Ainsi, dans des modes de réalisation particuliers, la présente invention porte sur un composé de formule (I) pour son utilisation dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la démence frontotemporale avec parkinsonisme en chromosome 17 (DFTP17), de la maladie de Pick, de la dégénérescence corticobasale ou de la paralysie supranucléaire progressive. Dans des modes de réalisation particuliers, la présente invention porte sur un composé de formule (I) pour son utilisation dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

La présente invention porte également sur l'utilisation d'un composé de formule (I) pour la préparation d'un médicament utile dans le traitement des pathologies liées à une hyperphosphorylation ou phosphorylation anormale de la protéine Tau (Tauopathie), et tout particulièrement dans le traitement d'Alzheimer.

Compositions pharmaceutiques

La présente invention porte également sur une composition pharmaceutique, en particulier un médicament, comprenant un composé de formule (I) et un ou plusieurs excipients, en particulier un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables et leurs utilisations dans les applications thérapeutiques décrites ci-dessus.

L'expression « pharmaceutiquement acceptable » désigne ce qui est connu pour être non toxique et qui peut être utilisé dans le domaine de la médecine. Des excipients pharmaceutiquement acceptables sont bien connus dans la littérature médicale.

Les excipients sont choisis selon la forme pharmaceutique et le mode d'administration souhaités. De tels excipients sont bien connus de l'homme du métier.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées par voie parentérale, telle que par voie intraveineuse ou intradermique, ou par voie topique, orale ou nasale.

Les formes administrables par voie parentérale incluent les suspensions aqueuses, les solutions salines isotoniques ou les solutions stériles et injectables qui peuvent contenir des agents de dispersion et/ou des mouillants pharmacologiquement compatibles. Les formes administrables par voie orale incluent les comprimés qui peuvent être dispersibles, orodispersibles, effervescents ou solubles, les gélules molles ou dures, les poudres, les granules, les solutions et suspensions orales. Les formes administrables par voie nasale incluent les aérosols. Les formes administrables par voie topique incluent les patchs, les gels, les crèmes, les pommades, les lotions, les sprays, les collyres. De préférence, les composés ou compositions de l'invention sont administrés par voie orale ou parentérale (notamment intraveineuse).

La présente invention concerne également une méthode de de traitement des pathologies ci-dessus indiquées qui comprend l'administration, à un individu en ayant besoin, d'une dose efficace d'un composé de formule (I) ou d'une composition pharmaceutique comprenant un composé de formule (I) et un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

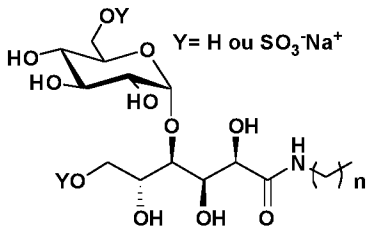
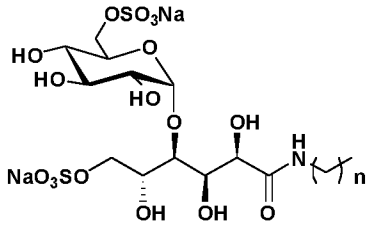
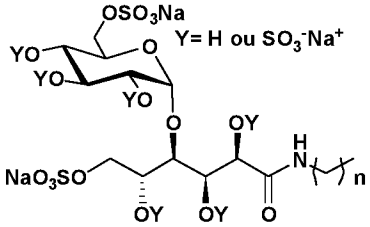
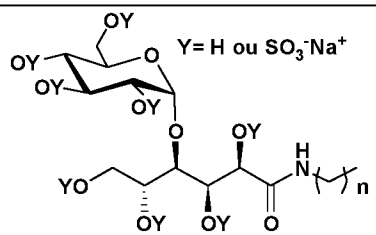
La dose efficace d'un composé de formule (I) varie en fonction de nombreux paramètres tels que, par exemple, la voie d'administration choisie, le poids, l'âge, le sexe, l'état d'avancement de la pathologie à traiter et la sensibilité de l'individu à traiter.

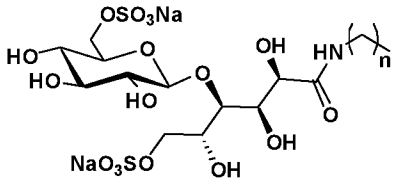
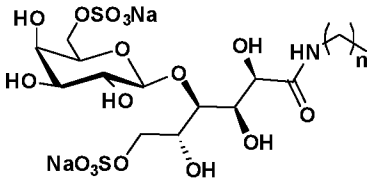
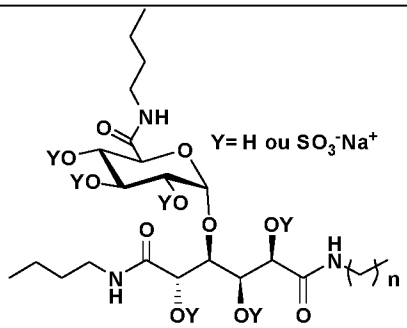
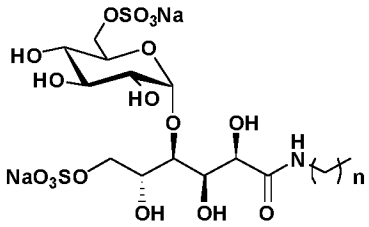
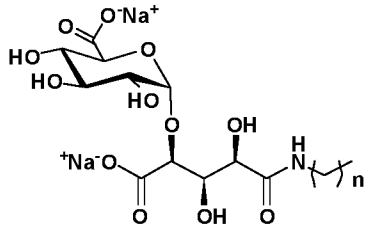
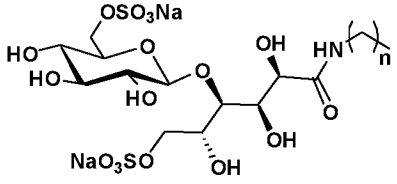
Les exemples qui suivent sont donnés à titre illustratif, mais ne doivent en aucun cas être considérés comme limitatifs de la présente invention.

EXEMPLES

I. Composés testés

Les composés testés sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

		Structure		Code
Composés de formule (I)	Maltobionamide monosulfatés		n=15	Mal16monoS
			n=17	Mal18monoS
	Maltobionamide disulfaté		n=15	Mal16diS
			n=17	Mal18diS
	Maltobionamide trisulfaté		n=15	Mal16triS
			n=17	Mal18triS
	Maltobionamide persulfaté	 Mélange avec majoritairement 6 sulfates	n=15	Mal16perS

		Structure		Code
	Cellobionamide disulfaté		n=15	Cell16diS
			n=17	Cell18diS
	Lactobionamide disulfaté		n=15	Lac16diS
			n=17	Lac18diS
	Maltobionamide dibutylamide persulfaté		n=15	Mal16diBu-perS
Composés ne répondant pas à la formule (I)	Maltobionamide disulfaté		n=13	Mal14diS
			n=18	Mal19diS
			n=19	Mal20diS
	Maltobionamide dioxydé		n=15	Mal16diOx
			n=17	Mal18diOx
	Cellobionamide disulfaté		n=13	Cell14diS

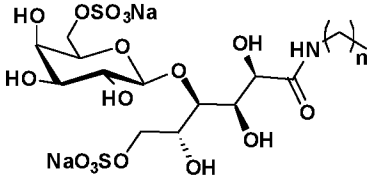
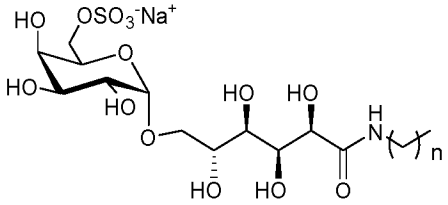
		Structure		Code
	Lactobionamide disulfaté		n=13	Lac14diS
	Melibionamide monosulfaté		n=13	Mel14monoS
			n=15	Mel16monoS
			n=17	Mel18monoS

Tableau 1 : composés testés

II. Synthèse des composés testés

II-1. Matériels et méthodes chimiques

a) Réactifs et solvants

Les réactifs utilisés proviennent des sociétés Merck, Acros ou Alfa Aesar et sont utilisés sans purification. Les solvants sont achetés soit sous forme anhydre ou sont distillés sous atmosphère inerte et conditionnés sur tamis moléculaire 3 ou 4 Angströms.

b) Broyeur à billes

Les réactions sont menées dans un broyeur planétaire Fritsch Pulverisette Premium 7 (P7PL) équipé de deux bols de 20 mL comprenant chacun 80 billes de 5mm, en zircone (ZrO_2).

c) Chromatographie

Chromatographie sur Couche Mince (CCM). Les chromatographies sur couche mince sont effectuées sur des plaques de silice avec support aluminium ALUGRAM® Xtra SIL G/UV_{254} pour la phase normale ou ALUGRAM® RP-18/ UV_{254} pour la phase inverse. Les techniques utilisées pour révéler les produits après élution sont : H_2SO_4/EtOH à 4% ou molybdate de cérium (IV) : $(NH_4)_4Ce(SO_4).2H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, H_2SO_4, H_2O (2,1 g/5,3 g/ 12 mL/ 188 mL) puis chauffage.

Chromatographie flash automatisée. Les purifications flash automatisées ont été réalisées avec un appareil flash Grace (Reveleris®iES Flash System). La séparation se fait à l'aide de colonnes de silice normale ou C18, prépaquées disponibles dans le commerce (4g, 12g, 24g, 40g, 80g). Il est possible de réaliser des purifications en phase normale et également en phase inverse. La masse de produits bruts correspond au maximum à 10% de silice de la colonne prépaquée. L'appareil est équipé d'un détecteur à diffusion de lumière (DEDL) et d'un détecteur UV à deux longueurs d'onde paramétrables.

d) Caractérisation des composés

Le pouvoir rotatoire spécifique

Les pouvoirs rotatoires spécifiques ont été mesurés à une température de 20° C à l'aide du polarimètre Perkin-Elmer 343 qui émet une lumière polarisée de longueur d'onde λ=549 nm (raie D du sodium). La concentration c est exprimée en gramme pour 100 mL de solvant.

Spectrométrie de masse basse résolution.

Les analyses en spectrométrie de masse basse résolution ont été réalisées sur un appareil simple quadripôle (Micromass-Waters ZQ) possédant une source d'ionisation électrospray (Z-spray). L'appareil permet d'analyser en mode d'ionisation positif ou négatif. Le voltage de capillaire est de 3.5 kV et la tension de cône variable de 20 à 120 V. Les températures de la source et de désolvatation sont respectivement de 80 et 150°C. Le gaz de désolvatation et de nébulisation est l'azote.

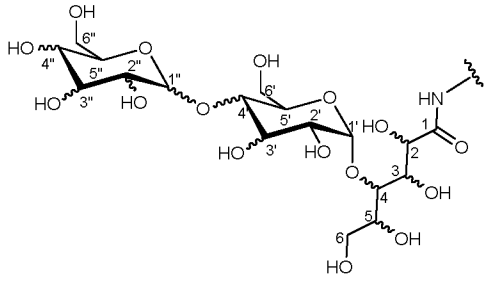
Spectrométrie de masse haute résolution.

Les analyses en spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) ont été réalisées sur un spectromètre de masse hybride quadripôle à temps de vol (Micromass-Waters Q-TOF Ultima Global), équipé d'une source d'ionisation électrospray. Les températures de la source et de désolvatation sont respectivement de 80 et 120°C. Le gaz utilisé, de nébulisation et de désolvatation, est l'azote avec un débit respectif de 20 et 500 L/h. Le voltage du capillaire est 3,5 kV et la tension de cône varie de 100 à 250 V. Avant toute mesure de masse exacte, une calibration est effectuée avec de l'acide orthophosphorique. La précision de la mesure de masse exacte du Q-TOF étant inférieure à 5 ppm, l'accès à la composition élémentaire des molécules est possible.

Spectrométrie RMN. Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C ont été réalisés sur un spectromètre Bruker Advance 400 ou 600 MHz. Les spectres RMN ^{1}H sont enregistrés à 400 MHz ou 600 MHz et les spectres RMN ^{13}C à 101 MHz ou 150 MHz. Toutes les expériences sont réalisées à une température proche de 25°C, dans un solvent deutéré qui sert aussi de référence. Les

déplacements chimiques sont donnés en ppm, les constantes de couplage en Hertz. Les spectres RMN sont traités à l'aide de MestReNova.

Numérotation des carbones :



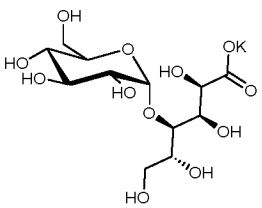
II-2 Synthèse des maltobionamides sulfatés

Les maltobionamides sulfatés, incluant les composés de formule (I), ont été préparés selon le schéma (1) présenté dans la description, sauf indications contraires.

II.2 a). Mode opératoire pour la synthèse des glycobionates de potassium

Une solution aqueuse de 5% de disaccharide (250 mg dans 5 mL d'eau MilliQ) est placée dans un tube pour microonde CEM de 10 mL, puis 2 équivalents de K_2CO_3 et 2.5 mg de catalyseur Au/Al_2O_3 préparé selon le protocole décrit dans l'*ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2016,** 4, 2432-2438, sont additionnés, et le mélange est soumis aux ultrasons afin d'homogénéiser. Puis 1.8 équivalents de H_2O_2 à 30 % dans l'eau sont additionnés puis le mélange est placé dans un microonde CEM Discover et irradié à 60°C, en utilisant le programme Dynamic pour une durée de 20 min. Le catalyseur est ensuite filtré sur PVDF 0.25µm ou éliminé par centrifugation. Le filtrat est ensuite lyophilisé et le brut réactionnel analysé en RMN ^1H afin de contrôler la conversion totale de l'aldose en aldonate. La réaction peut être menée sur 1 g de disaccharide dans un tube de 35 mL avec un temps de réaction de 50 min à 70 min selon le disaccharide.

D-maltobionate de potassium (Mal)



Rendement quantitatif

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{12}H_{21}KO_{12}$

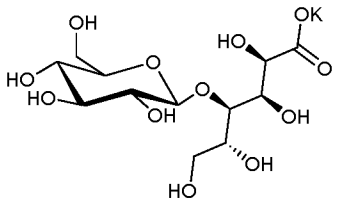
MM : 396,39 g.mol^{-1}

ESI -MS: [M-K]$^-$ *m/z* 357 Da

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O): δ 5.20 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-1'), 4.17 (dd, *J* = 6.2, 2.6 Hz, 1H, H-3), 4.13 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-2), 4.03 (dt, *J* = 7.7, 3.7 Hz, 1H, H-5), 3.98 – 3.89 (m, 2H, H-5', H-4), 3.89 – 3.80 (m, 3H, 1 H-6'a, H-6'b, H-6a), 3.77 (dd, *J* = 9.2, 9.9 Hz, 1H, H-3'), 3.71 (dd, 1H, *J* = 11.9, 7.8 Hz, H-6b), 3.59 (dd, *J* = 9.9, 3.8 Hz, 1H, H-2'), 3.47 (dd, *J* = 9.1, 10.1 Hz, 1H, H-4').

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O): δ 178.2 (C-1), 100.4 (C-1'), 82.4 (C-4), 73.0 (C-3'), 72.6 (C-2), 72.5 (C-3), 72.4 (C-5), 72.3 (C-5'), 71.8 (C-2'), 69.3 (C-4'), 62.1 (C-6), 60.4 (C-6').

D-Cellobionate de potassium (Cell)



Rendement quantitatif

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{12}H_{21}KO_{12}$

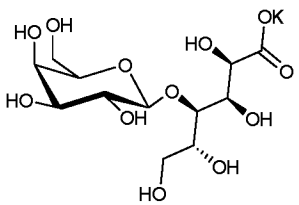
MM : 396,39 g.mol^{-1}

ESI –MS : [M-K]$^-$ *m/z* 357 Da

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O): δ 4.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.16 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-2), 4.09 (dd, *J* = 5.4, 3.0 Hz, 1H, H-3), 4.05 – 3.94 (m, 2H, H-4, H-5), 3.91 (dd, *J* = 12.4, 2.1 Hz, 1H, H-6'a), 3.85 (dd, *J* = 12.0, 3.1 Hz, 1H, H-6a), 3.78 – 3.71 (m, 2H, H-6b, H-6'b), 3.52 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-3'), 3.49 – 3.44 (m, 1H, H-5'), 3.44 – 3.38 (m, 1H, H-4'), 3.35 (dd, *J* = 9.4, 7.9 Hz, 1H, H-2').

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O): δ 178.4 (C-1), 103.0 (C-1'), 81.8 (C-4), 76.0 (C-5'), 75.6 (C-3'), 73.4 (C-2'), 72.4 (C-2), 71.8 (C-5), 71.6 (C-3), 69.5 (C-4'), 61.9 (C-6), 60.6 (C-6').

D-Lactobionate de potassium (Lac)



Rendement quantitatif

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{12}H_{21}KO_{12}$

MM : 396,39 $g.mol^{-1}$

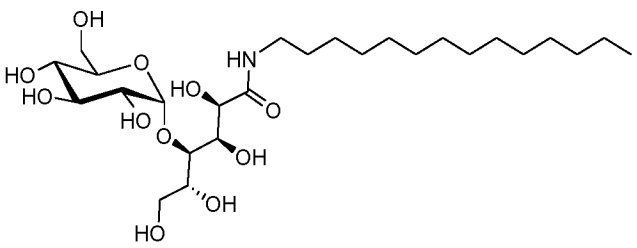
ESI -MS : $[M-K]^-$ *m/z* 357 Da

RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O): δ 4.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.20 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-2), 4.13 (dd, *J* = 5.3, 2.9 Hz, 1H, H-3), 4.06 – 3.97 (m, 2H, H-4, H-5), 3.94 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-4'), 3.88 (dd, *J* = 12.0, 3.1 Hz, 1H, H-6a), 3.84 – 3.72 (m, 4H, H-6'a, H-6b, H-6'b, H-5'), 3.70 (dd, *J* = 10.0, 3.4 Hz, 1H, H-3'), 3.59 (dd, *J* = 10.0, 7.8 Hz, 1H, H-2').

RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O): δ 178.5 (C-1), 103.5 (C-1'), 81.7 (C-4), 75.3 (C-5'), 72.6 (C-3'), 72.5 (C-2), 71.8 (C-5), 71.6 (C-3), 71.1 (C-2'), 68.7 (C-4'), 61.9 (C-6), 61.1 (C-6').

II.2 b). Protocole de synthèse de *N*-alkyl-D-glycobionamide *via* les D-glycobionate de méthyle Un gramme de brut réactionnel de glycobionate de potassium et 1.1 éq (≈1g) d'acide sulfurique supporté sur silice (H_2S0_4/SiO_2 commercial 22%) sont placés dans un bol en zircone de 20 mL équipé de 80 billes de 5mm, en zircone (ZrO_2). Un millilitre de méthanol est ajouté et le mélange est broyé à 500 rpm durant 8 cycles de 5 min dans le P7PL. La réaction est ensuite contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM) en phase normale (éluant : acétate d'éthyle/méthanol/eau 7/2/1). L'amine (1.5 éq.) est ensuite ajoutée au milieu réactionnel dans le bol, suivie de 2 mL de méthanol. Le broyage est poursuivi 12x5min à 500 rpm. La réaction est de nouveau contrôlée par CCM avec le même éluant. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est laissé sécher à température ambiante. Cette poudre rebroyée est ensuite mélangée à de la silice non broyée et soumise à une purification par chromatographie flash en utilisant le même éluant que pour le suivi de la réaction. La fraction contenant le glycobionamide est concentrée à l'évaporateur rotatif avant d'être lyophilisée.

