

Numéro d'ordre : D.U. 1493

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

(U.F.R. Recherche Scientifique et Technique)

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° : 411

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(Spécialité : Chimie Organique)

par

Latino LOUREIRO MORAIS

Ingénieur diplômé de l'ENSCCF

Diplômé d'Études Approfondies

SYNTHÈSE DE THIOOLIGOSACCHARIDES, PRÉCURSEURS D'ANALOGUES DE FACTEURS DE NODULATION

Soutenue publiquement le 27 février 2004, devant la Commission d'Examen :

- Rapporteurs : **J.-M. BEAU**, Professeur à l'Université Paris-Sud, Orsay
P. WESTERDUIN, Docteur, Responsable du Service Développement au sein d'Organon,
Oss (Pays-Bas)
- Examineurs : **K. BENNIS**, Maître de Conférences à l'E.N.S.C. de Clermont-Ferrand
J. BOLTE, Professeur à l'Université Blaise Pascal
J. GELAS, Professeur à l'E.N.S.C. de Clermont-Ferrand
I. RIPOCHE, Maître de Conférences à l'E.N.S.C. de Clermont-Ferrand
- Invité : **F.-I. AUZANNEAU**, Professeur-Assistant à l'Université de Guelph, Ontario (Canada)

A Freddie

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Chimie des Hétérocycles et des Glucides dirigé par Monsieur Yves TROIN, Professeur à l'ENSC de Clermont-Ferrand, que je remercie de m'avoir accueilli.

Je voudrais remercier Monsieur Jacques GELAS, Professeur à l'ENSC de Clermont-Ferrand, pour la confiance qu'il m'a témoignée en me permettant de réaliser ce travail au sein de son équipe.

J'adresse également mes remerciements à Messieurs Jean-Marie BEAU, Professeur à l'Université Paris-Sud et Pieter WESTERDUIN, Responsable du service Développement au sein de la société ORGANON (Pays-Bas), qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens de plus à remercier Monsieur Jean BOLTE, Professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, qui a accepté de faire partie de mon jury, témoignant ainsi de son intérêt pour ce travail.

J'adresse également mes vifs remerciements à Mademoiselle France-Isabelle AUZANNEAU, Professeur à l'Université de Guelph, pour avoir accepté d'examiner ce travail, pour son aide et ses conseils judicieux que ce soit à Clermont-Ferrand ou à Guelph.

Je voudrais remercier plus particulièrement Madame Isabelle RIPOCHE et Monsieur Khalil BENNIS, Maîtres de Conférence à l'ENSC de Clermont-Ferrand, pour leur aide et leur patience tout au long de ces recherches, pour leur disponibilité, leur soutien mais aussi et surtout pour leur amitié.

Je ne saurais oublier tous les membres du laboratoire et j'aimerais témoigner de mon amitié à mes collègues et amis : Annabelle, Anne et Ala Eddin avec qui j'ai partagé de très bons moments pendant ces presque

quatre années ; Elisabeth, Pierre(s), Sophie, Jean-Louis, Jean-Philippe et Yves pour leur gentillesse et leur sympathie au quotidien.

Je voudrais enfin remercier pour leur aide les différents étudiants qui ont contribué à ce travail : Jana, Ondrej et Ben.

Table des matières

PARTIE 1 : INTRODUCTION	15
Chapitre 1. Nutrition et croissance des végétaux	17
Chapitre 2. Symbiose azotée	21
2.1. Structure des facteurs Nod	24
2.2. Biosynthèse des facteurs Nod	25
2.3. Spécificité plante/bactérie	26
2.4. Régulation de la nodulation	27
PARTIE 2 : SYNTHÈSES DE FACTEURS NOD ET D'ANALOGUES	30
Chapitre 1. Synthèses de facteurs Nod	32
1.1. Isolement du milieu naturel	32
1.2. Synthèses chimiques	33
1.2.1. Synthèse de Nicolaou	33
1.2.2. Synthèse de Hui	35
1.2.3. Synthèse de Beau	36
1.2.4. Synthèse d'Ogawa	37
1.2.5. Synthèse de Fraser-Reid	40
1.3. Conclusion	41
Chapitre 2. Synthèses d'analogues de facteurs Nod	42
2.1. Synthèse de Lee	42
2.2. Synthèse de Robina	44
2.3. Synthèse de Driguez	45
2.4. Conclusion et perspectives	46
PARTIE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION	49
Chapitre 1. Objectif et Stratégie de synthèse	51
1.1. Introduction	51
1.2. Formation de la liaison thioglycosidique	52
1.3. Stratégie de synthèse	55
Chapitre 2. Synthèse chimique	59
2.1. Synthèse d'un thiodisaccharide de type <u>II</u>	60

- 2.1.1. Synthèse du thiol **91** 60
- 2.1.2. Synthèse du triflate **92** 60
- 2.1.3. Synthèse du thiodisaccharide **93** 61
- 2.2. Synthèse d'un thiotrisaccharide de type **III** **62**
 - 2.2.1. Introduction 62
 - 2.2.2. Quelques méthodes de glycosylation 63
 - 2.2.2.1. Méthode de Koënigs-Knorr 64
 - 2.2.2.2. Activation du donneur sous forme de 1-fluorure 65
 - 2.2.2.3. Activation du donneur sous forme de thioglycoside 65
 - 2.2.2.4. Activation du donneur sous forme de n-pentényle 67
 - 2.2.2.5. Activation du donneur sous forme de trichloroacétimide 68
 - 2.2.2.6. Conclusion 69
 - 2.2.3. Synthèse d'un thiotrisaccharide de type **III** 70
 - 2.2.3.1. Introduction 70
 - 2.2.3.2. Synthèse du donneur de glycosyle **96** 71
 - 2.2.3.3. Essais de glycosylation avec les accepteurs **98** et **99** 73
 - 2.2.3.4. Essais de glycosylation avec l'accepteur **100** 74
 - 2.2.3.5. Conclusion 74
 - 2.2.4. Synthèse de thiotrisaccharides de type **IV** par extension du côté non réducteur 75
 - 2.2.4.1. Essais de glycosylation avec les accepteurs **102**, **103** et **104** 75
 - 2.2.4.2. Conclusion 76
 - 2.2.5. Synthèse de molécules modèles 77
 - 2.2.5.1. Stratégie de synthèse 77
 - 2.2.5.2. Synthèse des donneurs de glycosyle **105** et **106** 77
 - 2.2.5.3. Synthèses des thiodisaccharides modèles **113** et **114** 78
 - 2.2.6. Conclusion 80
- 2.3. Synthèse du thiotrisaccharide **115** **81**
 - 2.3.1. Stratégie de synthèse 81
 - 2.3.2. Synthèse du thiodisaccharide **116** 82
 - 2.3.2.1. Synthèse du thiol **117** 82
 - 2.3.2.2. Synthèse du triflate **118** 83
 - 2.3.2.3. Synthèse du thiodisaccharide **116** 85
 - 2.3.3. Synthèse du thiotrisaccharide **115** 86

2.3.3.1. Préparation du donneur de glycosyle	<u>126</u>	87
2.3.3.2. Synthèse du thiotrisaccharide	<u>115</u>	87
2.3.4. Conclusion		92
2.4. Synthèse du thiotétraccharide	<u>136</u>	93
2.4.1. Synthèse du donneur de glycosyle	<u>127</u>	94
2.4.2. Synthèse de l'accepteur de glycosyle		95
2.4.2.1. Préparation du thiotrisaccharide	<u>128</u>	95
2.4.2.2. Protection des groupes hydroxyle en positions 3 (unité A) et 6 (unité B)		97
2.4.2.2.1. Protection sous forme d'éther		97
2.4.2.2.2. Protection sous forme d'acétate		100
2.4.2.3. Synthèse de l'accepteur	<u>135</u>	100
2.4.3. Synthèse du thiotétraccharide	<u>136</u>	101
2.5. Conclusion sur la synthèse chimique du thiotétraccharide	<u>136</u>	102
Chapitre 3. Synthèse par voie enzymatique		106
3.1. Quelques rappels bibliographiques		106
3.2. Synthèse du thiotrisaccharide	<u>138</u>	111
3.2.1. Stratégie de synthèse		111
3.2.2. Synthèse de l'accepteur	<u>137</u>	112
3.2.2.1. Synthèse du thiodisaccharide	<u>139</u>	112
3.2.2.2. Synthèse du thiodisaccharide	<u>137</u>	113
3.2.3. Nouvelle stratégie de synthèse		115
3.2.3.1. Synthèse du thiodisaccharide	<u>144</u>	115
3.2.3.2. Synthèse du thiodisaccharide	<u>145</u>	116
3.2.3.3. Synthèse du thiodisaccharide	<u>137</u>	117
3.2.4. Synthèse du thiotrisaccharide	<u>138</u>	par transfert enzymatique 118
3.2.5. Conclusion		119
3.3. Synthèse du thiotétraccharide	<u>153</u>	120
3.3.1. Stratégie de synthèse		120
3.3.2. Synthèse du thiotrisaccharide	<u>160</u>	122
3.3.2.1. Synthèse du thiotrisaccharide	<u>155</u>	122
3.3.2.2. Synthèse du thiotrisaccharide	<u>160</u>	123
3.4. Conclusion		124
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		126
PARTIE EXPÉRIMENTALE		132

