



N° d'ordre 031-2009

Année 2009

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
ECOLE DOCTORALE DES MATERIAUX DE LYON

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité "Chimie organique"

Soutenue publiquement le 3 mars 2009

par

Astrid PERNET-POIL-CHEVRIER

## Nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides possédant une structure et une architecture contrôlées

|        |                          |                    |
|--------|--------------------------|--------------------|
| Jury : | M. Paul Boullanger       | président          |
|        | M. Sébastien Fort        | rapporteur         |
|        | M. Yves Queneau          | rapporteur         |
|        | Mme Nadine Aubry-Barocca | examineur          |
|        | M. Alain Domard          | directeur de thèse |
|        | M. Stéphane Trombotto    | co-encadrant       |



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur G. ANNAT

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

## UFR SANTE

### Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIES

### Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologies A

Institut Universitaire de Technologies B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

# Remerciements

Ce travail s'est déroulé dans le Laboratoire des Matériaux Polymères et Biomatériaux (CNRS UMR 5223) dirigé par Gérard Seytre, grâce à un financement du projet européen NBS « Nanotechnologies for Bio-inspired polySaccharides : biological decoys designed as knowledge-based, multifunctional biomaterials », 6th Framework Research Program of the EU « Nanotechnologies and nano-sciences, knowledge-based multifunctional materials and new production processes and devices ».

Je remercie M. Alain Domard, directeur de thèse, qui m'a accueillie dans son laboratoire, m'a associée à ce projet, et a toujours été présent dans les moments difficiles. Je le remercie de sa patience et de son aide dans la rédaction du présent manuscrit. Chacun de nos échanges de ces trois années a été riche d'enseignement.

Je remercie particulièrement M. Stéphane Trombotto, co-encadrant, pour ses conseils avisés, sa grande disponibilité et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier Agnès Crépet pour son aide au quotidien.

J'adresse un grand merci à tous les étudiants du laboratoire qui ont fait que ces années se sont déroulées dans une excellente ambiance et particulièrement à Rocio et Simina pour nos trois ans de collocation dans le bureau 426.

Remercier Pierre Yves et Nathalie est une évidence tant ils m'ont apporté. Je leur dois énormément et leur suis reconnaissante de m'avoir transmis leur passion de la recherche.

Je remercie enfin toutes les personnes qui m'ont apporté aide et soutien en dehors du laboratoire : famille, amis et Guillaume.

## Abréviations

A : unité acétylée

Ac : acétyle

ACS : acide camphosulfonique

AIBN : 2,2'-azobisisobutyronitrile

Bn : benzyle

Bz : benzoyle

CAN : ammonium cérium (IV) nitrate

CCM : chromatographie sur couche mince

COSY : correlation spectroscopy

D : unité désacétylée

d : doublet

dd : doublet dédoublé

DA : degré d'acétylation

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène

DCM : dichlorométhane

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

DMM : diméthylmaléoyle

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMTST : diméthyl(méthylthio)sulfonium triflate

DP : degré de polymérisation

éq : équivalent

ES+MS : spectrométrie de masse électrospray positive

GlcN : glucosamine

GlcNAc : *N*-acétylglucosamine

HMBC : heteronuclear multiple bond coherence

HSQC : heteronuclear single quantum coherence

LG : groupe partant (leaving group)

Maldi : matrix-assisted laser desorption ionization

MeOTf : trifluorométhanesulfonate de méthyle

MP : 4-méthoxyphényle

MS : tamis moléculaire (molecular sieves)  
m : multiplet  
NBS : *N*-bromosuccinimide  
NIS : *N*-iodosuccinimide  
PhSeOTf : trifluorométhanesulfonate de benzènesélényle  
Phth : phthalimido  
PMB : *p*-méthoxybenzyle  
R<sub>f</sub> : rapport frontal  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
s : singulet  
SM-HR (ES<sup>+</sup>) : spectrométrie de masse haute résolution électrospray positive  
T<sub>a</sub> : température ambiante  
TBAA : acétate de tetra-*n*-butylammonium  
TBAF : fluorure de tetra-*n*-butylammonium  
TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle  
TBDPS : *tert*-butyldiphénylsilyle  
TCA : trichloroacétyle  
TCP : tétrachlorophthaloyle  
TESOTf : trifluorométhanesulfonate de triéthylsilyle  
Tf : triflate (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)  
TFA : acide trifluoroacétique  
THF : tétrahydrofurane  
TMSOTf : trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle  
t : triplet  
Z : benzyloxycarbonyle

« Patience et longueur de temps font plus que force ni que rage »

-Jean de La Fontaine-

# SOMMAIRE

|   |                 |
|---|-----------------|
| <b>A- <u>Introduction générale</u></b>                                    | <b><u>1</u></b> |
| <b>B- <u>Chapitre bibliographique</u></b>                                 | <b><u>4</u></b> |
| <b>1. Introduction</b>  | <b>5</b>        |
| <b>2. Intérêts des chitooligosaccharides</b>                              | <b>8</b>        |
| 2.1. Propriétés   | 8               |
| 2.1.1. Activité antimicrobienne   | 8               |
| 2.1.2. Activité antitumorale  | 9               |
| 2.1.3. Activité élicitrice  | 10              |
| 2.1.4. Activité antifongique  | 12              |
| 2.1.5. Autres activités   | 13              |
| 2.2. Applications   | 15              |
| 2.3. Conclusion sur l'intérêt des chitooligosaccharides                   | 16              |
| <b>3. Préparation des chitooligosaccharides</b>                           | <b>18</b>       |
| 3.1. Préparation par dégradation de la chitine et du chitosane            | 18              |
| 3.1.1. Méthodes chimiques   | 18              |
| 3.1.1.1. Hydrolyse acide  | 18              |
| 3.1.1.2. Acétolyse  | 20              |
| 3.1.1.3. Fluorohydrolyse  | 21              |
| 3.1.1.4. Désamination nitreuse  | 23              |
| 3.1.2. Hydrolyse enzymatique  | 26              |
| 3.1.2.1. Hydrolyse enzymatique par les chitinases                         | 26              |
| 3.1.2.2. Hydrolyse enzymatique par les chitosanases                       | 27              |
| 3.1.2.3. Hydrolyse enzymatique par les lysozymes                          | 28              |
| 3.1.2.4. Hydrolyse enzymatique par d'autres enzymes                       | 28              |
| 3.1.3. Irradiation gamma  | 30              |
| 3.1.4. Sonication   | 31              |
| 3.2. Synthèse enzymatique   | 32              |
| 3.3. Synthèse chimique  | 35              |
| 3.4. Conclusion sur la préparation des oligomères de chitine et chitosane | 48              |
| <b>4. Synthèse chimique d'oligosaccharides</b>                            | <b>51</b>       |
| 4.1. Introduction   | 51              |
| 4.2. Formation d'une liaison glycosidique                                 | 51              |
| 4.2.1. Formation d'une liaison glycosidique 1,2- <i>trans</i>             | 54              |
| 4.2.2. Formation d'une liaison glycosidique 1,2- <i>cis</i>               | 56              |
| 4.3. Méthodes de glycosylation  | 57              |
| 4.3.1. Réaction de Koenigs-Knorr  | 57              |
| 4.3.2. Méthode oxazoline  | 58              |
| 4.3.3. Méthode phthalimido  | 60              |
| 4.3.4. Utilisation des donneurs 2-azido-2-désoxy                          | 62              |
| 4.3.5. Utilisation des donneurs 2-(alkoxycarbonyl)amino-2-désoxy          | 65              |
| <b>5. Conclusion</b>  | <b>67</b>       |

|  |                  |
|--|------------------|
| <b>C- <u>Résultats et discussion</u></b>   | <b><u>68</u></b> |
| <b>1. Introduction</b>   | <b>69</b>        |
| <b>2. Stratégie</b>  | <b>71</b>        |
| 2.1. Groupes protecteurs de la fonction amine  | 71               |
| 2.2. Groupes protecteurs des fonctions hydroxyle   | 72               |
| 2.3. Choix du groupe partant   | 74               |
| 2.4. Structure des monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine   | 75               |
| 2.5. Synthèse de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation supérieurs à 2  | 77               |
| 2.6. Bilan de la stratégie de synthèse des chitooligosaccharides   | 78               |
| <b>3. Synthèse des quatre monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine</b>                                | <b>81</b>        |
| 3.1. Synthèse des deux monosaccharides donneur et accepteur de D-glucosamine <b>59 et 61</b>   | 81               |
| 3.1.1. Analyse rétrosynthétique  | 81               |
| 3.1.2. Synthèse de l'accepteur de D-glucosamine <b>61</b>  | 83               |
| 3.1.3. Synthèse du donneur de D-glucosamine <b>59</b>  | 89               |
| 3.1.4. Bilan de la synthèse des deux monosaccharides donneur et accepteur de D-glucosamine <b>59 et 61</b>                                     | 91               |
| 3.2. Synthèse des deux monosaccharides donneur et accepteur de N-acétyl-D-glucosamine <b>58 et 60</b>  | 92               |
| 3.2.1. Analyse rétrosynthétique  | 92               |
| 3.2.2. Synthèse de l'accepteur de N-acétyl-D-glucosamine <b>60</b>   | 94               |
| 3.2.3. Synthèse du donneur de N-acétyl-D-glucosamine <b>58</b>   | 101              |
| 3.2.4. Bilan de la synthèse deux monosaccharides donneur et accepteur de N-acétyl-D-glucosamine <b>58 et 60</b>                                | 102              |
| 3.3. Conclusion sur la synthèse multi-étapes des monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine             | 104              |
| <b>4. Synthèse des chitodisaccharides</b>  | <b>105</b>       |
| 4.1. Réaction de couplage entre un monosaccharide accepteur de glycosyle et un monosaccharide donneur de glycosyle                             | 105              |
| 4.1.1. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de N-acétyl-D-glucosamine et le monosaccharide donneur de N-acétyl-D-glucosamine | 106              |
| 4.1.2. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de N-acétyl-D-glucosamine et le monosaccharide donneur de D-glucosamine          | 108              |
| 4.1.3. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide donneur de N-acétyl-D-glucosamine          | 110              |
| 4.1.4. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide  | 112              |

|  |                   |
|--|-------------------|
| donneur de D-glucosamine   |                   |
| 4.2. Réactions de déprotection des chitodisaccharides  | 114               |
| 4.2.1. Réactions de déprotection conduisant aux<br>chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc | 114               |
| 4.2.2. Réactions de déprotection conduisant aux<br>chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN     | 119               |
| 4.3. Conclusion sur la préparation des quatre chitodisaccharides                                   | 127               |
| <b>5. Synthèse des chitodisaccharides accepteurs et<br/>    donneurs de glycosyle</b>              | <b>129</b>        |
| 5.1. Synthèse des chitodisaccharides accepteurs<br>de glycosyle                                    | 130               |
| 5.2. Synthèse des chitodisaccharides donneurs<br>de glycosyle                                      | 131               |
| 5.3. Réaction de couplage des chitodisaccharides   | 132               |
| <b>6. Conclusion sur la préparation des chitooligosaccharides</b>                                  | <b>135</b>        |
| <b>7. Détermination des pK apparents des chitodisaccharides</b>                                    | <b>137</b>        |
| 7.1. Introduction  | 137               |
| 7.2. Méthode de détermination du pKa   | 137               |
| 7.2.1. Description de la méthode de titration potentiométrique                                     | 138               |
| 7.2.2. Validation de la méthode  | 140               |
| 7.3. Détermination du pKa des chitodisaccharides   | 143               |
| 7.4. Interprétation des valeurs des pKa des<br>chitodisaccharides                                  | 146               |
| 7.5. Conclusion sur la détermination des<br>pK apparents des chitodisaccharides                    | 148               |
| <b>D- <u>Conclusion générale</u></b>   | <b><u>150</u></b> |
| <b>E- <u>Partie expérimentale</u></b>  | <b><u>154</u></b> |
| 1. Généralités   | 155               |
| 2. Description   | 157               |
| <b>F- <u>Références bibliographiques</u></b>   | <b><u>198</u></b> |



# *A- Introduction générale*

Le chitosane est un copolymère linéaire constitué d'unités 2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucane (GlcNAc) et 2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucane (GlcN) reliées par une liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Bien que présent dans la nature, il est principalement obtenu par *N*-désacétylation de la chitine, le polymère le plus abondant dans la biomasse avec la cellulose. Le chitosane est un biopolymère biocompatible, biorésorbable et bioactif. Il possède d'importantes propriétés biologiques et trouve de nombreuses applications dans les domaines : du biomédical, de l'agriculture, de l'alimentaire, des cosmétiques...

Le chitosane a toutefois un usage restreint *in vivo* en raison de sa faible solubilité dans les conditions physiologiques et de sa forte viscosité en milieu acide, liée à son caractère de polyélectrolyte cationique.

Les chitooligosaccharides, issus de la dégradation du chitosane, connaissent un intérêt croissant. Leur faible masse molaire leur donne un accès plus large à certaines propriétés physicochimiques et pourrait avoir une forte influence sur la bioactivité observée lors de l'utilisation du chitosane sous forme de gel, de fibre, de film ou d'éponge.

Si les chitooligosaccharides possèdent d'intéressantes propriétés biologiques, leur bioactivité semble dépendre de leur structure. L'établissement d'une relation structure - activité est donc indispensable au développement de cette famille de composés. Or, à ce jour, les études menées sur les chitooligosaccharides utilisent des mélanges d'oligomères. La taille et la structure des composés responsables de l'activité biologique sont donc difficiles à contrôler. En effet, aucune méthode ne permet actuellement d'obtenir des chitooligosaccharides possédant une structure et une architecture parfaitement définies. Les voies conventionnelles, chimiques ou enzymatiques, consistent à dépolymériser le chitosane sans contrôle des structures obtenues. Quelques synthèses sont reportées, mais elles sont limitées à la préparation d'homo-chitooligosaccharides.

Aucune loi de comportement n'a donc pu être établie, bien qu'une telle relation soit un outil très important pour permettre le développement des chitooligosaccharides dans leurs nombreuses applications potentielles.

L'objectif de ce travail est de mettre au point une nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides, par synthèse chimique, en partant des deux monomères, permettant d'obtenir des structures parfaitement définies.

L'étude bibliographique va dans une première partie brièvement décrire le chitosane, ses propriétés et ses applications. Puis les intérêts des chitooligosaccharides seront mis en avant par l'étude de leurs propriétés et applications. Dans une troisième partie, nous détaillerons les méthodes de préparation de ces composés existant à ce jour, ainsi que leurs limites concernant l'obtention d'une structure définie. Enfin, nous nous intéresserons à la synthèse chimique d'oligosaccharides, voie que nous avons choisie de suivre pour atteindre notre objectif.

Le chapitre intitulé « Résultats et discussion » détaillera précisément la stratégie que nous avons développée pour la synthèse de diverses structures définies de chitooligosaccharides. Puis la synthèse des quatre chitodisaccharides sera décrite, ainsi que leur transformation sélective afin d'obtenir des chitooligosaccharides de degré de polymérisation supérieur à deux. Dans une dernière partie, nous étudierons les propriétés physico-chimiques de ces quatre chitodisaccharides en déterminant leurs pK apparents, et ce afin d'obtenir des informations concernant une relation structure - activité.

Pour terminer, les analyses et caractérisations effectuées sur les différents composés synthétisés au cours de ce travail seront détaillées dans la partie expérimentale.

*B- Chapitre  
bibliographique*

# 1. Introduction

La chitine est le polysaccharide le plus abondant dans la biomasse avec la cellulose. Il s'agit d'un copolymère linéaire constitué d'unités D-glucosamine (GlcN) et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées par une liaison glycosidique  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). La chitine est présente dans les cuticules, ou exosquelettes, des arthropodes (crustacés, insectes, arachnides) ainsi que dans l'endosquelette des céphalopodes (calamars, seiches). Elle est également présente dans les parois cellulaires et la matrice extracellulaire de la plupart des champignons, de certaines levures et algues.

Le chitosane est également un copolymère linéaire constitué d'unités D-glucosamine (GlcN) et N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées par une liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Il se trouve à l'état naturel dans la paroi cellulaire de certains microorganismes (champignons, bactéries, levures et algues), mais dans des quantités relativement restreintes [1]. Au niveau industriel, il est principalement produit par N-désacétylation de la chitine.

La chitine et le chitosane possèdent la même structure chimique décrite dans le schéma 1 et ne se différencient que par la fraction molaire des motifs acétylés le long de la chaîne polymère, appelée degré d'acétylation (DA).

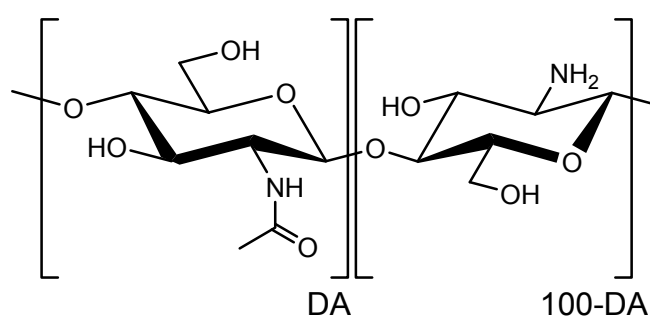


Schéma 1 : structure chimique de la chitine et du chitosane

Il n'existe pas de nomenclature officielle précise. La distinction entre chitine et chitosane est alors fonction de leurs propriétés de solubilité [2]. Le chitosane est suffisamment N-désacétylé pour être soluble en milieu acide dilué par protonation des groupements amine, ce qui correspond à des degrés d'acétylation inférieurs à 70%. Il est par contre insoluble dans les solvants organiques. Quant à la chitine, elle est insoluble en milieu aqueux et dans les solvants organiques usuels, mais se

solubilise dans le diméthylacétamide (DMAc) ou la *N*-méthylpyrrolidone en présence de chlorure de lithium [1].

Le chitosane est utilisé notamment pour élaborer des hydrogels [3-5], des films [6, 7], des fibres [6, 8-11] ou des éponges [12, 13]. Grâce à leur biocompatibilité [14], leur biorésorbabilité [15] et leur non-toxicité [16], ces matériaux peuvent être utilisés dans le domaine biomédical pour produire des sutures chirurgicales [17-20], de la peau artificielle [21-24], du tissu osseux [25, 26], des lentilles de contact jetables [27, 28]... Le chitosane trouve également des applications dans les domaines : de l'agriculture (mécanismes de défense et stimulation de croissance des plantes, ou élicitation [29-33], protection contre le gel, enrobage des semences [34-38]), du traitement de l'eau et des déchets (clarification de l'eau, suppression des ions métalliques, réduction des odeurs) [26, 39-41], de l'alimentation (fibres alimentaires [42], réduction du cholestérol [43-47], conservateur [48], stabilisant, enrobage protecteur des fruits), des cosmétiques (maintien de l'humidité de la peau, traitement de l'acné [49], amélioration de la souplesse des cheveux, dentifrice [50-52]) [53], de la pharmacie (produits immunologiques, antitumoraux, hémostatiques, anticoagulants, bactériostatiques) [54].

La chitine peut être utilisée pour former des fibres [55, 56] ou des films [6]. Ces produits sont non allergéniques et antibactériens [57]. Les fibres de chitine peuvent par exemple être utilisées dans l'industrie papetière pour améliorer la résistance du papier [58], ou dans le domaine alimentaire (clarification des jus de fruits) et le traitement des polluants industriels. Mais sa principale application concerne les domaines médical et pharmaceutique où elle est utilisée comme pansement [6, 59] ou comme vecteur de médicaments [60, 61].

La chitine et le chitosane sont donc exploités dans de nombreux domaines mais malgré leurs intéressantes propriétés, ces composés présentent plusieurs inconvénients pour être utilisés dans des applications biologiques. D'une part, leur faible solubilité dans les conditions physiologiques et leur forte viscosité peuvent limiter leur usage *in vivo*. D'autre part, l'appareil digestif humain ne possède pas d'enzymes spécifiques telles que la chitinase ou la chitosanase capables d'hydrolyser la liaison  $\beta$ -glycosidique de ces biopolymères.

De nombreuses études se sont par conséquent intéressées à des oligomères de chitine et chitosane appelés chitooligosaccharides (COS) possédant une plus faible masse molaire afin de pallier les problèmes rencontrés avec le polymère, tout en espérant apporter une intéressante bioactivité, à caractère spécifique. Nous détaillerons dans un premier temps le potentiel des chitooligosaccharides en décrivant les principales propriétés biologiques mises en évidence par ces études ainsi que les applications potentielles qui en découlent. Dans une deuxième partie, nous examinerons les différentes méthodes existant à ce jour pour préparer les chitooligosaccharides.

## 2. Intérêts des chitooligosaccharides

### 2.1. Propriétés

Contrairement au chitosane, les chitooligosaccharides sont solubles dans l'eau en raison notamment de leur plus courte longueur de chaîne et de leurs propriétés électrostatiques différentes de celles du polymère [62]. Leur faible viscosité et leur plus grande solubilité à pH neutre ont ainsi attiré l'intérêt de nombreux chercheurs. Une étude sur l'évaluation de la sécurité d'une exposition par voie orale aux chitooligosaccharides a conclu que la dose létale (LD<sub>50</sub>) chez les souris était supérieure à 10g/kg/jour (largement au-delà de celle du saccharose), aucune mutation génétique ni symptôme anormal ou décès n'ont été observés [63]. De même, aucune anomalie n'a été détectée dans les organes lors de l'examen. Cette étude conclue donc qu'à court terme l'ingestion orale de chitooligosaccharides est non toxique. Une étude antérieure avait déjà montré que les chitooligosaccharides n'entraînent aucun effet toxique après ingestion orale de 0.5, 1 et 2 g/kg/jour par des rats pendant 28 jours [64]. Puisque ces composés sont biocompatibles et biodégradables, ils peuvent être utilisés dans des applications biologiques. Des recherches ont été menées sur la bioactivité des chitooligosaccharides et il a été montré qu'ils possèdent notamment des activités antimicrobienne, antitumorale, élicitrice et antifongique.

#### 2.1.1. Activité antimicrobienne

De nombreuses recherches ont été menées sur l'étude des propriétés antimicrobiennes des chitooligosaccharides [65-77]. Y. Wang et al. [66] ainsi que X. Wei et al. [70] ont montré que l'activité antimicrobienne des chitooligosaccharides augmente lorsque les degrés d'acétylation et de polymérisation diminuent. Le chitotétrasaccharide avec un degré d'acétylation de 10% est le plus actif pour inhiber la croissance de plusieurs bactéries.

En revanche, K. Ueno et al. [65] ont mis en évidence que des chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 50% avec une masse molaire inférieure à 2 200 g.mol<sup>-1</sup> (DP 12) ne sont pas capables de supprimer la croissance microbienne tandis que des chitooligosaccharides de même degré d'acétylation mais de masse molaire de 5 500 g.mol<sup>-1</sup> (DP 30) la diminue. La croissance microbienne est même

pratiquement supprimée par un chitooligosaccharide de masse molaire de 9 300 g.mol<sup>-1</sup> (DP 51). Les auteurs ont également déterminé la concentration minimale supprimant la croissance bactérienne pour chacun de ces chitooligosaccharides. Ces concentrations minimales sont respectivement de 0.004% et 0.032% pour les chitooligosaccharides de masses molaires de 9 300 g.mol<sup>-1</sup> et 5 500 g.mol<sup>-1</sup> tandis que dans le cas d'un chitooligosaccharide de 2 200 g.mol<sup>-1</sup>, même à une concentration de 0.5% aucune activité antimicrobienne n'est observée. Ces résultats semblent indiquer que l'activité antimicrobienne des chitooligosaccharides augmente avec leur degré de polymérisation.

Les différentes études portant sur l'activité antimicrobienne des chitooligosaccharides conduisent à des résultats contradictoires concernant l'évolution de cette activité en fonction des paramètres structuraux. Cette propriété semble dépendre des degrés d'acétylation et de polymérisation, mais à ce jour aucune loi de comportement n'a été établie. Il a toutefois été suggéré que les groupements amine présents dans la structure des chitooligosaccharides joueraient un rôle important dans l'activité antimicrobienne en interagissant avec les groupes acide carboxylique chargés négativement des macromolécules à la surface des bactéries. Il en résulterait la formation de complexes polyélectrolytes [69, 78], créant une couche imperméable et supprimant l'activité métabolique de la bactérie en bloquant le transfert des nutriments à travers la paroi cellulaire. Les chitooligosaccharides pourraient donc altérer la perméabilité membranaire des cellules microbiennes, empêchant ainsi la transfection cellulaire [79].

### 2.1.2. Activité antitumorale

Plusieurs équipes se sont intéressées à l'étude de l'activité antitumorale des chitooligosaccharides [80-90]. K. Suzuki et al. [81] ont montré que les chitohexasaccharides (GlcN)<sub>6</sub> et (GlcNAc)<sub>6</sub> inhibent la croissance des tumeurs S180 (sarcoma 180) et MM46 (mouse mammary 46) implantées dans des souris. L'injection intraveineuse de (GlcNAc)<sub>6</sub> sept jours après l'implantation de la tumeur entraîne une inhibition respectivement de 85 et 83% de la croissance des tumeurs S180 et MM46. L'injection du chitooligosaccharide (GlcN)<sub>6</sub> inhibe la croissance des mêmes tumeurs respectivement de 93 et 55%. Ces deux chitooligosaccharides possèdent le même degré de polymérisation, mais la modification du degré

d'acétylation entraîne des taux d'inhibition différents. Plusieurs études sur différentes tumeurs ont confirmé que le chitooligosaccharide (GlcNAc)<sub>6</sub> possède une forte activité antitumorale [80, 83, 89].

Y.-J. Jeon et al. [82] ont étudié l'activité de chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 0% et des degrés de polymérisation inférieurs à 9, compris entre 9 et 34 ou supérieurs à 34 sur l'inhibition des tumeurs S180 et U14 (Uterine cervix carcimona No. 14) implantées dans des souris. Le mélange de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation variant de 9 à 34 possède une plus grande activité antitumorale que les mélanges de degrés de polymérisation inférieurs à 9 ou supérieurs à 34.

Un mélange de tétramère et pentamère possédant un degré d'acétylation de 42% est également capable d'inhiber la croissance des cellules tumorales S180 après une administration orale et intrapéritonéale [88]. Contrairement aux autres molécules biologiques, l'activité antitumorale des chitooligosaccharides peut être exercée suite à une administration orale et ses effets sont similaires à ceux obtenus après une injection intrapéritonéale [88].

Il semblerait que l'activité antitumorale ne soit pas due directement à la destruction des cellules cancéreuses, mais plutôt à l'augmentation de la production de lymphokines. Cette augmentation entraînerait l'effet antitumoral par la prolifération de lymphocytes T [91].

Les différentes recherches menées sur l'activité antitumorale des chitooligosaccharides semblent indiquer que cette activité varie lorsque les degrés d'acétylation et de polymérisation sont modifiés. Mais aucune étude ne permet à ce jour de mettre en évidence une relation structure - activité précise.

### 2.1.3. Activité élicitrice

Un éliciteur est une substance capable, dans certaines conditions, de stimuler les mécanismes de défense naturelle de la plante, à très faibles doses, de l'ordre du ppm. Ces défenses naturelles seraient dirigées soit contre des bio-agresseurs (maladie, ravageur), soit contre des stress abiotiques comme ceux provoqués par le gel ou la sécheresse. Le terme éliciteur faisait initialement référence aux molécules capables d'induire la synthèse et l'accumulation de phytoalexine dans

les cellules des plantes [92], mais il est maintenant utilisé pour les molécules stimulant tout mécanisme de défense des plantes [93-96].

Depuis une quinzaine d'année, l'activité élicitrice des chitooligosaccharides a été abondamment étudiée [96-103]. L.-A. Hadwiger et al. [96] se sont intéressés à la capacité des chitooligosaccharides (GlcN)<sub>4</sub>, (GlcN)<sub>6</sub> et (GlcN)<sub>8</sub> d'augmenter la résistance aux maladies des pois. Alors que les deux premiers ne montrent aucune activité élicitrice, le chitooctasaccharide s'avère être un éliciteur très efficace.

K. Akiyama et al. [99] ont étudié l'activité élicitrice des chitooligosaccharides de degrés de polymérisation compris entre 4 et 12, et avec des degrés d'acétylation variant de 13 à 76%, sur des pois et des haricots. Les mélanges dont le degré d'acétylation est de 13 et 36% montrent la plus grande activité élicitrice pour l'induction de phytoalexine dans les deux systèmes. En revanche, le mélange de chitooligosaccharides de degré d'acétylation 73% présente une très faible activité.

J.-C. Cabrera et al. [98] ont étudié l'influence des degrés de polymérisation et d'acétylation sur l'activation de défense dans une culture de cellules *Arabidopsis thaliana*. Les chitooligosaccharides de degrés de polymérisation de 5 à 9 avec un degré d'acétylation de 0% possèdent une plus forte activité élicitrice que les chitooligosaccharides de même degré d'acétylation mais de degrés de polymérisation compris entre 3 et 6. Lorsqu'ils ont acétylé leurs chitooligosaccharides, ils ont observé une activité élicitrice maximale pour un degré d'acétylation de 65%. Au-delà de cette valeur, l'activité diminue.

P. Vander et al. [97] ont confirmé l'influence du degré d'acétylation sur l'activité élicitrice des chitooligosaccharides. Les oligomères de GlcN de degrés de polymérisation variant de 5 à 7 ne montrent aucune activité élicitrice lorsqu'ils sont injectés dans les feuilles de *Triticum aestivum L.*, tandis que les oligomères de GlcNAc de degrés de polymérisation supérieurs à 7 sont actifs.

Selon le système étudié, il apparaît donc que les chitooligosaccharides n'ont pas la même activité élicitrice. Pour un système donné, cette activité semble dépendre des paramètres structuraux que sont les degrés d'acétylation et de polymérisation. Les études menées à ce jour indiquent que les chitooligosaccharides doivent avoir un degré de polymérisation supérieur à 4 pour entraîner une réponse biologique mais il n'est pas possible de généraliser quant à une structure type responsable d'une activité précise [102].

### 2.1.4. Activité antifongique

Quelques études ont mis en évidence que les chitooligosaccharides possèdent une activité antifongique et que celle-ci serait influencée par les degrés de polymérisation et d'acétylation. Hirano et Nagano [104] ont étudié l'influence du degré de polymérisation sur l'inhibition de la croissance de plusieurs phytopathogènes. Un mélange de chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 0% et des degrés de polymérisation variant de 2 à 8 possède une plus forte inhibition de croissance qu'un chitosane de masse molaire de  $400\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (DA 0% et DP 2484) contre *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis fukushi* et *Alternaria alternata*. Y. Shimai et al. [105] ont montré l'influence du degré d'acétylation. Un chitooligosaccharide de degré d'acétylation 0% possède une plus grande activité antifongique contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae* qu'un chitooligosaccharide de même degré de polymérisation mais possédant un degré d'acétylation de 100%.

L'activité antifongique des chitooligosaccharides serait due au fait que ces composés contiennent des unités D-glucosamine dans leur structure. Ils possèdent donc un caractère polycationique. Cette propriété leur permettrait de réagir avec les groupes chargés négativement des champignons, leur conférant ainsi une activité antifongique [106]. Le mécanisme d'inhibition des chitooligosaccharides contre les champignons est similaire à celui précédemment décrit pour l'activité antimicrobienne. La formation de complexes polyélectrolytes entre les chitooligosaccharides et les charges négatives à la surface des cellules interférerait directement sur la croissance des champignons. Il en résulterait que l'activité antifongique des chitooligosaccharides dépendrait de la distribution de charges le long de la chaîne oligomère et varierait en fonction des degrés d'acétylation et de polymérisation, même si aucune étude n'a été menée pour établir une relation entre l'activité antifongique et la structure des chitooligosaccharides.

### 2.1.5. Autres activités

Quelques études ont également décrit des activités hypocholestérolémiante, antivirale ou antioxydante pour les chitooligosaccharides, ainsi que leur capacité à réguler la pression artérielle ou à accélérer l'absorption *in vivo* du calcium.

#### Activité hypocholestérolémiante :

L'activité hypocholestérolémiante a été étudiée par M. Sugano et al. [107] qui ont mis en évidence la relation entre la diminution du taux de cholestérol chez les rats et la masse molaire moyenne des chitooligosaccharides ajoutés à leur régime alimentaire. Ils ont montré que les chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 0% et une masse molaire comprise entre 8 000 et 20 000 g.mol<sup>-1</sup> (DP 49 à 124) sont aussi efficaces qu'un chitosane de 300 000 g.mol<sup>-1</sup> (DP 1863 et DA 0%) tandis que les chitooligosaccharides de degré de polymérisation inférieur à 5 ne montrent aucune activité.

I. Ikeda et al. [108] ont étudié l'activité hypocholestérolémiante de chitooligosaccharides de masses molaires moyennes de 2 000 (DP 11), 5 000 (DP 27), 10 000 (DP 57) et 20 000 g.mol<sup>-1</sup> (DP 116) possédant tous un degré d'acétylation de 20%. Les composés possédant la plus grande activité sont ceux dont la masse molaire est comprise entre 10 000 et 20 000 g.mol<sup>-1</sup>, tandis que ceux dont la masse molaire est de 5 000 g.mol<sup>-1</sup> ne montrent qu'un très faible effet. L'activité hypocholestérolémiante des chitooligosaccharides semble donc dépendre de leur masse molaire et une valeur limite existerait puisque dans cette étude les chitooligosaccharides de faibles degrés de polymérisation n'entraînent pas de réduction du taux de cholestérol.

#### Activité antivirale :

Quelques recherches ont permis de mettre en évidence l'activité antivirale des chitooligosaccharides [109, 110]. Il a été montré que lorsque le degré de polymérisation diminue, l'activité antivirale est plus faible. En revanche, lorsque le degré d'acétylation diminue, l'activité antivirale est améliorée. Il a donc été suggéré que l'activité antivirale serait directement reliée à la présence des charges positives sur les fonctions amine présentes dans les chitooligosaccharides et dépendrait des degrés d'acétylation et de polymérisation. Le mécanisme de

l'activité antivirale n'est pas bien compris, mais une explication possible pourrait être que les charges positives des groupes amine activeraient les systèmes immunitaire et de défense chez les plantes et les animaux [106].

#### Activité antioxydante :

Il a également été montré que les chitooligosaccharides possèdent un pouvoir anti-radicaux libres et antioxydant. P.-J. Park et al. [111] ont étudié cinq mélanges de chitooligosaccharides de masses molaires respectives supérieure à  $10\,000\text{ g.mol}^{-1}$  ( $> DP\ 60$ ),  $5\,000\text{-}10\,000\text{ g.mol}^{-1}$  ( $DP\ 30\ \text{à}\ 60$ ),  $3\,000\text{-}5\,000\text{ g.mol}^{-1}$  ( $DP\ 18\ \text{à}\ 30$ ),  $1\,000\text{-}3\,000\text{ g.mol}^{-1}$  ( $DP\ 6\ \text{à}\ 18$ ) et inférieure à  $1\,000\text{ g.mol}^{-1}$  ( $< DP\ 6$ ) obtenus à partir d'un chitosane avec un degré d'acétylation de 7% et une masse molaire de  $280\,000\text{ g.mol}^{-1}$  ( $DP\ 1708$ ). Les auteurs ont obtenu les meilleurs résultats avec les chitooligosaccharides possédant une masse molaire comprise entre  $1\,000$  et  $3\,000\text{ g.mol}^{-1}$  ( $DP\ 6\ \text{à}\ 18$ ). La même équipe a ensuite étudié l'activité antioxydante de neuf sortes d'hétéro-chitooligosaccharides possédant des masses molaires comprises entre  $5\,000$  et  $10\,000\text{ g.mol}^{-1}$ , entre  $1\,000$  et  $5\,000\text{ g.mol}^{-1}$ , et inférieures à  $1\,000\text{ g.mol}^{-1}$  avec des degrés d'acétylation de 10, 25 et 50% [112]. Les auteurs ont montré que les chitooligosaccharides de masse molaire comprise entre  $1\,000$  et  $5\,000\text{ g.mol}^{-1}$  possédant un degré d'acétylation de 10% présentent la plus grande activité antioxydante. Ces résultats sembleraient indiquer que le pouvoir antioxydant dépend à la fois de la masse molaire et également du degré d'acétylation des chitooligosaccharides.

#### Activité de régulation de la pression artérielle :

Une étude sur la régulation de la pression artérielle a été réalisée avec les mêmes neuf sortes de chitooligosaccharides [113] que ceux utilisés pour l'étude de l'activité antioxydante, comme décrit ci-dessus. L'équipe de Park a ainsi montré que les chitooligosaccharides de masses molaires comprises entre  $1\,000$  et  $5\,000\text{ g.mol}^{-1}$  et possédant un degré d'acétylation de 50% ont la plus grande activité de régulation de la pression sanguine.

### Activité d'absorption *in vivo* du calcium :

La capacité des chitooligosaccharides à accélérer l'absorption *in vivo* du calcium a été montrée par Y.-J. Jeon et al. [114]. Dans cette étude, un mélange de chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 0% et des degrés de polymérisation variant de 3 à 7 permet d'accélérer l'absorption *in vivo* du calcium chez les rats. Ceci se traduit par l'augmentation de la résistance mécanique de leur fémur, alors que dans le même temps, la quantité de calcium retrouvée dans les déjections diminue.

Les travaux effectués sur la bioactivité des chitooligosaccharides mettent en évidence les nombreuses propriétés de cette famille de composés aussi bien dans le monde animal que végétal. Ces structures possèdent un fort potentiel et peuvent trouver des applications dans divers domaines.

## 2.2. Applications

Grâce à leurs intéressantes propriétés biologiques décrites ci-dessus, les chitooligosaccharides sont susceptibles d'être utilisés dans de nombreux domaines tels que la médecine et la pharmacie (effets protecteurs contre les infections bactériennes, agents antitumoraux, diminution du cholestérol, accélération de l'absorption du calcium), l'agriculture (enrobage des semences [115]), l'industrie alimentaire (agents antimicrobiens, conservateurs), les cosmétiques [62]...

Grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, les chitooligosaccharides peuvent trouver des applications dans le domaine de la conservation de produits alimentaires. Par exemple, l'ajout de 4g/L de chitooligosaccharides permet de conserver le jus de pomme à 37°C pendant 70 jours au lieu de 9 jours grâce à leur pouvoir bactériostatique [116]. Un brevet récent fait état d'une solution de chitooligosaccharides avec un degré d'acétylation de 0% et une masse molaire inférieure à 3 000 g.mol<sup>-1</sup> (DP < 18) utilisée sous forme de film de protection afin d'améliorer la conservation des filets de poisson [117]. Un mélange de chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 0% et des degrés de polymérisation variant de 1 à 8 permet d'améliorer la conservation du lait [118].

Les propriétés antimicrobiennes des chitooligosaccharides peuvent également être exploitées par l'industrie textile. Ainsi, deux chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 0% et des degrés de polymérisation respectifs de 3 et 10 ont été incorporés dans des tissus en coton [119, 120]. Après cinquante lavages, les tissus contenant 2.4% de chitooligosaccharides sont capables de maintenir une réduction des bactéries de 95% pour le DP 3 et de 100% pour le DP 10. De plus, ces tissus résistent plus longtemps à l'usure entraînée par les lavages.

Les chitooligosaccharides peuvent aussi intéresser les domaines pharmaceutique et biomédical. Des chitooligosaccharides de degrés de polymérisation variant de 1 à 30 sont par exemple additionnés à des gels ou des crèmes pour améliorer la vectorisation des médicaments [121]. L'utilisation de chitooligosaccharides dans des chewing-gum [122] ou des dentifrices [123] permettrait de limiter les caries grâce à leurs propriétés antimicrobiennes.

### 2.3. Conclusion sur l'intérêt des chitooligosaccharides

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer la bioactivité des chitooligosaccharides. Les résultats indiquent que ces composés possèdent de nombreuses activités biologiques telles que des activités antimicrobienne, antitumorale, élicitrice, antifongique, hypocholestérolémiante, antivirale ou antioxydante. Les chitooligosaccharides permettent également de réguler la pression artérielle ou d'accélérer l'absorption *in vivo* du calcium. Il semblerait que ces propriétés biologiques dépendent de la longueur de la chaîne oligosaccharide ou degré de polymérisation (DP) et soient optimales pour des DP variant de 5 à 8, ainsi que du nombre d'unités *N*-acétyl-*D*-glucosamine ou degré d'acétylation (DA). Même si la plupart des travaux mettent en évidence la variation de l'activité étudiée en fonction de ces deux paramètres structuraux, aucune loi de comportement n'a été déterminée. Un troisième paramètre pourrait également régir l'activité des chitooligosaccharides. Il s'agit de la distribution des deux unités constitutives *N*-acétyl-*D*-glucosamine et *D*-glucosamine le long de la chaîne oligomère. Mais aucune étude à ce jour n'a permis de montrer l'influence de ce dernier paramètre.

D'autre part, précisons que la plupart des travaux étudiant la bioactivité des chitooligosaccharides a principalement été menée avec des mélanges possédant aussi bien des degrés de polymérisation que des degrés d'acétylation moyens. Dans ces conditions, il est difficile de déterminer quelles sont les structures oligosaccharides réellement responsables de l'activité biologique. Afin de pallier cet inconvénient, il est primordial d'obtenir des chitooligosaccharides avec des structures parfaitement définies et caractérisées. Dans ce contexte, plusieurs méthodes de préparation de chitooligosaccharides ont été développées.

## 3. Préparation des chitooligosaccharides

Grâce aux propriétés variées et intéressantes des chitooligosaccharides ainsi que des nombreuses applications potentielles en découlant, le développement de méthodes efficaces pour leur préparation connaît un fort intérêt depuis quelques années. Deux stratégies d'obtention ont été développées : l'une par dégradation de la chitine et du chitosane, l'autre par synthèse selon des procédés chimiques ou enzymatiques.

### 3.1. Préparation par dégradation de la chitine et du chitosane

Plusieurs méthodes permettent de cliver les liaisons glycosidiques de la chitine et du chitosane, conduisant ainsi aux chitooligosaccharides. Cette voie a été la première explorée car la chitine est facilement accessible et abondante. Les méthodes de dégradation de la chitine et du chitosane font appel à des procédés chimiques ou enzymatiques. Quelques méthodes physiques ont également été reportées.

#### 3.1.1. Méthodes chimiques

##### 3.1.1.1. Hydrolyse acide

La méthode chimique « classique » permettant d'obtenir les oligomères de chitine et chitosane à partir du polymère est l'hydrolyse acide. En effet, comme tous les polysaccharides, le chitosane et la chitine peuvent être hydrolysés en raison de la liaison glycosidique présente dans la molécule. Cette liaison est relativement instable lorsqu'elle est mise en présence d'un agent hydrolysant, comme par exemple les solutions acides. Les liaisons glycosidiques sont clivées durant l'hydrolyse, conduisant à une diminution des masses molaires. Le mécanisme d'hydrolyse décrit dans le schéma 2 fait intervenir dans une première étape la protonation de l'atome d'oxygène de la liaison glycosidique. L'étape limitante de ce mécanisme correspond à la rupture de la liaison entre l'atome d'oxygène exocyclique et le carbone anomère. La structure résultante est un ion

oxocarbénium cyclique, qui réagit ensuite avec une molécule d'eau pour former le sucre réducteur.

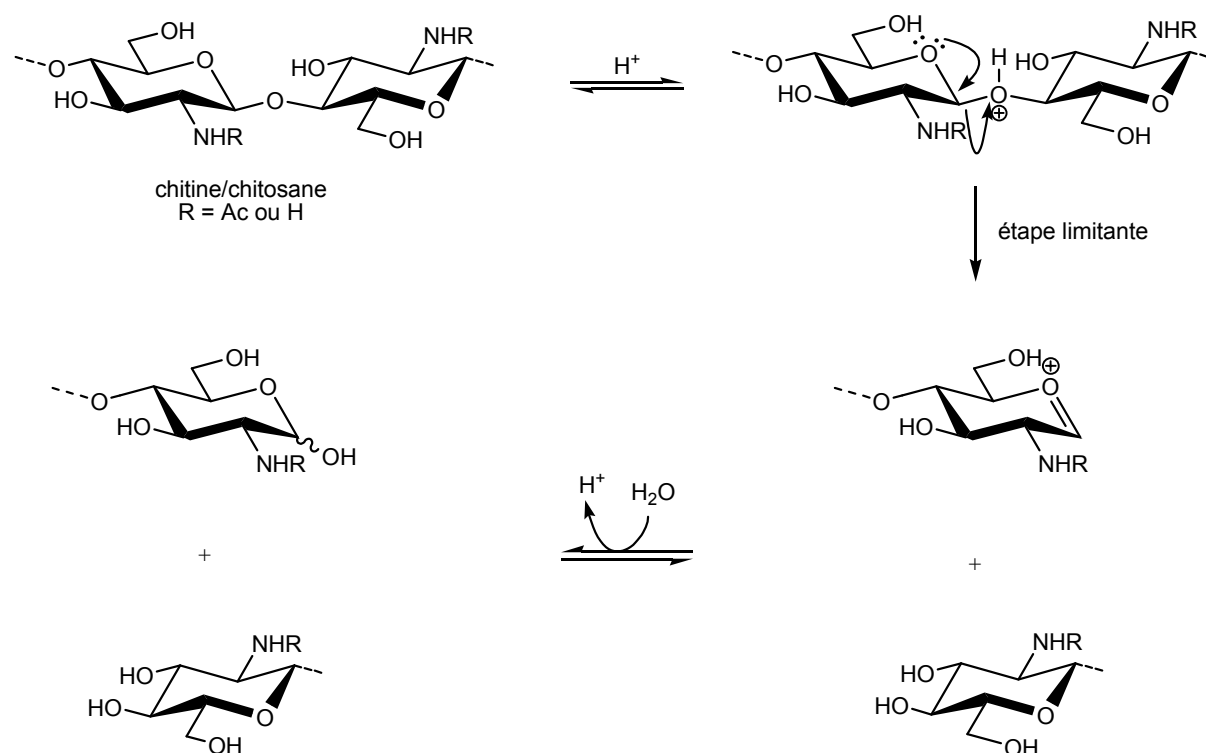


Schéma 2 : hydrolyse acide de la chitine et du chitosane [124]

Le chitosane étant soluble dans les acides dilués, à l'exception de l'acide sulfurique, cette réaction a lieu en milieu homogène. En revanche, l'hydrolyse acide de la chitine se produit dans des conditions hétérogènes puisque cette dernière n'est pas soluble en milieu aqueux.

La première préparation d'oligomères de chitosane a été effectuée par S. Horowitz et al. en 1957 [125]. Au cours de cette étude, les auteurs ont mis en évidence que le temps de l'hydrolyse est déterminant quant à la taille des chitooligosaccharides formés. En effet, un chitosane possédant un degré d'acétylation de 0% a été hydrolysé par réaction avec de l'acide chlorhydrique 4 N à 53°C pendant 48 h pour obtenir des oligomères de D-glucosamine avec des degrés de polymérisation variant de 1 à 6, les DP 1 et 2 étant majoritaires. Après 72 h d'hydrolyse, seul le monosaccharide D-glucosamine est isolé. En revanche, si l'hydrolyse ne dure que 24 h, un mélange de chitooligosaccharides constitué essentiellement de degrés de polymérisation variant de 4 à 6 est récupéré.

Outre le temps de réaction, l'efficacité de l'hydrolyse dépend également de la concentration en acide, de la température ou du degré d'acétylation du chitosane. Domard et Cartier [126] ont par exemple montré que les oligomères de D-glucosamine de degrés de polymérisation jusqu'à 40 peuvent facilement être obtenus par hydrolyse d'un chitosane totalement désacétylé dans l'acide chlorhydrique 12 M à 72 °C pendant 90 minutes, puis séparés par chromatographie d'exclusion stérique avec une solution tampon acide acétique/acétate d'ammonium comme éluant.

L'hydrolyse acide de la chitine et du chitosane par HCl est une méthode simple à mettre en œuvre puisque seule l'action de l'acide chlorhydrique permet d'obtenir les chitooligosaccharides. Il s'agit d'un procédé peu coûteux mais il faut prendre en compte le fait que le processus de séparation demande beaucoup de temps et ne conduit qu'à un faible rendement en chitooligosaccharides. De plus, les conditions réactionnelles sont dures et risquent d'entraîner une modification chimique du cycle glucosidique. Un autre inconvénient est que cette méthode conduit soit à une dépolymérisation complète, soit à une large polydispersité. Afin de pallier ces problèmes, d'autres méthodes de préparation ont été étudiées et d'autres acides ont été utilisés pour hydrolyser le chitosane comme les acides phosphorique [127], trichloroacétique [128], formique [129] ou lactique [130]. La dépolymérisation de la chitine et du chitosane a également été effectuée par acétolyse, fluorohydrolyse et désamination nitreuse.

### 3.1.1.2. Acétolyse

T. Inaba et al. [131] ont utilisé la chitine comme produit de départ pour une acétolyse. La liaison glycosidique est clivée par l'action de l'anhydride acétique dans l'acide sulfurique pour conduire à la formation de *N*-acétylchitooligosaccharides peracétylés (schéma 3) avec de bons rendements et une forte reproductibilité.

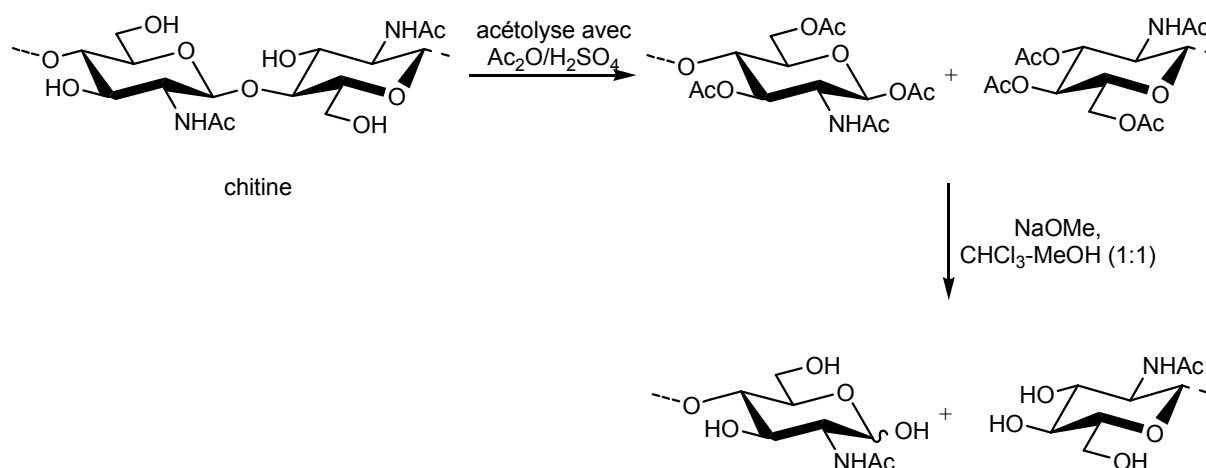


Schéma 3 : acétolyse de la chitine [131]

Les auteurs ont étudié l'influence du temps de réaction à  $55^\circ\text{C}$  sur le rendement d'acétolyse de la chitine et ont observé les meilleurs résultats après trois heures d'acétolyse. Ils ont obtenu un mélange de chitooligosaccharides peracétylés qu'ils ont ensuite séparés sur une colonne chromatographique Sephadex LH-20. Après la O-désacétylation effectuée en présence de méthanolate de sodium dans un mélange chloroforme-méthanol, les rendements des chitooligosaccharides de degrés de polymérisation 2, 3 et 4 sont respectivement 6.1, 5.4 et 3.7%.

### 3.1.1.3. Fluorohydrolyse

J. Defaye et coll. [132] ont remarqué que la fluorohydrolyse de la chitine dans l'acide fluorhydrique anhydre conduisait à la formation de chitooligosaccharides (schéma 4a) avec un rendement quasi quantitatif. Les conditions réactionnelles (temps, température) peuvent aisément être modifiées afin d'optimiser la préparation de chitooligosaccharides spécifiques contenant de 2 à 9 résidus. De plus, la chitine étant soluble dans l'acide fluorhydrique, la fluorohydrolyse s'effectue dans des conditions homogènes.

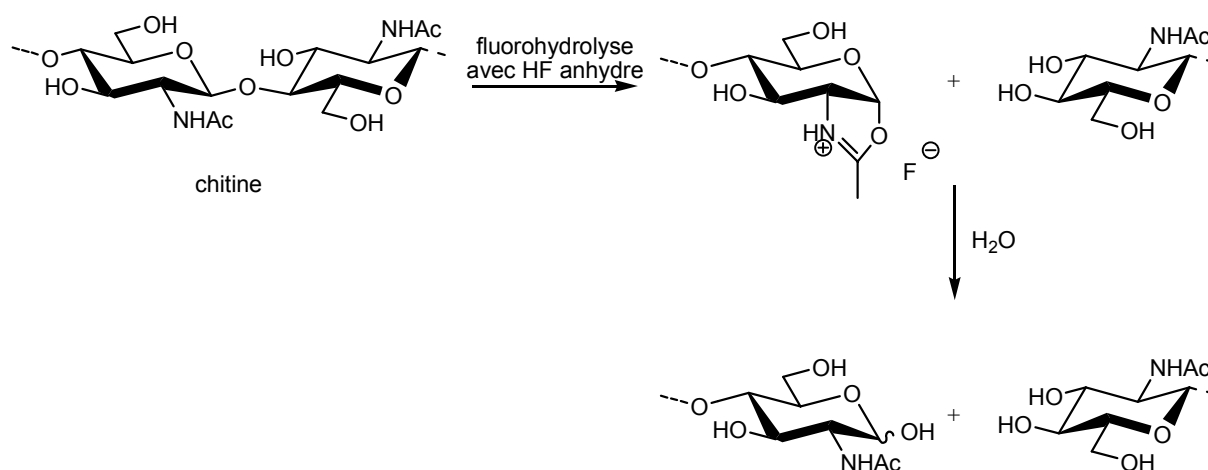


Schéma 4a : fluorohydrolyse de la chitine [132]

Après une demi-heure de réaction à 20°C, la chitine n'est pas hydrolysée alors qu'après une heure, elle est partiellement clivée. En revanche, 24 h de réaction conduisent à un clivage complet. Après 4 h de fluorohydrolyse, le produit prépondérant est le dimère GlcNAc-GlcNAc. Par cette méthode, un mélange de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation variant de 2 à 10 et avec un degré d'acétylation de 100% (puisque la chitine de départ est totalement acétylée) est obtenu. Ce mélange est ensuite séparé sur une colonne préparative Bio-Gel P-4 pour conduire aux chitooligosaccharides avec des rendements de 37% (DP 2), 23% (DP 3), 10% (DP 4), 5% (DP 5), 4.6% (DP 6), 3% (DP 7), 2.2% (DP 8), 1.6% (DP 9) et 1% (DP 10).

La même équipe a ensuite hydrolysé le chitosane dans les mêmes conditions que celles décrites pour la chitine [133]. La dissolution du chitosane dans l'acide fluorhydrique est plus lente, mais la réaction est néanmoins effectuée en milieu homogène. La fluorohydrolyse du chitosane conduit aux chitooligosaccharides possédant un fluorure de configuration  $\alpha$  en position anomère de l'extrémité réductrice. Les produits sont isolés par précipitation à l'éther puis l'action de l'acide perchlorique à 60°C permet la formation des chitooligosaccharides avec un hydroxyle en position anomère (schéma 4b).

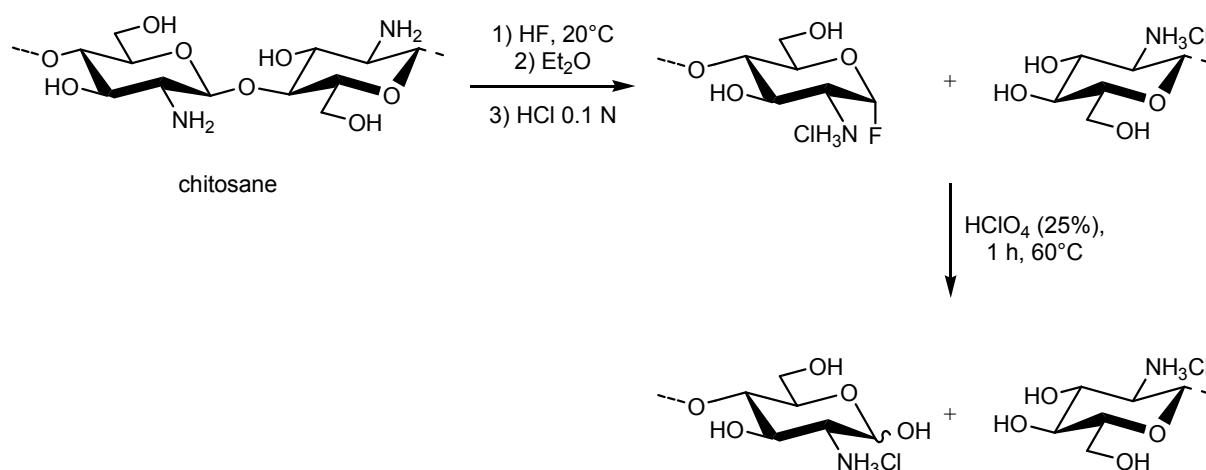


Schéma 4b : fluorohydrolyse du chitosane [133]

Contrairement au mécanisme décrit dans le schéma 4a pour la fluorohydrolyse de la chitine, dans le cas du chitosane, un fluorure est formé en position anomère. Les auteurs ont montré que ces composés sont plus stables que les dérivés 2-acétamido-2-désoxy [134]. En effet, lorsque ces derniers sont placés dans de l'eau bouillante, une hydrolyse a lieu, contrairement au cas des dérivés 2-amino-2-désoxy.

Le mélange de chitooligosaccharides obtenu après la fluorohydrolyse du chitosane est séparé sur une colonne chromatographique Bio-Gel P-4 et les rendements sont de 3.0% (DP 2), 9.9% (DP 3), 14.3% (DP 4), 15.9% (DP5), 15.4% (DP 6), 12.0% (DP 7), 8.8% (DP 8), 4.7% (DP 9), 3.0% (DP 10) et 1.0% (DP 11).

#### 3.1.1.4. Désamination nitreuse

Plusieurs équipes ont étudié la formation de chitooligosaccharides par désamination nitreuse du chitosane [135-147]. La dépolymérisation du chitosane par l'acide nitreux HONO est une réaction homogène où le nombre de liaisons glycosidiques clivées est stœchiométrique par rapport à la quantité d'acide nitreux utilisée [142]. Concernant le mécanisme de réaction, un ion diazonium est tout d'abord formé sur une unité D-glucosamine puis se décompose pour conduire à un carbocation. Ce dernier subit une addition nucléophile de l'oxygène endocyclique, conduisant à une structure 2,5-anhydro-D-mannose comme nouvelle extrémité de chaîne (schéma 5).

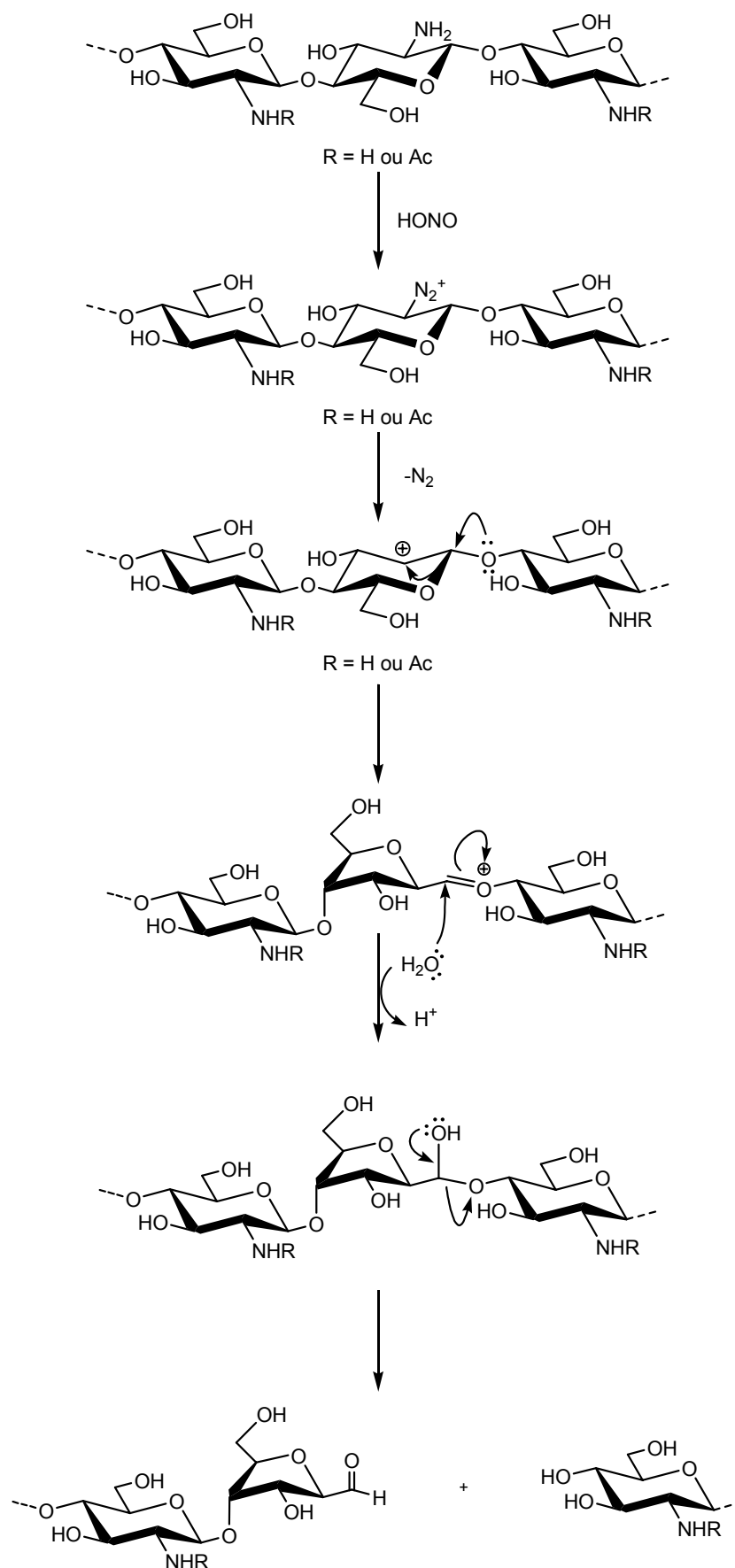


Schéma 5 : désamination nitreuse de la chitine et du chitosane [1]

Cette réaction est généralement très rapide même dans des conditions douces, à température ambiante [137, 143]. De plus, le chitosane étant soluble dans les acides dilués, la réaction avec l'acide nitreux est homogène.

G.-G. Allan et al. [136, 144] ont montré que cette méthode permet d'obtenir une taille précise en jouant sur la quantité d'acide nitreux. Ils ont étudié la cinétique de dépolymérisation en utilisant des chitosanes de différents degrés d'acétylation qu'ils ont fait réagir avec l'acide nitreux à différentes concentrations et à différentes températures. Le taux de dépolymérisation ne dépend pas de la masse molaire du chitosane de départ. Il s'agit d'une cinétique du premier ordre qui est fonction des concentrations en acide nitreux et unités D-glucosamine et dont l'équation est la suivante :

$$R_c = k_0[\text{GlcNH}_3^+][\text{HONO}]$$

où  $R_c$  représente le taux de réaction et  $k_0$  la constante de dépolymérisation.

Les auteurs ont établi une relation permettant d'obtenir une masse molaire du chitosane définie en fonction de la quantité d'acide nitreux :

$$1/M_2 - 1/M_1 = n_c/m_1$$

où  $M_2$  est la masse molaire du chitosane après dépolymérisation,  $M_1$  celle du chitosane avant dépolymérisation,  $m_1$  est la masse de chitosane de masse molaire  $M_1$  mise en jeu et  $n_c$  est le nombre de moles d'acide nitreux utilisé pour cliver la chaîne polymère. Cette méthode, très intéressante par son aspect quantitatif, nécessite toutefois la présence d'au moins un résidu D-glucosamine pour se produire et n'a pas lieu entre des résidus N-acétyl-D-glucosamine. D'autre part, une des extrémités de chaîne ainsi produites est modifiée chimiquement, ce qui peut s'avérer particulièrement gênant pour certaines applications.

Les chitooligosaccharides ont été préparés à partir de la chitine et du chitosane par hydrolyse chimique en utilisant différents acides. Une autre méthode de dégradation a été envisagée : l'hydrolyse enzymatique.

### 3.1.2. Hydrolyse enzymatique

La structure des liaisons glycosidiques joue un rôle important lors de l'hydrolyse enzymatique. En effet, la chitine et le chitosane possèdent quatre types de liaisons glycosidiques :

- 1 liaison entre deux unités acétylées (A-A)
- 1 liaison entre une unité acétylée et une unité désacétylée (A-D)
- 1 liaison entre une unité désacétylée et une unité acétylée (D-A)
- 1 liaison entre deux unités désacétylées (D-D)

Selon leur spécificité, les enzymes cliveront sélectivement un type de liaison glycosidique. Les chitinases clivent la liaison glycosidique entre deux unités *N*-acétyl-D-glucosamine tandis que les chitosanases clivent la liaison glycosidique entre deux unités D-glucosamine.

#### 3.1.2.1. Hydrolyse enzymatique par les chitinases

Les chitinases clivent les liaisons glycosidiques de type A-A. Elles sont présentes dans les bactéries, les champignons, les plantes et les insectes mais sont absentes chez la plupart des mammifères à l'exception des vaches, des chèvres et des moutons [148].

La plupart des chitinases isolées de bactéries sont utilisées pour obtenir des chitooligosaccharides *N*-acétylés avec un degré de polymérisation supérieur à deux. Quant aux *N*-acétylchitooligosaccharides ainsi produits, ils peuvent être hydrolysés par la  $\beta$ -*N*-acétylglucosaminidase pour conduire à la formation du monosaccharide *N*-acétyl-D-glucosamine [62].

Les chitinases ont été utilisées aux cours de plusieurs travaux afin d'obtenir des chitooligosaccharides par hydrolyse enzymatique [149-154]. Y. Takiguchi et al. [152] ont décrit la production du dimère (GlcNAc)<sub>2</sub> suite à l'hydrolyse de la chitine par des chitinases. La chitinase de *Vibrio anguillarum* E-383a permet l'accumulation de 16.6 g.L<sup>-1</sup> de (GlcNAc)<sub>2</sub> après 16 jours de culture. En tenant compte de la quantité initiale de chitine, le rendement est de 53%. Cette méthode nécessitant un temps de culture important, une autre chitinase, *Bacillus licheniformis* a été utilisée et permet d'obtenir 9.6 g.L<sup>-1</sup> de (GlcNAc)<sub>2</sub> après 5 jours de culture avec un rendement de 46% [150].

Le chitooligosaccharide obtenu de façon prédominante lors de l'hydrolyse d'un chitosane possédant un degré d'acétylation de 25% par la chitinase de *Streptomyces griseus* est le chitotrisaccharide GlcN-GlcNAc-GlcNAc (rendement de 21%) [149].

M. Mitsutomi et al. [153] ont isolé la chitinase de *Bacillus circulans* hydrolysant spécifiquement les liaisons *N*-acétyl- $\beta$ -D-glucosamine dans un chitosane de degré d'acétylation de 50% pour former des hétéro-chitooligosaccharides de degrés de polymérisation 2 et 3 majoritairement et portant une unité GlcNAc sur la partie réductrice.

### 3.1.2.2. Hydrolyse enzymatique par les chitosanases

Les chitosanases clivent les liaisons glycosidiques de type D-D. Elles se trouvent dans les bactéries, les champignons et les plantes [155], tout comme les chitinases. Elles peuvent toutes deux dégrader des chitosanes de différents degrés d'acétylation [156-158]. Cependant, les chitinases clivant spécifiquement les liaisons glycosidiques de type A-A, elles attaquent préférentiellement les chitines et chitosanes de haut degré d'acétylation. Les chitosanases clivant les liaisons glycosidiques de type D-D sont plus efficaces sur des chitosanes ayant un faible degré d'acétylation [156, 159-163]. Les chitosanases se distinguent également des chitinases par leur plus petite masse molaire [164]. Elles peuvent être divisées en deux catégories (de types exo et endo) en fonction de leur mode d'action lors de l'hydrolyse enzymatique. Les exo-chitosanases vont libérer des résidus D-glucosamine à partir de l'extrémité non réductrice du chitosane et de ses oligomères. Quant aux endo-chitosanases, elles vont fournir un mélange de chitooligosaccharides contenant principalement des dimères et trimères.

R.-L. Monaghan et al. [165] ont été les premiers à reporter l'existence d'une chitosanase hydrolysant le chitosane mais ne permettant pas de cliver les liaisons glycosidiques d'une chitine possédant un degré d'acétylation de 100%. Depuis, les chitosanases ont été souvent utilisées pour préparer des chitooligosaccharides par hydrolyse enzymatique du chitosane [155, 160, 166-172].

Elles n'ont pas le même mode d'action hydrolytique en fonction du degré d'acétylation du substrat [155, 167, 171]. Les chitosanases de *Bacillus sp* ont besoin d'un chitosane très désacétylé [172] tandis que celles de *Bacillus circulans*,

*Bacillus licheniformis* et *Fusarium solani* sont plus actives avec des chitosanes de degré d'acétylation respectifs de 20% [168], 25-35% [169] et 70% [171].

Bien que de nombreuses chitinases et chitosanases provenant de microorganismes aient été développées, elles sont encore trop chères pour être utilisées industriellement. C'est pourquoi d'autres enzymes ont été étudiées pour une utilisation à plus faible coût.

### 3.1.2.3. Hydrolyse enzymatique par les lysozymes

Comme les chitinases, les lysozymes peuvent dégrader la liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre les unités *N*-acétyl-D-glucosamine pour produire des chitooligosaccharides partiellement désacétylés. Ils clivent spécifiquement les liaisons glycosidiques de type A-A [124, 173]. L'action hydrolytique d'un lysozyme est différente selon sa provenance. Un lysozyme d'origine humaine est par exemple plus efficace pour cliver la liaison glycosidique dans le pentasaccharide (GlcNAc)<sub>5</sub> qu'un lysozyme provenant du blanc d'œuf de poule [174]. S. Hirano et al. [175] ont établi que le taux de dégradation est maximal lorsque le chitosane de départ possède un degré d'acétylation de 80%.