***N*-Tetradecyl-D-maltobionamide (Mal14)**



Rendement : 93 %

Aspect : solide blanc

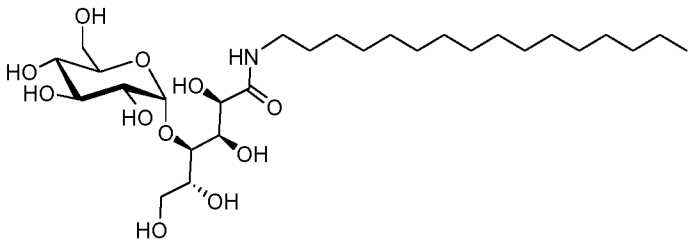
Formule brute : $C_{26}H_{51}NO_{11}$

MM : 553,68 $g.mol^{-1}$

RMN ^{1}H (400 MHz, pyridine-d_5): δ 8.23 (t, 1H, J = 6.0 Hz, NH), 5.76 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-1'), 5.25 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, J = 5.3 Hz, H-3), 5.12 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H-2), 4.76 (t, 1H, J = 5.0 Hz, H-4), 4.74 – 4.67 (m, 2H, H-5, H-5'), 4.60 (t, 1H, J = 9.2 Hz, H-3'), 4.54 (dd, 1H, J = 1.9 Hz, J = 11.5 Hz, H-6'a), 4.40 (dd, 1H, J = 4.7 Hz, J = 11.3 Hz, H-6a), 4.37 – 4.28 (m, 2H, H-6b, H-6'b), 4.19 (dd, 1H, J = 3.9 Hz, J = 9.5 Hz, H-2'), 4.15 (t, 1H, J = 9.5 Hz, H-4'), 3.55 – 3.40 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.54 (p, 2H, J = 7.2 Hz, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.33 – 1.12 (m, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, 3H, J = 6.6 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (101 MHz, pyridine-d_5): δ 174.0 (C-1), 103.4 (C-1'), 85.5 (C-4), 75.9 (C-3'), 75.6 (C-5'), 74.8 (C-5), 74.4 (C-2'), 74.3 (C-2), 74.1 (C-3), 72.4(C-4'), 64.8 (C-6), 63.1 (C-6'), 39.9 ($C\underline{H}_2$-NH), 32.6 – 23.4 (CH_2 chaine alkyle), 14.8 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-D-maltobionamide (Mal16)**



Rendement : 71%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{55}NO_{11}$

MM : 581,74 $g.mol^{-1}$

Rf : 0,72 (AcOEt/MeOH/H_2O: 7/2/1)

$[\alpha]_D^{20}$: + 71,4° (MeOH, c = 0,5)

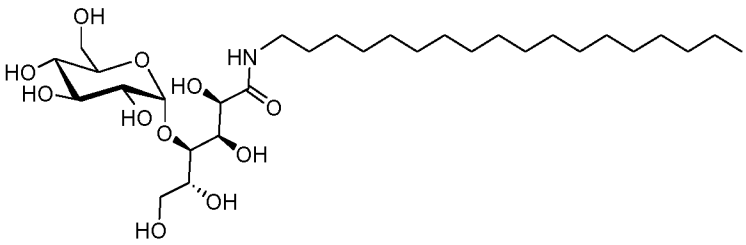
ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 604,3663 (calculé : 604,3673 pour $C_{28}H_{55}NO_{11}Na$)

RMN ^{1}H (600 MHz, pyridine-d_5): δ 8.25 (t, 1H, J = 5.3 Hz, NH), 5.78 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-1'), 5.25 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, J = 5.3 Hz, H-3), 5.13 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H-2), 4.77 (t, 1H, J = 5.0 Hz, H-4), 4.73 – 4.69 (m, 2H, H-5, H-5'), 4.59 (t, 1H, J = 9.2 Hz, H-3'), 4.53 (dd, 1H, J = 1.9 Hz, J = 11.5 Hz, H-6'a), 4.38 (dd, 1H, J = 4.7 Hz, J = 11.3 Hz, H-6a), 4.34 – 4.29 (m, 2H, H-6b, H-6'b), 4.18 (dd, 1H, J = 3.9 Hz, J = 9.5 Hz, H-2'), 4.14 (t, 1H, J = 9.5 Hz, H-4'), 3.52 – 3.40 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.53 (p, 2H, J = 7.2 Hz, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.29 – 1.16 (m, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.87 (t, 3H, J =

6.6 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (151 MHz, pyridine-d_5): δ 173.8 (C-1), 103.3 (C-1'), 85.3 (C-4), 75.8 (C-3'), 75.5 (C-5'), 74.7 (C-5), 74.3 (C-2'), 74.2 (C-2), 74.0 (C-3), 72.3 (C-4'), 64.6 (C-6), 63.0 (C-6'), 39.8 ($\underline{C}H_2$-NH), 32.5 – 23.3 (CH_2 chaine alkyle), 14.6 (CH_3).

***N*-Octadecyl-D-maltobionamide (Mal18)**



Rendement : 87%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{59}NO_{11}$

MM : 609,80 $g.mol^{-1}$

Rf : 0,71 (AcOEt/MeOH/H_2O: 7/2/1).

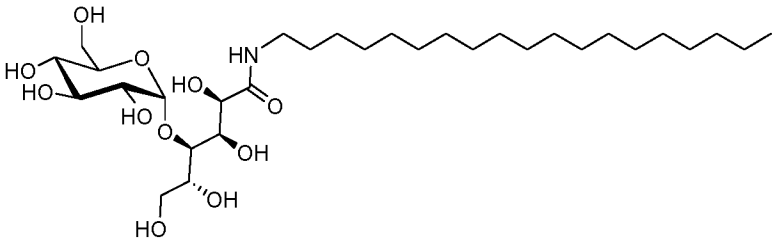
$[\alpha]_D^{20}$: + 70,8 (MeOH, c = 0,5)

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 632,3980 (calculé : 632,3986 pour $C_{30}H_{59}NO_{11}Na$)

RMN ^1H (600 MHz, pyridine-d_5): δ 8.23 (t, 1H, J = 5.5 Hz, NH), 5.77 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H-1'), 5.26 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, J = 5.6 Hz, H-3), 5.13 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-2), 4.77 (t, 1H, J = 4.9 Hz, H-4), 4.74 – 4.69 (m, 2H, H-5, H-5'), 4.60 (t, 1H, J = 9.2 Hz, H-3'), 4.53 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, J = 11.6 Hz, H-6'a), 4.39 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, J = 11.3 Hz, H-6a), 4.35 – 4.30 (m, 2H, H-6b, H-6'b), 4.18 (dd, 1H, J = 4.0 Hz, J = 9.5 Hz, H-2'), 4.15 (t, 1H, J = 9.5 Hz, H-4'), 3.52 – 3.41 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.56 – 1.51 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.29 – 1.17 (m, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.87 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (151 MHz, pyridine-d_5): δ 173.8 (C-1), 103.3 (C-1'), 85.4 (C-4), 75.8 (C-3'), 75.5 (C-5'), 74.7 (C-5), 74.3 (C-2'), 74.2 (C-2), 74.0 (C-3), 72.3 (C-4'), 64.6 (C-6), 63.0 (C-6'), 39.8 ($\underline{C}H_2$-NH), 32.5 – 23.3 (CH_2 chaine alkyle), 14.6 (CH_3).

***N*-Nonadecyl-D-maltobionamide (Mal19)**



Rendement : 69%

Aspect : solide blanc

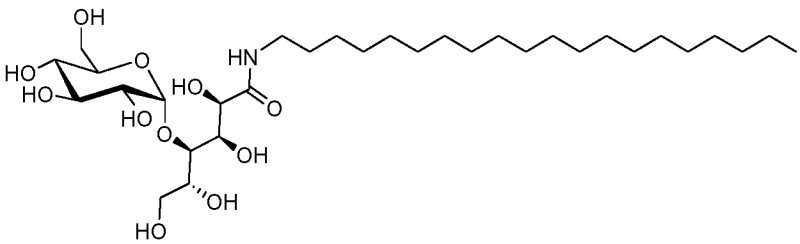
Formule brute : $C_{31}H_{61}NO_{11}$

MM : 623,82 g.mol^{-1}

RMN ^{1}H (400 MHz, pyridine-d$_5$): δ 8.22 (t, 1H, J = 5.5 Hz, NH), 5.78 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H-1'), 5.25 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, J = 5.6 Hz, H-3), 5.13 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-2), 4.77 (t, 1H, J = 4.9 Hz, H-4), 4.74 – 4.67 (m, 2H, H-5, H-5'), 4.60 (t, 1H, J = 9.2 Hz, H-3'), 4.55 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, J = 11.6 Hz, H-6'a), 4.40 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, J = 11.3 Hz, H-6a), 4.37 – 4.28 (m, 2H, H-6b, H-6'b), 4.20 (dd, 1H, J = 4.0 Hz, J = 9.5 Hz, H-2'), 4.15 (t, 1H, J = 9.5 Hz, H-4'), 3.55 – 3.40 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-NH), 1.58 – 1.51 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-CH$_2$-NH), 1.35 – 1.14 (m, 30H, CH$_2$ chaine alkyle), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH$_3$)

RMN ^{13}C (101 MHz, pyridine-d$_5$): δ 173.9 (C-1), 103.4 (C-1'), 85.5 (C-4), 75.9 (C-3'), 75.6 (C-5'), 74.8 (C-5), 74.4 (C-2'), 74.3 (C-2), 74.1 (C-3), 72.4 (C-4'), 64.7 (C-6), 63.1 (C-6'), 39.9 (C$\underline{H}_2$-NH), 32.6 – 23.1 (CH$_2$ chaine alkyle), 14.5 (CH$_3$).

***N*-Eicosanyl-D-maltobionamide (Mal20)**



Rendement : 38%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{32}H_{63}NO_{11}$

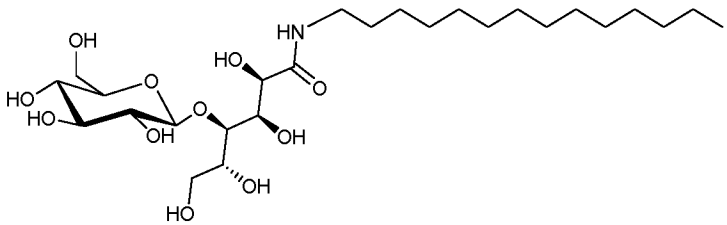
MM : 637,84 g.mol^{-1}

RMN ^{1}H (400 MHz, pyridine-d$_5$): δ 8.25 (t, 1H, J = 5.5 Hz, NH), 5.78 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H-1'), 5.25 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, J = 5.6 Hz, H-3), 5.13 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H-2), 4.79 (t, 1H, J = 4.9 Hz, H-

4), 4.76 – 4.68 (m, 2H, H-5, H-5'), 4.61 (t, 1H, J = 9.2 Hz, H-3'), 4.56 (dd, 1H, J = 2.2 Hz, J = 11.6 Hz, H-6'a), 4.38 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, J = 11.3 Hz, H-6a), 4.44 – 4.27 (m, 2H, H-6b, H-6'b), 4.19 (dd, 1H, J = 4.0 Hz, J = 9.5 Hz, H-2'), 4.15 (t, 1H, J = 9.5 Hz, H-4'), 3.55 – 3.40 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.59 – 1.50 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.37 – 1.11 (m, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (101 MHz, pyridine-d_5): δ 173.9 (C-1), 103.4 (C-1'), 85.4 (C-4), 75.9 (C-3'), 75.6 (C-5'), 74.8 (C-5), 74.4 (C-2'), 74.3 (C-2), 74.1 (C-3), 72.4 (C-4'), 64.7 (C-6), 63.1 (C-6'), 39.9 ($C\underline{H}_2$-NH), 32.4 – 23.4 (CH_2 chaine alkyle), 14.7 (CH_3).

***N*-Tetradecyl-D-cellobionamide (Cell14)**



Rendement : 74%

Aspect : solide blanc

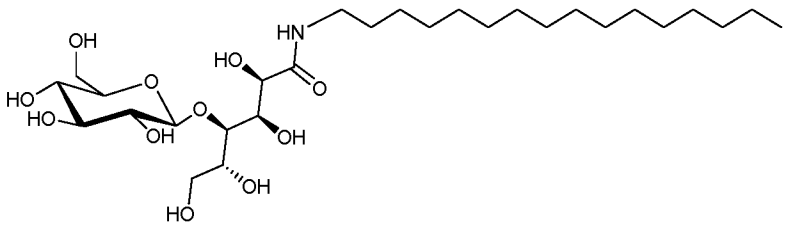
Formule brute : $C_{26}H_{51}NO_{11}$

MM : 553,68 g.mol^{-1}

RMN ^{1}H (400 MHz, pyridine-d_5): δ 8.31 (t, 1H, J = 5.9 Hz, NH), 5.35 (t, 1H, J = 3.2 Hz, H-3), 5.29 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H-2), 5.27 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-1'), 4.83 – 4.79 (m, 2H, H-4, H-5), 4.53 – 4.47 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-6a'), 4.23 (dd, 1H, J = 6.7 Hz, J = 11.8 Hz, H-6b'), 4.19 (t, 1H, J = 8.9 Hz, H-3'), 4.06 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-4'), 4.01 – 3.96 (m, 1H, H-5'), 3.53 – 3.37 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.56 – 1.50 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.28 – 1.09 (m, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (101 MHz, pyridine-d_5): δ 174.8 (C-1), 106.5 (C-1'), 84.3 (C-4), 79.2 (C-5'), 78.9 (C-3'), 76.0 (C-2'), 73.9 (C-5), 73.4 (C-2), 73.3 (C-3), 72.2 (C-4'), 65.2 (C-6), 63.4 (C-6'), 40.0 ($C\underline{H}_2$-NH), 32.6 – 23.4 (CH_2 chaine alkyle), 14.6 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-D-cellobionamide (Cell16)**



Rendement : 92%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{55}NO_{11}$

MM : 581,74 $g.mol^{-1}$

Rf : 0,72 (AcOEt/MeOH/H_2O: 7/2/1)

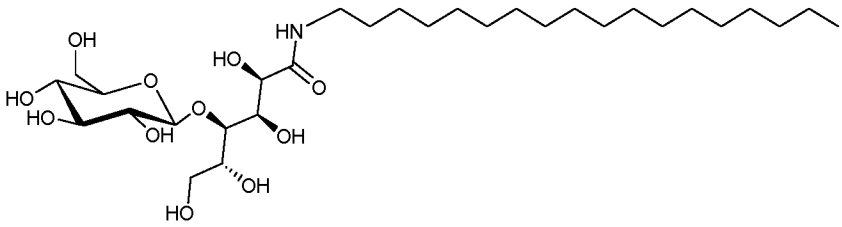
$[\alpha]_D^{20}$: + 13,8° (MeOH, c = 0,5)

ESI-HRMS : $[M+H]^+$ 582,3861 (calculé : 582,3853 pour $C_{28}H_{55}NO_{11}$)

RMN ^{1}H (600 MHz, pyridine-d_5): δ 8.30 (t, 1H, J = 5.9 Hz, NH), 5.34 (t, 1H, J = 3.2 Hz, H-3), 5.27 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H-2), 5.26 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-1'), 4.83 – 4.79 (m, 2H, H-4, H-5), 4.53 – 4.47 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-6a'), 4.22 (dd, 1H, J = 6.7 Hz, J = 11.8 Hz, H-6b'), 4.19 (t, 1H, J = 8.9 Hz, H-3'), 4.04 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2', H-4'), 3.99 – 3.94 (m, 1H, H-5'), 3.49 – 3.38 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$-NH), 1.55 – 1.48 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$-CH_2-NH), 1.27 – 1.15 (m, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.87 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (151 MHz, pyridine-d_5): δ 174.7 (C-1), 106.4 (C-1'), 84.2 (C-4), 79.1 (C-5'), 78.8 (C-3'), 75.9 (C-2'), 73.8 (C-5), 73.3 (C-2), 73.2 (C-3), 72.1 (C-4'), 65.1 (C-6), 63.3 (C-6'), 39.9 (<u>C</u>H$_2$-NH), 32.5 – 23.3 (CH_2 chaine alkyle), 14.6 (CH_3).

***N*-Octadecyl-D-cellobionamide (Cell18)**



Rendement : 97 %

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{59}NO_{11}$

MM : 609,41 $g.mol^{-1}$

Rf : 0,75 (EtOAc/MeOH/H_2O: 7/2/1)

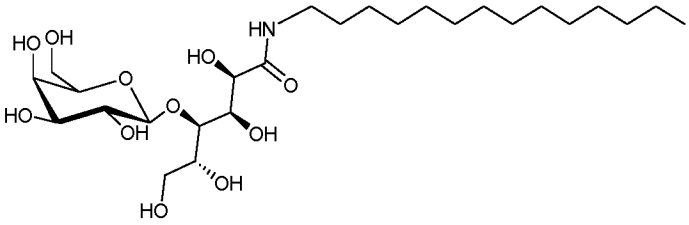
$[\alpha]_D^{20}$: + 14,8° (MeOH, c = 0,5)

ESI-HRMS : $[M+H]^+$ 610,4175 (calculé : 610,4166 pour $C_{30}H_{60}NO_{11}$)

RMN ^{1}H (400 MHz, pyridine-d_5): δ 8.31 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH), 5.34 (br s, 1H, H-3), 5.30 – 5.23 (m, 2H, H-2, H-1'), 4.84 – 4.78 (m, 2H, H-4, H-5), 4.57 – 4.45 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-6a'), 4.23 (dd, 1H, J = 6.4 Hz, J = 11.8 Hz, H-6b'), 4.19 (t, 1H, J = 8.8 Hz, H-3'), 4.04 (t, J = 8.3 Hz, 2H, H-2', H-4'), 3.99 – 3.95 (m, 1H, H-5'), 3.52 – 3.37 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-NH), 1.53 (p, J = 6.9 Hz, 2H, C$\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.38 – 1.11 (m, 30H chaine alkyle), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (101 MHz, pyridine-d_5): δ 174.6 (C-1), 106.3 (C-1'), 84.1 (C-4), 79.1 (C-5'), 78.8 (C-3'), 75.9 (C-2'), 73.8 (C-5), 73.3 (C-2), 73.2 (C-3), 72.1 (C-4'), 65.0 (C-6), 63.3 (C-6'), 39.8 (C$\underline{H}_2$-NH), 32.5 – 23.3 (CH_2 chaine alkyle), 14.6 (CH_3).