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **187**

ANNEXES **195**

Liste des abréviations

Ac	acétyle
APTS	acide <i>p</i> -toluène sulfonique
Ar	argon
Ara	arabinose
aro	aromatique(s)
Bn	benzyle
CA	chloroacétate
Cb	carbamyle
Cbz	benzyloxy-carbonyle
CH	cyclohexane
CSA	acide camphorsulfonique
DAST	trifluorure de diéthylaminosulfure
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DMF	<i>N,N</i> diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
éq.	équivalent
F	point de fusion
Fuc	fucosyle
Gro	glycéryle
LCO	lipochitoooligosaccharide
Me	méthyle
MeFuc	méthyl-fucosyle
MP ou PMP	<i>p</i> -méthoxyphényle
MS 3Å	tamis moléculaire 3 Å
MS 4Å	tamis moléculaire 4 Å
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
NPhth	phtalimido
Piv	pivaloyle

PMB	<i>p</i> -méthoxybenzyle
PMP ou MP	<i>p</i> -méthoxyphényle
Pr	propyle
quant.	quantitatif (rendement)
R _f	rapport frontal
TBDPS	<i>ter</i> -butyldiméthylsilyle
TESOTf	trifluorométhanesulfonyl de triéthylsilane
Tf ₂ O	anhydride trifluorométhanesulfonique
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TMSOTf	trifluorométhanesulfonyl de triméthylsilane
Troc	trichloroéthoxycarbonyle

L'infection de certaines plantes légumineuses (luzerne, soja, pois...) par des bactéries de la famille *Rhizobium*, se traduit par une association symbiotique entre la plante et la bactérie. En effet, cette dernière est capable de fixer l'azote de l'air et, grâce à son activité de nitrogénase, de le transformer en ammonium, élément essentiel pour la croissance de la plante qui, après réduction, entre dans la synthèse d'acides aminés et par conséquent de protéines.

Cette symbiose est possible grâce à un échange de messagers biologiques dont font partie les *facteurs de nodulation*, ou *facteurs Nod*. Ces molécules sont des lipochitooligosaccharides (LCOs) diversement substitués. C'est notamment cette diversité qui confère la spécificité plante/bactérie à l'association.

Dans l'optique de mieux comprendre les différents processus intervenant au cours de cette association, mon travail de thèse a pour but la préparation d'analogues sulfurés de facteurs Nod. L'introduction d'une liaison sulfurée devrait rendre ces messagers chimiques moins sensibles à l'action de certaines enzymes, les *chitinases*. Cela devrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de régulation de la nodulation par les chitinases et, à long terme, de limiter éventuellement l'apport en engrais azotés dont on connaît l'impact néfaste sur l'environnement.

Nous évoquerons, dans une première partie, les différentes synthèses de facteurs Nod et d'analogues décrites dans la littérature. Nous présenterons, dans une seconde partie, nos résultats concernant la synthèse chimique de précurseurs d'analogues de facteurs Nod. Enfin, dans la dernière partie, nous décrirons nos travaux préliminaires dans le domaine de la synthèse enzymatique de ces mêmes précurseurs.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

Nutrition et croissance des végétaux

L'azote est un élément essentiel à la vie puisqu'il constitue un des quatre éléments principaux à la base des molécules organiques présentes dans le monde du vivant. Il entre en effet dans la composition des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines, de la chlorophylle, des alcaloïdes..., molécules indispensables au développement et à la croissance des plantes.

Les plantes ne peuvent assimiler directement qu'une très faible proportion (environ 2%) des réserves en matière azotée des sols. Ces réserves sont libérées lors de processus biologiques ou chimiques soit sous forme d'ions nitrate (NO_3^-), soit sous forme d'ions ammonium (NH_4^+), directement assimilables par la plante. L'homme fait alors appel à d'autres sources d'azote pour accélérer la croissance de la plante : les engrais azotés, coûteux et très souvent polluants (on estime à environ 2% de la consommation annuelle de pétrole l'énergie nécessaire à la production d'ammoniac essentiellement utilisé pour la production d'engrais azotés).

L'Union Nationale des Industries de la Fertilisation et de l'Agriculture¹ (UNIFA) estime que sur 9 Mt par an d'azote assimilé par les sols, l'apport en engrais azotés constitue la deuxième source d'azote avec 2.4 Mt par an (27%), derrière la minéralisation de la matière organique des sols avec 3 Mt par an (33%). Cette utilisation intensive d'engrais, toujours en augmentation, pose d'importants problèmes environnementaux. En France, on estime actuellement que la présence de nitrates dans les eaux continentales provient à 66% de l'agriculture, suite à l'épandage intensif d'engrais azotés ou de lisier. La pollution des eaux par les nitrates présente un double risque. Ingerés en trop grande quantité, les nitrates ont des effets toxiques sur la santé. Ils peuvent, par exemple, être à l'origine de cancers gastro-intestinaux. C'est pour cela que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a imposé un taux maximal de nitrates de 50 mg/L, taux au-dessus duquel les eaux sont considérées comme non potables. En absence de contamination, ce taux est de 0.1 à 1 mg/L. Le deuxième risque de pollution, en association avec les phosphates, est la modification de l'équilibre biologique des milieux aquatiques en provoquant des phénomènes

d'eutrophisation, c'est-à-dire, l'enrichissement en éléments nutritifs des eaux de surface qui aboutit à la disparition de la vie aquatique.

L'essentiel de cette pollution est dû à la différence entre les apports en nitrates et la consommation effective par les plantes. En France, selon un bilan du ministère de l'agriculture, cet excédent est passé de 320 000 t par an en 1995 à 400 000 t par an en 1997. Les régions les plus touchées sont la Bretagne, la Champagne-Ardenne, le Centre, le Poitou-Charente et l'Ile-de-France.

On comprend aisément l'intérêt de trouver des solutions beaucoup moins polluantes et coûteuses.

L'azote atmosphérique (N_2) représente une source naturelle d'azote importante puisqu'elle constitue environ 79% de notre atmosphère. Cependant, les plantes sont incapables de fixer ou de réduire directement l'azote moléculaire. En revanche, certaines bactéries sont capables de transformer l'azote atmosphérique en ion ammonium, faisant entrer ainsi le diazote dans le cycle biologique de l'azote.

On connaît actuellement 90 genres de bactéries diazotrophes (Tableau 1). Une des familles les plus étudiées est la famille Rhizobium (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*) dont les différentes espèces sont capables d'établir un processus de *symbiose* avec certaines plantes légumineuses (Fabacées, Figure 1), permettant aux bactéries de fixer l'azote atmosphérique et de le métaboliser en ion ammonium, directement assimilable par la plante.

Espèce bactérienne		Principaux hôtes
Rhizobium	<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i> (luzerne), <i>Melilotus</i> (mélilot), <i>Trigonelle</i> (trigonelle)
	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> bv. <i>trifoli</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Pisum</i> (pois), <i>Vicia</i> (vesce), <i>Lathyrus</i> (pois de senteur), <i>Lens</i> (lentille) <i>Trifolium</i> (trèfle) <i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot)
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot), <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i>
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot)
	<i>R. loti</i>	<i>Lotus</i> (lotier)
	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Plus de 70 genres de légumineuses tropicales, <i>Parasponia</i> (non légumineuse)
	<i>R. fredii</i>	<i>Glycine</i> (soja), <i>Vigna</i>
	Bradyrhizobium	<i>B. japonicum</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Souche « <i>Parasponia</i> »		<i>Parasponia</i> (non légumineuse)
Azorhizobium		<i>A. caulinodans</i>
		<i>Sesbania</i> (nodosités sur tiges)

Tableau 1 : Quelques exemples de bactéries et de légumineuses associées



Luzerne



Vesce



Trèfle

Figure 1 : Quelques exemples de légumineuses

Une meilleure connaissance du processus de nodulation (messagers biologiques, symbiose plante/bactérie, ...) permettrait une utilisation plus efficace de l'azote de l'air et éviterait l'apport massif d'engrais azotés.

Symbiose azotée

L'établissement de la symbiose plante/bactérie est un phénomène relativement complexe. Schématiquement, quatre étapes la constituent :

- Vivant dans la rhizosphère de leur plante hôte, les bactéries sont d'abord attirées par chimiotactisme vers les poils racinaires de celle-ci². En effet, les plantes exsudent par leurs racines des molécules particulières, les flavonoïdes^{3,4} (Figure 2 et **A** sur Figure 3).