L'utilisation d'un lysozyme est une alternative à l'emploi des chitinases. L'activité hydrolytique d'autres enzymes comme les glycanases, protéases, lipases ou tannases a également été étudiée.

### 3.1.2.4. Hydrolyse enzymatique par d'autres enzymes

D. Pantaleone et al. [176, 177] ont étudié l'activité de dix glycanases, vingt-et-une protéases, cinq lipases et une tannase provenant de bactéries, champignons, plantes ou mammifères. Parmi les glycanases, plusieurs cellulases comme l'amylase, la dextranase, l'hémicellulase et la pectinase hydrolysent le chitosane à température ambiante. Deux glycanases (cellulase TV et hémicellulase), une lipase (lipase AIE) et une protéase (papaïne) ont même montré une activité hydrolytique supérieure à la chitinase de *Serratia marcescens*. L'efficacité des glycanases a été confirmée par E. Muraki et al. [178] qui ont préparé plusieurs milligrammes de

chitooligosaccharides possédant un degré de polymérisation variant de 6 à 8 en utilisant la cellulase de *Trichoderma viride*.

J. Li et al. [179] ont hydrolysé un chitosane possédant un degré d'acétylation de 8.3% par une protéase isolée de *Bacillus subtilis* à 50°C et à un pH de 5.4 pour obtenir un mélange de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation de 3 à 8 et de degrés d'acétylation variables.

H. Lin et al. [180] ont utilisé la protéase papaine pour hydrolyser un chitosane possédant un degré d'acétylation de 50%. Après 24 h de réaction à 45°C, des chitooligosaccharides de masses molaires inférieures à 10 000 g.mol<sup>-1</sup> (< DP 55) ont été obtenus avec un rendement de 50%. Un mélange de chitooligosaccharides de masses molaires comprises entre 600 et 2 000 g.mol<sup>-1</sup> (DP 3 à 11) a également été isolé avec un rendement de 11%.

C. Qin et al. [88] ont préparé trois mélanges de chitooligosaccharides à partir d'un chitosane de masse molaire 1230 kg.mol<sup>-1</sup> possédant un degré d'acétylation de 20% par l'action hydrolytique d'une hémicellulase. La première fraction de chitooligosaccharides correspond à un degré de polymérisation moyen de 106 et un degré d'acétylation de 86.0%. Le rendement obtenu est de 12.2%. La deuxième fraction obtenue avec un rendement de 6.8% contient des chitooligosaccharides de degré de polymérisation 58 avec un degré d'acétylation de 71.5%. Enfin, la troisième fraction obtenue avec un rendement de 81.0% est constituée de chitooligosaccharides de degré de polymérisation moyen 8 possédant un degré d'acétylation de 60%.

Le schéma 6 récapitule les différentes enzymes permettant d'hydrolyser la chitine et le chitosane pour obtenir des chitooligosaccharides de différents degrés de polymérisation et d'acétylation.

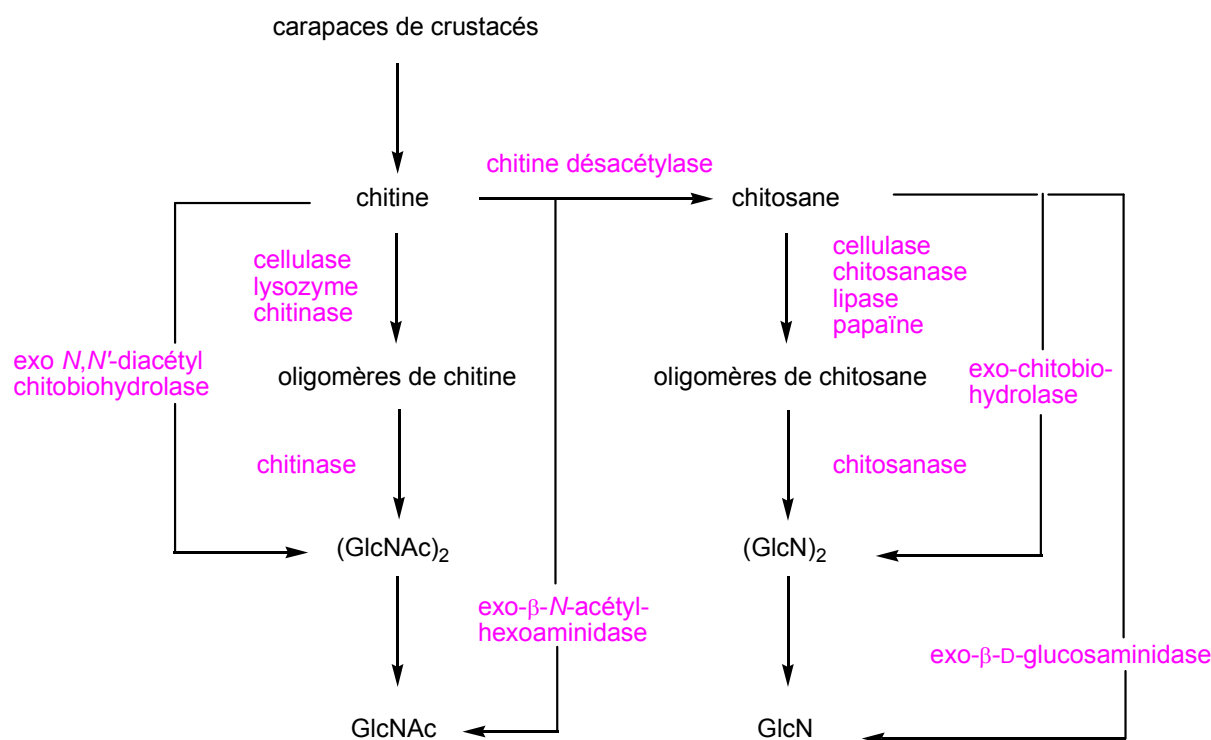


Schéma 6 : hydrolyse enzymatique de la chitine et du chitosane [62]

Cette voie permet un clivage spécifique dans des conditions douces. Mais après l'hydrolyse, le chitooligosaccharide est à son tour dégradé par l'enzyme. Cette méthode n'est donc pas la plus appropriée pour obtenir des chitooligosaccharides de degrés de polymérisation supérieurs à 4 [181].

D'autres méthodes, par voie physique, ont été développées pour préparer des chitooligosaccharides par dégradation de la chitine et du chitosane : il s'agit principalement de l'irradiation gamma et la sonication.

### 3.1.3. Irradiation gamma

Afin de pallier les problèmes rencontrés lors des dégradations de la chitine et du chitosane par voies chimique et enzymatique, des méthodes physiques comme l'irradiation gamma [182] ont été développées. Le chitosane sous forme de poudre est irradié par une source gamma de  $\text{Co}^{60}$  avec des doses variant de 10 à 500 kGy. Des essais sur des chitosanes possédant respectivement des degrés d'acétylation de 1 et 10% ont mis en évidence que selon la dose de radiation il est possible de produire des chitooligosaccharides de masse molaire contrôlée, selon l'équation de

Charlesby-Pinner [183] :

$$(1/Mn - 1/Mn_0) = Gd \times 1.04 \times 10^{-7} \times D$$

où Mn est la masse molaire moyenne du chitosane après absorption d'une dose d'irradiation D, Mn<sub>0</sub> est la masse molaire moyenne du chitosane de départ et Gd est le taux de dépolymérisation. En revanche cette méthode ne permet pas de contrôler le degré d'acétylation des chitooligosaccharides obtenus.

W.-S. Choi et al. [184] ont obtenu des chitooligosaccharides de degrés de polymérisation variant de 2 à 6 à partir d'un chitosane possédant un degré d'acétylation de 0% irradié par des rayons gamma Co<sup>60</sup> avec des doses de 2 à 200 kGy. D'un point de vue pratique, une dose d'irradiation de 100 kGy est suffisante pour dégrader le chitosane et obtenir les chitooligosaccharides de degrés de polymérisation variant de 2 à 4 avec les meilleurs rendements.

### 3.1.4. Sonication

La sonication, une autre méthode physique, permet d'obtenir des chitooligosaccharides par dégradation du polymère. Cette technique dégrade le chitosane en apportant l'énergie nécessaire pour rompre les liaisons glycosidiques. Le taux de dégradation est irrégulier au cours du traitement ultrasonique. La masse molaire limite des chitooligosaccharides obtenus par cette méthode dépend du degré d'acétylation, de la masse molaire du chitosane de départ et des paramètres environnementaux comme la puissance de l'onde ultrasonique, la température de la solution, le pH ou la force ionique [185].

R.-H. Chen et al. [185] ont étudié le traitement ultrasonique à 220 watts pendant des durées variant de 1 h 30 à 48 heures à 60°C sur des solutions de chitosane à 1% dans un mélange acide acétique 0.2 M/acétate de sodium 0.1 M. Ils ont observé que la masse molaire d'un chitosane possédant un degré d'acétylation de 37% diminue rapidement après 1 h 30 de réaction (de 650 000 à 160 000 g.mol<sup>-1</sup>) puis la réaction ralentit jusqu'à atteindre une masse molaire limite (120 000 g.mol<sup>-1</sup>). En revanche, le même traitement sur un chitosane possédant un degré d'acétylation de 26% et une masse molaire de 410 000 g.mol<sup>-1</sup> entraîne une faible diminution de la masse molaire pendant les douze premières heures (310 000 g.mol<sup>-1</sup>) puis cette dernière chute à 100 000 g.mol<sup>-1</sup> au cours des douze heures suivantes. Les auteurs ont également remarqué que la polydispersité du chitosane diminue

progressivement au cours de la sonication. Cette valeur passe de 6.5 à 2.7 après 48 h de sonication du chitosane de DA 37% et de 4.8 à 2.5 dans le cas du chitosane de DA 26%.

Plusieurs voies ont donc été développées afin de préparer des chitooligosaccharides par dégradation de la chitine ou du chitosane. Ces techniques font appel à des méthodes chimiques, enzymatiques ou physiques. Néanmoins, aucune d'entre elles ne permet de contrôler la dimension, et encore moins l'architecture, des chitooligosaccharides produits. Une autre alternative à la préparation des chitooligosaccharides a été envisagée : la synthèse. Deux cas sont à distinguer : la synthèse enzymatique et la synthèse chimique.

### 3.2. Synthèse enzymatique

Les lipochitooligosaccharides, aussi appelés facteurs de nodulation ou facteurs Nod, sont des molécules sécrétées par les rhizobia, des bactéries du sol qui permettent aux légumineuses de fixer l'azote [186, 187]. Ces composés sont constitués d'un squelette chitooligosaccharide contenant de trois à cinq unités GlcNAc et dont l'extrémité non réductrice est reliée à une chaîne lipidique mono- ou polyinsaturée [188]. Aux deux terminaisons de la chaîne oligosaccharide, différents substituants comme des groupements acétyle, sulfatyle, carbamoyle ou fucosyle peuvent être présents (schéma 7).

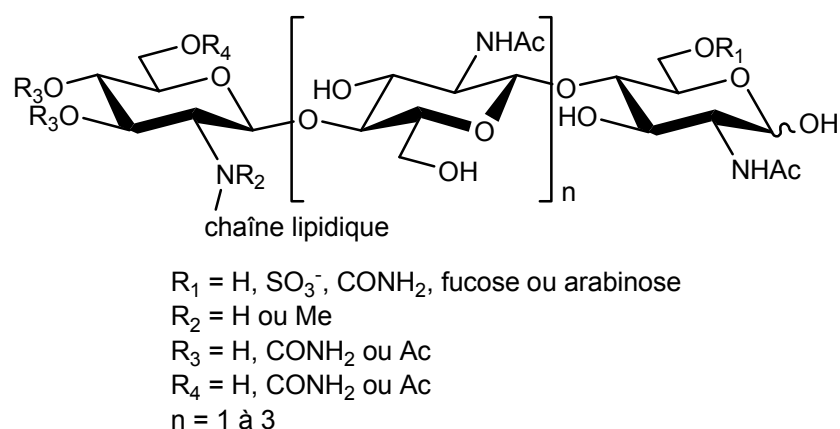


Schéma 7 : structure des lipochitooligosaccharides [189]

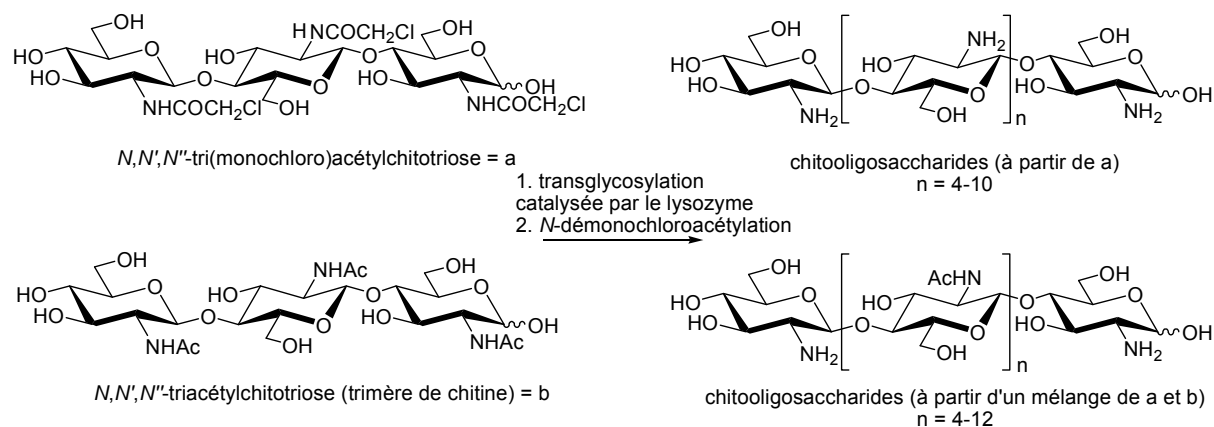
Les études menées sur la bioactivité des lipochitooligosaccharides naturels sont limitées par la faible quantité produite ainsi que par la difficulté d'isoler des produits purs. Plusieurs équipes ont donc cherché à synthétiser ces composés en préparant tout d'abord le squelette chitooligosaccharide, notamment par synthèse enzymatique [190-197]. N. Grenouillat et al. [192] ont obtenu le chitotétrasaccharide portant un groupement sulfate en position 6 de l'unité réductrice en cultivant la souche *Escherichia coli* exprimant les gènes nodBC (codant pour une chitooligosaccharide synthase et une chitooligosaccharide *N*-désacétylase) et nodH (codant pour une chitooligosaccharide sulfotransférase), en utilisant le glycérol comme source de carbone. La même souche permet à G.-L. Huang et al. [193] d'obtenir le chitopentasaccharide portant un groupement allyle en position anomère avec un rendement de 65%. E. Samain et al. [194] ont produit le penta-*N*-acétyl-chitopentaose et le tétra-*N*-acétyl-chitopentaose avec des rendements de 2.5 g/L en cultivant des cellules d'*Escherichia coli* exprimant les gènes *nodC* ou *nodB* codant respectivement pour une chitooligosaccharide synthase et une chitooligosaccharide *N*-désacétylase. Puis les dérivés sulfatés et *O*-acétylés ont été préparés en utilisant une souche *Escherichia coli* exprimant les gènes *nodC* ou *nodBC* ainsi que les gènes *nodH* ou *nodL* codant pour une chitooligosaccharide sulfotransférase et une chitooligosaccharide *O*-acétyltransférase [195].

D'autres synthèses enzymatiques ont été développées afin d'obtenir des chitooligosaccharides. K. Tokuyasu et al. [198] ont ainsi préparé des chitooligosaccharides partiellement désacétylés en utilisant une chitine désacétylase provenant de *Colletotrichum lindemuthianum*. Cette enzyme acétyle sélectivement le résidu D-glucosamine à l'extrémité non réductrice du dimère GlcN-GlcN pour donner exclusivement GlcNAc-GlcN. Avec la même enzyme, ils ont également synthétisé le dimère GlcN-GlcNAc à partir de (GlcNAc)<sub>2</sub>.

Une autre alternative consiste à allier deux techniques de synthèse : chimique et enzymatique. Par cette voie, il est par exemple possible de synthétiser les hexa- et heptamères (GlcNAc)<sub>6</sub> et (GlcNAc)<sub>7</sub> à partir des tétra- et pentamères (GlcNAc)<sub>4</sub> et (GlcNAc)<sub>5</sub> en exploitant l'activité transférase d'une chitinase isolée de *Nocardia orientalis* IFO 12806 [199].

La chitinase et le lysozyme possèdent tous deux une activité de transglycosylation.

K. Akiyama et al. [99] ont synthétisé des chitooligosaccharides en utilisant une réaction de transglycosylation catalysée par un lysozyme de blanc d'œuf de poule (schéma 8). Ils ont choisi le *N,N',N''*-tri(monochloro)acétylchitotriose et le *N,N',N''*-triacétylchitotriose comme substrats de départ.



*Schéma 8 : synthèse chemo-enzymatique de chitooligosaccharides [99]*

L'action du lysozyme provenant du blanc d'œuf de poule sur le *N,N',N''*-tri(monochloro)acétylchitotriose conduit à un mélange de chitooligosaccharides désacétylés de degrés de polymérisation variant de 4 à 10 avec un rendement de 33.2%.

Un mélange de *N,N',N''*-tri(monochloro)acétylchitotriose et *N,N',N''*-triacétylchitotriose réagit dans les mêmes conditions et permet aux auteurs d'obtenir un mélange de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation compris entre 4 et 12 avec des degrés d'acétylation de 23 à 76% selon la proportion de chacun des deux produits de départ. Ces chitooligosaccharides sont obtenus avec un rendement de 21.3%.

Les chitooligosaccharides ont été préparés par synthèse enzymatique. Cette voie permet le contrôle des paramètres structuraux, mais au prix de nombreux efforts concernant l'isolation et la purification des enzymes. De plus, les rendements obtenus sont faibles. Afin d'éviter le travail important sur les enzymes, des synthèses chimiques de chitooligosaccharides ont été étudiées.

### 3.3. Synthèse chimique

La synthèse chimique est une autre méthode qui a été utilisée pour préparer des chitooligosaccharides. Plusieurs squelettes de lipochitooligosaccharides ont par exemple été obtenus par cette voie [189, 200-206]. J.-S. Debenham et al. [189] ont effectué une synthèse stéréocontrôlée du facteur NodRf-III (C18:1, MeFuc) décrite dans le schéma 9 en utilisant la D-glucosamine comme produit de départ. Après une synthèse multi-étapes, les auteurs obtiennent le 3,4-Di-O-acétyl-6-O-benzyl-2-désoxy-1-O-pentényl-2-tétrachlorophthaloyl-β-D-glucopyranoside et le 3-O-Acétyl-6-O-benzyl-2-désoxy-1-O-(4,5-dibromopentanyl)-2-phthaloyl-β-D-glucopyranoside.

Une réaction de couplage entre ces deux composés conduit à un disaccharide avec un rendement de 71%. La position anomère de ce dernier est ensuite convertie en groupe O-pentényle avec un rendement de 93% afin de pouvoir mettre en œuvre une nouvelle réaction de couplage. Un intermédiaire tétrasaccharide est obtenu avec un rendement de 65% puis un protocole multi-étapes incluant des réactions de déprotection ainsi que l'introduction d'une chaîne lipidique conduit au facteur NodRf-III (C18:1, MeFuc).

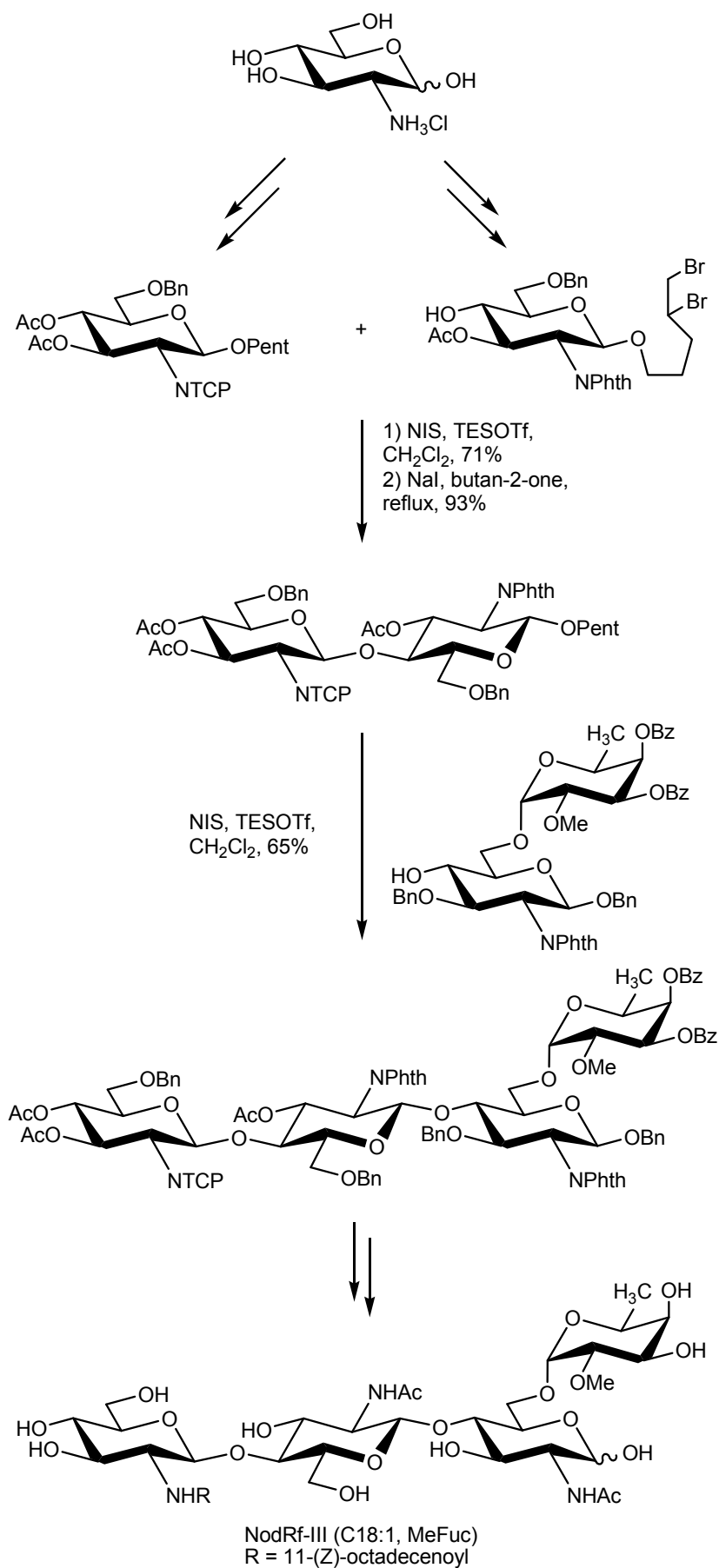


Schéma 9 : synthèse du facteur NodRf-III (C18:1, MeFuc) [189]

K.-C. Nicolaou et al. [204] ont synthétisé le facteur NodRm-IV selon le mode opératoire décrit dans le schéma 10 à partir de trois blocs constructifs. Ces derniers sont constitués d'une unité D-glucosamine dont la fonction amine est protégée par un groupement phthaloyle, tandis que les fonctions hydroxyle sont protégées par des groupes 4-méthoxybenzyle (PMB), 4-méthoxyphényle (MP), TBDMS (*t*-BuMe<sub>2</sub>Si), TBDPS (*t*-BuPh<sub>2</sub>Si) et acétyle. Un protocole multi-étapes faisant intervenir trois réactions de couplage conduit au squelette chitotétrasaccharide sous forme protégée. La fonction amine de l'extrémité non réductrice est ensuite sélectivement déprotégée pour pouvoir réagir avec la chaîne de l'acide gras et conduire au facteur NodRm-IV.

Le même facteur NodRm-IV a également été préparé par S. Ikeshita et al. [200] par synthèse chimique à partir de deux intermédiaires monosaccharide et un intermédiaire disaccharide (schéma 11). Ces trois composés sont synthétisés en plusieurs étapes à partir de la D-glucosamine. Les fonctions amine sont protégées par un groupement *N*-phthaloyle et les groupes protecteurs des hydroxyles sont des fonctions acétyle, benzyle et 4-méthoxyphényle. Deux réactions de couplage conduisent au squelette chitotétrasaccharide, puis un protocole multi-étapes de déprotection suivi de la réaction avec un acide gras permet aux auteurs d'obtenir le facteur NodRm-IV sous forme déprotégée.

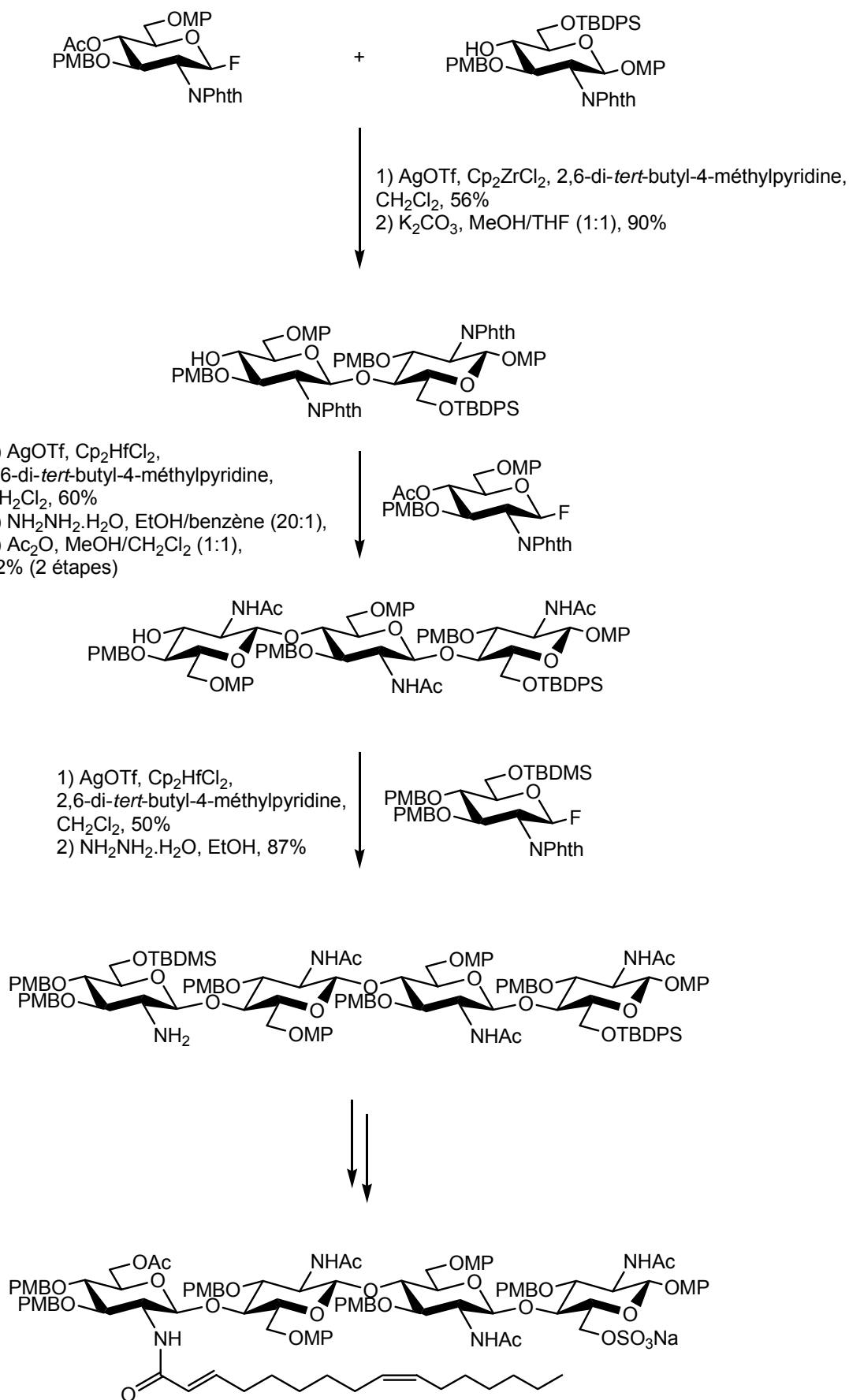


Schéma 10 : Synthèse du facteur NodRm-IV [204]

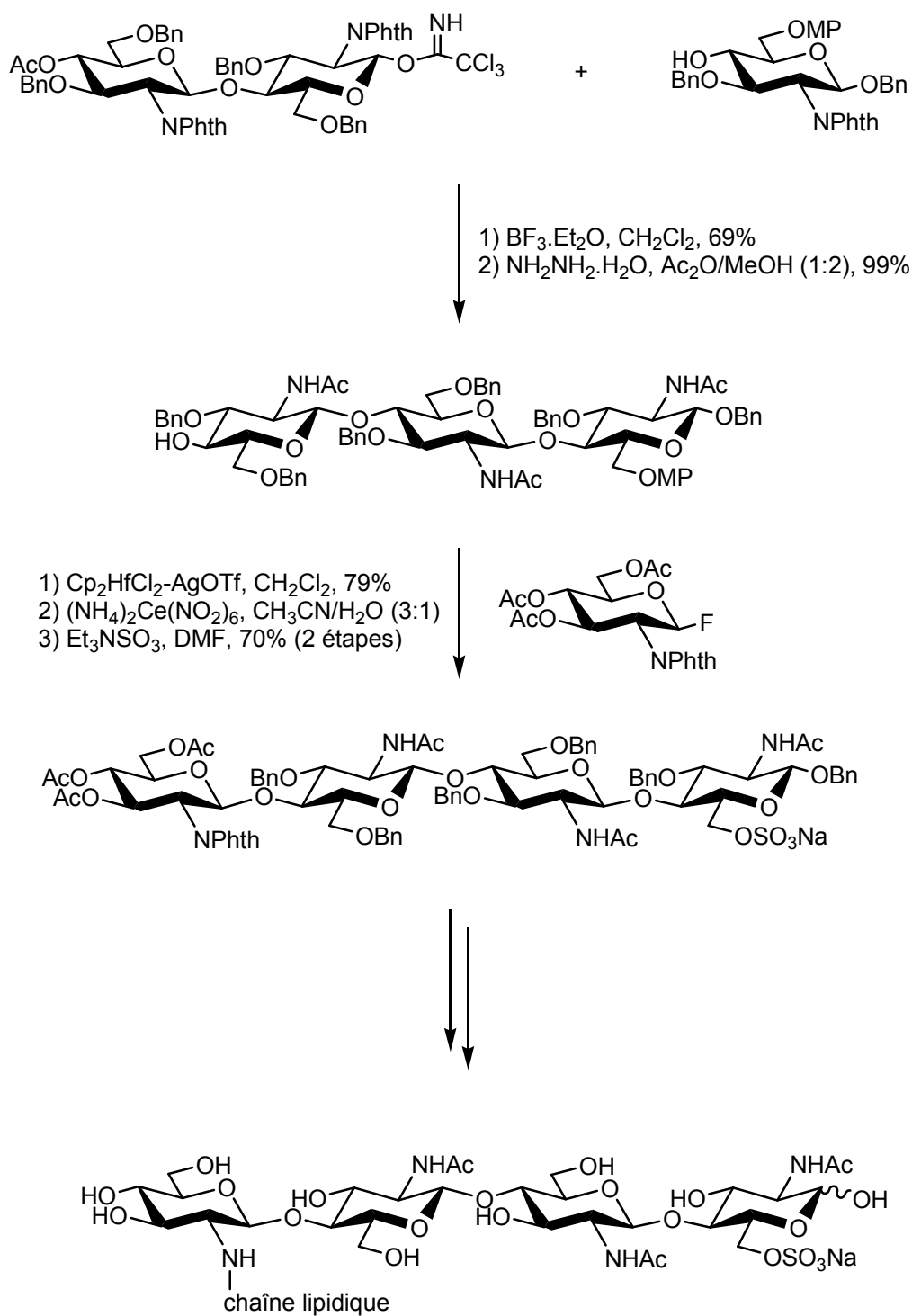


Schéma 11 : Synthèse du facteur NodRm-IV [200]

Les squelettes chitooligosaccharides font également partie de la structure des N-glycoprotéines. Ces dernières contiennent des chitobioses. Afin de les synthétiser, plusieurs synthèses chimiques de chitobioses protégés ont été réalisées [207-215]. La première date de 1973 quand F. Schmitt et al. [207] ont synthétisé le dimère GlcNAc-GlcNAc per-O-acétylé **6** dans les conditions du schéma 12.

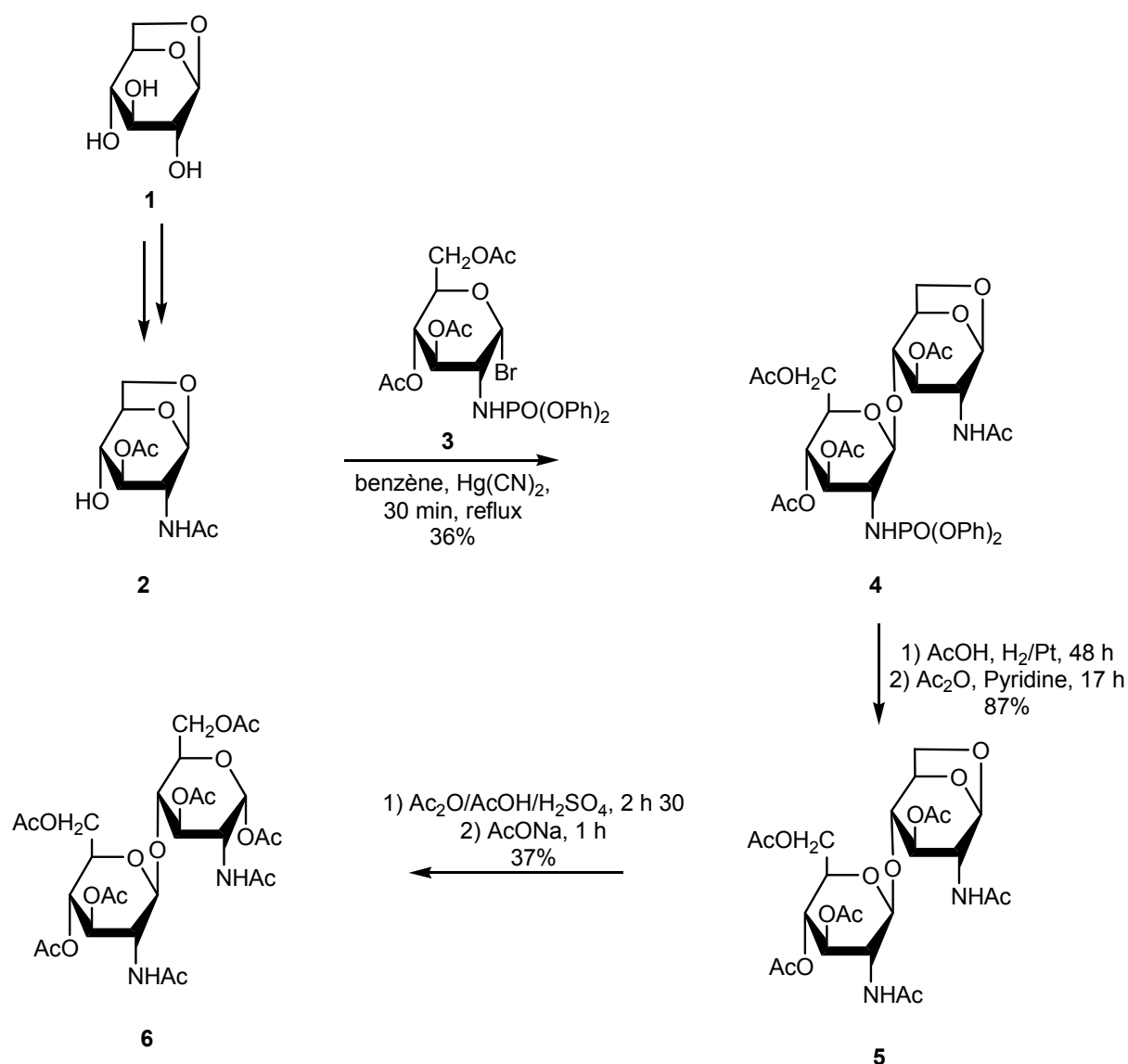


Schéma 12 : première synthèse chimique d'un chitobiose protégé [207]

Dans cette synthèse, le 2-Acétamido-3-O-acétyl-1,6-anhydro-2-déoxy-β-D-glucopyranose **2** est tout d'abord préparé en plusieurs étapes à partir du 1,6-Anhydro-β-D-glucopyranose **1**. La condensation du bromure de 3,4,6-Tri-O-acétyl-2-déoxy-2-diphénoxyphosphorylamino-α-D-glucopyranosyle **3** avec le composé **2** dans

le benzène anhydre en présence de cyanure mercurique conduit au disaccharide **4** en 30 min avec un rendement de 36%. Le produit **4** est ensuite hydrogéné catalytiquement. Cette étape entraînant une désacétylation partielle, le disaccharide est acétylé dans les conditions standard. Le composé acétylé **5** est obtenu avec un rendement de 87% pour les deux étapes et est ensuite acétolysé dans un mélange anhydride acétique/acide acétique/acide sulfurique concentré pendant 2 h 30 avant l'ajout d'acétate de sodium. Le chitodisaccharide **6** est obtenu avec un rendement de 37% pour les deux dernières étapes.

Dans la littérature, une synthèse chimique de chitobiose déprotégé est reportée [216]. Il s'agit du dimère GlcNAc-GlcNAc **11** obtenu selon le mode opératoire décrit dans le schéma 13.

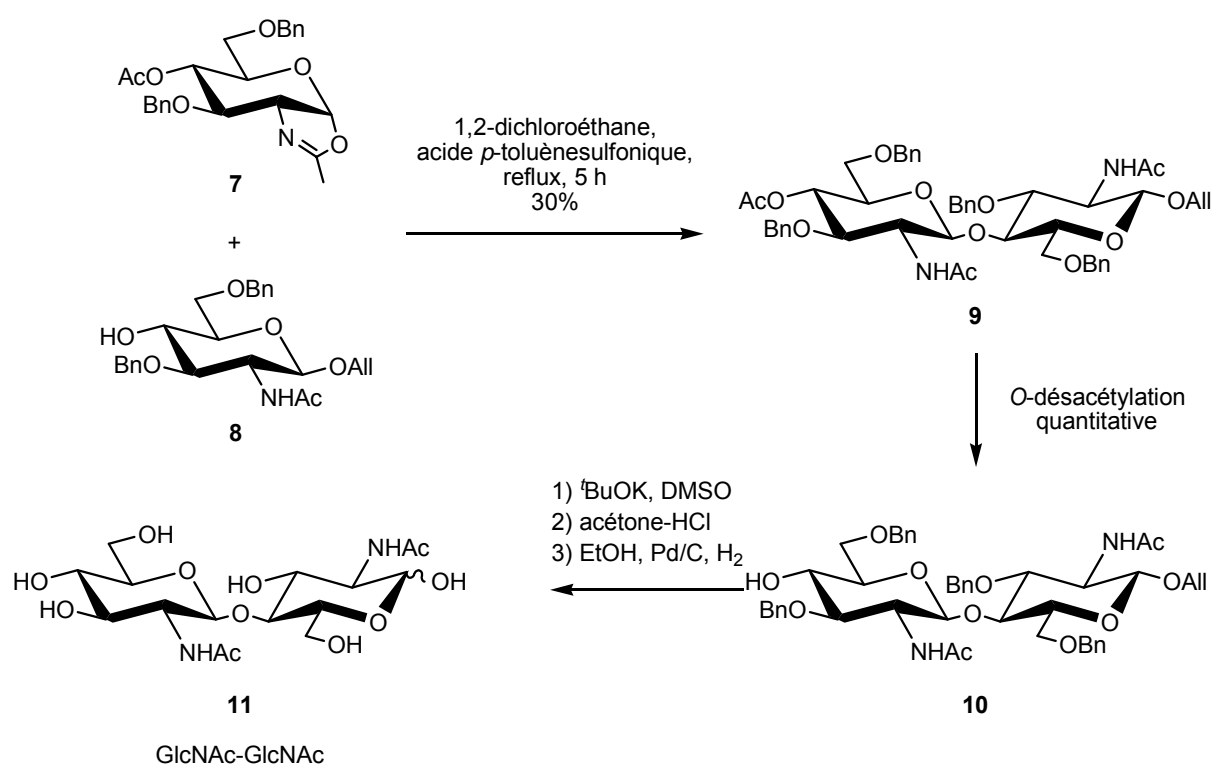


Schéma 13 : synthèse chimique d'un chitobiose déprotégé [216]

La réaction de couplage entre l'oxazoline **7** et le glycoside 1-*O*-allyle **8** à reflux pendant 5 h dans le 1,2-dichloroéthane, catalysée par l'acide *para*-toluènesulfonique, conduit au disaccharide **9** avec un rendement de 37%. Le composé **9** est tout d'abord *O*-désacétylé quantitativement dans les conditions

classiques (méthanolate de sodium dans le méthanol) pour donner le produit **10**, puis le groupement allyle est isomérisé par le *tert*-butoxyde de potassium dans le DMSO. Le glycoside 1-propényle résultant est hydrolysé dans un mélange acétone/HCl, puis une hydrogénolyse permet d'obtenir le chitodisaccharide GlcNAc-GlcNAc **11**.

H. Kuyama et al. [217] ont développé une synthèse stéréocontrôlée d'un chitododécasaccharide détaillée dans les schémas 10a et 10b. Tout d'abord, les dimères **15** et **16** sont préparés à partir des dérivés monosaccharides **12** et **13** (schéma 14a).

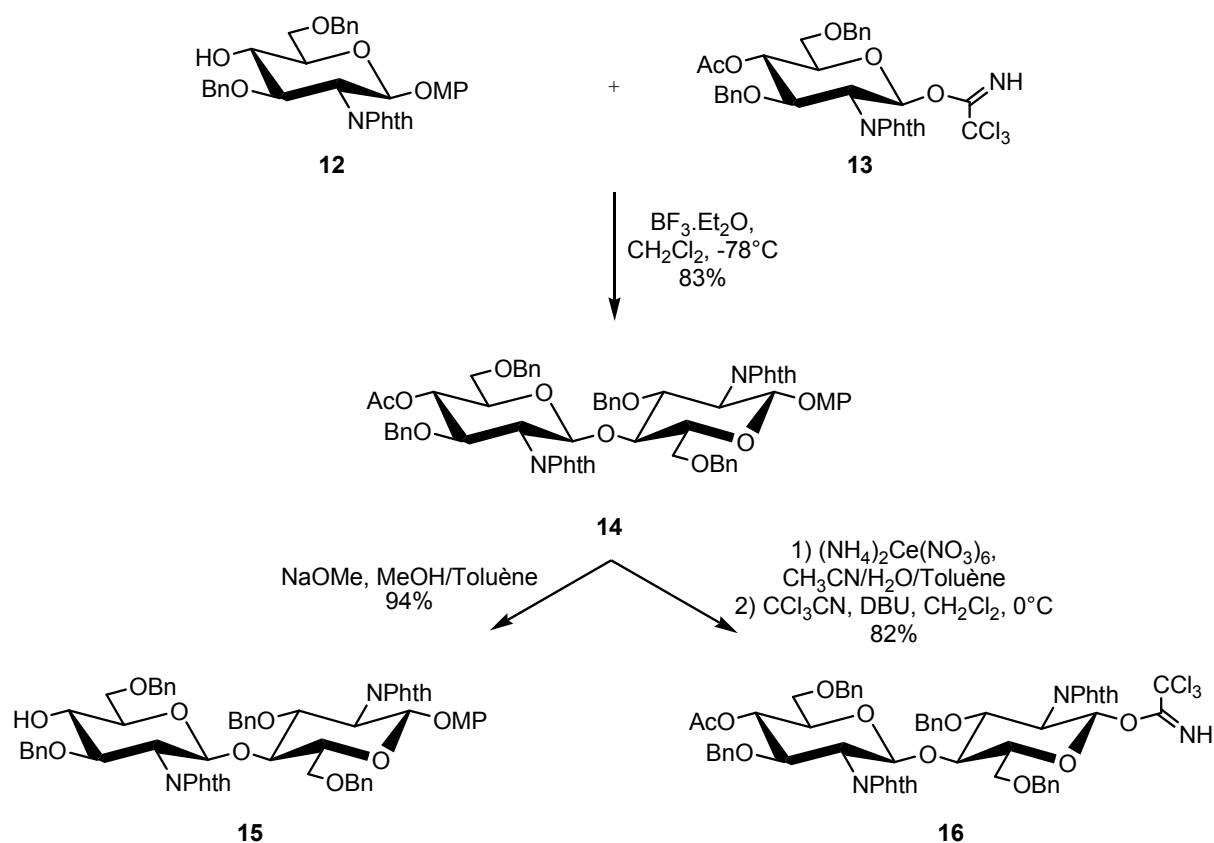


Schéma 14a : synthèse chimique d'un chitododécasaccharide [217]

La réaction de glycosylation des deux monosaccharides **12** et **13** en présence de BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O dans le dichlorométhane à -78°C conduit au chitodisaccharide **14** avec un rendement de 83%. D'un côté, la transestérification du composé **14** menée en présence de méthanolate de sodium dans un mélange méthanol/toluène permet

d'obtenir le produit **15** avec un rendement de 94%. De l'autre côté, la déprotection de l'alcool anomère du chitodisaccharide **14** par le nitrate d'ammonium et de cérium (IV), suivie de la réaction de l'hémiacétal obtenu avec  $\text{CCl}_3\text{CN}$  en présence de DBU dans le dichlorométhane à  $0^\circ\text{C}$ , conduit au composé **16** avec un rendement de 82%.

La réaction de couplage dans le dichlorométhane en présence de  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  à  $-78^\circ\text{C}$  entre les composés **15** et **16** précédemment synthétisés conduit au chitotétrasaccharide **17** avec un rendement de 75% (schéma 14b). Le produit **17** est désacétylé en position 4 par réaction dans un système  $\text{LiOH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{THF}$  à  $0^\circ\text{C}$  pour donner le composé **18** avec un rendement quantitatif. Ensuite, le chitotétrasaccharide **18** est couplé avec le disaccharide **16** dans un mélange dichlorométhane/toluène en présence de  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  à  $-78^\circ\text{C}$  pour former le chitohexasaccharide **19** avec un rendement de 62%. Le groupe acétyle en position 4 du composé **19** est clivé selon le même protocole que lors de l'étape précédente et un nouveau couplage avec le disaccharide **16** conduit au chitooctasaccharide. Les auteurs procèdent ainsi de suite jusqu'à obtenir le chitododécasaccharide **20** protégé. Ce dernier est déprotégé en deux étapes pour conduire au chitododécasaccharide cible **21** par action de l'hydrazine dans le méthanol à reflux puis par hydrogénolyse avec un rendement global de déprotection de 85%.

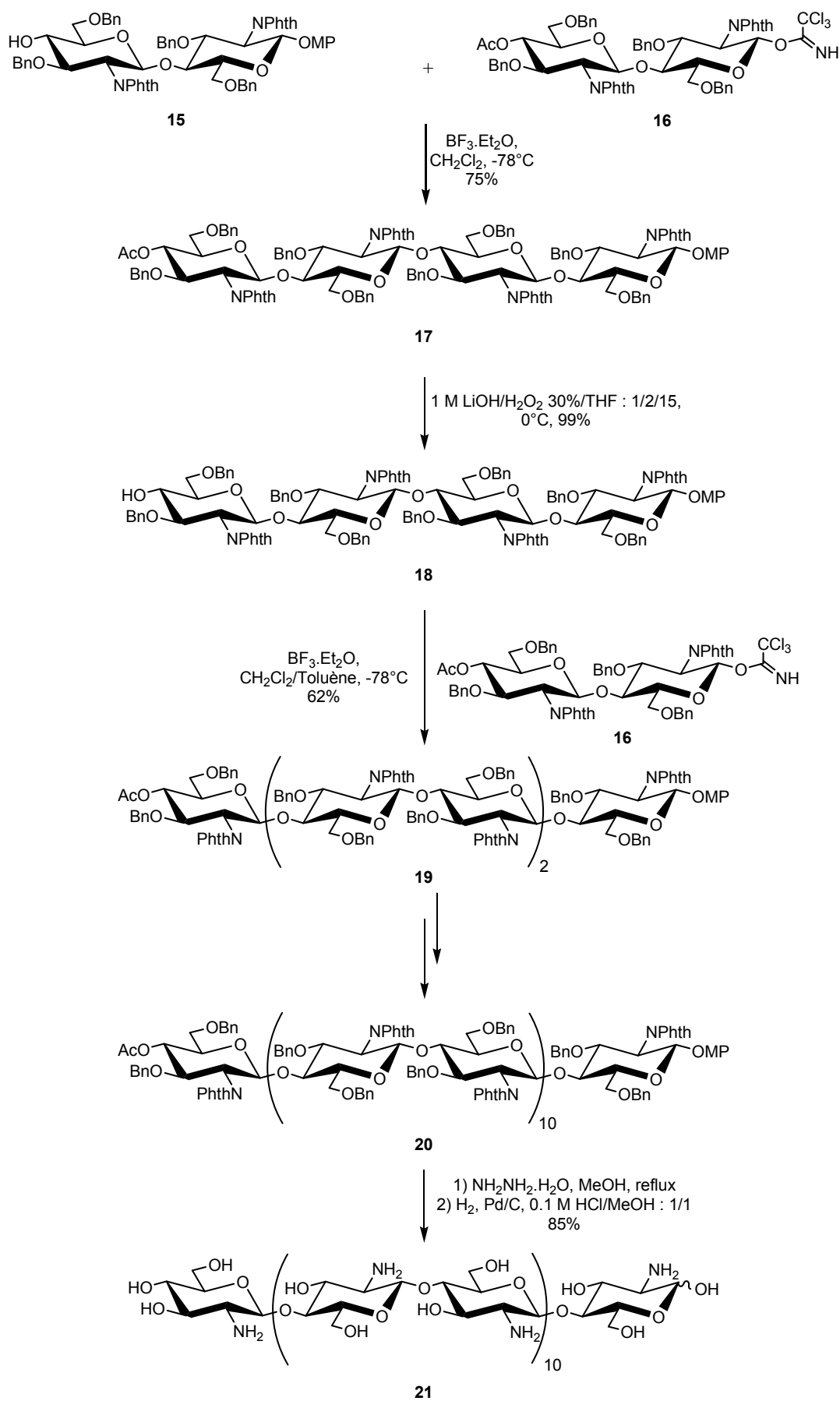
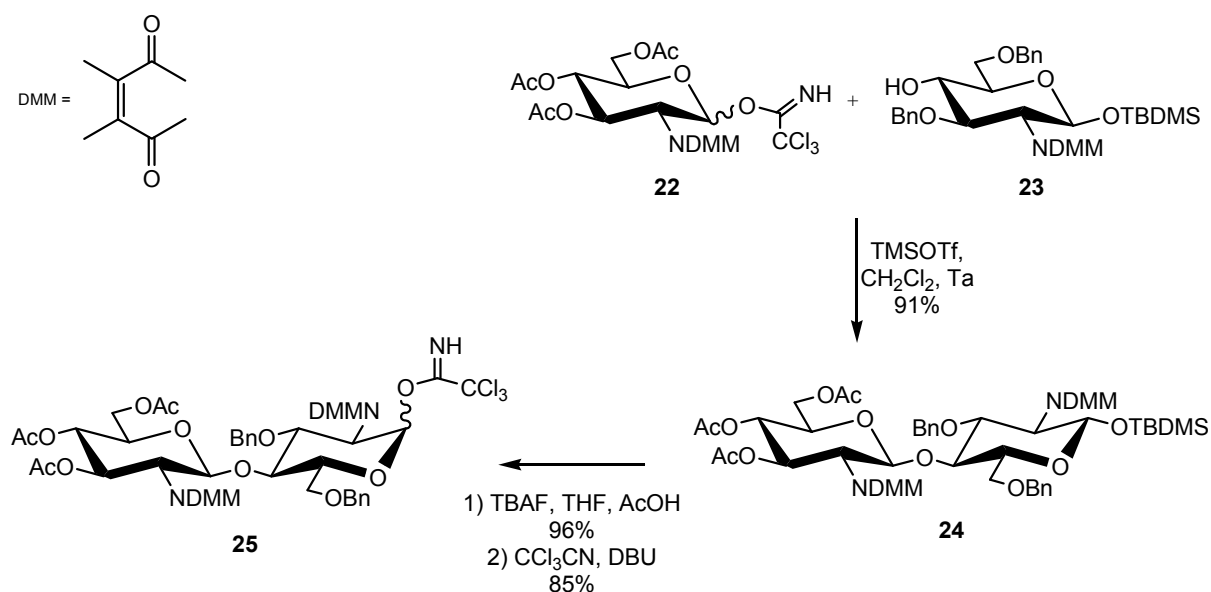


Schéma 14b : synthèse chimique d'un chitododécasaccharide [217]

M.-R.-E. Aly et al. ont synthétisé un chitotétrasaccharide totalement *N*-acétylé selon le protocole décrit dans les schémas 15a-d [218].



*Schéma 15a : préparation de l'intermédiaire 25 dans la synthèse chimique d'un chitotétrasaccharide tétra-N-acétylé [218]*

La glycosylation du *tert*-Butyldiméthylsilyl 3,6-di-*O*-benzyl-2-diméthylmaléimido- $\beta$ -D-glucopyranoside **23** avec le 3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-diméthylmaléimido-D-glucopyranosyle trichloroacétimide **22** dans le dichlorométhane en présence de triméthylsilyle trifluorométhanesulfonate conduit au disaccharide **24** avec un rendement de 91%. La position anomère du composé **24** est désilylée avec un rendement de 96% par le TBAF et l'acide acétique dans le THF. L'hémiacétal résultant réagit avec le trichloroacétonitrile en présence de DBU pour conduire au disaccharide **25** avec un rendement de 85% (schéma 15a).

Le traitement du *tert*-Butyldiméthylsilyl 3,6-di-*O*-benzyl-2-diméthylmaléimido- $\beta$ -D-glucopyranoside **23** avec le chlorure de phénoxyacétyle, suivi de la désilylation de la position anomère par TBAF, puis de la réaction de l'hémiacétal résultant avec  $\text{CCl}_3\text{CN}$  en présence de DBU, conduit au composé **26** avec un rendement global de 57% comme décrit dans le schéma 15b.

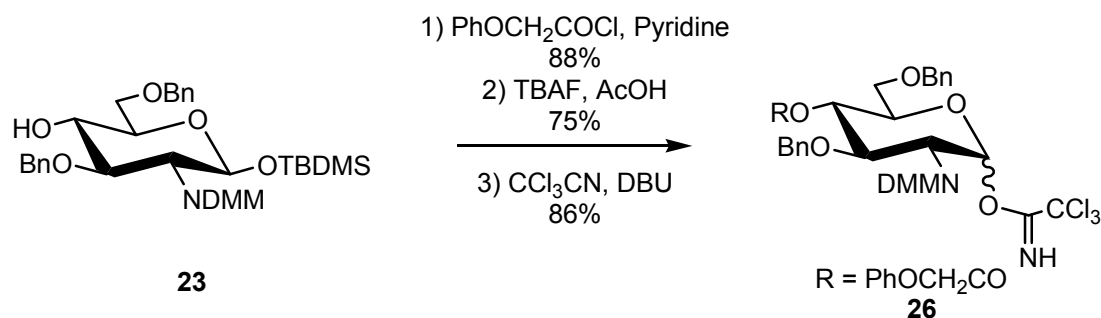


Schéma 15b : préparation de l'intermédiaire 26 dans la synthèse chimique d'un chitotétrasaccharide tétra-N-acétylé [218]

Une glycosylation, catalysée par le TMSOTf, de l'imidate 26 avec le 3,6-Di-O-benzyl-2-désoxy-2-diméthylmaléimido-1-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-β-D-glucopyranoside 23 dans l'acétonitrile permet d'obtenir le disaccharide 27 avec un rendement de 71% (schéma 15c). Le produit 27 peut être désacétylé par le méthanolate de sodium dans le méthanol pour conduire au composé 28 avec un rendement de 74%.

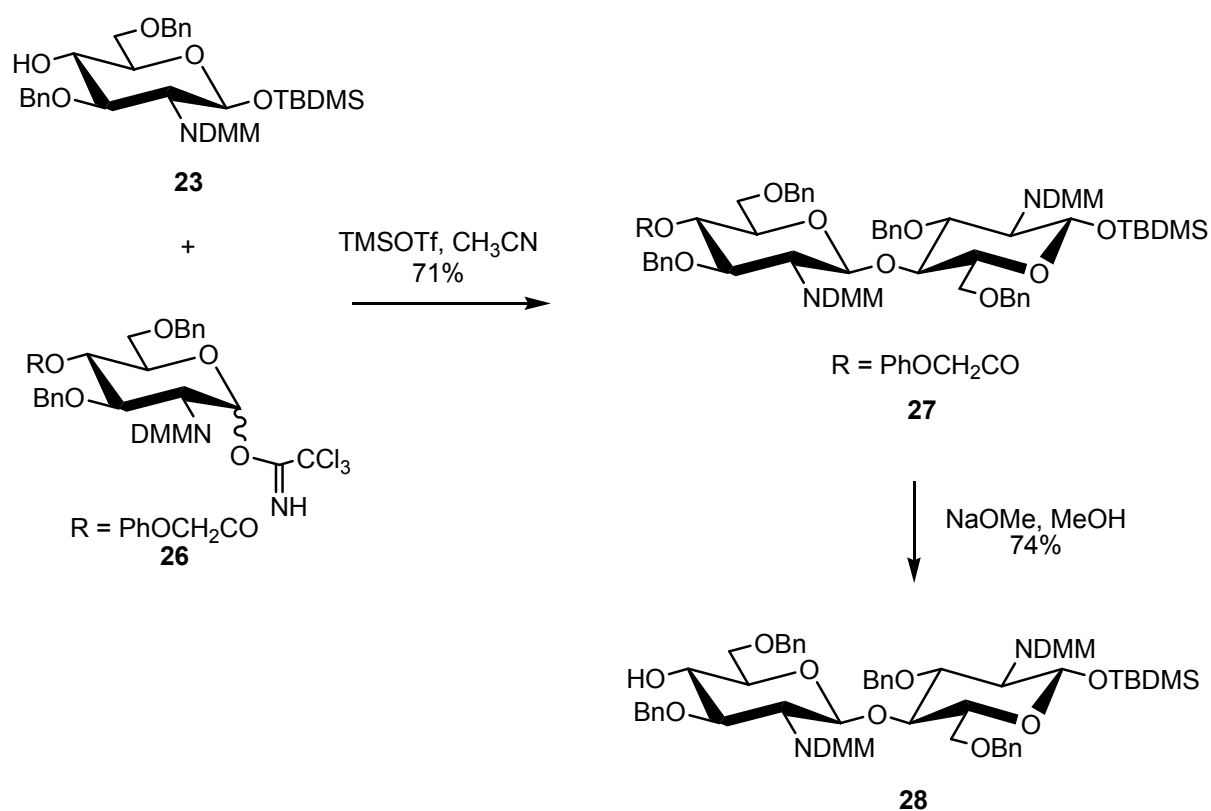


Schéma 15c : préparation de l'intermédiaire 28 dans la synthèse chimique d'un chitotétrasaccharide tétra-N-acétylé [218]

Une glycosylation entre le disaccharide **25** obtenu selon le schéma 15a et le disaccharide **28** obtenu selon le schéma 15c dans l'acétonitrile en présence de TMSOTf conduit au tétrasaccharide **29** avec un rendement de 74% (schéma 15d). Puis le composé **29** est totalement déprotégé en plusieurs étapes pour conduire au chitotétrasaccharide **30**.

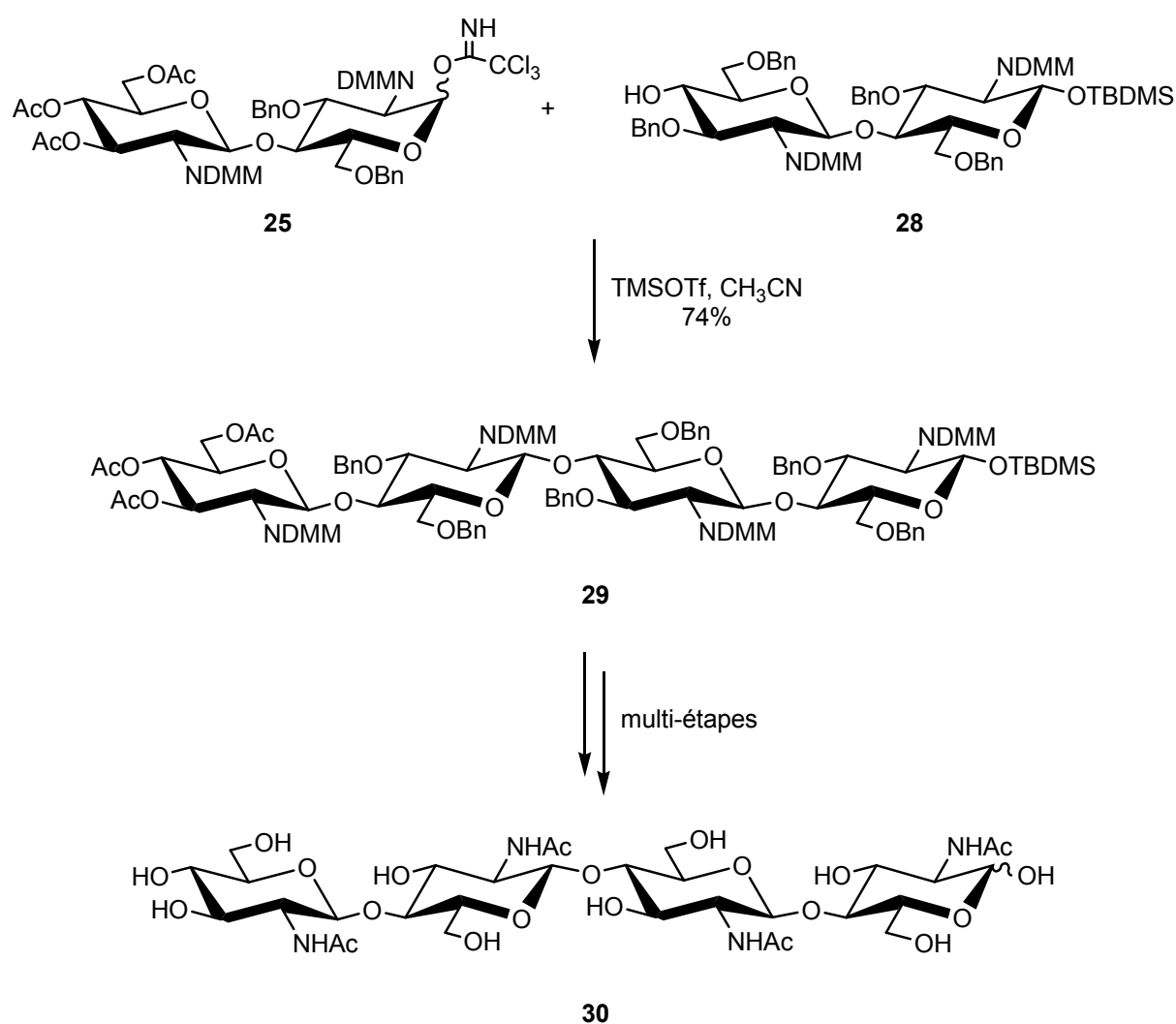


Schéma 15d : synthèse chimique d'un chitotétrasaccharide tétra-N-acétylé [218]

L. Huang et al. [219] ont développé une nouvelle méthode de glycosylation « one-pot ». Les monosaccharides **31**, **32** et **33** décrits dans le schéma 16a sont synthétisés et servent de briques constructrices à la synthèse du chitotétrasaccharide protégé **34**.

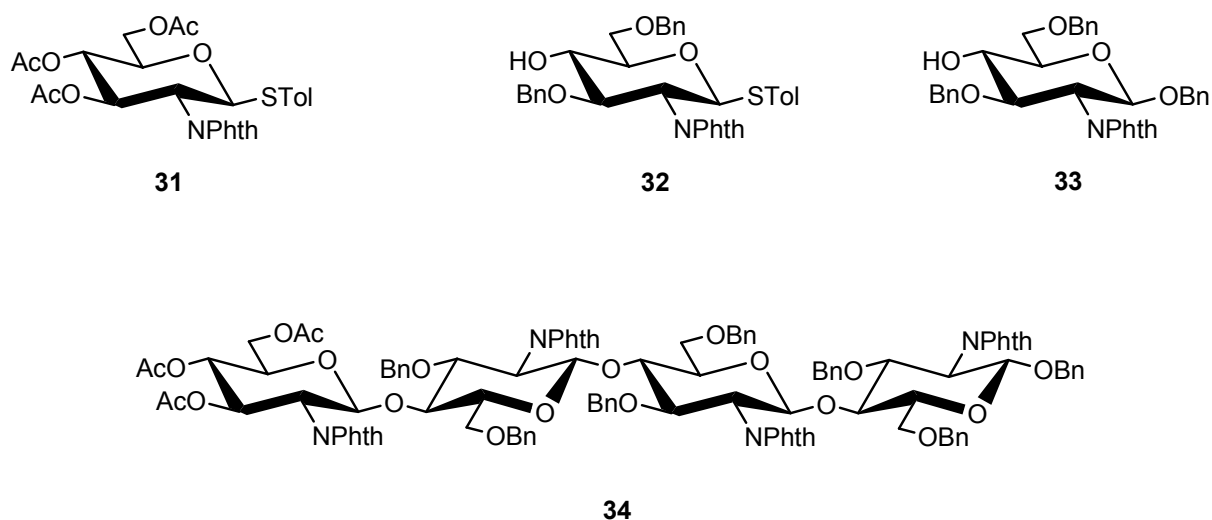


Schéma 16a : synthèse chimique « one-pot » d'un chitotétrasaccharide [219]

Les auteurs réalisent plusieurs séquences de glycosylation entre un accepteur et un donneur de thioglycosyle et obtiennent des chitotétrasaccharides « assemblés » en quelques heures et sans purification intermédiaire dans les conditions du schéma 16b.

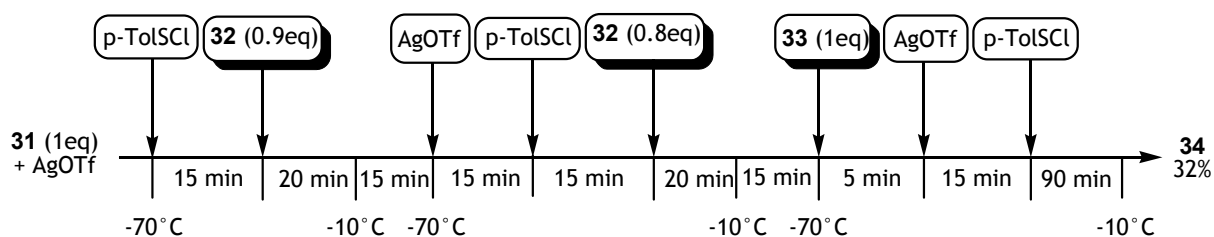


Schéma 16b : synthèse chimique « one-pot » d'un chitotétrasaccharide [219]

### 3.4. Conclusion sur la préparation des oligomères de chitine et chitosane

Plusieurs méthodes sont reportées dans la littérature pour préparer des chitooligosaccharides. Elles peuvent être regroupées en deux grandes parties :

d'une part la préparation par dégradation de la chitine et du chitosane, et d'autre part par synthèse chimique ou enzymatique.

Les méthodes de dégradation de la chitine ou du chitosane peuvent être effectuées par voie chimique, enzymatique ou physique. Elles ont l'avantage de partir d'un produit facilement accessible et permettent d'obtenir rapidement et en peu d'étapes des chitooligosaccharides. Les méthodes chimiques permettant de dégrader la chitine et le chitosane comme l'hydrolyse acide, l'acétolyse, la fluorohydrolyse ou la désamination nitreuse entraînent un clivage aléatoire de la liaison glycosidique. Bien que dans certaines conditions il soit possible de contrôler la masse molaire des chitooligosaccharides obtenus (méthode de désamination nitreuse en ajustant la quantité d'acide nitreux), il est très difficile de choisir le degré de polymérisation et des mélanges de chitooligosaccharides de polymolécularité relativement large sont toujours obtenus. Des méthodes chromatographiques permettent de séparer les chitooligosaccharides mais ces techniques demandent beaucoup de temps et les rendements obtenus sont très faibles. De plus, à moins d'avoir un degré d'acétylation de départ de 0 ou de 100%, il n'est pas possible d'obtenir un degré d'acétylation contrôlé après le clivage. Un degré d'acétylation moyen peut néanmoins être aisément déterminé par une analyse RMN. Par rapport à l'hydrolyse chimique, l'hydrolyse enzymatique de la chitine et du chitosane a l'avantage de produire plus rapidement des chitooligosaccharides dans des conditions réactionnelles plus douces. Cette voie permet d'effectuer des clivages spécifiques. En revanche, la préparation de l'enzyme comme la purification du produit nécessitent un lourd travail et ce procédé n'est pas facilement adaptable au niveau industriel. Il s'agit également d'une méthode coûteuse, bien que des enzymes plus abordables aient montré leur capacité à cliver les liaisons glycosidiques entre les unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine. La troisième voie de dégradation de la chitine et du chitosane fait appel à des techniques physiques comme l'irradiation gamma ou la sonication. En adaptant les paramètres expérimentaux il est possible de déterminer le degré de polymérisation du chitooligosaccharide obtenu. En revanche, le degré d'acétylation ne peut être contrôlé.

Les chitooligosaccharides peuvent être préparés par le chemin inverse, c'est-à-dire par synthèse. Deux voies ont été étudiées : enzymatique et chimique.