***N*-Tetradecyl-D-lactobionamide (Lac14)**



Rendement : 76%

Aspect : solide blanc

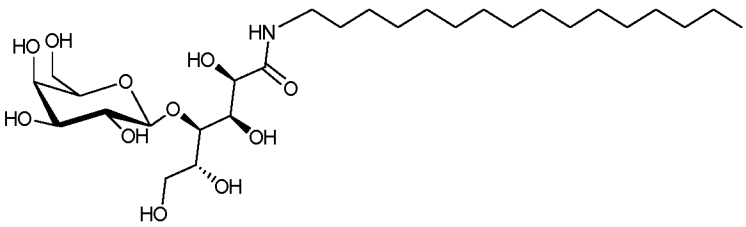
Formule brute : $C_{26}H_{51}NO_{11}$

MM : 553,68 g.mol^{-1}

RMN ^{1}H (600 MHz, pyridine-d_5): δ 8.18 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 5.34 (t, 1H, J = 3.0 Hz, H-3), 5.26 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H-2), 5.22 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H-1'), 4.81 (dd, 1H, J = 4.1 Hz, J = 6.9 Hz, H-4), 4.78 – 4.72 (m, 1H, H-5), 4.56 – 4.45 (m, 4H, H-2', H-6'a, H-6a, H-6b), 4.43 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H-4'), 4.29 (dd, 1H, J = 4.6 Hz, J = 11.3 Hz, H-6'b), 4.14 (dd, 1H, J = 3.2 Hz, J = 9.4 Hz, H-3'), 4.08 (dd, 1H, J = 5.4 Hz, J= 6.4 Hz, H-5'), 3.52 – 3.38 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-NH), 1.58 – 1.47 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.32 – 1.14 (m, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (151 MHz, pyridine-d_5): δ 174.3 (C-1), 107.0 (C-1'), 84.8 (C-4), 77.9 (C-5'), 75.7 (C-3'), 74.2 (C-2), 73.8 (C-5), 73.5 (C-2'), 73.0 (C-3), 70.7 (C-4'), 64.9 (C-6), 63.0 (C-6'), 39.9 (C$\underline{H}_2$-NH), 32.6 – 23.4 (CH_2 chaine alkyle), 14.7 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-D-lactobionamide (Lac16)**



Rendement : 69%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{55}NO_{11}$

MM : 581,74 $g.mol^{-1}$

Rf : 0,69 (AcOEt/MeOH/H_2O: 7/2/1)

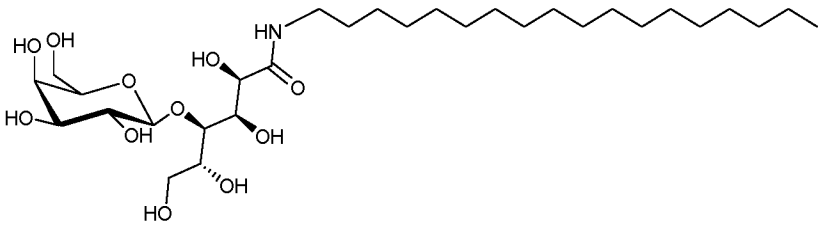
$[\alpha]_D^{20}$: + 22,0° (MeOH, c = 0.05)

ESI-HRMS : $[M+H]^+$ 582,3852 (calculé : 582,3853 pour $C_{28}H_{55}NO_{11}$)

RMN ^{1}H (600 MHz, pyridine-d_5): δ 8.19 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 5.32 (t, 1H, J = 3.0 Hz, H-3), 5.24 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H-2), 5.21 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H-1'), 4.80 (dd, 1H, J = 4.1 Hz, J = 6.9 Hz, H-4), 4.74 – 4.71 (m, 1H, H-5), 4.51 – 4.45 (m, 4H, H-2', H-6'a, H-6a, H-6b), 4.42 (d, 1H, J = 2.9 Hz, H-4'), 4.27 (dd, 1H, J = 4.6 Hz, J = 11.3 Hz, H-6'b), 4.12 (dd, 1H, J = 3.2 Hz, J = 9.4 Hz, H-3'), 4.06 (dd, 1H, J = 5.4 Hz, J= 6.4 Hz, H-5'), 3.48 – 3.38 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.55 – 1.48 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.27 – 1.16 (m, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.87 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (151 MHz, pyridine-d_5): δ 174.2 (C-1), 106.9 (C-1'), 84.6 (C-4), 77.8 (C-5'), 75.6 (C-3'), 74.1 (C-2), 73.7 (C-5), 73.4 (C-2'), 72.9 (C-3), 70.6 (C-4'), 64.8 (C-6), 62.9 (C-6'), 39.8 ($C\underline{H}_2$-NH), 32.5 – 23.3 (CH_2 chaine alkyle), 14.6 (CH_3).

***N*-Octadecyl-D-lactobionamide (Lac18)**



Rendement : 86%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{59}NO_{11}$

MM : 609,80 $g.mol^{-1}$

Rf : 0,71 (AcOEt/MeOH/H_2O: 7/2/1)

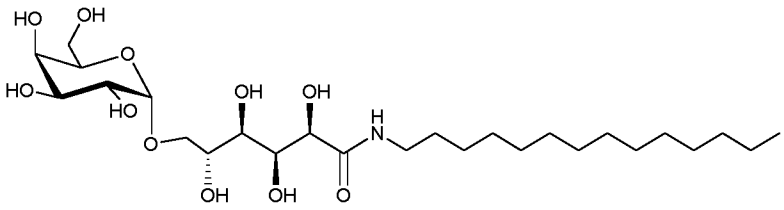
$[\alpha]_D^{20}$: + 136,0° (MeOH, c = 0,025)

ESI-HRMS : $[M+H]^+$ 610,4166 (calculé : 610,4166 pour $C_{30}H_{60}NO_{11}$)

RMN ^{1}H (600 MHz, pyridine-d_5): δ 8.19 (t, 1H, J = 5.9 Hz, NH), 5.32 (br s, 1H, H-3), 5.24 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-2), 5.21 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-1'), 4.80 (dd, 1H, J = 4.0 Hz, J = 7.0 Hz, H-4), 4.74 – 4.72 (m, 1H, H-5), 4.52 – 4.45 (m, 4H, H-2', H-6'a, H-6a, H-6b), 4.42 (d, 1H, J = 3.1 Hz, H-4'), 4.27 (dd, 1H, J = 4.4 Hz, J = 11.2 Hz, H-6'b), 4.12 (dd, 1H, J = 3.3 Hz, J = 9.5 Hz, H-3'), 4.06 (dd, 1H, J = 5.0 Hz, J = 7.0 Hz, H-5'), 3.48 – 3.38 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.55 – 1.48 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.29 – 1.16 (m, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.87 (t, 3H, J = 6.9 Hz, CH_3)

RMN ^{13}C (151 MHz, pyridine-d_5): δ 174.2 (C-1), 106.9 (C-1'), 84.7 (C-4), 77.9 (C-5'), 75.6 (C-3'), 74.1 (C-2), 73.7 (C-5), 73.4 (C-2'), 72.9 (C-3), 70.6 (C-4'), 64.8 (C-6), 62.9 (C-6'), 39.8 ($C\underline{H}_2$-NH), 32.5 (CH_2 chaine alkyle), 30.6 – 23.3 (CH_2 chaine alkyle), 14.6 (CH_3)

***N*-Tetradecyl-melibionamide (Mel14)**



Rendement : 60%

Aspect : solide blanc

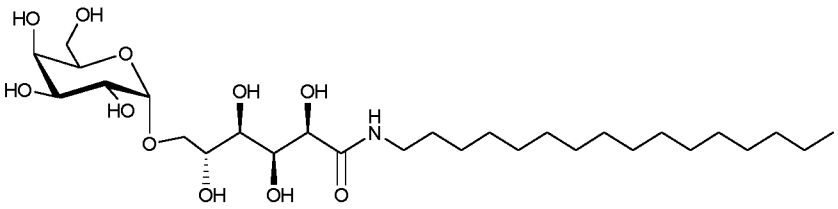
Formule brute : $C_{26}H_{51}NO_{11}$

MM : 553.35 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (400 MHz, pyridine-d_5): δ 8.39 (t, *J* = 5.9 Hz, N-H), 5.46 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1'), 5.21 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-3), 5.04 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-2), 4.78 – 4.70 (m, 2H, H-4', H-4), 4.68 (dd, *J* = 9.9, 3.8 Hz, 1H, H-2'), 4.63 – 4.56 (m, 3H, H-6a,b, H-5'), 4.51 (dd, *J* = 9.9, 3.1 Hz, 1H, H-3'), 4.42 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-6'a,b), 4.38 – 4.32 (m, 1H, H-5), 3.56 – 3.37 (m, 2H, CH_2-N), 1.63 – 1.49 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33-1.12 (m, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, pyridine-d_5): δ 174.5 (C-1), 101.60 (C-1'), 75.3 (C-2), 75.1 (C-4), 73.2 (C-5'), 72.7 (C-3), 72.1 (C-3'), 71.4 (C-5, C-6), 71.4 (C-4'), 71.1 (C-2'), 63.0 (C-6'), 40.0 (CH_2-N), 33.0 - 23.4 (CH_2 chaine alkyle), 14.7 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-melibionamide (Mel16)**



Rendement : 44%

Aspect : solide blanc

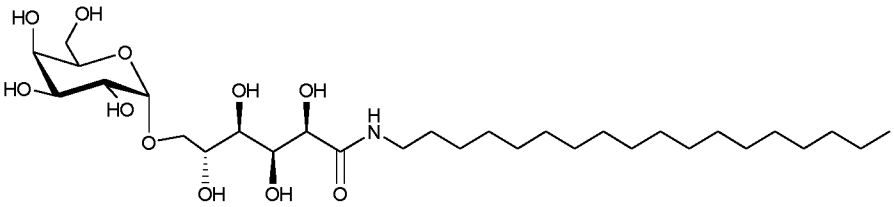
Formule brute : $C_{28}H_{55}NO_{11}$

MM : 581.38 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (400 MHz, pyridine-d$_5$): δ 8.39 (t, *J* = 5.9 Hz, N-H), 5.45 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1'), 5.21 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-3), 5.04 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-2), 4.78 – 4.70 (m, 2H, H-4', H-4), 4.67 (dd, *J* = 9.9, 3.8 Hz, 1H, H-2'), 4.62 – 4.55 (m, 3H, H-6a,b, H-5'), 4.51 (dd, *J* = 9.9, 3.1 Hz, 1H, H-3'), 4.41 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-6'a,b), 4.38 – 4.30 (m, 1H, H-5), 3.54 – 3.40 (m, 2H, CH_2-N), 1.62 – 1.51 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.34-1.12 (m, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, pyridine-d$_5$): δ 174.5 (C-1), 101.6 (C-1'), 75.3 (C-2), 75.1 (C-4), 73.2 (C-5'), 72.7 (C-3), 72.1 (C-3'), 71.4 (C-5, C-6), 71.4 (C-4'), 71.1 (C-2'), 63.0 (C-6'), 40.0 (CH_2-N), 33.0 - 23.4 (CH_2 chaine alkyle), 14.8 (CH_3).

***N*-Octadecyl-melibionamide (Mel18)**



Rendement : 38%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{59}NO_{11}$

MM : 609.41 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (400 MHz, pyridine-d$_5$): δ 8.39 (t, *J* = 5.9 Hz, N-H), 5.46 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1'), 5.21 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-3), 5.04 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-2), 4.78 – 4.70 (m, 2H, H-4', H-4), 4.68 (dd, *J* = 9.9, 3.8 Hz, 1H, H-2'), 4.62 – 4.56 (m, 3H, H-6a,b, H-5'), 4.51 (dd, *J* = 9.9, 3.1 Hz, 1H, H-3'), 4.42

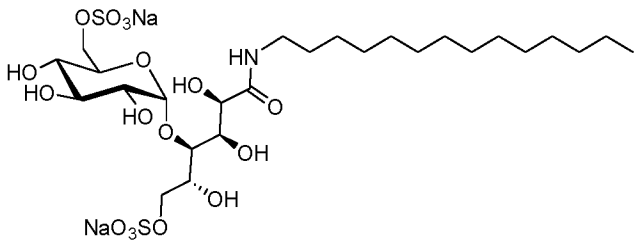
(d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-6'a,b), 4.38 – 4.31 (m, 1H, H-5), 3.54 – 3.40 (m, 2H, CH_2-N), 1.62 – 1.51 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.34-1.12 (m, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, pyridine-d_5): δ 174.5 (C-1), 101.6 (C-1'), 75.3 (C-2), 75.1 (C-4), 73.2 (C-5'), 72.7 (C-3), 72.1 (C-3'), 71.4 (C-5, C-6), 71.4 (C-4'), 71.1 (C-2'), 63.0 (C-6'), 40.0 (CH_2-N), 33.0 - 23.4 (CH_2 chaine alkyle), 14.8 (CH_3).

II-2. c). Procédure générale de sulfatation des *N*-alkyl-glyconamides

A 1 g de *N*-alkyl-glyconamide placé dans un bicol dans 50 mL de pyridine anhydre, sont additionnés 2X 1.1 éq de complexe SO_3/pyridine 50% actif pour les glycobionamides et 3x1.1 éq de complexe SO_3/pyridine 50% actif pour les maltotrionamides. L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince en phase inverse (phase stationnaire C18, éluant méthanol/eau 6/4). Après environ une heure de réaction, 1.5 eq complexe SO_3/pyridine 50% actif supplémentaires sont ajoutés pour terminer la réaction. La réaction est laissée sous agitation durant une nuit, puis traitée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium jusqu'à pH≈9 avant d'être évaporée à sec. Les composés disulfatés (*N*-alkyl-glyconamides disulfatés) ou *N*-alkyl maltotrionamides trisulfatés sont les produits majoritaires obtenus dans le milieu réactionnels, avec formation minoritaire de composés non totalement sulfatés sur les positions primaires ou comportant un sulfate supplémentaire. Le brut réactionnel est ensuite purifié par chromatographie flash en phase inverse avec une colonne C18 80g Reveleris. La phase mobile est un mélange eau/méthanol avec un débit de 40 mL/min et un gradient commençant par 40% de méthanol pour aller jusque 80% de méthanol en 10 min. Les fractions des *N*-alkyl glycobionamide monosulfaté, disulfaté (très majoritaires), trisulfatés purifiées ou des *N*-alkyl maltotrionamides trisulfatés sont ensuite évaporées pour éliminer le méthanol et ensuite lyophilisées.

***N*-Tetradecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-maltobioamide disodium (Mal14diS)**



Rendement : 61%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{26}H_{49}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 757.22 g.mol^{-1}

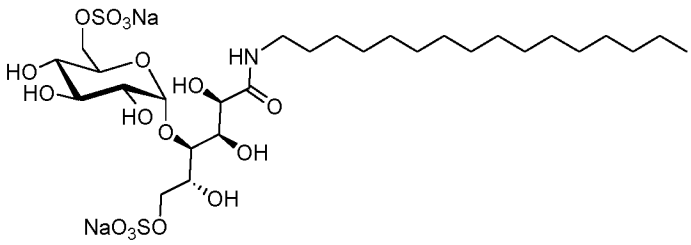
Rf : 0.47 (CH_3CN /H_2O: 3/7) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 780.2133 (calculé : 780.2135 pour $C_{26}H_{49}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (600 MHz, D_2O): δ 5.22 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-1'), 4.41 – 4.10 (m, 8H, H-6'a, H-6'b, H-2, H-5, H-6a, H-6b, H-3, H-5'), 4.00 (dd, *J* = 5.7, 3.8 Hz, 1H, H-4), 3.81 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3'), 3.65 (dd, *J* = 9.9, 3.8 Hz, 1H, H-2'), 3.57 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4'), 3.34 – 3.18 (m, 2H, CH_2-N), 1.57 (br s, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (br s, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.92 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (151 MHz, D_2O): δ 173.4 (C-1), 100.5 (C-1'), 82.0 (C-4), 72.7 (C-3'), 71.8 (C-2), 71.7 (C-3), 71.5 (C-2'), 70.5 (C-5'), 69.8 (C-5), 68.9 (C-6), 68.8 (C-4'), 66.7 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.0 – 22.6 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-maltobioamide disodium (Mal16diS)**



Rendement : 55%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{53}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 785,82 g.mol^{-1}

Rf : 0.52 (CH_3CN /H_2O: 6/4) CCM-C18

$[\alpha]_D^{20}$: +53.6° (H_2O, c = 0.5)

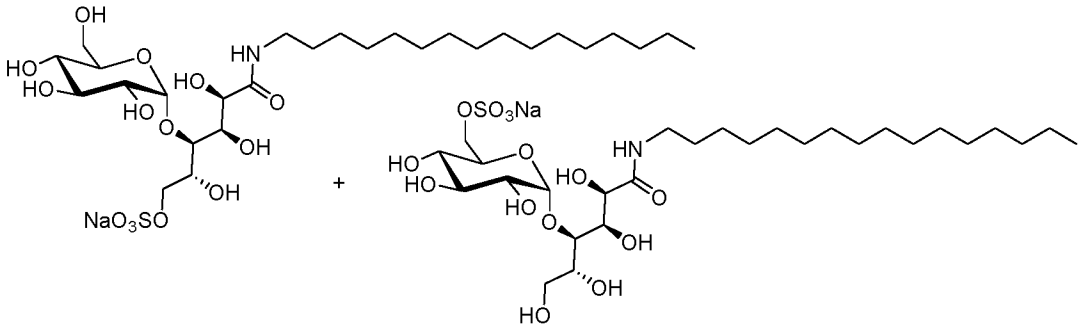
ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 808.2463 (calculé : 808.2448 pour $C_{28}H_{53}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.21 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-1'), 4.40 – 4.09 (m, 8H, H-6'a, H-6'b, H-2, H-5, H-6a, H-6b, H-3, H-5'), 3.99 (dd, *J* = 5.7, 3.8 Hz, 1H, H-4), 3.81 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3'), 3.64 (dd, *J* = 9.9, 3.8 Hz, 1H, H-2'), 3.56 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4'), 3.33 – 3.17 (m, 2H, CH_2-N), 1.56 (br s, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (br s, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.92 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.4 (C-1), 100.5 (C-1'), 82.0 (C-4), 72.8 (C-3'), 71.8 (C-2), 71.7 (C-3), 71.5 (C-2'), 70.5 (C-5'), 69.8 (C-5), 68.9 (C-6), 68.8 (C-4'), 66.7 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.0 – 22.6 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-6 ou 6'-*O*-sulfo-D-maltobioamide sodium (Mal16monoS)**

La fraction monosulfatée du Mal16 est obtenue à partir du brut Mal16diS purifié sur colonne flash. Il s'agit d'un mélange de *N*-hexadecyl maltobionamide sulfaté en position 6 et de son homologue sulfaté en position 6'



Rendement : 40%

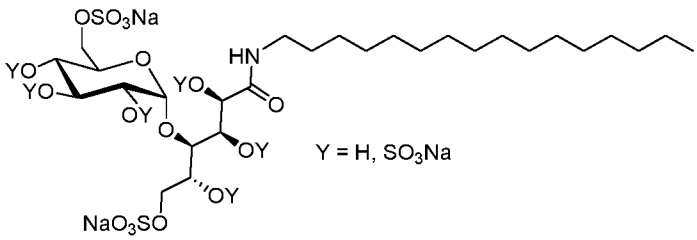
Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{54}NNaO_{14}S$

MM : 683,78 g.mol^{-1}

***N*-Hexadecyl-tri-*O*-sulfo-D-maltobioamide trisodium (Mal16triS)**

La fraction trisulfatée du Mal16 est obtenue à partir du brut Mal16diS purifié sur colonne flash. Il s'agit d'un mélange de plusieurs composés *N*-hexadecyl maltobionamide disulfaté en position 6 et 6' comportant un 3ème sulfate sur une des positions secondaires.