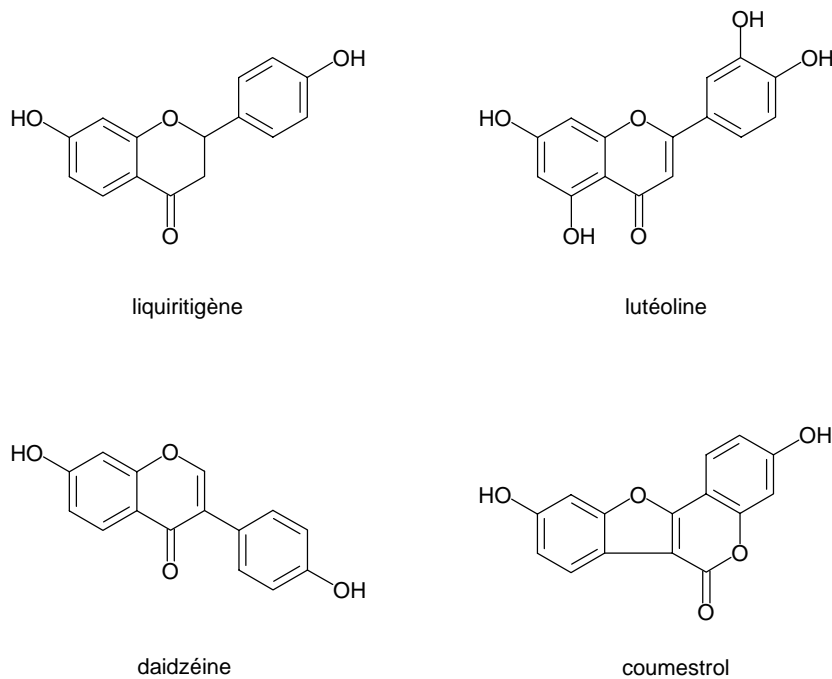


Figure 2 : Exemples de flavonoïdes^{3,4}

- Ces flavonoïdes vont interagir avec une protéine régulatrice propre à la bactérie, la protéine NodD⁵, qui va activer la transcription des gènes *nod* de la bactérie, produisant ainsi les facteurs de nodulation (facteurs Nod), messagers biologiques élémentaires dans ce processus symbiotique. Ces facteurs Nod induisent alors, grâce à des récepteurs spécifiques placés sur les racines⁶, la formation du primordium nodulaire (**B** sur Figure 3).
- Les bactéries, présentes dans la rhizosphère, s'attachent alors à l'extrémité des poils absorbants des racines. Le mécanisme d'accrochage n'est pas totalement connu mais quelques hypothèses ont néanmoins été avancées. La plus probable repose sur la présence à la surface des poils racinaires de lectines^{7,8} (glycoprotéines capables de reconnaître et de se

lier spécifiquement à certains saccharides) interagissant avec les polysaccharides compatibles se trouvant à la surface de la bactérie *Rhizobium*, constituant ainsi un point d'attache. La présence de ces bactéries au contact des racines de la plante provoque la déformation des poils absorbants⁹ qui se recourbent en « crosses de berger » au centre desquelles les bactéries se concentrent¹⁰.

Les bactéries pénètrent alors les poils absorbants par une invagination de la membrane plasmique de la cellule du poil. L'invagination est prolongée par une structure tubulaire : le cordon d'infection^{11,12} (**C** sur Figure 3) qui progresse jusqu'aux cellules du cortex racinaire où il se ramifie. Les bactéries sont ensuite libérées à l'intérieur des cellules corticales².

Après avoir accueilli les bactéries, le primordium nodulaire (initié par la reconnaissance des facteurs Nod par la plante) va se développer pour former un nouvel organe végétal : le *nodule*.

- Les bactéries différenciées en bactéroïdes (**D** sur Figure 3) lors de l'entrée dans le primordium, sont alors capables de réduire l'azote atmosphérique en ion ammonium grâce à l'action des nitrogénases produites par ces bactéroïdes. L'ion ammonium ainsi produit est ensuite assimilé en glutamine et en glutamate par l'action de deux enzymes : la glutamine et la glutamate synthases¹³. Après transamination, la synthèse d'asparagine, forme principale de transfert de l'azote réduit chez les légumineuses, se produit.

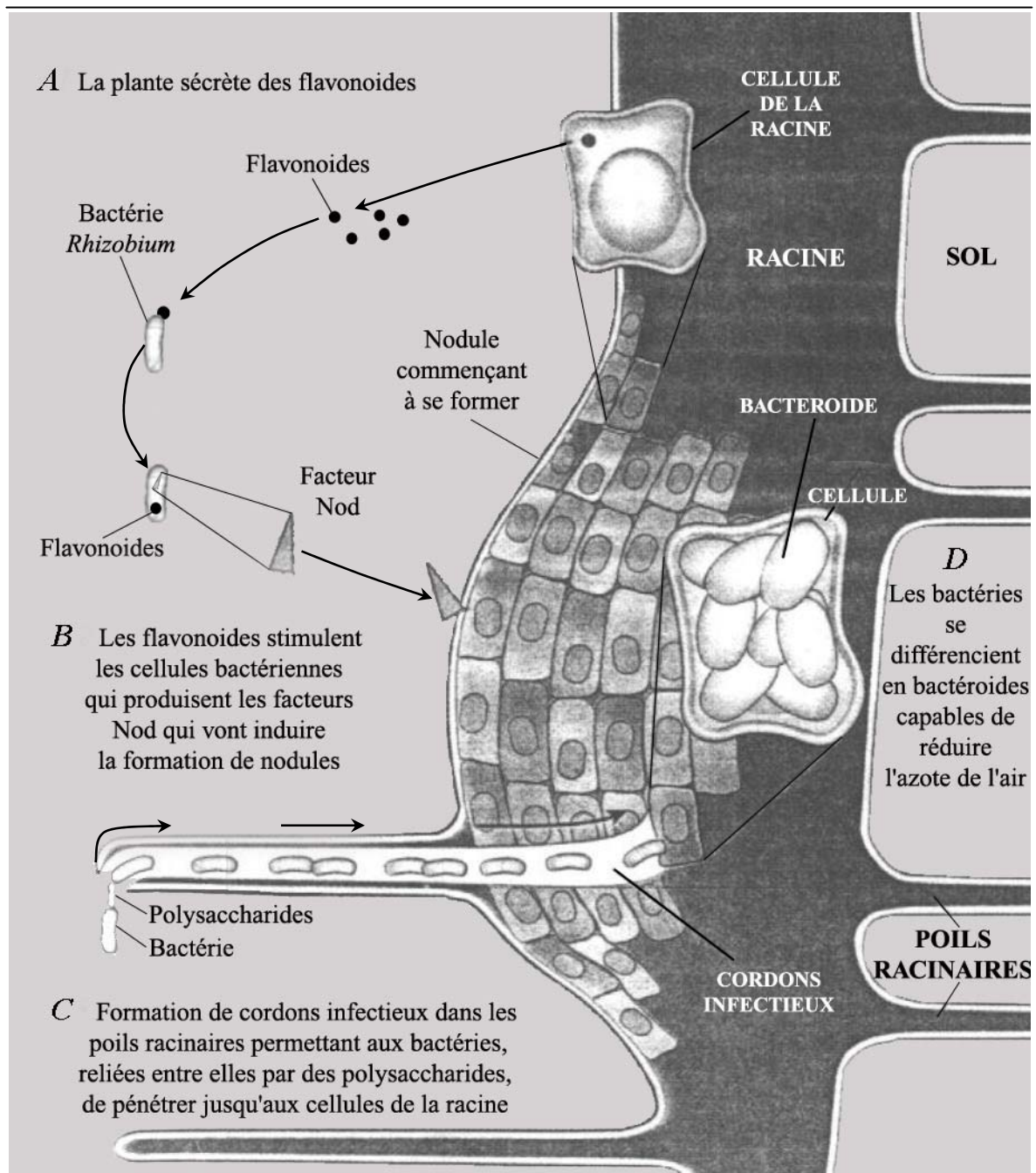


Figure 3 : Schéma du processus de symbiose azotée reproduit à partir de R. Losyck et D. Kaiser¹⁴.

Lors de l'interaction plante/bactérie, l'infection bactérienne est totalement profitable à la plante, par l'apport azoté que lui fournit la bactérie. Mais elle est également bénéfique pour cette dernière sous sa forme de bactéroïde, car elle reçoit de la plante les unités

saccharidiques nécessaires pour produire l'énergie indispensable à la fixation de l'azote et par conséquent pour se développer. De plus, le nodule forme une niche biologique unique assurant à la bactérie une protection contre l'oxygène et évitant une quelconque compétition, rencontrée dans le milieu naturel, avec d'autres espèces bactériennes. Lors de cette symbiose plusieurs messagers biologiques, comme les flavonoïdes et les facteurs de nodulation, jouent un rôle important dans l'association spécifique plante/bactérie.