Contrairement à la dépolymérisation, la synthèse permet le contrôle des degrés de polymérisation et d'acétylation. En ce qui concerne la synthèse enzymatique, le contrôle de ces paramètres nécessite un travail très important d'isolation et de purification des enzymes pour n'obtenir qu'un très faible rendement. Le coût d'une telle voie peut de plus être très important. De nombreux exemples de préparation de chitooligosaccharides par synthèse chimique sont reportés. Il s'agit de la méthode de choix pour préparer des chitooligosaccharides possédant des degrés de polymérisation et d'acétylation contrôlés. Mais ces synthèses conduisent dans la plupart des cas à des homo-chitooligosaccharides. Or, si des études ont montré que la bioactivité des chitooligosaccharides semble dépendre des degrés de polymérisation et d'acétylation, la distribution des deux unités constitutives D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine pourrait également influencer les propriétés de ces composés. La préparation d'hétéro-chitooligosaccharides ayant une structure parfaitement définie sera donc un outil très intéressant pour établir une relation structure - activité. C'est pourquoi nous avons choisi de mettre au point une méthode de préparation d'homo- et hétéro-chitooligosaccharides par synthèse chimique. Dans ce cadre, nous avons regardé dans la littérature quelles sont les méthodes pour synthétiser par voie chimique des oligosaccharides et plus particulièrement des oligosaccharides contenant des unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine [220].

## 4. Synthèse chimique d'oligosaccharides

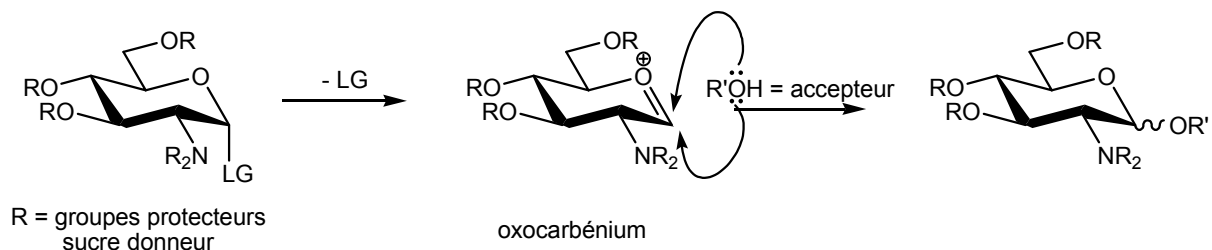
### 4.1. Introduction

La glycochimie connaît un intérêt croissant grâce aux propriétés et au fort impact des sucres dans les divers domaines liés aux sciences de la vie. Les glycoprotéines et les glycolipides résultent de l'assemblage d'un sucre (glycane) avec respectivement une protéine et un lipide. Ces composés sont impliqués dans un grand nombre de mécanismes biologiques comme la fertilisation, l'embryogenèse, le développement neuronal, l'activité hormonale, la prolifération des cellules et leur organisation dans les tissus [221]. La partie oligosaccharide des glycoconjugués joue un rôle clé dans la reconnaissance cellulaire. Grâce au développement des techniques d'analyse, de nombreuses structures d'oligosaccharides ont été identifiées, mettant ainsi en évidence l'incroyable diversité des glycoconjugués. Les chimistes de synthèse ont voulu relever le défi de la synthèse d'oligosaccharides qui est une partie importante de la chimie organique. En effet, il existe un grand nombre de possibilités lors de l'assemblage d'unités monomères pour former des oligomères et de plus, les liaisons glycosidiques doivent être introduites spécifiquement. De nombreuses recherches ont été menées et la chimie permettant d'obtenir des oligosaccharides s'est développée. Au premier plan des études en chimie des sucres figure la formation d'une liaison glycosidique puisqu'il s'agit de la voie permettant d'obtenir des oligosaccharides à partir de blocs élémentaires monosaccharides.

### 4.2. Formation d'une liaison glycosidique

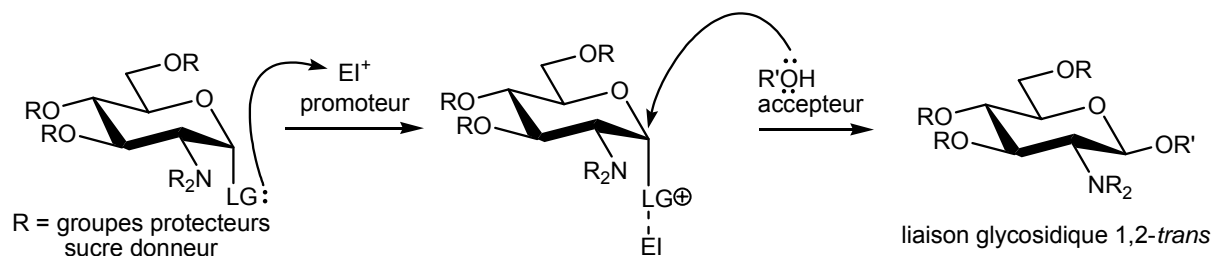
La réaction de glycosylation correspond à la création d'une liaison carbone - oxygène via une substitution nucléophile. Cette substitution implique la position anomère (C1) d'un saccharide appelé donneur de glycosyle contenant un groupe partant (noté LG pour leaving group) d'une part, et un groupe alcool libre de l'accepteur de glycosyle d'autre part. Souvent, l'accepteur est lui-même un saccharide. Dans cette approche, le donneur de glycosyle joue le rôle d'électrophile tandis que l'accepteur est un nucléophile. Cette réaction de couplage est généralement réalisée en présence d'un activateur appelé promoteur.

Son rôle est d'assister le départ du groupe partant du donneur de glycosyle de façon à éviter la formation de l'oxocarbénium qui entraînerait une perte de stéréosélectivité conduisant au mélange d'anomères  $\alpha$  et  $\beta$  (schéma 17).



*Schéma 17 : réaction de glycosylation sans promoteur conduisant à un mélange d'anomères  $\alpha$  et  $\beta$*

Le promoteur est généralement un acide de Lewis utilisé en quantité catalytique. Il va activer le groupe partant en position anomère du donneur de glycosyle, le rendant ainsi électro déficient et favorisant la substitution nucléophile de l'accepteur (schéma 18).



*Schéma 18 : réaction de glycosylation avec promoteur*

Les groupes partants LG traditionnellement employés dans les réactions de glycosylation sont les halogénures, les trichloroacétimidates, les phosphates/phosphites, les esters/carbonates/thiocarbonates, divers groupes aryloxy, le 4-pentényl ou les sulfures/sulfoxydes (schéma 19). Le groupe partant en position anomère du donneur de glycosyle est activé par un promoteur différent selon sa nature. Les différents types de promoteurs utilisés sont précisés dans le schéma 19 pour chaque donneur de glycosyle.

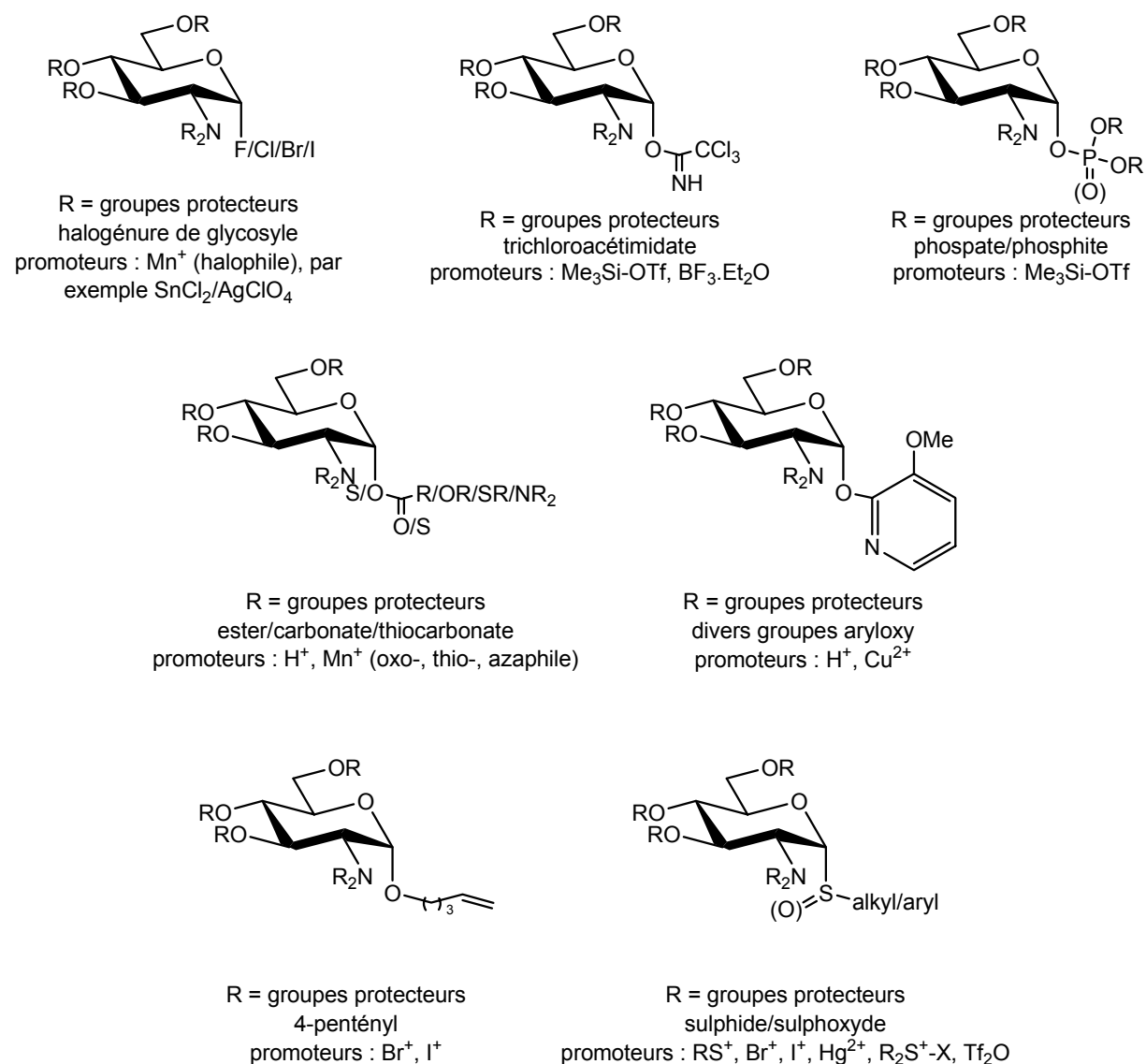
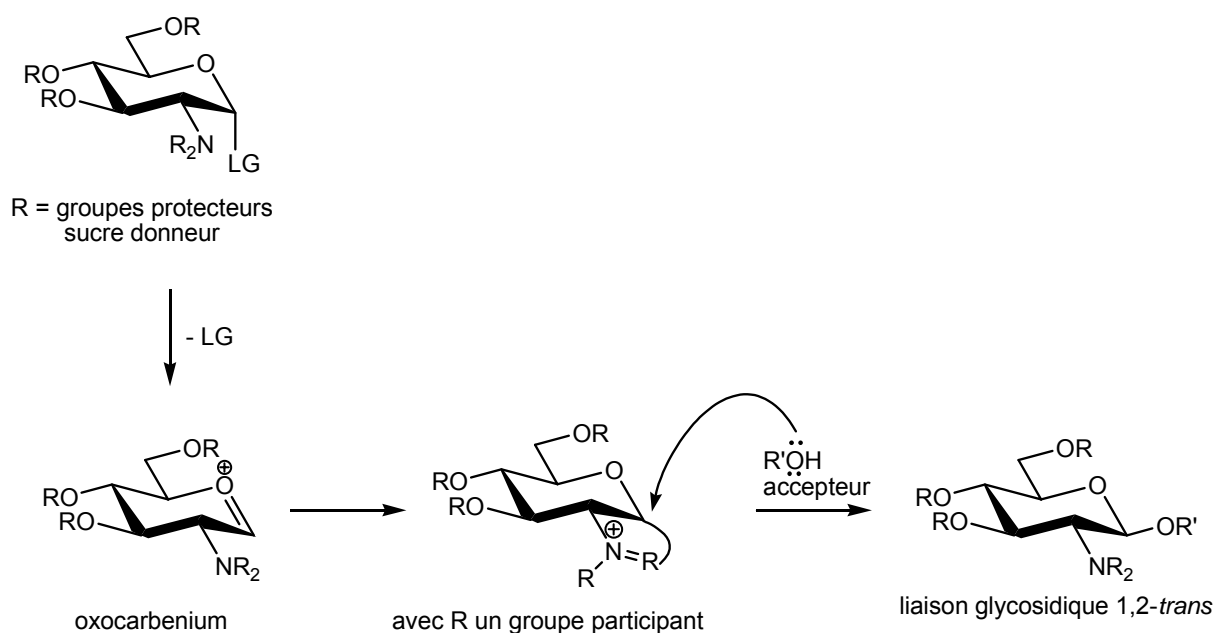


Schéma 19 : donneurs de glycosyle et leurs promoteurs [222]

La formation stéréo- et régiosélective d'une liaison glycosidique est délicate. Plusieurs méthodes ont été mises au point selon le type de liaison glycosidique souhaitée : 1,2-*trans* ou 1,2-*cis*. Une liaison est dite 1,2-*trans* lorsque le groupe en position 2 est du côté opposé au substituant anomère. Inversement, une liaison glycosidique où les groupes en positions 2 et 1 sont du même côté est appelée 1,2-*cis*. Notre objectif étant de synthétiser des chitoooligosaccharides, c'est-à-dire des oligosaccharides constitués d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, nous traiterons les méthodes de formation d'une liaison glycosidique 1,2-*trans* ou 1,2-*cis* dans des sucres 2-amino-2-désoxy-D-glucopyranose.

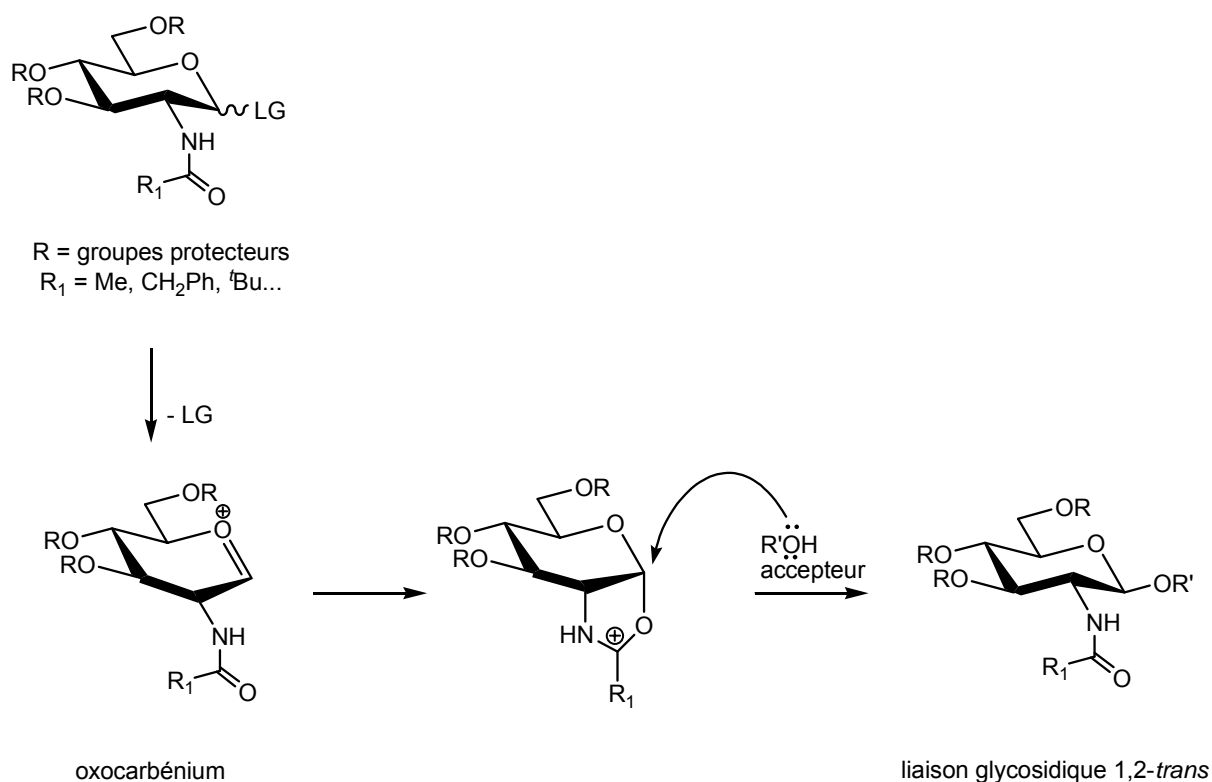
### 4.2.1. Formation d'une liaison glycosidique 1,2-*trans*

Pour obtenir une glycosylation 1,2-*trans*, deux voies sont communément employées. La plus répandue consiste à utiliser un donneur de glycosyle contenant un groupe participant sur la fonction amine en position 2 (schémas 20a, 20b). Dans cette stratégie, la formation d'un intermédiaire cyclique bloque la face  $\alpha$  du donneur de glycosyle obligeant l'alcool accepteur à attaquer sur la face  $\beta$ , ce qui entraîne la formation d'une liaison glycosidique 1,2-*trans* de façon stéréosélective.



*Schéma 20a : formation d'une liaison glycosidique 1,2-*trans* par la stratégie du groupe voisin participant*

Les groupes participants sont capables de former l'intermédiaire bicyclique décrit dans le schéma 20a. Pour cela, le groupe participant doit posséder une paire d'électrons libres. Les groupes participants des glycosyles sont généralement des esters, ou des amides dans le cas des dérivés 2-amino-2-désoxy. Ils réagiront selon le mécanisme décrit dans le schéma 20b.



*Schéma 20b : formation d'une liaison glycosidique 1,2-trans par la stratégie du groupe voisin participant*

L'autre voie permettant d'obtenir une glycosylation 1,2-*trans* consiste à utiliser d'une part un halogénure 1,2-*cis*-2-amino-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyle ne possédant pas de groupe participant sur la fonction amine, et d'autre part un promoteur insoluble capable de bloquer la face  $\alpha$  du donneur de glycosyle (schéma 21). Les promoteurs employés pour ce type de réaction sont généralement des sels d'argent (silicate, aluminate). Mais la stéréosélectivité de cette méthode est inférieure à celle obtenue avec la méthode du groupe voisin participant précédemment décrite (schéma 20a).

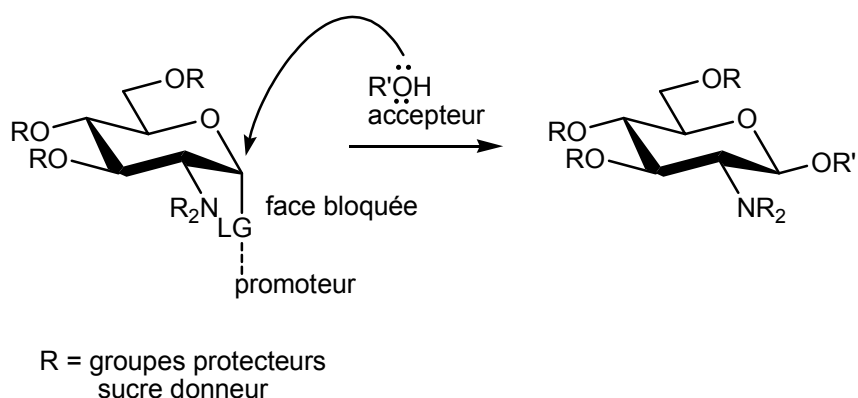


Schéma 21 : formation d'une liaison glycosidique 1,2-trans en utilisant un 1,2-cis-2-amino-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyle en présence d'un promoteur insoluble

#### 4.2.2. Formation d'une liaison glycosidique 1,2-cis

La formation d'une liaison glycosidique 1,2-cis est possible si le groupement amine en position 2 n'est pas protégé par un groupe participant et qu'un groupe partant est présent sur la position anomère avec une orientation 1,2-trans par rapport au substituant en position 2 (schéma 22).

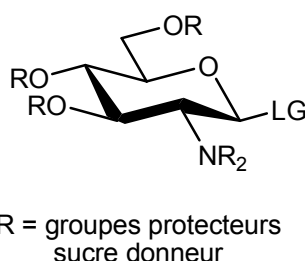


Schéma 22 : donneur de glycosyle possédant un groupe partant avec une orientation 1,2-trans

Une réaction de type  $S_N2$  entre un halogénure de 2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle et un accepteur pourrait *a priori* conduire à une glycosylation 1,2-cis. Mais un tel donneur de glycosyle est très réactif et peu stable car déstabilisé par effet anomère. R.-U. Lemieux et al. [223] ont résolu ce problème en préparant le donneur de glycosyle avec une configuration 1,2-trans *in situ* à partir de l'anomère  $\alpha$  stable par échange de groupes partants en présence de bromure de tétraalkyle ammonium (schéma 23).

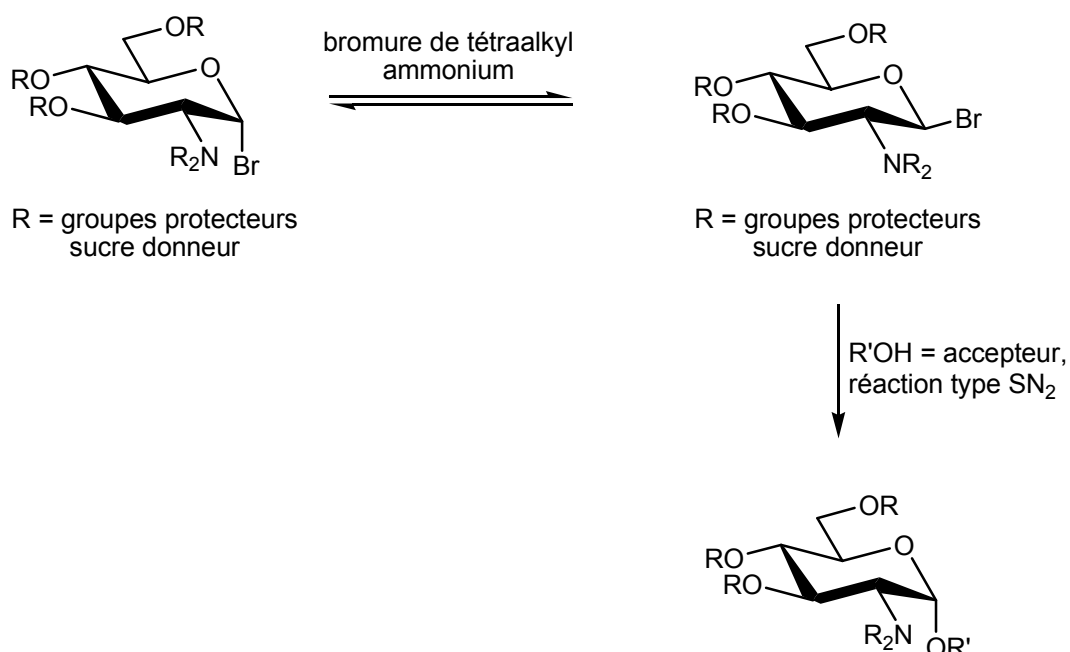


Schéma 23 : formation d'une liaison glycosidique 1,2-cis

L'attaque de l'alcool accepteur  $R'OH$  sur la face  $\alpha$  de l'halogénure de 2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle formé *in situ* étant plus rapide que l'épimérisation inverse conduisant à l'halogénure de configuration  $\alpha$ , la glycosylation 1,2-*cis* est obtenue avec une bonne stéréosélectivité.

### 4.3. Méthodes de glycosylation

Selon le groupe protecteur utilisé pour la fonction amine (participant ou non), la nature du promoteur, la nature et la stéréochimie du groupe partant, il est possible d'obtenir sélectivement une liaison 1,2-*trans* ou 1,2-*cis*. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour effectuer des réactions de glycosylation en suivant ces considérations. Différents groupes protecteurs, différents promoteurs et différents groupes partants ont été développés et les méthodes ont été progressivement améliorées.

#### 4.3.1. Réaction de Koenigs-Knorr

La première réaction de glycosylation a été effectuée par Koenigs et Knorr en 1901 [224]. Il s'agit d'une réaction de couplage entre un bromure ou un chlorure de

glucopyranosyle tétra-*O*-acétylé (donneur de glycosyle) et d'un hydroxyle (accepteur) avec un métal lourd comme promoteur (argent ou mercure).

La réaction de Koenigs-Knorr appliquée aux sucres 2-amino-2-désoxy-D-glucopyranosides est décrite dans le schéma 24.

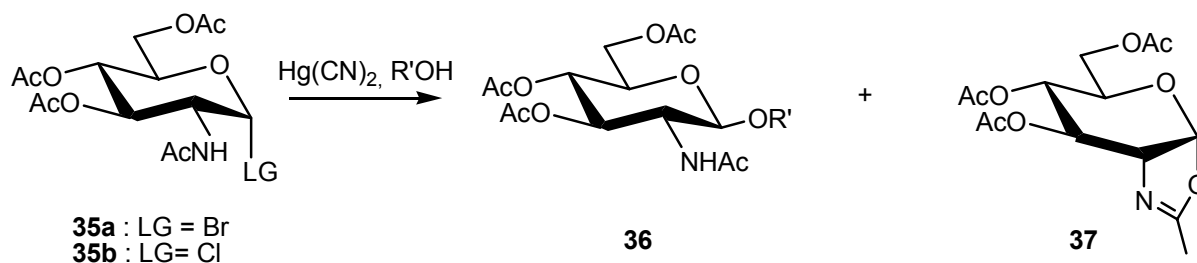


Schéma 24 : réaction de Koenigs-Knorr appliquée aux sucres 2-amino-2-désoxy-D-glucopyranoside

Les bromure et chlorure **35a** et **35b** sont obtenus par la réaction de la *N*-acétyl-D-glucosamine tétra-*O*-acétylée avec HBr ou HCl respectivement. Leur réactivité est différente de celle des dérivés 2-*O*-acétylés initialement employés dans la réaction de glycosylation de Koenigs et Knorr. Le bromure **35a** est instable et le chlorure **35b** est stable mais peu réactif. Ces deux donneurs de glycosyle sont utilisés pour les réactions de glycosylation avec des alcools primaires très réactifs placés en excès et en présence de cyanure de mercure comme promoteur. La glycosylation 1,2-*trans* est obtenue avec un bon degré de stéréosélectivité mais la formation de l'oxazoline **37** comme sous-produit de cette réaction diminue le rendement. Afin de pallier ces problèmes, d'autres méthodes de glycosylation ont été développées.

#### 4.3.2. Méthode oxazoline

La méthode oxazoline est une extension de la réaction de Koenigs-Knorr précédemment décrite et est détaillée dans le schéma 25.

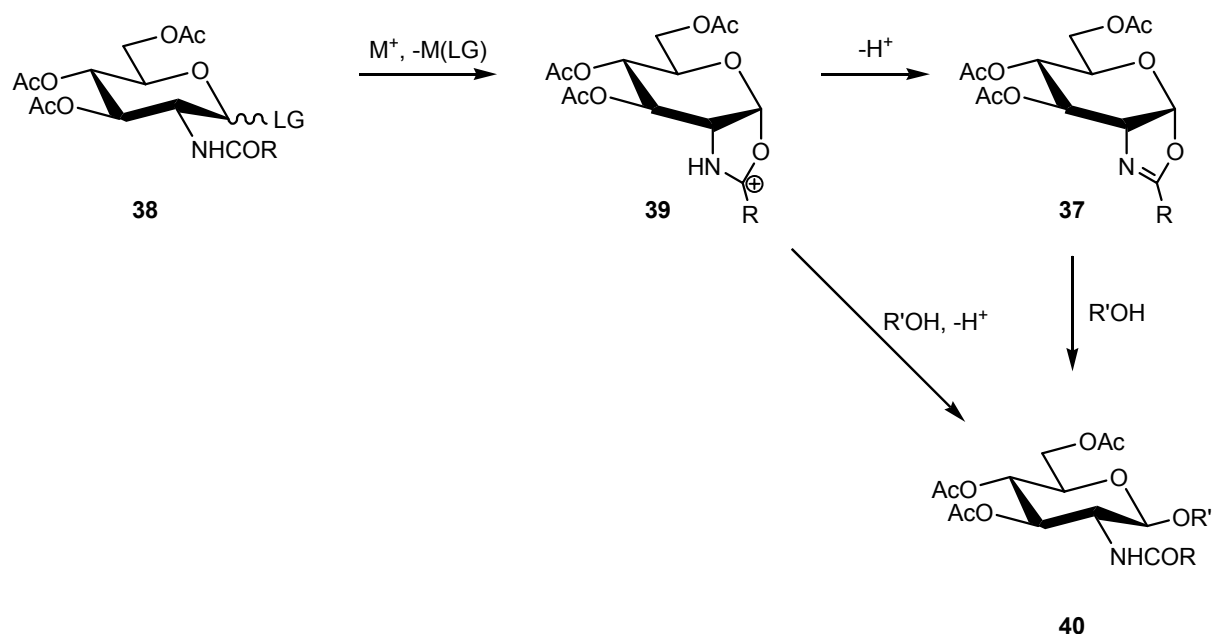


Schéma 25 : glycosylation 1,2-trans par la méthode oxazoline

Le départ du groupe partant du composé **38** entraîne la formation de l'ion oxazolinium **39** qui perd un proton pour former l'oxazoline **37**. Cette dernière peut jouer le rôle de donneur de glycosyle dans une réaction de glycosylation 1,2-*trans* conduisant au glycoside **40**. Mais l'ion oxazolinium **39** peut être formé sans isolation de l'oxazoline **37** et permettre la formation d'une liaison glycosidique 1,2-*trans* après couplage avec un alcool.

Les oxazolines les plus communément employées sont les méthyloxazolines où le groupement R est un méthyle. Dans ces conditions le composé **40** obtenu après la glycosylation possède une fonction N-acétyle en position 2. D'autres oxazolines ont été utilisées comme donneurs de glycosyle (R = Ph, CH<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>OMe, H).

Dans la procédure de Zurabyan et Khorlin [225, 226], le catalyseur de glycosylation est l'acide *para*-toluènesulfonique et la réaction est effectuée dans le nitrométhane et le toluène à reflux. Dans les cas où l'accepteur est un alcool réactif (méthanol, alcool allylique, alcool benzylique, phénol...) la glycosylation est obtenue avec des rendements de 40 à 70%.

Plusieurs améliorations ont été apportées à cette procédure. En utilisant des solvants chlorés comme le 1,2-dichloroéthane à la place du nitrométhane et du toluène, ou en employant d'autres promoteurs, les rendements de glycosylation ont été améliorés. Grâce à ces modifications, cette voie permet de synthétiser des glycosides et oligosaccharides 2-amino-2-désoxy 1,2-*trans*. Le principal avantage de

cette méthode est que le 2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside **40** formé est directement sous forme *N*-acétyle lorsque R = Me. Mais dans ces conditions, l'oxazolinium **39** est très stable et l'oxazoline correspondante n'est donc pas un très bon donneur de glycosyle. Afin de pallier ce problème, le groupement *N*-acétyle doit être remplacé par un groupe plus électroattracteur comme les groupes trifluoroacétyle (TFA), trichloroacétyle (TCA) ou trichloroéthoxycarbonyle (Troc). G. Blatter et al. [227] ont montré que l'utilisation du TCA comme groupe protecteur de la fonction amine d'un donneur trichloroacétimide permet d'obtenir une liaison glycosidique 1,2-*trans* avec une bonne stéréosélectivité. De plus, ce groupe protecteur est facilement transformé en *N*-acétyle par réduction radicalaire avec Bu<sub>3</sub>SnH en présence de AIBN. D'autres méthodes, comme une hydrogénéolyse en présence de Pd/C ou encore le clivage du groupe TCA par NaOH suivi d'une réacétylation permettent d'obtenir la fonction *N*-acétyle [228].

L'utilisation de la méthode oxazoline est limitée par les conditions dures dans lesquelles la réaction est effectuée (haute température, milieu acide). De plus, cette méthode se limite à des accepteurs possédant une fonction alcool réactive. D'autres voies ont donc été mises au point pour permettre la glycosylation entre un donneur de glycosyle et un accepteur peu réactif, comme la méthode phthalimido.

### 4.3.3. Méthode phthalimido

En 1976 R.-U. Lemieux et al. ont introduit l'utilisation des halogénures de 2-désoxy-2-phthalimidoglycosyle dans les réactions de glycosylation comme une méthode importante et fiable pour la préparation des 2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosides [229]. Les halogénures de 2-désoxy-2-phthalimidoglycosyle sont préparés par la réaction d'un sucre 2-amino-2-désoxy avec l'anhydride phthalique en présence d'une base, suivie d'une peracétylation puis d'un traitement par HBr ou HCl. En présence du complexe trifluorométhanesulfonate d'argent - collidine, le bromure de 3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-désoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyle **41** peut être glycosylé avec des alcools simples et également avec des accepteurs monosaccharides (schéma 26). Cette glycosylation donne de très bons rendements et a lieu à température ambiante.

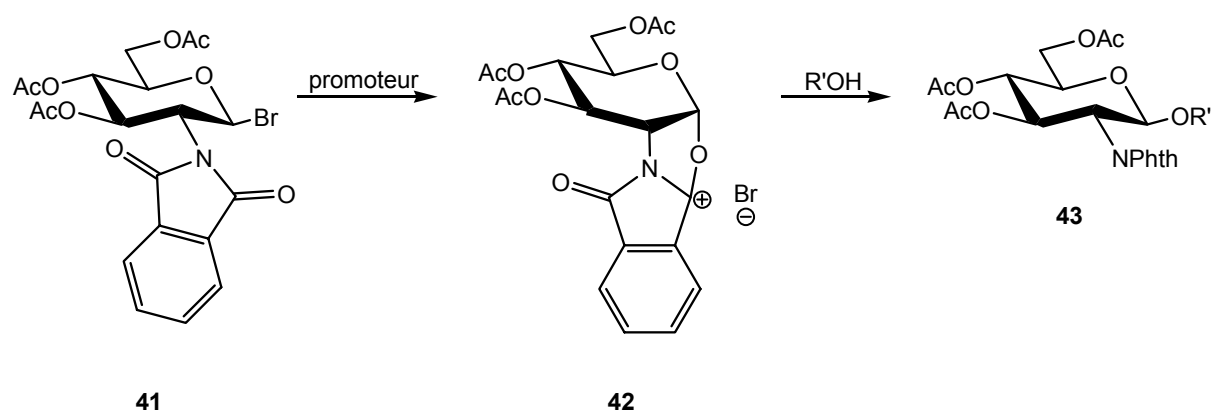


Schéma 26 : glycosylation 1,2-trans par la méthode phthalimido

Le départ du bromure conduit à l'intermédiaire **42** qui permet la formation du composé **43** avec une liaison glycosidique 1,2-trans, le volumineux groupement phthalimido bloquant la face α.

A partir de ce premier exemple de la méthode phthalimido, d'autres donneurs de glycosyle ont été développés. Le schéma 27 regroupe les différents donneurs de glycosyle 2-désoxy-2-phthalimido ainsi que les promoteurs associés à chacun.

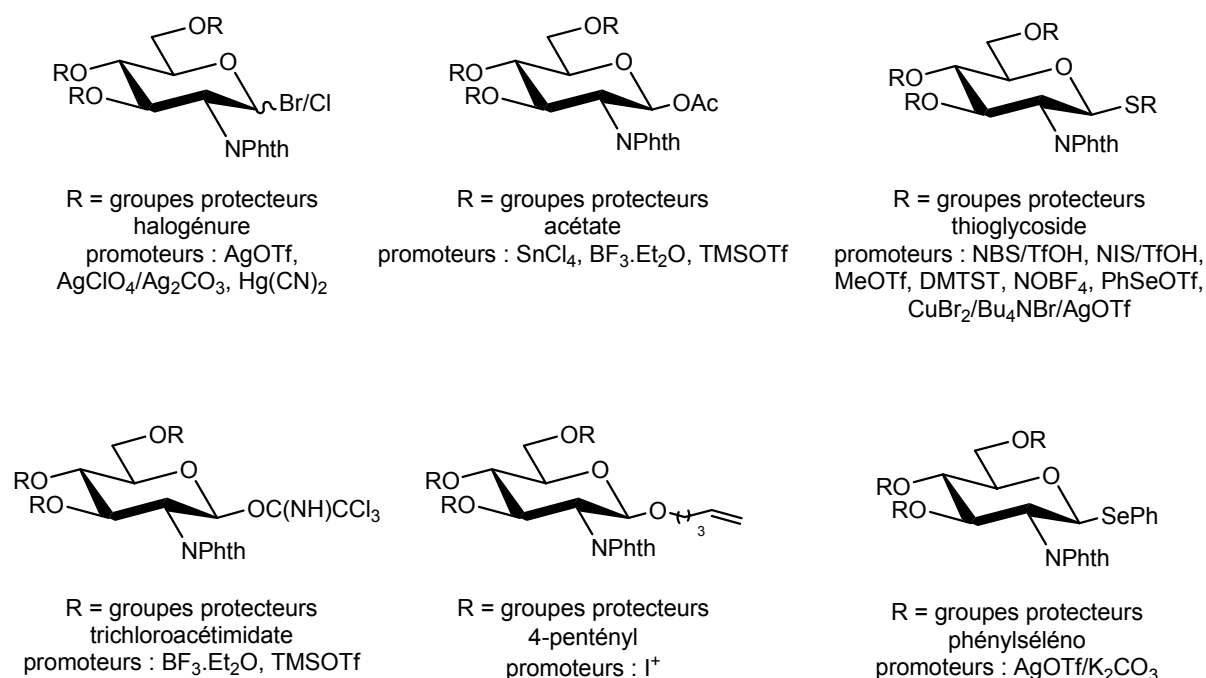


Schéma 27 : donneurs de glycosyle 2-désoxy-2-phthalimido et leurs promoteurs

La plupart du temps, les réactions de glycosylation menées par la méthode phthalimido permettent d'obtenir une liaison glycosidique 1,2-*trans*. Les rendements sont bons et l'introduction de nouveaux groupes partants a permis d'améliorer cette procédure. Néanmoins, la déprotection du groupe phthalimido est effectuée par une hydrazinolyse avec 85% d'hydrate d'hydrazine dans l'éthanol et à reflux, ou avec la butylamine au reflux du méthanol, ou encore avec l'hydroxylamine, l'acétate d'hydrazine ou NaBH<sub>4</sub>. Cette réaction de déprotection a lieu en milieu alcalin, ce qui peut être un inconvénient si l'oligosaccharide obtenu est sensible aux conditions basiques.

#### 4.3.4. Utilisation des donneurs 2-azido-2-désoxy

La fonction azoture n'est pas un groupe participant et n'entraîne pas d'encombrement stérique sur la face  $\alpha$  du donneur de glycosyle. Ce groupement peut donc être utilisé pour obtenir des liaisons glycosidiques de configuration 1,2-*cis*. Les sucres 2-azido-2-désoxy sont préparés selon la procédure développée par R.-U. Lemieux et al. [230] (schéma 28).

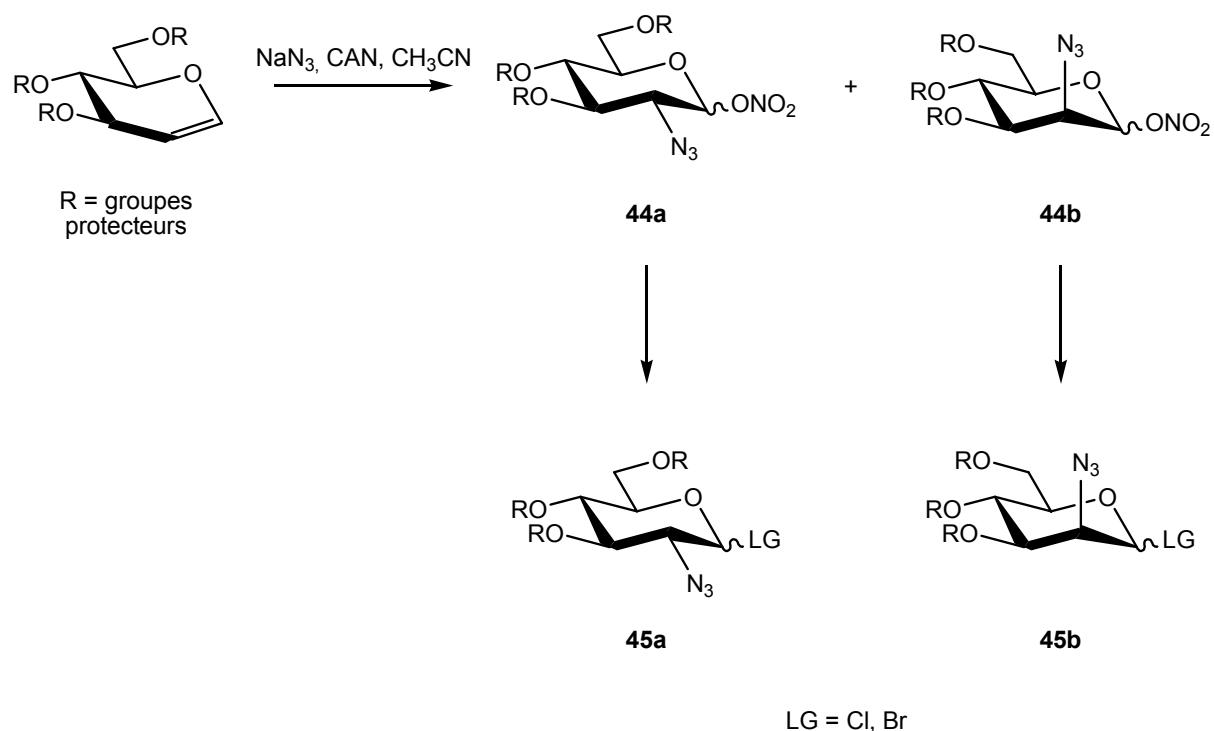
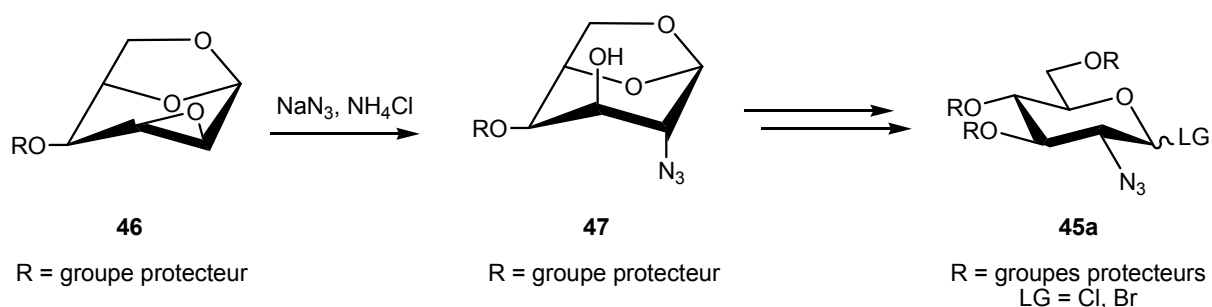


Schéma 28 : préparation des halogénures 2-azido-2-désoxy-glycopyranosyle

L'addition de nitrate d'ammonium et de cérium (IV)  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  (CAN) et d'azoture de sodium au glycal protégé (schéma 28) dans l'acétonitrile à  $-15^\circ\text{C}$  et sous atmosphère d'azote, permet d'obtenir majoritairement le composé équatorial **44a** et également **44b**. Le remplacement de la fonction nitrate des composés **44a,b** en utilisant un sel de bromure ou de chlorure permet de synthétiser les donneurs de glycosyle **45a,b** où LG = Br, Cl.

L'ouverture des 1,6:2,3-dianhydrohexopyranoses **46** par l'azoture de sodium conduit de façon régio- et stéréosélective aux dérivés 2,3-*trans*-diaxiaux-2-azido **47** qui sont ensuite transformés en halogénures de 2-azido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyles **45a** (schéma 29).



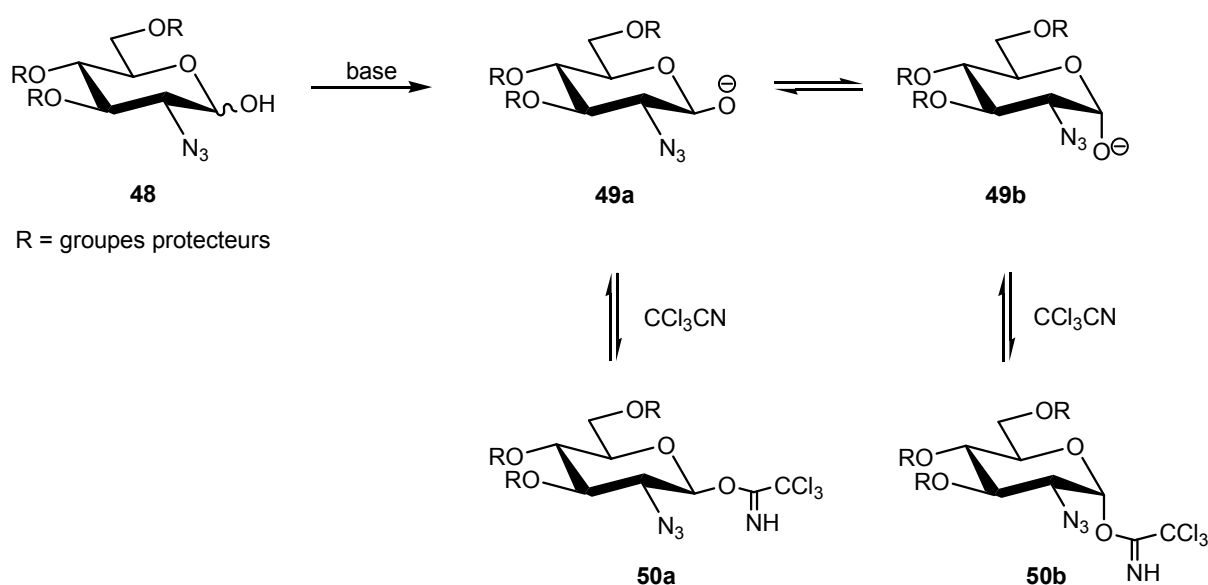
*Schéma 29 : préparation des halogénures de 2-azido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle*

La stéréosélectivité de la réaction de glycosylation dépend de la nature du promoteur et du groupe partant.

Les halogénures de 2-azido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle sont les donneurs de glycosyle les plus employés de cette famille. Une réaction de glycosylation menée avec un donneur de glycosyle qui est un halogénure de 2-azido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle et un promoteur soluble conduit à un glycoside 1,2-*cis*. Ce type de liaison glycosidique requiert que le groupe protecteur de la fonction amine ne soit pas un groupe participant, que ce dernier ne soit pas encombré et que de plus, le groupe partant soit orienté 1,2-*trans*. Tous ces paramètres vont permettre à l'accepteur d'attaquer le donneur de glycosyle sur la face où se trouve le groupe amine, créant ainsi une liaison glycosidique 1,2-*cis*. Les chlorures de 2-azido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle sont activés par  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CdCO}_3$ ,  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ , et les bromures de 2-azido-2-désoxy- $\alpha$ -D-glycopyranosyle peuvent être utilisés en

présence d'un promoteur qui permettra la formation *in situ* de l'anomère  $\beta$  comme  $\text{Hg}(\text{CN})_2/\text{HgBr}_2$ ,  $\text{AgOTf}$  ou  $\text{AgClO}_4/\text{Ag}_2\text{CO}_3$  pour entraîner la formation d'une liaison glycosidique 1,2-*cis*.

Schmidt [231] a introduit le trichloroacétimide comme groupe partant dans les conditions décrites dans le schéma 30.



*Schéma 30 : préparation du trichloroacétimide de 2-azido-2-désoxy-D-glucofuranose*

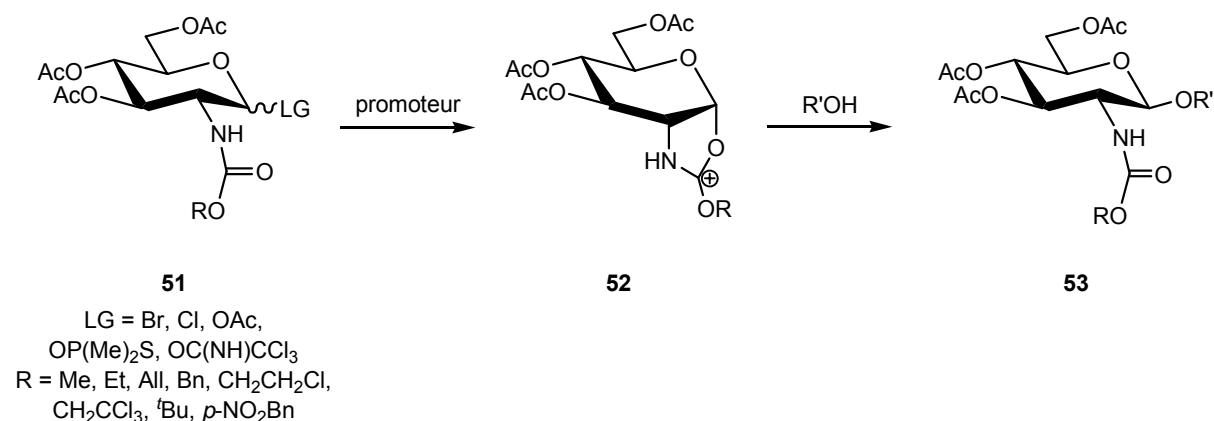
L'anomère  $\alpha$  ou  $\beta$  peut être sélectivement obtenu selon la nature de la base. Une base faible comme  $\text{K}_2\text{CO}_3$  conduira à l'anomère  $\beta$  **50a** (produit cinétiquement contrôlé) et une base forte du type  $\text{NaH}$  permettra la formation de l'anomère  $\alpha$  **50b** (produit thermodynamiquement contrôlé). Lorsque l'imide  $\alpha$  **50b** est utilisé comme donneur de glycosyle, la réaction de glycosylation en présence de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  conduit au glycoside de configuration  $\beta$  avec de bons rendements. Si le donneur de glycosyle est l'imide  $\beta$ , la glycosylation en présence de  $\text{TMSOTf}$  permet d'obtenir le glycoside de configuration  $\alpha$ .

Le groupe  $\beta$ -1-thioalkyle peut également être employé comme groupe partant pour former un glycoside de configuration  $\alpha$ . Le promoteur peut être choisi parmi  $\text{MeOTf}$ ,  $\text{DMTST}$ ,  $\text{RSOTf}$  ( $\text{R} = \text{alkyl}$ ),  $\text{PhSeOTf}$ ,  $\text{NOBF}_4$  ou un halonium.

Selon le groupe partant choisi et la nature du promoteur, une liaison glycosidique 1,2-*trans* ou 1,2-*cis* peut être obtenue. En raison du caractère non participant du groupe azoture, il s'agit d'une méthode de choix pour la préparation de glycosides 1,2-*cis*. Cette méthode peut également être utilisée pour former une liaison glycosidique 1,2-*trans* lorsque le glycoside est sensible aux conditions acides et basiques des méthodes oxazoline et phthalimido puisque le groupement amine est obtenu par simple réduction de l'azoture.

#### 4.3.5. Utilisation des donneurs 2-(alkoxycarbonyl)amino-2-désoxy

L'utilisation des sucres 2-(alkoxycarbonyl)amino-2-désoxy **51** comme donneurs de glycosyle est une voie très intéressante pour effectuer une réaction de glycosylation. Le groupe protecteur carbamate est un groupe participant qui va conduire à la formation de l'azadioxocarbénium cyclique **52**. L'addition de l'accepteur permet ensuite de créer une liaison glycosidique 1,2-*trans* (schéma 31). De plus, le carbamate peut être déprotégé sélectivement pour donner la fonction amine sans toucher aux autres groupes protecteurs.



*Schéma 31 : utilisation des sucres 2-(alkoxycarbonyl)amino-2-désoxy comme donneurs de glycosyle*

Le premier exemple dans la littérature de l'utilisation de ce type de donneur de glycosyle met en jeu le bromure de 3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-(benzyloxycarbonyl)amino-

2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyle (LG =  $\alpha$ -Br, R = Bn) comme donneur de glycosyle, l'accepteur est le méthanol et le promoteur est  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  [232].

L'utilisation des dérivés *N*-allyloxycarbonyl de la D-glucosamine a permis la préparation de  $\beta$ -glucosides d'alcools simples mais également de disaccharides avec de très bons rendements (un disaccharide a été isolé avec un rendement de 86%) [233-240].

Cette procédure a ensuite été généralisée et divers substituants *N*-alkoxycarbonyl ont été étudiés dans les réactions de  $\beta$ -glycosylation avec les dérivés 2-amino-2-désoxy-D-glucose (rendement maximum obtenu = 81%) [241].

Cette méthode est une très bonne alternative pour la synthèse des glycosides 2-amino-2-désoxy de configuration 1,2-*trans*. Le groupe protecteur est stable (excepté dans des conditions très basiques), les rendements sont bons et la fonction amine peut être déprotégée sélectivement.

Différentes méthodes ont été développées afin de permettre la formation de liaisons glycosidiques de configuration déterminée. Grâce à l'utilisation de divers groupes protecteurs de la fonction amine, il est possible de synthétiser de nombreuses structures d'oligosaccharides 2-amino-2-désoxy, notamment des chitooligosaccharides.

## 5. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons détaillé les propriétés biologiques particulières des chitooligosaccharides, mettant en évidence le fort potentiel de cette famille de molécules. Les nombreuses applications qu'ils pourraient offrir dans les domaines de la médecine, de la pharmacie, de l'agriculture, de l'industrie alimentaire ou encore des cosmétiques illustrent parfaitement cet aspect.

Les activités biologiques des oligomères de chitine et chitosane ont été étudiées, dans la plupart des cas, en utilisant des mélanges de chitooligosaccharides. La taille et la structure des oligomères possédant l'activité biologique sont donc méconnues. C'est pourquoi nous avons décidé de mettre au point une nouvelle méthode de préparation des chitooligosaccharides. Afin d'obtenir un contrôle parfait des degrés de polymérisation et d'acétylation ainsi que de la distribution des deux unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, nous avons choisi de préparer nos chitooligosaccharides par synthèse chimique. En effet, les méthodes par dégradation du polymère ne permettent pas d'obtenir des structures parfaitement définies. Or, obtenir des chitooligosaccharides parfaitement définis est indispensable pour établir une relation structure - activité.

Après avoir étudié les différentes méthodes de synthèse des oligosaccharides de 2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle et de N-acétyl-2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyle, nous avons mis au point une stratégie permettant de synthétiser les chitooligosaccharides avec un parfait contrôle des paramètres évoqués ci-dessus.

# *C- Résultats et discussion*

# 1. Introduction

Notre objectif est de synthétiser des chitooligosaccharides possédant une structure et une architecture parfaitement définies, c'est-à-dire avec un contrôle parfait des degrés de polymérisation et d'acétylation, ainsi que de la distribution des deux unités constitutives D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine.

Une étude bibliographique a permis de mettre en avant les limites des méthodes de préparation des chitooligosaccharides par dégradation de la chitine ou du chitosane concernant le contrôle de ces paramètres. En effet, le clivage des liaisons glycosidiques se produit de façon quasi aléatoire. Même si lors de la désamination nitreuse le degré de polymérisation peut être fixé en ajustant la quantité d'acide nitreux, le degré d'acétylation ou la distribution des deux unités constitutives ne peuvent être contrôlés. Ces méthodes conduisent alors à des mélanges de chitooligosaccharides correspondant à un degré de polymérisation moyen et avec des rendements médiocres.

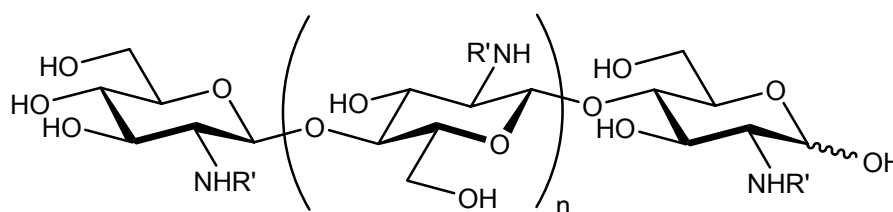
La voie par synthèse permet, par assemblage de blocs de construction monosaccharide définis, de toujours contrôler la structure de l'oligosaccharide. Mais la synthèse enzymatique est limitée par la disponibilité des enzymes, leur coût et les faibles rendements obtenus. En revanche, de nombreuses synthèses chimiques de chitooligosaccharides sont reportées, notamment de lipochitooligosaccharides ou de chitobioses. L'utilisation de groupes protecteurs spécifiques de la fonction amine permet de synthétiser de façon efficace des oligosaccharides 2-amino-2-désoxy reliés par une liaison glycosidique  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Il s'agit de la méthode de choix pour obtenir des chitooligosaccharides avec un contrôle parfait des paramètres structuraux. Nous avons alors tenté de mettre au point une stratégie de synthèse chimique permettant d'obtenir des chitooligosaccharides parfaitement définis, et notamment des hétéro-chitooligosaccharides.

Dans ce chapitre, nous décrirons tout d'abord notre stratégie de synthèse puis nous détaillerons la préparation des intermédiaires et les réactions chimiques permettant d'obtenir les chitodisaccharides. Enfin, dans une dernière partie, des analyses physico-chimiques effectuées sur ces composés seront reportées. Ce travail, basé sur l'étude des propriétés électrostatiques des chitodisaccharides,

permettra de déterminer les valeurs de leurs pK apparents et si une loi de comportement peut être établie.

## 2.Stratégie

Les chitooligosaccharides que nous souhaitons synthétiser ont la structure décrite dans le schéma 32.



R' = Ac ou H

Schéma 32 : structure des chitooligosaccharides

Ces oligosaccharides sont constitués d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine reliées par une liaison β-(1→4). La liaison glycosidique entre deux unités constitutives est de configuration 1,2-*trans*.

L'utilisation de groupes protecteurs spécifiques de la fonction amine, l'introduction de groupes protecteurs permanents et temporaires des fonctions alcool, ainsi que le choix du groupe partant, vont nous permettre de synthétiser cette liaison glycosidique.

### 2.1. Groupes protecteurs de la fonction amine

Les groupes protecteurs de la fonction amine doivent orienter la liaison glycosidique en configuration *trans*. Un de ces groupements doit de plus conduire après déprotection à une fonction -NH<sub>2</sub> tandis que l'autre permettra d'obtenir le groupe -NHAc.

La voie couramment employée pour synthétiser des liaisons glycosidiques de configuration *trans* consiste à utiliser un groupe protecteur participant. L'étude bibliographique a montré d'une part que l'utilisation des sucres 2-(benzyloxycarbonyl)amino-2-désoxy (2-NHZ) comme donneurs de glycosyle permet de créer une liaison glycosidique 1,2-*trans* (schéma 31). D'autre part, l'utilisation du trichloroacétyle (TCA) comme groupe protecteur de la fonction amine permet également d'obtenir une liaison glycosidique 1,2-*trans* avec une bonne

stéréosélectivité. Le groupement TCA peut être ensuite facilement converti en fonction *N*-acétyle par réduction radicalaire en présence de 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) et d'hydrure de tributyl étain sans entraîner de modification chimique du benzyloxycarbonyle. Quant à ce dernier, une hydrogénation catalytique en présence de palladium activé sur charbon permet de le cliver, libérant ainsi la fonction amine sans déprotéger le groupe trichloroacétyle.

L'utilisation de ces deux groupes protecteurs orthogonaux a de plus l'avantage de mettre en jeu des réactions d'introduction et de suppression simples et possédant de bons rendements.

En utilisant ces deux groupes protecteurs nous pouvons donc espérer obtenir des oligosaccharides constitués d'unités *D*-glucosamine et *N*-acétyl-*D*-glucosamine reliées par une liaison *trans* glycosidique.

Les deux groupes protecteurs de la fonction amine étant choisis, il faut ensuite considérer la protection des différentes fonctions hydroxyle.

## 2.2. Groupes protecteurs des fonctions hydroxyle

Les oligosaccharides peuvent être synthétisés de façon linéaire ou par blocs. Dans l'approche linéaire, un donneur de glycosyle monosaccharide est couplé à une chaîne oligosaccharide qui s'allonge à chaque addition du donneur monosaccharide. Une stratégie plus efficace consiste à coupler des accepteurs et donneurs de glycosyle oligosaccharides (schéma 33). Il s'agit d'une synthèse dite convergente où le choix des groupes protecteurs utilisés pour protéger les fonctions alcool est très important. Il faut utiliser des groupes protecteurs orthogonaux, c'est-à-dire qu'il doit être possible de déprotéger sélectivement une fonction alcool afin de transformer l'oligosaccharide protégé en un donneur ou accepteur de glycosyle. Les conditions de déprotection conduisant aux oligosaccharides donneurs et accepteurs de glycosyle sont spécifiques aux groupes protecteurs employés et ne sont pas précisées dans le schéma 33 qui est un schéma général illustrant la synthèse convergente des chitooligosaccharides.

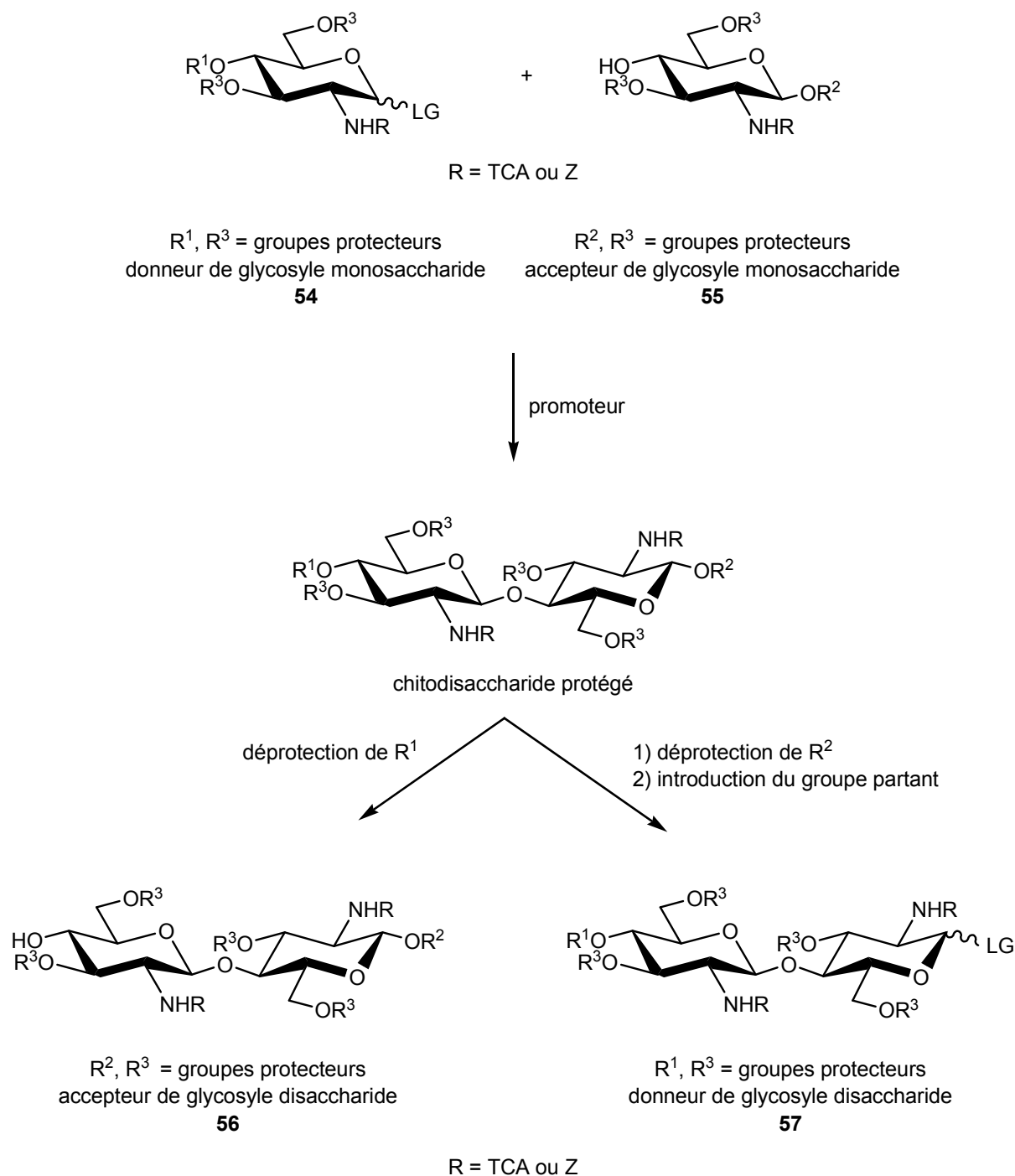


Schéma 33 : synthèse convergente de chitooligosaccharides

Les groupes protecteurs temporaires  $R^1$  et  $R^2$  des fonctions alcool doivent être choisis de façon à permettre leur déprotection sélective pour obtenir un nouveau donneur ou un nouvel accepteur de glycosyle, sans entraîner de modification chimique des groupes protecteurs permanents  $R$  et  $R^3$ . Des critères comme les facilités d'introduction et de suppression avec de bons rendements, ainsi que leur compatibilité, nous ont amené à choisir des groupes protecteurs de type ester,

tel-00628743, version 1 - 4 Oct 2011

silyle et éther. Ces fonctions sont couramment utilisées pour protéger les fonctions alcool, les réactions d'introduction et suppression sont donc bien connues. Enfin, il est possible de déprotéger sélectivement un de ces groupements sans modifier les deux autres. Les groupes protecteurs que nous avons choisis sont les suivants :

- acétyle (Ac) pour l'alcool en position 4 ( $R^1$ )
- *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) pour l'alcool anomère ( $R^2$ )
- benzyle (Bn) pour les autres fonctions alcool ( $R^3$ )

Afin de mettre au point une synthèse efficace, nous utilisons la même stratégie pour chacune des deux unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine. Les groupes protecteurs choisis pour les fonctions alcool seront ainsi identiques pour les deux séries. La seule différence sera bien sûr la nature du groupe protecteur utilisé pour la fonction amine.

La dernière fonction à définir est celle portée par le carbone anomère lors de la réaction de glycosylation : le groupe partant.

### 2.3. Choix du groupe partant

Plusieurs groupes partant peuvent être utilisés dans une réaction de glycosylation. Parmi les exemples de la littérature, les halogénures, les thioéthers, le 4-pentényle et le trichloroacétimidate sont couramment employés [222]. G. Blatter et al. [227] ont montré que ce dernier, en présence du groupement NHTCA en position 2, est un donneur efficace activé par  $BF_3 \cdot Et_2O$  ou TMSOTf pour conduire à de bons rendements de glycosylation. Il est facilement synthétisé à partir du dérivé 1-hydroxyle en présence de trichloroacétonitrile et d'une base. Selon la base employée, l'anomère  $\beta$  (produit cinétiquement contrôlé) ou  $\alpha$  (produit thermodynamiquement contrôlé) peut être obtenu (schéma 30). Comme pour les groupes protecteurs des fonctions hydroxyle, le groupe partant sera le même dans les deux séries.

## 2.4. Structure des monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine

En prenant en compte les différentes contraintes liées au choix des groupes protecteurs des fonctions amine et alcool nécessaires à la synthèse chimique des chitooligosaccharides, les monosaccharides que nous utiliserons en tant que donneurs de glycosyle pour cette synthèse sont les composés **58** et **59** décrits dans les schémas 34a et 34b.

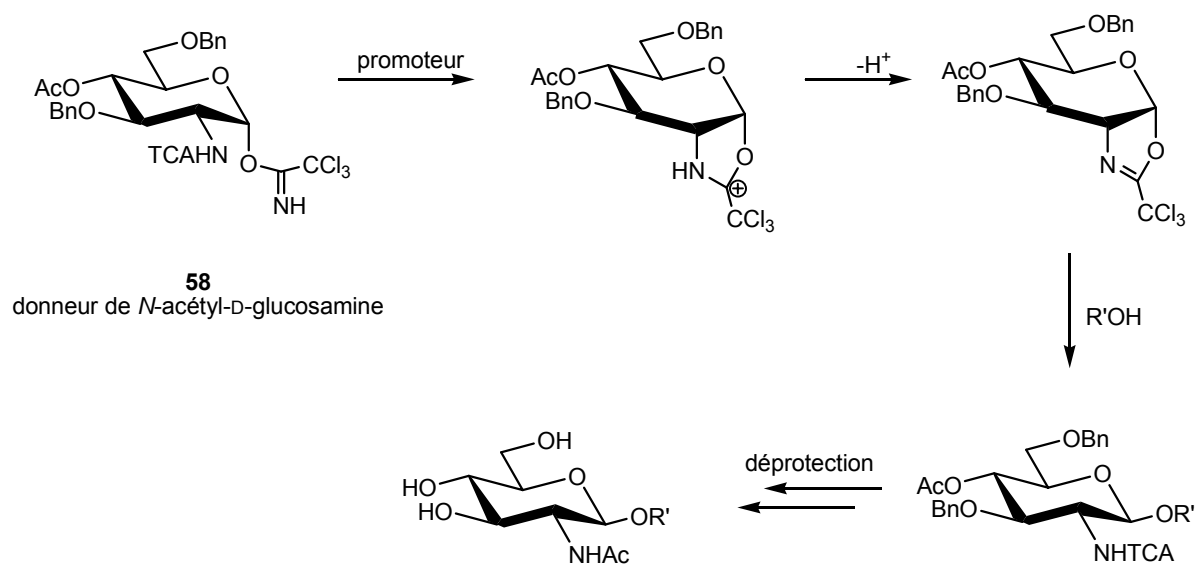


Schéma 34a : donneur de N-acétyl-D-glucosamine

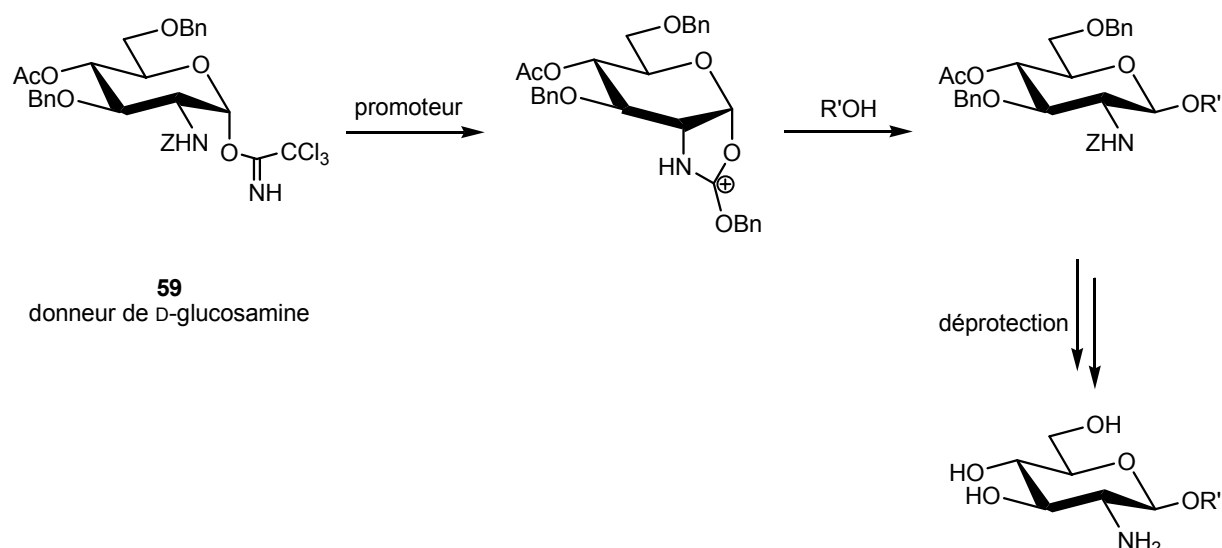


Schéma 34b : donneur de D-glucosamine

Pour les accepteurs R'OH, nous choisirons les dérivés **60** et **61** décrits dans le schéma 35.