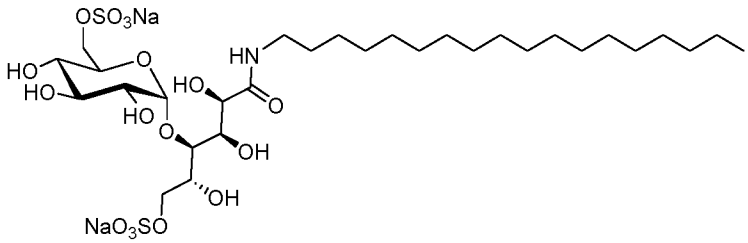
Rendement : 6%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{52}NNa_3O_{20}S_3$

MM : 887,86 g.mol^{-1}

***N*-Octadecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-maltobionamide disodium (Mal18diS)**



Rendement : 49%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{57}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 813,88 g.mol^{-1}

Rf : 0.44 (CH_3CN /H_2O: 6/4) CCM-C18

$[\alpha]_D^{20}$: +39.2° (H_2O, c = 0.125)

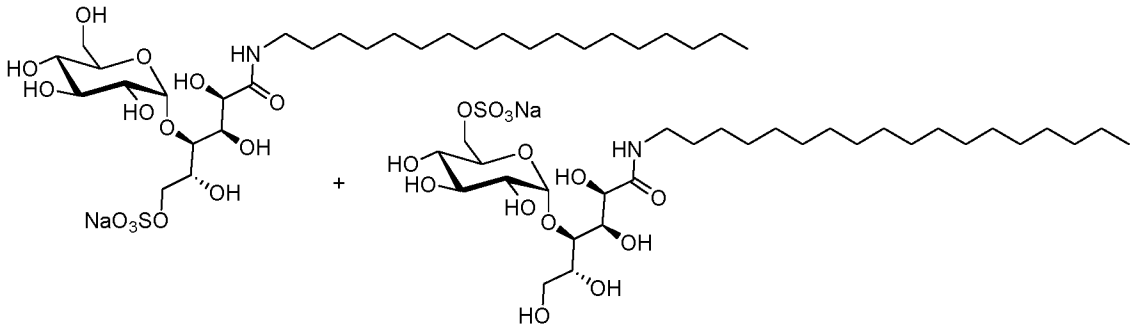
ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 836.2776 (calculé : 836.2761 pour $C_{30}H_{57}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.23 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1'), 4.45 – 4.08 (m, 8H, H-6'a, H-6'b, H-2, H-5, H-6a, H-6b, H-3, H-5'), 4.01 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-4), 3.83 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3'), 3.67 (dd, *J* = 9.9, 3.5 Hz, 1H, H-2'), 3.58 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4'), 3.41 – 3.10 (m, 2H, CH_2-N), 1.58 (br s, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (br s, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (D_2O, 101 MHz): δ 173.4 (C-1), 100.5 (C-1'), 82.0 (C-4), 72.8 (C-3'), 71.8 (C-2), 71.6 (C-3), 71.5 (C-2'), 70.5 (C-5'), 69.8 (C-5), 68.9 (C-6), 68.9 (C-4'), 66.7 (C-6'), 39.5 (CH_2-N), 32.1 – 22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Octadecyl-6 ou 6'-*O*-sulfo-D-maltobioamide sodium (Mal18monoS)**

La fraction monosulfatée du Mal18 est obtenue à partir du brut Mal18diS purifié sur colonne flash. Il s'agit d'un mélange de *N*-octadecyl maltobionamide sulfaté en position 6 et de son homologue sulfaté en position 6'



Rendement : 37%

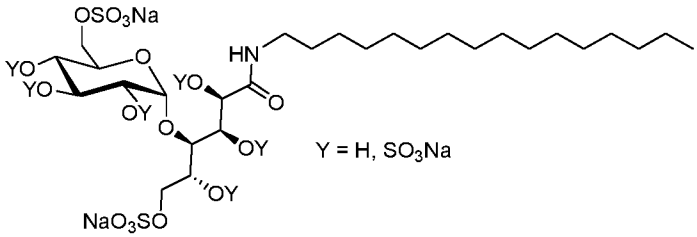
Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{58}NNaO_{14}S$

MM : 711,84 g.mol^{-1}

***N*-Octadecyl-tri-*O*-sulfo-D-maltobioamide trisodium (Mal18triS)**

La fraction trisulfatée du Mal18 est obtenue à partir du brut Mal18diS purifié sur colonne flash. Il s'agit d'un mélange de plusieurs composés *N*-octadecyl maltobionamide disulfaté en position 6 et 6' comportant un 3ème sulfate sur une des positions secondaires.



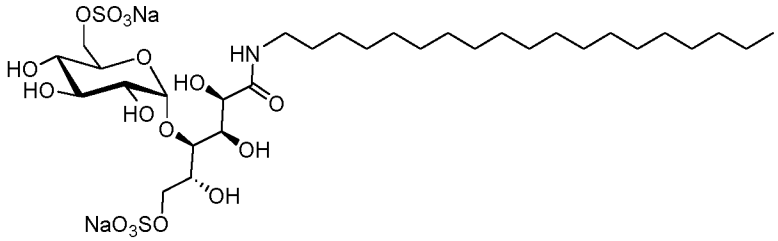
Rendement : 5%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{56}NNa_3O_{20}S_3$

MM : 915,91 g.mol^{-1}

***N*-Nonadecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-maltobionamide disodium (Mal19diS)**



Rendement : 47 %

Aspect : solide blanc

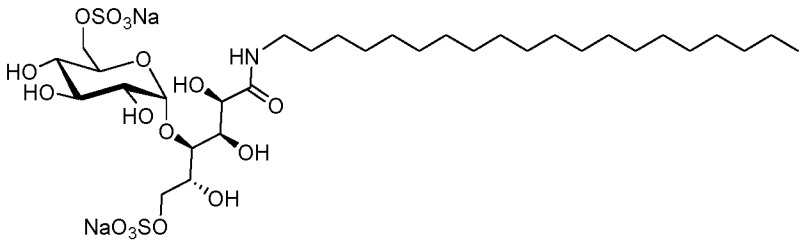
Formule brute : $C_{31}H_{59}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 827,90 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.22 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1'), 4.42 – 4.09 (m, 8H, H-6'a, H-6'b, H-2, H-5, H-6a, H-6b, H-3, H-5'), 4.00 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-4), 3.82 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3'), 3.65 (dd, *J* = 9.9, 3.5 Hz, 1H, H-2'), 3.57 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4'), 3.35 – 3.15 (m, 2H, CH_2-N), 1.57 (br s, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (br s, 32H, CH_2 chaine alkyle), 0.91 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (D_2O, 101 MHz): δ 173.4 (C-1), 100.5 (C-1'), 82.0 (C-4), 72.7 (C-3'), 71.9 (C-2), 71.5 (C-3), 71.5 (C-2'), 70.5 (C-5'), 69.8 (C-5), 68.9 (C-6), 68.9 (C-4'), 66.7 (C-6'), 39.5 (CH_2-N), 32.1 – 22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Eicosanyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-maltobionamide disodium (Mal20diS)**



Rendement : 32 %

Aspect : solide blanc

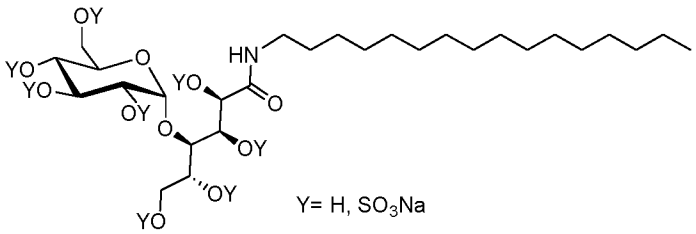
Formule brute : $C_{32}H_{61}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 841,32 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.23 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1'), 4.42 – 4.08 (m, 8H, H-6'a, H-6'b, H-2, H-5, H-6a, H-6b, H-3, H-5'), 4.01 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-4), 3.82 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-3'), 3.66 (dd, *J* = 9.9, 3.5 Hz, 1H, H-2'), 3.57 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4'), 3.36 – 3.14 (m, 2H, CH_2-N), 1.57 (br s, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (br s, 34H, CH_2 chaine alkyle), 0.91 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH_3).

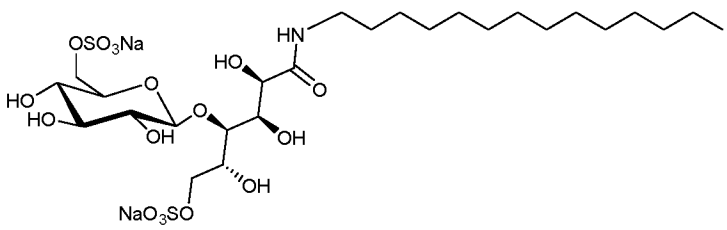
^{13}C NMR (D_2O, 101 MHz): δ 173.4 (C-1), 100.5 (C-1'), 82.0 (C-4), 72.8 (C-3'), 71.8 (C-2), 71.6 (C-3), 71.5 (C-2'), 70.5 (C-5'), 69.8 (C-5), 68.9 (C-6), 68.9 (C-4'), 66.7 (C-6'), 39.5 (CH_2-N), 32.1 – 22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-hexadecyl-per-*O*-sulfo-D-maltobioamide sel de sodium (Mal16perS)**



Le composé *N*-hexadecyl-D-maltobionamide (Mal16) (200 mg, 0.34 mmol) et 20 équivalents de complexe SO_3/pyridine 97% actif sont introduits dans un bol en zicone de 20 mL contenant 80 billes en zircone de diametre 5 mm, puis dans le broyeur planétaire P7PL Fritsch. Le mélange est broyé à 400 rpm durant 48 cycles de 5 min. Ensuite 30 equivalents de $NaHCO_3$ (578 mg, 6.88 mmol) sont introduits dans le bol et le mélange est rebroyé pendant 6 cycles de 5 minutes.,Le brut réactionnel est alors dissous dans de l'eau milliQ et dialysé à l'aide d'une membrane de seuil de coupure de 1000 kD (3x 500 mL). Après lyophilisation, un solide blanc est obtenu et analysé par spectrométrie de masse haute resolution. Mal16perS est composé d'un mélange de *N*-hexadecyl-D-maltobionamides tri, tétra, penta, hexa, hepta et octa sulfates (524 mg).

***N*-Tetradecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-cellobioamide disodium (Cell14diS)**



Rendement : 69%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{26}H_{49}NNa_2O_{17}S_2$

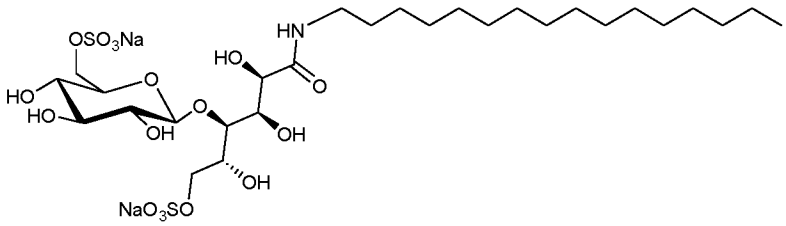
MM : 757,22 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.69 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.44 (bs, 1H, H-2), 4.40 – 4.33 (m, 4H, H-6'a, H-6a, H-6b, H-3), 4.33 – 4.10 (m, 2H, H-6'b, H-5), 4.06 (dd, *J* = 7.7, 3.2 Hz, 1H, H-4'), 3.79

– 3.71 (m, 1H, H-5), 3.60 – 3.48 (m, 2H, H-3', H-4'), 3.40 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-2'), 3.32 – 3.20 (m, 2H, CH_2-N), 1.61-1.51 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (s, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.5 (C-1), 102.6 (C-1'), 80.5 (C-4), 75.3 (C-3'), 73.7 (C-5'), 73.2 (C-2'), 72.9 (C-2), 69.5 (C-3), 69.3 (C-4'), 68.9 (C-5, C-6), 66.8 (C-6'), 39.3 (CH_2-N), 31.7 – 22.4 (CH_2 chaine alkyle), 13.8 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-cellobioamide disodium (Cell16diS)**



Rendement : 59%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{53}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 785,82 g.mol^{-1}

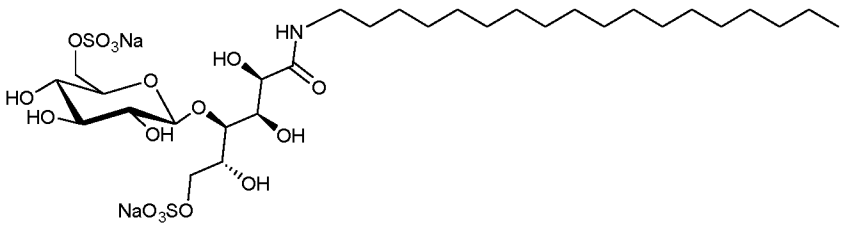
Rf : 0.6 (H_2O/CH_3CN : 65/35) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 808.2472 (calculé : 808.2448 pour $C_{28}H_{53}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.69 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.45 (bs, 1H, H-2), 4.40 – 4.27 (m, 4H, H-6'a, H-6a, H-6b, H-3), 4.24 – 4.13 (m, 2H, H-6'b, H-5), 4.07 (dd, *J* = 7.7, 3.2 Hz, 1H, H-4'), 3.77 – 3.73 (m, 1H, H-5), 3.58 – 3.48 (m, 2H, H-3', H-4'), 3.44 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-2'), 3.32 – 3.18 (m, 2H, CH_2-N), 1.58 – 1.54 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (s, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (D_2O, 101 MHz): δ 173.5 (C-1), 102.6 (C-1'), 80.5 (C-4), 75.3 (C-3'), 73.9 (C-5'), 73.2 (C-2'), 72.9 (C-2), 69.7 (C-3), 69.5 (C-4'), 68.9 (C-5, C-6), 67.0 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.0 – 22.7 (CH_2 chaine alkyle), 14.0 (CH_3).

***N*-Octadecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-D-cellobioamide disodium (Cell18diS)**



Rendement : 66%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{57}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 813,88 g.mol^{-1}

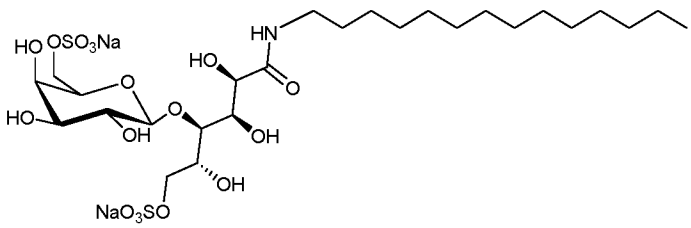
Rf : 0.22 (CH_3CN /H_2O: 2/8) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 836.2803 (calculé : 836.2761 pour $C_{30}H_{57}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.69 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.45 (bs, 1H, H-2'), 4.41 – 4.26 (m, 4H, H-6'a, H-6a, H-6b, H-3), 4.24 – 4.13 (m, 2H, H-6'b, H-5), 4.07 (dd, *J* = 7.7, 3.2 Hz, 1H, H-4'), 3.78 – 3.72 (m, 1H, H-5), 3.60 – 3.48 (m, 2H, H-3', H-4'), 3.41 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-2'), 3.32 – 3.18 (m, 2H, CH_2-N), 1.63 – 1.52 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.34 (s, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.4 (C-1), 102.6 (C-1'), 80.5 (C-4), 75.3 (C-3'), 73.9 (C-5'), 73.2 (C-2'), 72.8 (C-2), 69.7 (C-3), 69.5 (C-4'), 68.9 (C-5, C-6), 67.0 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.0 – 22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Tetradecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-lactobioamide disodium (Lac14diS)**



Rendement : 72%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{26}H_{49}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 757,22 g.mol^{-1}

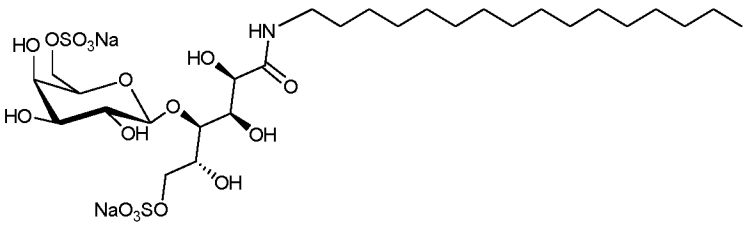
Rf : 0.23 (H_2O /CH_3CN : 7/3) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 780.2146 (calculé : 780.2135 pour $C_{26}H_{49}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.63 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-1'), 4.45 (bs, 1H, H-2), 4.42 – 4.26 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-3), 4.24 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-6'a, H-6'b), 4.20 – 4.13 (m, 1H, H-5), 4.08 (dd, *J* = 8.0, 2.9 Hz, 1H, H-4), 4.09 – 3.94 (m, 2H, H-4', H-5), 3.72 (dd, *J* = 10.0, 3.3 Hz, 1H, H-3'), 3.62 (dd, *J* = 9.9, 7.6 Hz, 1H, H-2'), 3.36 – 3.16 (m, 2H, CH_2-N), 1.63 – 1.50 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.32 (s, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.5 (C-1), 103.1 (C-1'), 80.4 (C-4), 72.9 (C-2), 72.8 (C-4'), 72.4 (C-3'), 70.9 (C-2'), 69.7 (C-3), 69.1 (C-5,C-6), 68.3 (C-5'), 66.7 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.0 – 22.6 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-lactobioamide disodium (Lac16diS)**



Rendement : 72%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{53}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 785,82 g.mol^{-1}

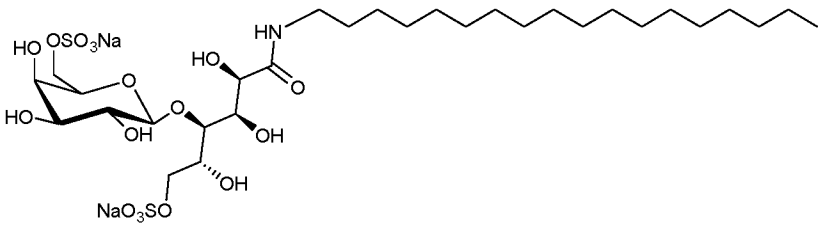
Rf : 0.23 (H_2O /CH_3CN : 7/3) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 808.2473 (calculé : 808.2448 pour $C_{28}H_{53}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-1'), 4.46 (bs, 1H, H-2), 4.43 – 4.28 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-3), 4.24 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-6'a, H-6'b), 4.20 – 4.13 (m, 1H, H-5), 4.08 (dd, *J* = 8.0, 2.9 Hz, 1H, H-4), 4.05 – 3.99 (m, 2H, H-4', H-5), 3.72 (dd, *J* = 10.0, 3.3 Hz, 1H, H-3'), 3.63 (dd, *J* = 9.9, 7.6 Hz, 1H, H-2'), 3.36 – 3.16 (m, 2H, CH_2-N), 1.64 – 1.52 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.33 (s, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.5 (C-1), 103.1 (C-1'), 80.4 (C-4), 72.9 (C-2), 72.8 (C-4'), 72.4 (C-3'), 70.9 (C-2'), 69.7 (C-3), 69.0 (C-5,C-6), 68.3 (C-5'), 66.7 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.0 – 22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Octadecyl-6,6'-di-*O*-sulfo-lactobioamide disodium (Lac18diS)**



Rendement : 64%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{57}NNa_2O_{17}S_2$

MM : 813,88 g.mol^{-1}

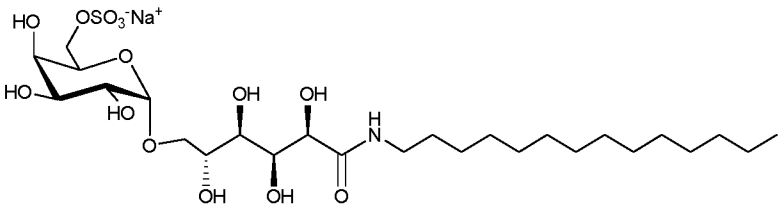
Rf : 0.36 (H_2O /CH_3CN : 7/3) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 836.2798 (calculé : 836.2761 pour $C_{30}H_{57}NNa_3O_{17}S_2$)