Depuis plusieurs années, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées aux facteurs Nod, à leur structure ainsi qu'à leur activité spécifique lors de la symbiose plante/bactérie.

Structure des facteurs Nod

La structure des facteurs de nodulation a été établie pour la première fois par Lerouge et coll.¹⁵ en 1990 chez *Rhizobium meliloti*. Par la suite, la structure d'autres facteurs Nod a été élucidée chez *Rhizobium* (Tableau 2). Ce sont des lipochitooligosaccharides (LCOs) constitués d'un squelette de chitine, c'est-à-dire d'unités de *N*-acétyl-*D*-glucosamine reliées entre elles par des liaisons β -1,4 (Figure 4). Ces oligomères possèdent tous une chaîne grasse polyinsaturée sur l'atome d'azote de l'unité non réductrice. Selon les espèces bactériennes, les substituants portés par l'atome d'oxygène en position 6 de l'unité réductrice peuvent être soit un groupe sulfate soit un groupe Me-fucosyle. On peut également rencontrer sur l'unité non réductrice, un groupe acétate en position 6 et un groupe méthyle sur l'atome d'azote. Le nombre d'unités de *N*-acétyl-*D*-glucosamine constituant le facteur Nod est généralement compris entre 3 et 5 (Tableau 2).

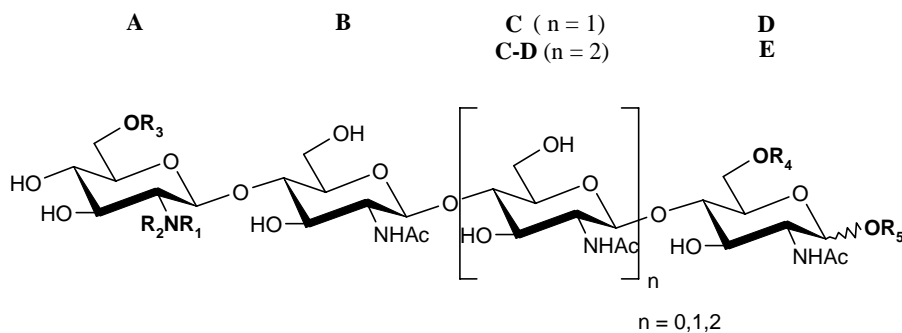


Figure 4 : Structure générale des facteurs de nodulation

La nomenclature utilisée pour nommer les facteurs de nodulation est la suivante. Le préfixe Nod est suivi du nom abrégé de l'espèce bactérienne (par exemple Rm pour *Rhizobium meliloti*) et d'un chiffre romain désignant le nombre d'unités de *N*-acétyl-*D*-glucosamine. Entre parenthèses sont précisées la nature de la chaîne grasse située à l'extrémité non réductrice et les substitutions (Ac pour *O*-acétyl, S pour groupement sulfate, etc.). A titre d'exemple, le facteur Nod NodRmIV (C16:2,S), le plus abondant chez *R. meliloti*, est un oligomère de 4 unités possédant un acide gras de 16 atomes de carbone, une insaturation en position 2 et un groupement sulfate sur l'unité réductrice.

Souche	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	n
<i>R. meliloti</i>	H	C16:2, C16:3, C18, C26(ω- 1)OH	Ac (<i>O</i> -6)	S	H	0, 1, 2
<i>R. l. bv. viciae</i>	H	C18:1, C18:4	Ac (<i>O</i> -6)	H	H	1, 2
<i>R. tropici</i>	Me	C18:1	H	S, H	H	2
<i>R. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFuc, Fuc	H	0, 1, 2
<i>R. NGR234</i>	Me	C18:1	Cb	MeFuc	H	2
<i>B. japonicum</i>	H	C18:1	H	MeFuc	H	2
<i>A. caulinodans</i>	Me	C18:1	Cb (<i>O</i> -6)	Fuc	Ara	1, 2

Tableau 2 : Exemples de substitutions rencontrées chez les facteurs Nod (d'après Dénarié *et al.*¹⁶)

Biosynthèse des facteurs Nod

La biosynthèse des facteurs Nod est assurée essentiellement par les gènes bactériens de nodulation *nod*. Les fonctions de ces gènes ont été déterminées à la fois par l'analyse génétique de mutants de différentes souches de *Rhizobium* et par des études d'activités enzymatiques *in vitro*.

La synthèse du squelette des facteurs Nod est déterminée par les gènes communs *nodABC*¹⁶ (gènes que l'on retrouve chez tous les *Rhizobium*). La protéine NodC est une *N*-

acétylglucosaminyltransférase (ou oligochitine synthase) qui est responsable de la synthèse du squelette d'oligochitine des facteurs Nod. La protéine NodB est responsable de la *N*-désacétylation de l'unité non réductrice¹⁷ alors que NodA est une *N*-acyltransférase qui permet l'introduction de la chaîne grasse sur l'atome d'azote de l'unité non réductrice¹⁸.

Les différentes substitutions propres à certaines souches de *Rhizobium* sont dues, quant à elles, à des gènes dits hôtes-spécifiques.

Par exemple, le gène *nodH*¹⁹, présent chez *R. meliloti*, code pour une sulfotransférase qui va permettre l'introduction d'un groupement sulfate sur l'unité réductrice. La protéine NodL permet chez *R. meliloti* l'acétylation sur l'unité non réductrice. Chez *Bradyrhizobium* le gène *nodZ* code pour une fucosyltransférase qui ajoute un groupement fucosyle sur l'unité réductrice.

Il existe un dernier type de gène : les gènes régulateurs, comme par exemple le gène *nodD* qui code pour la protéine NodD, celle-ci s'associant avec les flavonoïdes excrétés par la plante et activant la transcription des gènes *nod*.

Cette protéine NodD, ainsi que d'autres facteurs comme les différentes substitutions des facteurs Nod et les récepteurs membranaires de ces derniers, constituent la spécificité de l'association plante/bactérie.

Spécificité plante/bactérie

Le phénomène de symbiose comporte différents niveaux de spécificité. Les deux premiers niveaux concernent la bactérie, le troisième concerne la plante. Le premier niveau de spécificité est constitué par l'association flavonoïdes/protéine NodD. En effet, les protéines NodD de différentes espèces de *Rhizobium* sont capables de reconnaître des flavonoïdes différents. Ainsi, la naringénine induit l'expression des gènes *nod* chez *R. leguminosarum* et la daïdzéine chez *R. japonicum*. Toutefois, cette spécificité n'est pas totale car une protéine NodD est capable de reconnaître plusieurs flavonoïdes différents et une espèce de légumineuse produit généralement un mélange de flavonoïdes. L'intervention d'autres facteurs est donc nécessaire pour expliquer cette spécificité.

Le deuxième niveau de spécificité est expliqué par la différence de substitution des facteurs Nod. En effet, les facteurs Nod produits par *R. meliloti* sont actifs sur les racines

de la luzerne mais pas sur celles de la vesce²⁰ (hôte de *R. leguminosarum* bv. *Viciae*). La différence entre ces facteurs Nod est basée sur la présence ou l'absence d'un groupement sulfate en position 6 de l'unité réductrice. En 1991, Roche *et al.*¹⁹ ont démontré l'importance du groupement sulfate chez *R. meliloti* pour induire la nodulation. Par la suite, grâce à des mutants *nod*, il a été démontré l'importance des substitutions pour la spécificité des bactéries vis-à-vis de leur plante-hôte.

Le troisième niveau de spécificité est basé sur la reconnaissance des facteurs Nod par des récepteurs spécifiques situés sur les racines⁶ de la plante. Cette reconnaissance serait possible grâce à des lectines de surface²¹, propres à chaque légumineuse et capables de s'associer à un polysaccharide. Cependant, peu de données sont disponibles actuellement sur ce sujet. La spécificité, ici, ne dépendrait donc plus seulement de la structure des facteurs Nod (et donc de la bactérie) mais aussi des récepteurs végétaux. En d'autres termes, la spécificité serait également contrôlée par la plante.

Le phénomène de reconnaissance sur lequel est basé la symbiose azotée, est donc très complexe. La connaissance des différents mécanismes biologiques impliqués dans cette association symbiotique, nécessite, par conséquent, de nombreuses études.

Régulation de la nodulation

Les facteurs Nod, indispensables à la symbiose plante/bactérie, agissent à de faibles concentrations (entre 10^{-11} et 10^{-9} M). La quantité de facteurs Nod produits par la bactérie, est en fait régulée par les deux partenaires de la symbiose.