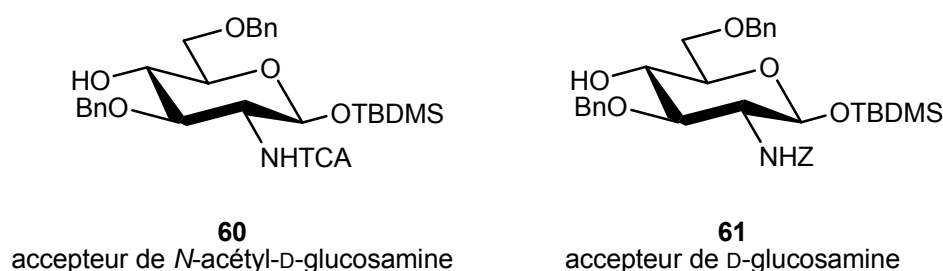


Schéma 35 : accepteurs de N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine

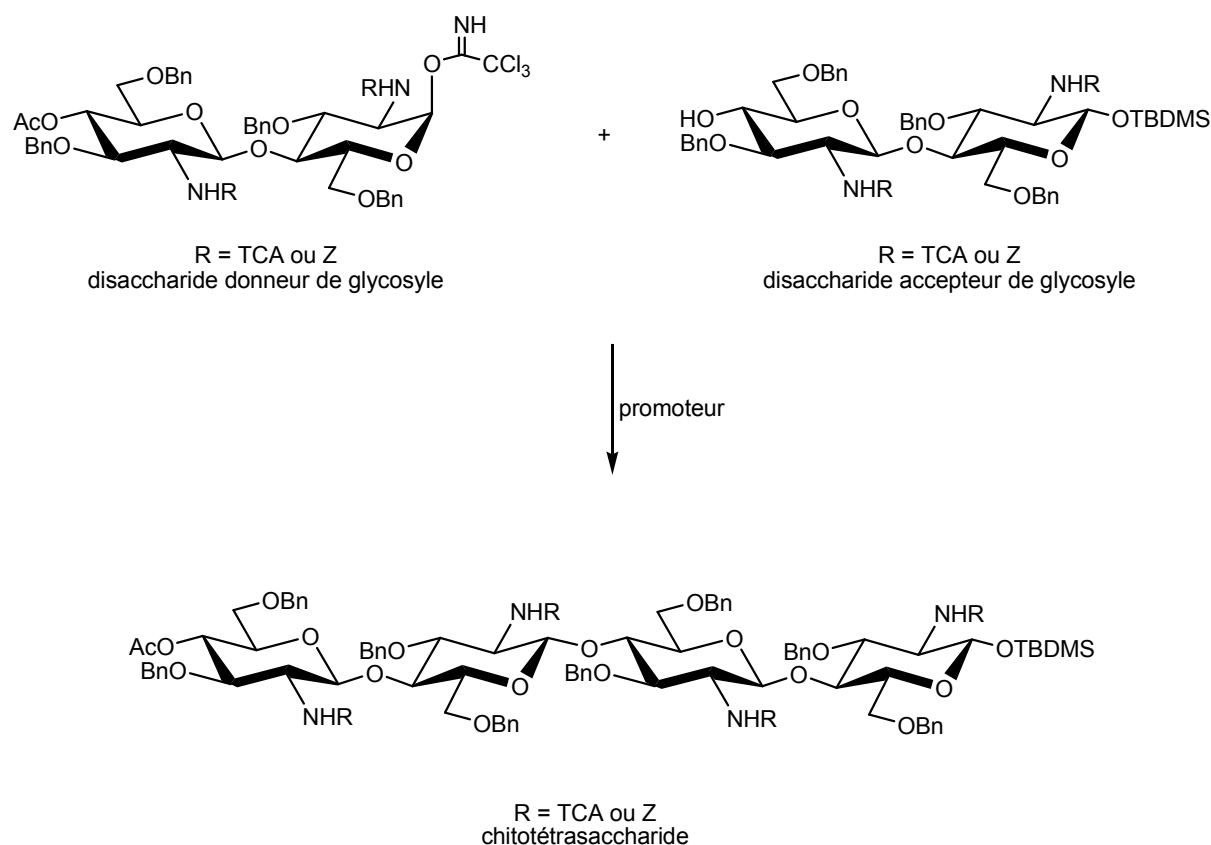
Ces quatre monosaccharides sont tous des dérivés 2-amino-2-désoxy-D-glucopyranose. Ils pourront donc être synthétisés de façon avantageuse selon un protocole multi-étapes à partir d'une molécule commune, commerciale et peu chère : le chlorhydrate de D-glucosamine.

Les accepteurs **60** et **61** possèdent leur seule fonction hydroxyle libre en position 4. Les donneurs **58** et **59** portent le groupe partant trichloroacétimide en position anomère. La fonction amine en position 2 est protégée par un groupe participant qui conduira après déprotection à une fonction -NH<sub>2</sub> ou -NHAc. Ces conditions nous permettront, après une réaction de couplage suivie d'un protocole multi-étapes de déprotection, d'obtenir des disaccharides constitués d'unités D-

glucosamine et *N*-acétyl-*D*-glucosamine reliées par une liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), c'est-à-dire des chitodisaccharides.

## 2.5. Synthèse de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation supérieurs à 2

Le couplage d'un donneur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine ou *D*-glucosamine **58** ou **59** avec un accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine ou *D*-glucosamine **60** ou **61** nous permettra d'obtenir des chitodisaccharides protégés parfaitement définis. Grâce à l'utilisation des groupes protecteurs temporaires des fonctions alcool en position 1 et 4, il sera possible de convertir ces chitodisaccharides soit en donneur soit en accepteur de glycosyle. Ces nouveaux chitodisaccharides nous permettront de synthétiser des chitooligosaccharides possédant un degré de polymérisation supérieur à 2 par synthèse convergente (schéma 33). Par exemple, les chitodisaccharides donneurs et accepteurs de glycosyle pourront être couplés avec un monosaccharide pour obtenir le chitotrisaccharide correspondant. Ils pourront également être couplés entre eux pour former le chitotétrasaccharide (schéma 36).



*Schéma 36 : synthèse convergente d'un chitotétrasaccharide*

Le chitotétrasaccharide ainsi obtenu pourra être totalement déprotégé ou sélectivement converti en donneur (déprotection de l'alcool anomère puis synthèse de l'imidate), ou en accepteur (déprotection de l'acétyle) pour permettre l'allongement de la chaîne oligosaccharide.

Cet exemple montre que notre stratégie, en employant les chitooligosaccharides précédemment obtenus, permettra l'obtention de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation supérieurs par synthèse convergente.

## 2.6. Bilan de la stratégie de synthèse des chitooligosaccharides

Le schéma 37 décrit la stratégie que nous avons mise au point pour synthétiser des chitodisaccharides possédant une structure et une architecture contrôlées.

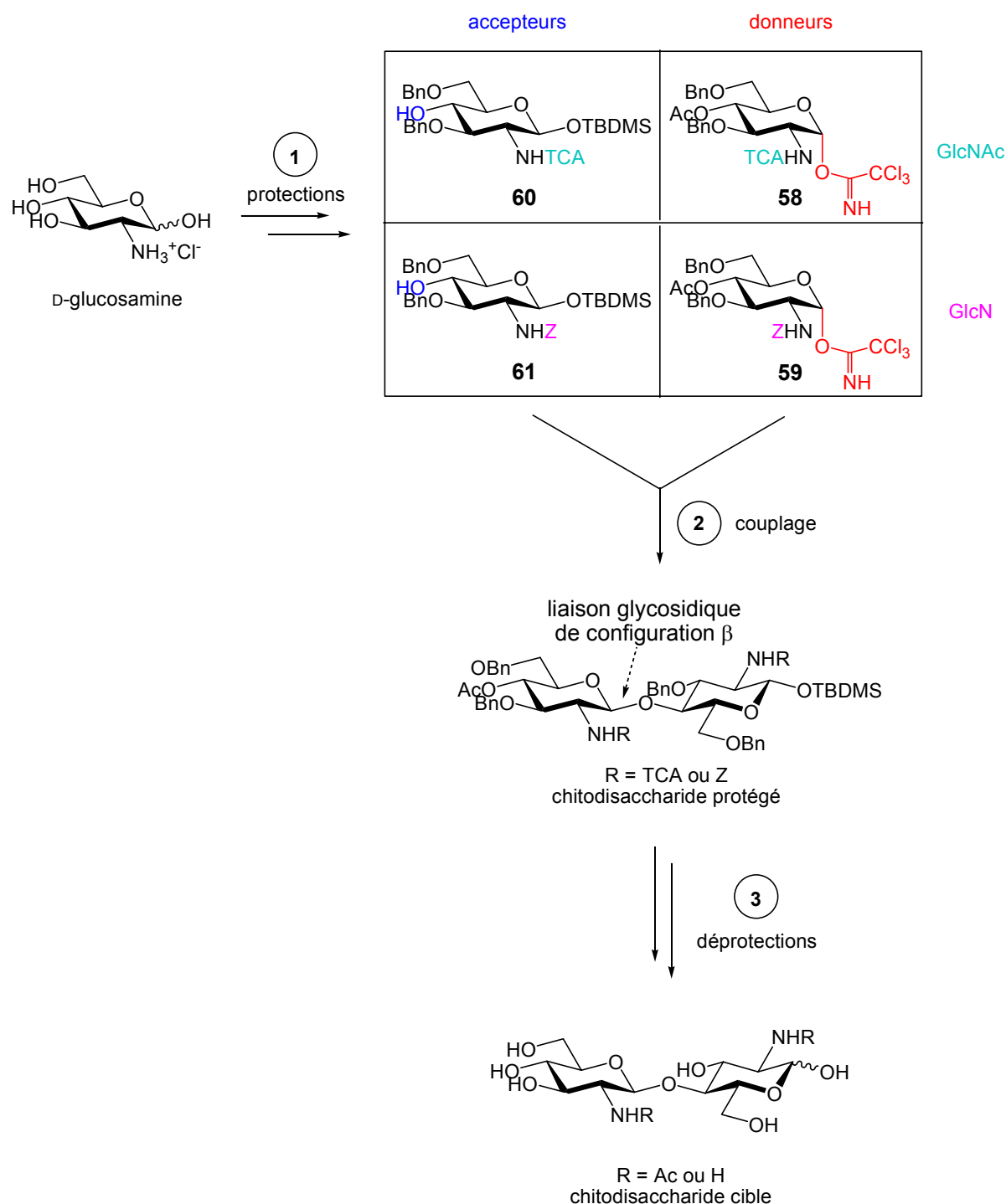


Schéma 37 : stratégie de synthèse des chitodisaccharides

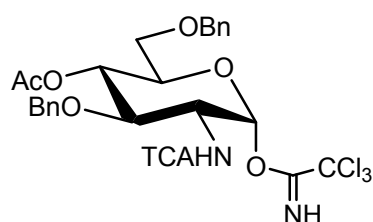
Dans une première phase, un protocole multi-étapes va nous permettre de synthétiser les quatre monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine à partir du chlorhydrate de D-glucosamine. La deuxième phase implique une réaction de couplage entre un des deux donneurs et un des deux accepteurs pour obtenir un chitodisaccharide protégé. En choisissant quel

donneur est couplé avec quel accepteur, nous obtenons un disaccharide dont le degré de polymérisation, le degré d'acétylation et la distribution des deux unités constitutives sont parfaitement contrôlés. Enfin, un protocole multi-étapes de réactions de déprotection conduira au chitodisaccharide cible.

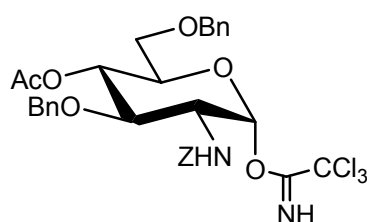
L'utilisation de groupes protecteurs temporaires des fonctions alcool permettra également la préparation de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation supérieurs à 2 par synthèse convergente. En effet, les chitodisaccharides protégés obtenus après le couplage de deux monomères pourront être convertis en nouveaux donneurs ou accepteurs. Cette stratégie permettra ainsi de préparer divers chitooligosaccharides possédant tous un parfait contrôle des trois paramètres clés précédemment cités.

### 3. Synthèse des quatre monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine

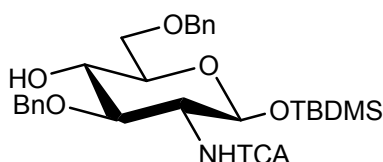
Nous souhaitons préparer des chitooligosaccharides par synthèse chimique à partir des quatre blocs constructifs monosaccharide **58**, **59**, **60** et **61** rappelés dans le schéma 38.



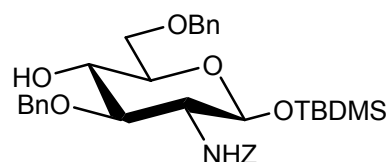
**58**  
donneur de N-acétyl-D-glucosamine



**59**  
donneur de D-glucosamine



**60**  
accepteur de N-acétyl-D-glucosamine



**61**  
accepteur de D-glucosamine

*Schéma 38 : blocs monosaccharide utilisés dans la synthèse convergente des chitooligosaccharides*

#### 3.1. Synthèse des deux monosaccharides donneur et accepteur de D-glucosamine **59** et **61**

##### 3.1.1. Analyse rétrosynthétique

Une analyse rétrosynthétique des monosaccharides donneur et accepteur de D-glucosamine est représentée dans le schéma 39.

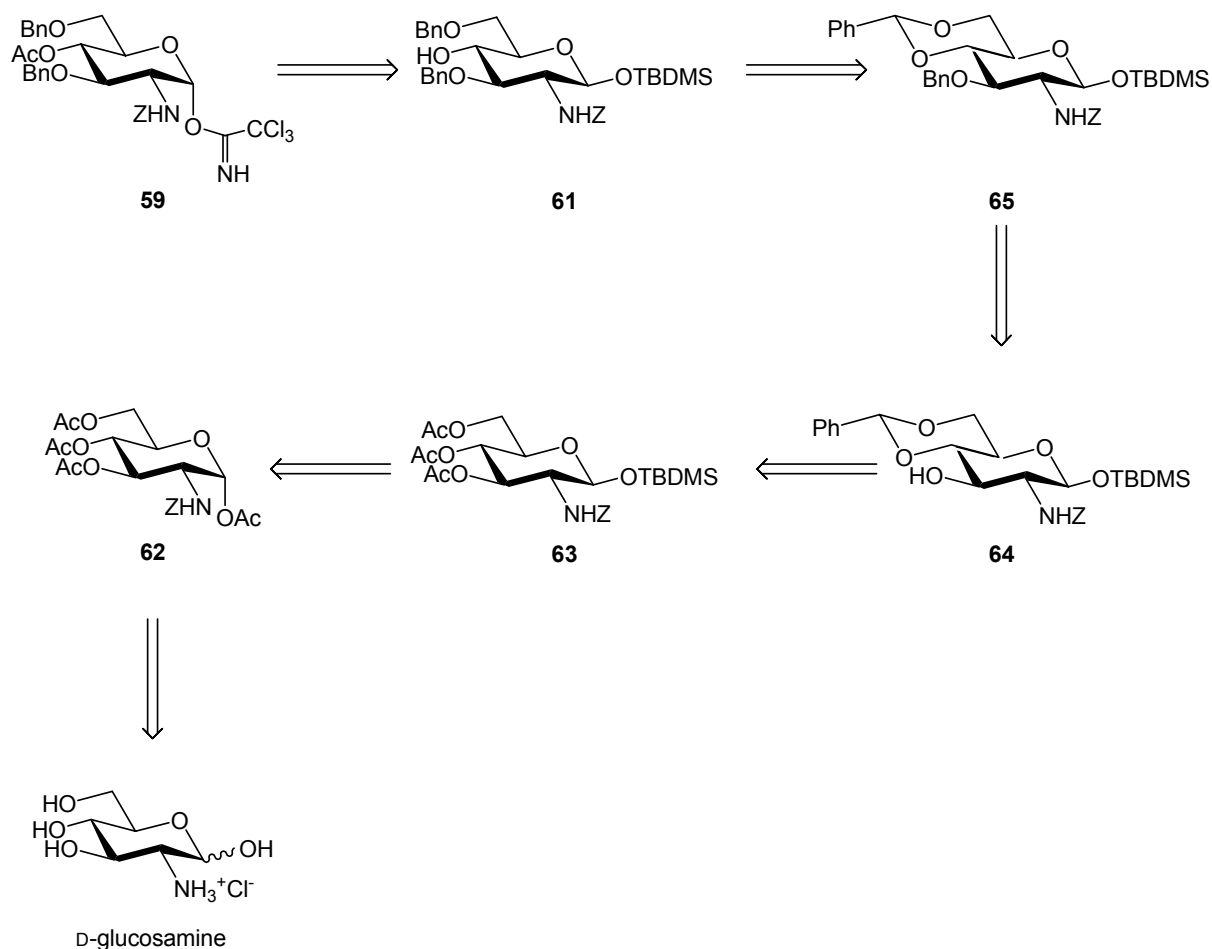


Schéma 39 : analyse rétrosynthétique des donneur et accepteur de D-glucosamine 59 et 61

Le donneur de D-glucosamine **59** peut être efficacement préparé à partir de l'accepteur **61** en déprotégeant le groupement silyle par un fluorure et en formant le groupe partant trichloroacétimide à partir de l'hémiacétal réagissant avec  $\text{CCl}_3\text{CN}$  en présence d'une base.

L'accepteur **61** est lui-même obtenu par ouverture régiosélective de l'acétal de benzylidène **65** résultant de la benzylation de l'alcool en position 3 du composé **64**.

Quant au composé **64**, il est préparé à partir de l'intermédiaire **63** après la suppression des trois groupements acétyles de ce dernier, permettant ainsi la formation de l'acétal de benzylidène après réaction du triol avec le 2,2-diméthoxybenzaldéhyde en présence d'un catalyseur acide.

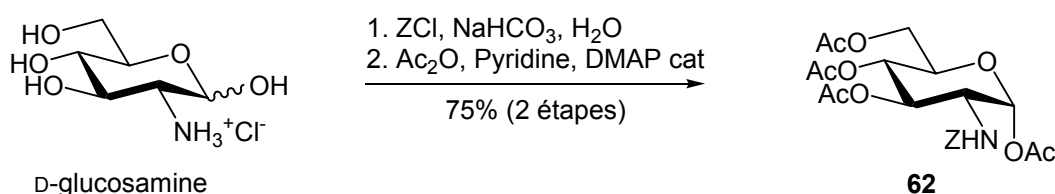
Le groupe protecteur *tert*-butyldiméthylsilyle du composé **63** est quant à lui introduit en faisant réagir le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle avec l'hémiacétal

obtenu après la désacétylation sélective en position anomère de l'intermédiaire tétra acétylé **62**.

Enfin, le produit **62** peut être synthétisé à partir du chlorhydrate de D-glucosamine en introduisant tout d'abord le groupement Z par réaction du chloroformate de benzyle en milieu basique, puis en peracétylant la molécule.

### 3.1.2. Synthèse de l'accepteur de D-glucosamine **61**

La première étape consiste à protéger la fonction amine du chlorhydrate de D-glucosamine puis à peracétyler la molécule pour obtenir le composé tétra acétylé **62** (schéma 40).



*Schéma 40: préparation de l'intermédiaire **62** dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de D-glucosamine*

Dans un premier temps, le chlorhydrate de D-glucosamine est solubilisé dans une solution aqueuse à 0°C rendue basique par l'hydrogencarbonate de sodium (4.5 éq) afin de libérer la fonction amine. Lorsque le produit est totalement dissous, une solution contenant 3 équivalents de chloroformate de benzyle (ZCl) dans de l'acétone est ajoutée de façon contrôlée. Le précipité blanc formé après 15 min de réaction à 0°C est filtré puis lavé par de l'éther.

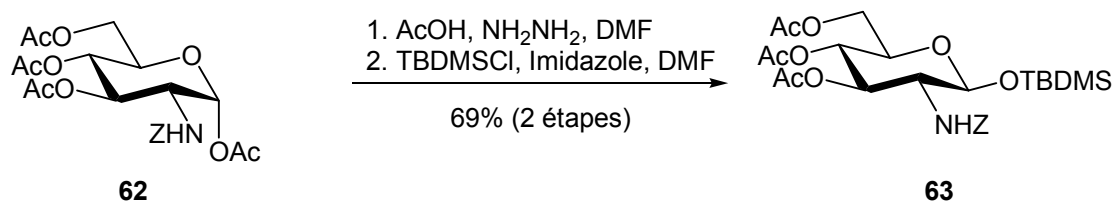
Les quatre fonctions hydroxyle sont ensuite acétylées sans autre purification du précipité. Ce dernier est mis en suspension dans la pyridine et une quantité catalytique de DMAP est ajoutée. Le mélange est refroidi à 0°C avant l'ajout goutte à goutte de deux équivalents d'anhydride acétique par fonction alcool. Lorsque la conversion est totale et après traitement du milieu réactionnel, une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40) conduit au dérivé tétra acétylé **62** sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 75% pour les deux étapes.

Le produit **62** a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . L'étude du spectre  $^1\text{H}$  met en évidence quatre singulets intégrant chacun pour trois protons à 2.16, 2.09, 2.03 et 1.92 ppm caractéristiques des quatre fonctions acétyle. L'introduction du groupement benzyloxycarbonate Z est confirmée par le multiplet intégrant pour cinq protons compris entre 7.36 et 7.33 ppm représentatif du groupe phényle.

Enfin, le groupe acétate sur la position anomère est en configuration  $\alpha$  puisque le spectre révèle un seul signal pour le proton H-1, un doublet dont la constante de couplage  $J_{1,2}$  est 3.57 Hz.

La spectrométrie de masse SM-HR (ES+) a également permis de s'assurer de la structure de l'intermédiaire **62** en confirmant sa masse molaire avec un pic à 504.1480 représentant l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

L'étape suivante consiste à désacétyle sélectivement la position anomère du composé **62** en utilisant de l'acétate d'hydrazine [242], puis à faire réagir l'hémiacétal obtenu avec le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle pour synthétiser l'intermédiaire **63** (schéma 41).



*Schéma 41 : préparation de l'intermédiaire 63 dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de D-glucosamine*

Le composé **62** est dissous dans le DMF puis un excès d'acétate d'hydrazine (1.6 éq) est ajouté. Précisons que l'acétate d'hydrazine utilisé dans cette réaction a été au préalable synthétisé avec un rendement de 67% (après recristallisation dans le méthanol) en faisant réagir un léger excès d'hydrazine (1.15 éq) avec une solution d'acide acétique dans de l'éther.

Un suivi par CCM (Heptane/AcOEt : 50/50) indique qu'au bout de deux heures de réaction le produit est totalement consommé et deux taches de  $R_f$  0.19 et 0.26 représentent les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémiacétal formé. Ce dernier réagit sans

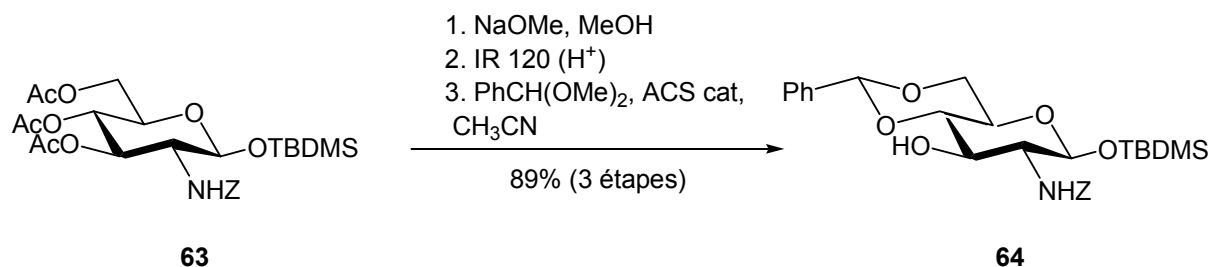
purification préalable avec 1.5 équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle en présence de 2.5 équivalents d'imidazole dans le DMF [243]. Après 16 h de réaction à température ambiante, la réaction est stoppée et l'excès de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle est détruit par ajout de méthanol. Après traitement du milieu réactionnel, une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 40/60) conduit au produit tri-acétylé **63** sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement global de 69% pour les deux étapes.

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  effectuée sur le composé **63** met en évidence la disparition d'un des quatre singulets représentatifs des groupements acétyle et dans le même temps trois singulets intégrant respectivement pour neuf, trois et trois protons apparaissent à 0.86, 0.09 et 0.06 ppm. Il s'agit des signaux caractéristiques du *tert*-butyldiméthylsilyle. En revanche, la configuration du carbone anomère ne peut être définie puisque le signal du proton anomère est superposé avec d'autres signaux. Mais cette dernière pourra être déterminée lors d'une étape ultérieure.

Le composé **63** a également été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  par S. Hanashima et al. [243], et nos analyses sont en accord avec leur description.

Enfin, la spectrométrie de masse MALDI-Tof ayant révélé une masse molaire de 576 g.mol $^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , la structure de l'intermédiaire **63** est confirmée.

Dans la suite du protocole multi-étapes, les trois groupements acétyles de l'intermédiaire **63** sont supprimés dans les conditions classiques de Zemplén [244], puis le triol obtenu réagit avec le 2,2-diméthoxybenzaldéhyde en présence d'un catalyseur acide, l'acide camphosulfonique (ACS) pour conduire au composé **64** (schéma 42).



*Schéma 42 : préparation de l'intermédiaire 64 dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de D-glucosamine*

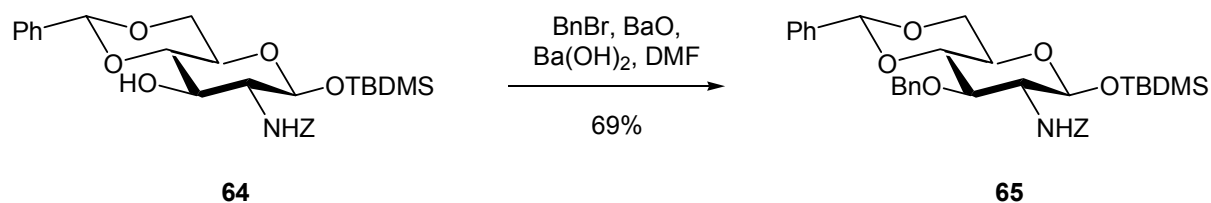
Le composé **63** subit une désacétylation totale dans les conditions de Zemplén [244], c'est-à-dire en présence de méthanolate de sodium dans du méthanol. Pour cela, 0.1 équivalents de sodium par groupement acétyle sont ajoutés à 0 °C à une solution du composé **63** dans le méthanol. Un suivi par CCM (AcOEt) indique que la réaction est généralement terminée au bout d'une heure, et une tache de Rf 0.23 caractérise le produit formé. Le sodium ayant rendu le milieu basique, la solution de triol est finalement neutralisée à l'aide d'une résine acide Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>).

L'intermédiaire triol est ensuite solubilisé sans purification préalable dans l'acétonitrile, puis un excès de 2,2-diméthoxybenzaldéhyde (1.5 éq) et une quantité catalytique d'acide camphosulfonique (4% molaire) sont ajoutés au mélange réactionnel. Le suivi par CCM (Heptane/AcOEt : 50/50) révèle que la formation de l'acétal de benzylidène s'effectue après 5 h de réaction. Ce dernier est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40 + triéthylamine). L'acétal de benzylidène **64** est alors isolé sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement global de 89%.

La structure de ce composé a été confirmée par les analyses RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ou encore la spectrométrie de masse MALDI-Tof. En effet, le spectre RMN <sup>1</sup>H montre la disparition des trois singulets caractéristiques des groupements acétyle. De plus, le multiplet compris entre 7.51 et 7.32 ppm révèle la présence d'un deuxième phényle tandis que le singulet intégrant pour un proton à 5.50 ppm correspond au signal du proton de l'acétal de benzylidène.

Quant à la spectrométrie de masse, elle permet de déterminer une masse molaire de 538 g.mol<sup>-1</sup> caractéristique de l'ion [M+Na]<sup>+</sup>.

L'étape suivante consiste à protéger la fonction alcool libre en position 3 du composé **64** par un groupement benzyle (qui jouera le rôle de groupe protecteur permanent) dans les conditions du schéma 43.



*Schéma 43 : préparation de l'intermédiaire 65 dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de D-glucosamine*

Un premier essai de benzylation dans les conditions classiques (BnBr et NaH) n'a pas permis d'obtenir le produit attendu. Ce résultat étant probablement dû au fait que la fonction carbamate NHZ est sensible aux conditions très basiques, la méthode de *O*-benzylation de ce dérivé doit être effectuée dans des conditions basiques plus douces. Le système bromure de benzyle en présence d'oxyde de baryum et d'hydroxyde de baryum décrit par J.-C. Jacquinet et al. [245] a donc été utilisé.

Ainsi, le composé **63** est dissous dans le DMF puis 4 équivalents d'oxyde de baryum, 0.5 équivalents d'hydroxyde de baryum et un léger excès de bromure de benzyle (1.3 éq) sont successivement ajoutés. La réaction s'effectuant en conditions hétérogènes, 24 h sont nécessaires pour convertir le produit de départ. L'excès de bromure est ensuite détruit par un ajout de méthanol. Conformément au protocole de J.-C. Jacquinet et al. [245], le milieu est dilué dans du dichlorométhane et lavé par une solution aqueuse contenant 60% d'acide acétique puis par de la saumure. L'ajout d'acide acétique permet de former le sel Ba(OAc)<sub>2</sub> qui, étant soluble dans l'eau, sera éliminé par lavage. Mais, adapté à notre structure contenant un acétal de benzylidène sensible aux conditions acides, ce traitement entraîne une dégradation du produit. L'utilisation d'une solution aqueuse contenant 20% d'acide acétique a permis de limiter la dégradation tout en éliminant les sels de baryum. Une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 80/20 + triéthylamine) a conduit au dérivé 3-*O*-benzylé **65** sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 69%.

La caractérisation par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ainsi que la spectrométrie de masse par électrospray ont confirmé la structure du composé **65**. Le spectre <sup>1</sup>H révèle l'apparition d'un troisième groupement phényle dans le multiplet compris entre

7.53 et 7.28 ppm qui intègre désormais pour quinze protons. De plus, le multiplet de deux protons à 4.74 ppm est caractéristique du CH<sub>2</sub> de la fonction benzyle.

L'introduction du groupement benzyle est également confirmée par la spectrométrie de masse qui fait apparaître un signal à 628 g.mol<sup>-1</sup> représentant l'ion [M+Na]<sup>+</sup>.

La dernière étape pour obtenir l'accepteur de D-glucosamine **61** consiste en une ouverture régiosélective de l'acétal de benzyldène permettant d'obtenir le dérivé 6-O-benzyl-4-hydroxy (schéma 44).

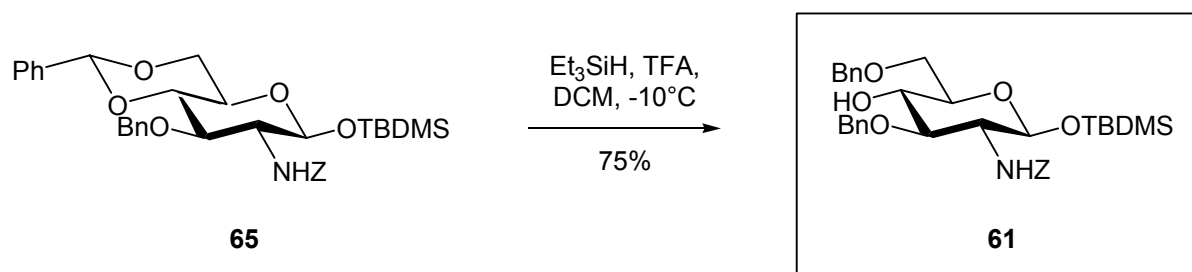


Schéma 44 : préparation de l'accepteur de D-glucosamine **61**

M.-P. DeNinno et al. [246] ont décrit l'utilisation du système triéthylsilane - acide trifluoroacétique pour obtenir ce dérivé à partir de l'acétal de benzyldène. Nous avons suivi ce mode opératoire et le composé **65** a été dissous dans le dichlorométhane anhydre et refroidi à 0°C avant l'ajout de 10 équivalents de triéthylsilane. 10 équivalents d'acide trifluoroacétique ont ensuite été additionnés de façon contrôlée. La température du milieu réactionnel remonte progressivement à l'ambiante et la réaction est suivie par CCM (Heptane/AcOEt : 70/30). Des produits de dégradation sont observés. Une purification à l'aide d'une chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30) permet d'isoler une petite fraction du produit voulu ainsi que le produit de dégradation qui est majoritaire (70%). Une analyse RMN <sup>1</sup>H a mis en évidence la disparition d'un groupement benzyle. Le produit de dégradation est donc le diol résultant de l'hydrolyse de l'acétal de benzyldène. L'utilisation de dichlorométhane et de tamis moléculaire 3 Å diminue la proportion de diol formé, mais ce dernier reste le produit majoritaire (60%). De nouveaux essais au cours desquels la température

reste constante à 0°C ont été menés. Le temps de réaction est difficile à déterminer. En effet, les suivis par CCM mettent en évidence qu'un temps de réaction de quelques minutes ne permet pas une conversion totale. Mais lorsque cette dernière est suffisamment avancée, le produit majoritaire est le diol. Nous avons à nouveau abaissé la température et la réaction a été conduite à -10°C. Dans ces conditions la formation du diol est limitée et une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30) permet de séparer les deux produits et le composé **61** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 75%.

L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  a confirmé la présence de trois groupements benzyle. En effet, le multiplet compris entre 7.41 et 7.25 ppm intègre pour quinze protons, soit trois phényles. De plus, deux multiplets à 4.71 et 4.57 ppm, intégrant chacun pour deux protons, mettent en évidence les signaux des  $\text{CH}_2$  des groupements OBn. Enfin, le singulet à 2.95 ppm, caractéristique d'une fonction alcool, confirme la formation de l'accepteur. Quant à la position des deux groupes *O*-benzyle, elle a été établie grâce à des analyses RMN à deux dimensions de type COSY, HSQC et HMBC. Les taches de corrélation proton-proton ainsi que proton-carbone courte et longue distances ont mis en évidence que ces deux groupements se trouvent en positions 3 et 6.

Enfin, la spectrométrie de masse par électrospray a confirmé la masse molaire de l'accepteur de *D*-glucosamine en faisant apparaître un signal à 630  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , représentatif de l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### 3.1.3. Synthèse du donneur de *D*-glucosamine **59**

Le donneur de *D*-glucosamine **59** est synthétisé en trois étapes à partir de l'accepteur de *D*-glucosamine **61** dans les conditions du schéma 45.

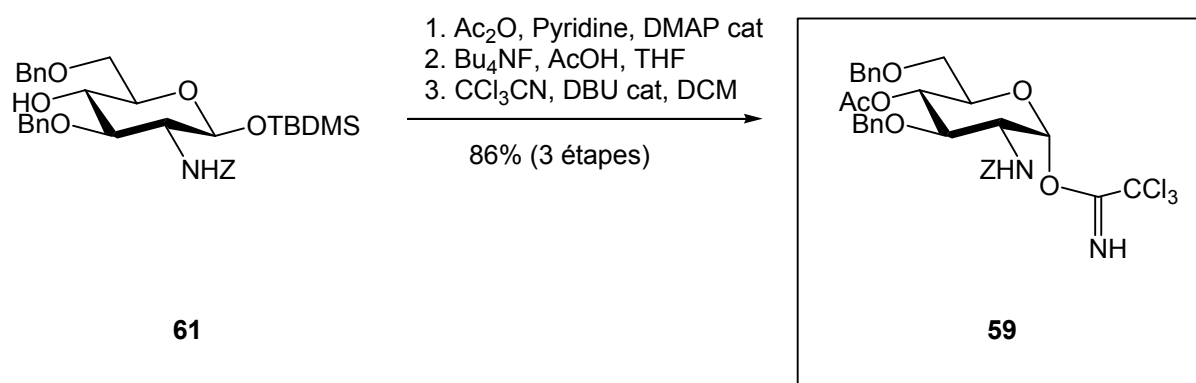


Schéma 45 : préparation du donneur de D-glucosamine 59

Tout d'abord la fonction hydroxyle libre en position 4 est acétylée dans les conditions classiques (anhydride acétique/pyridine en présence d'une quantité catalytique de DMAP) puis le résidu est purifié par recristallisation dans un mélange AcOEt/Heptane : 50/50.

L'analyse RMN <sup>1</sup>H des cristaux blancs obtenus avec un rendement de 91% permet de mettre en évidence la formation du groupement acétyle avec l'apparition d'un singulet intégrant pour trois protons à 1.87 ppm. De même, la spectrométrie de masse par électrospray révèle une masse molaire de 672 g.mol<sup>-1</sup> pour l'ion [M+Na]<sup>+</sup>. L'augmentation de 42 g.mol<sup>-1</sup> par rapport au composé précédent est caractéristique de l'introduction du groupement acétyle.

Le groupe *tert*-butyldiméthylsilyle est ensuite clivé en présence d'un léger excès de fluorure de tétrabutylammonium (1.2 éq) et d'acide acétique (1.2 éq) dans le THF [247]. Un suivi par CCM (Heptane/AcOEt : 70/30) met en évidence la disparition du produit de départ (R<sub>f</sub> = 0.52) et deux taches représentatives des anomères α et β apparaissent (R<sub>f</sub> = 0.32 et 0.39). L'hémiacétal ainsi obtenu réagit sans purification préalable à température ambiante avec 10 équivalents de trichloroacétonitrile en présence de la base forte 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU) en quantité catalytique (25% molaire). Le solvant de la réaction est le dichlorométhane, qui a été distillé afin d'éviter la présence d'eau qui risquerait d'hydrolyser l'imidate formé. Après 5 h de réaction, le solvant est évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif, à température ambiante, afin d'éviter la dégradation de l'imidate. Une purification par chromatographie liquide sur gel de silice

(Heptane/AcOEt : 70/30 + triéthylamine) permet d'isoler l'imidate sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 95% pour les deux dernières étapes et un rendement global de 86% pour les trois étapes.

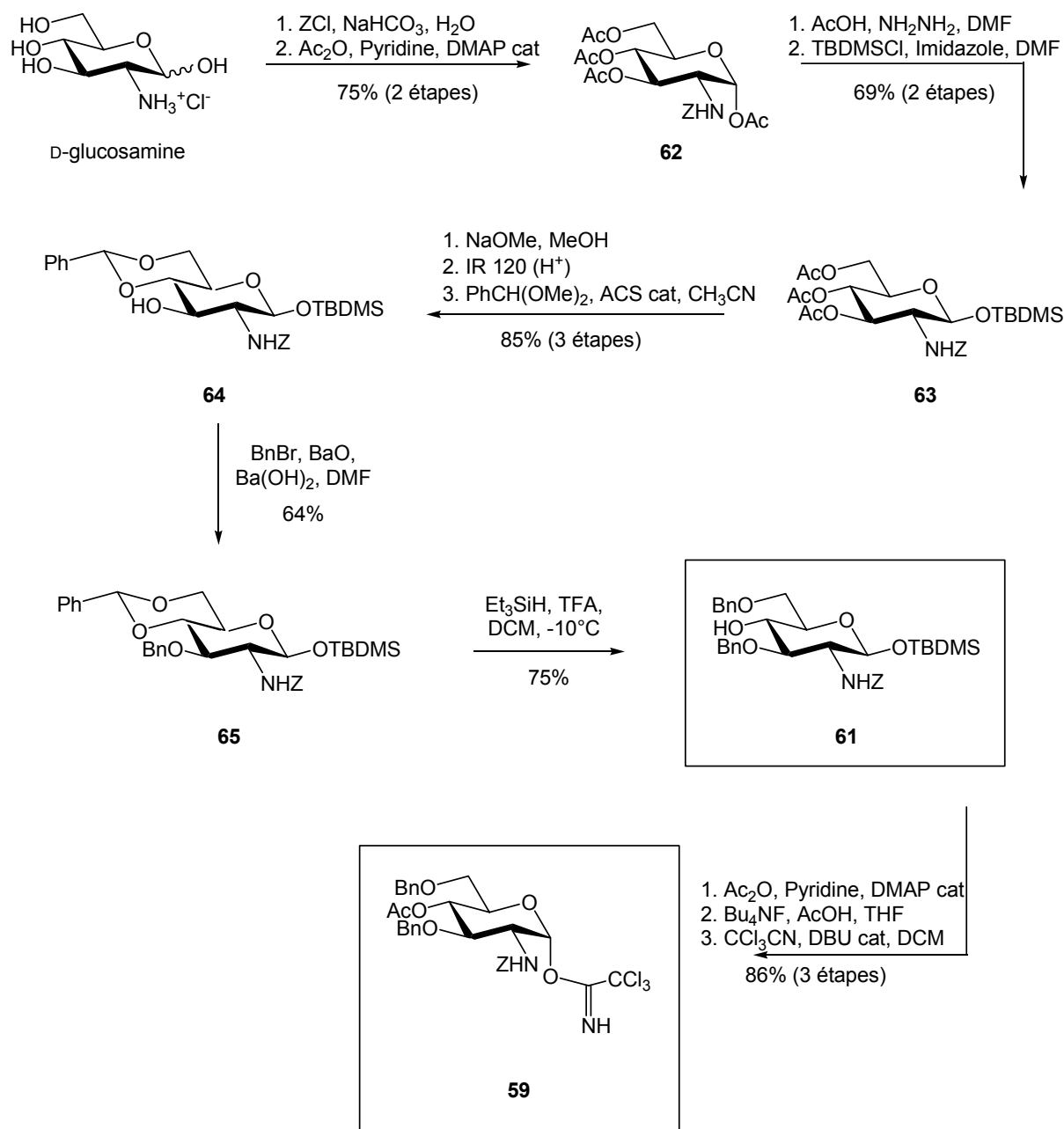
La formation de l'imidate a été confirmée par l'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **59**. Les trois singulets caractéristiques du groupe *tert*-butyldiméthylsilyle ont disparu. Dans le même temps, un singulet intégrant pour un proton est apparu à 8.69 ppm. Il s'agit du signal du groupe NH de l'imidate. La RMN  $^{13}\text{C}$  montre également l'apparition de pics à 160.2 et 91.0 ppm représentant respectivement les carbones quaternaires C=NH et  $\text{CCl}_3$  de l'imidate.

Le groupe partant possède la configuration  $\alpha$ . En effet, un seul signal est observé pour le proton anomère. Il s'agit d'un doublet dont la constante de couplage  $J_{1,2}$  vaut 3.2 Hz.

La structure du donneur de D-glucosamine est également confirmée par la spectrométrie de masse par électrospray qui met en évidence une masse molaire de  $518 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}-\text{CCl}_3\text{CONH}]^+$ .

### 3.1.4. Bilan de la synthèse des deux monosaccharides donneur et accepteur de D-glucosamine **59** et **61**

Cette synthèse multi-étapes résumée dans le schéma 46 permet d'obtenir environ 5 g d'accepteur de D-glucosamine **61** à partir de 10 g de chlorhydrate de D-glucosamine en neuf étapes avec un rendement global de 21%. Quant au donneur de D-glucosamine **59**, il est préparé à partir de l'accepteur en trois étapes avec un rendement de 86%.



Sch\u00e9ma 46 : synth\u00e8se multi-\u00e9tapes des donneur et accepteur de D-glucosamine

## 3.2. Synth\u00e8se des deux monosaccharides donneur et accepteur de N-ac\u00e9tyl-D-glucosamine **58** et **60**

### 3.2.1. Analyse r\u00e9trosynth\u00e9tique

Les donneur et accepteur de N-ac\u00e9tyl-D-glucosamine **58** et **60** sont pr\u00e9par\u00e9s \u00e0 partir des interm\u00e9diaires d\u00e9crits dans l'analyse r\u00e9trosynth\u00e9tique du sch\u00e9ma 47.

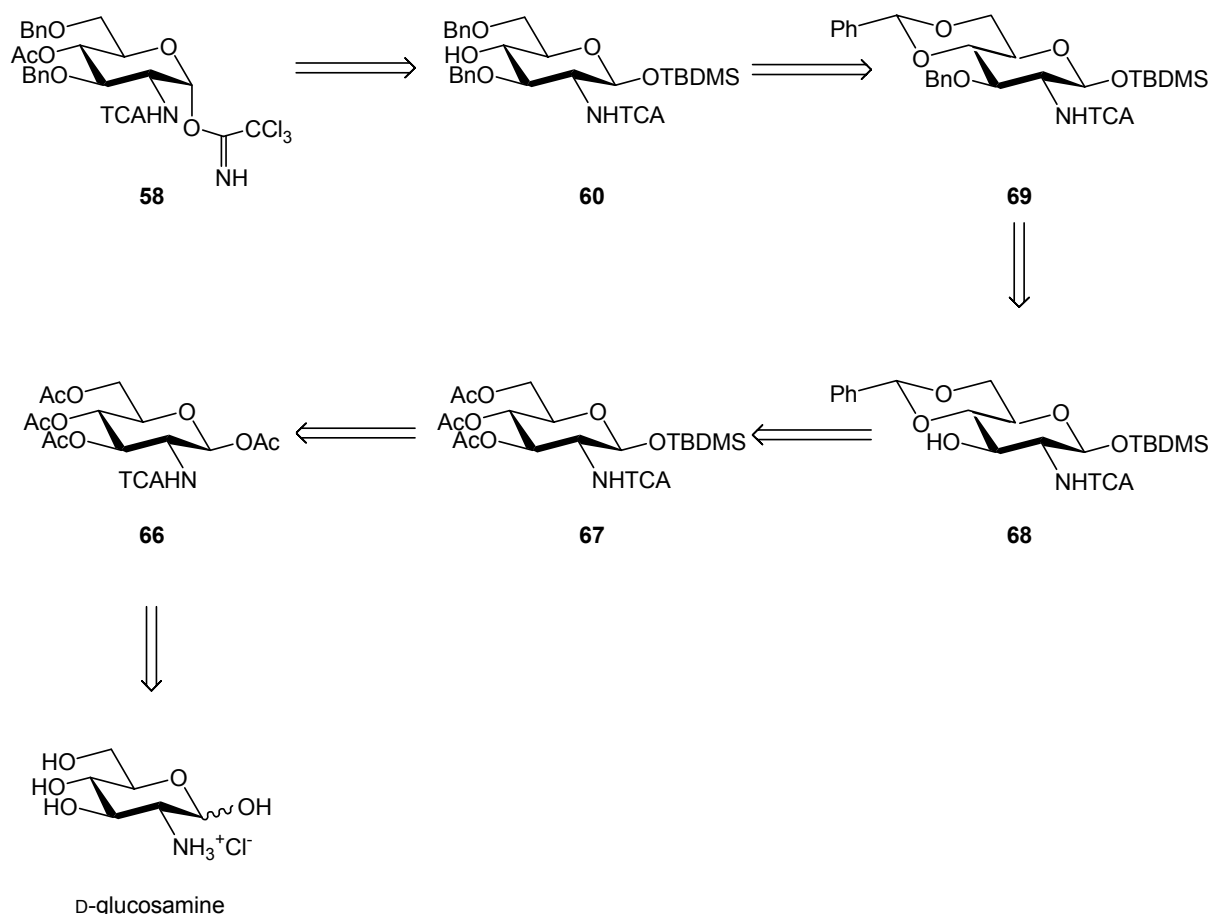


Schéma 47 : analyse rétrosynthétique des donneur et accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine

La stratégie utilisée pour préparer les donneur et accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine est la même que celle précédemment décrite pour la synthèse des donneur et accepteur de *D*-glucosamine.

Le donneur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine **58** peut ainsi être efficacement préparé à partir de l'accepteur **60** en déprotégeant le groupement silyle par un fluorure et en formant le groupe partant trichloroacétimide à partir de l'hémiacétal réagissant avec CCl<sub>3</sub>CN en présence d'une base.

L'accepteur **60** est lui-même obtenu par ouverture régiosélective de l'acétal de benzylidène **69** résultant de la benzoylation de l'alcool en position 3 du composé **68** selon la méthode décrite par D.-M. Ratner et al. [248].

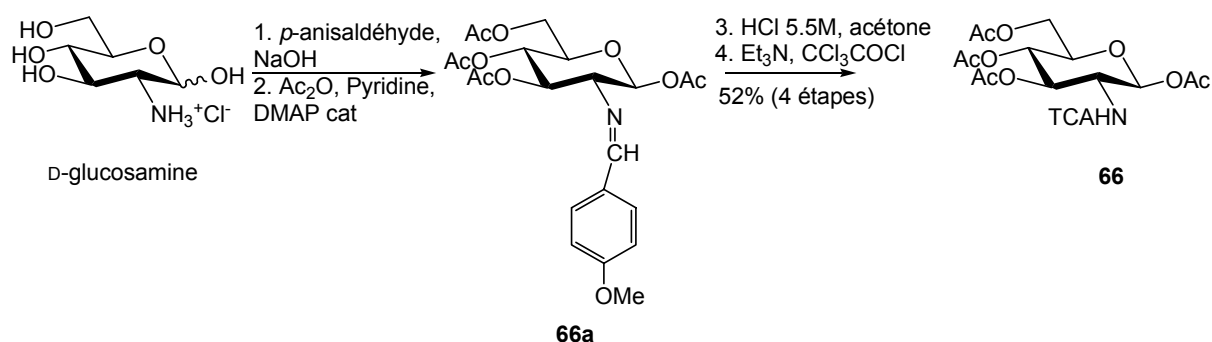
Quant au composé **68**, il est préparé à partir de l'intermédiaire **67** après la suppression des trois groupements acétyles de ce dernier, permettant ainsi la formation de l'acétal de benzylidène après réaction du triol avec le 2,2-diméthoxybenzaldéhyde en présence d'un catalyseur acide.

Le groupe protecteur *tert*-butyldiméthylsilyle du composé **67** est introduit en faisant réagir le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle avec l'hémiacétal obtenu après la désacétylation sélective en position anomère de l'intermédiaire tétra acétylé **66**.

Enfin, le produit **66** peut être synthétisé à partir du chlorhydrate de D-glucosamine en introduisant le groupement TCA et en peracétylant la molécule.

### 3.2.2. Synthèse de l'accepteur de N-acétyl-D-glucosamine **60**

La première étape consiste à synthétiser le dérivé **66** tétra O-acétylé dont la fonction amine est protégée par le groupement TCA (schéma 48).



*Schéma 48 : préparation de l'intermédiaire 66 dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de N-acétyl-D-glucosamine*

Dans un premier temps, nous avons envisagé de mettre en œuvre un protocole décrit par G. Blatter et al. [227] consistant à protéger tout d'abord la fonction amine de la D-glucosamine par le groupe TCA, puis à peracétyler les fonctions alcool. Dans ce but, une solution aqueuse de chlorhydrate de D-glucosamine rendue basique par un excès d'hydrogénocarbonate de sodium (3 éq) a été préparée. La fonction amine libre a ensuite réagi avec 1.5 équivalents de chlorure de trichloroacétyle. Le résidu a été purifié par recristallisation dans l'eau froide avant d'être dissous dans la pyridine. L'ajout d'anhydride acétique (2 équivalents par fonction alcool) a permis d'acétyler les quatre fonctions alcool. Après recristallisation dans un mélange AcOEt/Heptane : 50/50, le composé **66** a été obtenu avec un rendement global de 24%.

Afin d'améliorer ce rendement, une deuxième voie a été envisagée, consistant à introduire le groupe TCA, non pas directement sur la fonction amine de la D-glucosamine, mais sur la fonction amine du 1,3,4,6-Tétra-O-acétyl-2-amino-2-désoxy-β-D-glucopyranoside. Pour cela, nous avons tout d'abord synthétisé le 1,3,4,6-Tétra-O-acétyl-2-amino-2-désoxy-β-D-glucopyranoside à partir de la D-glucosamine via un intermédiaire imine **66a** dérivé du *para*-anisaldéhyde (schéma 48), selon une méthode décrite dans plusieurs publications [249-252].

Le chlorhydrate de D-glucosamine est solubilisé dans une solution de soude 1 M afin de libérer la fonction amine. Le *para*-anisaldéhyde (1.2 éq) est additionné et le milieu réactionnel est laissé à température ambiante pendant 15 min, puis amené à 0°C pendant 20 min. La réaction entre l'aldéhyde et l'amine conduit à la formation d'une imine. Ce produit précipitant, il est lavé avant d'être mis en suspension sans autre purification préalable dans la pyridine, puis la solution est refroidie à 0°C avant l'ajout contrôlé d'anhydride acétique (2 équivalents par fonction alcool). Après 1 h 30 à 0°C, le milieu est versé sur de la glace et un précipité apparaît. Ce dernier est filtré et recristallisé dans de l'éthanol.

Le temps et la température de cette réaction sont des paramètres très importants. En effet, des essais d'acétylation ont été effectués pendant une nuit à température ambiante. Dans ces conditions, lorsque la solution était versée sur la glace, peu de précipité était formé et le produit attendu n'était isolé qu'avec un rendement d'environ 20%. Lorsque nous versions le milieu réactionnel sur la glace, une réaction très exothermique se produisait. Nous avons tout d'abord supposé qu'avec l'augmentation de température l'imine était dégradée, ce qui semblait expliquer l'absence de précipité. Mais une analyse RMN a mis en évidence la présence du dérivé 1,3,4,6-Tétra-O-acétyl-2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranoside. Le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé a été décrit par G. Kretzschmar et al. [253] et nos résultats sont en accord avec leur description.

Si l'imine était clivée lors de l'ajout de la solution sur la glace, la fonction amine ne serait pas acétylée. Nous en avons déduit que l'imine était dégradée pendant l'acétylation, ce qui expliquerait la présence de la fonction N-acétyl. Nous avons donc effectué un suivi régulier de la réaction d'acétylation par CCM avec l'acétate d'éthyle comme éluant, et nous avons observé qu'au bout d'une heure trente à 0°C

le produit de départ était totalement converti. Le traitement habituel a permis d'isoler le produit souhaité sous la forme d'un précipité blanc avec un rendement de 75%. Quant au dérivé *N*-acétylé, il est malgré tout formé de façon minoritaire mais, ne précipitant pas, il est facilement séparé.

Une analyse RMN  $^1\text{H}$  a confirmé la structure de l'intermédiaire **66a**. Quatre singulets intégrant chacun pour trois protons apparaissent à 2.06, 2.00, 1.99 et 1.85 ppm. Il s'agit des signaux caractéristiques des quatre fonctions acétyle. Les singulets intégrant pour un et trois protons à 8.12 et 3.81 ppm correspondent respectivement au proton de l'imine et à ceux du groupe méthoxy. Enfin, les deux doublets situés à 7.62 et 6.88 ppm mettent en évidence la présence d'un groupement phényle. L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  permet de déterminer que l'acétate en position anomère est de configuration  $\beta$ . En effet, la constante de couplage  $J_{1,2}$  du seul doublet représentatif du proton anomère a été calculée et vaut 8.3 Hz.

La spectrométrie de masse SM-HR (ES+) confirme également la structure de l'intermédiaire en révélant un signal à  $466 \text{ g.mol}^{-1}$  correspondant à l'ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

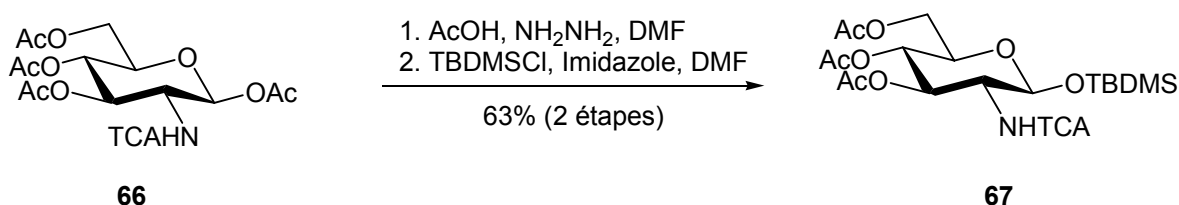
Afin d'obtenir le composé **66**, la fonction imine de l'intermédiaire **66a** doit tout d'abord être clivée. Pour cela, le produit est mis en suspension dans de l'acétone. Le milieu est chauffé à reflux jusqu'à dissolution complète. Le chauffage est ensuite arrêté et un très léger excès d'acide chlorhydrique (1.1 éq) est additionné. Le chlorhydrate de 1,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside précipite aussitôt. Il est lavé puis mis en suspension sans autre purification ou caractérisation dans le dichlorométhane. Le milieu est refroidi à  $0^\circ\text{C}$  puis un excès de triéthylamine (1.4 éq) est additionné afin de libérer la fonction amine. Au bout de 15 min, le composé est totalement dissous. L'ajout contrôlé de 1.25 équivalents de chlorure de trichloroacétyle conduit après 1 h de réaction à température ambiante au dérivé **66**. Ce composé est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40) et isolé sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement global de 52% à partir du chlorhydrate de D-glucosamine.

L'introduction du groupement TCA est confirmée par l'étude du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  qui met en évidence deux signaux à 162.3 et 91.0 ppm représentant respectivement les carbones quaternaires CONH et  $\text{CCl}_3$ .

La masse molaire de l'ion  $[M+Na]^+$  est déterminée à  $514 \text{ g.mol}^{-1}$  par la spectrométrie de masse SM-HR (ES+), confirmant également la structure du composé **66**.

La caractérisation par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ainsi que la spectrométrie de masse du composé **66** sont en accord avec les résultats obtenus par G. Blatter et al. [227].

Dans la suite du protocole, l'acétate en position anomère est sélectivement clivé [242] afin de permettre l'introduction du groupe protecteur temporaire *tert*-butyldiméthylsilyle dans les conditions du schéma 49.



*Schéma 49 : préparation de l'intermédiaire 67 dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de N-acétyl-D-glucosamine*

Pour effectuer cette synthèse, nous suivons le protocole décrit par E.-R. Palmacci et al. [254]. 2 équivalents d'acétate d'hydrazine sont tout d'abord ajoutés à une solution du composé **66** dans le DMF. Une CCM (Heptane/AcOEt : 65/35) indique qu'après 1 h 30, le produit de départ est totalement converti et que les deux anomères de l'hémiacétal, de Rf 0.03 et 0.10, sont obtenus. Ces derniers sont ensuite solubilisés dans le DMF sans purification préalable et réagissent avec un léger excès de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (1.1 éq) en présence d'une base, l'imidazole (2.2 éq). 16 h de réaction sont nécessaires pour convertir l'hémiacétal, puis une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 80/20) permet d'isoler le composé **67** sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement global de 63% pour les deux étapes.

L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé révèle la présence de trois singulets intégrant pour trois protons à 2.08, 2.04 et 2.03 ppm. La disparition du quatrième signal met en évidence la désacétylation de la position anomère. Dans le même temps, les trois singulets de neuf, trois et trois protons à 0.88, 0.13 et 0.10 ppm

caractéristiques du *tert*-butyldiméthylsilyle sont observés. Ce groupement est de configuration  $\beta$  car la constante de couplage  $J_{1,2}$  vaut 7.9 Hz pour le seul signal représentatif du proton anomère.

La spectrométrie de masse MALDI-Tof a confirmé la structure du produit **67** en faisant apparaître un signal à  $588 \text{ g.mol}^{-1}$  pour l'ion  $[M+Na]^+$ .

La troisième phase consiste à totalement désacétyler le composé **67** puis à faire réagir le triol obtenu avec le 2,2-diméthoxybenzaldéhyde en présence d'un catalyseur acide (ACS) pour synthétiser l'acétal de benzylidène **68** (schéma 50).

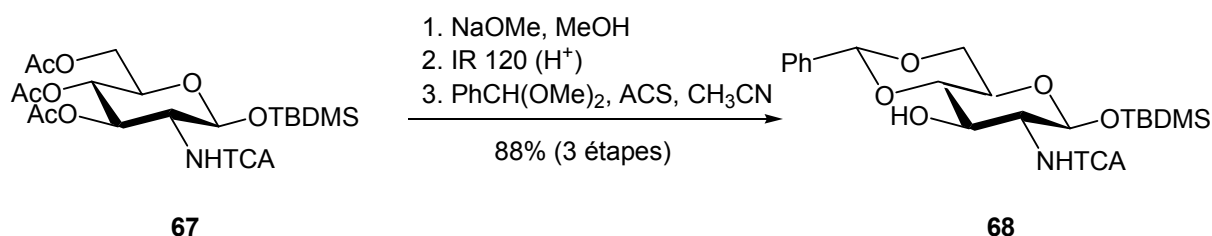


Schéma 50 : préparation de l'intermédiaire **68** dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine

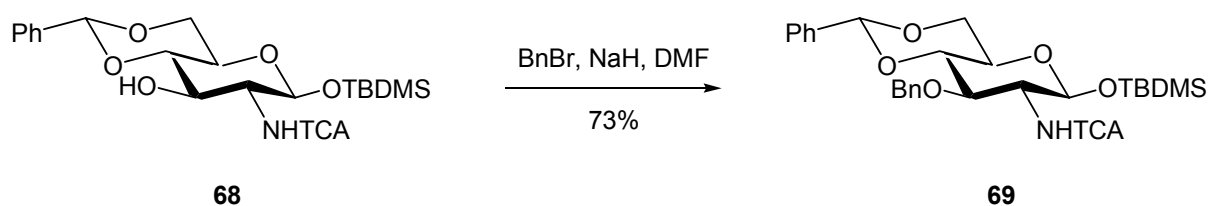
Le composé **67** subit tout d'abord une transestérification dans les conditions de Zemplen [244] (méthanolate de sodium dans le méthanol) suivie par une neutralisation sur résine acide Amberlite IR 120 H<sup>+</sup>. Le triol obtenu est ensuite solubilisé dans l'acétonitrile sans purification ou caractérisation préalable. Les hydroxyles en position 4 et 6 réagissent avec le 2,2-diméthoxybenzaldéhyde (1.5 éq) en présence du catalyseur acide ACS (4% molaire) pour former un acétal de benzylidène après une heure de réaction. Après purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 75/25 + triéthylamine), le 4,6-*O*-benzylidène **68** est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 88% pour les trois étapes.

La désacétylation est appuyée par l'étude RMN <sup>1</sup>H du composé **68**. En effet, les signaux caractéristiques des groupements acétyle ont disparu. D'autre part, un multiplet compris entre 7.65 et 7.36 ppm, intégrant pour cinq protons, met en évidence l'apparition d'un groupement phényle. Enfin, le singulet intégrant pour un proton à 5.53 ppm et représentatif du proton de l'acétal de benzylidène

confirme la structure du produit **68**. Ces résultats sont en accord avec les analyses précédemment effectuées par E.-R. Palmacci et al. [254].

La spectrométrie de masse MALDI-Tof révèle une masse molaire de 548 g.mol<sup>-1</sup> pour l'ion [M+Na]<sup>+</sup>, confirmant ainsi la structure du composé **68**.

La fonction alcool libre en position 3 est ensuite protégée par un groupement benzyle dans les conditions du schéma 51.



*Schéma 51 : préparation de l'intermédiaire 69 dans la synthèse des deux monomères donneur et accepteur de N-acétyl-D-glucosamine*

Le groupe trichloroacétamide NHTCA n'étant pas sensible aux conditions très basiques contrairement au carbamate NHZ, la O-benzoylation peut être effectuée dans les conditions classiques, c'est-à-dire en utilisant l'hydrure de sodium comme base [255].

Le composé **68** est dissous dans le DMF et la solution est refroidie à 0°C avant l'ajout d'un excès d'hydrure de sodium (2 éq). 1.5 équivalents de bromure de benzyle sont ensuite ajoutés et après 16 h de réaction, le dérivé 3-O-benzyle **69** est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 80/20 + triéthylamine) et isolé sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 73%.

Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé **69** met en évidence l'apparition d'un deuxième groupement phényle dans le multiplet compris entre 7.53 et 7.27 ppm qui intègre désormais pour dix protons. Le multiplet intégrant pour deux protons à 4.79 ppm représentatif du groupe CH<sub>2</sub> du benzyle confirme la structure du composé **69**.

Cette structure est également confirmée par la spectrométrie de masse MALDI-Tof qui fait apparaître un pic à 638 g.mol<sup>-1</sup> pour l'ion [M+Na]<sup>+</sup>.

La dernière étape pour obtenir l'accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine **60** consiste à ouvrir l'acétal de benzylidène **69** de façon régiosélective (schéma 52).

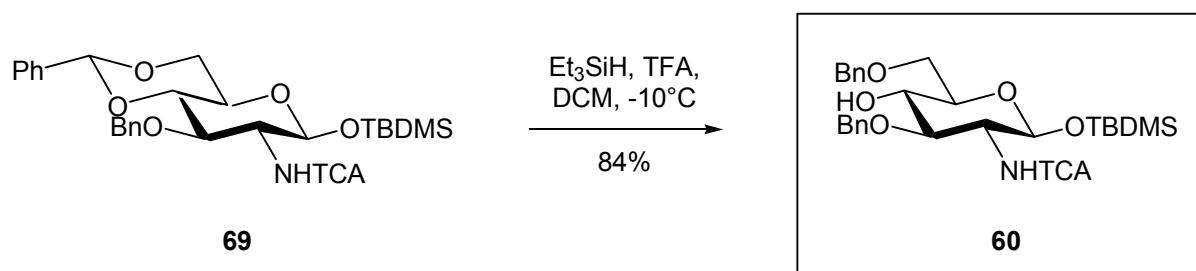


Schéma 52 : préparation de l'accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine **60**

Le clivage régiosélectif de l'acétal de benzylidène a été optimisé et effectué dans les mêmes conditions que celles décrites pour la préparation de l'accepteur de *D*-glucosamine **61**. Le composé **69** est dissous dans le dichlorométhane, puis du tamis moléculaire 3 Å, un large excès de triéthylsilane (15 éq) et d'acide trifluoroacétique (15 éq) sont ajoutés [246, 256]. 1 h de réaction à  $-10^\circ\text{C}$  conduit à l'accepteur **60** sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 84% après purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30). Les 16% manquant au rendement sont dus à la formation du diol, qui a été isolé lors de la purification.

L'accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine **60** a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ainsi que par spectrométrie de masse MALDI-Tof. L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  montre la présence de deux groupements phényle dans le multiplet compris entre 7.35 et 7.24 ppm qui intègre pour dix protons. De plus, deux multiplets intégrant chacun pour deux protons sont présents à 4.75 et 4.56 ppm et représentent les  $\text{CH}_2$  du benzyle. Une analyse RMN à deux dimensions (COSY, HSQC, HMBC) a permis de s'assurer que ces fonctions se trouvent bien sur les positions 3 et 6.

Quant à la spectrométrie de masse MALDI-Tof, elle révèle un signal à  $642 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Nos analyses sont en accord avec celles effectuées par D.-M. Ratner et al. [248].

### 3.2.3. Synthèse du donneur de *N*-acétyl-D-glucosamine **58**

Le donneur de *N*-acétyl-D-glucosamine **58** peut être préparé à partir de l'accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine **60** selon le mode opératoire de D.-M. Ratner et al. [248] en trois étapes avec un rendement global de 90% (schéma 53).

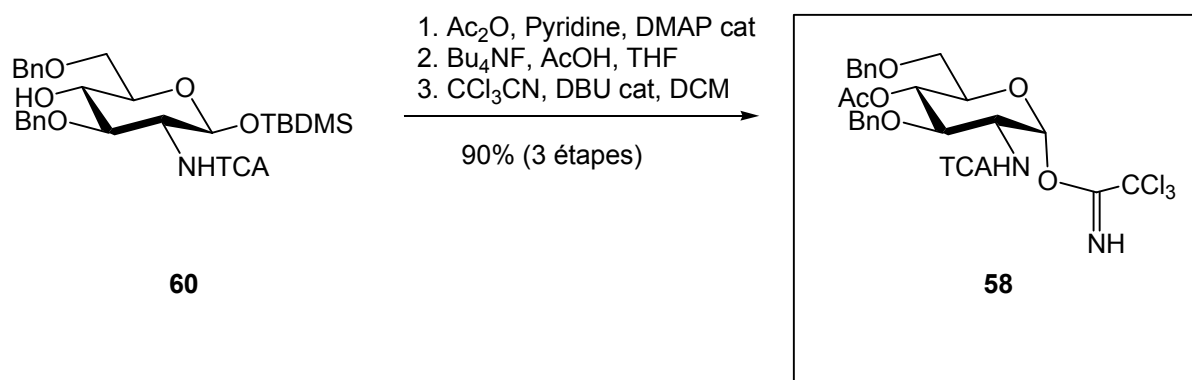


Schéma 53 : préparation du donneur de *N*-acétyl-D-glucosamine **58**

Tout d'abord, la fonction alcool libre en position 4 du composé **60** est acétylée dans les conditions classiques (anhydride acétique/pyridine en présence de DMAP). Le produit acétylé est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30). Le dérivé 4-*O*-acétylé est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 95%.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  met en évidence l'apparition d'un singulet intégrant pour trois protons à 1.87 ppm, caractéristique du groupement acétylé.

De plus, la spectrométrie de masse MALDI-Tof confirme l'introduction de la fonction acétylé en révélant une masse molaire de  $682 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Le groupe *tert*-butyldiméthylsilylé en position anomère est ensuite clivé par réaction avec un léger excès de fluorure de tétrabutylammonium (1.2 éq) et d'acide acétique (1.2 éq) dans le DMF. Les deux anomères de l'hémiacétal sont obtenus et réagissent sans purification préalable avec un excès de trichloroacétonitrile (10 éq) en présence d'une quantité catalytique de la base forte DBU (25% molaire) pour conduire à l'imidate. Une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40 + triéthylamine) permet d'isoler le donneur de *N*-acétyl-D-glucosamine **58** sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 94% pour les deux dernières étapes.