^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz): δ 4.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-1'), 4.47 (bs, 1H, H-2), 4.43 – 4.28 (m, 3H H-6a, H-6b, H-3), 4.24 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H-6'a, H-6'b), 4.18 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-5), 4.15 – 4.06 (m, 1H, H-4), 4.07 – 4.00 (m, 2H, H-4', H-5), 3.73 (dd, *J* = 10.1, 3.0 Hz, 1H, H-3'), 3.65 (dd, *J* = 9.8, 7.6 Hz, 1H, H-2'), 3.36 – 3.16 (m, 2H, CH_2-N), 1.65 – 1.49 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.34 (s, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (D_2O, 101 MHz): δ 173.5 (C-1), 103.1 (C-1'), 80.3 (C-4), 72.9 (C-2), 72.8 (C-4'), 72.4 (C-3'), 70.9 (C-2'), 69.7 (C-3), 68.9 (C-5,C-6), 68.3 (C-5'), 66.7 (C-6'), 39.5 (CH_2-N), 32.0 – 22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Tetradecyl-6'-*O*-sulfo-melibioamide sodium (Mel14monoS)**



Rendement : 48%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{26}H_{50}NNaO_{14}S$

MM : 655.28 g.mol^{-1}

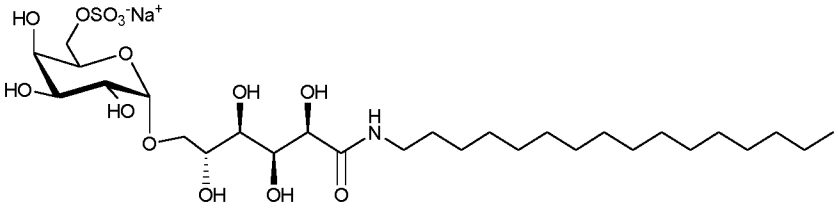
Rf : 0.32 (H_2O /CH_3CN : 7/3) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 678.2750 (calculé : 678.2747 pour $C_{26}H_{50}NNa_3O_{14}S$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.03 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1'), 4.35 (bs, 1H, H-2), 4.30 – 4.14 (m, 4H, H-6'a, H-6'b, H-5', H-3), 4.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-4'), 4.01 – 3.90 (m, 4H, H-3', H-5, H-4, H-2'), 3.75 (dd, *J* = 22, 7.2 Hz, 1H, H-6a, H-6b), 3.38 – 3.12 (m, 2H, CH_2-N), 1.66 – 1.50 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.47-1.21 (s, 22H, CH_2 chaine alkyle), 0.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.7 (C-1), 98.4 (C-1'), 73.6 (C-2), 72.3 (C-4), 70.1 (C-3), 69.6 (C-5), 69.3 (C-3'), 69.2 (C-4'), 68.6 (C-6, C-5'), 68.4 (C-2'), 67.4 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.1–22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Hexadecyl-6'-*O*-sulfo-melibioamide sodium (Mel16monoS)**



Rendement : 53%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{28}H_{54}NNaO_{14}S$

MM : 683.32 g.mol^{-1}

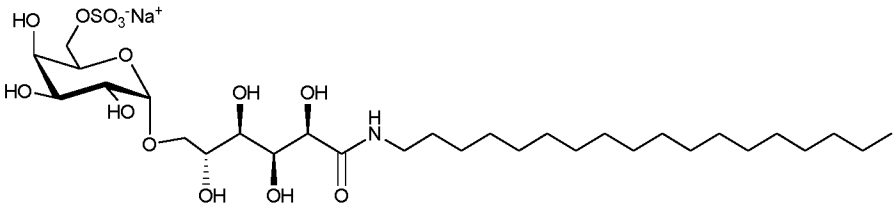
Rf : 0.22 (H_2O /CH_3CN : 7/3) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$ 706.3082 (calculé : 706.3060 pour $C_{28}H_{54}NNa_3O_{14}S$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.03 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1'), 4.35 (bs, 1H, H-2), 4.29 – 4.13 (m, 4H, H-6'a, H-6'b, H-5', H-3), 4.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-4'), 4.01 – 3.90 (m, 4H, H-3', H-5, H-4, H-2'), 3.75 (dd, *J* = 22, 7.2 Hz, 1H, H-6a, H-6b), 3.37 – 3.14 (m, 2H, CH_2-N), 1.63 – 1.52 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.46-1.18 (s, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.7 (C-1), 98.4 (C-1'), 73.6 (C-2), 72.3 (C-4), 70.1 (C-3), 69.6 (C-5), 69.3 (C-3'), 69.1 (C-4'), 68.7 (C-6), 68.6 (C-5'), 68.4 (C-2'), 67.4 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.1–22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

***N*-Octadecyl-6'-*O*-sulfo-melibioamide sodium (Mel18monoS)**



Rendement : 38%

Aspect : solide blanc

Formule brute : $C_{30}H_{58}NNaO_{14}S$

MM : 711.35 $g.mol^{-1}$

Rf : 0.16 (H_2O /CH_3CN : 7/3) CCM-C18

ESI-HRMS : $[M]^-$ 688.3569 (calculé : 688.3578 pour $C_{30}H_{58}NO_{14}S$)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O): δ 5.03 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1'), 4.35 (bs, 1H, H-2), 4.28 – 4.14 (m, 4H, H-6'a, H-6'b, H-5', H-3), 4.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-4'), 4.01 – 3.81 (m, 4H, H-3', H-5, H-4, H-2'), 3.75 (dd, *J* = 22, 7.2 Hz, 1H, H-6a, H-6b), 3.37 – 3.14 (m, 2H, CH_2-N), 1.63 – 1.52 (m, 2H, CH_2-CH_2-N), 1.46-1.18 (s, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 173.7 (C-1), 98.5 (C-1'), 73.7 (C-2), 72.3 (C-4), 70.1 (C-3), 69.6 (C-5), 69.3 (C-3'), 69.1 (C-4'), 68.7 (C-6), 68.6 (C-5'), 68.4 (C-2'), 67.4 (C-6'), 39.4 (CH_2-N), 32.1–22.7 (CH_2 chaine alkyle), 13.9 (CH_3).

II-3. Synthèse des glycobionamides oxydés

La synthèse des glycobionamides oxydés a été réalisée selon le schéma réactionnel ci-dessous (Schéma 2).

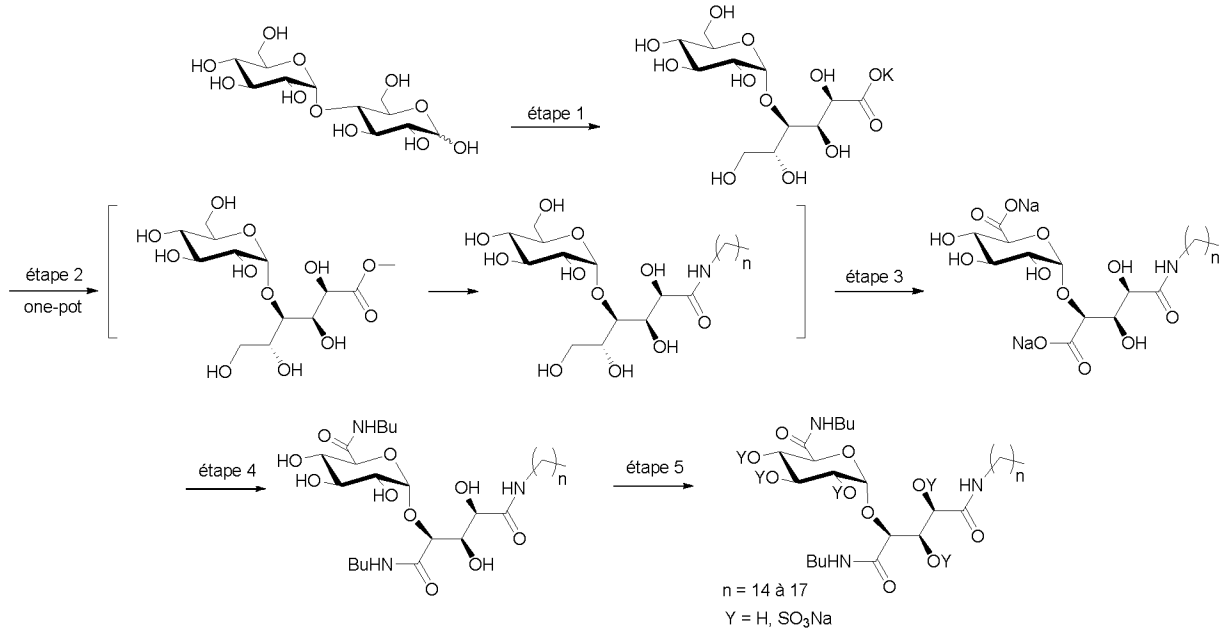


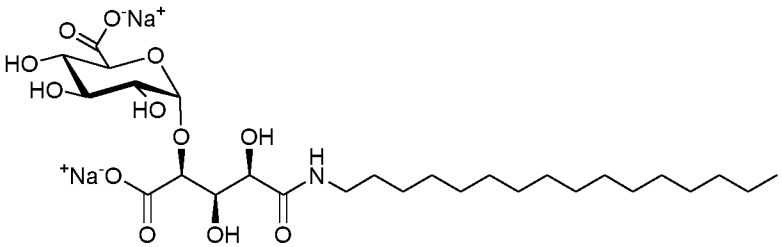
Schéma 2 : voie de synthèse des glycobionamides oxydés

La synthèse des glycobionamides oxydés comportent 3 étapes, dont les 2 premières sont identiques à la synthèse des dérivés sulfatés : oxydation de la position anomère et estérification-aminolyse one-pot pour greffer la chaine lipidique via une liaison amide.

Etape 3 : Oxydation des hydroxyles primaires du disaccharide par le système TEMPO/ BAIB, $NaHCO_3$ dans un mélange CH_3CN/H_2O (48h) (Lu, H. et al., Molecules **2016**, *21(10)*, 1301/1-1301/15). L'analyse RMN et HRMS montre qu'une perte de carbone -C6 (par décarboxylation) a eu lieu, similaire à ce qui a été décrit dans la littérature, avec un motif pyruvate (Coggins, A. J. et al., Nature Chemistry **2017**, *9(4),* 310-317 ; Lee Y et al., Chem Commun **2014**, *50*).

Pour le composé Mal16diBu-perS, 2 étapes supplémentaires sont nécessaires : une estérification-aminolyse (étape 4) suivie d'une persulfatation (étape 5) (Bu= butyle dans le schéma 2).

***N*-hexadecyl-D-glucuronyl-(α-1,4)-D-xyluronamide (Mal16diOx)**



Le dérivé *N*-hexadecyl-maltobionamide (0.60 mmol, 350 mg) est dissous dans un mélange d'acétonitrile (4 ml) et d'H_2O mQ (4 ml). Le mélange est agité à 0°C et le TEMPO (1.20 mmol, 187 mg) est additionné, suivi de BAIB (6.02 mmol, 1.94 g) et $NaHCO_3$ (3.01 mmol, 253 mg). Ensuite, le mélange est agité à température ambiante durant 72h. De l'éthanol (10 ml) est additionné et le milieu réactionnel est dilué avec de l'AcOEt (100 ml) et de l'H_2O mQ (100 ml). La phase aqueuse est isolée et extraite avec AcOEt (2 x 100 ml), puis lyophilisée. Le brut réactionnel est ensuite purifié par chromatographie en phase inverse. Le gradient d'élution est H_2O/MeCN: 100/0 à 0/100 en 20 min. Après évaporation et lyophilisation, le composé Mal16diOx est obtenu sous forme de poudre blanche, avec un rendement de 8% (31 mg).

M: 623.65 $g.mol^{-1}$

Formula: $C_{27}H_{47}NNa_2O_{12}$

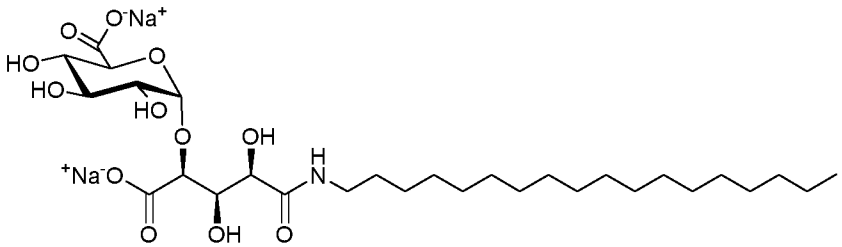
Rf: 0.51 (H_2O/MeCN: 5/5)

HRMS: 602.3150 (found 602.3152 for $C_{27}H_{49}NO_{12}Na$)

RMN ^{1}H (D_2O, 400 MHz): 5.14 (m, 1H, $H_{Glc1'}$), 4.20 (m, 3H, H_{Glc2}, H_{Glc3} and $H_{Glc5'}$), 4.10 (d, 1H, J = 6.0 Hz, H_{Glc4}), 3.93 (t, 1H, J = 9.4 Hz, $H_{Glc3'}$), 3.65 (d, 1H, J = 9,6 Hz, $H_{Glc2'}$), 3.50 (t, 1H, J = 9.5 Hz, $H_{Glc4'}$), 3.22 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.55 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.32 (m, 26H, CH_2 chaine alkyle), 0.90 (t, 3H, J = 6.2 Hz, CH_3 chaine alkyle)

RMN ^{13}C (D_2O, 100 MHz): 177.22 (C_{Glc5}), 176.93 ($C_{Glc6'}$), 173.68 (C_{Glc1}), 100.66 ($C_{Glc1'}$), 83.33 (C_{Glc4}), 72.84 (C_{Glc2} ou C_{Glc3}), 72.55 (C_{Glc2} ou C_{Glc3}), 72.44 ($C_{Glc3'}$), 72.07 ($C_{Glc4'}$), 71.59 ($C_{Glc5'}$), 71.29 ($C_{Glc2'}$), 39.38 ($\underline{C}H_2$-NH), 32.09 (CH_2 chaine alkyle), 30.16-29.11 (CH_2 chaine alkyle), 27.14 (CH_2 chaine alkyle), 22.71 (CH_2 chaine alkyle), 13.86 (CH_3 chaine alkyle).

***N*-octadecyl-D-glucuronyl-(α-1,4)-D-xyluronamide (Mal18diOx)**



Le dérivé *N*-hexadecyl-maltobionamide (0.82 mmol, 500 mg) est dissous dans un mélange d'acétonitrile (5 ml) et d'H_2O mQ (5 ml). Le mélange est agité à 0°C et le TEMPO (1.64 mmol, 256 mg) est additionné, suivi de BAIB (8.20 mmol, 2.64 g) et $NaHCO_3$ (4.10 mmol, 344 mg). Ensuite, le mélange est agité à température ambiante durant 48h. De l'éthanol (5 ml) est additionné et le milieu réactionnel est dilué avec de l'AcOEt (200 ml) et de l'H_2O mQ (200 ml). La phase aqueuse

est isolée et extraite avec AcOEt (2 x 200 ml), puis lyophilisée. Le brut réactionnel est ensuite purifié par chromatographie en phase inverse. Le gradient d'élution est H_2O/MeCN: 100/0 à 0/100 en 20 min. Après évaporation et lyophilisation, le composé Mal18diOx est obtenu sous forme de poudre blanche, avec un rendement de 17% (90 mg).

M: 651.70 $g.mol^{-1}$

Formula: $C_{29}H_{51}NNa_2O_{12}$

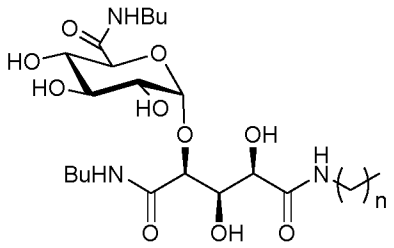
Rf: 0.48 (H_2O/MeCN: 5/5)

HRMS: 630.3466 (found 630.3465 for $C_{29}H_{53}NO_{12}Na$)

RMN ^{1}H (D_2O, 400 MHz): 5.14 (m, 1H, $H_{Glc1'}$), 4.20 (m, 3H, H_{Glc2}, H_{Glc3} and $H_{Glc5'}$), 4.10 (d, 1H, J = 6.0 Hz, H_{Glc4}), 3.94 (t, 1H, J = 8.7 Hz, $H_{Glc3'}$), 3.66 (d, 1H, J = 9,6 Hz, $H_{Glc2'}$), 3.50 (t, 1H, J = 9.5 Hz, $H_{Glc4'}$), 3.21 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-NH), 1.54 (m, 2H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.32 (m, 30H, CH_2 chaine alkyle), 0.88 (t, 3H, J = 6.2 Hz, CH_3 chaine alkyle)

RMN ^{13}C (D_2O, 100 MHz): 177.31 (C_{Glc5}), 176.94 ($C_{Glc6'}$), 173.68 (C_{Glc1}), 100.71 ($C_{Glc1'}$), 82.38 (C_{Glc4}), 72.80 (C_{Glc2} ou C_{Glc3}), 72.55 (C_{Glc2} ou C_{Glc3} ou $C_{Glc3'}$), 72.04 ($C_{Glc4'}$), 71.74 ($C_{Glc5'}$), 71.23 ($C_{Glc2'}$), 39.43 ($\underline{C}H_2$-NH), 32.24 (CH_2 chaine alkyle), 30.68-29.19 (CH_2 chaine alkyle), 27.35 (CH_2 chaine alkyle), 22.82 (CH_2 chaine alkyle), 13.84 (CH_3 chaine alkyle).

***N*-hexadecyl-(D-glucuronyl-(α-1,4)-D-xyluronamide) dibutylamide (Mal16diBu)**



Le *N*-hexadecyl-D-glucuronyl-(α-1,4)-D-xyluronamide (0.127 mmol, 79 mg) et H_2SO_4/SiO_2 22% wt (0.305 mmol, 136 mg) sont ajoutés dans un bol en zircone contenant 80 billes de zircone de diamètre 5 mm. Du MeOH (0.15 ml) est ajouté. Le milieu est broyé dans un broyeur à billes planétaire (P7P)L à 500 rpm pendant 8 cycles de 5 min avec une pause de 2 min, en mode inverse. L'ester méthylique obtenu est directement engagé dans la réaction suivante dans les mêmes conditions de broyage. De la butylamine 99.5 % (0.381 mmol, 38 µl) est ajoutée dans le bol, suivie de MeOH (0.15 ml). Le milieu est broyé dans un broyeur à billes planétaire (P7P)L à 500 rpm pendant 8 cycles de 5 min avec une pause de 2 min, en mode inverse. Le brut réactionnel est dissout dans du MeOH, filtré pour éliminer H_2SO_4/SiO_2 et évaporé. Le résidu est purifié par chromatographie flash automatisée sur une cartouche de 15g de SiO_2. Le gradient d'élution est:

AcOEt/MeOH: 100/0 à 80/20 en 30 min. Après évaporation et lyophilisation, le composé Mal16diBu est obtenu sous forme de poudre blanche, avec un rendement de 40% (35 mg).