La production de facteurs Nod est régulée chez la plupart des bactéries par des protéines régulatrices, notamment NodD. Celle-ci se lie au niveau des opérons, en aval des gènes *nod*, à des séquences dénommées « *nod-Box* », activant ainsi la transcription des gènes *nod* responsables de la synthèse des facteurs Nod. Il existe également des flavonoïdes qui, en interagissant avec la protéine NodD, répriment l'expression de gènes *nod* et par conséquent, diminuent la production de facteurs Nod. Chez *R. meliloti*^{22,23}, on retrouve également une protéine, NoIR, capable de se fixer en aval de la « *nod-Box* » et de limiter ainsi la fixation de l'ARN polymérase ainsi que celle de NodD par encombrement. La

protéine NolR inhibe ainsi la transcription des gènes *nod*²³ et participe à la régulation de la production de facteurs de nodulation.

Quant à la plante, elle peut contrôler indirectement la production des facteurs Nod par l'intermédiaire de ses flavonoïdes. Par exemple, en cas de carence azotée, la plante produit plus de flavonoïdes, favorisant ainsi le chimiotactisme et la nodulation²⁴. De plus, certains flavonoïdes activent la synthèse de facteurs Nod alors que d'autres la répriment²⁵.

Un autre mode de régulation de la nodulation par la plante est l'action des chitinases. Les chitinases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons β -1,4 des chitooligosaccharides possédant au moins trois unités. De manière générale, les chitinases ont un rôle important pour la plante. En effet, elles sont utiles dans la défense contre des pathogènes tels que les champignons dont la paroi cellulaire est composée de chitine²⁶. Mais elles sont également impliquées dans la régulation de la production de facteurs Nod. En effet, la structure chitinique des facteurs de nodulation en font des substrats pour ces enzymes. Par exemple, dans l'association *R. meliloti/Medicago* les chitinases sont associées à l'avortement des cordons d'infection²⁷ et par conséquent à la limitation du phénomène de nodulation.

Cependant, l'activité de dégradation racinaire des facteurs Nod dans le cas de l'association *R. meliloti/Medicago sativa*, présente un profil particulier qui ne ressemble pas à celui des chitinases connues. Contrairement aux chitinases classiques, cette enzyme dégrade tous les facteurs Nod de *R. meliloti* (et même les facteurs Nod possédant un groupement sulfate) en clivant toujours la même liaison et en formant des dimères acylés²⁸. Cette activité particulière est désignée par le sigle DFE (Dimer Forming Enzyme). Balland-Vanney²⁹ explique que cette enzyme particulière, qui est en fait une *Nod Factor Hydrolase* (NDFH), est spécifique des plantes hôtes de *R. meliloti* et que l'on ne retrouve pas cette activité chez les autres Fabacées.

De nombreuses équipes se sont alors intéressées à la préparation de facteurs Nod et d'analogues afin d'étudier les relations structure/activité de ces oligosaccharides et de comprendre les différents mécanismes chimiques ou biologiques impliqués dans cette association symbiotique.

tel-00662408, version 1 - 24 Jan 2012

PARTIE 2 : SYNTHÈSES DE FACTEURS NOD ET D'ANALOGUES

Chapitre 1. Synthèses de facteurs Nod

Dans les années 90, l'intérêt croissant pour la symbiose azotée et ses possibles applications ont poussé plusieurs équipes de recherche à préparer des facteurs Nod afin d'étudier ce phénomène.

Deux méthodes d'obtention des facteurs Nod ont été utilisées : soit l'isolement du milieu naturel, soit la synthèse chimique ou biochimique.

Isolement du milieu naturel

Dans le but de caractériser les messagers biologiques intervenant dans la symbiose plante/bactérie, différentes équipes^{15,30,31} ont extrait des facteurs Nod à partir de cultures de bactéries génétiquement modifiées pour surexprimer les gènes *nod* responsables de la production des facteurs Nod^{16,32}. Par exemple, Lerouge *et coll.*¹⁵ ont été les premiers, en 1990, à identifier un facteur Nod grâce à l'utilisation de mutants tels que la souche EJ355 de *Rhizobium meliloti*.

Il existe deux types d'extraction pour isoler les facteurs Nod naturels :

- Extraction liquide/liquide^{15,16,31} : le filtrat de culture est extrait par un solvant organique puis purifié par chromatographie sur résine échangeuse d'ions et HPLC sur phase inverse. A titre d'exemple, les facteurs Nod isolés de la souche HH103 de *Rhizobium Fredii*³¹ sont obtenus après extraction du milieu de culture au n-butanol, suivie de purifications par HPLC sur phase C₁₈.
- Extraction liquide/solide : l'extraction du filtrat de culture est réalisée par passage direct sur colonne, comme par exemple pour les facteurs de nodulation de *Rhizobium* sp. NGR234³³ où le milieu de culture est extrait directement par un passage sur une colonne phase inverse C₁₈.

Synthèses chimiques

Toutes les synthèses de facteurs Nod décrites dans la littérature sont des synthèses multistades, longues et se traduisant par des rendements relativement faibles.

Généralement, ces synthèses reposent sur la fonctionnalisation de l'oligosaccharide chitinique préalablement préparé. Les fonctionnalisations concernent principalement la position 6 de l'unité réductrice (SO₃H, MeFuc) ainsi que la fonction amine de l'unité non réductrice par introduction d'une chaîne grasse.

Synthèse de Nicolaou

En 1992, Nicolaou *et coll.*³⁴ ont décrit la première synthèse de facteurs Nod sulfatés, actifs sur la luzerne (**10** et **11**) ainsi que leurs homologues non sulfatés actifs sur la vesce (**8** et **9**) (Schéma 1). Ce schéma décrit la construction du squelette de chitine par des réactions de glycosylations successives. Les donneurs de glycosyles utilisés sont des monomères possédant en position anomérique β un atome de fluor. La préparation du tétrasaccharide **7** a été réalisée par glycosylation du fluorure **1** et de l'accepteur **2** pour donner, dans un premier temps, le disaccharide **3**. Celui-ci génère le trisaccharide **4** par glycosylation avec le même donneur de glycosyle **1**. Des réactions de déprotection puis de protection des différentes fonctions amines, suivies d'une troisième glycosylation avec le donneur **5**, fournissent le tétrasaccharide **6**. Les étapes suivantes sont l'acylation de l'unité non réductrice pour donner le tétrasaccharide commun **7**, précurseur de NodRmIV (S) **11**, de NodRmIV (Ac, S) **10** et de leurs homologues non sulfatés **8** et **9**, selon deux voies distinctes.

Tous ces lipochitoooligosaccharides sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 1% à partir du composé **2**.