Une analyse RMN  $^1\text{H}$  a mis en évidence la disparition des signaux caractéristiques du *tert*-butyldiméthylsilyle tandis que le singulet représentatif de l'imidate est apparu à 8.77 ppm. Ce spectre a également montré que le composé **58** est obtenu avec la configuration  $\alpha$  puisque la constante de couplage  $J_{1,2}$  du seul doublet caractéristique du proton anomère est de 3.4 Hz.

L'étude du spectre  $^{13}\text{C}$  a confirmé la formation de l'imidate en faisant apparaître deux signaux à 160.0 et 90.8 ppm correspondant respectivement aux carbones quaternaires C=NH et  $\text{CCl}_3$  de l'imidate.

La spectrométrie de masse par électrospray a certifié la structure du composé **58** en montrant un signal à  $530 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}-\text{CCl}_3\text{CONH}]^+$ .

### 3.2.4. Bilan de la synthèse des deux monosaccharides donneur et accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine **58** et **60**

Cette synthèse multi-étapes résumée dans le schéma 54 permet d'obtenir environ 5 g d'accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine **60** à partir de 12 g de chlorhydrate de D-glucosamine en onze étapes avec un rendement global de 16%. Quant au donneur de *N*-acétyl-D-glucosamine **58**, il est préparé à partir de l'accepteur en trois étapes avec un rendement de 90%.

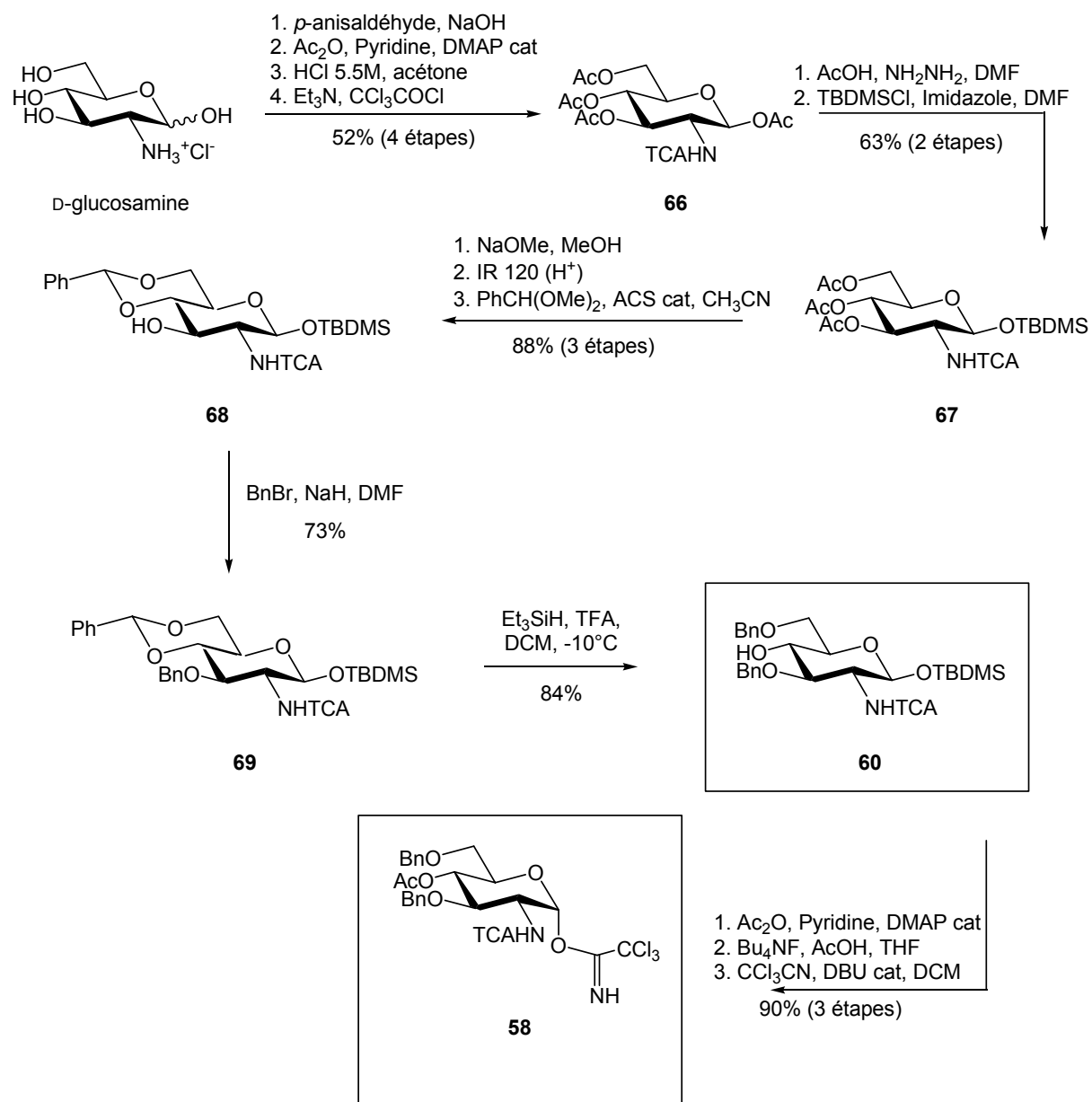


Schéma 54 : synthèse multi-étapes des donneur et accepteur de N-acétyl-D-glucosamine

### 3.3. Conclusion sur la synthèse multi-étapes des monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et *N*-acétyl-D-glucosamine

Les composés **58**, **59**, **60** et **61** sont des intermédiaires clés dans la synthèse des chitooligosaccharides. A partir de ces quatre blocs de construction jouant le rôle de donneurs et accepteurs de D-glucosamine et *N*-acétyl-D-glucosamine, il devrait être possible de préparer divers chitooligosaccharides possédant tous une structure et une architecture parfaitement définies par synthèse chimique convergente. De nombreux efforts ont donc été fournis pour optimiser la préparation de ces quatre monosaccharides. L'efficacité de la stratégie de synthèse mise au point est améliorée en utilisant le même mode opératoire pour les deux unités et en pouvant synthétiser rapidement et avec de bons rendements les donneurs à partir des accepteurs.

La deuxième partie dans la préparation des chitooligosaccharides consiste à coupler un monosaccharide accepteur de glycosyle avec un monosaccharide donneur de glycosyle de façon à obtenir les quatre chitodisaccharides sous forme protégée.

## 4. Synthèse des chitodisaccharides

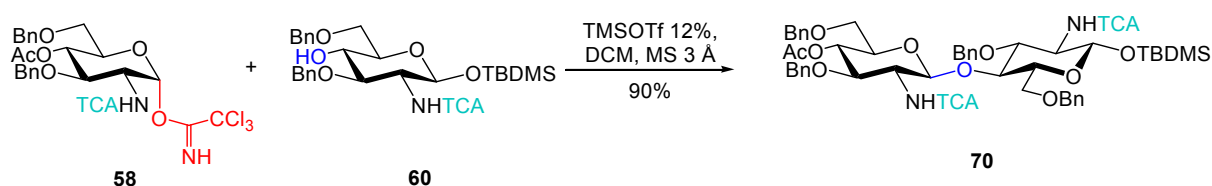
### 4.1. Réaction de couplage entre un monosaccharide accepteur de glycosyle et un monosaccharide donneur de glycosyle

L'étude bibliographique sur les méthodes de glycosylation a mis en évidence que la réaction de couplage entre un monosaccharide donneur portant un groupe partant trichloroacétimide et un monosaccharide accepteur, est réalisée dans des conditions anhydres et catalysée par un acide de Lewis : le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf) ou le trifluorure de bore étheré ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ). En utilisant cette stratégie avec les monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine synthétisés lors de l'étape précédente, quatre structures différentes de chitodisaccharides protégés pourront être obtenues. Afin d'optimiser cette réaction, plusieurs essais ont été effectués pour chacune des quatre réactions de couplage en faisant varier la nature et la quantité du promoteur ainsi que le rapport donneur/accepteur. Le protocole, identique pour les différents essais, est décrit ci-dessous et s'applique aux quatre glycosylations.

Tout d'abord, le donneur et l'accepteur sont placés dans un ballon bien sec. Du tamis moléculaire 3 Å est éventuellement ajouté. Les réactifs sont placés de 30 min à 1 h sous flux d'argon avant l'ajout de dichlorométhane anhydre préalablement distillé, afin de proscrire la présence d'eau risquant d'hydrolyser l'imide avant que celui-ci n'ait pu réagir avec l'accepteur. La solution reste sous flux d'argon 30 min supplémentaires, puis le promoteur est additionné. Des CCM régulières permettent de suivre la réaction. Pour stopper cette dernière, de la triéthylamine est ajoutée afin de neutraliser le catalyseur acide. Ensuite, si du tamis moléculaire a été introduit, il est filtré sur Célite®. Le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie liquide sur gel de silice. Le protocole général de la réaction de glycosylation étant décrit, détaillons à présent les différents essais menés afin d'optimiser cette étape importante dans la synthèse des chitooligosaccharides.

### 4.1.1. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine et le monosaccharide donneur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine

La réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine **60** et le monosaccharide donneur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine **58** a été effectuée dans les conditions optimisées du schéma 55.



*Schéma 55 : Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine et le monosaccharide donneur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine*

De nombreux essais en utilisant les deux promoteurs (TMSOTf et  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) ont été réalisés afin d'optimiser la réaction de glycosylation. Ces différents essais sont résumés dans le tableau 1.

| Rapport molaire imidate/accepteur | Nature promoteur                        | quantité promoteur (/accepteur) | Rendement (%) |
|-----------------------------------|---|---------------------------------|---------------|
| 1.2/1                             | TMSOTf                                  | 0.15 éq                         | 10            |
| 1.4/1                             | TMSOTf                                  | 0.05+0.05+0.05 éq               | 55            |
| 1.5/1                             | TMSOTf                                  | 0.15 éq                         | 49            |
| 1.5/1                             | TMSOTf                                  | 0.12 éq                         | 90            |
| 1.5/1                             | $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ | 0.15 éq                         | 43            |

*Tableau 1 : Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine et le monosaccharide donneur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine*

L'utilisation du promoteur trifluorure de bore étheré n'a pas permis d'isoler le chitodisaccharide avec un rendement supérieur à 43%. En revanche, l'emploi de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle a montré de meilleurs résultats et le rendement maximal a été obtenu lorsque 0.12 équivalents (par rapport à la quantité molaire d'accepteur) de TMSOTf ont été additionnés.

Le rapport donneur/accepteur a également été étudié. Le suivi par CCM (Toluène/AcOEt : 75/25 + triéthylamine) de la réaction de glycosylation a révélé que le trichloroacétimide est consommé plus rapidement que l'accepteur, limitant ainsi la formation du chitodisaccharide. Afin d'obtenir une conversion totale de l'accepteur, nous avons ajouté du donneur en cours de réaction. Mais dans ces conditions, même en introduisant une nouvelle quantité de promoteur, la réaction n'évolue pas vers la formation du chitodisaccharide. Au lieu de cela, l'ajout d'acide provoque la dégradation du trichloroacétimide. Nous avons donc introduit le monosaccharide donneur en excès dès le début de la réaction. L'ajout de 1.5 équivalents de donneur et 2 h de réaction ont permis d'obtenir le chitodisaccharide avec le rendement le plus élevé (90%).

Le résidu obtenu après la glycosylation a été purifié par une chromatographie liquide sur gel de silice. La difficulté de cette étape vient du fait que les  $R_f$  du chitodisaccharide et de l'accepteur non réagi sont très proches ( $R_f$ -**60** = 0.65 et  $R_f$ -**70** = 0.70, Toluène/AcOEt : 75/25 + Et<sub>3</sub>N). Trois purifications en utilisant des systèmes d'éluants différents (Toluène/AcOEt : 90/10 + Et<sub>3</sub>N, Toluène/AcOEt : 80/20 + Et<sub>3</sub>N, Heptane/AcOEt : 75/25 + Et<sub>3</sub>N) sont nécessaires pour isoler le chitodisaccharide **70**.

La spectrométrie de masse par électrospray et les analyses RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ont permis de vérifier que la réaction de glycosylation a bien conduit au dérivé **70** attendu. En effet, la spectrométrie de masse révèle un pic à 1170 g.mol<sup>-1</sup> caractéristique de l'ion [M+Na]<sup>+</sup>.

La liaison glycosidique β-(1→4) est confirmée par l'étude des spectres RMN à une et deux dimensions. Le spectre <sup>1</sup>H indique que la configuration du carbone anomère de l'unité non réductrice est bien de configuration β puisque la constante de couplage du seul signal représentatif du proton anomère (un doublet) a été mesurée à 8.3 Hz. Enfin, le spectre HMBC montre une tache de corrélation entre le proton 1 de l'unité non réductrice et le carbone 4 de l'unité réductrice.

#### 4.1.2. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine et le monosaccharide donneur de D-glucosamine

La réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine **60** et le monosaccharide donneur de D-glucosamine **59** a été effectuée dans les conditions optimisées du schéma 56.

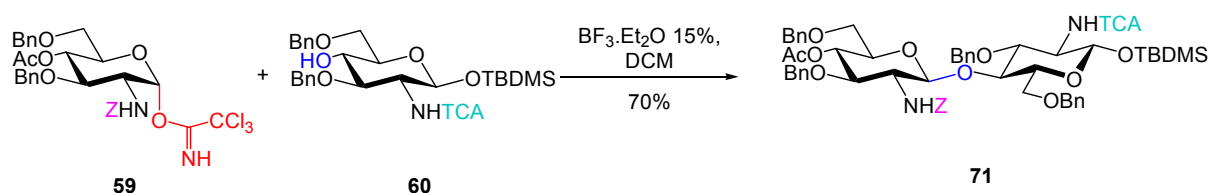


Schéma 56 : Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine et le monosaccharide donneur de D-glucosamine

Le tableau 2 regroupe les résultats obtenus pour ce couplage, selon la nature et la quantité du promoteur utilisé.

| Rapport imidate/accepteur | Nature promoteur                   | quantité promoteur (/accepteur) | Rendement (%) |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 1.4/1                     | TMSOTf                             | 0.15 éq                         | 20            |
| 1.4/1                     | TMSOTf                             | 0.05 éq                         | 17            |
| 1.5/1                     | TMSOTf                             | 0.05+0.05+0.05 éq               | 43            |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.15 éq                         | 70            |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.12 éq                         | 57            |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.20 éq                         | 54            |

Tableau 2 : Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine et le monosaccharide donneur de D-glucosamine

La première glycosylation effectuée entre le donneur et l'accepteur de *N*-acétyl-D-glucosamine ayant été plus efficace en présence de TMSOTf, ce promoteur a été utilisé lors des premiers essais de la deuxième réaction de couplage. Mais les rendements obtenus étant médiocres (environ 20%), le trifluorure de bore éthéré a ensuite été employé et le chitodisaccharide a été isolé avec de meilleurs

rendements. La quantité optimale de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  a été déterminée en réalisant divers essais où le volume de promoteur variait et 0.15 équivalents (par rapport à la quantité molaire d'accepteur) de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  ont conduit aux meilleurs rendements. Comme dans la glycosylation précédente, même en milieu anhydre, le trichloroacétimide se dégrade rapidement. Il a donc été introduit en excès et le rapport 1.5 équivalents de donneur par rapport à l'accepteur a permis d'obtenir le meilleur rendement de chitodisaccharide après 3 h de réaction (70%).

Le résidu obtenu après la réaction de couplage a été purifié par une chromatographie liquide sur gel de silice. Comme dans le cas précédent, l'accepteur non réagi et le chitodisaccharide ont des  $R_f$  très proches ( $R_f\text{-60} = 0.39$  et  $R_f\text{-71} = 0.44$ , Toluène/AcOEt : 80/20 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ). La séparation est difficile et plusieurs purifications doivent être effectuées avant d'isoler le composé **71** pur (Heptane/AcOEt : 75/25 +  $\text{Et}_3\text{N}$ , Toluène/AcOEt : 70/30 +  $\text{Et}_3\text{N}$ , Toluène/AcOEt : 90/10 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

La spectrométrie de masse par électrospray, en faisant apparaître un signal à  $1159 \text{ g.mol}^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , permet de confirmer la formation du chitodisaccharide. La RMN à deux dimensions HMBC montre que la liaison a été formée entre le carbone anomère de l'unité non réductrice et le carbone en position 4 de l'unité réductrice. En revanche, l'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  ne permet pas de déterminer la configuration de la liaison glycosidique. En effet, le signal du proton en position anomère est masqué par le singulet du  $\text{CH}_2$  du groupe benzyloxycarbone à 4.97 ppm. A ce stade, il n'est donc pas possible de certifier la configuration  $\beta$  de la liaison glycosidique du chitodisaccharide **71**. Cependant, dans la troisième phase de préparation des chitodisaccharides, les composés obtenus après la glycosylation sont déprotégés. Les caractérisations effectuées sur les composés partiellement déprotégés confirmeront la configuration  $\beta$  de la liaison glycosidique.

### 4.1.3. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide donneur de N-acétyl-D-glucosamine

La réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine **61** et le monosaccharide donneur de N-acétyl-D-glucosamine **58** a été effectuée dans les conditions optimisées du schéma 57.

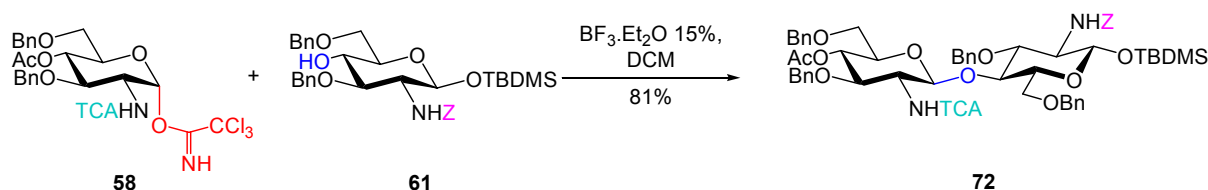


Schéma 57: Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide donneur de N-acétyl-D-glucosamine

Les différents essais menés en faisant varier la nature et la quantité du promoteur sont rassemblés dans le tableau 3.

| Rapport imidate/accepteur | Nature promoteur                   | quantité promoteur (/accepteur) | Rendement (%) |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 1.5/1                     | TMSOTf                             | 0.15 éq                         | 0             |
| 1.5/1                     | TMSOTf                             | 0.20 éq                         | 0             |
| 2.2/1                     | TMSOTf                             | 0.15 éq                         | 0             |
| 1.7/1                     | TMSOTf                             | 0.15 éq                         | 35            |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.20 éq                         | 55            |
| 1.7/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.15 éq                         | 54            |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.15 éq                         | 81            |

Tableau 3: Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide donneur de N-acétyl-D-glucosamine

Cette glycosylation, initialement menée avec le TMSOTf, n'a pas permis d'isoler le disaccharide. Quelques minutes après l'ajout du promoteur, les CCM (Toluène/AcOEt : 80/20 + triéthylamine) indiquaient la formation du disaccharide mais ce dernier se dégradait très rapidement. Dans ces conditions expérimentales,

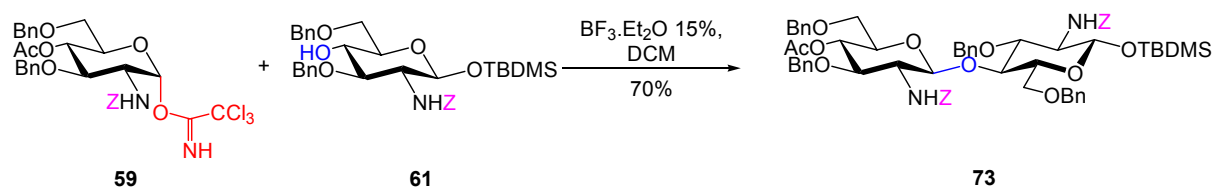
la réaction était très difficile à suivre et conduisait principalement à des produits de dégradation. L'utilisation du trifluorure de bore étheré a facilité le suivi, même si des CCM régulières (Toluène/AcOEt : 80/20 + triéthylamine) ont mis en évidence qu'un temps de glycosylation trop long entraînait la formation de produits de dégradation. Mais lorsque la neutralisation était effectuée trop tôt, la conversion n'était pas totale et le chitodisaccharide était obtenu avec de faibles rendements. Un compromis avec un temps de réaction de 1 h 30 a permis d'obtenir un bon rendement de glycosylation tout en limitant la formation de sous-produits. Plusieurs essais successifs, où les quantités de promoteur et de donneur variaient, ont montré que 0.15 équivalents (par rapport à la quantité molaire d'accepteur) de promoteur et 1.5 équivalents de donneur conduisaient aux meilleurs résultats (rendement = 81%).

En raison de la similitude entre les  $R_f$  du chitodisaccharide et de l'accepteur n'ayant pas réagi ( $R_f$ -**61** = 0.41 et  $R_f$ -**72** = 0.48, Toluène/AcOEt : 80/20), plusieurs chromatographies sur gel de silice ont à nouveau été nécessaires pour isoler le produit **72** (Toluène/AcOEt : 80/20 + Et<sub>3</sub>N, Heptane/AcOEt : 60/40 + Et<sub>3</sub>N, Heptane/AcOEt : 50/50 + Et<sub>3</sub>N). Ce dernier a ensuite été caractérisé par spectrométries RMN et de masse (électrospray). Cette dernière technique a mis en évidence un pic à 1159 g.mol<sup>-1</sup> pour l'ion [M+Na]<sup>+</sup>, confirmant ainsi la formation du chitodisaccharide.

Les analyses RMN à une et deux dimensions ont quant à elles montré que la liaison glycosidique formée est bien une liaison β-(1→4). En effet, le spectre HMBC révèle une tache de corrélation entre le proton anomère de l'unité non réductrice et le carbone 4 de l'unité réductrice. De plus, le spectre RMN <sup>1</sup>H a permis de calculer la constante de couplage  $J_{1,2}$  du seul signal caractéristique du proton anomère. Cette dernière valant 8.4 Hz, la liaison glycosidique est effectivement de configuration β.

#### 4.1.4. Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide donneur de D-glucosamine

La réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine **61** et le monosaccharide donneur de D-glucosamine **59** a été effectuée dans les conditions optimisées du schéma 58.



*Schéma 58 : Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide donneur de D-glucosamine*

Le tableau 4 résume les rendements obtenus lors des différents essais de glycosylation.

| Rapport imidate/accepteur | Nature promoteur                   | quantité promoteur (/accepteur) | Rendement (%) |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------|
| 1.5/1                     | TMSOTf                             | 0.15 éq                         | 5             |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.20 éq                         | 16            |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.15 éq                         | 70            |
| 1.5/1                     | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 0.12 éq                         | 55            |

*Tableau 4 : Réaction de couplage entre le monosaccharide accepteur de D-glucosamine et le monosaccharide donneur de D-glucosamine*

Le scénario visant à optimiser les conditions réactionnelles de cette glycosylation est identique à celui décrit pour les trois premières réactions de couplage. Des essais menés avec le trifluorure de bore étheré et le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle ont montré que le premier promoteur est le plus efficace pour cette réaction. En effet, les conditions sont très difficiles à maîtriser lorsque le promoteur est le TMSOTf. Un suivi CCM (Toluène/AcOEt : 80/20 + triéthylamine) indique un bon avancement après 10 min de réaction. En revanche, au bout de 20

min, le chitodisaccharide est dégradé. Ce problème n'apparaît pas lors de l'utilisation de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  comme promoteur. La quantité optimale de ce réactif a été déterminée à 0.15 équivalents en effectuant divers essais. Comme dans les glycosylations précédentes, le trichloroacétimide se dégrade rapidement. Il est donc introduit en excès et après plusieurs essais, 1.5 équivalents de donneur par rapport à l'accepteur montrent les meilleurs résultats concernant le rendement du chitodisaccharide **73** formé (70%).

La séparation du chitodisaccharide **73** a une nouvelle fois été compliquée par les valeurs très proches des  $R_f$  de ce composé et de l'accepteur n'ayant pas réagi ( $R_f\text{-61} = 0.39$  et  $R_f\text{-73} = 0.50$ , Toluène/AcOEt : 80/20). Jusqu'à quatre purifications par chromatographie liquide sur gel de silice (Toluène/AcOEt : 90/10 + triéthylamine, Toluène/AcOEt : 80/20 + triéthylamine, Heptane/AcOEt : 60/40 + triéthylamine, Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine) ont été réalisées pour isoler le composé **73**.

Ce dernier a ensuite été caractérisé par spectrométries de masse et RMN afin de confirmer la structure du produit formé.

Tout d'abord, la spectrométrie de masse par électrospray, en faisant apparaître un signal à  $1147 \text{ g.mol}^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , indique que le disaccharide est bien obtenu.

Ensuite, la RMN à deux dimensions (spectre HMBC) montre que la nouvelle liaison a été formée entre le carbone anomère de l'unité non réductrice et le carbone en position 4 de l'unité réductrice.

En revanche, comme pour le chitodisaccharide **71** portant lui aussi une unité D-glucosamine en position non réductrice, la configuration de la liaison glycosidique n'a pu être confirmée par l'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$ . En effet, le doublet du proton anomère est masqué dans le multiplet compris entre 4.85 et 4.40 ppm, où se trouvent également les signaux des  $\text{CH}_2$  des groupements benzyle. La configuration sera confirmée lors des étapes ultérieures de déprotection.

Après la synthèse des quatre monosaccharides donneurs et accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, puis la synthèse des quatre chitodisaccharides protégés par une combinaison de réactions de couplage entre

ces donneurs et accepteurs, la troisième partie de notre stratégie consiste à obtenir les quatre chitodisaccharides cibles selon un protocole multi-étapes de déprotection.

## 4.2. Réactions de déprotection des chitodisaccharides

Le chemin réactionnel de déprotection des chitodisaccharides est différent selon l'unité présente sur l'extrémité réductrice. En effet, selon qu'il s'agisse de l'unité D-glucosamine ou N-acétyl-D-glucosamine, la réactivité n'est pas la même. C'est pour cela que nous traiterons d'une part la déprotection des chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc puis d'autre part celle des chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN.

### 4.2.1. Réactions de déprotection conduisant aux chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc

La première étape de déprotection décrite dans le schéma 59 consiste à convertir les fonctions trichloroacétamide des chitodisaccharides **70** et **71** en fonction acétamide.

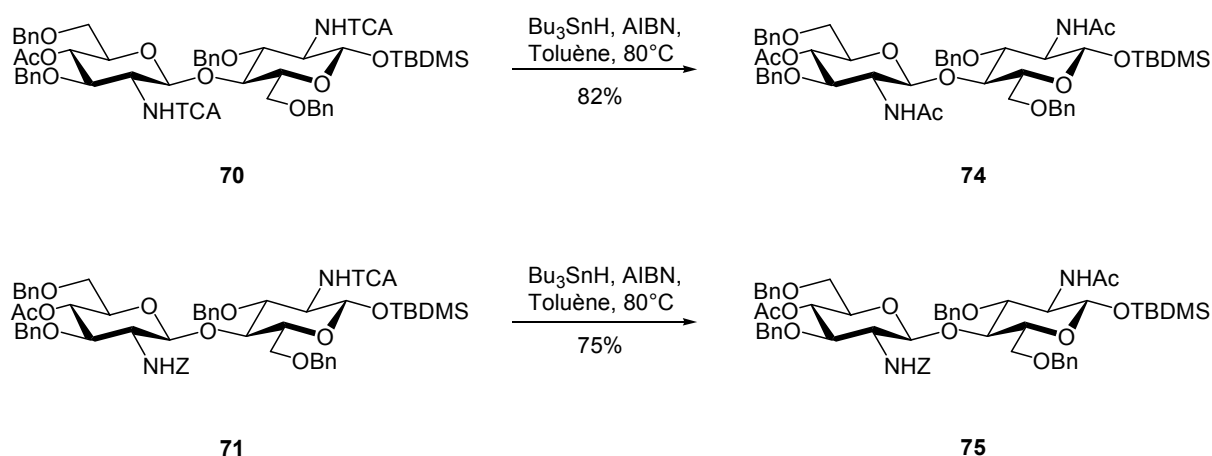
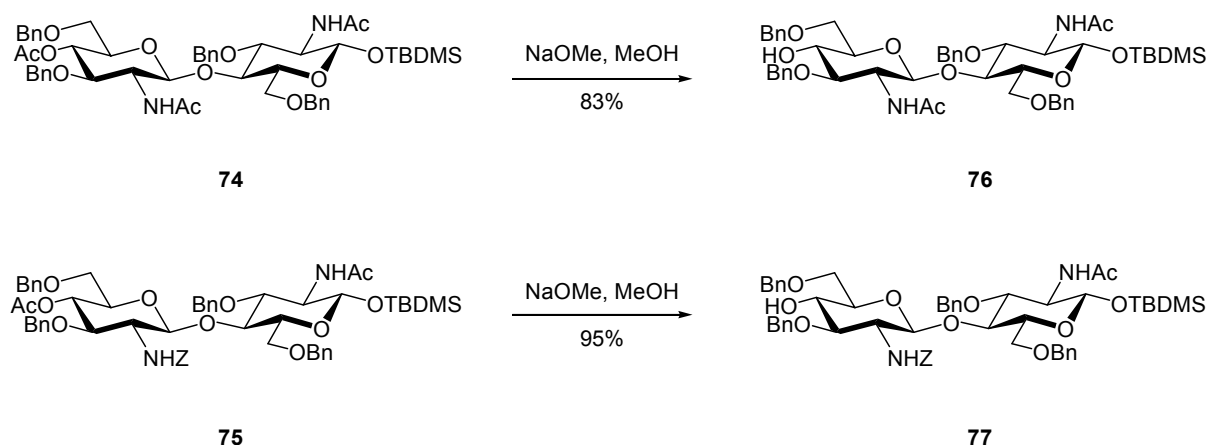


Schéma 59 : déprotection conduisant aux intermédiaires **74** et **75** dans la synthèse des deux chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc

G. Blatter et al. [227] ont décrit cette déprotection par réduction radicalaire. L'ensemble du montage est placé sous un flux d'argon pendant une nuit, puis le chitodisaccharide est solubilisé dans le toluène. Le mode opératoire décrit dans la littérature utilise le benzène comme solvant mais pour des raisons de toxicité nous l'avons remplacé par le toluène. 2 équivalents d'hydruure de tributylétain par équivalent chlorure, puis une quantité catalytique de 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) sont ajoutés. Le milieu est agité 1 h sous flux d'argon puis chauffé au reflux du toluène pendant 2 h. Après refroidissement et évaporation du solvant, le résidu est agité dans l'heptane puis purifié par une chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine). Les chitodisaccharides **74** et **75** ont été obtenus selon cette méthode avec des rendements respectifs de 82 et 75%. L'étude des spectres RMN  $^1\text{H}$  de ces deux produits a mis en évidence l'apparition des groupements acétamide, sous la forme d'un singulet intégrant pour trois protons respectivement à 1.86 et 1.89 ppm pour les composés **74** et **75**.

De plus, à ce stade, il devient possible de confirmer la configuration de la liaison glycosidique du composé **75**, ce qui ne pouvait pas être fait dans l'étape précédente en raison de la superposition de plusieurs signaux. Le seul signal du proton en position 1 de l'unité non réductrice se trouve à  $\delta = 4.59$  ppm et la constante de couplage  $J_{1,2}$  de 8.8 Hz indique que la liaison glycosidique possède bien la configuration *trans*.

Dans l'étape suivante, la fonction *O*-acétyle est clivée. Cette désacétylation est effectuée dans les conditions usuelles de Zemplén en présence d'un mélange méthanolate de sodium/méthanol [244] (schéma 60).

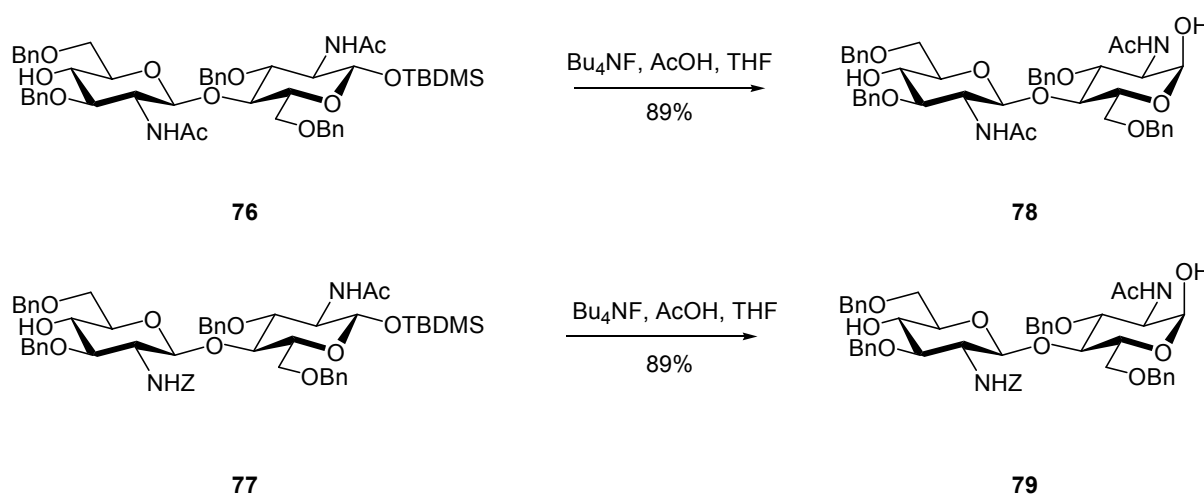


*Schéma 60 : déprotection conduisant aux intermédiaires 76 et 77 dans la synthèse des deux chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc*

La réaction est suivie par CCM (Heptane/AcOEt : 65/35 + Et<sub>3</sub>N, R<sub>f</sub> 0.31 pour **76** et Heptane/AcOEt : 50/50 + Et<sub>3</sub>N, R<sub>f</sub> 0.48 pour **77**). Lorsque la CCM indique que le produit de départ est totalement consommé, le milieu est neutralisé à l'aide de résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). Les composés **76** et **77** sont purifiés par une chromatographie liquide sur gel de silice et isolés avec des rendements respectifs de 83 et 95%.

Les spectres RMN <sup>1</sup>H de chacun des deux composés mettent en évidence la disparition du singulet caractéristique du groupement *O*-acétyle (1.75 et 1.87 ppm pour **76** et **77**). La spectrométrie de masse par électrospray confirme également la disparition de ce groupement en faisant apparaître un pic à 921 et 1013 g.mol<sup>-1</sup> respectivement pour les ions [M+Na]<sup>+</sup> des composés **76** et **77**.

La troisième réaction de déprotection libère l'alcool anomère en clivant le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle dans les conditions du schéma 61.



*Schéma 61 : déprotection conduisant aux intermédiaires 78 et 79 dans la synthèse des deux chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc*

Le chitodisaccharide est tout d'abord solubilisé dans le THF et refroidi à 0 °C avant l'ajout d'une solution contenant un excès de trifluorure de tétrabutylammonium

(2.5 éq) et d'acide acétique (2.5 éq) dans le THF à 0°C. L'hémiacétal obtenu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (DCM/MeOH : 90/10 + triéthylamine) et les deux chitodisaccharides **78** et **79** sont isolés avec un rendement de 89% pour chacun.

La spectrométrie de masse SM-HR (ES+) confirme la disparition du groupement silyle après cette réaction en faisant apparaître un pic à 807 et 899 g.mol<sup>-1</sup> respectivement pour les ions [M+Na]<sup>+</sup> des composés **78** et **79**.

L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H montre également la disparition des trois singulets caractéristiques du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (0.87, 0.12 et 0.07 ppm). Ces spectres indiquent de plus que l'alcool anomère des composés **78** et **79** est de configuration  $\alpha$ . En effet les valeurs des constantes de couplage J<sub>1,2</sub> de ces deux produits valent respectivement 3.5 et 3.4 Hz. De plus, aucun autre signal n'est observé pour ces protons anomères.

La dernière réaction de déprotection permettant d'obtenir les deux chitodisaccharides cibles portant l'unité *N*-acétyl-D-glucosamine sur la partie réductrice est une hydrogénation catalytique qui supprime simultanément les groupements benzyle et benzyloxycarbonyle (schéma 62).

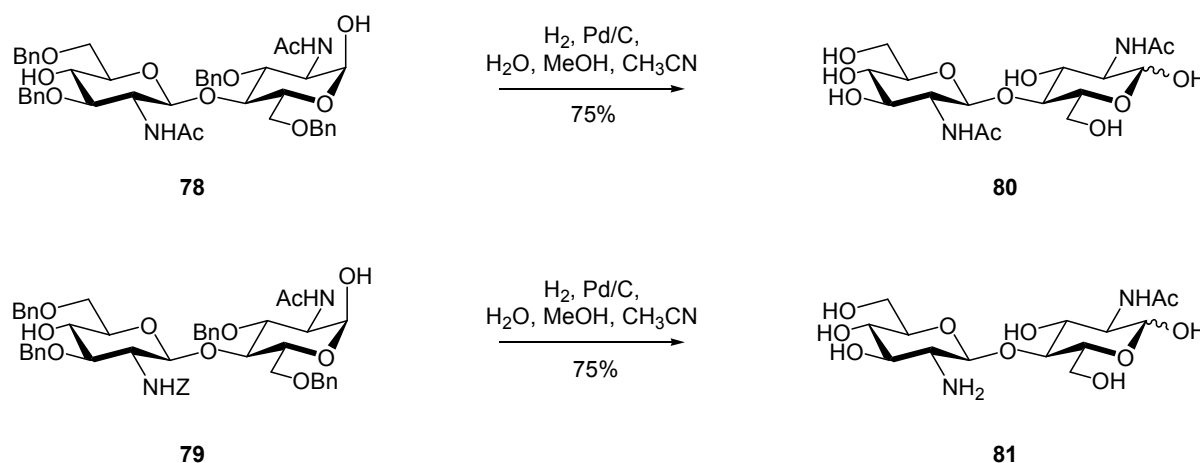


Schéma 62 : déprotection conduisant aux chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc **80** et **81**

Les chitodisaccharides protégés sont solubilisés dans un mélange d'eau, de méthanol et d'acétonitrile, puis une quantité catalytique de palladium sur charbon est ajoutée et le milieu est agité sous atmosphère d'hydrogène. Après 2 jours

d'hydrogénation, la réaction est stoppée. Une analyse RMN  $^1\text{H}$  du produit brut obtenu indique immédiatement si des groupements phényle sont toujours présents. Si tel est le cas, l'hydrogénation est relancée dans les mêmes conditions. Lorsque l'analyse RMN  $^1\text{H}$  ne montre plus aucun signal caractéristique du groupe phényle, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 70/30 + triéthylamine). Les chitodisaccharides cibles **80** et **81** sont obtenus avec des rendements de 75% pour chacun, puis caractérisés par spectrométries de masse et RMN afin de mettre en évidence la disparition de tous les groupes protecteurs. La spectrométrie de masse SM-HR (ES+) révèle des pics à 447.1576 et 383.1647 respectivement pour les ions  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  du composé **80** et  $[\text{M}+\text{H}]^+$  du composé **81**. Quant aux spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , ils montrent clairement la disparition des signaux caractéristiques des groupements phényles, confirmant ainsi l'obtention des deux chitodisaccharides cibles **80** et **81**. Le tableau 5 regroupe les différents signaux observés pour chacun des chitodisaccharides **80** et **81**, leurs déplacements chimiques et leur attribution lors d'une analyse RMN  $^1\text{H}$  effectuée à 500 MHz dans l'eau deutérée.

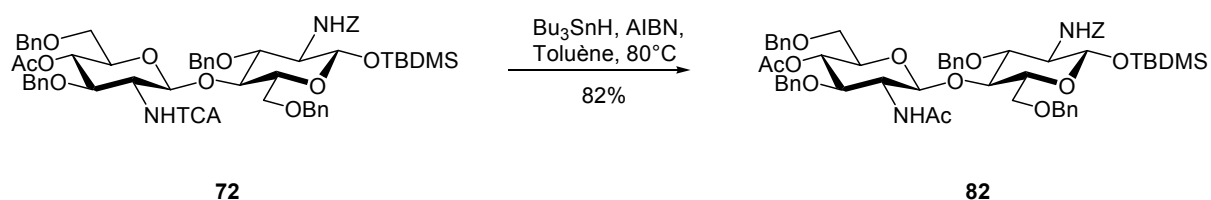
| Chitodisaccharide <b>80</b> |                            |                        | Chitodisaccharide <b>81</b> |                            |                          |
|-----------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| signal                      | Déplacement chimique (ppm) | attribution            | signal                      | Déplacement chimique (ppm) | attribution              |
| doublet                     | 5.19                       | H-1a $\alpha$          | doublet                     | 5.15                       | H-1a $\alpha$            |
| doublet                     | 4.79                       | H-1a $\beta$           | doublet                     | 4.64                       | H-1a $\beta$             |
| doublet                     | 4.70                       | H-1b                   | doublet                     | 4.43                       | H-1b                     |
| multiplet                   | 3.93-3.87                  | H-3a, H-5a, H-2a       | multiplet                   | 3.90                       | H-3a                     |
| multiplet                   | 3.78-3.72                  | H-6b, H-6b, H-6a, H-2b | multiplet                   | 3.87-3.58                  | H-2a, H-4a, H-5ab, H-6ab |
| multiplet                   | 3.69-3.60                  | H-4a, H-6a             | multiplet                   | 3.46-3.28                  | H-4b, H-3b               |
| multiplet                   | 3.57                       | H-3b                   | multiplet                   | 2.62                       | H-2b                     |
| multiplet                   | 3.50-3.46                  | H-5b, H-4b             | singulet                    | 2.05                       | CH <sub>3</sub> CONH     |
| singulet                    | 2.05                       | CH <sub>3</sub> CONH   |                             |                            |                          |
| singulet                    | 2.02                       | CH <sub>3</sub> CONH   |                             |                            |                          |

*Tableau 5 : interprétation des spectres RMN <sup>1</sup>H des chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc 80 et 81*

Les deux chitodisaccharides cibles **80** et **81** sont obtenus après une séquence de quatre réactions de déprotection à partir des chitodisaccharides protégés. Le rendement global de déprotection est de 45% pour GlcNAc-GlcNAc et 48% pour le chitodisaccharide GlcN-GlcNAc.

#### 4.2.2. Réactions de déprotection conduisant aux chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN

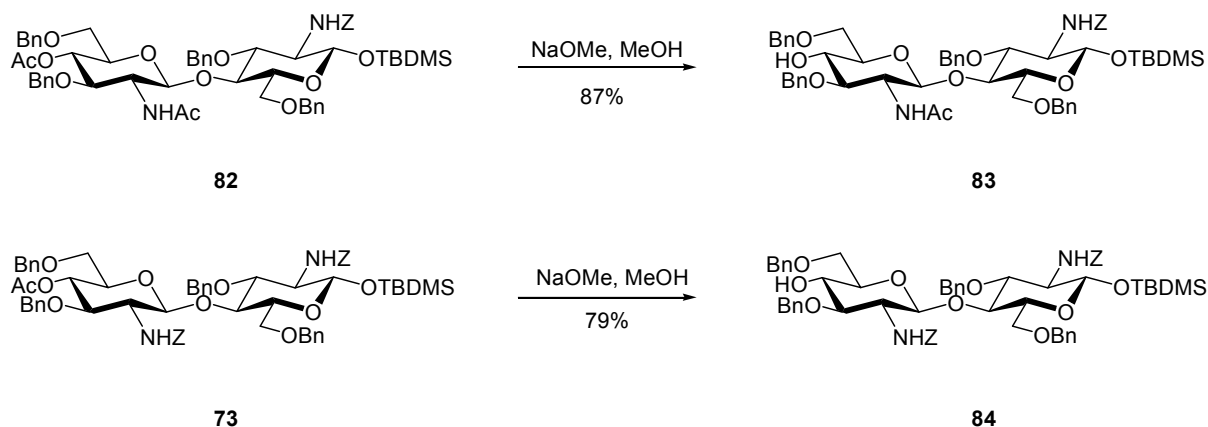
La stratégie choisie pour la déprotection des chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN est initialement identique à celle précédemment décrite pour la déprotection des chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc. C'est-à-dire que nous commençons par convertir le groupe *N*-trichloroacétyle du composé **72** en groupe *N*-acétyle par réduction radicalaire en présence de 6 équivalents d'hydrure de tributylétain et d'une quantité catalytique d'AIBN au reflux du toluène [227] (schéma 63).



*Schéma 63 : déprotection conduisant à l'intermédiaire 82 dans la synthèse du chitodisaccharide GlcNAc-GlcN*

Après purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine), le composé **82** est isolé avec un rendement de 82%. La caractérisation par spectrométries de masse (électrospray) et RMN <sup>1</sup>H confirme l'apparition du groupe *N*-acétyle. En effet, la première technique montre un signal à 1055 g.mol<sup>-1</sup> pour l'ion [M+Na]<sup>+</sup>. De plus, la deuxième technique fait apparaître un singulet intégrant pour trois protons à 1.78 ppm représentatif du groupement acétamide.

Comme dans la première série de déprotections, la réaction du méthanolate de sodium dans le méthanol [244] permet ensuite le clivage du groupe *O*-acétyle en position 4 des composés **82** et **73** (schéma 64).

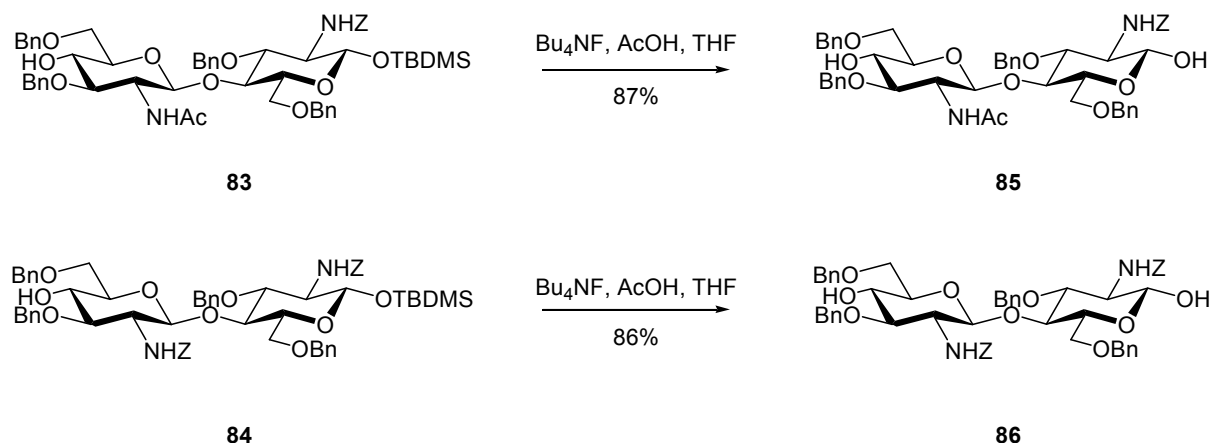


*Schéma 64 : déprotection conduisant aux intermédiaires 83 et 84 dans la synthèse des deux chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN*

Lorsque le suivi CCM (Heptane/AcOEt : 50/50 + Et<sub>3</sub>N) indique que le produit de départ est totalement consommé, le milieu est neutralisé par ajout de résine acide Amberlite IR-120. Les composés **83** et **84** sont ensuite purifiés par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine pour **83** et Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine pour **84**) et isolés avec des rendements respectifs de 87 et 79%.

La caractérisation des composés **83** et **84** par RMN <sup>1</sup>H met en évidence la disparition du singulet du groupement *O*-acétyle à 1.66 et 1.88 ppm respectivement. Ce résultat est confirmé par la spectrométrie de masse SM-HR (ES+) qui révèle des pics à 1013 et 1105 g.mol<sup>-1</sup> respectivement pour les ions [M+Na]<sup>+</sup> des composés **83** et **84**.

Lors de la troisième réaction de déprotection, l'alcool anomère des composés **83** et **84** est déprotégé (schéma 65).



*Schéma 65 : déprotection conduisant aux intermédiaires 85 et 86 dans la synthèse des deux chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN*

Le chitodisaccharide est solubilisé dans le THF et le milieu est refroidi à 0°C. Une solution contenant un excès de fluorure de tétrabutylammonium (2.5 éq) et d'acide acétique (2.5 éq) dans le THF à 0°C est ajoutée. L'hémiacétal est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice et les composés **85** et **86** sont isolés avec des rendements respectifs de 87 et 86%.

Ces produits ont été caractérisés par RMN <sup>1</sup>H et la disparition du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle est confirmée par l'absence des trois singulets caractéristiques à 0.86, 0.11 et 0.06 ppm. La constante de couplage J<sub>1,2</sub> du seul signal représentatif du proton anomère a également été déterminée sur les spectres RMN <sup>1</sup>H. Les valeurs 8.2 et 7.9 Hz, respectivement pour les composés **85** et **86** indiquent que seuls les anomères de configuration β sont obtenus. Le spectre du composé **86** montre également un signal à δ = 4.72 ppm qui correspond au proton en position 1 de l'unité non réductrice. La constante de couplage de ce signal J<sub>1,2</sub> 7.9 Hz confirme que la liaison glycosidique est de configuration β, comme pour les trois autres chitodisaccharides.

La dernière étape de déprotection pour obtenir les chitodisaccharides cibles vise à cliver les groupements benzyle et benzyloxycarbone. Une hydrogénation catalytique est menée dans les mêmes conditions que celles décrites pour les chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc (schéma 66).

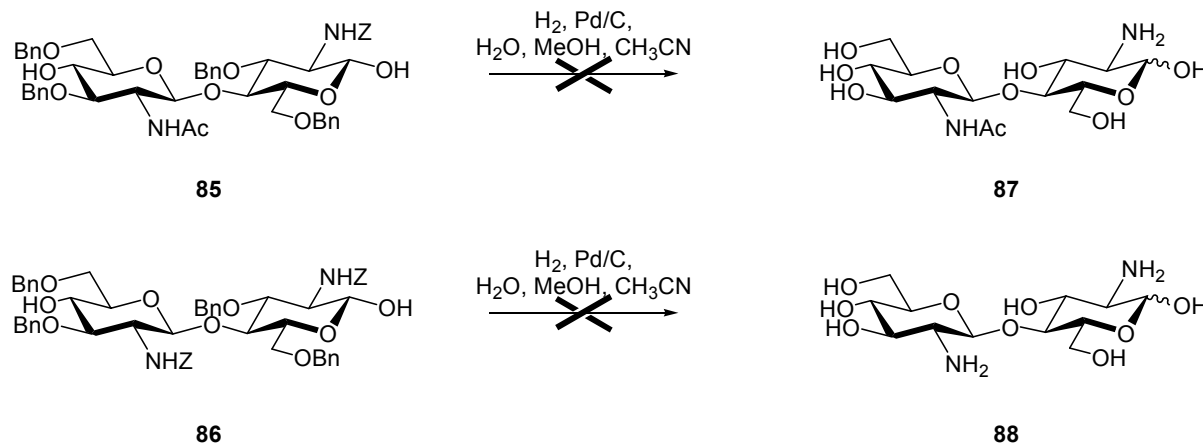


Schéma 66 : déprotection ne conduisant pas aux chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN **87** et **88**

L'hydrogénation menée sur les composés **85** et **86** a conduit à des produits de dégradation qui n'ont pu être isolés. La réactivité des chitodisaccharides **85** et **86** est différente de celle des chitodisaccharides **78** et **79** précédemment synthétisés, puisque le groupe porté par la fonction amine en position réductrice n'est pas le même. Cette différence de réactivité explique vraisemblablement pourquoi nous n'avons pu obtenir les chitodisaccharides GlcNAc-GlcN **87** et GlcN-GlcN **88** totalement déprotégés par cette voie.

Nous avons alors tenté une autre méthode. Les deux dernières étapes de déprotection ont été inversées. C'est-à-dire que les composés **83** et **84** obtenus après la *O*-désacétylation ont été hydrogénés pour déprotéger les groupements benzyle et benzyloxycarbone, l'alcool anomère étant toujours protégé par le *tert*-butyldiméthylsilyle (schéma 67).

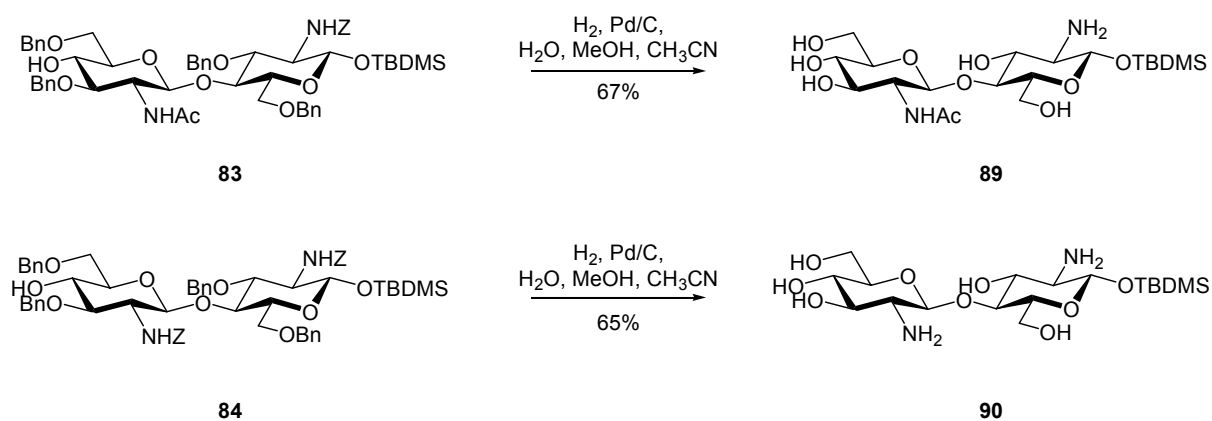


Schéma 67 : déprotection conduisant aux intermédiaires 89 et 90 dans la synthèse des chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN

Les chitodisaccharides **83** et **84** sont solubilisés dans un mélange contenant de l'eau, du méthanol et de l'acétonitrile puis une quantité catalytique de palladium sur charbon est ajoutée. Le milieu est agité sous atmosphère d'hydrogène. La réaction est suivie par RMN <sup>1</sup>H afin de mettre en évidence la disparition des protons aromatiques. Lorsque les signaux caractéristiques des groupements phényle ont totalement disparus, le milieu réactionnel est filtré sur Célite<sup>®</sup>. Cette dernière est abondamment rincée avec du méthanol puis de l'acétonitrile afin de limiter la perte de matière puis le solvant est évaporé et le résidu purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 75/25 + triéthylamine). Les composés **89** et **90** sont isolés avec des rendements respectifs de 67% et 65%. Ils sont ensuite caractérisés par RMN <sup>1</sup>H, ce qui met en évidence l'absence de signaux caractéristiques des groupements phényle.

Pour ces deux chitodisaccharides, l'hydrogénation catalytique semble être plus efficace lorsque l'alcool anomère est protégé. Nous pouvons alors effectuer la dernière déprotection visant à cliver le groupe *tert*-butyldiméthylsilyle (schéma 68).

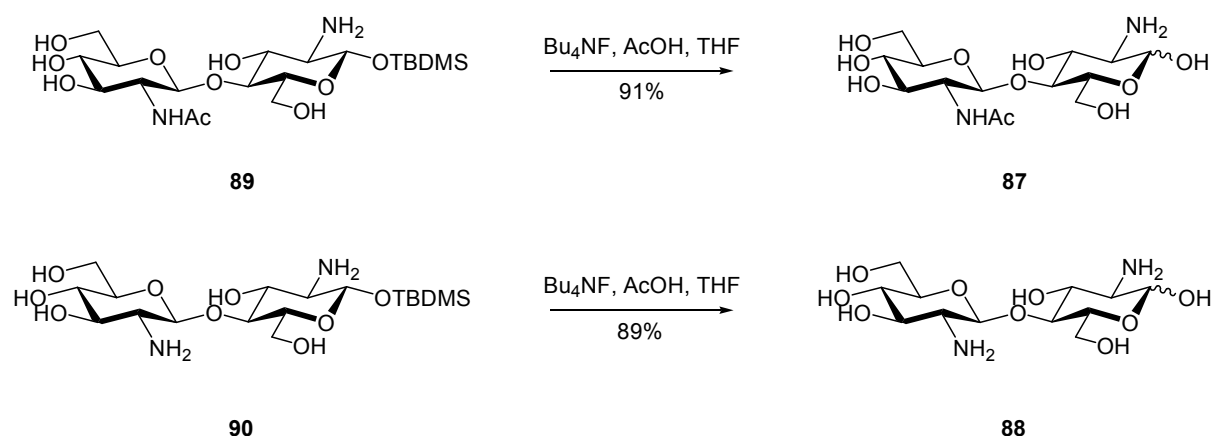


Schéma 68: déprotection conduisant aux chitodisaccharides *GlcNAc-GlcN 87* et *GlcN-GlcN 88*

Les chitodisaccharides sont solubilisés dans le THF et la température du milieu réactionnel abaissée à 0°C avant l'ajout d'une solution contenant un excès de fluorure de tétrabutylammonium (2.5 éq) et d'acide acétique (2.5 éq) dans le THF. Après 30 min de réaction à 0°C puis 16 h à température ambiante, une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 70/30 + triéthylamine), permet d'isoler les chitodisaccharides **87** et **88** avec des rendements respectifs de 91 et 89%.

Ces composés ont été caractérisés par spectrométries de masse et RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Ces analyses mettent en évidence la disparition des signaux caractéristiques des groupements protecteurs. De plus, la spectrométrie de masse SM-HR (ES+) montre des pics à 383.1671 et 341.1557  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  respectivement pour les ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  des composés **87** et **88**.

Toutefois, les analyses RMN ont mis en évidence qu'un sous-produit était également formé lors de cette étape. L'étude du spectre RMN du composé cible a montré une série de pics inconnus. Le plus inquiétant était que des purifications répétées par chromatographie liquide sur gel de silice ne permettaient pas de séparer le chitodisaccharide de la structure inconnue. Nous avons fini par remarquer qu'en solubilisant le mélange chitodisaccharide/structure inconnue dans le méthanol puis en ajoutant de l'acétate d'éthyle, un précipité se formait. Une analyse RMN nous a permis de déterminer que le précipité était composé du chitodisaccharide et d'une quantité moins importante que dans le mélange initial

du composé de structure inconnue. Plusieurs cycles de solubilisation dans le méthanol - précipitation à l'acétate d'éthyle - séparation du précipité par centrifugation ont conduit à l'isolement du chitodisaccharide pur. Ils nous ont également permis de récupérer la structure inconnue pure. Nous avons alors effectué une série d'analyses RMN à une et deux dimensions afin de caractériser ce produit. Nous avons mis en évidence qu'il s'agissait de l'acétate de tétrabutylammonium (TBAA). En effet, lors de la dernière étape de déprotection (schéma 68), nous clivons le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle par réaction avec le fluorure de tétrabutylammonium et l'acide acétique dans le THF. Le mécanisme du schéma 69 explique la formation de l'acétate de tétrabutylammonium.

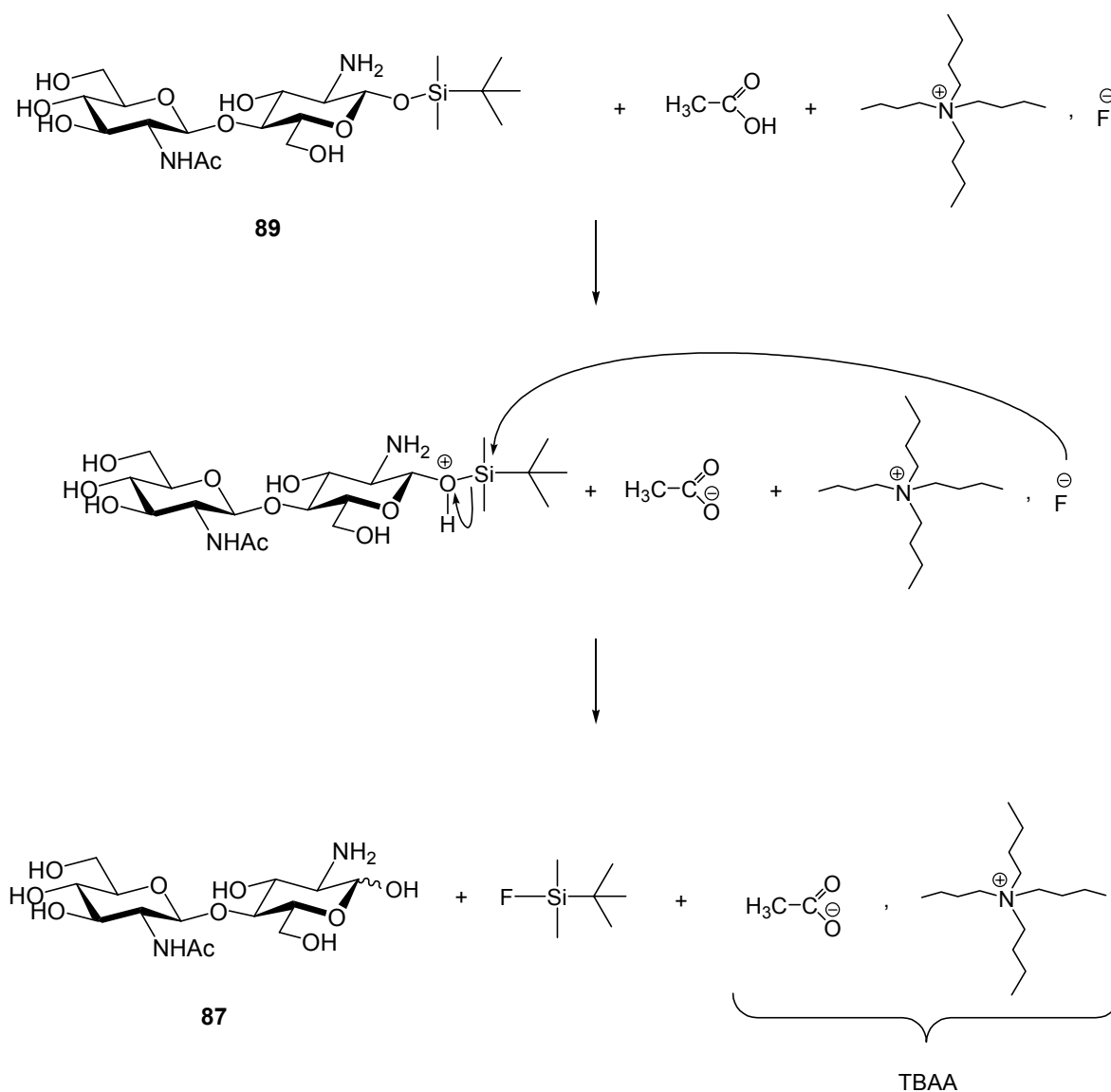


Schéma 69 : formation de l'acétate de tétrabutylammonium

tel-00628743, version 1 - 4 Oct 2011

Lors du clivage du groupe *tert*-butyldiméthylsilyle des chitodisaccharides **76** (GlcNAc-GlcNAc) et **77** (GlcN-GlcNAc), l'acétate de tétrabutylammonium n'était pas observé sur les spectres RMN. En effet, pour les chitodisaccharides GlcNAc-GlcNAc et GlcN-GlcNAc, la déprotection du groupement silyle intervenait alors que les groupes benzyle et benzyloxycarbone étaient toujours présents. L'hémiacétal obtenu pouvait donc être lavé puisqu'il est insoluble en milieu aqueux. En revanche, l'acétate de tétrabutylammonium, soluble dans l'eau, était éliminé. Si nous revenons aux chitodisaccharides **87** et **88**, ils sont totalement déprotégés et possèdent six fonctions hydroxyle. Ils sont solubles en milieu aqueux et l'acétate de tétrabutylammonium ne peut être éliminé par lavage. En jouant sur les solubilités des chitodisaccharides et de l'acétate de tétrabutylammonium dans divers solvants, la seule solution que nous avons trouvée pour éliminer ce sous-produit est la solubilisation du mélange dans le méthanol et la précipitation du chitodisaccharide par l'acétate d'éthyle.

Après résolution des divers problèmes rencontrés, les chitodisaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN sont obtenus après une séquence de quatre (GlcNAc-GlcN) ou trois (GlcN-GlcN) réactions de déprotection suivant le couplage. Les rendements globaux de déprotection sont respectivement de 43 et 46%.

Le tableau 6 montre les différents signaux observés sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) des chitodisaccharides **87** et **88**.

| Chitodisaccharide 87 |                            |                           | Chitodisaccharide 88 |                            |                           |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------|
| signal               | Déplacement chimique (ppm) | attribution               | signal               | Déplacement chimique (ppm) | attribution               |
| doublet              | 5.19                       | H-1a $\alpha$             | doublet              | 5.46                       | H-1a $\alpha$             |
| doublet              | 4.55                       | H-1b                      | doublet              | 4.97                       | H-1b                      |
| doublet              | 4.42                       | H-1a $\beta$              | doublet              | 4.86                       | H-1a $\beta$              |
| multiplet            | 3.95-3.91                  | H-6b                      | multiplet            | 4.05                       | H-6b                      |
| multiplet            | 3.87-3.75                  | H-6b, H-2b                | multiplet            | 3.97-3.84                  | H-6b, H-2b                |
| multiplet            | 3.72-3.54                  | H-2a, H-3b                | multiplet            | 3.80-3.77                  | H-2a, H-3b                |
| multiplet            | 3.52-3.47                  | H-5b, H-6a,<br>H-4b, H-3a | multiplet            | 3.74-3.70                  | H-5b, H-6a,<br>H-4b, H-3a |
| multiplet            | 3.37-3.22                  | H-4a, H-6a                | multiplet            | 3.53-3.46                  | H-4a, H-6a                |
| multiplet            | 3.14                       | H-5a                      | multiplet            | 3.45                       | H-5a                      |
| singulet             | 2.03                       | CH <sub>3</sub> CONH      |                      |                            |                           |

Tableau 6 : interprétation des spectres RMN <sup>1</sup>H des chitodisaccharides GlcNAC-GlcN 87 et GlcN-GlcN 88

### 4.3. Conclusion sur la préparation des quatre chitodisaccharides

Les chitodisaccharides ont été synthétisés selon une stratégie divisée en trois parties. Dans la première phase, deux monosaccharides accepteurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine sont préparés selon un protocole multi-étapes à partir du chlorhydrate de D-glucosamine, puis deux monosaccharides donneurs de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine sont rapidement obtenus à partir des accepteurs. Dans un deuxième temps, un des deux accepteurs est couplé avec un des deux donneurs pour obtenir un chitodisaccharide protégé possédant une structure parfaitement contrôlée. De nombreux essais ont été réalisés afin d'optimiser les conditions réactionnelles de cette étape. Le rapport donneur/accepteur a été modifié, de même que la nature et la quantité du

promoteur. Les quatre chitodisaccharides protégés ont finalement été obtenus avec des rendements de 70 à 90%. La troisième partie consiste en une série de déprotections permettant d'obtenir une centaine de milligrammes des chitodisaccharides cibles.

La synthèse chimique des chitooligosaccharides suit donc un protocole multi-étapes. Chaque étape nécessite d'être optimisée afin d'obtenir un bon rendement global. Certaines voies conduisant théoriquement au produit cible s'avèrent en réalité infructueuses et la synthèse doit être repensée. C'est par exemple ce qui s'est produit lors de l'étape finale d'hydrogénation catalytique des chitooligosaccharides GlcNAc-GlcN et GlcN-GlcN. Après l'optimisation de cette synthèse multi-étapes et la résolution des problèmes rencontrés, nous sommes capables de synthétiser des chitodisaccharides possédant une structure et une architecture parfaitement contrôlées. L'objectif est d'utiliser ce procédé pour la synthèse de chitooligosaccharides de degrés de polymérisation supérieurs à deux.



Ainsi, après la réaction de couplage entre deux monosaccharides donneur et accepteur de glycosyle, nous pouvons suivre le processus de déprotection précédemment décrit pour obtenir le chitodisaccharide cible. Mais nous pouvons également transformer le chitodisaccharide protégé en accepteur ou en donneur de glycosyle.

## 5.1. Synthèse des chitodisaccharides accepteurs de glycosyle

Afin de transformer le chitodisaccharide protégé en accepteur de glycosyle, le groupe acétyle présent en position 4 doit être supprimé (schéma 70). Les quatre chitodisaccharides accepteurs de glycosyle ont été préparés à partir des chitodisaccharides protégés correspondant selon le même protocole. Le chitodisaccharide est solubilisé dans le méthanol puis 0.1 équivalents de sodium sont ajoutés à 0 °C [244] (schéma 71).