M: 689.93 $g.mol^{-1}$

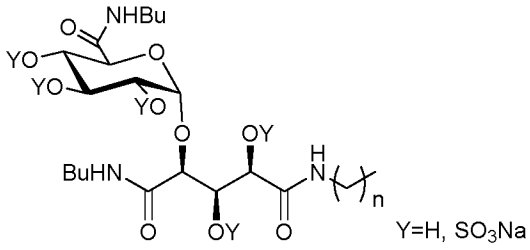
Formula: $C_{35}H_{67}N_3O_{10}$

Rf: 0.57 (AcOEt/MeOH: 9/1)

RMN ^{1}H (600 MHz, pyridine-d_5,): 8.34 (m, 3H, NH), 5.70 (d, 1H, J = 3.2 Hz, $H_{Glc1'}$), 5.22 (d, 1H, J = 5.1 Hz, H_{Glc2}), 5.03 (m, 8H, H_{Glc3}, H_{Glc4}, $H_{Glc5'}$ and OH), 4.59 (t, 1H, J = 9.1 Hz, $H_{Glc3'}$), 4.27 (t, 1H, J = 9.4 Hz, $H_{Glc4'}$), 4.13 (dd, 1H, J = 9,5 Hz, J = 3.4 Hz, $H_{Glc2'}$), 3.45 (m, 5H, $C\underline{H}_2$-NH), 3.27 (s^x, 1H, J = 6.5 Hz, $C\underline{H}_2$-NH), 1.53 (m, 6H, $C\underline{H}_2$-CH_2-NH), 1.24 (m, 30H, CH_2 chaines hexadecylamine and butylamine), 0.86 (t, 3H, J = 6.1 Hz, CH_3 chaines hexadecylamine and butylamine), 0.79 (m, 6H, CH_3 chaines hexadecylamine and butylamine)

RMN ^{13}C (150 MHz, pyridine-d_5,): 173.53 (C_{Glc1}), 171.75 (C_{Glc5} or $C_{Glc6'}$), 171.71 (C_{Glc5} or $C_{Glc6'}$), 103.19 ($C_{Glc1'}$), 84.74 (C_{Glc4}), 74.61 ($C_{Glc3'}$), 74.16 ($C_{Glc4'}$), 74.10 (C_{Glc2}), 73.91 (C_{Glc3} or $C_{Glc5'}$), 73.22 ($C_{Glc2'}$), 39.85 ($\underline{C}H_2$-NH chaine butyle), 39.68 ($\underline{C}H_2$-NH chaine butyle), 39.47 ($\underline{C}H_2$-NH chaine hexadecyle), 32.09 (CH_2 chaine hexadecyle), 32.38 (CH_2 chaine butyl), 32.36 (CH_2 chaine butyl), 30.58-29.98 (CH_2 chaine hexadecyle), 27.66 (CH_2 chaine hexadecyl), 23.31 (CH_2 chaine hexadecyle), 20.79 (CH_2 chaine butyle), 20.69 (CH_2 chaine butyle), 14.65 (CH_3 chaine hexadecyle), 14.26 (CH_3 chaine butyle), 14.24 (CH_3 chaine butyle)

***N*-hexadecyl-(D-glucuronyl-(α-1,4)-D-xyluronamide) dibutylamide persulfaté (Mal16diBu-perS)**



Le dérivé Mal16diBu-perS est obtenu suivant le même mode opératoire décrit pour l'obtention du Mal16perS. Le compose Mal16diBu (35 mg, 0.051 mmol) et 16 équivalents de complexe SO_3/pyridine 97% actif sont introduits dans un bol en zicone de 20 mL contenant 80 billes en zircone de diamètre 5 mm, puis dans le broyeur planétaire P7PL Fritsch. Le mélange est broyé à 400 rpm durant 48 cycles de 5 min. Ensuite 16 équivalents de $NaHCO_3$ (69 mg, 0.81 mmol) sont introduits dans le bol et le mélange est rebroyé pendant 6 cycles de 5 minutes. Le brut réactionnel est alors dissous dans de l'eau milliQ et dialysé à l'aide d'une membrane de seuil de coupure de

1000 kD (3x 500 mL). Mal16diBu-perS (52 mg) est obtenu sous forme de mélanges *N*-hexadecyl-(D-glucuronyl-(α-1,4)-D-xyluronamide) dibutylamide tri, tétra, penta sulfates.

III. Données biologiques

1) Tests *in vitro* de phosphorylation anormale de Tau

La phosphorylation de la protéine Tau est la modification post-traductionnelle la plus courante pour réguler l'activité et les fonctions de Tau. L'isoforme de Tau la plus longue (4R2N, 441 acides aminés) contenant 85 sites de phosphorylation potentiels a été utilisée. La phosphorylation *in vitro* de la protéine Tau est réalisée d'une part en induction (figure 5) et d'autre part selon un processus de compétition entre les molécules du LG2A et l'héparine, classiquement utilisé pour induire *in vitro* la phosphorylation anormale de Tau (figures 3, 4, 6, 7, 8, 9 et 10).

Pour les tests de phosphorylation anormale de Tau, la GSK3β, kinase centralement impliquée dans ce processus dans le cerveau de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer (MA), a été utilisée. L'analyse de la phosphorylation de Tau par la GSK3b sur des sites caractéristiques de la MA est possible par la technique de Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques qui reconnaissent les sites anormalement phosphorylés dans le cerveau ou liquide céphalorachidien des sujets MA tels que l'anticorps AT270 qui reconnait la thréonine 181 (Thr181), l'anticorps PHF1 qui reconnait les serines 396 et 404 (Ser396/Ser404), et l'anticorps AT8, qui reconnait le site Ser199/Ser202/Thr205.

Protocole expérimental

La composition des milieux réactionnels est la suivante :

En induction : La protéine Tau (40 µg/ml) (Millipore) est phosphorylée en présence d'ATP (Sigma-Aldrich) à 48 µM, d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, 1/100), par l'enzyme GSK3β à 4 ng/ml (Promega), dans du tampon (40 mM Tris [pH 7.5], 20 mM $MgCl_2$, 0.1 mg/ml BSA et 0.1 mM de DTT). Les molécules du LG2A sont ajoutées à 12 µg/ml et leurs effets comparés à celui observé par l'ajout d'une même concentration d'héparine.

En compétition : La protéine Tau (40 µg/ml) est phosphorylée par l'enzyme GSK3β à 4 ng/ml (Promega)en présence d'ATP (Sigma-Aldrich) à 48 µM, d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, 1/100), dans le tampon cité ci-dessus. La capacité des molécules du LG2A (60 µg/ml) à rentrer en compétition avec l'héparine (12 µg/ml ; Sigma-Aldrich) est évaluée. Ainsi si le signal en

présence des molécules est moindre que celui obtenu avec l'héparine seule, les molécules sont alors définies comme « protectrices » de la phosphorylation anormale de Tau.

Dans les 2 systèmes (induction ou compétition), la protéine Tau est incubée à 37°C sous agitation en présence des différents éléments présentés ci-dessus. Le suivi de la cinétique réactionnelle est réalisé par un prélèvement de 8µl des échantillons à 1,5h, 3h et 6h d'incubation. A chaque prélèvement est ajouté du tampon de charge (Euromedex) et du β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à l'analyse par Western Blot.

Après dénaturation des échantillons par chauffage à 95°C pendant 5 minutes, les échantillons sont déposés en parallèle du marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards ; BIO-RAD) sur un gel d'acrylamide 10% placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de migration (Tris 0.25M ; Glycine 1,6 M ; SDS 20% ; pH de 8.6).

Les contrôles utilisés pour cette expérience de phosphorylation suivi par Western Blot sont :

- la protéine « Tau native » c'est-à-dire la protéine Tau non phosphorylée.
- la protéine Tau phosphorylée seule par la GSK3b en absence d'héparine.
- la protéine Tau phosphorylée en présence d'héparine, notée « Tau + héparine ».
- le « standard externe » correspondant à la protéine Tau phosphorylée en présence d'héparine durant 3h. Ce standard est réalisé dans une expérience indépendamment des expériences de phosphorylation en présence des composés du LG2A. Il permet de s'assurer que le Western Blot est bien réalisé.

La migration s'effectue à 80 V constant jusqu'à l'arrivée des protéines dans le gel de séparation visualisé par le front de migration du bleu de bromophénol contenu dans le tampon de charge, puis à 120 V constant jusqu'à l'arrivée du front de migration à l'autre extrémité du gel.

A la fin de la migration, un transfert semi-sec est réalisé sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF) grâce au kit « *Trans-blot Turbo RTA Transfert Kit, PVDF* » (Bio-rad). Auparavant, la membrane PVDF est activée dans du méthanol (VWR) puis placée dans du tampon de transfert fourni dans le kit.

Le transfert est opéré à 25 V pendant 10 minutes.

Une fois que le transfert des protéines sur la membrane de PVDF est terminé, une étape de saturation est effectuée dans du PBS avec 3% de lait écrémé en poudre (Merck Millipore) et 0,1% de Tween 20 (VWR) pendant 1h sous agitation à température ambiante.

Puis la membrane est incubée toute une nuit sous agitation à +4°C dans une solution de PBS, 0,1% de Tween, 1% de lait contenant l'anticorps primaires spécifiques des sites de phosphorylation de Tau (AT270, ThermoScientific ou S199-202, Millipore).

Après l'incubation de la membrane PVDF dans l'anticorps primaire choisi, une succession de 3 lavages de 5 minutes de la membrane est réalisée dans du PBS, 0,1% Tween sous agitation et la membrane est incubée pendant 1h sous agitation à température ambiante dans une solution de PBS 1X, 0,1% de Tween, 1% de lait contenant l'anticorps secondaire dilué (Jackson Immuno-Research).

Après 3 lavages de 5 minutes au PBS, 0,1% de Tween, puis un lavage au PBS, la révélation de la membrane est effectuée par le kit « *Immobilon Forte Western HRP Substrate* » (Merck Millipore) et le signal enregistré par l'appareil LI-COR (Odyssey).

Résultats

En absence d'héparine (HS hautement sulfaté), aucune phosphorylation de Tau sur des sites caractéristiques de la MA n'est observable (Sepulveda-Diaz et al, 2015) (Figure 2). Cependant, en présence de l'héparine, HS hautement sulfaté, la phosphorylation sur l'ensemble des sites de la Tau a lieu (p-Tau), reproduisant le processus d'hyperphosphorylation anormale qui a lieu dans la cellule avant la mise en place de la tauopathie.

En utilisant le test *in vitro*, il a été démontré que les maltobionamides C16 di-sulfatés synthétisés (Mal16diS) entrent en compétition totale avec l'héparine (Hep), empêchant que l'héparine induise la phosphorylation de Tau sur les 2 sites de phosphorylation anormale Tau caractéristiques de la Maladie d'Alzheimer analysés (AT270, Ser 199/202) dès 1h30 et jusqu'à 6h de réaction. Ainsi, la phosphorylation anormale de Tau (P-Tau), révélée par les anticorps caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (AT270 et Ser199/202), est inhibée par la présence des maltobionamides C16 di-sulfatés (Mal16diS) après 3h de réaction *in vitro*. Les résultats sont présentés à la Figure 3.

De même, les maltobionamides C18 di-sulfatés synthétisés (Mal18diS) entrent en compétition totale avec l'héparine (Hep) sur les sites MA de Tau (AT270) après 1h30, 3h et 6h de réaction. Ainsi, la phosphorylation anormale de Tau (p-Tau), révélée par les anticorps caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (AT270, pSer199/202) est inhibée par la présence des maltobionamides C18 di-sulfatés (Mal18diS) après 3h de réaction (figure 4).

Cependant, lorsque la capacité des composés maltobionamides, avec une chaine hydrocarbonée (R_1) comprenant de 14 à 20 carbones (Mal14diS à Mal20diS), à induire eux même la phosphorylation anormale de Tau a été étudiée, c'est-à-dire en absence d'héparine, il a été démontré que plus les chaines hydrocarbonées des composés sont longues, plus les composés sont inducteurs de la p-Tau (figure 5).

Ainsi, pour une même capacité à protéger la Tau de sa phosphorylation anormale, il est préférable de choisir le composé ayant une longueur de chaine lipidique la plus courte.

Influence du disaccharide

Les dérivés analogues cellobionamides et lactobionamides di-sulfatés avec une chaîne hydrocarbonée comprenant de 14 à 18 carbones ont été synthétisés afin d'étudier l'influence de la nature du disaccharide.

Seuls les composés cello- et lactobionamides comprenant une chaîne hydrocarbonée à 16 et 18 carbones, respectivement « Cell16diS », « Cell18diS », et « Lac16diS », « Lac18diS », montrent un résultat similaire aux maltobionamides disulfatés comprenant une chaîne hydrocarbonée à 16 carbones (Mal16diS,) et 18 carbones (« Mal18diS »), sur leur capacité à rentrer en compétition totale avec l'héparine de 1h30 à 6h de phosphorylation de Tau par la GSK3b, comme le montre la figure 6 pour 3h de réaction.

Les dérivés mélibionamides comprenant une chaîne hydrocarbonée à 14, 16 ou 18 carbones respectivement « Mel14monoS », « Mel16monoS et « Mel18monoS) n'entrent pas en compétition avec l'héparine pour la phosphorylation anormale de Tau (Figure 6). Ainsi, par ces derniers dérivés, il apparait qu'une seule charge anionique ou la conformation du disaccharide n'est pas favorable pour entrer en compétition avec l'héparine et empêcher la phosphorylation anormale de Tau.

Influence de la sulfatation

Des composés oxydés analogues aux maltobionamides comprenant une chaîne hydrocarbonée à 16 ou 18 carbones ont été synthétisés afin d'estimer la nécessité de la sulfatation de la partie saccharidique des composés pour leur activité anti-P-Tau. Il a été observé que les composés oxydés comprenant une chaîne hydrocarbonée à 16 carbones (« Mal16diOx ») se montrent moins efficaces que les composés maltobionamides disulfatés avec une même longueur de chaîne (Mal16diS) pour empêcher la phosphorylation de Tau (figure 7). Le composé oxydé comprenant une chaîne hydrocarbonée à 18 carbones (« Mal18diOx ») n'entre pas en compétition avec

l'héparine, contrairement à son analogue disulfaté comprenant une chaîne hydrocarbonée à 18 carbones (« Mal18diS »).
Ainsi la sulfatation du disaccharide est essentielle pour entrer en compétition avec l'héparine (prototype des HS hypersulfatés présents dans la maladie d'Alzheimer) et empêcher la phosphorylation anormale de Tau.

Pour affiner l'importance de la sulfatation du disaccharide, des dérivés des maltobionamides comprenant une chaîne hydrocarbonée à 16 ou 18 carbones monosulfatés respectivement « mal16monoS » et « mal18monoS » ou tri-sulfatés respectivement « mal16triS » et « mal18triS » ont été synthétisés.

Les composés « Mal16monoS », « Mal16triS », « mal18monoS » et « mal18triS » ont montré (i) une perte légère de la capacité de protection de la Tau contre sa phosphorylation induite par l'héparine quand le maltobionamide perd un sulfalte (« Mal16monoS » et « Mal18 monoS ») et (ii) un maintien de cette capacité à protéger la Tau quand le composé gagne un sulfate (« Mal16triS » et « Mal18triS » (Figure 8).

De plus, quand le composé maltobionamide à 16 carbones est persulfaté (Mal16perS), il garde sa capacité à protéger la Tau de sa phosphorylation anormale induite par l'héparine comme son homologue disulfaté à même longueur de chaine lipidique (Figure 9.

2) Induction de l'agrégation de la protéine Tau

La capacité du composé maltobionamide disulfaté à 16 carbones « Mal16diS » à induire l'agrégation de la protéine Tau, autre étape dans la survenue des dégénérescences neurofibrillaires, a été évaluée.
Ainsi, la capacité de cette molécule à induire ou inhiber l'agrégation de Tau *in vitro* (figure 10) a été évaluée dans un test décrit dans l'article de *Sui et al,* 2015 dans lequel l'agrégation de Tau est monitorée par l'incorporation de la thioflavine T (ThT).

Protocole expérimental

Le test d'agrégation est réalisé avec la protéine Tau (isoforme 4R2N, 441 acides aminés) synthétisée à façon par le fournisseur Tebu-bio (fabrication en date du 17/04/19 ; Conc initiale : 2,47 mg/ml) dans une plaque noire 96 puits avec un volume final de 100 µl et sous différentes conditions :

- la protéine Tau (0,71 mg/ml) seule dans du tampon (40 mM Tris [pH 7.45], 200 mM NaCl, 2 mM EDTA et 1 mM de DTT).
- La protéine Tau (0,71 mg/ml) en présence d'héparine à 0,35mg/ml (ratio massique de 2/1) ou à 0,175mg/ml (ratio massique de 4/1) dans le tampon cité ci-dessus.
- La protéine Tau (0,71 mg/ml) en présence du Mal16diS à 0,175 mg/ml (ratio massique de 4/1) dans le tampon cité ci-dessus.

Dans chacun des puits est immédiatement ajouté 100 µL de ThT (Sigma-Aldrich) à 50 µM puis la plaque est incubée à 37 °C sous agitation. Le suivi de la formation des agrégats de la protéine Tau est possible par le suivi d'incorporation de la Thioflavine amenant à son émission de fluorescence et est réalisé par lecture à 0, 24, 40, 48 et 71 h aux longueurs d'ondes, λExc 450 nm / λEm 510 nm, grâce au spectro-fluorimètre Infinite M1000 (Tecan).

Résultats

Le composé Mal16diS testé induit plus faiblement l'agrégation de la protéine Tau par rapport à l'héparine jusqu'à 72h de réaction (Figure 10).

3) Test *in cellulo* de la phosphorylation anormale de Tau

Au préalable des tests de phosphorylation de Tau *in cellulo*, une étude de cytotoxicité a été réalisée sur la lignée cellulaire de neuroblastomes, les SH-SY5Y.

a) Etude de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur les molécules ayant montré le meilleur potentiel dans les tests de phosphorylation de Tau *in vitro* : les maltobionamides disulfatés à 16 carbones et 18 carbones. Afin d'évaluer le niveau de toxicité de ces molécules selon leur concentration dans l'environnement cellulaire, un test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) est réalisé (Figures 11 et 12) en amont des tests de phosphorylation *in cellulo*.

Protocole expérimental

Les SH-SY5Y (ATCC-CRL-2266 se développent en Milieu complet Eagle Modifié de Dulbecco (DMEM-GlutaMAX™, Life Technologies) avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et 1 % de pénicilline/streptomycine dans un incubateur à 37°C avec 5 % de CO_2.

Pour cela, les cellules SH-SY5Y sont mises en culture dans une plaque 6 puits à une densité cellulaire de 200 000 cellules /puits et sont différenciées à l'aide de l'acide rétinoïque (10µM,

Sigma Aldrich) durant 5 jours. Au 6ème jour, les cellules sont mises en présence des molécules du LG2A à différentes concentrations (0,1, 1, 10 ou 100 µg/ml), dans un volume final de 2 ml. Après 24 heures, le MTT (5µg/ml ; Sigma-Aldrich) est ajouté dans le milieu cellulaire pendant 2 heures à 37°C. Puis le milieu est retiré et 200 µl de DiMéthylSulfOxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) pur est ajouté dans chaque puit. La totalité du contenu de chaque puits est transféré dans une plaque 96 puits et l'absorbance est mesurée à 562 nm grâce au spectro-fluorimètre Infinite M1000 (Tecan).

Résultats

Les maltobionamides disulfatés à 16 carbones (Mal16diS) ne sont pas cytotoxiques pour les SH-SY5Y de la dose la plus faible de 0,1 µg/ml à la dose la plus forte de 100 µg/ml (Figure 11).
De la même façon, il a été montré que les maltobionamides disulfatés à 18 carbones (Mal18diS) ne sont pas cytotoxiques pour les SH-SY5Y de la dose la plus faible de 0.1 µg/ml à la dose la plus forte de 100 µg/ml (Figure 12).
Par ailleurs, les composés testés n'ont pas montré induire un état inflammatoire supplémentaire, via le dosage de l'Interleukine 6, des cellules HMC3 après stimulation au lipopolysaccharide (LPS) (50 ng/ml) lorsque les composés sont ajoutés à des doses de 0.1, 1 ou 10 µg/ml comparées aux mêmes cellules recevant uniquement du LPS (données non présentées).

b) Test *in cellulo* dans la lignée SH-SY5Y

Le modèle d'induction de phosphorylation de Tau sur la lignée de cellules SH-SY5Y décrit dans l'article du laboratoire Gly-CRRET a été utilisé ici (Sepulveda-Diaz et al., 2015).