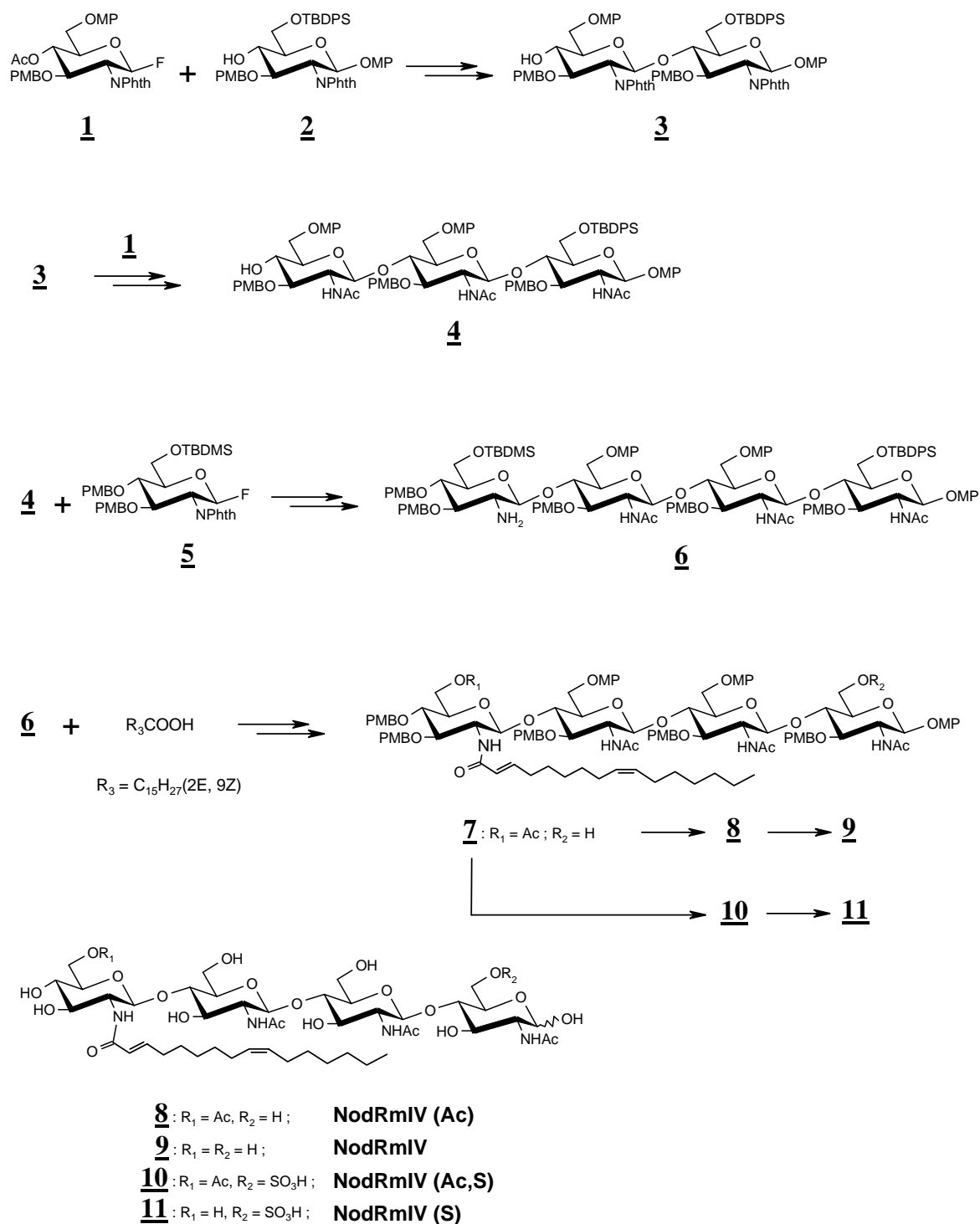
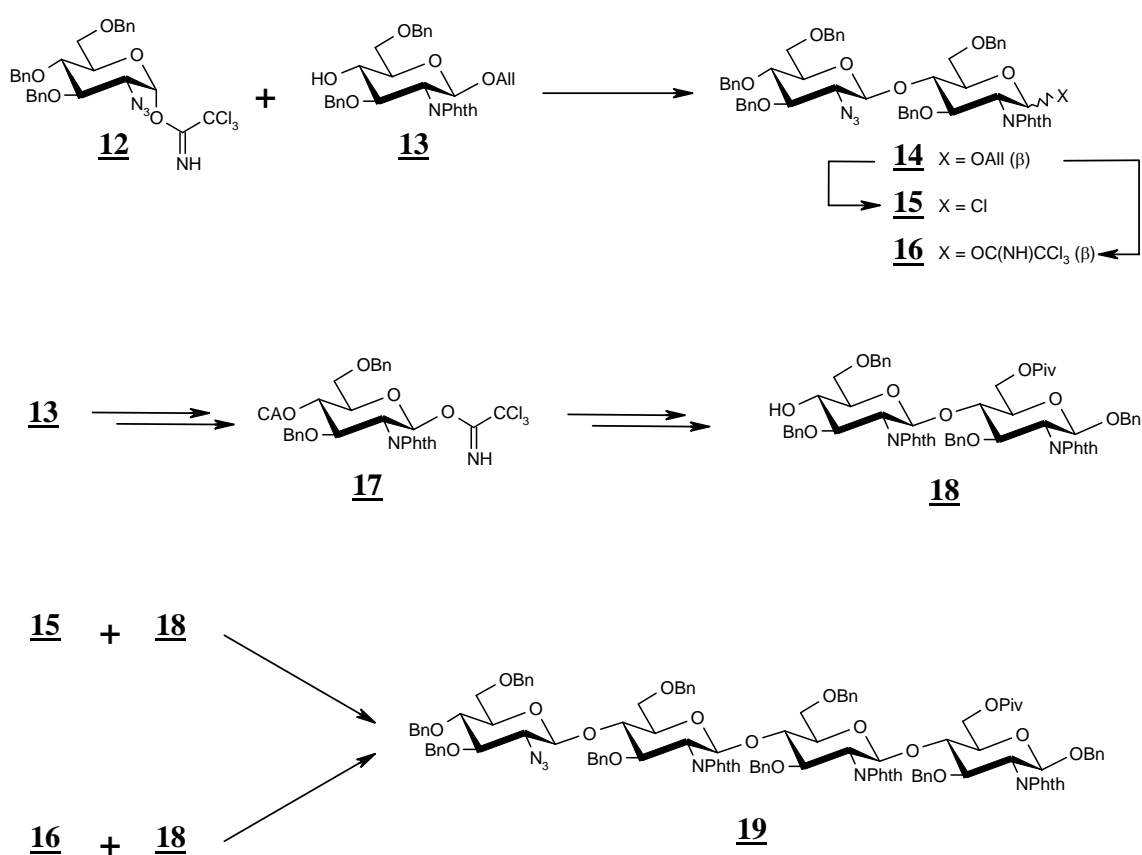


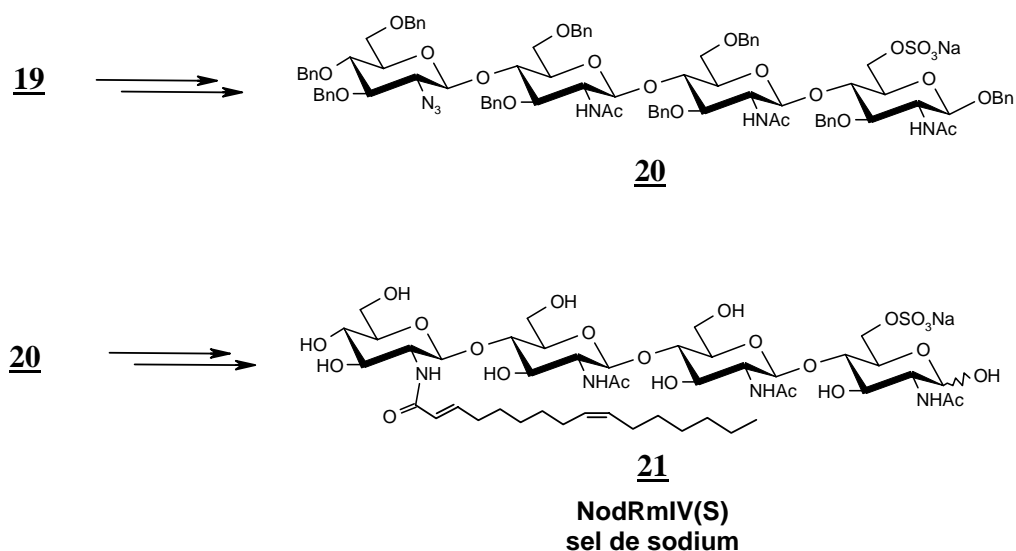
Schéma 1 : Synthèse de Nicolaou *et coll.*³⁴

Synthèse de Hui

La stratégie de Hui *et coll.*³⁵ a consisté à construire le tétrasaccharide chitinique par couplage de deux unités. Deux donneurs de glycosyle ont été utilisés : le chlorure **15** et le β -trichloroacétimidate **16** obtenus à partir des composés **12** et **13** (Schéma 2). La glycosylation de l'accepteur **18**, préparé à partir du monosaccharide **17**, avec les donneurs **15** ou **16** fournit le tétrasaccharide **19**, les meilleurs résultats étant obtenus avec l'imidate **16** (72% de rendement).

Schéma 2 : Synthèse de Hui *et coll.*³⁵

Le facteur Nod **21**, NodRmIV(S), est alors obtenu après sulfatation et acylation, sous la forme de sel de sodium avec un rendement global de 6% à partir de **13** (Schéma 3).

Schéma 3 : Synthèse de Hui *et coll.*³⁵

Synthèse de Beau

Beau *et coll.*³⁶ ont préparé en 1994 le NodRmIV (S) ainsi que des analogues possédant différentes chaînes lipidiques. Leur stratégie est basée sur la construction du squelette saccharidique à partir du 1,6-anhydro-2-azido-2-désoxy- β -D-glucopyranose **22**^{37,38} (Schéma 4). En effet, ce synthon a permis la préparation de l'accepteur **23** et du trichloroacétimate **24** qui conduisent après glycosylation au disaccharide **25**. Ce dernier fournit le tétrasaccharide **27** après deux glycosylations successives du même accepteur **23**.

L'utilisation du groupement carbamate de benzyle du coté non réducteur et du pont 1,6-*anhydro* du coté réducteur a permis de différencier les deux positions clefs, fournissant ainsi après sulfatation et acylation et avec un rendement global d'environ 5% à partir du composé **22**, le NodRmIV (S) **28** ainsi que les analogues de facteurs Nod **29** et **30**.