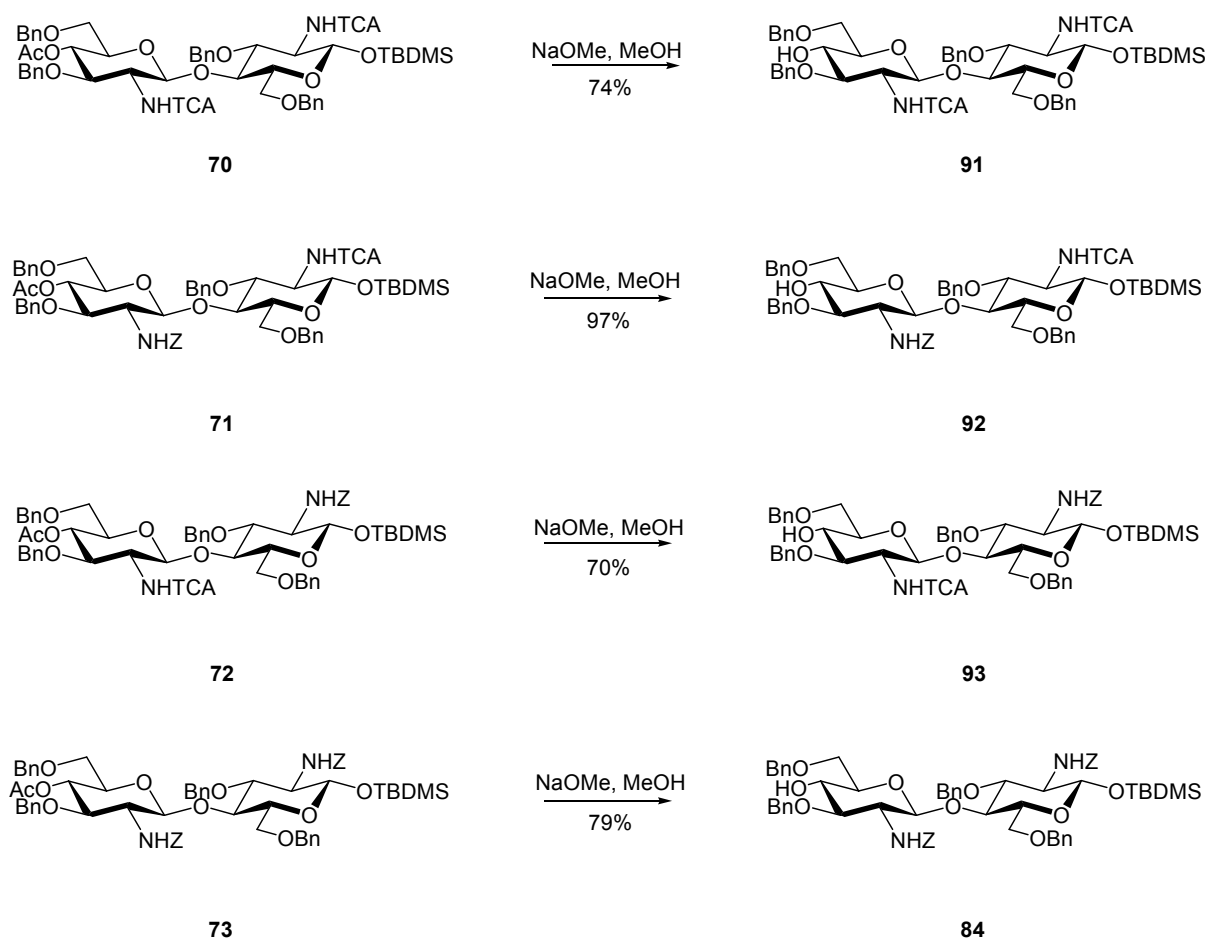


Schéma 71 : synthèse des quatre chitodisaccharides accepteurs de glycosyle

La réaction est suivie par CCM (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine) et lorsque la conversion est totale, le milieu est neutralisé en ajoutant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). L'accepteur obtenu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine). Les quatre accepteurs de glycosyle **91**, **92**, **93** et **84** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 74, 97, 70 et 79%. Ils ont ensuite été caractérisés par spectrométries de masse SM-HR (ES<sup>+</sup>) et RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C). La *O*-désacétylation est confirmée par la disparition du singulet caractéristique du groupement *O*-acétyle aux environs de 1.8 ppm sur les spectres RMN <sup>1</sup>H. De plus, la spectrométrie de masse révèle des pics à 1128, 1117 et 1105 g.mol<sup>-1</sup> respectivement pour les ions [M+Na]<sup>+</sup> des composés **91**, **92** et **84**. Cette même technique montre une masse de 1093 pour l'ion [M+H]<sup>+</sup> du composé **93**.

## 5.2. Synthèse des chitodisaccharides donneurs de glycosyle

Il est également possible de sélectivement transformer les chitodisaccharides protégés en donneurs de glycosyle (schéma 70). Pour cela, il faut tout d'abord déprotéger l'alcool anomère puis synthétiser l'imidate dans les conditions du schéma 72.

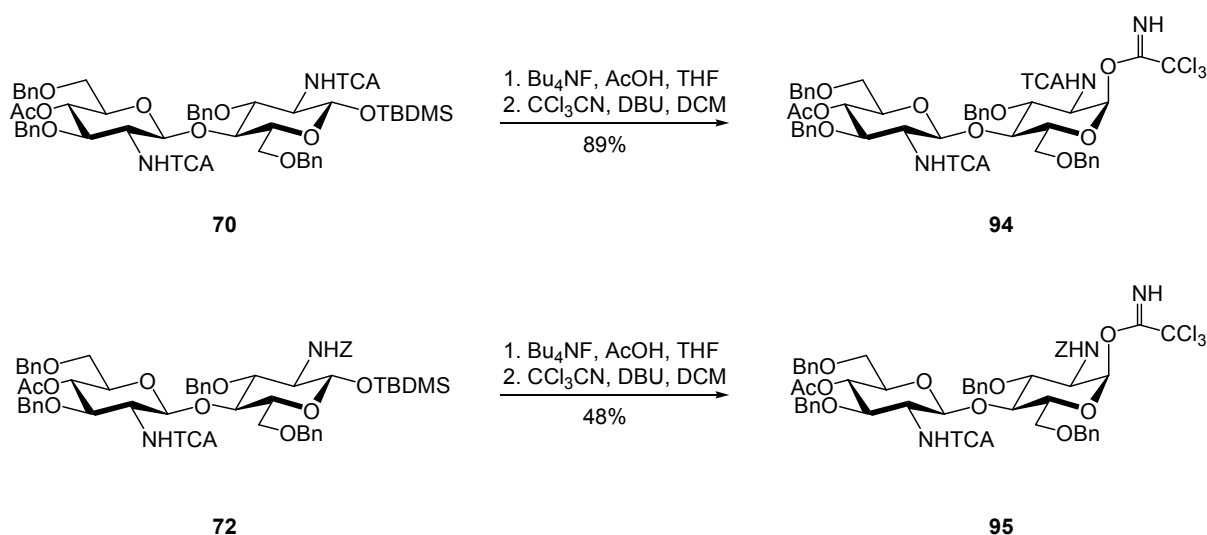


Schéma 72 : synthèse des chitodisaccharides *GlcNAc-GlcNAc* et *GlcNAc-GlcN* donneurs de glycosyle

Le groupe protecteur *tert*-butyldiméthylsilyle des chitodisaccharides totalement protégés est clivé par réaction avec un excès de fluorure de tétrabutylammonium (1.5 éq) et d'acide acétique (1.5 éq) dans le THF. Le groupe partant trichloroacétimide est ensuite obtenu en faisant réagir l'hémiacétal sans purification préalable avec un excès de trichloroacétonitrile (10 éq) dans le dichlorométhane en milieu rendu basique par la base forte DBU (0.3 éq). Le donneur est finalement purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine). Les donneurs de glycosyle **94** et **95** ont été isolés avec des rendements respectifs de 89 et 48%.

La structure de ces chitodisaccharides a été confirmée par spectrométries de masse SM-HR (ES+) et RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ). La spectrométrie de masse montre des pics à 1196 et 1005 g.mol<sup>-1</sup> respectivement pour les ions  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et  $[\text{M}-\text{CCl}_3\text{CONH}]^+$  des composés **94** et **95**. De plus, la RMN  $^1\text{H}$  montre la disparition des trois singulets caractéristiques du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (0.8, 0.1 et 0.05 ppm) tandis que le singulet représentant le groupement imide apparaît à 8.6 ppm. L'étude du spectre RMN  $^1\text{H}$  a également permis de déterminer la configuration du groupe partant. Les constantes de couplages du proton anomère, représenté par un unique doublet, ont été mesurées à 3.4 Hz, indiquant que l'imide est de configuration  $\alpha$  pour les deux chitodisaccharides donneurs de glycosyle.

Les deux chitodisaccharides **70** et **72** ont été choisis pour être transformés en donneur de glycosyle car la fonction amine est respectivement protégée par les groupements TCA et Z. Cela permet de s'assurer que cette modification chimique peut être effectuée quel que soit le groupe protecteur utilisé pour l'unité subissant la transformation.

### 5.3. Réactions de couplage des chitodisaccharides

Une fois les chitodisaccharides accepteurs et donneurs de glycosyle synthétisés, il devient possible d'effectuer une réaction de couplage visant à allonger la chaîne oligosaccharide. Deux chitodisaccharides peuvent être couplés pour conduire au chitotétrasaccharide. Un chitodisaccharide peut également être couplé avec un monosaccharide pour former le chitotrisaccharide correspondant. Les conditions

réactionnelles sont similaires au couplage des monosaccharides, c'est-à-dire en milieu anhydre et en utilisant un acide de Lewis comme  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  ou TMSOTf.

Le chitodisaccharide accepteur de glycosyle **91** et le monosaccharide donneur de *N*-acétyl-*D*-glucosamine **58** ont été couplés dans les conditions du schéma 73.

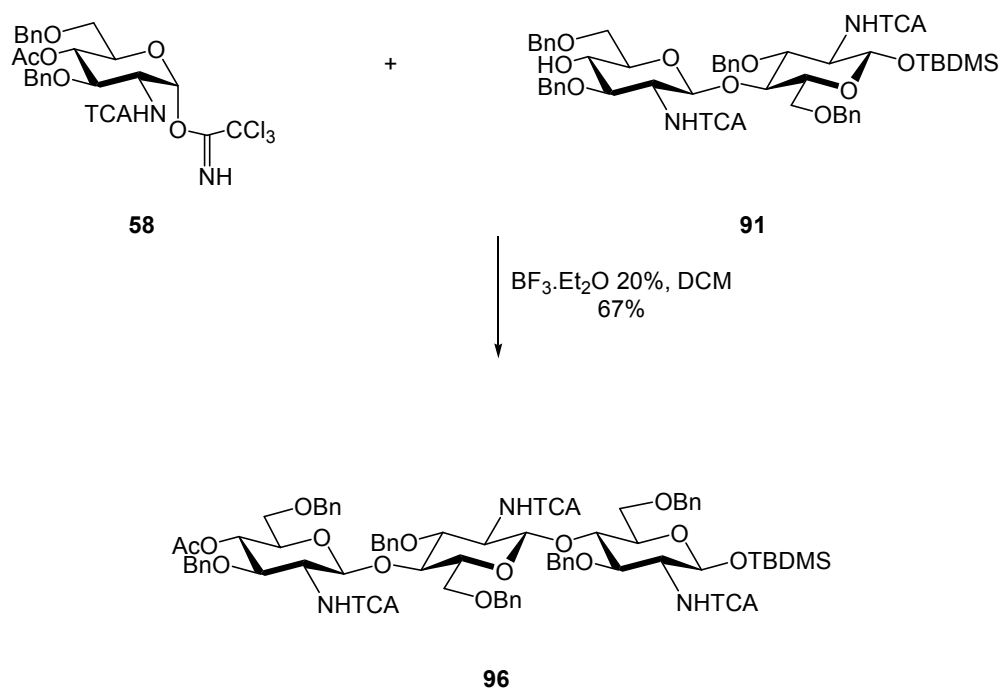


Schéma 73 : synthèse du chitotrisaccharide protégé *GlcNAc-GlcNAc-GlcNAc* **96**

Les deux réactifs ont été solubilisés dans le dichlorométhane anhydre. Des essais ont été réalisés avec les deux promoteurs et sont résumés dans le tableau 7.

| Rapport imidate/accepteur | Nature promoteur                        | quantité promoteur (/accepteur) | Rendement (%) |
|---------------------------|---|---------------------------------|---------------|
| 1.5/1                     | $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ | 0.15 éq                         | 40            |
| 1.5/1                     | $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ | 0.20 éq                         | 33            |
| 2/1                       | $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ | 0.20 éq                         | 67            |
| 1.5/1                     | TMSOTf                                  | 0.15 éq                         | 18            |

Tableau 7 : synthèse du chitotrisaccharide protégé *GlcNAc-GlcNAc-GlcNAc* **96**

L'utilisation du trifluorure de bore étheré a permis d'obtenir les meilleurs rendements. Comme dans les réactions de glycosylation conduisant aux chitodisaccharides, nous avons fait varier les quantités de promoteur et de donneur

afin d'optimiser la réaction. 2 équivalents (par rapport à la quantité molaire d'accepteur) de donneur et 0.2 équivalents de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  ont donné les meilleurs résultats. Le chitotrisaccharide obtenu après la glycosylation a été purifié par une chromatographie liquide sur gel de silice (Toluène/AcOEt : 90/10 + triéthylamine) et isolé avec un rendement de 67%. La conversion n'étant pas totale, du donneur et de l'accepteur ont également été récupérés après la purification. En effet, le suivi de la réaction par CCM (Toluène/AcOEt : 80/20 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ) indique que si le temps de réaction est trop long, le chitotrisaccharide formé se dégrade. 40 min ont permis d'isoler le chitotrisaccharide avec le plus haut rendement (67%).

La caractérisation du chitotrisaccharide **96** par spectrométries de masse SM-HR (ES+) et RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) a confirmé sa structure. En effet, la spectrométrie de masse révèle un pic à  $1652 \text{ g.mol}^{-1}$  pour l'ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  du composé **96**. Les analyses RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , et notamment l'étude du spectre HMBC, confirment la création d'une liaison entre les positions 1 et 4 du donneur **58** et de l'accepteur **91** en faisant apparaître une tache de corrélation entre le carbone 1 et le proton 4 de ces groupements. Enfin, le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre que l'unique signal caractéristique du proton anomère de la nouvelle unité réductrice est un doublet. Sa constante de couplage a été déterminée et vaut 7.6 Hz. La nouvelle liaison glycosidique formée possède donc bien la configuration *trans* attendue.

## 6. Conclusion sur la préparation des chitooligosaccharides

Nous avons développé une méthode de préparation d'homo- et hétéro-chitooligosaccharides basée sur la synthèse de quatre monosaccharides jouant le rôle de blocs de construction, eux-mêmes synthétisés selon un protocole multi-étapes à partir du chlorhydrate de D-glucosamine commercial. L'utilisation des groupes protecteurs de la fonction amine trichloroacétyle (TCA) et benzyloxycarbone (Z) permet de différencier les unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine constitutives des chitooligosaccharides. L'utilisation du groupe partant trichloroacétimide de configuration  $\alpha$  pour les donneurs de glycosyle, activé par le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf) ou le trifluorure de bore étheré (BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O), ainsi que la présence d'un groupe voisin participant, permettent bien d'obtenir une liaison glycosidique de configuration  $\beta$ . Cette dernière a été confirmée en déterminant la constante de couplage du proton anomère grâce à l'analyse RMN <sup>1</sup>H.

La réaction de glycosylation entre un monosaccharide donneur et un monosaccharide accepteur de glycosyle permet d'obtenir le chitodisaccharide correspondant avec un parfait contrôle de la nature et de la position des deux unités constitutives. Les chitodisaccharides **70**, **71**, **72** et **73** peuvent ensuite être déprotégés en quatre étapes pour conduire aux chitodisaccharides cibles.

Les groupes protecteurs que nous avons choisis pour les fonctions hydroxyle permettent d'effectuer une synthèse convergente. Il est en effet possible de déprotéger sélectivement le groupement hydroxyle en position 1 ou 4 du chitodisaccharide afin de transformer ce dernier en donneur ou accepteur de glycosyle. Une nouvelle réaction de couplage permet l'allongement de la chaîne oligosaccharide tout en conservant un parfait contrôle du degré de polymérisation, du degré d'acétylation et de la distribution des deux unités constitutives N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine.

Grâce à la méthode que nous avons mise au point, il a été possible de synthétiser les quatre chitodisaccharides cibles possédant une structure et une architecture totalement contrôlées. Cette nouvelle stratégie a également permis d'obtenir un

chitotrisaccharide parfaitement défini à partir d'un chitodisaccharide. Ce résultat montre ainsi que cette voie peut permettre de préparer diverses structures de chitooligosaccharides possédant une structure contrôlée.

Des études physico-chimiques et biologiques des composés parfaitement définis ainsi obtenus permettront d'établir une relation structure - activité. Dans ce cadre, nous avons étudié le comportement acido-basique des trois chitodisaccharides possédant au moins une unité D-glucosamine.

## 7. Détermination des pK apparents des chitodisaccharides

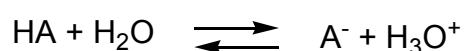
### 7.1. Introduction

Avoir développé une méthode permettant d'obtenir des chitooligosaccharides possédant une taille et une architecture parfaitement définies est très utile pour déterminer une relation structure - activité. Afin d'établir une telle relation, des analyses biologiques et physico-chimiques doivent être effectuées sur les chitodisaccharides synthétisés. Puisque ces composés portent des sites ionisables en raison de la présence d'unités D-glucosamine, nous nous sommes intéressés à l'étude de leurs propriétés électrostatiques, et avons étudié leurs pK apparents (pKa). Cette analyse permettra de voir si une relation existe entre la structure du chitodisaccharide et son comportement physico-chimique, et si une loi de comportement peut être établie après étude d'autres structures de chitooligosaccharides.

### 7.2. Méthode de détermination du pKa

L'étude de l'ionisation des polyélectrolytes met en jeu des phénomènes dont la mesure expérimentale consiste en une détermination potentiométrique du pH. A partir de là, il est possible de déduire la valeur du pKa des fonctions ionisées.

Lors d'une réaction acide/base classique, l'équation-bilan est la suivante :



La constante d'équilibre Ka se calcule selon la relation A :

$$(A) \quad K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Ensuite, le pKa se déduit par la relation  $\text{pKa} = -\log K_a$

Dans le cas d'un électrolyte simple comme le chlorhydrate de D-glucosamine (GlcN,HCl), le pKa ne dépend pas de l'état d'ionisation. Ainsi, la valeur du pKa du groupe  $\text{NH}_3^+$  peut être déterminée graphiquement sur la courbe de titration comme

étant égale à la valeur du pH à la demi-équivalence. Mais pour les polyélectrolytes, il n'est possible de définir qu'un pK apparent. En effet, une des conséquences de la présence de plusieurs sites ionisables le long de la chaîne est leur influence réciproque sur leur dissociation. La valeur du pKa des groupes  $\text{NH}_3^+$  pourrait être déterminée graphiquement comme dans le cas d'un électrolyte simple, mais une meilleure méthode consiste à utiliser l'équation de Katchalsky-Spitnik (B) qui tient compte du changement d'énergie libre durant la neutralisation pour un polyélectrolyte [257]. Dans ce cas, le pKa est pK apparent, du fait qu'il varie avec le degré d'ionisation.

$$(B) \quad \text{pH} = \text{pKa} + n \log[\alpha / (1 - \alpha)]$$

où  $n$  est un paramètre empirique relié au changement d'énergie libre durant la titration, et  $\alpha$  le degré de neutralisation vrai obtenu en tenant compte de l'auto-dissociation des polyélectrolytes à l'aide de la relation (C) :

$$(C) \quad \alpha = \alpha' + [\text{H}^+] / C_p$$

avec  $\alpha'$  le degré de neutralisation expérimental,  $[\text{H}^+]$  la concentration en ions  $\text{H}^+$  déduite de la valeur du pH et  $C_p$  la concentration en polymère. La distinction entre  $\alpha$  et  $\alpha'$  est surtout marquée au début du dosage et devient vite négligeable devant  $C_p$ .

L'équation de Katchalsky-Spitnik (B) permet de déterminer le pK apparent des polyélectrolytes. Il s'agit d'une méthode potentiométrique que nous avons adaptée à la détermination des valeurs des pKa de nos chitodisaccharides.

### 7.2.1. Description de la méthode de titration potentiométrique

Les titrations potentiométriques ont été effectuées dans une cellule thermostatée à  $25^\circ\text{C}$  sous agitation magnétique en utilisant un titrimètre automatique TIM 865 Titration Manager Titralab<sup>®</sup> de Radiometer Analytical équipé d'une électrode de pH

combinée Ag/AgCl pH3006 du même fabricant. Une solution de soude 0.1 M a été utilisée comme agent titrant.

Les chitodisaccharides synthétisés sont tout d'abord convertis en chlorhydrates, afin que les résidus D-glucosamine soient totalement convertis sous forme ammonium à l'aide d'un acide fort. Pour cela, les chitodisaccharides sont solubilisés dans de l'eau et un très léger excès d'acide chlorhydrique 0.01 M est ajouté. La solution de chlorhydrate de chitodisaccharide est ensuite lyophilisée, puis dissoute dans une solution de  $\text{KClO}_4$  de force ionique 0.1 M, pour obtenir une concentration d'environ  $5 \cdot 10^{-4}$  M en groupements amine. La présence du sel permet de s'affranchir des effets électrostatiques à longue distance, par effet d'écran, et ainsi la valeur du pKa obtenue est plus précise. Ces conditions expérimentales ont été choisies afin d'être en accord avec des analyses préalablement effectuées au laboratoire sur la variation du pKa du chitosane en fonction du degré d'acétylation [258, 259].

Lors de la titration potentiométrique, nous ajoutons progressivement un volume connu de soude, ce qui nous permet de tracer la variation du pH de la solution du chlorhydrate de chitodisaccharide en fonction du volume de soude ( $V_{\text{NaOH}}$ ) versé soit :

$$\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}}) \quad (1)$$

A partir de ce premier graphique, nous pouvons déterminer le degré de neutralisation expérimental ( $\alpha'$ ) pour chaque valeur de pH, comme étant le rapport volume de soude versé/volume équivalent.  $\alpha'$  est ensuite corrigé selon l'équation (C) pour donner le degré de neutralisation vrai ( $\alpha$ ). Nous pouvons alors tracer la variation du pH en fonction du  $\log[\alpha/(1-\alpha)]$  :

$$\text{pH} = f(\log[\alpha/(1-\alpha)]) \quad (2)$$

La relation de Katchalsky-Spitnik (B) est du type  $y = b + ax$ . Ainsi, lorsque nous traçons la courbe (2)  $\text{pH} = f(\log[\alpha/(1-\alpha)])$ , nous pouvons en déduire la valeur du pKa comme étant l'ordonnée à l'origine.

La méthode de Katchalsky-Spitnik permet de déterminer graphiquement le pKa des polyélectrolytes par le tracé des fonctions (1) et (2). Avant d'appliquer cette méthode à la détermination du pKa des chitodisaccharides obtenus par synthèse chimique, nous avons voulu la valider en l'utilisant pour un produit dont la structure est proche de celle des chitodisaccharides et dont le pKa est connu : le chlorhydrate de D-glucosamine.

### 7.2.2. Validation de la méthode

Le chlorhydrate de D-glucosamine étant un électrolyte simple, nous déterminons en réalité un pKa. Dans la littérature, le pKa du chlorhydrate de D-glucosamine est compris entre 7.3 et 7.8 selon les méthodes physico-chimiques utilisées et les auteurs. Dès 1926, la valeur du pKa du chlorhydrate de D-glucosamine est déterminée à 7.66 par rotation optique par Vellinger [260]. A. Neuberger et al. [261] ont utilisé la mesure du pouvoir rotatoire pour trouver les valeurs des pKa des anomères  $\alpha$  et  $\beta$ , respectivement égales à 7.71 et 7.27. Une étude RMN  $^1\text{H}$  permet à A. Blaskó et al. [262] de calculer un pKa de 7.56 pour l'anomère  $\alpha$  du chlorhydrate de D-glucosamine et un pKa de 7.31 pour l'anomère  $\beta$ . Plus récemment, S.-B. Strand et al. [263] ont trouvé par diffusion de la lumière et RMN  $^1\text{H}$  un pKa de 7.7. D'autres études ont permis la détermination du pKa du chlorhydrate de D-glucosamine par titration à l'aide d'une solution de soude comme agent titrant. Les valeurs trouvées sont 7.47 [264], 7.55 [265] et 7.8 [266].

Afin d'effectuer cette analyse, nous avons préparé une solution de chlorhydrate de D-glucosamine à  $5.10^{-4}$  M dans du  $\text{KClO}_4$  0.1 M. Une solution de soude à 0.1 M est ensuite ajoutée et le pH est déterminé pour chaque volume de soude ajouté. Ces mesures permettent le tracé de la courbe  $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$  du schéma 74.

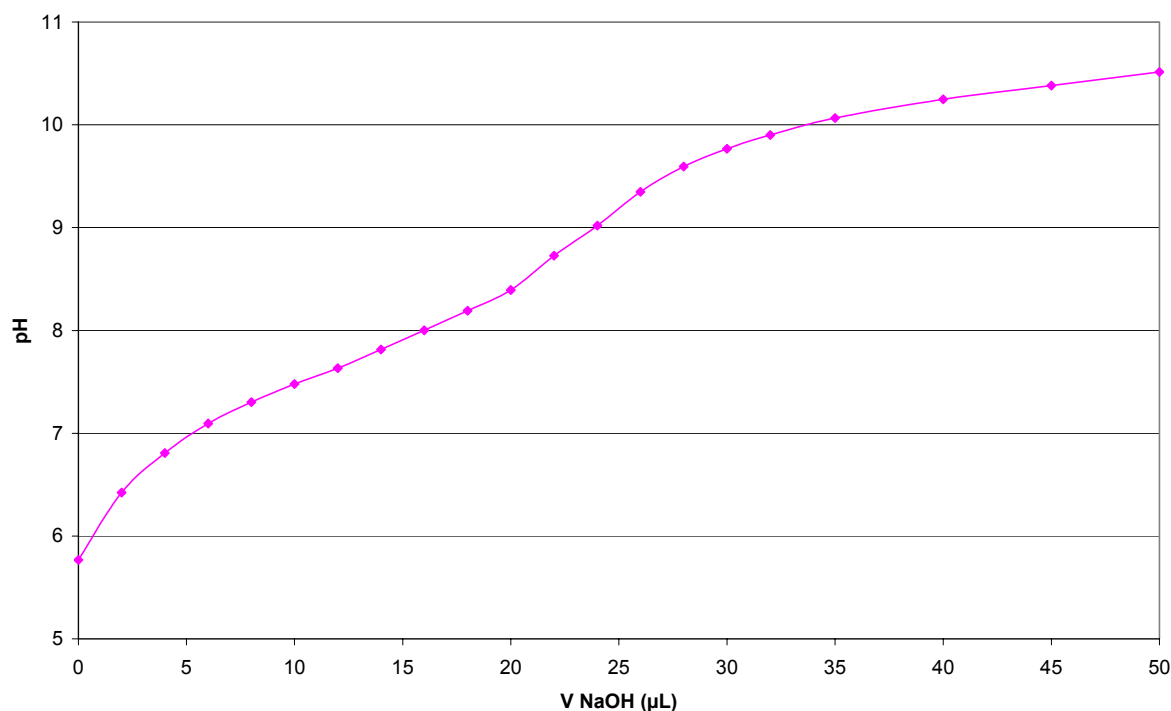


Schéma 74 :  $pH = f(V_{NaOH})$  pour 5 mL d'une solution de chlorhydrate de D-glucosamine dans  $KClO_4$  0.1 M à 25 °C,  $[NaOH] = 0.1$  M

Cette courbe (1) nous a permis de déterminer le volume équivalent ( $V_{eq}$ ) de soude par la méthode des tangentes ou de la dérivée. Ici  $V_{eq} = 22.9$   $\mu$ L.

Initialement, la D-glucosamine est sous forme chlorhydrate (GlcN,HCl). A l'équivalence, le chlorhydrate de D-glucosamine est totalement neutralisé et l'espèce présente en solution est la D-glucosamine (GlcN). Avant l'équivalence, une partie est neutralisée tandis qu'une partie diminuant à chaque ajout de soude se trouve toujours sous forme de chlorhydrate. Le degré de neutralisation expérimental  $\alpha'$  est déterminé pour chaque ajout de soude (et donc pour chaque valeur de pH) comme le rapport molaire  $(GlcN)_V / (GlcN,HCl)_0$  où  $(GlcN)_V$  est la quantité molaire de D-glucosamine présente en solution pour V mL de soude versés, tandis que  $(GlcN,HCl)_0$  est la quantité molaire initiale de chlorhydrate de D-glucosamine. La quantité molaire  $(GlcN,HCl)_0$  est déterminée grâce au volume équivalent et à la concentration de la soude par la relation (D) :

$$(D) \quad (GlcN,HCl)_0 = V_{eq} \times [NaOH]$$

Quant à la quantité molaire  $(\text{GlcN})_V$ , elle est déterminée par l'équation (E) où  $V_V$  est le volume de soude versé :

$$(E) \quad (\text{GlcN})_V = V_V \times [\text{NaOH}]$$

Nous obtenons alors la relation  $(\text{GlcN})_V / (\text{GlcN}, \text{HCl})_0 = V_V / V_{\text{eq}}$  soit  $\alpha' = V_V / V_{\text{eq}}$ .

Le degré de neutralisation vrai ( $\alpha$ ) est ensuite calculé pour chaque valeur de pH en utilisant l'équation (C). Dans cette relation,  $[\text{H}^+]$  est déterminée en fonction du pH. Puis  $C_p$ , la concentration initiale en polymère, qui est une valeur fixe, est obtenue à partir du volume équivalent de soude versé. En effet, cette valeur permet de calculer la quantité de matière de polymère présente en solution. Enfin, connaissant le volume de solution, la concentration en polymère est déduite.

Ainsi, pour chaque valeur du pH, il est possible de déterminer la valeur de  $\alpha$ . Nous sommes alors en mesure de tracer la variation du pH en fonction du  $\log[\alpha / (1 - \alpha)]$  représentée dans le schéma 75.

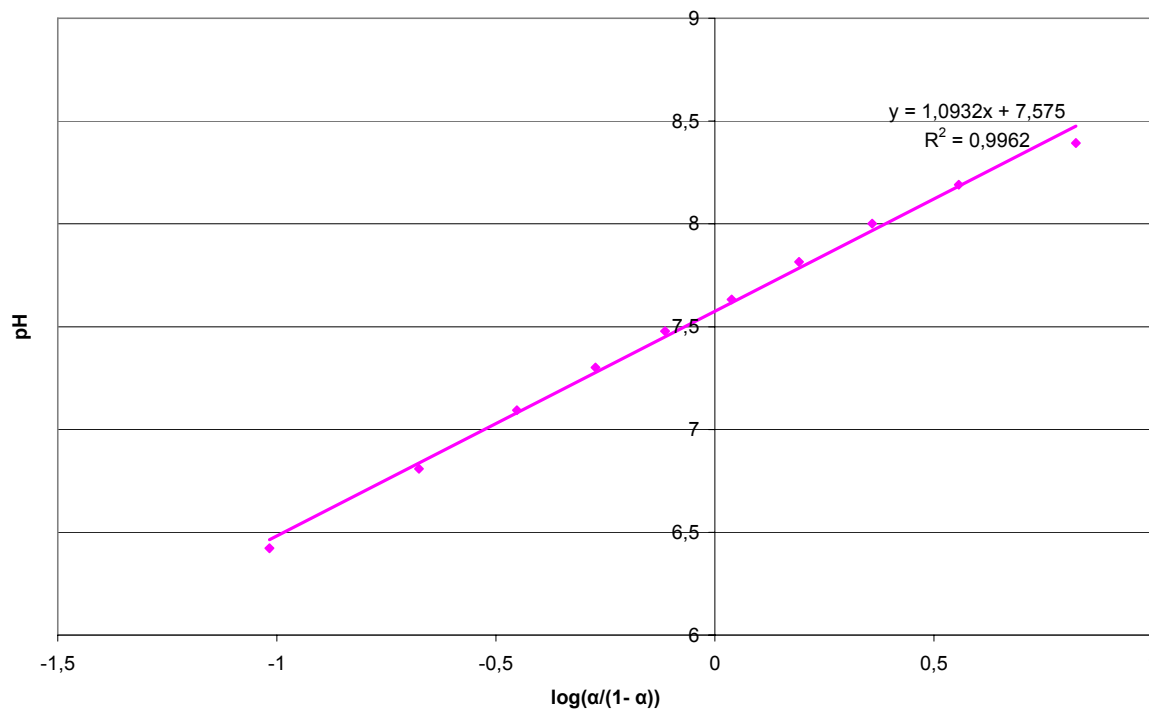


Schéma 75 :  $pH = f(\log[\alpha / (1 - \alpha)])$  pour 5 mL d'une solution de chlorhydrate de D-glucosamine dans  $\text{KClO}_4$  0.1 M à 25 °C

En utilisant la relation de Katchalsky-Spitnik (B), la valeur du pKa est lue comme étant l'ordonnée à l'origine. Dans le cas du chlorhydrate de D-glucosamine, nous

trouvons  $pK_a = 7.58 \pm 0.03$ . Cette valeur étant en accord avec les résultats de la littérature ( $7.3 < pK_a < 7.8$ ), nous pouvons valider cette méthode et l'appliquer à la détermination du  $pK_a$  des chitodisaccharides.

### 7.3. Détermination du $pK_a$ des chitodisaccharides

Nous avons appliqué la méthode de Katchalsky-Spitnik à la détermination des  $pK_a$  des chitodisaccharides possédant au moins une unité D-glucosamine, c'est-à-dire  $(GlcN,HCl)_2$ ,  $(GlcN,HCl)-GlcNAc$  et  $GlcNAc-(GlcN,HCl)$ . En utilisant le même protocole que celui décrit pour la détermination du  $pK_a$  du chlorhydrate de D-glucosamine, nous obtenons pour chacun des trois chitodisaccharides les courbes (1) et (2) respectivement représentées dans les schémas 76 et 77.

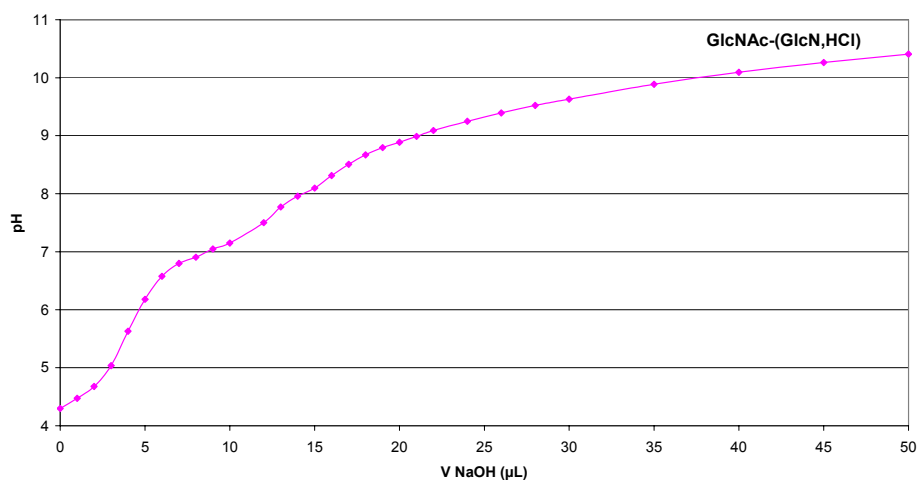
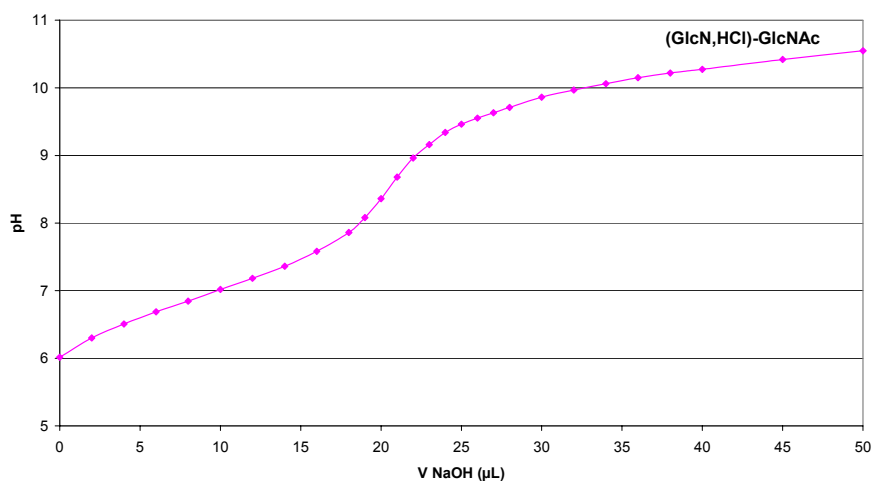
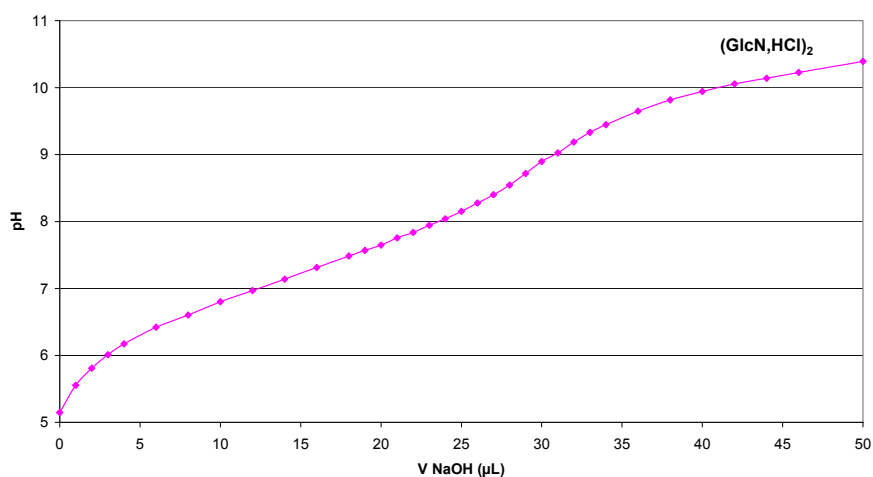


Schéma 76 :  $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$  pour 5 mL d'une solution de  $(\text{GlcN,HCl})_2$ ,  $(\text{GlcN,HCl})\text{-GlcNAc}$  et  $\text{GlcNAc}-(\text{GlcN,HCl})$  respectivement dans  $\text{KClO}_4$  0.1 M à  $25^\circ\text{C}$ ,  $[\text{NaOH}] = 0.1 \text{ M}$

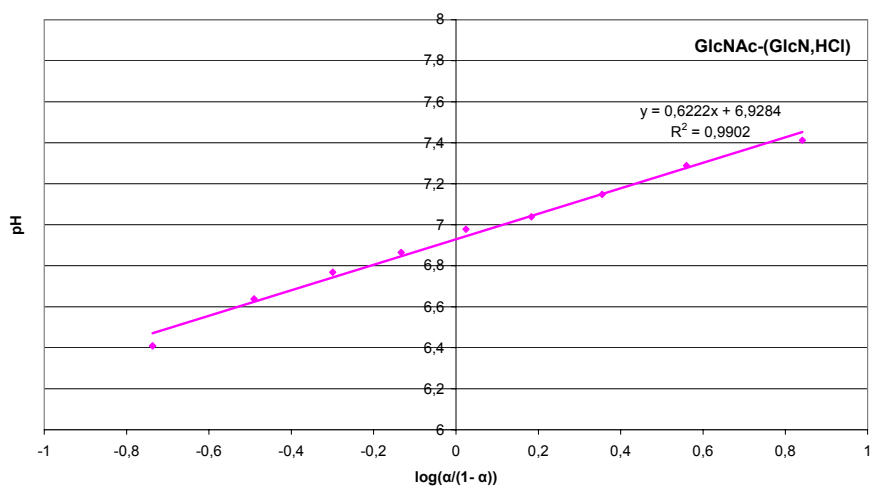
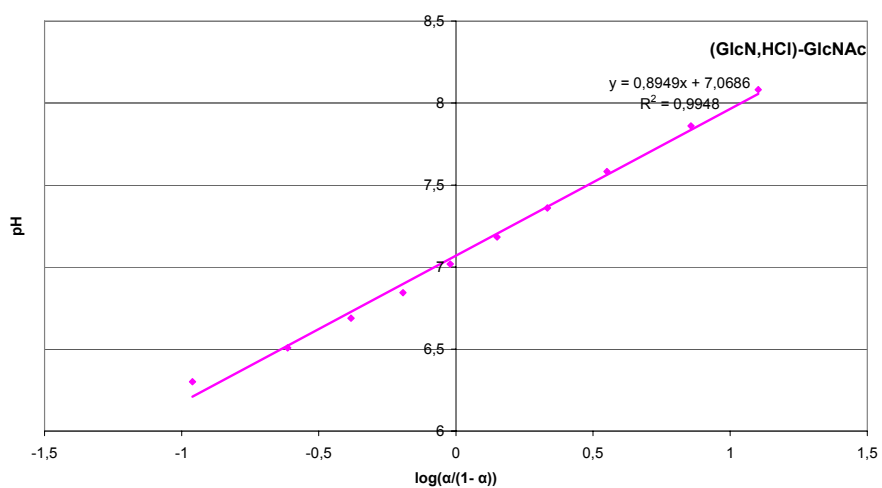
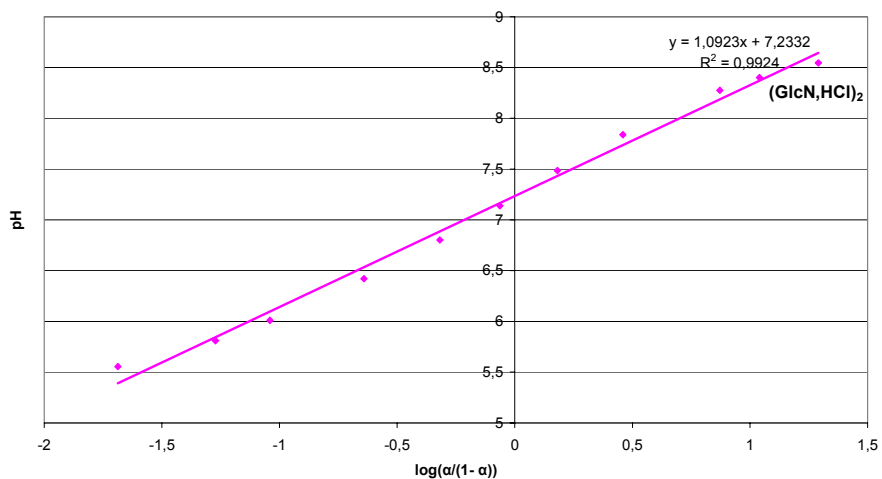


Schéma 77 : tracé de  $pH = f(\log[a/(1-a)])$  pour 5 mL d'une solution de  $(GlcN,HCl)_2$ ,  $(GlcN,HCl)-GlcNAc$  et  $GlcNAc-(GlcN,HCl)$  respectivement dans  $KClO_4$  0.1 M à 25 °C

En utilisant la méthode de Katchalsky-Spitnik, les pKa des trois chitodisaccharides constitués d'au moins une unité D-glucosamine ont été déterminés. Chaque analyse a été répétée à trois reprises afin de s'assurer de la reproductibilité de la mesure. La moyenne de ces valeurs a conduit aux résultats du tableau 8.

| structure               | pKa       |
|-------------------------|-----------|
| (GlcN,HCl) <sub>2</sub> | 7.21±0.02 |
| (GlcN,HCl)-GlcNAc       | 7.06±0.02 |
| GlcNAc-(GlcN,HCl)       | 6.92±0.03 |

*Tableau 8 : valeurs des pKa des chitodisaccharides (GlcN,HCl)<sub>2</sub>, (GlcN,HCl)-GlcNAc et GlcNAc-(GlcN,HCl)*

La valeur de 7.21 obtenue pour le pKa du chitodisaccharide (GlcN,HCl)<sub>2</sub> semble être en accord avec la valeur de 7.30, déterminée par S. Tsukada et al. [265], au cours du titrage potentiométrique du (GlcN,HCl)<sub>2</sub> par une solution de soude de 0.06 M. Notons cependant que dans leur étude aucun sel n'a été ajouté pour écranter les charges, contrairement à notre méthode de titrage.

Concernant les chitodisaccharides (GlcN,HCl)-GlcNAc et GlcNAc-(GlcN,HCl), aucun élément de comparaison n'est actuellement disponible, étant donné qu'aucune étude de détermination de pKa de ces oligomères n'a été décrite dans la littérature à notre connaissance.

## 7.4. Interprétation des valeurs des pKa des chitodisaccharides

En utilisant la relation de Katchalsky-Spitnik nous avons déterminé le pKa des chitodisaccharides. Le tableau 9 indique les valeurs des pKa du chlorhydrate de D-glucosamine et du chitodisaccharide (GlcN,HCl)<sub>2</sub>. Ce tableau montre également la valeur précédemment obtenue au laboratoire pour un chitosane de masse molaire 364 000 g.mol<sup>-1</sup> et de degré d'acétylation 0% [258] afin de mettre en évidence la relation entre la valeur du pKa et le degré de polymérisation.

| Structure               | pKa  |
|-------------------------|------|
| (GlcN,HCl)              | 7.58 |
| (GlcN,HCl) <sub>2</sub> | 7.21 |
| (GlcN,HCl) <sub>n</sub> | 6.43 |

*Tableau 9 : évolution du pKa en fonction du DP*

Le tableau 9 met en évidence une diminution des valeurs de pKa lorsque le degré de polymérisation augmente. En effet, le pKa du chlorhydrate de D-glucosamine vaut 7.58. Cette valeur passe à 7.21 pour le chitodisaccharide (GlcN,HCl)<sub>2</sub> et enfin, le pKa d'un chitosane constitué d'unités D-glucosamine et de masse molaire 364 000 g.mol<sup>-1</sup> (DP≈1800) vaut 6.43. Cette évolution montre l'influence du nombre de liaisons glycosidiques sur la valeur du pKa. Ce résultat avait déjà été mis en évidence par S. Tsukada et al. [265] qui ont déterminé par titration les valeurs des pKa d'homo-chitooligosaccharides constitués exclusivement d'unités D-glucosamine et de degrés de polymérisation variant de 1 à 7. Le pKa du monomère vaut 7.55 et décroît progressivement jusqu'à atteindre une valeur de 6.95 pour l'heptamère.

Le tableau 10 regroupe les valeurs des pKa du monosaccharide (GlcN,HCl) et des deux chitodisaccharides de degré d'acétylation 50% (GlcN,HCl)-GlcNAc et GlcNAc-(GlcN,HCl), ainsi que la valeur déterminée lors de travaux antérieurs dans l'équipe pour un chitosane de masse molaire 411 000 g.mol<sup>-1</sup> et de degré d'acétylation 50% [258].

| Structure  | pKa  |
|--|------|
| (GlcN,HCl)   | 7.58 |
| (GlcN,HCl)-GlcNAc                                  | 7.06 |
| GlcNAc-(GlcN,HCl)                                  | 6.92 |
| [(GlcN,HCl)-GlcNAc/GlcNAc-(GlcN,HCl)] <sub>n</sub> | 6.75 |

*Tableau 10 : évolution du pKa en fonction de la structure et du DP*

Le tableau 10 montre également la diminution de la valeur du pKa lorsque le degré de polymérisation augmente. Il met aussi en évidence l'importance de la structure

du chitodisaccharide. En effet, les deux chitodisaccharides (GlcN,HCl)-GlcNAc et GlcNAc-(GlcN,HCl) ont les mêmes degrés de polymérisation (DP 2) et d'acétylation (DA 50%). Ils ne diffèrent que par l'enchaînement des deux unités constitutives et pourtant leurs pKa ne sont pas identiques : nous observons un pKa de 6.92 lorsque le motif D-glucosamine est en position réductrice contre 7.06 en position non réductrice.

Enfin, la comparaison des pKa des trois chitodisaccharides (degré de polymérisation fixe, degré d'acétylation 0 ou 50%) montre que les valeurs des pKa sont modifiées lorsque le degré d'acétylation change. En effet, la valeur du pKa du chitodisaccharide de degré d'acétylation 0% a été déterminée à 7.21, tandis que celles des hétéro-chitodisaccharides sont 7.06 et 6.92 (selon la distribution des deux groupements constitutifs). L'influence du degré d'acétylation sur le pKa est confirmée par les différentes valeurs de pKa pour un chitosane de DA 0% (6.43) et un chitosane de DA 50% (6.75).

Bien qu'une différence montrant que la valeur du pKa semble dépendre du degré d'acétylation soit observée, aucune tendance ne peut être déduite. En effet, pour les chitodisaccharides, la valeur du pKa diminue lorsque le degré d'acétylation augmente. En revanche, dans le cas du polymère, la valeur du pKa augmente avec le degré d'acétylation. Ceci tend à montrer l'intérêt de connaître les valeurs obtenues pour des oligomères de degrés de polymérisation supérieurs, afin de mieux discerner le rôle du DP par rapport à celui du DA.

## 7.5. Conclusion sur la détermination des pK apparents des chitodisaccharides

L'étude bibliographique sur les activités des chitooligosaccharides avait déjà montré l'influence des degrés de polymérisation et d'acétylation sur leur bioactivité. Nous suggérons que la distribution des deux unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine était également un paramètre clé.

La détermination des pK apparents des trois chitodisaccharides contenant au moins une unité D-glucosamine, et possédant une structure et une architecture parfaitement définies, confirment ce dernier point. Cette étude montre que les

valeurs des pKa des chitodisaccharides dépendent de leur structure (nombre et position des unités *N*-acétyl-*D*-glucosamine et *D*-glucosamine). De même, la variation du degré de polymérisation entraîne une modification de la valeur du pKa. Il est néanmoins trop tôt pour parler de loi de comportement puisque seuls les chitodisaccharides ont été étudiés. Toutefois, les valeurs obtenues montrent des différences significatives devant induire des propriétés physicochimiques et par suite biologiques diverses qu'il faudra confirmer et élargir à l'aide d'autres structures de chitooligosaccharides.

# *D- Conclusion générale*

Les chitooligosaccharides possèdent d'intéressantes propriétés biologiques : activités antimicrobienne, antitumorale, élicitrice, antifongique... Ils ont donc un fort potentiel pour être exploités dans de nombreux domaines : biomédical, pharmaceutique, agro-alimentaire, cosmétique...

Afin de développer l'utilisation des chitooligosaccharides dans leurs applications potentielles, il est nécessaire de connaître la structure responsable de l'activité souhaitée. Or, à ce jour, toutes les études réalisées sur des chitooligosaccharides utilisent des oligomères possédant un degré de polymérisation moyen. En effet, les méthodes actuelles de préparation de chitooligosaccharides conduisent généralement à des mélanges, sans contrôle de la taille ou de la structure des composés obtenus. La mise au point d'une nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides, permettant d'obtenir des structures parfaitement contrôlées, est un outil très utile à l'établissement d'une relation structure - activité, et constitue ainsi une grande avancée pour leur exploitation.

Les objectifs de ce travail étaient d'utiliser la synthèse chimique d'oligosaccharides afin de mettre au point une telle méthode. En effet, la synthèse est la voie idéale pour ce type de stratégie puisqu'elle permet de choisir les composés réagissant entre eux. Ainsi, les paramètres comme la taille et la structure du produit obtenu sont constamment sous contrôle.

Notre stratégie est basée sur la synthèse de quatre monosaccharides jouant le rôle de donneurs et accepteurs de *N*-acétyl-*D*-glucosamine et *D*-glucosamine. Ces quatre composés sont préparés selon un protocole multi-étapes à partir d'une molécule commune, le chlorhydrate de *D*-glucosamine. Les rendements pour la synthèse des accepteurs de *D*-glucosamine et *N*-acétyl-*D*-glucosamine sont respectivement 21% (9 étapes) et 16% (11 étapes). Ensuite, les donneurs de *D*-glucosamine et *N*-acétyl-*D*-glucosamine sont synthétisés en trois étapes à partir des accepteurs respectifs avec des rendements de 86% pour le premier et 90% pour le second.

Dans une deuxième partie, la réaction de couplage entre un de ces donneurs et un de ces accepteurs permet l'obtention d'un chitodisaccharide de structure définie et sous forme protégée. Les quatre chitodisaccharides (GlcN)<sub>2</sub>, (GlcNAc)<sub>2</sub>, (GlcN-GlcNAc) et (GlcNAc-GlcN) protégés ont été préparés avec des rendements respectifs de 70, 90, 81 et 70%.

Dans la troisième phase de notre stratégie, les dimères sont déprotégés en quatre étapes pour conduire aux chitodisaccharides cibles. Les quatre chitodisaccharides (GlcN)<sub>2</sub>, (GlcNAc)<sub>2</sub>, (GlcN-GlcNAc) et (GlcNAc-GlcN) ont été obtenus avec des rendements de déprotection respectifs de 46, 45, 48 et 43%.

Un avantage de notre stratégie repose sur la possibilité de préparer des chitooligosaccharides de degré de polymérisation supérieur à deux par synthèse convergente. C'est-à-dire que grâce aux groupements protecteurs orthogonaux introduits, les chitodisaccharides protégés ont pu être transformés en accepteurs ou donneurs de glycosyle. Les quatre chitodisaccharides (GlcN)<sub>2</sub>, (GlcNAc)<sub>2</sub>, (GlcN-GlcNAc) et (GlcNAc-GlcN) accepteurs de glycosyle ont été préparés en une étape à partir des chitodisaccharides protégés avec des rendements respectifs de 79, 74, 97 et 70%. A partir des mêmes chitodisaccharides, les donneurs de glycosyle (GlcNAc)<sub>2</sub> et (GlcNAc-GlcN) ont été obtenus après une séquence de trois réactions avec des rendements respectifs de 89 et 48%.

Enfin, une réaction de couplage entre un monosaccharide donneur et un disaccharide accepteur a conduit au chitotrisaccharide protégé (GlcNAc)<sub>3</sub> avec un rendement de 67%.

Nous avons donc développé une nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides possédant un contrôle parfait des degrés de polymérisation et d'acétylation ainsi que de l'enchaînement des deux unités constitutives D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine. Nous avons appliqué cette méthode à la synthèse des quatre chitodisaccharides cibles et montré que l'allongement de la chaîne oligosaccharide est possible.

L'obtention de chitooligosaccharides parfaitement définis est indispensable à l'établissement d'une relation structure - activité. Afin d'obtenir des informations concernant une loi de comportement, nous avons exploité les chitodisaccharides obtenus en étudiant leurs propriétés physico-chimiques, et plus particulièrement en déterminant leur pK apparents. Ces composés portent des sites ionisables en raison de la présence d'unités D-glucosamine, et une analyse par titration potentiométrique permet d'obtenir rapidement des premières informations concernant une éventuelle relation entre la structure du chitodisaccharide et son comportement physico-chimique. En utilisant la méthode de Katchalsky-Spitnik,

nous avons obtenu des valeurs de pK apparents de 7.21, 7.06 et 6.92 respectivement pour les chitodisaccharides (GlcN,HCl)<sub>2</sub>, (GlcN,HCl)-GlcNAc et GlcNAc-(GlcN,HCl). Cette étude a mis en avant l'influence des paramètres structuraux que sont les degrés de polymérisation et d'acétylation mais aussi la distribution des deux unités constitutives *N*-acétyl-*D*-glucosamine et *D*-glucosamine. Néanmoins, afin d'établir une relation structure - activité pour les chitooligosaccharides, notre stratégie de synthèse devra être exploitée afin de fournir une chimiothèque de composés. La détermination du pKa de ces nouveaux composés, alliée à des études biologiques, devrait permettre de définir une relation structure - activité. L'objectif d'une telle relation est, dans un premier temps, de pouvoir cibler les structures responsables de l'activité biologique recherchée. Puis, une fois les structures cibles définies, la synthèse pourra être orientée de façon à obtenir le composé voulu de façon rapide et efficace.

# *E- Partie expérimentale*

# 1. Généralités

Les solvants utilisés pour les réactions sont anhydres. Pour les réactions où l'eau est à proscrire, les solvants ont en plus été préalablement distillés. L'ensemble des solvants et réactifs a été acheté chez Aldrich et Acros.

Les réactions ont été suivies par chromatographies sur couche mince en utilisant un gel de silice déposé sur plaque d'aluminium (SDS Carlo Erba, support : aluminium, adsorbant : gel de silice 60F354 60.15  $\mu\text{m}$ ). La solution de révélateur a été préparée au laboratoire et est constituée d'éthanol et de 7% volumique d'acide sulfurique.

Les purifications par chromatographie sur colonne de gel de silice ont été réalisées en utilisant de la silice SDS Carlo Erba 60 A C-C 70-200  $\mu\text{m}$  Chromagel.

Lors des extractions, les phases organiques ont été séchées sur du sulfate de magnésium anhydre.

L'identification et la caractérisation des produits ont été effectuées par spectroscopie RMN sur des spectromètres haute résolution liquide Brüker (ALS 300 MHz, DRX 300 MHz, DRX 500 MHz) en prenant le tétraméthylsilane comme référence de calibration. Environ 5 à 10 mg de produit ont été dissous dans un tube RMN puis 1.5 mL de solvant deutéré a été ajouté.

Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés à l'aide d'un polarimètre Perkin Elmer 241 à 25°C et à une longueur d'onde de 589 nm. Pour effectuer l'analyse, 20 mg de produit ont été placés dans une fiole jaugée de 2 mL. Puis le solvant a été ajouté jusqu'au trait de jauge et la solution obtenue a été placée dans la cellule de mesure.

Les spectres de masse exacte haute résolution ont été faits par le service central d'analyse du CNRS à Vernaison (69). Les analyses MALDI-Tof ont été réalisées sur un appareil Perspective Voyager DE STR. Les analyses Haute Résolution ont quant à elles été effectuées à l'aide d'un appareil ZAB2-SEQ. Enfin, les analyses ElectroSpray ont été obtenues grâce à un appareil Micromasse LCT.

Les titrations potentiométriques ont été effectuées dans une cellule thermostatée à 25°C sous agitation magnétique en utilisant un titrimètre automatique TIM 865 Titration Manager Titrablab® de Radiometer Analytical équipé d'une électrode de pH

combinée Ag/AgCl pHC3006 du même fabricant et par ajout d'une solution de soude à 0.1 M comme agent titrant.

Une solution de  $\text{KClO}_4$  (250 mL) possédant une force ionique de 0.1 M a tout d'abord été préparée en dissolvant le sel (3.46 g, 24.98 mmol) dans une fiole jaugée de 250 mL. De l'eau distillée a été ajoutée jusqu'au trait de jauge.

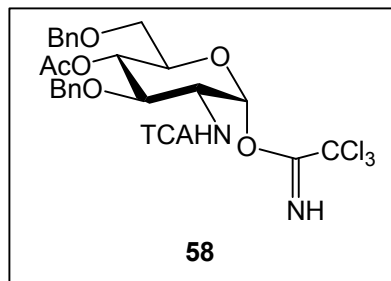
Le chlorhydrate de D-glucosamine (1.62 mg, 7.5  $\mu\text{mol}$ ) a ensuite été dissous dans la solution de  $\text{KClO}_4$  (15 mL).

De même, les chitodisaccharides GlcN,HCl-GlcNAc (3.14 mg, 7.5  $\mu\text{mol}$ ), GlcNAc-GlcN,HCl (3.14 g, 7.5  $\mu\text{mol}$ ) et  $(\text{GlcN,HCl})_2$  (1.55 mg, 3.75  $\mu\text{mol}$ ) ont été dissous dans la solution de  $\text{KClO}_4$  (15 mL).

Pour chaque analyse, 5 mL de solution sont prélevés puis la soude à 0.1 M est ajoutée et le pH est mesuré pour chaque ajout de solution titrante.

## 2. Description

4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-*O*-trichloroacétimidoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (**58**)



Un mélange à 0 °C d'acide acétique (0.14 mL, 2.43 mmol, 1.2 éq) et de Bu<sub>4</sub>NF.3H<sub>2</sub>O (0.76 g, 2.41 mmol, 1.2 éq) dans du THF anhydre (10 mL) est ajouté à une solution à 0 °C du composé **58a** (1.32 g, 2.00 mmol) dissous dans du THF anhydre (10 mL). Le milieu est agité 3 h de 0 °C à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué avec AcOEt puis la phase organique est lavée avec de l'eau et de la saumure avant d'être séchée et concentrée. Un mélange de l'hémiacétal obtenu, de CCl<sub>3</sub>CN (2.0 mL, 19.94 mmol, 10 éq) et de DBU (75  $\mu$ L, 0.50 mmol, 0.25 éq) dans le DCM anhydre (10 mL) est agité pendant 5 h à température ambiante puis concentré sans être chauffé. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40 + triéthylamine) pour donner le composé **58** sous la forme d'une huile jaune (1.30 g, 94%).

$[\alpha]_D = +70.0$  (c = 0.72, CHCl<sub>3</sub>).

Rf 0.43 (Heptane/AcOEt : 60/40 + Et<sub>3</sub>N).

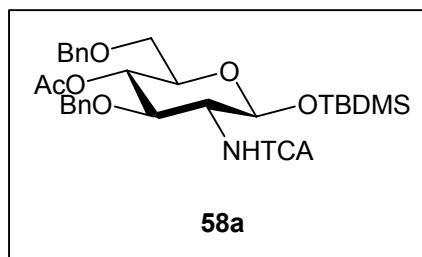
**RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 8.77 (s, 1H, NH imidate) ; 7.35-7.27 (m, 10H, 2Ph) ; 6.60 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 8.5 Hz, NH) ; 6.47 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 3.4 Hz, H-1) ; 5.38 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 9.6 Hz, J<sub>3,4</sub> = 9.6 Hz, H-4) ; 4.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.46 (m, 1H, H-2) ; 4.06 (m, 1H, H-5) ; 4.03 (m, 1H, H-3) ; 3.60 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 3.3 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 10.8 Hz, H-6a) ; 3.56 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> = 4.2 Hz, H-6b) ; 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO).

**RMN** <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.4 (CO, Ac) ; 161.8 (COCCl<sub>3</sub>) ; 160.0 (C=NH) ; 137.6, 137.0 (C aromatiques) ; 128.8-127.9 (CH aromatiques) ; 94.4 (C-1) ; 92.1 (CCl<sub>3</sub> trichloroacétamido) ; 90.8 (CCl<sub>3</sub> imidate) ; 76.0 (C-3) ; 73.7, 73.0 (2CH<sub>2</sub>Ph) ; 72.2 (C-5) ; 70.0 (C-4) ; 68.5 (C-6) ; 53.5 (C-2) ; 20.9 (CH<sub>3</sub>CO).

**ES+MS** : (m/z) 530 [M-CCl<sub>3</sub>CONH]<sup>+</sup>.

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $C_{26}H_{26}Cl_6N_2O_7$  : C 45.18, H 3.79, N 5.05, trouvé : C 45.09, H 3.84, N 4.12.

**4-O-Acétyl-3,6-di-O-benzyl-1-O-tert-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranose (58a)**



Le composé **60** (1.30 g, 2.10 mmol) est dissous dans la pyridine (20 mL) et une pointe de spatule de DMAP est ajoutée. Le milieu est refroidi à 0°C puis de l'anhydride acétique (0.40 mL, 4.20 mmol, 2 éq) est additionné goutte à goutte. Après 1 h 30 de réaction de 0°C à température ambiante, le mélange est concentré sous pression réduite puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30) et conduit au composé **58a** sous la forme d'un solide blanc (1.32 g, 95%).

$[\alpha]_D = +4.3$  (c = 0.79,  $CHCl_3$ ) ; lit. +9.0 ( $CH_2Cl_2$ ) [248].

Rf 0.50 (Heptane/AcOEt : 60/40).

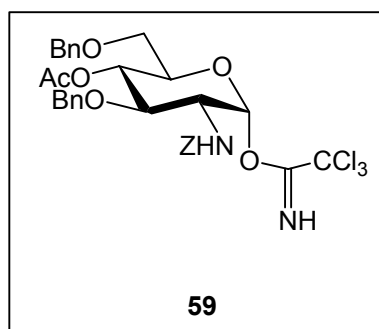
**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.34-7.21 (m, 10H, 2Ph) ; 6.96 (d, 1H,  $J_{2,NH} = 7.5$  Hz, NH) ; 5.06 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.7$  Hz, H-1) ; 4.92 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.8$  Hz,  $J_{3,4} = 8.9$  Hz, H-4) ; 4.60 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.52 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.29 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.5$  Hz, H-3) ; 3.67 (m, 1H,  $J_{5,6b} = 4.8$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.8$  Hz, H-5) ; 3.55 (d, 2H,  $J_{6a,6b} < 0.5$  Hz, H-6a, H-6b) ; 3.44 (m, 1H, H-2) ; 1.87 (s, 3H,  $CH_3CO$ ) ; 0.89 (s, 9H,  $(CH_3)_3CSi$ ) ; 0.14 (s, 3H,  $CH_3Si$ ) ; 0.11 (s, 3H,  $CH_3Si$ ).

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.9 (CO, Ac) ; 161.8 ( $COCCl_3$ ) ; 138.0, 137.7 (C aromatiques) ; 128.6-127.8 (CH aromatiques) ; 94.1 (C-1) ; 92.5 ( $CCl_3$ ) ; 77.1 (C-3) ; 74.1, 73.6 ( $2CH_2Ph$ ) ; 73.4 (C-5) ; 71.7 (C-4) ; 69.8 (C-6) ; 60.9 (C-2) ; 25.7 ( $(CH_3)_3CSi$ ) ; 21.0 ( $CH_3CO$ ) ; 17.9 ( $(CH_3)_3CSi$ ) ; -4.0 ( $CH_3Si$ ) ; -5.1 ( $CH_3Si$ ).

**SM MALDI-Tof** : (m/z) 682  $[M+Na]^+$ .

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $C_{30}H_{40}Cl_3NO_7Si$  : C 54.50, H 5.97, N 2.13, trouvé : C 54.09, H 6.08, N 2.16.

**4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy-1-*O*-trichloroacétimidoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (**59**)**



Une solution à 0 °C de  $\text{Bu}_4\text{NF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (1.13 g, 3.58 mmol, 1.2 éq) et d'acide acétique (0.21 mL, 3.64 mmol, 1.2 éq) dans du THF anhydre (15 mL) est préparée. Ce mélange est ensuite ajouté à une solution à 0 °C du composé **59a** (1.94 g, 2.99 mmol) dans du THF anhydre (15 mL). L'ensemble est agité pendant 5 h de 0 °C à température ambiante. Le mélange est ensuite concentré, dilué avec AcOEt, lavé avec de la saumure, séché puis concentré. Un mélange de l'hémiacétal obtenu, de  $\text{CCl}_3\text{CN}$  (3.00 mL, 29.92 mmol, 10 éq) et de DBU (0.11 mL, 0.74 mmol, 0.25 éq) dans du DCM anhydre (30 mL) est agité pendant 5 h à température ambiante puis concentré sans être chauffé. Le résidu est purifié à l'aide d'une chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30 + triéthylamine) pour donner le composé **59** sous la forme d'une huile jaune (1.93 g, 95%).

$[\alpha]_D = +64.4$  ( $c = 0.675$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

Rf 0.39 (Heptane/AcOEt : 70/30 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

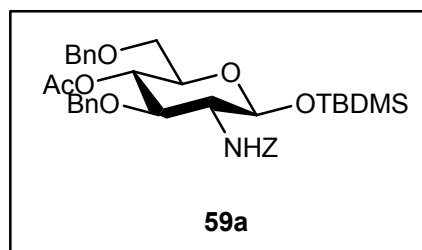
**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 8.69 (s, 1H, NH imidate) ; 7.35-7.19 (m, 15H, 3Ph) ; 6.37 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1) ; 5.31 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.7$  Hz,  $J_{3,4} = 9.7$  Hz, H-4) ; 5.07 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{O}$ , NH) ; 4.67-4.45 (m, 4H,  $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.26 (m, 1H, H-2) ; 4.02 (m, 1H,  $J_{5,6b} = 6.8$  Hz,  $J_{5,6a} = 6.8$  Hz, H-5) ; 3.83 (t, 1H, H-3) ; 3.55 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 1.93 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.4 (CO, Ac) ; 160.2 (C=NH) ; 155.7 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 138.0, 137.7, 136.2 (C aromatiques) ; 128.5-127.7 (CH aromatiques) ; 95.7 (C-1) ; 91.0 ( $\text{CCl}_3$ ) ; 76.4 (C-3) ; 73.5, 73.0 ( $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 72.0 (C-5) ; 70.2 (C-4) ; 68.7 (C-6) ; 66.8 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 53.5 (C-2) ; 20.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**ES+MS** : (m/z) 518 [ $\text{M}-\text{CCl}_3\text{CONH}$ ] $^+$ .

Analyse élémentaire : Calc. pour  $C_{32}H_{33}Cl_3N_2O_8$  : C 56.52, H 4.89, N 2.06, trouvé : C 56.64, H 4.92, N 2.01.

4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (**59a**)



Le composé **61** (2.00 g, 3.29 mmol) est dissous dans la pyridine (30 mL) et une pointe de spatule de DMAP est ajoutée. Le milieu est refroidi à 0°C puis de l'anhydride acétique (0.62 mL, 6.58 mmol, 2 éq) est additionné goutte à goutte. Après 45 minutes de réaction de 0°C à température ambiante, le mélange est concentré sous pression réduite et le résidu est cristallisé dans un mélange AcOEt/Heptane pour donner le composé **59a** sous la forme de cristaux blancs (1.94 g, 91%).

$[\alpha]_D = +6.0$  ( $c = 0.965$ ,  $CHCl_3$ ).

Rf 0.52 (Heptane/AcOEt : 70/30).

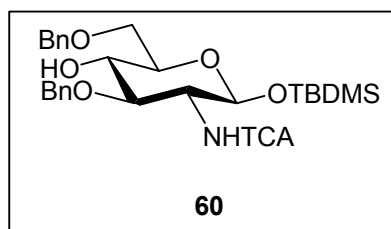
**RMN**  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.37-7.16 (m, 15H, 3Ph) ; 5.06-4.97 (m, 5H, H-4, H-1,  $CH_2O$ , NH) ; 4.55 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.51 (s, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.05 (m, 1H, H-3) ; 3.60 (m, 1H,  $J_{5,6b} = 4.5$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.8$  Hz, H-5) ; 3.53 (d, 2H,  $J_{6a,6b} < 0.5$  Hz, H-6a, H-6b) ; 3.25 (m, 1H, H-2) ; 1.87 (s, 3H,  $CH_3CO$ ) ; 0.87 (s, 9H,  $(CH_3)_3CSi$ ) ; 0.11 (s, 3H,  $CH_3Si$ ) ; 0.07 (s, 3H,  $CH_3Si$ ).

**RMN**  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 1265 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.9 (CO, Ac) ; 155.7 ( $CO_2CH_2Ph$ ) ; 138.1, 136.4, 134.2 (C aromatiques) ; 128.6-127.6 (CH aromatiques) ; 95.0 (C-1) ; 77.9 (C-3) ; 73.7, 73.6 ( $2CH_2Ph$ ) ; 73.4 (C-5) ; 71.8 (C-4) ; 70.0 (C-6) ; 66.8 ( $CH_2O$ ) ; 59.9 (C-2) ; 25.7 ( $(CH_3)_3CSi$ ) ; 21.0 ( $CH_3CO$ ) ; 18.0 ( $(CH_3)_3CSi$ ) ; -4.1 ( $CH_3Si$ ) ; -5.2 ( $CH_3Si$ ).