Protocole expérimental

En résumé, les cellules SH-SY5Y sont ensemencées dans des plaques 6 puits et différenciées à l'aide de l'acide rétinoïque (10 µM, Sigma Aldrich) durant 5 jours. Au 6ème jour, les cellules sont mises en présence des molécules Mal16diS et Mal18diS à différentes concentrations (1, 10 ou 100 µg/ml), dans un volume final de 2 ml en parallèle d'un puits ne recevant pas de molécules. Après 24 heures, les molécules sont retirées et l'inducteur de stress (H_2O_2, Sigma Aldrich) est ajouté dans le milieu cellulaire pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite rincées au PBS 1X puis lysées et récupérées dans du tampon RIPA (ThermoFischer). Les extraits protéiques des cellules (10 µg) sont ensuite analysés par Western Blot selon la même procédure décrite plus haut.

Le site de phosphorylation de Tau étudié ici est le site S262 (Thermo Fisher), normalisés sur l'expression de la protéine GAPDH (Sigma Aldrich). La quantification des bandes est effectuée grâce au logiciel Odyssey de l'appareil LI-COR permettant de calculer le ratio p-Tau/GAPDH pour chacune des conditions. Le ratio obtenu pour chaque concentration de molécule est ensuite exprimé en pourcentage du ratio obtenu pour les cellules contrôle, c'est-à-dire non traitées par les molécules. Ainsi une valeur inférieure à 100% correspond à une protection apportée par les molécules dans ce modèle cellulaire d'induction de la phosphorylation de Tau.

L'expérience a été répétée au moins 4 fois pour chaque dose de molécule pour les molécules « Mal16diS » et « Mal18diS » et au moins 2 fois pour les molécules « Cell16diS » et « Lac16diS ». La moyenne et l'écart type des réplicats sont représentés sur les figures 13 à 16, chacune des valeurs obtenues pour chaque dose est comparée à celle du contrôle sans ajout de molécule, avec un *t*-test. Les différences statistiques avec une valeur de $p < 0.05$ et < 0.001 sont représentées respectivement par « * » et « *** ».

Résultats

Les 2 doses les plus faibles de maltobionamides disulfatés à 16 carbones testées (« mal16diS ») (1 et 10 µg/ml) permettent une diminution significative ($p<0.01$) de 30 et 40 % de la phosphorylation de Tau dans les cellules SH-SY5Y comparées aux cellules non traitées (figure 13).

Concernant le maltobionamide disulfaté à 18 carbones (« mal18diS »), on observe une diminution croissante de la phosphorylation de Tau avec l'augmentation de la concentration de composé. Avec la dose la plus forte de 100 µg/ml, on observe jusqu'à 60 % de diminution de la phosphorylation de Tau comparées aux cellules non traitées ($p<0.001$) ; les doses les plus faibles permettent d'obtenir une protection de la phosphorylation de Tau induite par le stress oxydatif, proche de 30 % (Figure 14).

Pour la dose la plus faible de 1 µg/ml, le cellobionamide disulfaté à 16 carbones (« cell16diS ») permet une diminution d'environ 34% de la phosphorylation de Tau dans les cellules SH-SY5Y comparées aux cellules non traitées ; cependant cette différence n'est pas statistiquement différente. Il en est de même pour les doses de 10 et 100 µg/ml de ce composé où la protection de la Tau est de 17 et 20% respectivement (Figure 15).

Enfin, pour le lactobionamide disulfaté à 16 carbones (« lac16diS »), la dose la plus faible de 1 µg/ml permet une diminution presque significative ($p=0.069$) de 25% de la phosphorylation de Tau dans les cellules SH-SY5Y. La dose de 10 µg/ml de ce composé n'a pas été testée. La dose la

plus forte de 100 µg/ml de cette molécule permet une protection de la phosphorylation de la protéine Tau de 54% ($p<0.01$) comparée aux cellules non traitées dites contrôles (Figure 16).

c) Test *in cellulo* dans les cellules corticales des souris rTg4510

Les cellules corticales des souris rTg4510 mutées pour la protéine Tau humaine (P301L) ont été utilisées comme modèle de cellules primaires exprimant une tauopathie sans induction par un effecteur à la différence du modèle cellulaire précédent (Santa Cruz et al., Science, 2005).

Protocole expérimental

Les cellules corticales sont extraites d'embryons de souris exprimant la mutation P301L au stade E16 et mises en culture en plaque 6 puits. Au 14ème (phosphorylation modérée de Tau) ou 18ème (phosphorylation sévère de Tau) jour, les cellules extraites d'un même embryon sont mises en présence de la molécule Mal16diS à différentes concentrations (0.1 ou 1 µg/ml), dans un volume final de 2 ml en parallèle d'un puits de cellules d'un même embryon ne recevant pas de molécules pour 24h.

Après 24 heures de traitement avec les molécules, les cellules sont rincées au PBS 1X puis lysées et récupérées dans du tampon RIPA (ThermoFischer). Les extraits protéiques des cellules (10 µg) sont ensuite analysés par Western Blot selon la même procédure décrite plus haut.

Le site de phosphorylation de Tau étudié ici est le site S262 (Thermo Fisher), normalisés sur l'expression de la protéine Tau totale (K9JA, Dako). La quantification des bandes est effectuée grâce au logiciel Odyssey de l'appareil LI-COR permettant de calculer le ratio p-Tau/Tau totale pour chacune des conditions. Le ratio obtenu pour chaque concentration de molécule est ensuite exprimé en pourcentage du ratio obtenu pour les cellules non traitées par les molécules. Ainsi une valeur inférieure à 100% correspond à une protection apportée par les molécules dans ce modèle cellulaire d'expression de la phosphorylation de Tau.

L'expérience a été répétée au moins 3 fois pour chaque dose de molécule « Mal16diS » La moyenne et l'écart type des réplicats sont représentés sur les figures 17 et 18, chacune des valeurs obtenues pour chaque dose est comparée à celle des cellules sans ajout de molécule, avec un *t*-test. Les différences statistiques avec une valeur de $p < 0.01$ et < 0.001 sont représentées respectivement par « ** » et « *** ».

Résultats

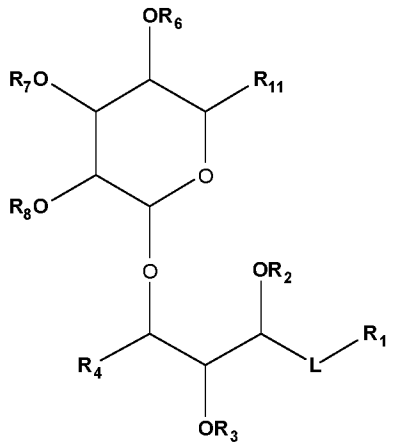
Les 2 doses de maltobionamide disulfaté à 16 carbones testées (« mal16diS ») (0.1 et 1 µg/ml) permettent une diminution significative de 48% ($p<0.01$) et 64 % ($p<0.001$) de la phosphorylation

de Tau lorsque cette dernière est modérée (J14) dans les cellules corticales des souris rTg4510 comparées aux cellules non traitées (Figure 17, n=4).

Cette diminution de la phosphorylation dans des cultures primaires de cellules corticales est maintenue lorsque les cellules présentent une phosphorylation plus sévère (J18) avant traitement, avec notamment une diminution de 39 % et 53 % pour des doses de 0.1 et 1 µg/ml respectivement de « mal16diS » (Figure 18, n=4).

REVENDICATIONS

1. Composé de formule (I) suivante :



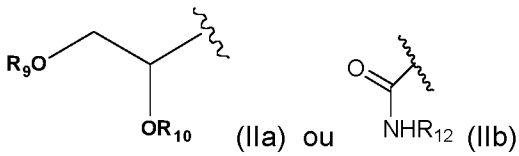
(I)

dans laquelle :

L est un groupement -C(=O)NH-, -C(=O)O- ou -C(=O)S-

$\mathbf{R_1}$ est une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, optionnellement substituée en position terminale par un groupement choisi parmi -OH, -OR, -NH_2, -NHR, -NRR', -COOH, -COOR, -CONHR, -CONRR', -SR avec R et R' désignant indépendamment l'un de l'autre un groupement alkyle comprenant de un à six atomes de carbone ;

$\mathbf{R_4}$ est un groupement de formule (IIa) ou (IIb) :



(IIa) ou (IIb)

dans lequel :

$\mathbf{R_9}$ et $\mathbf{R_{10}}$ sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

$\mathbf{R_{12}}$ est un groupement alkyle comprenant de un à six atomes de carbone ;

$\mathbf{R_{11}}$ est un groupement -CH_2-O$\mathbf{R_5}$ ou -CONH$\mathbf{R_{13}}$ dans lequel :

$\mathbf{R_5}$ est un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

$\mathbf{R_{13}}$ est un groupement alkyle comprenant de un à six atomes de carbone ;

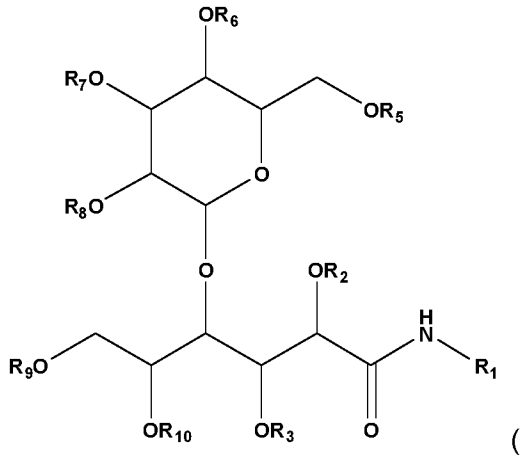
R_2, R_3, R_6, R_7 et R_8 sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ; et

dans laquelle au moins un des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10} est, de préférence au moins deux des groupements R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 et R_{10} sont, un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

pour son utilisation en médecine.

2. Composé pour son utilisation selon la revendication 1 dans lequel R_{11} est un groupement CH_2-OR_5 avec R_5 tel que défini à la revendication 1.

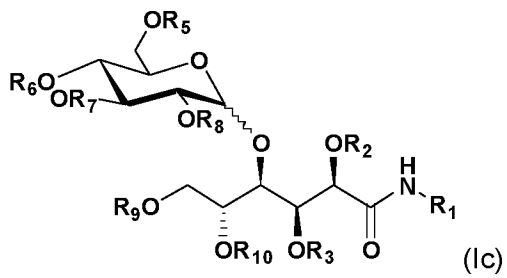
3. Composé pour son utilisation selon la revendication 1 ou 2 présentant la formule (Ib) suivante :



(Ib)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits à la revendication 1 ou 2.

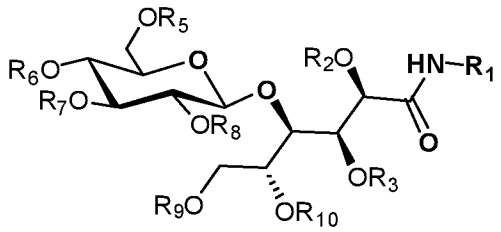
4. Composé pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes présentant la structure (Ic) suivante :



(Ic)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits à la revendication 1.

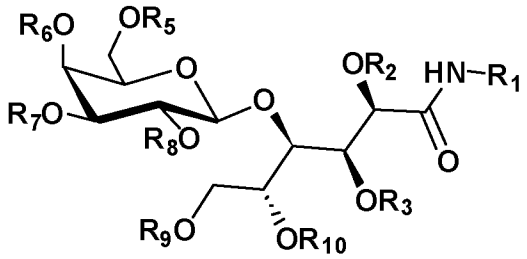
5. Composé pour son utilisation selon la revendication 1 présentant la structure (Ie) suivante :



(Ie)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits à la revendication 1.

6. Composé pour son utilisation selon la revendication 1 présentant la structure (Ig) suivante :



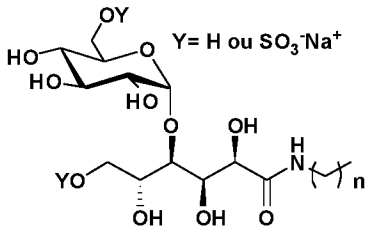
(Ig)

dans laquelle R_1 à R_3 et R_5 à R_{10} sont tels que décrits à la revendication 1.

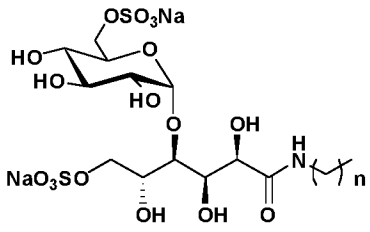
7. Composé pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes dans lequel R_1 est une chaîne hydrocarbonée linéaire saturée comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, de préférence 16 et 18 atomes de carbone.

8. Composé pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes dans lequel R_2, R_3, R_6, R_7, R_8 et R_{10} sont des atomes d'hydrogène et R_5 et R_9 sont des groupements sulfonates sous forme ionisée.

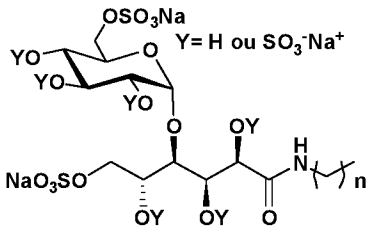
9. Composé pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes, ledit composé étant choisi parmi les composés suivants :



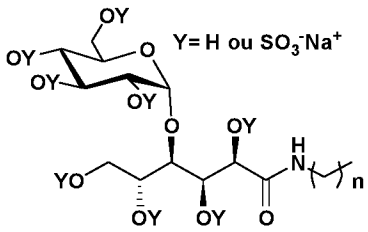
avec n= 15 ou 17;



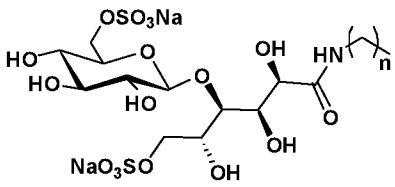
avec n= 15 ou 17 ;



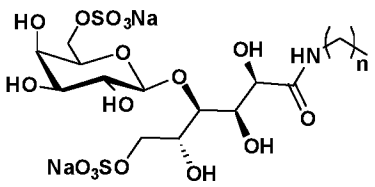
avec n= 15 ou 17 ;



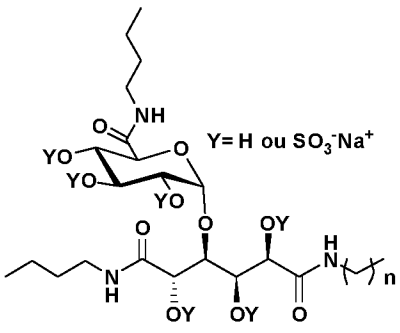
avec n = 15 ;



avec n= 15 ou 17 ;



avec n= 15 ou 17 ;



avec n= 15.

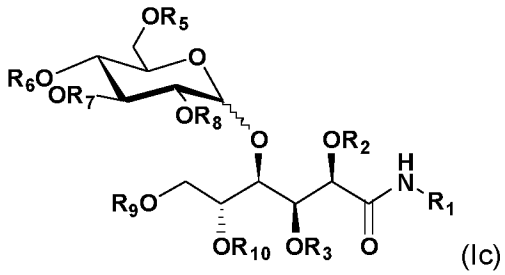
10. Composé tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 9 pour son utilisation dans le traitement des tauopathies.

11. Composé tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 9 pour son utilisation dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

12. Composition pharmaceutique comprenant un composé de formule (I) tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 9 et un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 pour son utilisation dans le traitement des tauopathies.

14. Composé présentant la structure (Ic) suivante :



(Ic)

R_1 est une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, comprenant 15, 16, 17 ou 18 atomes de carbone, optionnellement substituée en position terminale par un groupement

choisi parmi -OH, -OR, -NH_2, -NHR, -NRR', -COOH, -COOR, -CONHR, -CONRR', -SR avec R et R' désignant indépendamment l'un de l'autre un groupement alkyle comprenant de un à six atomes de carbone ;

R_5 est un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_9 et **R_{10}** sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ;

R_2, R_3, R_6, R_7 et **R_8** sont, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un groupement sulfonate sous forme ionisée ; et

dans laquelle au moins un des groupements **R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9** et **R_{10}** est, de préférence au moins deux des groupements **R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9** et **R_{10}** sont, un groupement sulfonate sous forme ionisée.