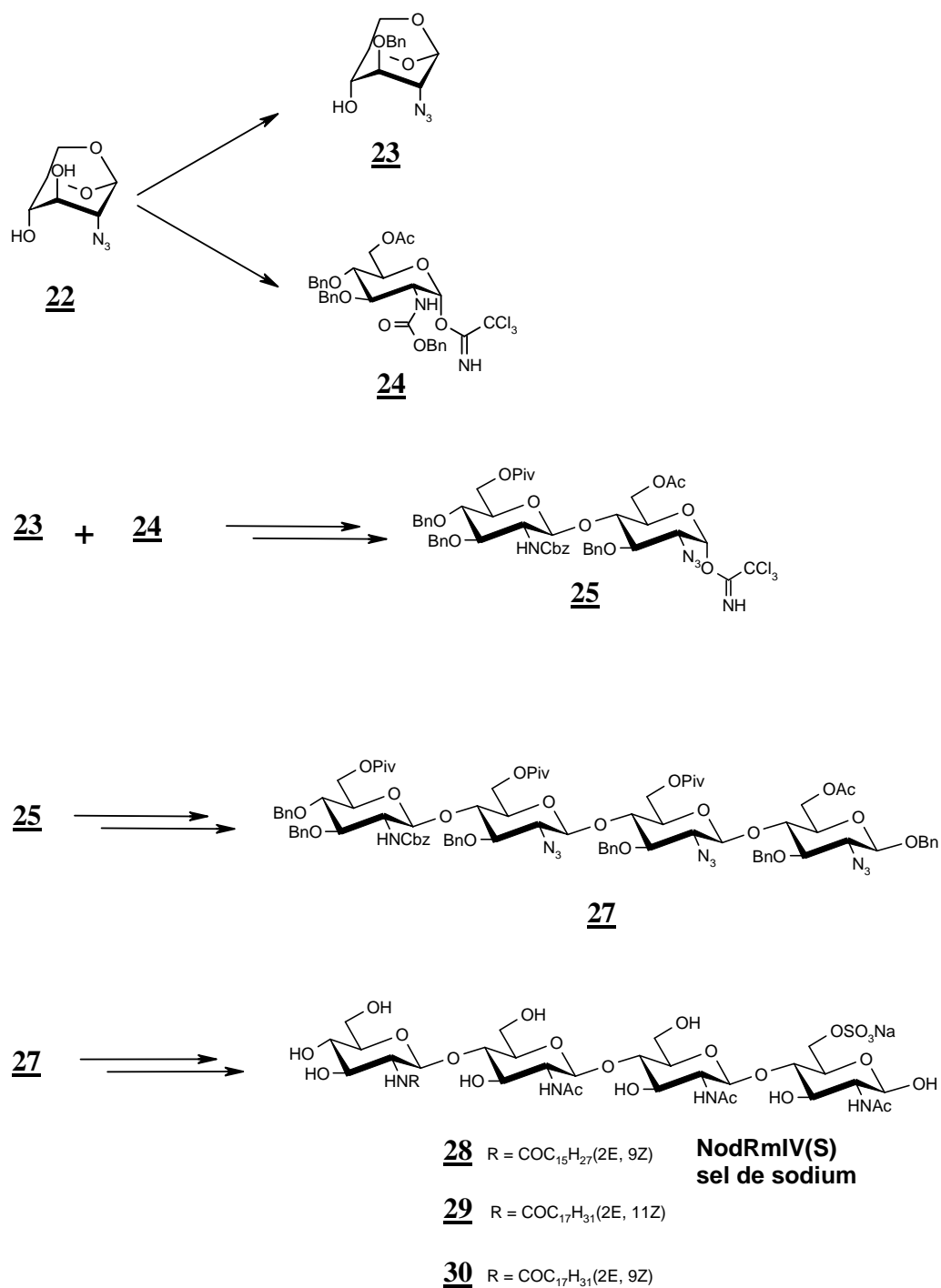


Schéma 4 : Synthèse de Beau *et coll.*³⁶

Synthèse d'Ogawa

Ogawa *et coll.*³⁹ ont décrit en 1994 la préparation de NodRmIV (S) et d'analogues possédant diverses chaînes grasses. Leur synthèse est basée sur la formation du

trisaccharide **33**, obtenu par glycosylation du trichloroacétimidate **31** et de l'accepteur **32** (Schéma 5). Le tétrasaccharide **35** est préparé, quant à lui, par couplage entre le trisaccharide **33** et le fluorure **34**.

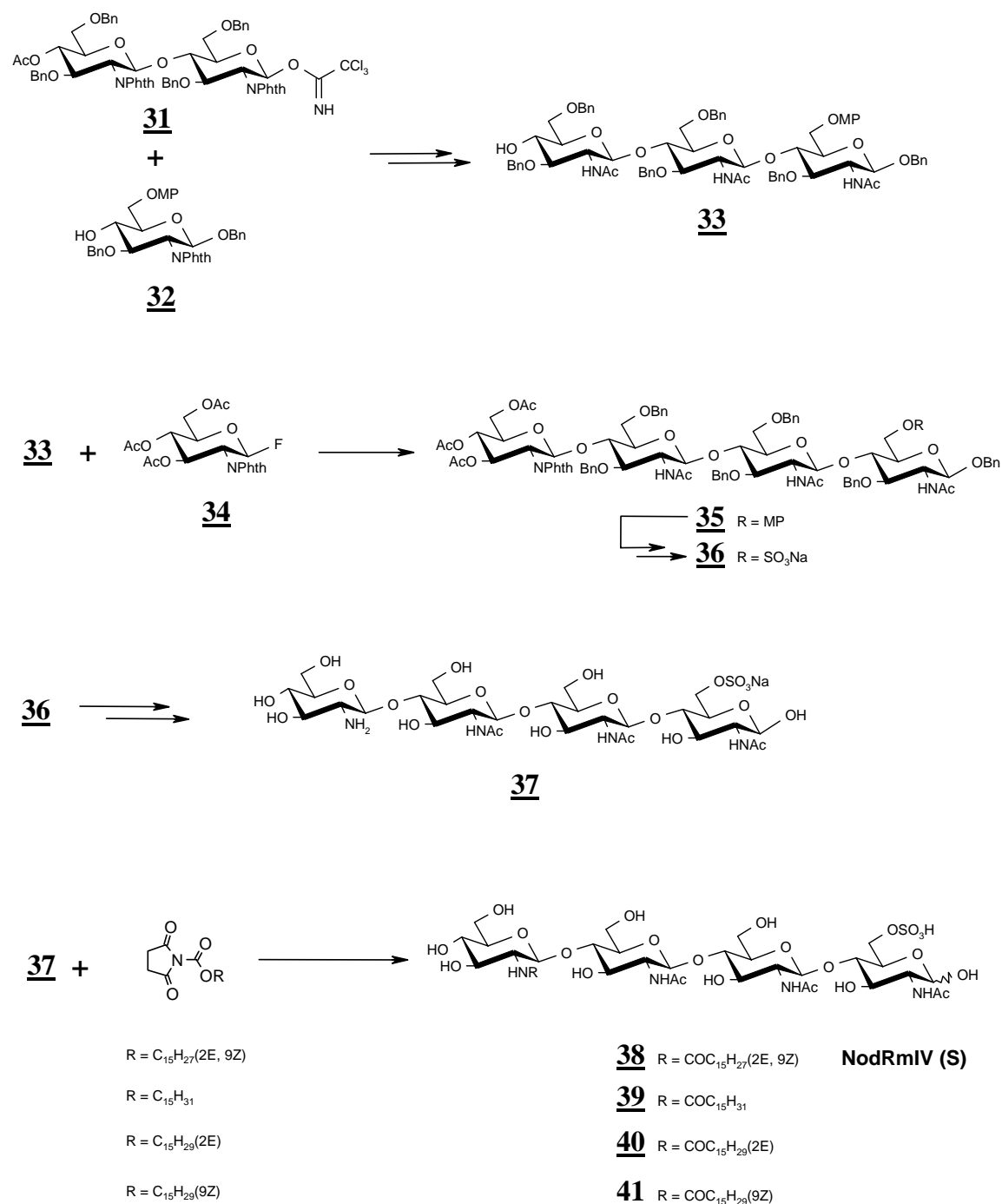


Schéma 5 : Synthèse d'Ogawa *et coll.*³⁹

La déprotection sélective du groupe hydroxyle en position 6 de l'unité réductrice du tétrasaccharide **35** protégé sous forme de 4-méthoxyphényle (MP), suivie d'une sulfatation, d'une hydrazinolyse du phtalimide ainsi que d'une désacétylation conduit au

tétrasaccharide **37**. Une réaction d'acylation permet d'obtenir NodRmIV (S) **38** et les analogues **39**, **40** et **41** possédant diverses chaînes grasses.