**ES+MS** : (m/z) 672  $[M+Na]^+$ .

Analyse élémentaire : Calc. pour  $C_{36}H_{47}NO_8Si$  : C 66.54, H 7.29, N 2.16, trouvé : C 66.65, H 7.42, N 2.21.

**3,6-Di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranose (60)**



Un mélange constitué du composé **69** (2.38 g, 3.86 mmol), de tamis moléculaire 3 Å et de triéthylsilane (9.35 mL, 57.88 mmol, 15 éq) dans du DCM anhydre (30 mL) est refroidi à  $-10^{\circ}\text{C}$ . De l'acide trifluoroacétique (4.30 mL, 57.90 mmol, 15 éq) est ajouté et le mélange est agité pendant 1 h à  $-10^{\circ}\text{C}$ . Le tamis moléculaire est filtré sur Célite® et la phase organique est lavée avec de l'eau puis par une solution saturée en  $\text{NaHCO}_3$  avant d'être séchée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30) pour donner le composé **60** sous la forme d'une poudre blanche (2.00 g, 84%).

$[\alpha]_{\text{D}} = -13.2$  ( $c = 1.08$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) ; lit.  $-13.4$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) [248].

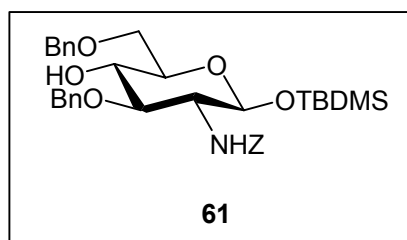
Rf 0.14 (Heptane/AcOEt : 70/30).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.35-7.24 (m, 10H, 2Ph) ; 6.98 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}} = 8.1$  Hz, NH) ; 5.02 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.9$  Hz, H-1) ; 4.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.56 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 3.92 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 8.5$  Hz,  $J_{2,3} = 10.5$  Hz, H-3) ; 3.71-3.64 (m, 3H, H-4, H-6a, H-6b) ; 3.58-3.48 (m, 2H, H-5, H-2) ; 2.95 (s, 1H, OH-4) ; 0.88 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 0.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 161.8 ( $\text{COCCl}_3$ ) ; 138.2, 137.8 (C aromatiques) ; 128.7-127.8 (CH aromatiques) ; 94.7 (C-1) ; 92.6 ( $\text{CCl}_3$ ) ; 79.6 (C-3) ; 74.6, 73.9 ( $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 73.7 (C-5) ; 73.6 (C-4) ; 70.8 (C-6) ; 60.4 (C-2) ; 25.8 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 18.0 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; -4.0 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; -5.0 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**SM MALDI-Tof** : ( $m/z$ ) 642  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{Cl}_3\text{NO}_6\text{Si}$  : C 54.33, H 6.19, N 2.26, trouvé : C 54.53, H 6.21, N 2.16.

**3,6-Di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (61)**

Un mélange comprenant le composé **65** (9.92 g, 16.39 mmol), du tamis moléculaire 3 Å activé et du triéthylsilane (39.21 mL, 245.86 mmol, 15 éq) dans du DCM anhydre (75 mL) est refroidi à -10°C. De l'acide trifluoroacétique (18.94 mL, 245.89 mmol, 15 éq) est ajouté goutte à goutte et le mélange est agité 1 h à -10°C. Le tamis moléculaire est filtré sur Célite®. La phase organique est lavée avec de l'eau, puis par une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>, avant d'être séchée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 70/30) pour donner le composé **61** sous la forme d'une huile incolore (7.46 g, 75%).  
[α]<sub>D</sub> = +12.0 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

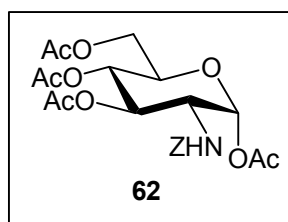
Rf 0.18 (Heptane/AcOEt : 70/30).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.41-7.25 (m, 15H, 3Ph) ; 5.08 (m, 2H, H-1, NH) ; 4.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 4.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.81 (m, 1H, H-3) ; 3.72 (d, 2H, J<sub>6a,6b</sub> = 4.9 Hz, H-6a, H-6b) ; 3.66 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 9.9 Hz, J<sub>3,4</sub> = 8.5 Hz, H-4) ; 3.45 (m, 2H, H-5, H-2) ; 2.95 (s, 1H, OH-4) ; 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) : δ (ppm) 155.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 138.5, 136.5, 134.6 (C aromatiques) ; 128.6-127.7 (CH aromatiques) ; 95.6 (C-1) ; 80.5 (C-3) ; 74.1, 73.8 (2CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.7 (C-5) ; 73.0 (C-4) ; 70.8 (C-6) ; 66.8 (CH<sub>2</sub>O) ; 59.4 (C-2) ; 25.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 18.0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.2 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 630 [M+Na]<sup>+</sup> ; 608 [M+H]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>Si : C 67.19, H 7.46, N 2.30, trouvé : C 66.96, H 7.57, N 2.35.

**1,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose (62)**

Le chlorhydrate de D-glucosamine (21.56 g, 0.10 mol) est dissous dans un ballon tricol contenant de l'eau (500 mL). La solution est agitée mécaniquement et refroidie à 0°C avant l'ajout de NaHCO<sub>3</sub> (37.80 g, 0.45 mol, 4.5 éq). Le milieu est laissé sous agitation mécanique 30 min à 0°C puis une solution de chloroformate de benzyle (44.30 mL, 0.31 mol, 3.1 éq) dans de l'acétone (300 mL) est additionnée goutte à goutte. Après 15 min à 0°C, le précipité formé est filtré et lavé par de l'éther froid puis séché sous vide. Le solide est ensuite dissous dans la pyridine (90 mL) et une pointe de spatule de DMAP est ajoutée. Le milieu est refroidi à 0°C puis de l'anhydride acétique (75 mL, 0.80 mol, 8 éq) est additionné goutte à goutte. Après 4 h de réaction de 0°C à température ambiante, le milieu est versé dans un bécher contenant de la glace pilée (250 mL) puis extrait avec du DCM et lavé par une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>. La phase organique est séchée et concentrée puis une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40) conduit au composé **62** sous la forme d'une huile jaune (36.09 g, 75%).

$[\alpha]_D^{25} = +73.0$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>) ; lit. +75.3 (pyridine) [267].

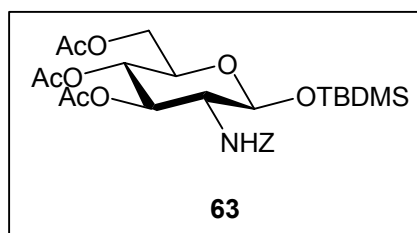
Rf 0.44 (Heptane/AcOEt : 45/55).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.36-7.33 (m, 5H, Ph) ; 6.21 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 3.6 Hz, H-1) ; 5.27-4.96 (m, 5H, NH, H-3, H-4, CH<sub>2</sub>O) ; 4.30-3.98 (m, 4H, H-2, H-5, H-6a, H-6b) ; 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 171.2 (CO, Ac) ; 170.6 (CO, Ac) ; 169.3 (CO, Ac) ; 168.6 (CO, Ac) ; 155.5 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 135.9 (C aromatique) ; 128.5, 128.2 (CH aromatiques) ; 90.8 (C-1) ; 72.2 (C-3) ; 70.6 (C-5) ; 69.7 (C-4) ; 67.3 (CH<sub>2</sub>O) ; 61.6 (C-6) ; 52.8 (C-2) ; 20.9 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.6 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.5 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.4 (CH<sub>3</sub>CO).

SM-HR (ES<sup>+</sup>) : (m/z) Calc. pour C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>11</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 504.1480 ; trouvé 504.1482.

**3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (63)**



L'acétate d'hydrazine (8.40 g, 91.30 mmol, 1.6 éq) est ajouté à une solution du composé **62** (27.46 g, 57.09 mmol) dans du DMF anhydre (120 mL). Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante puis dilué avec de l'eau. La phase aqueuse est ensuite extraite par AcOEt. La phase organique récupérée est séchée et concentrée sous pression réduite pour conduire à l'hémiacétal.

Ensuite, un mélange contenant l'hémiacétal, de l'imidazole (9.72 g, 142.77 mmol, 2.5 éq) et du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (12.90 g, 85.59 mmol, 1.5 éq) dans du DMF anhydre (120 mL) est agité pendant une nuit à température ambiante. L'excès de chlorure est détruit par l'ajout de méthanol, puis le milieu est dilué avec de l'eau avant d'être extrait par AcOEt et lavé par de la saumure. La phase organique est séchée et concentrée. Le produit est purifié à l'aide d'une chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 40/60) pour donner le composé **63** sous la forme d'une poudre blanche (32.66 g, 69%).

$[\alpha]_D = +9.4$  ( $c = 0.985$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) ; lit.  $+9.9$  ( $\text{CHCl}_3$ ) [243].

Rf 0.16 (Heptane/AcOEt : 50/50).

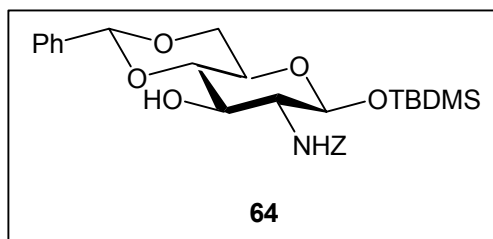
**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.39-7.29 (m, 5H, Ph) ; 5.21 (m, 1H, NH) ; 5.07-5.01 (m, 3H, H-3, H-4, H-1) ; 4.98 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 4.19 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 5.8$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12.1$  Hz, H-6b) ; 4.11 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 2.6$  Hz, H-6a) ; 3.68 (m, 1H, H-2) ; 3.57 (m, 1H, H-5) ; 2.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 1.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 0.86 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 0.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 170.9 (CO, Ac) ; 170.8 (CO, Ac) ; 169.6 (CO, Ac) ; 155.8 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 136.3 (C aromatique) ; 128.5, 128.2 (CH aromatiques) ; 96.3 (C-1) ; 72.1 (C-3) ; 71.8 (C-5) ; 69.2 (C-4) ; 66.9 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 62.6 (C-6) ; 58.1 (C-2) ; 25.6 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 20.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 20.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 20.7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 18.0 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; -4.2 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; -5.2 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**SM MALDI-Tof** : (m/z) 576  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $C_{26}H_{39}NO_{10}Si$  : C 56.40, H 7.09, N 2.54, trouvé : C 56.03, H 7.05, N 2.89.

**4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (64)**



Une suspension du composé **63** (20.37 g, 36.82 mmol) dans le méthanol (200 mL) est traitée pendant 1 h de 0°C à température ambiante avec NaOMe (Na : 0.25g, 10.87 mmol, 0.3 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée, pour donner le triol correspondant. De l'acide camphosulfonique (0.34 g, 1.46 mmol, 0.04 éq) est ajouté à une solution contenant le triol et du 2,2-diméthoxybenzaldéhyde (8.3 mL, 55.30 mmol, 1.5 éq) dans de l'acétonitrile (150 mL). La solution est agitée pendant 5 h à température ambiante puis le milieu est neutralisé par l'ajout de triéthylamine. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Une purification par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40 + triéthylamine) permet d'obtenir le composé **64** sous la forme d'une poudre blanche (16.93 g, 89%).

$[\alpha]_D = -32.1$  (c = 0.77, CHCl<sub>3</sub>).

Rf 0.60 (Heptane/AcOEt : 50/50 + Et<sub>3</sub>N).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.51-7.32 (m, 10H, 2Ph) ; 5.50 (s, 1H, PhCH) ; 5.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 4.99 (d, 1H,  $J_{2,NH} = 7.5$  Hz, NH) ; 4.83 (m, 1H, H-1) ; 4.27 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 4.9$  Hz,  $J_{6b,6a} = 10.4$  Hz, H-6b) ; 4.04 (m, 1H, H-3) ; 3.75 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 10.2$  Hz, H-6a) ; 3.54 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.2$  Hz,  $J_{3,4} = 9.1$  Hz, H-4) ; 3.46 (m, 1H, H-5) ; 3.34 (m, 1H, H-2) ; 3.18 (s, 1H, OH-3) ; 0.87 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

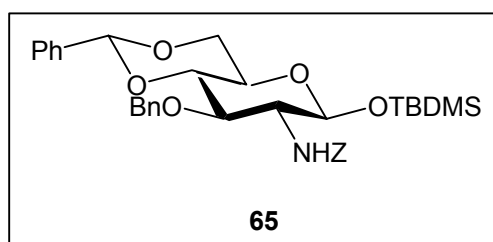
**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 156.5 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 137.2, 136.2 (C aromatiques) ; 129.3-126.5 (CH aromatiques) ; 100.7 (CHPh) ; 96.3 (C-1) ; 81.5 (C-

4) ; 70.9 (C-3) ; 68.7 (C-6) ; 67.1 (CH<sub>2</sub>O) ; 66.3 (C-5) ; 60.8 (C-2) ; 25.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 17.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.2 (CH<sub>3</sub>Si).

SM MALDI-Tof : (m/z) 538 [M+Na]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub>Si : C 62.89, H 7.23, N 2.73, trouvé : C 62.56, H 7.33, N 2.71.

**3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (65)**



Une solution du composé **64** (11.97 g, 23.23 mmol) dans du DMF anhydre (100 mL) est agitée pendant 24 h à température ambiante en présence d'oxyde de baryum (14.24 g, 92.89 mmol, 4 éq), d'hydroxyde de baryum octahydraté (3.66 g, 11.60 mmol, 0.5 éq) et de bromure de benzyle (3.59 mL, 30.19 mmol, 1.3 éq). L'excès de bromure est ensuite détruit par l'addition de méthanol à 0°C. Après 30 min d'agitation, le milieu est dilué avec du DCM puis la phase organique est successivement lavée avec une solution à 20% d'acide acétique et de la saumure avant d'être séchée et concentrée. Une chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 80/20 + triéthylamine) permet d'obtenir le composé **65** sous la forme d'une huile jaune (9.72 g, 69%).

[α]<sub>D</sub> = +2.1 (c = 1.02, CHCl<sub>3</sub>).

Rf 0.54 (Heptane/AcOEt : 75/25 + Et<sub>3</sub>N).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.53-7.28 (m, 15H, 3Ph) ; 5.55 (s, 1H, PhCH) ; 5.15-5.05 (m, 4H, H-1, CH<sub>2</sub>O, NH) ; 4.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.29 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> = 4.9 Hz, J<sub>6b,6a</sub> = 10.5 Hz, H-6b) ; 4.08 (m, 1H, H-3) ; 3.79 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 10.2 Hz, H-6a) ; 3.71 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 9.4 Hz, J<sub>3,4</sub> = 9.2 Hz, H-4) ; 3.47 (m, 1H, H-5) ; 3.22 (m, 1H, H-2) ; 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

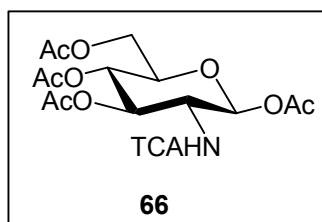
RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) : δ (ppm) 155.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 138.4, 136.5, 134.7 (C aromatiques) ; 129.0-126.1 (CH aromatiques) ; 101.3 (CHPh) ; 95.9 (C-1) ; 82.7 (C-

4) ; 76.5 (C-3) ; 74.4 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 68.9 (C-6) ; 66.7 (CH<sub>2</sub>O) ; 66.1 (C-5) ; 60.2 (C-2) ; 25.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 18.0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.2 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.2 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 628 [M+Na]<sup>+</sup> ; 606 [M+H]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>7</sub>Si : C 67.41, H 7.15, N 2.32, trouvé : C 67.19, H 7.36, N 2.26.

### 1,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranose (**66**)



Le précipité **66b** (14.97 g, 39.01 mmol) est suspendu dans le DCM (120 mL) et le milieu est refroidi à 0 °C avant l'ajout de triéthylamine (7.58 mL, 54.60 mmol, 1.4 éq). Après 20 min sous agitation à 0 °C le solide est totalement dissous et CCl<sub>3</sub>COCl (5.44 mL, 48.74 mmol, 1.25 éq) est additionné goutte à goutte. Le mélange est agité 15 min à 0 °C puis 1 h à température ambiante. Après ajout de méthanol, la phase organique est lavée par de l'eau, puis par une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>, avant d'être séchée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 60/40) pour donner le composé **66** sous la forme d'une poudre blanche (14.41 g, 75%).

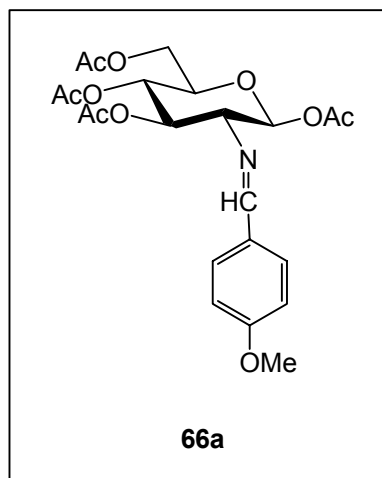
[α]<sub>D</sub> = +10.1 (c = 1.03, CHCl<sub>3</sub>) ; lit. +4.0 (CHCl<sub>3</sub>) [227], +7.0 (CHCl<sub>3</sub>) [268], +0.5 (CHCl<sub>3</sub>) [269].

R<sub>f</sub> 0.62 (AcOEt).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.16 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 9.4 Hz, NH) ; 5.82 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.7 Hz, H-1) ; 5.41 (t, 1H, H-3) ; 5.16 (t, 1H, H-4) ; 4.38-3.87 (m, 4H, H-2, H-6a, H-6b, H-5) ; 2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 171.5 (CO, Ac) ; 170.6 (CO, Ac) ; 169.3 (CO, Ac) ; 169.3 (CO, Ac) ; 162.3 (CONH) ; 92.2 (C-1) ; 91.0 (CCl<sub>3</sub>) ; 73.1 (C-3) ; 71.9 (C-5) ; 67.9 (C-4) ; 61.7 (C-6) ; 54.4 (C-2) ; 20.8 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.7 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.5 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.5 (CH<sub>3</sub>CO).

SM-HR (ES<sup>+</sup>) : (m/z) Calc. pour C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>10</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 514.0050 ; trouvé : 514.0062.

**1,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-2-désoxy-2-[*p*-méthoxybenzylidène(amino)]-β-D-glucopyranose (66a)**

Le chlorhydrate de D-glucosamine (12.21 g, 56.62 mmol) est dissous dans une solution de soude 1 M (250 mL) puis le *p*-anisaldéhyde (8.25 mL, 67.93 mmol, 1.2 éq) est additionné en trois fois. Le milieu est agité mécaniquement pendant 15 min à température ambiante puis 20 min à 0°C. Le précipité blanc obtenu est filtré et successivement lavé par de l'eau glacée, de l'éthanol froid et de l'éther froid. Le produit est ensuite dissous dans la pyridine (50 mL) et une pointe de spatule de DMAP est ajoutée. Le milieu est refroidi à 0°C puis de l'anhydride acétique (43 mL, 0.45 mol, 8 éq) est additionné goutte à goutte. Après 1 h 30 de réaction de 0°C à température ambiante, le milieu réactionnel est versé sur de la glace pilée (250 mL), ce qui entraîne l'apparition du composé **66a** sous la forme d'un précipité blanc. Ce dernier est filtré et purifié par une recristallisation dans l'éthanol (18.96 g, 72%).

$[\alpha]_D^{20} = +98.3$  ( $c = 0.995$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) ; lit.  $+98.6$  ( $\text{CHCl}_3$ ) [250].

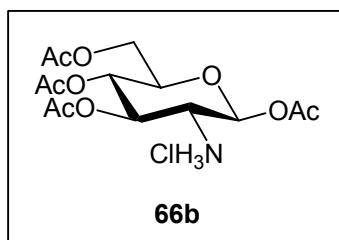
Rf 0.70 (AcOEt).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 8.12 (s, 1H, CH imine) ; 7.62 (d, 2H, 2CH aromatiques) ; 6.88 (d, 2H, 2CH aromatiques) ; 5.91 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.3$  Hz, H-1) ; 5.39 (t, 1H, H-3) ; 5.11 (t, 1H, H-4) ; 4.35 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 4.5$  Hz,  $J_{6a,6b} = 7.9$  Hz, H-6b) ; 4.10 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 1.9$  Hz, H-6a) ; 3.97-3.91 (m, 1H, H-5) ; 3.81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) ; 3.42 (t, 1H, H-2) ; 2.06 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 2.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 1.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 1.85 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 170.6 (CO, Ac) ; 169.9 (CO, Ac) ; 169.5 (CO, Ac) ; 168.7 (CO, Ac) ; 164.2, 162.3 (C aromatiques) ; 130.2 (CH aromatiques) ; 128.3 (CH imine) ; 114.0 (CH aromatiques) ; 93.2 (C-1) ; 73.2 (C-3) ; 72.9 (C-2) ; 72.8 (C-5) ; 68.0 (C-4) ; 61.8 (C-6) ; 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ) ; 20.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 20.7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 20.7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 20.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**SM-HR (ES<sup>+</sup>)** : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  466.1713 ; trouvé 466.1699.

**Chlorhydrate de 1,3,4,6-Tétra-O-acétyl-2-amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (66b)**



Le produit **66a** (18.96 g, 40.77 mmol) est suspendu dans de l'acétone (70 mL) dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant. Le milieu est agité mécaniquement et chauffé à reflux jusqu'à dissolution du précipité. Le chauffage est alors arrêté et une solution de HCl 5.5 M (8.1 mL, 44.55 mmol, 1.1 éq) est ajoutée. Le précipité obtenu est filtré après refroidissement et lavé avec de l'éther pour donner le composé **66b** sous la forme d'une poudre blanche (14.97 g, 96%).

$[\alpha]_D = +30.3$  (c = 1.0, MeOH) ; lit. +32.0 (MeOH) [252].

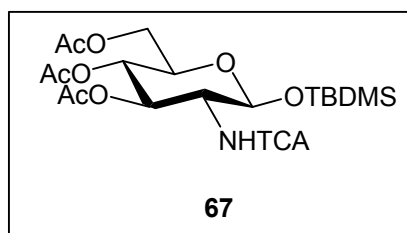
Rf 0.31 (Heptane/AcOEt : 50/50).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 5.89 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.8$  Hz, H-1) ; 5.38 (t, 1H, H-3) ; 5.09 (t, 1H, H-4) ; 4.30 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 4.5$  Hz,  $J_{6a,6b} = 8.1$  Hz, H-6b) ; 4.11 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 2.2$  Hz, H-6a) ; 4.06-4.00 (m, 1H, H-5) ; 3.64 (t, 1H, H-2) ; 2.20 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 2.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 176.1 (CO, Ac) ; 176.0 (CO, Ac) ; 175.8 (CO, Ac) ; 175.6 (CO, Ac) ; 92.8 (C-1) ; 74.8 (C-5) ; 73.6 (C-4) ; 70.1 (C-3) ; 63.9 (C-6) ; 54.5 (C-2) ; 22.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 22.7 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 22.6 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 22.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**SM-HR (ES<sup>+</sup>)** : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_9\text{Cl}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  406.0880 ; trouvé 406.0892.

**3,4,6-Tri-*O*-acétyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranose (67)**



De l'acétate d'hydrazine (5.38 g, 58.48 mmol, 2 éq) est ajouté à une solution du composé **66** (14.41 g, 29.25 mmol) dans du DMF anhydre (50 mL). La solution est agitée 1 h 30 à température ambiante puis diluée avec de l'eau et extraite avec AcOEt. La phase organique est lavée avec de l'eau et une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>, puis est séchée et concentrée sous pression réduite. Un mélange contenant l'hémiacétal obtenu, de l'imidazole (4.38 g, 64.32 mmol, 2.2 éq) et du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (4.85 g, 32.18 mmol, 1.1 éq) dans du DMF anhydre (50 mL) est agité pendant une nuit à température ambiante. L'excès de chlorure est détruit avec du méthanol puis le milieu est dilué avec de l'eau avant d'être extrait par AcOEt. La phase organique est lavée par de l'eau puis de la saumure, séchée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 80/20) pour donner le composé **67** sous la forme d'une poudre blanche (10.41 g, 63%).

$[\alpha]_D = -6.2$  ( $c = 1.025$ , CHCl<sub>3</sub>) ; lit.  $-4.2$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [254].

Rf 0.30 (Heptane/AcOEt : 65/35).

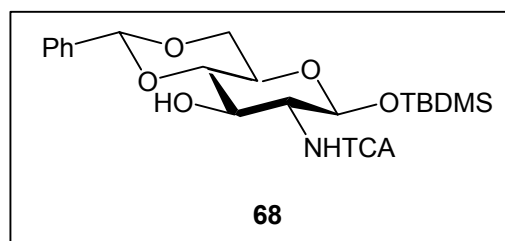
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 6.74 (d, 1H,  $J_{2,NH} = 9.4$  Hz, NH) ; 5.30 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 9.2$  Hz,  $J_{2,3} = 10.9$  Hz, H-3) ; 5.09 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 10.0$  Hz, H-4) ; 4.88 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.9$  Hz, H-1) ; 4.23 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 5.7$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12.2$  Hz, H-6b) ; 4.15 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 2.7$  Hz, H-6a) ; 3.95 (m, 1H, H-2) ; 3.74 (m, 1H, H-5) ; 2.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 171.3 (CO, Ac) ; 170.7 (CO, Ac) ; 169.4 (CO, Ac) ; 161.9 (CONH) ; 95.9 (C-1) ; 92.4 (CCL<sub>3</sub>) ; 72.1 (C-3) ; 71.8 (C-5) ; 68.9 (C-4) ; 62.5 (C-6) ; 57.9 (C-2) ; 25.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 20.8 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.8 (CH<sub>3</sub>CO) ; 20.7 (CH<sub>3</sub>CO) ; 17.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.1 (CH<sub>3</sub>Si).

**SM MALDI-Tof** : (m/z) 604 [M+K]<sup>+</sup> ; 588 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $C_{20}H_{32}Cl_3NO_9Si$  : C 42.52, H 5.71, N 2.49, trouvé : C 42.89, H 5.76, N 2.42.

**4,6-*O*-Benzylidène-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranose (68)**



Une suspension du composé **67** (10.84 g, 19.20 mmol) dans le méthanol (200 mL) est traitée pendant 2 h à température ambiante avec NaOMe (Na : 0.13 g, 5.65 mmol, 0.3 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 ( $H^+$ ), filtrée et concentrée, pour donner le triol correspondant. De l'acide camphosulfonique (0.18 g, 0.77 mmol, 0.04 éq) est ajouté à une solution contenant le triol et du 2,2-diméthoxybenzaldéhyde (4.32 mL, 28.78 mmol, 1.5 éq) dans de l'acétonitrile (100 mL). La solution est agitée pendant 1 h à température ambiante. De la triéthylamine est ajoutée pour neutraliser le milieu et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 75/25 + triéthylamine) pour donner le composé **68** sous la forme d'une poudre blanche (8.86 g, 88%).

$[\alpha]_D = -33.8$  ( $c = 0.985$ ,  $CHCl_3$ ).

Rf 0.27 (Heptane/AcOEt : 70/30).

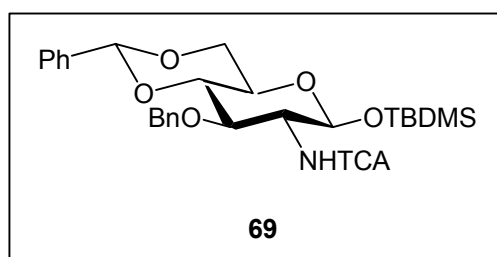
**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.65-7.36 (m, 5H, Ph) ; 6.94 (d, 1H,  $J_{2,NH} = 7.4$  Hz, NH) ; 5.53 (s, 1H, PhCH) ; 5.09 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.7$  Hz, H-1) ; 4.32 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 4.6$  Hz,  $J_{6b,6a} = 10.5$  Hz, H-6b) ; 4.26 (m, 1H,  $J_{3,4} = 8.6$  Hz,  $J_{2,3} = 10.1$  Hz, H-3) ; 3.77 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 9.6$  Hz, H-6a) ; 3.53-3.48 (m, 3H, H-4, H-5, H-2) ; 3.01 (s, 1H, OH-3) ; 0.89 (s, 9H,  $(CH_3)_3CSi$ ) ; 0.13 (s, 3H,  $CH_3Si$ ) ; 0.10 (s, 3H,  $CH_3Si$ ).

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 162.2 ( $COCCl_3$ ) ; 137.0 (C aromatique) ; 129.4-126.4 (CH aromatiques) ; 102.0 (CHPh) ; 95.3 (C-1) ; 92.5 ( $CCl_3$ ) ; 81.7 (C-4) ; 69.7 (C-3) ; 68.6 (C-6) ; 66.3 (C-5) ; 61.6 (C-2) ; 25.7 ( $(CH_3)_3CSi$ ) ; 17.9 ( $(CH_3)_3CSi$ ) ; -4.0 ( $CH_3Si$ ) ; -5.0 ( $CH_3Si$ ).

SM MALDI-Tof : (m/z) 548 [M+Na]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>6</sub>Si : C 47.87, H 5.74, N 2.67, trouvé : C 47.51, H 5.53, N 2.47.

**3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidène-1-O-tert-butyl-diméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranose (69)**



De l'hydrure de sodium (60% dans de l'huile minérale, 1.54 g, 38.50 mmol, 2 éq) est additionné par fractions à 0°C à une solution du composé **68** (10.13 g, 19.23 mmol) dans du DMF anhydre (80 mL). Le mélange est agité pendant 30 min à 0°C puis du bromure de benzyle (3.43 mL, 28.84 mmol, 1.5 éq) est ajouté et le mélange est agité 24 h à température ambiante. Du méthanol est additionné pour détruire l'excès de bromure puis le mélange est dilué avec de l'eau et extrait par AcOEt. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 80/20 + triéthylamine) pour donner le composé **69** sous la forme d'une poudre blanche (8.66 g, 73%).

[α]<sub>D</sub> = -16.2 (c = 1.07, CHCl<sub>3</sub>).

R<sub>f</sub> 0.73 (Heptane/AcOEt : 70/30 + Et<sub>3</sub>N).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.53-7.27 (m, 10H, 2Ph) ; 6.86 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.9 Hz, NH) ; 5.59 (s, 1H, PhCH) ; 5.18 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.9 Hz, H-1) ; 4.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.32 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> = 4.9 Hz, J<sub>6b,6a</sub> = 10.6 Hz, H-6b) ; 4.23 (m, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.9 Hz, J<sub>2,3</sub> = 10.3 Hz, H-3) ; 3.90 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 10.2 Hz, H-6a) ; 3.81 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 9.6 Hz, H-4) ; 3.58-3.45 (m, 2H, H-5, H-2) ; 0.91 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

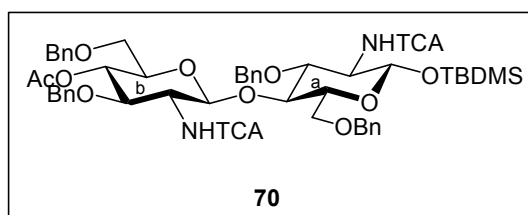
RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 161.8 (COCCl<sub>3</sub>) ; 137.9, 137.3 (C aromatiques) ; 129.1-126.1 (CH aromatiques) ; 101.3 (CHPh) ; 95.1 (C-1) ; 92.5 (CCl<sub>3</sub>) ; 82.8 (C-4) ;

75.7 (C-3) ; 74.7 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 68.7 (C-6) ; 66.2 (C-5) ; 60.9 (C-2) ; 25.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 17.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.0 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.0 (CH<sub>3</sub>Si).

SM MALDI-Tof : (m/z) 638 [M+Na]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>6</sub>Si : C 54.45, H 5.88, N 2.28, trouvé : C 54.46, H 5.97, N 2.38.

**4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranose (70)**



Un mélange composé de l'accepteur **60** (233 mg, 0.38 mmol), du donneur **58** (390 mg, 0.56 mmol, 1.5 éq) et de tamis moléculaire 3 Å dans du DCM anhydre (5 mL) est agité pendant 1 h à température ambiante sous argon. Du TMSOTf (9 μL, 0.05 mmol, 0.12 éq) est additionné et le mélange est agité pendant 2 h. Le milieu est neutralisé par ajout de triéthylamine puis filtré sur Célite® avant d'être concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Toluène/AcOEt : 90/10 + triéthylamine) pour donner le disaccharide **70** sous la forme d'un solide blanc (389 mg, 90%).

Rf 0.70 (Toluène/AcOEt : 75/25 + Et<sub>3</sub>N).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : δ (ppm) 7.39-7.21 (m, 20H, 4Ph) ; 6.87 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.9 Hz, NHa) ; 6.77 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.7 Hz, NHb) ; 5.05 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 9.3 Hz, J<sub>4,5</sub> = 9.3 Hz, H-4b) ; 5.04 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.5 Hz, H-1a) ; 4.96 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.3 Hz, H-1b) ; 4.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.14 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.7 Hz, J<sub>2,3</sub> = 8.7 Hz, H-3a) ; 4.05 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.9 Hz, J<sub>2,3</sub> = 10.4 Hz, H-3b) ; 4.01 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub> = 9.8 Hz, J<sub>4,5</sub> = 8.3 Hz, H-4a) ; 3.67 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 3.57 (m, 1H, H-2b) ; 3.52-3.42 (m, 5H, H-2a, H-5a, H-5b, H-6b, H-6a) ; 1.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 0.87 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

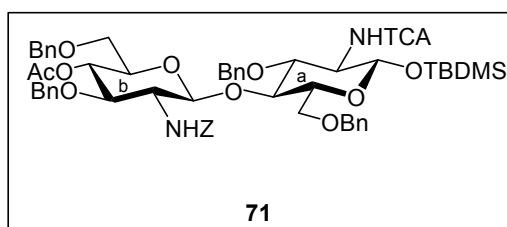
**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 170.1 (CO, Ac) ; 162.2, 162.0 (2COCCL<sub>3</sub>) ; 138.7, 138.4, 138.4, 137.8 (C aromatiques) ; 128.9-128.0 (CH aromatiques) ; 98.5

(C-1b) ; 94.9 (C-1a) ; 92.9, 92.8 (2CCl<sub>3</sub>) ; 77.9 (C-3b) ; 77.9 (C-4a) ; 76.0 (C-3a) ; 74.9 (C-5a) ; 74.7, 74.5, 74.0 (3CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.8 (C-5b) ; 73.7 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 72.3 (C-4b) ; 70.0 (C-6b) ; 68.7 (C-6a) ; 60.2 (C-2a) ; 59.2 (C-2b) ; 26.0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 21.2 (CH<sub>3</sub>CO) ; 18.2 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -3.7 (CH<sub>3</sub>Si) ; -4.6 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 1170 [M+Na]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>52</sub>H<sub>62</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Si : C 54.45, H 5.45, N 2.45, trouvé : C 54.62, H 5.38, N 2.41.

**4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranose (71)**



Un mélange composé de l'accepteur **60** (560 mg, 0.90 mmol) et du donneur **59** (922 mg, 1.36 mmol, 1.5 éq) dans du DCM anhydre (20 mL) est agité pendant 1 h à température ambiante sous argon. BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (17 μL, 0.13 mmol, 0.15 éq) est additionné et le mélange est agité pendant 3 h. Le milieu est neutralisé avec de la triéthylamine puis concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Toluène/AcOEt : 90/10 + triéthylamine) pour donner le disaccharide **71** sous la forme d'un solide blanc (720 mg, 70%).

Rf 0.63 (Toluène/AcOEt : 75/25 + Et<sub>3</sub>N).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.45-7.22 (m, 25H, 5Ph) ; 6.91 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.4 Hz, NHa) ; 5.09-4.97 (m, 5H, CH<sub>2</sub>O, H-1a, NHb, H-1b) ; 4.85 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 9.2 Hz, H-4b) ; 4.70-4.41 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.07-3.90 (m, 2H, H-3b, H-3a) ; 3.70-3.25 (m, 9H, H-4a, H-2b, H-2a, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-6a, H-6b) ; 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

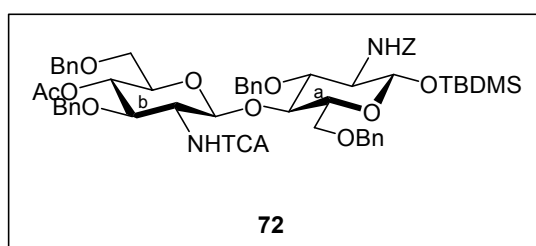
RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) : δ (ppm) 170.2 (CO, Ac) ; 169.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 162.1 (COCCl<sub>3</sub>) ; 138.9, 138.8, 138.4, 138.4, 138.3 (C aromatiques) ; 129.0-127.8 (CH aromatiques) ; 100.0 (C-1b) ; 95.1 (C-1a) ; 93.0 (CCl<sub>3</sub>) ; 79.1 (C-3b) ; 78.2 (C-4a) ;

76.5 (C-3a) ; 75.5 (C-5b) ; 74.9, 74.7, 74.2, 73.9 (4CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.5 (C-5a) ; 72.2 (C-4b) ; 70.2 (C-6b) ; 68.4 (C-6a) ; 67.2 (CH<sub>2</sub>O) ; 60.1 (C-2a) ; 58.3 (C-2b) ; 26.1 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 21.3 (CH<sub>3</sub>CO) ; 18.3 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -3.7 (CH<sub>3</sub>Si) ; -4.6 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 1159 [M+Na]<sup>+</sup> ; 1137 [M+H]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>58</sub>H<sub>69</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>Si : C 61.29, H 6.12, N 2.46, trouvé : C 61.13, H 6.45, N 2.40.

**4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (72)**



Un mélange composé de l'accepteur **61** (705 mg, 1.16 mmol) et du donneur **58** (1.2 g, 1.74 mmol, 1.5 éq) dans du DCM anhydre (30 mL) est agité pendant 1 h à température ambiante sous argon. BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (22 μL, 0.17 mmol, 0.15 éq) est additionné et le mélange est agité 3 h avant d'être neutralisé par de la triéthylamine et concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Toluène/AcOEt : 90/10 + triéthylamine) pour donner le disaccharide **72** sous la forme d'un solide blanc (958 mg, 73%).

Rf 0.54 (Toluène/AcOEt : 80/20 + Et<sub>3</sub>N).

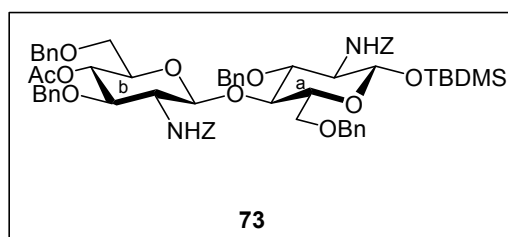
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.33-7.11 (m, 25H, 5Ph) ; 6.80 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.7 Hz, NHb) ; 5.05 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 9.7 Hz, J<sub>4,5</sub> = 9.7 Hz, H-4b) ; 4.95 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 4.87 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.3 Hz, H-1b) ; 4.76 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 8.3 Hz, NHa) ; 4.72 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.4 Hz, H-1a) ; 4.65-4.43 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.03 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.9 Hz, J<sub>2,3</sub> = 8.9 Hz, H-3a) ; 3.95 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> = 10.4 Hz, H-3b) ; 3.63-3.50 (m, 4H, H-4a, H-5b, H-6a, H-6b) ; 3.45-3.26 (m, 5H, H-2b, H-2a, H-5a, H-6a, H-6b) ; 1.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 0.78 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.8 (CO, Ac) ; 168.7 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 162.0, ( $\text{COCCl}_3$ ) ; 138.8, 138.1, 138.0, 137.8, 137.5 (C aromatiques) ; 128.5-127.4 (CH aromatiques) ; 100.0 (C-1a) ; 98.1 (C-1b) ; 92.5 ( $\text{CCl}_3$ ) ; 77.7 (C-4a) ; 76.1 (C-3b) ; 74.4 (C-3a) ; 73.9, 73.6 ( $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 73.4 (C-5a) ; 73.3, 72.3 ( $2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 71.8 (C-5b) ; 71.2 (C-4b) ; 69.6 (C-6a) ; 68.4 (C-6b) ; 66.6 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 58.7 (C-2a) ; 49.5 (C-2b) ; 25.6 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 20.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 17.9 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; -4.1 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; -5.2 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**ES+MS** : (m/z) 1159  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ; 1137  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $\text{C}_{58}\text{H}_{69}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{13}\text{Si}$  : C 61.29, H 6.12, N 2.46, trouvé : C 61.35, H 6.39, N 2.41.

**4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-tert-butylidiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (73)**



Un mélange composé de l'accepteur **61** (1.13 g, 1.86 mmol) et du donneur **59** (1.9 g, 2.79 mmol, 1.5 éq) dans du DCM anhydre (40 mL) est agité pendant 1 h à température ambiante sous argon.  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (36  $\mu\text{L}$ , 0.28 mmol, 0.15 éq) est additionné et le mélange est agité 1 h 30 avant d'être neutralisé par de la triéthylamine et concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Toluène/AcOEt : 90/10 + triéthylamine) pour donner le disaccharide **73** sous la forme d'un solide blanc (1.46 g, 70%).

Rf 0.50 (Toluène/AcOEt : 90/10 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

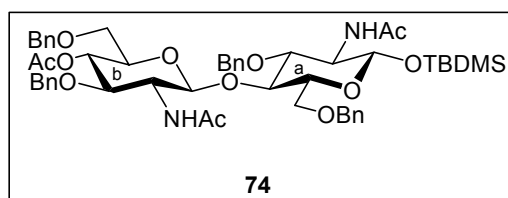
**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.38-7.15 (m, 30H, 6Ph) ; 5.09-5.02 (m, 4H,  $2\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 5.00 (t, 1H,  $J_{3,4} = 9.3$  Hz,  $J_{4,5} = 9.3$  Hz, H-4b) ; 4.85-4.40 (m, 10H, H-1b, NHa, NHb, H-1a,  $3\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.32 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 3.95 (t, 1H,  $J_{3,4} = 8.8$  Hz,  $J_{2,3} = 8.8$  Hz, H-3a) ; 3.74-3.63 (m, 2H, H-4a, H-3b) ; 3.52-3.25 (m, 8H, H-2b, H-2a, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-6a, H-6b) ; 1.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 0.87 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 0.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.7 (CO, Ac) ; 157.4, 155.7 ( $2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 138.9, 138.2, 138.1, 138.0, 137.5, 136.6 (C aromatiques) ; 128.7-127.3 (CH aromatiques) ; 99.8 (C-1b) ; 95.6 (C-1a) ; 78.7 (C-4a) ; 78.6 (C-3a) ; 76.5 (C-3b) ; 74.4 (C-5a) ; 73.8, 73.6, 73.5, 73.2 ( $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 73.1 (C-5b) ; 71.7 (C-4b) ; 69.8 (C-6a) ; 68.1 (C-6b) ; 66.7, 66.5 ( $2\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 59.1 (C-2a) ; 57.8 (C-2b) ; 25.6 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 20.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 17.9 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; -4.2 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; -5.2 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**ES+MS** : (m/z) 1147  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $\text{C}_{64}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{Si}$  : C 68.30, H 6.81, N 2.50, trouvé : C 68.37, H 7.01, N 2.44.

**2-Acétamido-4-O-acétyl-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-3,6-di-O-benzyl-1-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (74)**



Un mélange composé du produit **70** (690 mg, 0.60 mmol), de  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  (1.9 mL, 7.17 mmol, 12 éq) et d'AIBN (30 mg) dans du toluène anhydre (20 mL) est agité 1 h à température ambiante sous argon, puis chauffé pendant 2 h à  $80^\circ\text{C}$ , refroidi et concentré. Le résidu est agité dans l'heptane (40 mL) et les cristaux obtenus sont filtrés. Le produit est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine) pour donner le composé **74** sous la forme d'un solide blanc (464 mg, 82%).

**Rf** 0.33 (Heptane/AcOEt : 35/65 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.35-7.19 (m, 20H, 4Ph) ; 5.98 (s, 1H, NHa) ; 5.21 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}} = 7.9$  Hz, NHb) ; 5.07 (t, 1H,  $J_{3,4} = 9.1$  Hz,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz, H-4b) ; 4.92 (d, 1H,  $J_{1,2} = 6.3$  Hz, H-1a) ; 4.74 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.3$  Hz, H-1b) ; 4.70 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.61 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.41 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.04 (t, 1H,  $J_{3,4} = 6.8$  Hz,  $J_{2,3} = 6.8$  Hz, H-3a) ; 3.95-3.90 (m, 2H, H-3b, H-4a) ; 3.78 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 4.7$  Hz,  $J_{6a,6b} = 10.4$  Hz, H-6b) ; 3.70-3.65 (m, 2H, H-6b, H-2a) ; 3.64-3.56 (m, 2H, H-2b, H-5b) ; 3.53-3.49 (m, 2H, H-6a, H-5a) ; 3.44 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 6.3$  Hz,  $J_{6a,6b}$

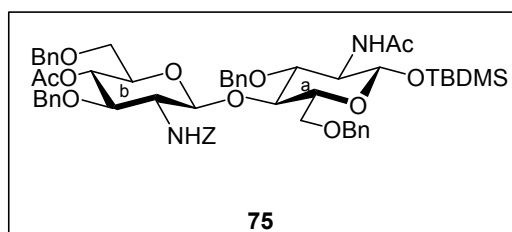
= 11.7 Hz, H-6a) ; 1.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CONH) ; 1.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CONH) ; 1.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 0.83 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 170.6 (CO, Ac) ; 170.2, 169.9 (2CONH) ; 138.9, 138.3, 138.0, 137.9 (C aromatiques) ; 128.6-127.4 (CH aromatiques) ; 99.5 (C-1b) ; 95.1 (C-1a) ; 78.3 (C-4a) ; 77.8 (C-3b) ; 77.3 (C-3a) ; 74.9 (C-5b) ; 74.5 (C-5a) ; 73.6, 73.4, 73.1, 72.8 (4CH<sub>2</sub>Ph) ; 71.7 (C-4b) ; 69.7 (C-6b) ; 69.4 (C-6a) ; 56.5 (C-2b) ; 55.7 (C-2a) ; 25.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 23.6, 23.4 (2CH<sub>3</sub>CONH) ; 21.0 (CH<sub>3</sub>CO) ; 18.0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.2 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.1 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 963 [M+Na]<sup>+</sup> ; 941 [M+H]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>52</sub>H<sub>68</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Si : C 66.36, H 7.28, N 2.98, trouvé : C 66.52, H 7.06, N 2.90.

#### 4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (75)



Un mélange constitué du composé **71** (837 mg, 0.74 mmol), de Bu<sub>3</sub>SnH (1.2 mL, 4.53 mmol, 6 éq) et d'AIBN (30 mg) dans du toluène anhydre (20 mL) est agité 1 h à température ambiante sous argon puis chauffé pendant 2 h à 80 °C, refroidi et concentré. Le résidu est agité dans l'heptane (40 mL) et les cristaux obtenus sont filtrés. Le produit est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine) pour donner le composé **75** sous la forme d'une poudre blanche (571 mg, 75%).

Rf 0.44 (Heptane/AcOEt : 50/50 + Et<sub>3</sub>N).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : δ (ppm) 7.38-7.16 (m, 25H, 5Ph) ; 5.74 (m, 1H, NHa) ; 5.07 (m, 3H, CH<sub>2</sub>O, NHb) ; 5.03 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz, J<sub>4,5</sub> = 9.1 Hz, H-4b) ; 4.93 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 6.6 Hz, H-1a) ; 4.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.59 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.8 Hz, H-1b) ; 4.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.47-4.30 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.99 (m, 1H, H-4a) ; 3.91 (t, 1H, J<sub>2,3</sub> = 7.8 Hz, J<sub>3,4</sub> = 7.8 Hz, H-3a) ; 3.70 (m, 1H, H-3b) ; 3.56 (m, 2H, H-6b, H-6a) ;

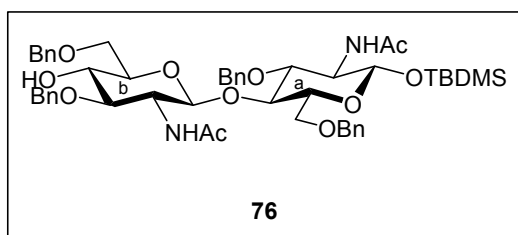
3.53-3.37 (m, 6H, H-5b, H-6b, H-6a, H-5a, H-2b, H-2a) ; 1.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CONH) ; 1.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 170.1 (CO, Ac) ; 169.8 (CONH) ; 156.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 139.1, 138.3, 138.0, 137.9, 136.5 (C aromatiques) ; 128.5-127.4 (CH aromatiques) ; 100.0 (C-1b) ; 95.0 (C-1a) ; 78.6 (C-3b) ; 77.9 (C-3a) ; 76.1 (C-4a) ; 74.3 (C-5a) ; 73.7, 73.7, 73.7, 73.3 (4CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.2 (C-5b) ; 71.5 (C-4b) ; 69.8 (C-6a) ; 68.8 (C-6b) ; 66.9 (CH<sub>2</sub>O) ; 57.2 (C-2a) ; 55.9 (C-2b) ; 25.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 23.5 (CH<sub>3</sub>CONH) ; 21.0 (CH<sub>3</sub>CO) ; 18.0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.1 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 1055 [M+Na]<sup>+</sup> ; 1033 [M+H]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>58</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>Si : C 67.42, H 7.02, N 2.71, trouvé : C 67.94, H 7.36, N 2.68.

### 2-Acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (**76**)



Un mélange composé du produit **74** (738 mg, 0.78 mmol) dans le méthanol (20 mL) est traité pendant 4 h de 0°C à température ambiante avec NaOMe (Na : 1.81 mg, 0.08 mmol, 0.1 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine) pour donner le composé **76** sous la forme d'une poudre blanche (585 mg, 83%).

Rf 0.31 (Heptane/AcOEt : 65/35 + Et<sub>3</sub>N).

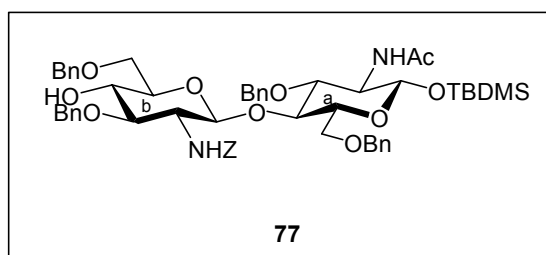
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.40-7.19 (m, 20H, 4Ph) ; 5.95 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 8.7 Hz, NHa) ; 4.84 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 8.7 Hz, NHb) ; 4.79 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 5.7 Hz, H-1a) ; 4.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.56 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.8 Hz, H-1b) ; 4.45-4.35 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.88 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 6.0 Hz, J<sub>2,3</sub> = 6.0 Hz, H-3a) ; 3.73 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 6.2 Hz, J<sub>2,3</sub> = 6.2 Hz, H-3b) ; 3.72-3.54 (m, 7H, H-4a, H-4b, H-6a, H-6b, H-2a, H-2b, H-5a) ; 3.50 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 5.9 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 9.7 Hz, H-6a) ; 3.38 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub>

= 8.5 Hz,  $J_{6a,6b} = 10.6$  Hz, H-6b) ; 3.26 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 4.7$  Hz,  $J_{4,5} = 9.4$  Hz, H-5b) ; 3.02 (s, 1H, OH-4) ; 1.91 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CONH}$ ) ; 1.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CONH}$ ) ; 0.86 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 0.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 170.1, 170.1 (2CONH) ; 139.0, 138.9, 138.2, 137.5 (C aromatiques) ; 128.7-127.3 (CH aromatiques) ; 100.0 (C-1b) ; 95.0 (C-1a) ; 80.9 (C-5a) ; 77.8 (C-4a) ; 77.3 (C-3b) ; 75.2 (C-3a) ; 74.6 (C-4b) ; 73.6, 73.4, 73.1, 72.8 ( $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 72.6 (C-5b) ; 69.4 (C-6b) ; 68.7 (C-6a) ; 59.1 (C-2a) ; 56.9 (C-2b) ; 25.7 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 23.6, 23.3 (2 $\text{CH}_3\text{CONH}$ ) ; 18.0 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; -4.2 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; -5.1 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

SM-HR (ES<sup>+</sup>) : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{50}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Si}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> 921.4334 ; trouvé 921.4329.

**3,6-di-*O*-Benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (77)**



Une suspension du produit **75** (507 mg, 0.49 mmol) dans le méthanol (20 mL) est traitée pendant 4 h de 0°C à température ambiante avec NaOMe (Na : 1.13 mg, 0.05 mmol, 0.1 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine) pour donner le composé **77** sous la forme d'une poudre blanche (460 mg, 95%).

Rf 0.48 (Heptane/AcOEt : 50/50 + Et<sub>3</sub>N).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.46-7.19 (m, 25H, 5Ph) ; 5.71 (m, 1H, NHa) ; 5.07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 4.90 (d, 1H,  $J_{1,2} = 6.4$  Hz, H-1a) ; 4.70 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.63-4.35 (m, 8H, H-1b, NHb, 3 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 3.92 (t, 1H,  $J_{2,3} = 6.8$  Hz, H-3a) ; 3.84 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 7.4$  Hz, H-4a) ; 3.68 (t, 1H,  $J_{2,3} = 9.1$  Hz,  $J_{3,4} = 9.1$  Hz, H-3b) ; 3.65-3.40 (m, 8H, H-2a, H-6a, H-6b, H-6a, H-4b, H-2b, H-6b, H-5a) ; 3.27 (m, 1H,  $J_{4,5} = 9.7$  Hz,

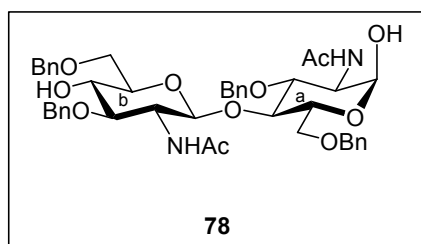
$J_{5,6b} = 5.1$  Hz,  $J_{5,6a} = 5.1$  Hz, H-5b) ; 2.99 (s, 1H, OH-4) ; 1.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CONH) ; 0.87 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 170.1 (CONH) ; 156.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 139.0, 138.9, 138.1, 137.6, 136.6 (C aromatiques) ; 128.5-127.3 (CH aromatiques) ; 100.4 (C-1b) ; 95.0 (C-1a) ; 80.9 (C-5a) ; 77.8 (C-4a) ; 75.2 (C-3a) ; 74.2 (C-3b) ; 73.7, 73.7 (2CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.6 (C-4b) ; 73.3 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.1 (C-5b) ; 70.9 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 69.4 (C-6b) ; 69.0 (C-6a) ; 66.8 (CH<sub>2</sub>O) ; 56.9 (C-2b) ; 55.6 (C-2a) ; 25.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 23.3 (CH<sub>3</sub>CONH) ; 17.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.2 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.1 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 1013 [M+Na]<sup>+</sup> ; 991 [M+H]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>56</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Si : C 67.85, H 7.12, N 2.83, trouvé : C 67.62, H 7.48, N 2.70.

### 2-Acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose (**78**)



Un mélange constitué du composé **76** (556 mg, 0.62 mmol), d'acide acétique (85  $\mu$ L, 1.48 mmol, 2.4 éq) et de Bu<sub>4</sub>NF.3H<sub>2</sub>O (468 mg, 1.48 mmol, 2.4 éq) dans du THF anhydre (20 mL) est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est concentré puis dilué dans AcOEt. La phase organique est lavée successivement avec de l'eau et une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub> avant d'être séchée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (DCM/MeOH : 90/10 + triéthylamine) pour donner le composé **78** sous la forme d'une poudre blanche (434 mg, 89%).

Rf 0.59 (DCM/MeOH : 90/10 + Et<sub>3</sub>N).

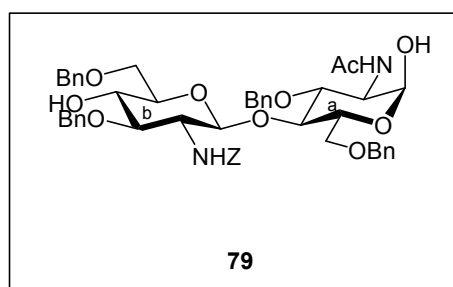
RMN <sup>1</sup>H (MeOD, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.41-7.18 (m, 20H, 4Ph) ; 5.09 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1a) ; 5.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.72 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.5$  Hz, H-1b) ; 4.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.13 (d, 1H,  $J_{2,3} = 10.4$  Hz, H-2a) ; 4.05 (m, 2H, H-3b, H-4a) ; 3.85-3.70 (m, 5H, H-2b, H-3a, H-6a, H-6b, H-6a) ;

3.55 (m, 2H, H-4b, H-5b) ; 3.45 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 6.1$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.7$  Hz, H-6b) ; 3.35 (m, 1H, H-5a) ; 1.92 (s, 3H,  $CH_3CONH$ ) ; 1.91 (s, 3H,  $CH_3CONH$ ).

RMN  $^{13}C$  (MeOD, 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 174.1, 174.0 (2CONH) ; 142.8, 141.0, 140.6, 140.5 (C aromatiques) ; 130.2-128.8 (CH aromatiques) ; 102.3 (C-1b) ; 93.2 (C-1a) ; 84.6 (C-4a) ; 80.0 (C-3a) ; 79.6 (C-5a) ; 78.0 (C-3b) ; 76.5, 75.8, 75.3, 75.0 (4 $CH_2Ph$ ) ; 73.2 (C-5b) ; 72.5 (C-4b) ; 71.4 (C-6b) ; 70.7 (C-6a) ; 58.1 (C-2a) ; 55.4 (C-2b) ; 24.0, 23.5 (2 $CH_3CONH$ ).

SM-HR (ES+) : (m/z) Calc. pour  $C_{44}H_{52}N_2O_{11}$  [ $M+Na$ ] $^+$  807.3469 ; trouvé 807.3477.

### 3,6-Di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- $\alpha$ -D-glucopyranose (**79**)



Un mélange constitué du composé **77** (469 mg, 0.47 mmol), d'acide acétique (68  $\mu$ L, 1.19 mmol, 2.5 éq) et de  $Bu_4NF \cdot 3H_2O$  (383 mg, 1.21 mmol, 2.5 éq) dans du THF anhydre (20 mL) est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est concentré puis dilué dans AcOEt. La phase organique est lavée successivement avec de l'eau et une solution saturée en  $NaHCO_3$  avant d'être séchée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (DCM/MeOH : 90/10 + triéthylamine) pour donner le composé **79** sous la forme d'une poudre blanche (370 mg, 89%).

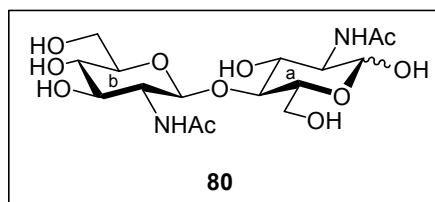
Rf 0.17 (Heptane/AcOEt : 25/75 +  $Et_3N$ ).

RMN  $^1H$  (MeOD, 500 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.45-7.22 (m, 25H, 5Ph) ; 5.11 (m, 2H,  $CH_2O$ ) ; 5.10 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz, H-1a) ; 4.80 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.70-4.65 (m, 4H, 2 $CH_2Ph$ ) ; 4.61 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1b) ; 4.37 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.12 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.4$  Hz, H-2a) ; 4.04 (t, 1H,  $J_{4,5} = 8.8$  Hz, H-4a) ; 4.00 (m, 1H, H-3b) ; 3.81 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 8.5$  Hz, H-3a) ; 3.76 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 1.7$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.2$  Hz, H-6a) ; 3.72 (m, 1H, H-6b) ; 3.60-3.47 (m, 4H, H-4b, H-2b, H-6b, H-5b) ; 3.43 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 6.1$  Hz, H-6a) ; 3.32 (m, 1H, H-5a) ; 1.97 (s, 3H,  $CH_3CONH$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOD, 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 173.9 (CONH) ; 159.3 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 141.8, 140.9, 140.6, 140.4, 139.2 (C aromatiques) ; 130.3-128.8 (CH aromatiques) ; 102.8 (C-1b) ; 93.2 (C-1a) ; 84.6 (C-4a) ; 80.4 (C-3a) ; 78.4 (C-3b) ; 78.0 (C-5a) ; 76.7, 75.9, 75.3, 74.9 ( $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 73.2 (C-5b) ; 72.2 (C-4b) ; 71.5 (C-6b) ; 70.6 (C-6a) ; 68.2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 59.7 (C-2b) ; 55.3 (C-2a) ; 23.5 ( $\text{CH}_3\text{CONH}$ ).

SM-HR (ES+) : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{50}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{12}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  899.3731 ; trouvé 899.3737.

### 2-Acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acétamido-2-désoxy- $\alpha$ , $\beta$ -D-glucopyranose (**80**)



Une solution du composé **78** (193 mg, 0.25 mmol) dans un mélange AcOEt/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (5/10/4, 10 mL) est hydrogénée en présence de 10% de Pd-C (100 mg) pendant 6 jours à température ambiante. Le mélange est filtré sur Célite<sup>®</sup> puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 70/30 + triéthylamine) pour donner le composé **80** sous la forme d'une poudre blanche (78 mg, 75%).

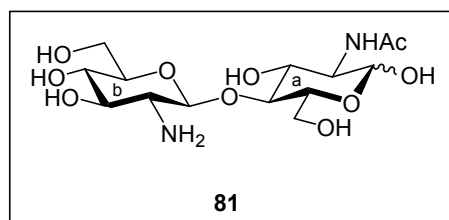
Rf 0.25 (AcOEt/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  : 4/2/1 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) :  $\delta$  (ppm) 5.19 (d, 1H,  $J_{1,2} = 2.7$  Hz, H-1a $\alpha$ ) ; 4.79 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1a $\beta$ ) ; 4.70 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, H-1b) ; 3.93-3.87 (m, 3H, H-3a, H-5a, H-2a) ; 3.78-3.72 (m, 4H, H-6b, H-6b, H-6a, H-2b) ; 3.69-3.60 (m, 2H, H-4a, H-6a) ; 3.57 (m, 1H, H-3b) ; 3.50-3.46 (m, 2H, H-5b, H-4b) ; 2.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CONH}$ ) ; 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CONH}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 174.9, 174.8 (2CONH) ; 101.8 (C-1b) ; 95.1 (C-1a $\beta$ ) ; 90.7 (C-1a $\alpha$ ) ; 80.2 (C-4a) ; 79.7 (C-3a) ; 76.2 (C-5b) ; 74.9 (C-5a) ; 73.8 (C-3b) ; 70.0 (C-4b) ; 60.8 (C-6b) ; 60.4 (C-6a) ; 55.9 (C-2b) ; 53.9 (C-2a) ; 22.5, 22.4 (2 $\text{CH}_3\text{CONH}$ ).

SM-HR (ES+) : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  447.1591 ; trouvé 447.1576.

**2-Amino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-acétamido-2-désoxy-α,β-D-glucopyranose (81)**



Une solution du composé **79** (226 mg, 0.26 mmol) dans un mélange AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (5/10/4, 10 mL) est hydrogénée en présence de 10% de Pd-C (100 mg) pendant 48 h à température ambiante. Le mélange est filtré sur Célite<sup>®</sup> puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 70/30 + triéthylamine) pour donner le composé **81** sous la forme d'une poudre blanche (74 mg, 75%).

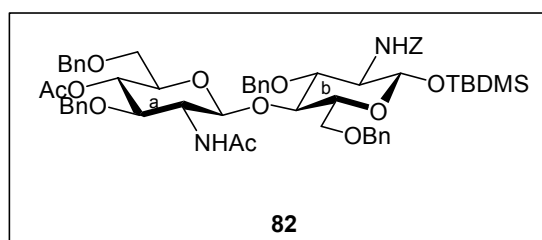
Rf 0.34 (AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O : 4/2/1 + Et<sub>3</sub>N).

RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) : δ (ppm) 5.15 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 2.2 Hz, H-1aα) ; 4.64 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.9 Hz, H-1aβ) ; 4.43 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.9 Hz, H-1b) ; 3.90 (m, 1H, H-3a) ; 3.87-3.58 (m, 8H, H-2a, H-4a, H-5ab, H-6ab) ; 3.46-3.28 (m, 2H, H-4b, H-3b) ; 2.62 (m, 1H, H-2b) ; 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CONH).

RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 125 MHz) : δ (ppm) 175.1 (CONH) ; 102.8 (C-1b) ; 95.1 (C-1aβ) ; 90.8 (C-1aα) ; 78.9 (C-5a) ; 75.7 (C-3b) ; 72.7 (C-5a) ; 70.4 (C-3a) ; 69.9 (C-4b) ; 69.4 (C-4a) ; 60.9 (C-6b) ; 60.5 (C-6a) ; 57.0 (C-2b) ; 54.2 (C-2a) ; 22.5 (CH<sub>3</sub>CONH).

SM-HR (ES<sup>+</sup>) : (m/z) Calc. pour C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup> 383.1666 ; trouvé 383.1647.

**2-Acétamido-4-O-acétyl-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-O-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-O-tert-butyl-diméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (82)**



Un mélange constitué du composé **72** (792 mg, 0.70 mmol), de Bu<sub>3</sub>SnH (1.1 mL, 4.15 mmol, 6 éq) et d'AIBN (30 mg) dans du toluène anhydre (20 mL) est agité 1 h à température ambiante sous argon puis chauffé pendant 2 h à 80°C, refroidi et concentré. Le résidu est agité dans l'heptane (40 mL) et les cristaux obtenus sont filtrés. Le produit est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine) pour donner le composé **82** sous la forme d'une poudre blanche (592 mg, 82%).

Rf 0.25 (Toluène/AcOEt : 80/20 + Et<sub>3</sub>N).

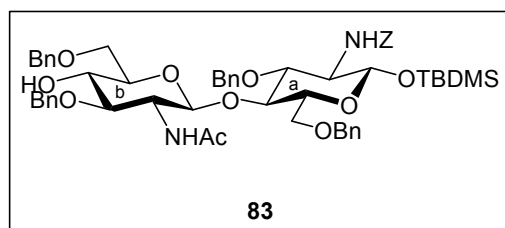
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : δ (ppm) 7.35-7.05 (m, 25H, 5Ph) ; 5.15 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.5 Hz, NHb) ; 4.96 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 4.94 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 9.6 Hz, J<sub>4,5</sub> = 9.6 Hz, H-4b) ; 4.81 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.3 Hz, H-1b) ; 4.80-4.40 (m, 8H, 3CH<sub>2</sub>Ph, H-1a, NHa) ; 4.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.91 (m, 2H, H-3b, H-3a) ; 3.57 (m, 2H, H-4a, H-5b) ; 3.42-3.26 (m, 7H, H-6b, H-6b, H-6a, H-6a, H-5a, H-2b, H-2a) ; 1.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CONH) ; 1.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO) ; 0.77 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 170.5 (CO, Ac) ; 169.9 (CONH) ; 155.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 138.9, 138.3, 138.1, 137.4, 136.6 (C aromatiques) ; 128.6-127.4 (CH aromatiques) ; 99.2 (C-1b) ; 95.7 (C-1a) ; 78.5 (C-3a) ; 78.4 (C-3b) ; 74.5 (C-4a) ; 74.4 (C-5a) ; 73.6 (C-5b) ; 73.5, 73.5, 73.3 (3CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.1 (C-4b) ; 71.9 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 69.8 (C-6b) ; 68.6 (C-6a) ; 66.6 (CH<sub>2</sub>O) ; 58.8 (C-2a) ; 57.3 (C-2b) ; 25.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 23.5 (CH<sub>3</sub>CONH) ; 20.9 (CH<sub>3</sub>CO) ; 18.0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.2 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 1055 [M+Na]<sup>+</sup> ; 1033 [M+H]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>58</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>Si : C 67.42, H 7.02, N 2.71, trouvé : C 67.82, H 7.35, N 2.59.

**2-Acétamido-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-O-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-O-tert-butylidiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (83)**



Une suspension du composé **82** (681 mg, 0.66 mmol) dans le méthanol (20 mL) est traitée pendant 4 h de 0 °C à température ambiante avec NaOMe (Na : 1.5 mg, 0.07 mmol, 0.1 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 50/50 + triéthylamine) pour donner le composé **83** sous la forme d'une poudre blanche (568 mg, 87%).

Rf 0.54 (Heptane/AcOEt : 50/50 + Et<sub>3</sub>N).

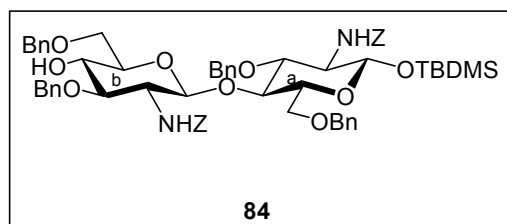
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : δ (ppm) 7.39-7.21 (m, 25H, 5Ph) ; 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 4.90 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.9 Hz, NHb) ; 4.85 (m, 1H, NHa) ; 4.82 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.8 Hz, H-1b) ; 4.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.63 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.9 Hz, H-1a) ; 4.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.94 (t, 1H, J<sub>2,3</sub> = 8.7 Hz, J<sub>3,4</sub> = 8.7 Hz, H-3a) ; 3.82 (m, 1H, H-3b) ; 3.69 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.8 Hz, J<sub>4,5</sub> = 8.8 Hz, H-4b) ; 3.65 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 2.8 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 8.2 Hz, H-6a) ; 3.60-3.49 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-4a, H-2b) ; 3.47 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> = 6.4 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 9.6 Hz, H-6b) ; 3.44 (m, 1H, H-5a) ; 3.33 (m, 1H, J<sub>4,5</sub> = 10.1 Hz, J<sub>5,6a</sub> = 4.0 Hz, H-5b) ; 3.29 (m, 1H, H-2a) ; 3.12 (s, 1H, OH-4) ; 1.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CONH) ; 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 170.1 (CONH) ; 155.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 139.0, 138.7, 138.2, 137.5, 136.6 (C aromatiques) ; 128.7-127.3 (CH aromatiques) ; 100.0 (C-1b) ; 96.5 (C-1a) ; 81.1 (C-4a) ; 77.3 (C-3b) ; 76.7 (C-3a) ; 74.6 (C-4b) ; 74.5, 74.0 (2CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.9 (C-5a) ; 73.8, 73.6 (2CH<sub>2</sub>Ph) ; 72.7 (C-5b) ; 71.4 (C-6b) ; 68.7 (C-6a) ; 66.7 (CH<sub>2</sub>O) ; 59.1 (C-2a) ; 56.0 (C-2b) ; 25.7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 23.6 (CH<sub>3</sub>CONH) ; 18.0 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.2 (CH<sub>3</sub>Si).