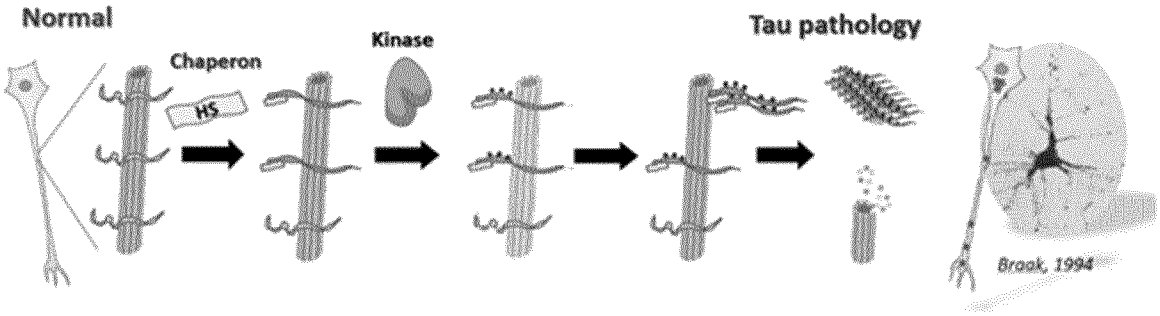


Fig. 1

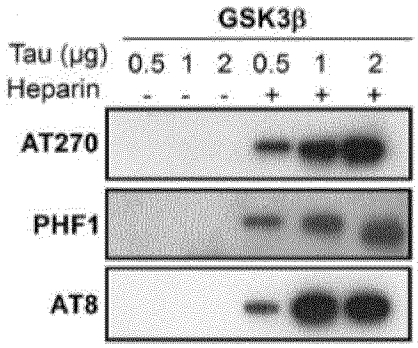


Fig. 2

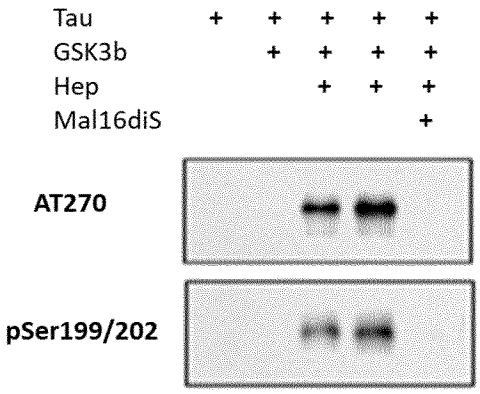


Fig. 3

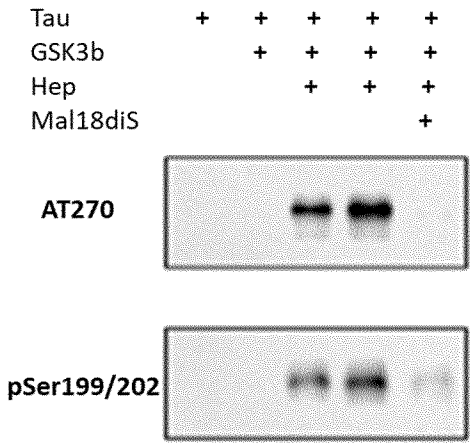


Fig. 4

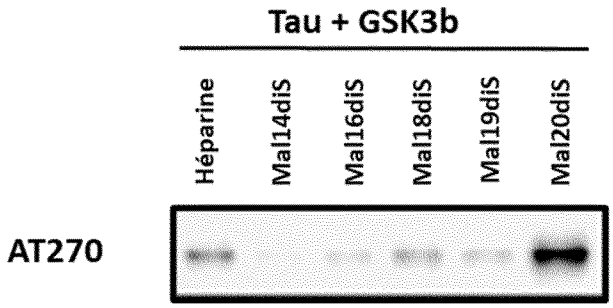


Fig. 5

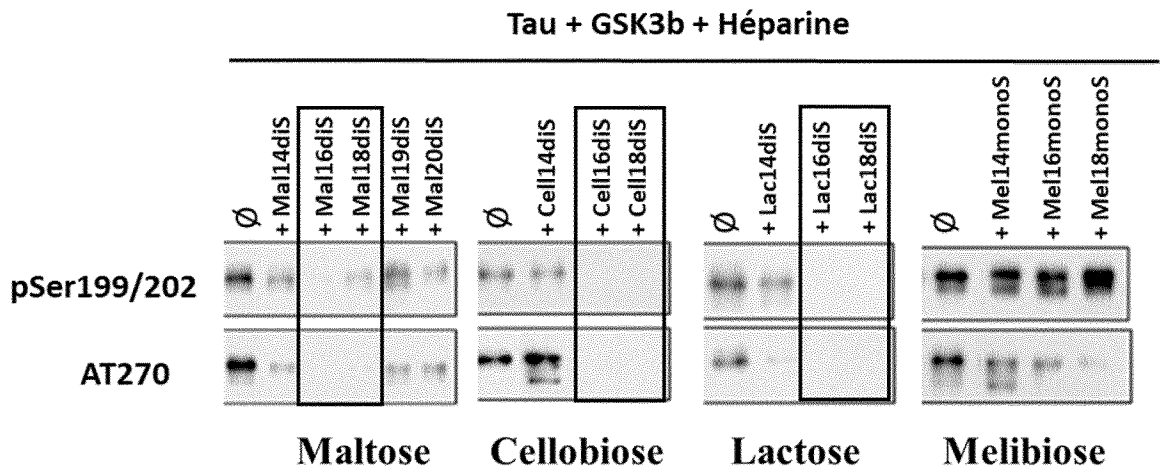


Fig. 6

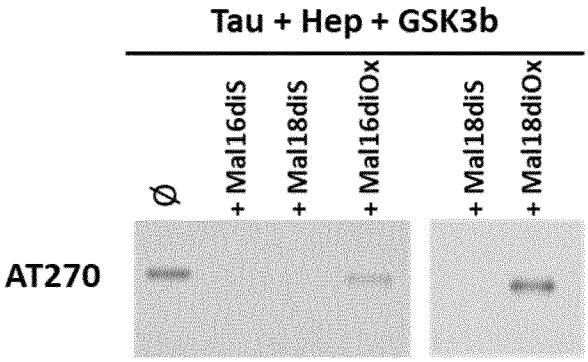


Fig. 7

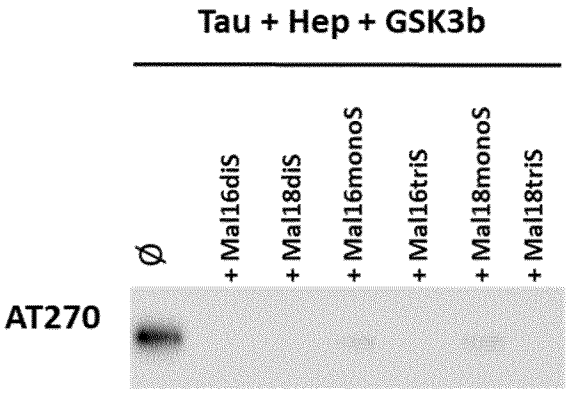


Fig. 8

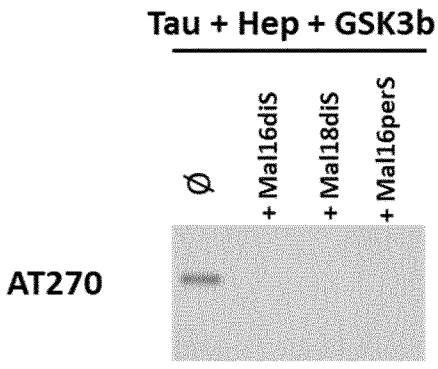


Fig. 9

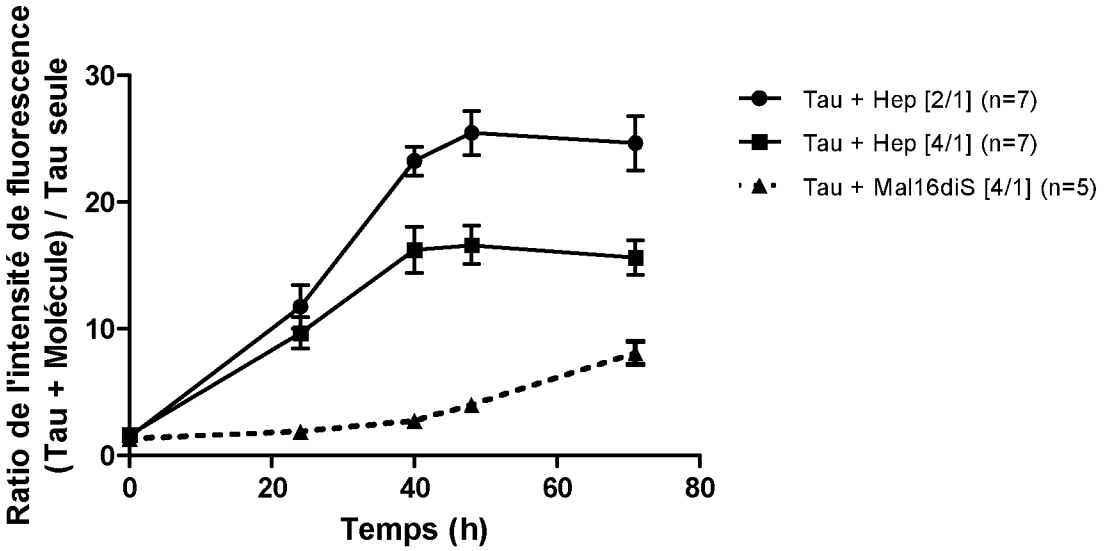

Ratio de l'intensité de fluorescence (Tau + Molécule) / Tau seule
30
20
10
0
0
20
40
60
80
Temps (h)
Tau + Hep [2/1] (n=7)
Tau + Hep [4/1] (n=7)
Tau + Mal16diS [4/1] (n=5)

Fig. 10

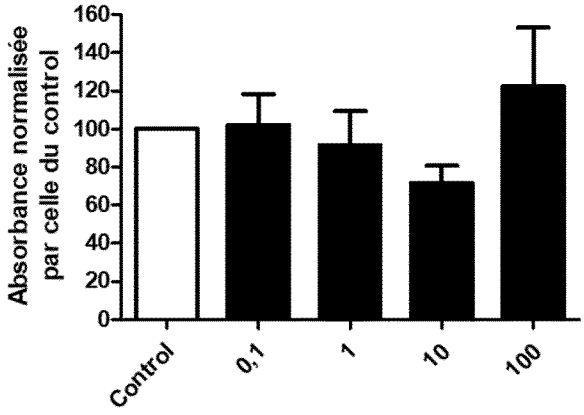

Absorbance normalisée par celle du control
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0,1
1
10
100

Fig. 11

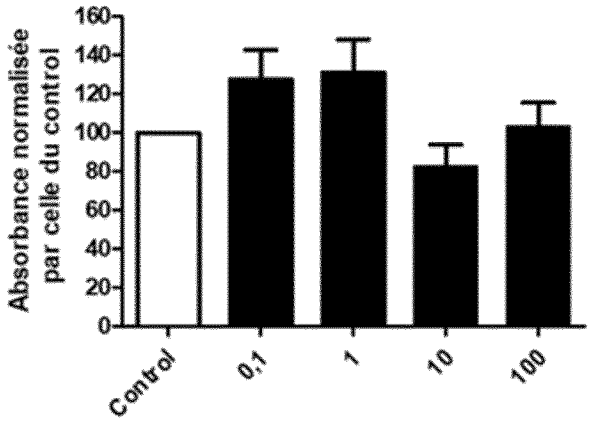

Absorbance normalisée par celle du control
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0,1
1
10
100

Fig. 12

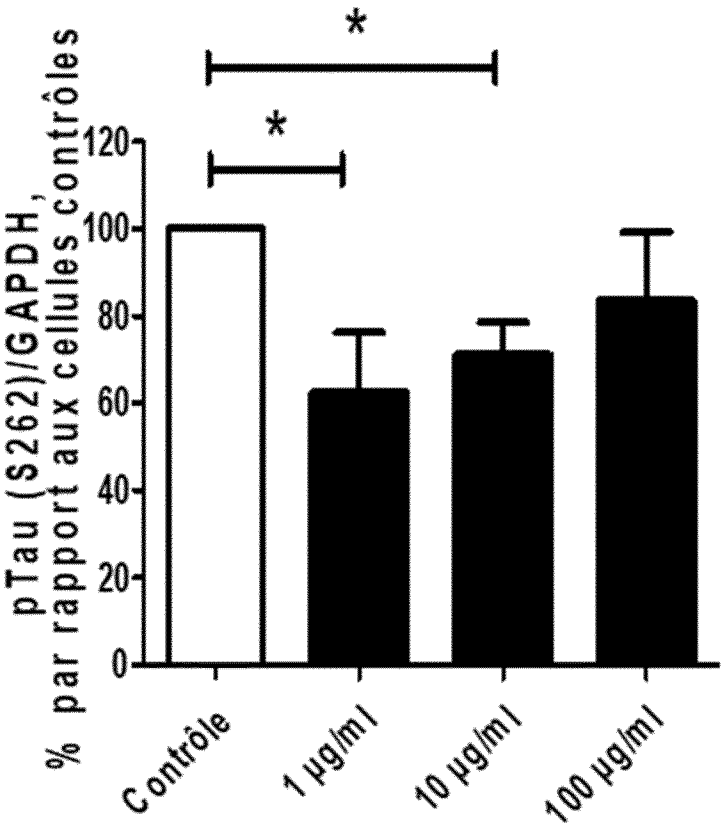

*
*
pTau (S262)/GAPDH, % par rapport aux cellules contrôles
120
100
80
60
40
20
0
Contrôle
1 µg/ml
10 µg/ml
100 µg/ml

Fig. 13

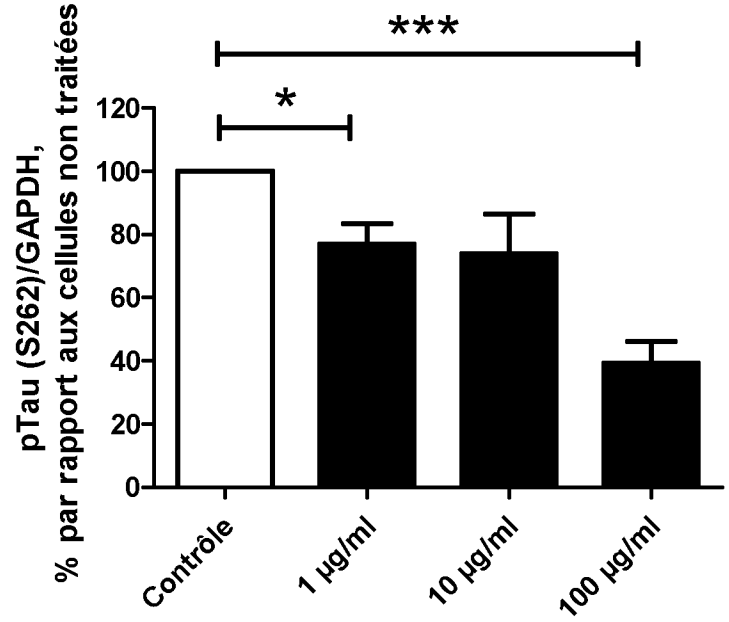

***
*
120
100
80
60
40
20
0
pTau (S262)/GAPDH,
% par rapport aux cellules non traitées
Contrôle
1 µg/ml
10 µg/ml
100 µg/ml

Fig. 14

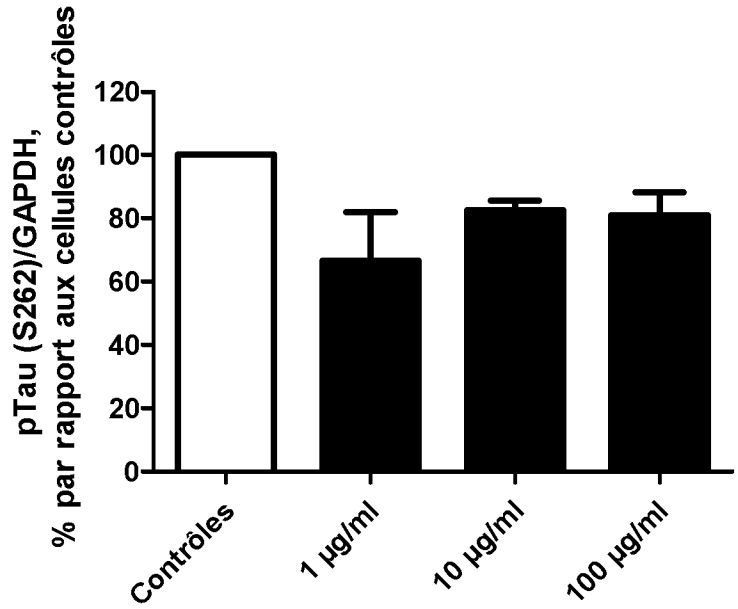

120
100
80
60
40
20
0
pTau (S262)/GAPDH,
% par rapport aux cellules contrôles
Contrôles
1 µg/ml
10 µg/ml
100 µg/ml

Fig. 15

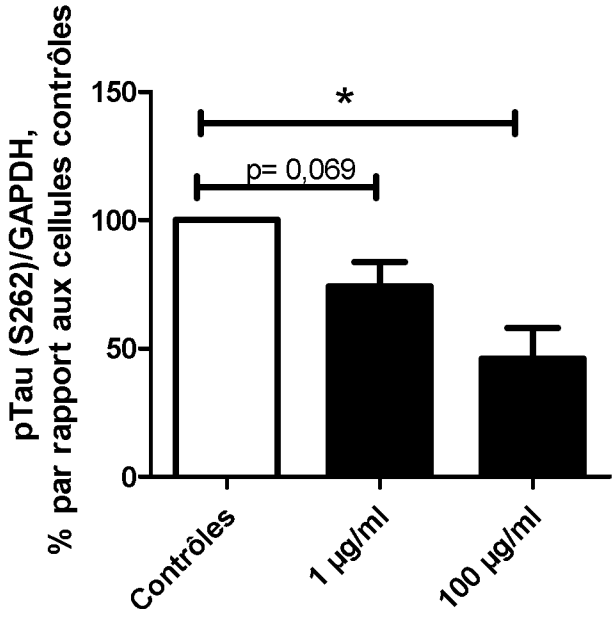

pTau (S262)/GAPDH,
% par rapport aux cellules contrôles
150
100
50
0
*
p= 0,069
Contrôles
1 µg/ml
100 µg/ml

Fig. 16

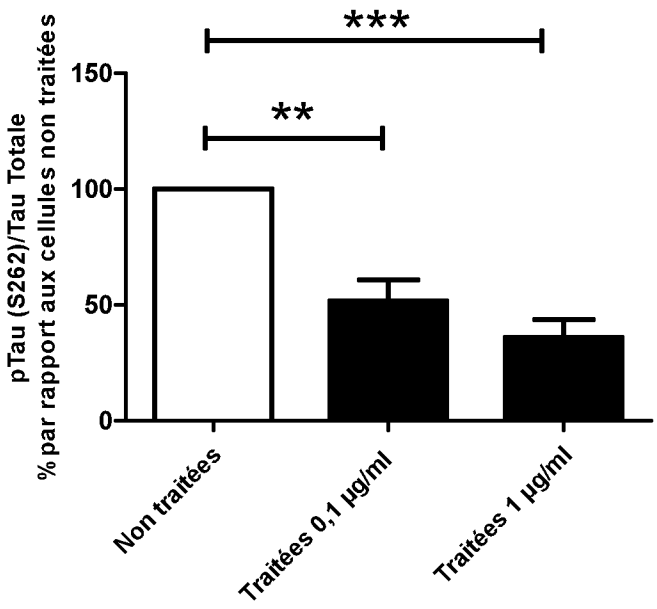

pTau (S262)/Tau Totale
% par rapport aux cellules non traitées
150
100
50
0
***
**
Non traitées
Traitées 0,1 µg/ml
Traitées 1 µg/ml

Fig. 17

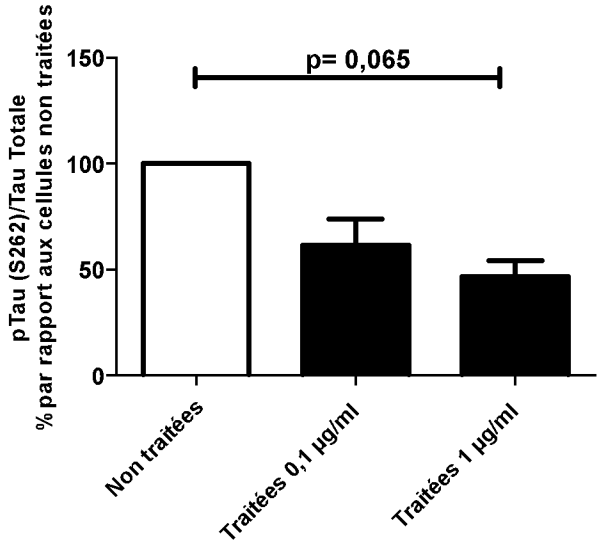

pTau (S262)/Tau Totale
% par rapport aux cellules non traitées
150
100
50
0
p= 0,065
Non traitées
Traitées 0,1 µg/ml
Traitées 1 µg/ml

Fig. 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/083709

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 15/12(2006.01)i; ***A61P 25/28***(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5686603 A (AU VAN [US] ET AL) 11 November 1997 (1997-11-11)	14
A	example 97 claim 1	1-13
A	WO 2007115372 A1 (UNIV MONASH [AU]; SMALL DAVID H [AU] ET AL.) 18 October 2007 (2007-10-18) page 1, paragraph 1 claims 7,9	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 February 2023	**27 February 2023**

Name and mailing address of the ISA/EP	Authorized officer
European Patent Office **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	**Fanni, Stefano** Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP2022/083709

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 5686603 A	11 November 1997	NONE	
WO 2007115372 A1	18 October 2007	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2022/083709

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C07H15/12 A61P25/28
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C07H A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 686 603 A (AU VAN [US] ET AL) 11 novembre 1997 (1997-11-11)	14
A	exemple 97 revendication 1	1-13

A	WO 2007/115372 A1 (UNIV MONASH [AU]; SMALL DAVID H [AU] ET AL.) 18 octobre 2007 (2007-10-18) page 1, alinéa 1 revendications 7,9	1-14

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent;; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent;; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 février 2023	27/02/2023

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fanni, Stefano

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2022/083709

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5686603 A	11-11-1997	AUCUN	
WO 2007115372 A1	18-10-2007	AUCUN	