**ES+MS** : (m/z) 1013 [M+Na] ; 991 [M+H]<sup>+</sup>.

**Analyse élémentaire** : Calc. pour C<sub>56</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Si : C 67.85, H 7.12, N 2.83, trouvé : C 67.70, H 7.27, N 2.73.

**3,6-Di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (**84**)**



Une suspension du composé **73** (1.42 g, 1.26 mmol) dans le méthanol (30 mL) est traitée pendant 4 h de 0 °C à température ambiante avec NaOMe (Na : 3 mg, 0.13 mmol, 0.1 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine) pour donner le composé **84** sous la forme d'une poudre blanche (1.08 g, 79%).

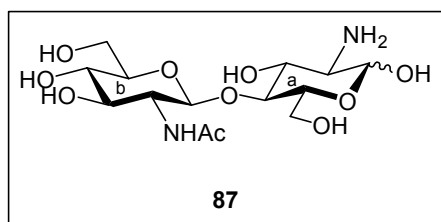
Rf 0.40 (Heptane/AcOEt : 60/40 + Et<sub>3</sub>N).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.38-7.16 (m, 30H, 6Ph) ; 5.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 5.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 4.83-4.50 (m, 10H, NH<sub>a</sub>, NH<sub>b</sub>, H-1<sub>a</sub>, H-1<sub>b</sub>, 3 CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.90 (t, 1H, J<sub>2,3</sub> = 8.9 Hz, H-3<sub>b</sub>) ; 3.73 (m, 1H, H-4<sub>a</sub>) ; 3.63 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.7 Hz, J<sub>2,3</sub> = 8.7 Hz, H-3<sub>a</sub>) ; 3.54 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> = 4.8 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 9.9 Hz, H-6<sub>b</sub>) ; 3.44 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 6.1 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 9.9 Hz, H-6<sub>a</sub>) ; 3.42-3.30 (m, 3H, H-2<sub>b</sub>, H-2<sub>a</sub>, H-4<sub>b</sub>) ; 3.25 (m, 1H, J<sub>4,5</sub> = 9.7 Hz, H-5<sub>b</sub>) ; 3.22-3.13 (m, 2H, H-6<sub>a</sub>, H-6<sub>b</sub>) ; 3.03 (m, 1H, H-5<sub>a</sub>) ; 2.66 (s, 1H, OH-4) ; 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 156.0, 155.9 (2CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 138.9, 138.4, 137.9, 137.6, 136.5, 136.5 (C aromatiques) ; 128.4-127.0 (CH aromatiques) ; 100.3 (C-1<sub>b</sub>) ; 95.6 (C-1<sub>a</sub>) ; 81.1 (C-5<sub>b</sub>) ; 78.8 (C-4<sub>b</sub>) ; 78.6 (C-4<sub>a</sub>) ; 76.3 (C-3<sub>a</sub>) ; 76.2 (C-3<sub>b</sub>) ; 74.3 (C-5<sub>a</sub>) ; 73.9, 73.4, 73.3, 73.2 (4CH<sub>2</sub>Ph) ; 70.6 (C-6<sub>a</sub>) ; 68.1 (C-6<sub>b</sub>) ; 66.7, 66.5 (2CH<sub>2</sub>O) ; 58.8 (C-2<sub>a</sub>) ; 57.1 (C-2<sub>b</sub>) ; 25.5 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 17.8 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.2 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.3 (CH<sub>3</sub>Si).

**SM-HR (ES<sup>+</sup>)** : (m/z) Calc. pour C<sub>62</sub>H<sub>74</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 1105.4858 ; trouvé 1105.4850.

**2-Acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-amino-2-désoxy-α,β-D-glucopyranose (87)**



Un mélange constitué du composé **89** (10.6 mg, 0.021 mmol), d'acide acétique (3  $\mu$ L, 0.052 mmol, 2.5 éq) et de  $\text{Bu}_4\text{NF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (16.8 mg, 0.053 mmol, 2.5 éq) dans du THF anhydre (2 mL) est agité 30 min à 0°C puis à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est concentré puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 70/30 + triéthylamine) pour donner le composé **87** sous la forme d'un solide blanc (7.4 mg, 91%).

$[\alpha]_D = +13.4$  ( $c = 0.410$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

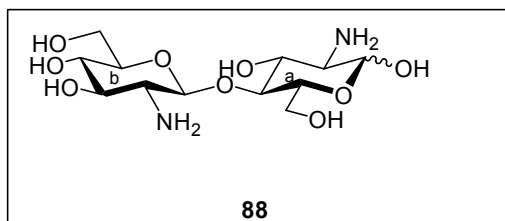
Rf 0.26 (MeOH/AcOEt : 70/30 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) :  $\delta$  (ppm) 5.19 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1a $\alpha$ ) ; 4.55 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.4$  Hz, H-1b) ; 4.42 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1a $\beta$ ) ; 3.95-3.91 (m, 1H, H-6b) ; 3.87-3.75 (m, 2H, H-6b, H-2b) ; 3.72-3.54 (m, 2H, H-2a, H-3b) ; 3.52-3.47 (m, 4H, H-5b, H-6a, H-4b, H-3a) ; 3.27-3.22 (m, 2H, H-4a, H-6a) ; 3.14 (m, 1H, H-5a) ; 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CONH}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 175.1 (CONH) ; 101.9 (C-1b) ; 101.5 (C-1a $\beta$ ) ; 89.2 (C-1a $\alpha$ ) ; 76.2 (C-5b) ; 75.7 (C-5a) ; 74.0 (C-3a) ; 73.7 (C-3b) ; 70.4 (C-4b) ; 69.9 (C-4a) ; 60.9 (C-6b) ; 60.1 (C-6a) ; 55.9 (C-2b) ; 54.3 (C-2a) ; 22.5 ( $\text{CH}_3\text{CONH}$ ).

SM-HR (ES+) : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  383.1666 ; trouvé 383.1671.

**2-Amino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-amino-2-désoxy-α,β-D-glucopyranose (88)**



Un mélange constitué du composé **90** (71 mg, 0.16 mmol), d'acide acétique (22  $\mu$ L, 0.39 mmol, 2.5 éq) et de  $\text{Bu}_4\text{NF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (123.6 mg, 0.39 mmol, 2.5 éq) dans du THF anhydre (15 mL) est agité 30 min à 0 °C puis à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est concentré puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 70/30 + triéthylamine) pour donner le composé **88** sous la forme d'un solide blanc (48.4 mg, 89%).

$[\alpha]_D = +26.0$  ( $c = 0.995$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

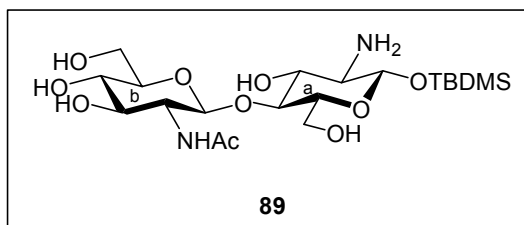
Rf 0.20 (MeOH/AcOEt : 70/30 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) :  $\delta$  (ppm) 5.46 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1a $\alpha$ ) ; 4.97 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.2$  Hz, H-1b) ; 4.86 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1a $\beta$ ) ; 4.05 (m, 1H, H-6b) ; 3.97-3.84 (m, 2H, H-6b, H-2b) ; 3.80-3.77 (m, 2H, H-2a, H-3b) ; 3.74-3.70 (m, 4H, H-5b, H-6a, H-4b, H-3a) ; 3.53-3.49 (m, 2H, H-4a, H-6a) ; 3.45 (m, 1H, H-5a).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 98.1 (C-1b) ; 97.0 (C-1a $\beta$ ) ; 92.9 (C-1a $\alpha$ ) ; 77.0 (C-5b) ; 76.7 (C-5a) ; 76.5 (C-3a) ; 72.3 (C-3b) ; 69.9 (C-4b) ; 68.3 (C-4a) ; 60.6 (C-6b) ; 60.5 (C-6a) ; 56.2 (C-2b) ; 54.5 (C-2a).

SM-HR (ES+) : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  341.1560 ; trouvé 341.1557.

### 2-Acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucoopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-1-O-tert-butylidiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucoopyranose (**89**)



Une solution du composé **83** (280 mg, 0.28 mmol) dans un mélange AcOEt/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (5/10/4, 25 mL) est hydrogénée en présence de 10% de Pd-C (100 mg) pendant 7 jours à température ambiante. Le mélange est filtré sur Célite<sup>®</sup> puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 75/25 + triéthylamine) avant d'être lyophilisé pour donner le composé **89** sous la forme d'un solide blanc (94 mg, 67%).

$[\alpha]_D = -1.2$  ( $c = 0.255$ , MeOH).

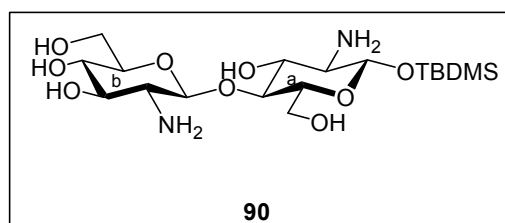
Rf 0.26 (MeOH/AcOEt : 75/25 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

**RMN  $^1\text{H}$**  (MeOD, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 4.94 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.1$  Hz, H-1a) ; 4.49 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.5$  Hz, H-1b) ; 3.88 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 1.9$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.8$  Hz, H-6a) ; 3.80-3.71 (m, 2H, H-6b, H-3a) ; 3.68-3.50 (m, 3H, H-2b, H-6b, H-6a) ; 3.47-3.41 (m, 1H, H-4a) ; 3.34-3.30 (m, 1H, H-3b) ; 3.28-3.12 (m, 3H, H-5b, H-4b, H-5a) ; 2.65 (m, 1H, H-2a) ; 1.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CONH}$ ) ; 0.92 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 0.17 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (MeOD, 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 172.8 (CONH) ; 102.2 (C-1b) ; 94.8 (C-1a) ; 80.9 (C-4a) ; 77.1 (C-5b) ; 75.5 (C-5a) ; 74.7 (C-3b) ; 71.0 (C-4b) ; 70.1 (C-2a) ; 69.9 (C-3a) ; 61.5 (C-6a) ; 60.5 (C-6b) ; 56.3 (C-2b) ; 25.4 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 22.1 ( $\text{CH}_3\text{CONH}$ ) ; 17.6 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 8.2 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 7.4 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**SM-HR (ES<sup>+</sup>)** : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Si}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  519.2350 ; trouvé 519.2353.

### 2-Amino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-1-O-tert-butylidiméthylsilyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (90)



Une solution du composé **84** (260 mg, 0.24 mmol) dans un mélange AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (5/10/4, 25 mL) est hydrogénée en présence de 10% de Pd-C (100 mg) pendant 7 jours à température ambiante. Le mélange est filtré sur Célite<sup>®</sup> puis le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (MeOH/AcOEt : 70/30 + triéthylamine) avant d'être lyophilisé pour donner le composé **90** sous la forme d'un solide blanc (71 mg, 65%).

**Rf** 0.32 (MeOH/AcOEt : 70/30 + Et<sub>3</sub>N).

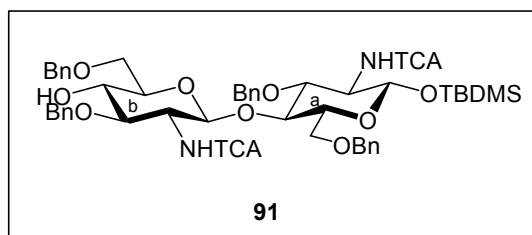
**RMN  $^1\text{H}$**  (MeOD, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 4.90 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, H-1a) ; 4.52 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.4$  Hz, H-1b) ; 3.86 (m, 1H, H-6a) ; 3.79-3.71 (m, 2H, H-6b, H-3a) ; 3.66-3.52 (m, 3H, H-2b, H-6b, H-6a) ; 3.47-3.41 (m, 1H, H-4a) ; 3.34-3.29 (m, 1H, H-3b) ; 3.25-3.10 (m, 3H, H-5b, H-4b, H-5a) ; 2.65 (m, 1H, H-2a) ; 0.92 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 0.19 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (MeOD, 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 102.4 (C-1b) ; 95.1 (C-1a) ; 80.8 (C-4a) ; 77.1 (C-5b) ; 75.3 (C-5a) ; 75.0 (C-3b) ; 71.1 (C-4b) ; 70.1 (C-2a) ; 69.7 (C-3a) ; 61.5 (C-

6a) ; 60.8 (C-6b) ; 56.0 (C-2b) ; 25.4 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 17.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 8.2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 7.6 (CH<sub>3</sub>Si).

SM-HR (ES<sup>+</sup>) : (m/z) Calc. pour C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 477.2244 ; trouvé 477.2337.

**3,6-Di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranose (91)**



Une suspension du composé **70** (680 mg, 0.59 mmol) dans le méthanol (20 mL) est traitée pendant une nuit de 0° C à température ambiante avec NaOMe (Na : 1.4 mg, 0.06 mmol, 0.1 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine) pour donner le composé **91** sous la forme d'une poudre blanche (485 mg, 74%).

Rf 0.46 (Toluène/AcOEt : 60/40 + Et<sub>3</sub>N).

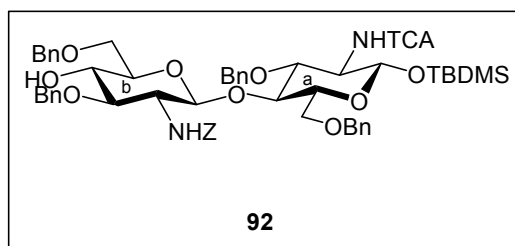
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.31-7.11 (m, 20H, 4Ph) ; 6.85 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 8.1 Hz, NHa) ; 6.62 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.5 Hz, NHb) ; 4.89 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.4 Hz, H-1b) ; 4.80-4.60 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.44 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.7 Hz, H-1a) ; 4.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.00 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.6 Hz, J<sub>4,5</sub> = 8.6 Hz, H-4a) ; 3.84 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> = 8.3 Hz, J<sub>3,4</sub> = 9.5 Hz, H-3b) ; 3.65-3.45 (m, 6H, H-6a, H-6b, H-2a, H-2b, H-4b, H-3a) ; 3.42-3.34 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 3.32-3.29 (m, 2H, H-5a, H-5b) ; 3.27 (s, 1H, OH-4) ; 0.78 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 161.7, 161.6 (2COCCL<sub>3</sub>) ; 138.4, 138.0, 137.8, 137.4 (C aromatiques) ; 128.5-127.4 (CH aromatiques) ; 98.9 (C-1b) ; 94.9 (C-1a) ; 92.6, 92.5 (2CCL<sub>3</sub>) ; 79.9 (C-3b) ; 77.8 (C-4a) ; 75.7 (C-3a) ; 74.6 (C-5a) ; 74.4 (C-5b) ; 74.3, 74.0, 73.6, 73.4 (4CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.1 (C-4b) ; 70.9 (C-6b) ; 68.3 (C-6a) ; 59.2 (C-2a) ; 57.6 (C-2b) ; 25.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 17.8 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.0 (CH<sub>3</sub>Si).

ES+MS : (m/z) 1128 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Analyse élémentaire** : Calc. pour  $C_{50}H_{60}Cl_6N_2O_{11}Si$  : C 54.35, H 5.47, N 2.55, trouvé : C 54.53, H 5.67, N 2.51.

**3,6-Di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-*O*-benzyl-1-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranose (92)**



Une suspension du composé **71** (129 mg, 0.11 mmol) dans le méthanol (5 mL) est traitée pendant une nuit de 0°C à température ambiante avec NaOMe (Na : 0.3 mg, 0.01 mmol, 0.1 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 75/25 + triéthylamine) pour donner le composé **92** sous la forme d'une poudre blanche (121 mg, 97%).

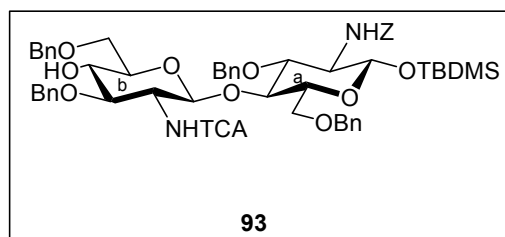
Rf 0.31 (Heptane/AcOEt : 65/35 + Et<sub>3</sub>N).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.39-7.18 (m, 25H, 5Ph) ; 6.62 (d, 1H,  $J_{2,NH} = 7.4$  Hz, NHa) ; 5.08 (m, 3H, CH<sub>2</sub>O, NHb) ; 4.97 (t, 1H,  $J_{1,2} = 7.5$  Hz, H-1b) ; 4.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.69 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.7$  Hz, H-1a) ; 4.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 4.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.95 (t, 1H,  $J_{3,4} = 8.4$  Hz, H-3b) ; 3.91 (m, 1H, H-3a) ; 3.75 (t, 1H,  $J_{3,4} = 8.6$  Hz,  $J_{4,5} = 7.5$  Hz, H-4a) ; 3.65-3.55 (m, 3H, H-2b, H-2a, H-4b) ; 3.50 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 4.9$  Hz,  $J_{6a,6b} = 9.8$  Hz, H-6b) ; 3.40 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 6.2$  Hz,  $J_{6a,6b} = 9.8$  Hz, H-6a) ; 3.30-3.20 (m, 4H, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b) ; 3.05 (s, 1H, OH-4) ; 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 161.7 (COCl<sub>3</sub>) ; 155.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 138.6, 138.4, 137.9, 137.5, 136.6 (C aromatiques) ; 128.6-127.3 (CH aromatiques) ; 100.4 (C-1b) ; 94.7 (C-1a) ; 92.6 (CCl<sub>3</sub>) ; 81.1 (C-3a) ; 77.8 (C-4a) ; 76.2 (C-5b) ; 74.5 (C-3b) ; 74.2 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 74.0 (C-5a) ; 73.9, 73.6, 73.3 (3CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.0 (C-4b) ; 71.0 (C-6a) ; 68.0 (C-6b) ; 66.7 (CH<sub>2</sub>O) ; 59.5 (C-2a) ; 57.2 (C-2b) ; 25.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 17.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.0 (CH<sub>3</sub>Si).

**SM-HR (ES<sup>+</sup>):** (m/z) Calc. pour C<sub>56</sub>H<sub>67</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup> 1115.3427 ; trouvé 1115.3389.

**3,6-Di-O-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-O-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-1-O-tert-butylidiméthylsilyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose (93)**



Une suspension du composé **72** (1.11 g, 0.98 mmol) dans le méthanol (20 mL) est traitée pendant une nuit de 0 °C à température ambiante avec NaOMe (Na : 2.2 mg, 0.10 mmol, 0.1 éq). La solution est ensuite neutralisée en utilisant la résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine) pour donner le composé **93** sous la forme d'une poudre blanche (750 mg, 70%).

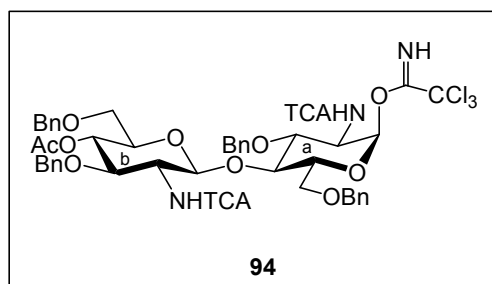
Rf 0.26 (Heptane/AcOEt : 65/35 + Et<sub>3</sub>N).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : δ (ppm) 7.31-7.08 (m, 25H, 5Ph) ; 6.54 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 7.4 Hz, NHb) ; 5.00 (d, 1H, J<sub>2,NH</sub> = 9.0 Hz, NHa) ; 4.97 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O) ; 4.77 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.2 Hz, H-1a) ; 4.72-4.36 (m, 9H, H-1b, 4 CH<sub>2</sub>Ph) ; 3.98 (t, 1H, J<sub>3,4</sub> = 8.8 Hz, J<sub>2,3</sub> = 8.8 Hz, H-3a) ; 3.68-3.50 (m, 7H, H-2b, H-3b, H-4b, H-4a, H-6b, H-6a, H-6a) ; 3.42 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 6.1 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 9.9 Hz, H-6b) ; 3.33-3.20 (m, 3H, H-2a, H-5b, H-5a) ; 3.09 (s, 1H, OH-4) ; 0.82 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) : δ (ppm) 161.8 (COCl<sub>3</sub>) ; 155.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 138.9, 138.1, 138.0, 137.5, 136.5 (C aromatiques) ; 128.6-127.3 (CH aromatiques) ; 98.6 (C-1b) ; 95.6 (C-1a) ; 92.6 (CCl<sub>3</sub>) ; 79.9 (C-4a) ; 78.3 (C-3a) ; 75.7 (C-3b) ; 74.6 (C-4b) ; 74.4 (C-5a) ; 74.3, 73.8, 73.7, 73.4 (4CH<sub>2</sub>Ph) ; 72.9 (C-5b) ; 71.1 (C-6a) ; 68.4 (C-6b) ; 66.6 (CH<sub>2</sub>O) ; 59.1 (C-2a) ; 57.9 (C-2b) ; 25.6 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; 17.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi) ; -4.1 (CH<sub>3</sub>Si) ; -5.1 (CH<sub>3</sub>Si).

**SM-HR (ES+)** : (m/z) Calc. pour  $C_{56}H_{67}Cl_3N_2O_{12}Si$   $[M+H]^+$  1093.3607 ; trouvé 1093.3641.

**4-O-Acétyl-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-glucopyranose (94)**



Un mélange constitué du composé **70** (400 mg, 0.35 mmol), d'acide acétique (24  $\mu$ L, 0.42 mmol, 1.2 éq) et de  $Bu_4NF \cdot 3H_2O$  (132 mg, 0.42 mmol, 1.2 éq) dans du THF anhydre (5 mL) est agité 30 min à 0°C puis à température ambiante pendant une nuit. Le THF est évaporé sous pression réduite puis le résidu est dilué dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution saturée en  $NH_4Cl$  puis par de l'eau avant d'être séchée et concentrée. Un mélange de l'hémiacétal obtenu, de  $CCl_3CN$  (0.35 mL, 3.49 mmol, 10 éq) et de DBU (13  $\mu$ L, 0.09 mmol, 0.25 éq) dans du DCM anhydre (5 mL) est agité pendant 1 h à température ambiante avant d'être concentré sans être chauffé. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/AcOEt : 65/35 + triéthylamine) pour donner le composé **94** sous la forme d'une poudre blanche (365 mg, 89%).

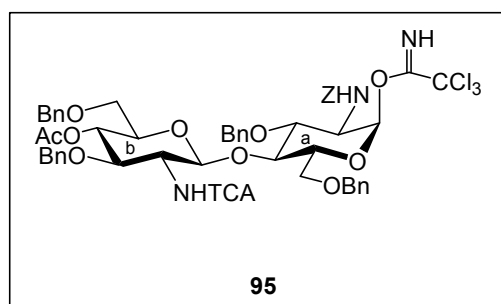
Rf 0.43 (Heptane/AcOEt : 60/40 +  $Et_3N$ ).

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 8.67 (s, 1H, NH imidate) ; 7.43-7.19 (m, 20H, 4Ph) ; 6.73 (d, 1H,  $J_{2,NH} = 7.7$  Hz, NHa) ; 6.47 (d, 1H,  $J_{2,NH} = 7.7$  Hz, NHb) ; 6.43 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz, H-1a) ; 5.07 (t, 1H,  $J_{3,4} = 9.1$  Hz,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz, H-4b) ; 4.82 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.72 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.7$  Hz, H-1b) ; 4.61 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.56 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.40 (m, 2H,  $CH_2Ph$ ) ; 4.30 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 9.1$  Hz,  $J_{2,3} = 9.5$  Hz, H-3b) ; 4.22 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.9$  Hz, H-2a) ; 3.90-3.72 (m, 4H, H-4a, H-3a, H-6a, H-6b) ; 3.63 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 2.1$  Hz,  $J_{5,6a} = 11.3$  Hz, H-6b) ; 3.52-3.35 (m, 4H, H-2b, H-5b, H-5a, H-6a) ; 1.92 (s, 3H,  $CH_3CO$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.7 (CO, Ac) ; 161.9, 161.8 ( $2\text{COCCl}_3$ ) ; 160.0 (C=NH) ; 137.9, 137.7, 137.6, 137.3 (C aromatiques) ; 128.7-127.6 (CH aromatiques) ; 98.6 (C-1b) ; 94.1 (C-1a) ; 92.4, 92.0 ( $2\text{CCl}_3$  trichloroacétamido) ; 90.8 ( $\text{CCl}_3$  imidate) ; 77.9 (C-4a) ; 75.2 (C-3b) ; 74.9 (C-3a) ; 74.3 (C-5a) ; 73.8 (C-5b) ; 73.6, 73.6, 73.5, 73.1 ( $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 71.4 (C-4b) ; 69.3 (C-6b) ; 67.3 (C-6a) ; 57.9 (C-2a) ; 53.9 (C-2b) ; 20.9 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**SM-HR (ES+)** : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{48}\text{H}_{48}\text{Cl}_9\text{N}_3\text{O}_{12}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1196.0332 ; trouvé 1196.0337.

**4-*O*-Acétyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-1-*O*-trichloroacétimidoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (95)**



Un mélange constitué du composé **72** (416 mg, 0.37 mmol), d'acide acétique (37  $\mu\text{L}$ , 0.65 mmol, 1.8 éq) et de  $\text{Bu}_4\text{NF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (210 mg, 0.67 mmol, 1.8 éq) dans du THF anhydre (10 mL) est agité 30 min à  $0^\circ\text{C}$  puis à température ambiante pendant une nuit. Le THF est évaporé sous pression réduite puis le résidu est dilué dans  $\text{AcOEt}$ . La phase organique est lavée par une solution saturée en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  puis par de l'eau avant d'être séchée et concentrée. Un mélange de l'hémiacétal obtenu, de  $\text{CCl}_3\text{CN}$  (0.37 mL, 3.69 mmol, 10 éq) et de DBU (20  $\mu\text{L}$ , 0.13 mmol, 0.36 éq) dans du DCM anhydre (5 mL) est agité pendant 1 h à température ambiante avant d'être concentré sans être chauffé. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Heptane/ $\text{AcOEt}$  : 65/35 + triéthylamine) pour donner le composé **95** sous la forme d'une poudre blanche (180 mg, 48%).

Rf 0.29 (Heptane/ $\text{AcOEt}$  : 65/35 +  $\text{Et}_3\text{N}$ ).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  (ppm) 8.62 (s, 1H, NH imidate) ; 7.37-7.18 (m, 25H, 5Ph) ; 6.83 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}_a} = 8.7$  Hz,  $\text{NH}_a$ ) ; 6.61 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}_b} = 8.1$  Hz,  $\text{NH}_b$ ) ; 6.31

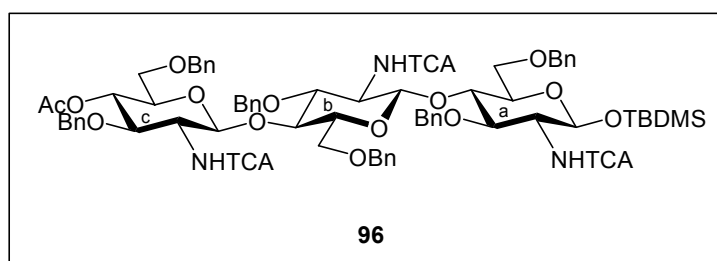
(d, 1H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz, H-1a) ; 5.14-4.99 (m, 3H, H-4b, CH<sub>2</sub>O) ; 4.74-4.35 (m, 11H, 4CH<sub>2</sub>Ph, H-2a, H-3a, H-1b) ; 4.25 (t, 1H,  $J_{3,4} = 9.4$  Hz,  $J_{2,3} = 9.4$  Hz, H-3b) ; 4.09 (m, 1H, H-5a) ; 3.84-3.58 (m, 5H, H-2b, H-5b, H-4a, H-6a, H-6b) ; 3.50-3.36 (m, 2H, H-6b, H-6a) ; 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 169.7 (CO, Ac) ; 168.7 (CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph) ; 161.9, (COCCl<sub>3</sub>) ; 159.9 (C=NH) ; 137.9, 137.7, 137.5, 137.3, 136.9 (C aromatiques) ; 128.8-127.6 (CH aromatiques) ; 99.0 (C-1a) ; 98.0 (C-1b) ; 92.0 (CCl<sub>3</sub> trichloroacétamido) ; 90.7 (CCl<sub>3</sub> imidate) ; 77.7 (C-4a) ; 76.0 (C-3b) ; 74.4 (C-3a) ; 73.9, 73.5 (2CH<sub>2</sub>Ph) ; 73.4 (C-5a) ; 73.3, 72.2 (2CH<sub>2</sub>Ph) ; 71.9 (C-5b) ; 71.4 (C-4b) ; 69.5 (C-6a) ; 68.9 (C-6b) ; 66.8 (CH<sub>2</sub>O) ; 58.1 (C-2a) ; 54.1 (C-2b) ; 20.9 (CH<sub>3</sub>CO).

ES+MS : (m/z) 1005 [M-CCl<sub>3</sub>CONH]<sup>+</sup>.

Analyse élémentaire : Calc. pour C<sub>54</sub>H<sub>55</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub> : C 55.79, H 4.75, N 3.60, trouvé : C 55.22, H 4.29, N 3.72.

**4-O-Acétyle-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-O-benzyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-O-benzyl-1-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- $\beta$ -D-glucopyranose (96)**



Un mélange composé de l'accepteur **91** (197 mg, 0.18 mmol) et du donneur **58** (246 mg, 0.36 mmol, 2 éq) dans du DCM anhydre (6 mL) est agité pendant 30 min à température ambiante sous argon. BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (4.5  $\mu$ L, 0.04 mmol, 0.2 éq) est additionné et le mélange est agité pendant 40 min. Le milieu est neutralisé par ajout de triéthylamine avant d'être concentré sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Toluène/AcOEt : 90/10 + triéthylamine) pour donner le trisaccharide **96** sous la forme d'un solide blanc (194 mg, 67%).

Rf 0.30 (Toluène/AcOEt : 80/20 + Et<sub>3</sub>N).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) :  $\delta$  (ppm) 7.45-7.16 (m, 30H, 6Ph) ; 6.79 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}} = 8.2$  Hz, NHa) ; 6.56 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}} = 7.9$  Hz, NHc) ; 6.50 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}} = 8.5$  Hz, NHb) ; 5.07 (t, 1H,  $J_{3,4} = 9.1$  Hz,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz, H-4c) ; 4.77 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.6$  Hz, H-1a) ; 4.71 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.6$  Hz, H-1c) ; 4.66 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1b) ; 4.63-4.48 (m, 12H, 6 $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 4.12-4.08 (m, 3H, H-5b, H-4b, H-4a) ; 3.92 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 9.8$  Hz,  $J_{2,3} = 8.5$  Hz, H-3a) ; 3.78-3.73 (m, 3H, H-2c, H-3c, H-6a) ; 3.69-3.55 (m, 5H, H-6a, H-5a, H-3b, H-2a, H-2b) ; 3.47-3.40 (m, 3H, H-5c, H-6c, H-6b) ; 3.34-3.27 (m, 2H, H-6c, H-6b) ; 1.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 0.98 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 0.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) :  $\delta$  (ppm) 170.2 (CO, Ac) ; 162.3, 162.2, 162.1 ( $3\text{COCCl}_3$ ) ; 139.0, 138.7, 138.5, 138.4, 138.1, 137.9 (C aromatiques) ; 129.3-127.9 (CH aromatiques) ; 99.6 (C-1b) ; 99.0 (C-1c) ; 95.3 (C-1a) ; 93.1, 93.0, 92.9 ( $3\text{CCl}_3$ ) ; 79.1 (C-3b) ; 78.5 (C-3c) ; 78.4 (C-3a) ; 76.5 (C-5b) ; 76.5 (C-5c) ; 75.2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 75.1 (C-5a) ; 75.0 (C-4c) ; 74.7, 74.3, 74.2, 74.0 ( $4\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 73.9 (C-4b) ; 73.8 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 72.2 (C-4a) ; 70.2 (C-6b) ; 68.9 (C-6c) ; 68.8 (C-6a) ; 60.1 (C-2a) ; 58.5 (C-2c) ; 58.2 (C-2b) ; 26.1 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; 21.4 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) ; 18.4 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ) ; -3.6 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; -4.5 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**SM-HR (ES+)** : (m/z) Calc. pour  $\text{C}_{74}\text{H}_{84}\text{Cl}_9\text{N}_3\text{O}_{17}\text{Si}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1652.2798 ; trouvé 1652.2664.

### Préparation de l'acétate d'hydrazine $\text{AcONH}_2\text{NH}_3$

De l'hydrazine monohydraté (30 mL, 0.618 mol) est dissous dans de l'éther (30 mL). Le milieu réactionnel est refroidi à  $0^\circ\text{C}$  puis une solution d'acide acétique (30 mL, 0.525 mol) dans de l'éther (30 mL) est additionnée goutte à goutte. Après une heure de réaction à  $0^\circ\text{C}$ , le précipité est stocké deux heures au réfrigérateur. Le solide est filtré et lavé par de l'éther. Le produit est purifié par une recristallisation dans le méthanol en veillant à ne pas être trop chauffé pour conduire à l'acétate d'hydrazine sous la forme de cristaux blancs (32.34 g, 67%).

*F- Références  
bibliographiques*

1. G.-A.-F. Roberts. *Chitin chemistry*. London: Macmillan Press Ltd, 1992. In: *Chitin Chemistry*. Roberts GAF editor (1992).
2. A. Domard. *Adv. Chitin Sci.* **3**, 24-38 (1998).
3. E. Ruel-Gariepy, M. Shive, A. Bichara, M. Berrada, D.-L. Garrec, A. Chenite, J.-C. Leroux. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 53-63 (2004).
4. K. Ono, Y. Saito, H. Yura, K. Ishikawa. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **49**, 289 (2000).
5. S. Ganguly, A.-K. Dash. *Int. J. of Pharmaceutics* **276**, 83-92 (2004).
6. T.-D. Rathke, S.-M. Hudson. *Rev. Macromol. Chem. Phys.* **C34**, 375 (1994).
7. C.-L. Silva, J.-C. Pereira, A. Ramalho, A.-A.-C.-C. Pais, J.-J.-S. Sousa. *J. of Membrane Sci.* **320**, 268 (2008).
8. L.-S. Nair, S. Bhattacharyya, C.-T. Laurencin. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**, 659 (2004).
9. Y. Wi, S.-M. Hudson, J.-M. Mayer, D.-L. Kaplan. *J. Poly. Sci.: Part A: Poly. Chem.* **30**, 2187 (1992).
10. K. ElTahlawy, S.-M. Hudson. *J. Appl. Polym. Sci.* **100**, 1162 (2006).
11. J.-D. Schiffman, C.-L. Schauer. *Biomacromolecules* **8**, 594 (2007).
12. M.-N.-V. Ravi-Kumar. *React. Funct. Polym.* **46**, 1-27 (2000).
13. K. Oungbho, B.-W. Muller. *Int. J. of Pharmaceutics* **156**, 229 (1997).
14. S. Hirano, Y. Noishiki. *J. Biomed. Mater. Res.* **19**, 413 (1985).
15. R. Muzzarelli, V. Baldassarre, F. Conti, P. Ferrara, G. Biagini, G. Gazzanelli. *Biomaterials* **9**, 247 (1988).
16. S. Hirano, C. Itakura, H. Seino, Y. Akiyama, I. Nonaka, N. Kanbara. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 1214 (1990).
17. X. Su, T. Li, M. Zeng. *Liaoning Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* **19**, 312-329 (1994).
18. Q. Shang, Z. Yi. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1586635* (2005).
19. W. Eckstein, W. Kaminsky, Z. Modrzejewska. **PL 175283** (1998).
20. Z. Ni, P. Zhang. *Zhejiang Gongye Daxue Xuebao* **23**, 157-160 (1995).
21. R. Olsen, D. Schwartzmiller, W. Weppner, R. Winandy. *Chitin and Chitosan (G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford, eds)*, Elsevier, London (1989).
22. C.-C. Peng, M.-H. Yang, W.-T. Chiu, C.-H. Chiu, C.-S. Yang, Y.-W. Chen, K.-C. Chen, R.-Y. Peng. *Macromol. Biosci.* **8**, 316-327 (2008).
23. Y. Le, S.-C. Anand, A.-R. Horrocks. *European Conference on Advances in Wound Management* (1996).
24. D.-A. Sandford, A. Stinnes. *Physical, Chemical and Bioactive Properties, ACS Symposium Series* **467**, 430 (1991).
25. E. Ruel-Gariepy, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis, J.-C. Leroux. *Int. J. of Pharmaceutics* **203**, 89-98 (2000).
26. R.-A.-A. Muzzarelli. *Cell Mol. Life Sci.* **53**, 131-140 (1997).
27. K.-W. Gregory. *PCT Int. Appl. WO 200842891* (2008).
28. B.-S. Hong, D.-L. Meadows, H.-A. Ketelson, G.-R. Owen. *U.S. Pat. Appl. Publ. US 2004121924* (2004).
29. H. Pospieszny, S. Chirkov, I. Atabekov. *Plant Science* **79**, 63-68 (1991).
30. H.-C. Lin. *U.S. Pat. Appl. Publ. US 20070275859* (2007).
31. H. Chen, L. Xu. *Yunnan Zhiwu Yanjiu* **27**, 613-619 (2005).
32. D.-E. Freepons. *U.S. Pat. Appl. Publ. US 4964894* (1990).
33. H. Pospieszny, I.-G. Atabekov. *Plant Science* **62**, 29-31 (1989).

34. T.-S. Yoon. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* KR 2005102050 (2005).
35. P. Liu, X. Liu, W. Zhang, Z. Da, X. Wu, Z. Zhang, W. Ji. *Nongyao* 43, 312-314, 335 (2004).
36. X. Sui, X. Jin, W. Zhang, Q. Wang, Z. Zhou, M. Li. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* CN 1363215 (2002).
37. X. Sui, Z. Xu, W. Zhang, X. Jin, S. Li. *Mo Kexue Yu Jishu* 23, 25-29 (2003).
38. X.-Y. Sui, Z.-L. Zhou, W.-Q. Zhang, X.-R. Jin, M. Li, S.-Y. Li. *Huadong Ligong Daxue Xuebao* 28, 637-639 (2002).
39. V.-M. Boddu, K. Abburi, A.-J. Randolph, E.-D. Smith. *Separation Science and Technology* 43, 1365-1381 (2008).
40. Z.-B. Wu, W.-M. Ni, B.-H. Guan. *Journal of Hazardous Materials* 152, 757-764 (2008).
41. S.-N. Kartal, Y. Imamura. *Bioresour. Technol.* 96, 389-392 (2005).
42. T. Ogawa, T. Fukuda. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 2007000048 (2007).
43. M. Sugano, T. Fujikawa, Y. Hiratsuji, Y. Hasegawa. *Nutr. Rep. Int.* 18, 531 (1978).
44. M. Sugano, Y. Fujikawa, K. Hiratsuji, N. Nakashima, N. Fukuda, Y. Hasegawa. *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 787 (1980).
45. J.-G. LeHoux, F. Grondin. *Endocrinology* 132, 1078 (1993).
46. A. Razdan, D. Pettersson. *Br. J. Nutr.* 72, 277 (1994).
47. Y. Maezaki, K. Tsuji, Y. Nakagawa, Y. Kawai, M. Akimoto. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1439 (1993).
48. O.-I. Kvasenkov. *Russ. RU* 2167532 (2001).
49. M. Sasaki, Y. Akai, Y. Suzuki. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP 05124956 (1993).
50. F. Chang. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* CN 1977797 (2007).
51. B.-S. Song. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* KR 2002028764 (2002).
52. K.-W. Kim. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* KR 2000024742 (2000).
53. H.-F. Mark, N.-M. Bikales, C.-G. Overberger, G. Menges. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* 1, 20 (1985).
54. M. Rinaudo. *Prog. Polym. Sci.* 31, 603-632 (2006).
55. S. Hirano. *Macromol. Symp.* 168, 21-30 (2001).
56. P.-R. Austin, J. Brine. *US Patent* 4, 727 (1977).
57. H. Yoshino, S. Ishii, S. Nishimura, K. Kurita. *Advances in Chitin and Chitosan*, 565 (1992).
58. S. Tokura, N. Nishi. *Proceeding of the International Conference, 2d. Jpn. Soc. Chitin Chitosan*, 244-247 (1982).
59. N.-L. Yusof, A. Wee, L.-Y. Lim, E. Khor. *J. Biomed. Mater. Res. A* 66A, 224-232 (2003).
60. M. Kanke, H. Katayama, S. Tsuzuki, H. Kuramoto. *Chem. Pharm. Bul.* 37, 523 (1989).
61. Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 4, 303 (2003).
62. Y.-J. Jeon, F. Shahidi, S.-K. Kim. *Food Rev. Int.* 16, 159-176 (2000).
63. C. Qin, J. Gao, L. Wang, L. Zeng, Y. Liu. *Food and Chemical Toxicology* 44, 855-861 (2006).
64. S.-K. Kim, H.-G. Byun, P.-J. Park, F. Shahidi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2992-2997 (2001).
65. K. Ueno, T. Yamaguchi, N. Sakairi, N. Nishi, S. Tokura. *Adv. Chitin Sci.*, 156-161 (1997).

66. Y. Wang, P. Zhou, J. Yu, X. Pan, P. Wang, W. Lan, S. Tao. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **2007**, 174 (2007).
67. B.-G. Yang, J. Lee, S.-H. Kim, Y.-J. Jeon. *Han'guk Sikp'um yongyang Kwahak Hoechi* **33**, 236-243 (2004).
68. G.-J. Tsai, S.-L. Zhang, P.-L. Shieh. *Journal of Food Protection* **67**, 396-398 (2004).
69. B.-K. Choi, K.-Y. Kim, Y.-J. Yoo, S.-J. Oh, J.-H. Choi, C.-Y. Kim. *Int. J. of Antimicrobial Agents* **18**, 553-557 (2001).
70. X. Wei, C. Lei. *Zhongguo Nongye Kexue* **37**, 552-557 (2004).
71. P.-J. Park, J.-Y. Je, H.-G. Byun, S.-H. Moon, S.-K. Kim. *J. of Microbiol. and Biotech.* **14**, 317-323 (2004).
72. P.-J. Park, H.-K. Lee, S.-K. Kim. *J. of Microbiol. and Biotech.* **14**, 41-47 (2004).
73. Y. Yang, Z. Ma, J. Yin, L. Wen, G. Chen. *Zhongguo Gonggong Weisheng* **21**, 1080-1081 (2005).
74. J.-M. Jung, Y.-J. Jung, J.-H. Kim. *Kongkae Taeho Kongbo KR 2004043396* (2004).
75. B. Liu, L. Chen, L. Ren, B. Li, S. Gao. *Nanhua Daxue Xuebao, Yixueban* **33**, 331-333 (2005).
76. S. Zivanovic, C.-C. Basurto, S. Chi, P.-M. Davidson, J. Weiss. *Journal of Food Protection* **67**, 952-959 (2004).
77. B. Liu, S. Gao, B. Li, Z. Yang. *Zhongguo Shenghua Yaowu Zazhi* **24**, 73-75 (2003).
78. J.-Y. Kim, J.-K. Lee, T.-S. Lee, W.-H. Park. *Int. J. of Biomol. Macromol.* **32**, 23-27 (2003).
79. N.-R. Sudharshan, D.-G. Hoover, D. Knorr. *Food Biotechnology* **6**, 257-272 (1992).
80. K. Tsukada, T. Matsumoto, K. Aizawa, A. Tokoro, R. Naruse, S. Suzuki, M. Suzuki. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 259 (1990).
81. K. Suzuki, T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, M. Suzuki. *Carbohydr. Res.* **151**, 403-408 (1986).
82. Y.-J. Jeon, S.-K. Kim. *J. of Microbiol. and Biotech.* **12**, 503-507 (2002).
83. A. Tokoro, N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, M. Suzuki. *Chem. Pharm. Bul.* **36**, 784 (1988).
84. Y. Shiratori, H. Nagatsuyu, K. Umishio, M. Izume. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63185352* (1988).
85. R. Huang, E. Mendis, N. Rajapakse, S.-K. Kim. *Life Sciences* **78**, 2399-2408 (2006).
86. X.-M. Cao, H.-J. Xu, M. Shang, W.-S. Liu. *Harbin Shangye Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* **22**, 8-10 (2006).
87. V.-I. Gorbach, I.-N. Krasikova, P.-A. Luk'yanov, Y.-N. Loenko, T.-F. Solov'eva, Y.-S. Ovodov, L.-V. Moroz, A.-A. Pimenov, E.-A. Grubova. *U.S.S.R. SU 1652319* (1991).
88. C. Qin, Y. Du, L. Xiao, Z. Li, X. Gao. *Int. J. Biol. Macromol.* **31**, 111-117 (2002).
89. S. Suzuki, T. Watanabe, T. Mikami, T. Matsumoto, M. Suzuki. *Advanced in Chitin and Chitosan (C.-J. Brine, P.-A. Sandford, and J.-P. Zikakis, eds), Elsevier, London*, 96-105 (1992).
90. S. Suzuki. *Fragrance J.* **15**, 61 (1996).

91. A. Tokoro, N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, M. Suzuki. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **36**, 784-790 (1998).
92. N.-T. Keen. *Science* **187**, 74-75 (1975).
93. R.-A. Dixon. *Biol. Rev.* **61**, 239-291 (1986).
94. R.-A. Dixon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 339-367 (1990).
95. J. Ebel. *Annu. Rev. Phytopath.* **24**, 234-265 (1986).
96. L.-A. Hadwiger, T. Ogawa, H. Kuyama. *Mol. Plant Microb. Interact.* **7**, 531 (1994).
97. P. Vander, K.-M. Varum, A. Domard, N.-E. ElGuedarri, B.-M. Moerschbacher. *Plant Physiol.* **118**, 1353-1359 (1998).
98. J.-C. Cabrera, J. Messiaen, P. Cambier, P. VanCutsem. *Physiologia Plantarum* **127**, 44-56 (2006).
99. K. Akiyama, K. Kawazu, A. Kobayashi. *Carbohydr. Res.* **279**, 151 (1995).
100. P. Brodelius, C. Funk, A. Haner, M. Villegas. *Phytochemistry* **28**, 2651 (1989).
101. A. Darvill, C. Augur, C. Bergmann, R.-W. Carlson, J.-J. Cheong, S. Eberhard, M.-G. Hahn, V.-M. Lo, V. Marfa, B. Meyer, D. Mohnen, M.-A. O'Neill, M.-D. Spiro, H. Halbeek, W.-S. York, P. Albersheim. *Glycobiology* **2**, 181 (1992).
102. F. Cote, M.-G. Hahn. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1397-1411 (1994).
103. T. Yamaguchi, N. Shibuya. *Baiosaiensu to Indasutori* **57**, 607-610 (1999).
104. S. Hirano, N. Nagao. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3065 (1989).
105. Y. Shimai, K. Tsukuda, H. Seino. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 05092926* (1993).
106. S.-K. Kim, N. Rajapakse. *Carbohydr. Polym.* **62**, 357-368 (2005).
107. M. Sugano, S. Watanabe, A. Kishi, M. Izume, A. Ohtakara. *Lipids* **23**, 187 (1988).
108. I. Ikeda, M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto, K. Hatano. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 431-435 (1993).
109. Z.-M. Kochkina, S.-N. Chirkov. *Mikrobiologiya* **69**, 266-269 (2000).
110. Z.-M. Kochkina, S.-N. Chirkov. *Mikrobiologiya* **69**, 257-260 (2000).
111. P.-J. Park, J.-Y. Je, S.-K. Kim. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4624-4627 (2003).
112. J.-Y. Je, P.-J. Park, S.-K. Kim. *Food and Chemical Toxicology* **42**, 381-387 (2003).
113. P.-J. Park, J.-Y. Je, S.-K. Kim. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4930-4934 (2003).
114. Y.-J. Jeon, S.-K. Kim. *Korean J. Chitin Chitosan* **2**, 60 (1997).
115. M. Izume, Y. Kinooka. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63297305* (1988).
116. W. Xia, F. Zhang, X. He. *Wuxi Qinggong Daxue Xuebao Bianjibu* **17**, 10-14 (1998).
117. F.-F. Lin. **CN 1965706** (2007).
118. G.-J. Tsai, Z.-Y. Wu, W.-H. Su. *Journal of Food Protection* **63**, 747-752 (2000).
119. H.-S. Seong, S.-W. Ko, K.-G. Song. *Korean Fiber Society* **35**, 716-720 (1998).
120. H.-S. Seong. *Textile Research Journal* **69**, 483-488 (1999).
121. X. Zhou, D. Liu, K. Yao. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1686559* (2005).
122. H. Ai, B. Liu, W. Huang, Z. Lei, X. Zhou. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1883306* (2006).

123. L. Wang. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1969801* (2007).
124. K.-M. Varum, M.-H. Ottoy, O. Smidsrod. *Carbohydr. Polym.* **46**, 89-98 (2001).
125. S. Horowitz, S. Roseman, H.-J. Blumenthal. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5046 (1957).
126. A. Domard, N. Cartier. *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 297-302 (1989).
127. P.-R. Austin, C.-J. Brine, J.-E. Castle, J.-P. Zikakis. *Science* **212**, 749-753 (1981).
128. T. Ando, S. Kataoka. *Kobunshi Ronbunshu* **37**, 1-7 (1980).
129. R. Yamaguchi, Y. Arai, T. Itoh. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2379-2381 (1982).
130. A.-V. Il'ina, V.-P. Varlamov. *Appl. Biochem. and Microbiol.* **40**, 300-303 (2003).
131. T. Inaba, T. Ohgushi, Y. Iga, E. Hasegawa. *Chem. Pharm. Bul.* **32**, 1603 (1984).
132. J. Defaye, A. Gadelle, C. Pedersen. *Chitin and Chitosan (G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford, eds)*, Elsevier, London, 415-429 (1989).
133. J. Defaye, A. Gadelle, C. Pedersen. *Carbohydr. Res.* **261**, 267 (1994).
134. C. Bosso, J. Defaye, A. Domard, A. Gadelle, C. Pedersen. *Carbohydr. Res.* **156**, 57-68 (1986).
135. K.-H. Meyer, H. Wehrli. *Helv. Chim. Acta* **20**, 353 (1934).
136. G.-G. Allan, M. Peyron. *Carbohydr. Res.* **277**, 257-272 (1995).
137. J.-M. Williams. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **31**, 9-79 (1975).
138. S. Mao, X. Shuai, F. Unger, M. Simon, D. Bi, T. Kissel. *Int. J. of Pharmaceutics* **281**, 45-54 (2004).
139. K. Tommeraas, K.-M. Varum, B.-E. Christensen, O. Smidsrod. *Carbohydr. Res.* **333**, 137-144 (2001).
140. H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Shigemasa, S. Tokura. *Carbohydr. Res.* **242**, 167-172 (1993).
141. S. Hirano, Y. Kondo, K. Fujii. *Carbohydr. Res.* **144**, 338-341 (1985).
142. G.-G. Allan, M. Peyron. *Chitin and Chitosan (G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford, eds)*, Elsevier, London, 443-466 (1989).
143. J.-H. Ridd. *Adv. Phys. Org. Chem* **16**, 1-49 (1978).
144. G.-G. Allan, M. Peyron. *Carbohydr. Res.* **277**, 273-282 (1995).
145. W. Ambrecht. *Biochem. Z.* **95**, 108-123 (1919).
146. P. Karrer, S.-M. White. *Helv. Chim. Acta* **13**, 1105 (1930).
147. A.-B. Foster, E.-F. Martlew, M. Stacey. *Chem. Ind.*, 825 (1953).
148. Y. Takamori, H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Okamoto, S. Minami, A. Matsushashi, Y. Shigemasa. "Proceedings from the 2<sup>nd</sup> Asia Pacific Chitin Symposium", Bangkok, 249-256 (1996).
149. A. Ohtakara, H. Matsunaga, M. Mitsutomi. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3191-3199 (1990).
150. Y. Takiguchi, K. Shimahara. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1537 (1989).
151. T. Takayanagi, K. Ajisaka, Y. Takiguchi, K. Shimahara. *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 404 (1991).
152. Y. Takiguchi, K. Shimahara. *Lett. Appl. Microbiol.* **6**, 129 (1988).
153. M. Mitsutomi, H. Kidoh, H. Tomita, T. Watanabe. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 529 (1995).
154. M. Mitsutomi, A. Ohtakara, T. Fukamizo, S. Goto. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 871-877 (1990).
155. D. Somashekar, R. Joseph. *Bioresource Technol.* **55**, 35 (1996).

156. A. Ohtakara, M. Izume, M. Mitsutomi. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 3181 (1988).
157. W.-F. Osswald, J.-P. Shapiro, R.-E. McDonald, R.-P. Niedz, R.-T. Mayer. *Experientia* **49**, 888 (1993).
158. W.-F. Osswald, J.-P. Shapiro, R.-E. McDonald, R.-P. Niedz, C.-J. Nairn, J. Hearn, R.-T. Mayer. *Plant Cell Physiol.* **35**, 811 (1994).
159. F. Nanjo, M. Ishikawa, R. Katsumi, K. Sakai. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 899 (1990).
160. D.-M. Fenton, D.-E. Eveleigh. *J. Gen. Microbiol.* **126**, 151 (1981).
161. A. Pelletier, I. Lemire, J. Sygusch, E. Chornet, R.-P. Overend. *Biotech. Bioeng.* **36**, 310 (1990).
162. A. Pelletier, J. Sygusch. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 844 (1990).
163. H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Shigemasa, R. Ogawa, S. Tokura. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 295 (1990).
164. J. Grenier, A. Asselin. *Mol. Plant Microb. Interact.* **3**, 401 (1990).
165. R.-L. Monaghan, D.-E. Eveleigh, R.-P. Tewari, E.-T. Reese. *Nature New Biol.* **245**, 78 (1973).
166. K.-M. Varum, H.-K. Holme, M. Izume, B.-T. Stokke, O. Smidsrod. *Biochem. Biophys. Acta* **1291**, 5-15 (1996).
167. K. Kurita, K. Tomita, S. Ishii, S. Nishimura, K. Shimoda. *J. Poly. Sci.: Part A: Poly. Chem.* **31**, 2393 (1993).
168. Y. Yamasaki, I. Hayashi, Y. Ohta, H. Matsuda. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 444 (1993).
169. T. Fukamizo, Y. Honda, S. Goto, I. Boucher, R. Brzexinski. *Biochem. J.* **311**, 377 (1995).
170. T. Kuroiwa, S. Ichakawa, O. Hiruta, S. Sato, S. Mukataka. *Biotechnol. Prog.* **18**, 969-974 (2002).
171. K. Sakai, R. Katsumi, A. Isobe, F. Nanjo. *Biochem. Biophys. Acta* **1097**, 65 (1991).
172. M. Izume, A. Ohtakara. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1189 (1987).
173. K. Amano, E. Ito. *Eur. J. Biochem.* **85**, 97-104 (1978).
174. T. Fukamizo, T. Torikata, S. Kuhara, K. Hayashi. *J. Biochem.* **92**, 709-716 (1982).
175. S. Hirano, H. Tsushida, N. Nagao. *Biomaterials* **10**, 574-576 (1989).
176. D. Pantaleone, M. Yalpani, M. Scollar. "Advanced in Chitin and Chitosan" (C.-J. Brine, P.-A. Sandford, and J.-P. Zikakis, eds), Elsevier, London, 292-303 (1992).
177. D. Pantaleone, M. Yalpani, M. Scollar. *Carbohydr. Res.* **237**, 325 (1992).
178. E. Muraki, F. Yaku, H. Kojima. *Carbohydr. Res.* **239**, 227-237 (1993).
179. J. Li, Y. Du, J. Yang, T. Feng, A. Li, P. Chen. *Polym. Degrad. and Stability* **87**, 441-448 (2005).
180. H. Lin, H. Wang, C. Xue, M. Ye. *Enzyme and Microbial Tech.* **31**, 588-592 (2002).
181. S. Aiba, E. Muraki. "Proceedings from the 2nd Asia Pacific Chitin Symposium", Bangkok, 236-241 (1996).
182. L. Hai, T. Bang-Diep, N. Nagasawa, F. Yoshii, T. Kume. *Nuc. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* **208**, 466-470 (2003).
183. A. Charlesby. *Adv. Radiation Chem. Res.: Current Status. IAEA. Vienna*, 151 (1995).
184. W.-S. Choi, K.-J. Ahn, D.-W. Lee, M.-W. Byun, H.-J. Park. *Polym. Degrad. and Stability* **78**, 533-538 (2002).

185. R.-H. Chen, J.-S. Chen. *Adv. Chitin Sci.* **4**, 361 (2000).
186. P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J.-C. Promé, J. Dénarié. *Nature* **344**, 781-784 (1990).
187. W. D'Haese, M. Holsters. *Glycobiology* **12**, 79R (2002).
188. P. Lerouge. *Glycobiology* **4**, 127-134 (1994).
189. J.-S. Debenham, R. Rodebaugh, B. Fraser-Reid. *J. Org. Chem.* **61**, 6478 (1996).
190. S. Drouillard, S. Armand, G.-J. Davies, E. Vorgias, B. Henrissat. *Biochem. J.* **328**, 945-949 (1995).
191. N. Demont-Caulet, F. Maillet, D. Tailler, J.-C. Jacquinet, J.-C. Promé, K.-C. Nicolau, G. Truchet, J.-M. Beau, J. Dénarié. *Plant Physiol.* **120**, 83-92 (1999).
192. N. Grenouillat, B. Vauzeilles, J.-J. Bono, E. Samain, J.-M. Beau. *Angew. Chem., Int. Ed.* **43**, 4644-4646 (2004).
193. G.-L. Huang, D.-W. Zhang, H.-J. Zhao, H.-C. Zhang, P.-G. Wang. *Bioorg. and Med. Chem. Letters* **16**, 2042-2043 (2006).
194. E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R.-A. Geremia. *Carbohydr. Res.* **302**, 35-42 (1997).
195. E. Samain, V. Chazalet, R.-A. Geremia. *J. of Biotechnology* **72**, 33-47 (1999).
196. M.-O. Rasmussen, B. Hogg, J.-J. Bono, E. Samain, H. Driguez. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 1908-1910 (2004).
197. F. Gressent, S. Drouillard, N. Mantegazza, E. Samain, R.-A. Geremia, H. Canut, A. Niebel, H. Driguez, R. Ranjeva, J. Cullimore, J.-J. Bono. *Plant Biology* **96**, 4704 (1999).
198. K. Tokuyasu, H. Ono, K. Hayashi, Y. Mori. *Carbohydr. Res.* **322**, 26-31 (1999).
199. T. Usui, Y. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai, Y. Ishido. *Biochim. Biophys. Acta* **923**, 302 (1987).
200. S. Ikeshita, A. Sakamoto, Y. Nakahara, T. Ogawa. *Tetrahedron Lett.* **35**, 3123 (1994).
201. S. Ikeshita, Y. Nakahara, T. Ogawa. *Glycoconjugate J.* **11**, 257-261 (1994).
202. S.-L. Sedinkin, A.-I. Zinin, N.-N. Malysheva, A.-S. Shashkov, V.-I. Torgov, V.-N. Shibaev. *Mendeleev Commun.* **17**, 10-13 (2007).
203. L.-L. Morais, K. Bennis, I. Ripoche, L. Liao, F.-I. Auzanneau, J. Gelas. *Carbohydr. Res.* **338**, 1369 (2003).
204. K.-C. Nicolaou, N.-J. Bockovich, D.-R. Carcanague, C.-W. Hummem, L.-F. Even. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8701 (1992).
205. D. Tailler, J.-C. Jacquinet, J.-M. Beau. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1827 (1994).
206. L.-X. Wang, C. Li, Q.-W. Wang, Y.-Z. Hui. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 621 (1994).
207. F. Schmitt, P. Sinaÿ. *Carbohydr. Res.* **29**, 99-111 (1973).
208. C.-D. Warren, R.-W. Jeanloz. *Carbohydr. Res.* **53**, 67-84 (1977).
209. C. Augé, C.-D. Warren, R.-W. Jeanloz. *Carbohydr. Res.* **82**, 85-95 (1980).
210. M. Kiso, Y. Kaneda, R. Shimizu, A. Haszgawa. *Carbohydr. Res.* **83**, C8-C11 (1980).
211. T. Ogawa, S. Nakabayashi, K. Sasajima. *Carbohydr. Res.* **96**, 29-39 (1981).
212. P.-L. Durette, E.-P. Meitzner. *Carbohydr. Res.* **89**, 279-288 (1981).
213. M.-M. ElSayed, C.-D. Warren, R.-W. Jeanloz. *Carbohydr. Res.* **100**, C35-C38 (1982).

214. M.-M. ElSayed, C.-D. Warren, R.-W. Jeanloz. *Carbohydr. Res.* **131**, 166-174 (1984).
215. D.-A. Schwartz, H.-H. Lee, J.-P. Carver, J.-J. Krepinsky. *Can. J. Chem.* **63**, 1073 (1985).
216. M.-A. Nashed, M. Kiso, C.-W. Slife, L. Anderson. *Carbohydr. Res.* **90**, 71-82 (1981).
217. H. Kuyama, Y. Nakahara, T. Nukada, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa. *Carbohydr. Res.* **243**, C1-C7 (1993).
218. M.-R.-E. Aly, E.-S.-I. Ibrahim, E.-S.-H. ElAshry, R.-R. Schmidt. *Carbohydr. Res.* **331**, 129-142 (2001).
219. L. Huang, Z. Wang, X. Li, X.-S. Ye, X. Huang. *Carbohydr. Res.* **341**, 1669-1679 (2006).
220. J. Banoub, P. Boullanger, D. Laffont. *Chem. Rev.* **92**, 1167-1195 (1992).
221. G.-J. Boons. *Tetrahedron* **52**, 1095-1121 (1996).
222. D.-P. Galonic, D.-Y. Gin. *Nature* **446**, 1000 (2007).
223. R.-U. Lemieux, K.-B. Hendriks, R.-V. Stick, K. James. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4056-4062 (1975).
224. W. Koenigs, E. Knorr. *Chem. Berr.* **34**, 957-981 (1901).
225. A.-Y. Khorlin, M.-L. Shul'man, S.-E. Zurabyan, I.-M. Privalova, Y.-L. Kopaevich. *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim.*, 227 (1968).
226. A.-Y. Khorlin, M.-L. Shul'man, S.-E. Zurabyan, I.-M. Privalova, Y.-L. Kopaevich. *Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim.*, 2094 (1968).
227. G. Blatter, J.-M. Beau, J.-C. Jacquinet. *Carbohydr. Res.* **260**, 189-202 (1994).
228. T.-J. Donohoe, J.-G. Logan, D.-D.-P. Laffan. *Org. Lett.* **4995-4998** (2003).
229. R.-U. Lemieux, T. Takeda. *ACS Symp. Ser.* **39**, 90 (1976).
230. R.-U. Lemieux, R.-M. Ratcliff. *Can. J. Chem.* **57**, 1244 (1979).
231. R.-R. Schmidt. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **25**, 212 (1986).
232. L. Zervas, S. Konstas. *S. Chem. Ber.* **93**, 435 (1960).
233. D. Lafont, P. Boullanger, B. Fenet. *J. Carb. Chem.* **13**, 565-583 (1994).
234. D. Lafont, S. Manaudier, P. Boullanger, G. Descotes. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **127**, 576-583 (1990).
235. P. Boullanger, J. Banoub, G. Descotes. *Can. J. Chem* **65**, 1343 (1987).
236. D. Lafont, P. Boullanger, J. Banoub, G. Descotes. *Can. J. Chem* **68**, 828 (1990).
237. P. Boullanger, G. Descotes. *Tetrahedron Lett.* **27**, 2599-2602 (1986).
238. P. Boullanger, D. Lafont, J. Banoub, G. Descotes. *J. Carb. Chem.* **8**, 343-356 (1989).
239. B. Rehel, D. Lafont, P. Boullanger. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **129**, 253-258 (1992).
240. P. Martin, V. Lequart, R. Cecchelli, P. Boullanger, D. Lafont, J. Banoub. *Chem. Lett.* **33**, 696-697 (2004).
241. P. Boullanger, M. Jouineau, B. Bouammali, D. Lafont, G. Descotes. *Carbohydr. Res.* **202**, 151-164 (1990).
242. G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utille. *Carbohydr. Res.* **39**, 368 (1975).
243. S. Hanashima, K.-I. Inamori, S. Manabe, N. Taniguchi, Y. Ito. *Chem. Eur. J.* **12**, 3449-3462 (2006).
244. G. Zemplén, A. Kunz. *Chem. Ber.* **26**, 1705-1710 (1923).
245. J.-C. Jacquinet, M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, G. Torri, P. Sinaj. *Carbohydr. Res.* **130**, 221 (1984).

246. M.-P. DeNinno, J.-B. Etienne, K.-C. Duplantier. *Tetrahedron Lett.* **36**, 669-672 (1995).
247. W. Kinzy, R. R. Schmidt. *Liebigs Ann. Chem.* **8**, 1537-1545 (1985).
248. D.-M. Ratner, E.-R. Swanson, P.-H. Seeberger. *Org. Lett.* **5**, 4717-4720 (2003).
249. G. Chauvière, B. Bouteille, B. Enanga, C. deAlbuquerque, S.-L. Croft, M. Dumas, J. Périé. *J. Med. Chem.* **46**, 427-440 (2003).
250. M. Bergmann, L. Zervas. *Berichte* **64**, 975 (1931).
251. A. Marra, P. Sinaj. *Carbohydr. Res.* **200**, 319-337 (1990).
252. H. Myszka, D. Bednarczyk, M. Najder, W. Kaca. *Carbohydr. Res.* **338**, 133-141 (2003).
253. G. Kretzschmar, W. Stahl. *Tetrahedron* **54**, 6341-6358 (1998).
254. E.-R. Palmacci, P.-H. Seeberger. *Tetrahedron* **60**, 7755-7766 (2004).
255. J. Kerékgyarto, J.-G.-M. VanDerVen, J.-P. Kamerling. *Carbohydr. Res.* **238**, 135-145 (1993).
256. T.-K.-K. Mong, C.-Y. Huang, C.-H. Wong. *J. Org. Chem.* **68**, 2135-2142 (2003).
257. A. Katchalsky, P. Spitnik. *J. Polym. Science* **2**, 432 (1947).
258. P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, A. Domard. *Biomacromolecules* **2**, 765-772 (2001).
259. P. Sorlier, C. Viton, A. Domard. *Biomacromolecules* **3**, 1336-1342 (2002).
260. E. Vellinger. *Compt. Rend.* **182**, 1625-1627 (1926).
261. A. Neuberger, P. Fletcher. *J. Chem. Soc.*, 178 (1969).
262. A. Blasko, C.-A. Bunton, S. Bunel, C. Ibarra, E. Moraga. *Carbohydr. Res.* **298**, 163-172 (1996).
263. S.-B. Strand, K. Tommeras, K.-M. Varum, K. Ostgaard. *Biomacromolecules* **2**, 1310-1314 (2001).
264. Z. Tamura, M. Miyazaki, T. Suzuki. *Chem. Pharm. Bul.* **13**, 330-332 (1965).
265. S. Tsukada, Y. Inoue. *Carbohydr. Res.* **88**, 19-38 (1981).
266. J.-W. Park, K.-H. Choi, K.-K. Park. *Bull. of Korean Chem. Soc.* **4**, 68 (1982).
267. T.-F. Buckley, H. Rapoport. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4446-4450 (1982).
268. M.-L. Wolfrom, H.-B. Bhat. *J. Org. Chem.* **32**, 1821-1823 (1967).
269. A.-M. Dempsey, L. Hough. *Carbohydr. Res.* **41**, 63-76 (1975).



## Nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides possédant une structure et une architecture contrôlées

La bioactivité des chitooligosaccharides semble dépendre des degrés de *N*-acétylation et de polymérisation ainsi que de la distribution des unités répétitives D-glucosamine et *N*-acétyl-D-glucosamine. Afin de préparer des structures parfaitement définies, nous avons développé une nouvelle méthode basée sur la synthèse chimique totale d'oligosaccharides pouvant être décrite en trois étapes :

1- préparation de quatre monosaccharides jouant le rôle de donneurs et accepteurs de GlcN et GlcNAc

2- formation des oligosaccharides protégés suite à la réaction de couplage d'un donneur de GlcN/GlcNAc avec un accepteur de GlcN/GlcNAc

3- suppression des groupes protecteurs permettant l'obtention des chitooligosaccharides cibles

Un avantage important de cette stratégie vient de sa convergence. Ainsi, chaque structure protégée de chitooligosaccharide peut être convertie en un nouveau donneur ou accepteur de glycosyle par modification chimique, conduisant ensuite aux chitooligosaccharides de plus haut DP.

### New method for the preparation of chitooligosaccharides with controlled structure and architecture

Bioactivity of chitooligosaccharides seems to depend on their degrees of *N*-acetylation and polymerisation but also the sequence of the D-glucosamine and *N*-acetyl-D-glucosamine units. To prepare well defined structures, we have developed a new method based on the total chemical synthesis of oligosaccharides described in three stages:

1- preparation of four monosaccharides playing the role of donors and acceptors of both GlcN and GlcNAc

2- formation of protected oligosaccharides by the coupling reaction of one GlcN/GlcNAc donor with one GlcN/GlcNAc acceptor

3- removal of protecting groups to generate targeted chitooligosaccharides

An important advantage of this strategy is based on its convergence. Thus, each protected chitooligosaccharide structure can be converted into a new glycosyl donor or acceptor, thanks to chemical modifications, and then leads to higher DP chitooligosaccharides.

Discipline : chimie organique

Mots-clés (Key words) :

Chitooligosaccharides, synthèse chimique totale d'oligosaccharides, synthèse convergente

Chitooligosaccharides, totale chemical synthesis of oligosaccharides, convergent synthesis

Intitulé et adresse du laboratoire :

Laboratoire des Matériaux Polymères et des Biomatériaux (UMR CNRS 5223),  
Bâtiment ISTIL, Université Claude Bernard Lyon 1 - Domaine Scientifique de la  
Doua, 15, boulevard Latarjet 69622 Villeurbanne Cédex