Une année plus tard, en 1995, la même stratégie a été utilisée par la même équipe⁴⁰ pour préparer quatre isomères de NodBjIV (C18:1, Fuc, Gro), possédant un groupement fucosyle en position 6 du côté réducteur et un groupement glycéryle en position anomérique (Schéma 6).

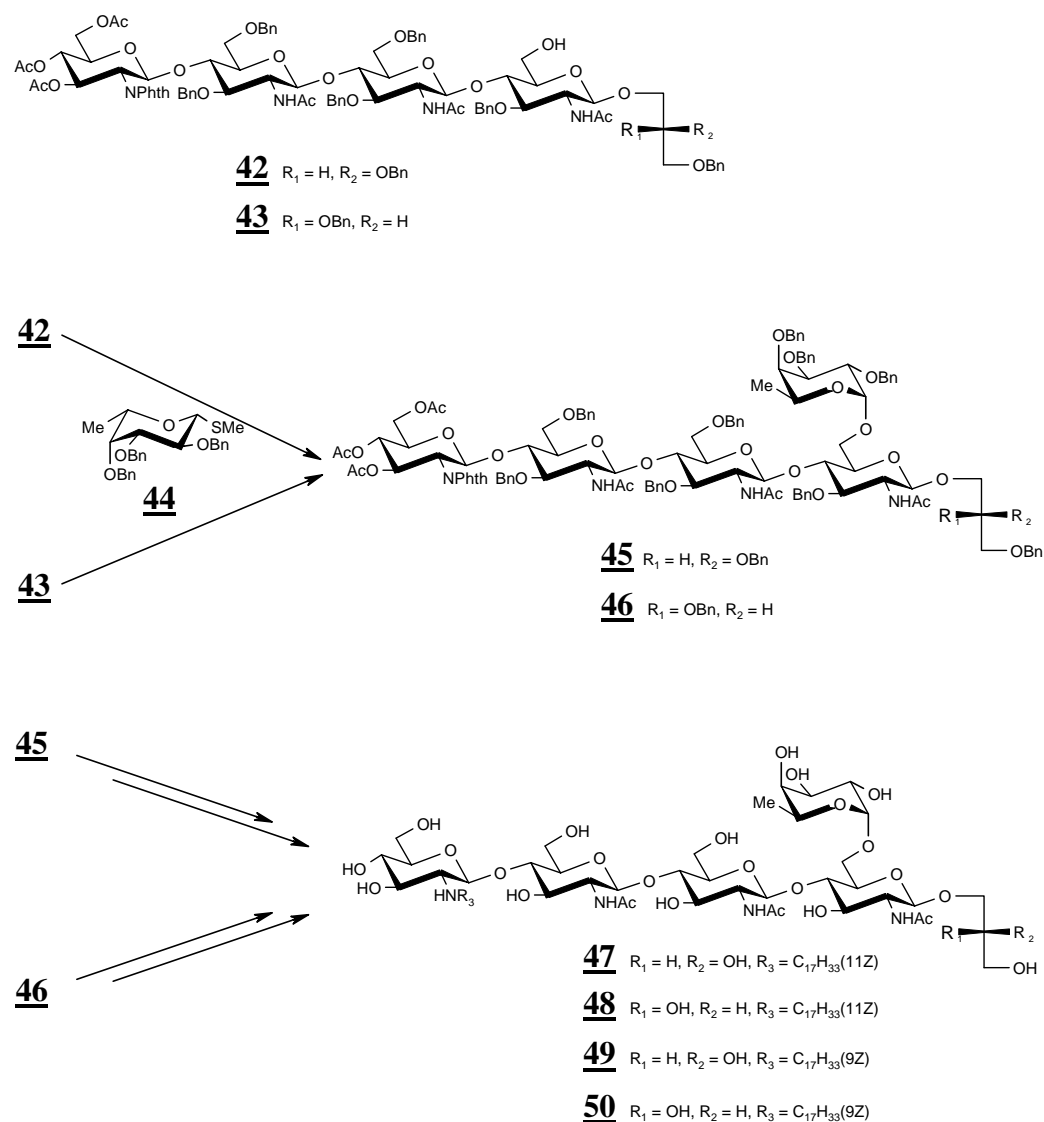
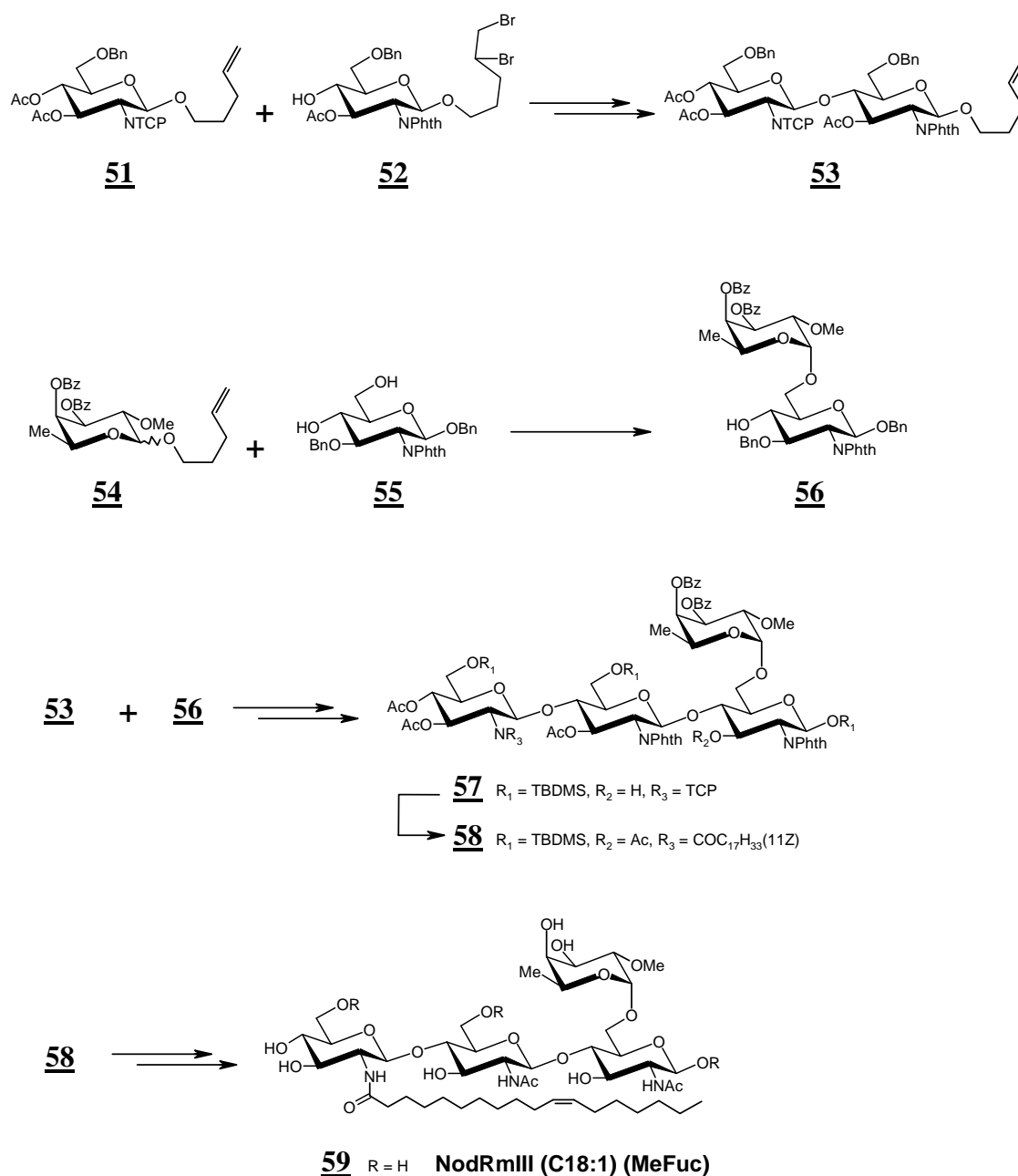


Schéma 6 : Synthèse d'Ogawa *et coll.*⁴⁰

Synthèse de Fraser-Reid

La stratégie élaborée par Fraser-Reid *et coll.*⁴¹ pour accéder au NodRfIII (C18:1, MeFuc) **59** repose sur la glycosylation des deux disaccharides **53** et **56** grâce à l'utilisation du groupement *n*-pentényle anomérique. Cette méthode a permis d'obtenir le tétrasaccharide **57**, qui après déprotection sélective de la fonction amine de l'unité non réductrice et acylation, fournit NodRfIII (C18:1, MeFuc) **59** avec 5% de rendement à partir du monosaccharide **51** (Schéma 7).

Schéma 7 : Synthèse de Fraser-Reid *et coll.*⁴¹

Conclusion

Toutes les synthèses citées font appel à un nombre d'étapes relativement important et les rendements en LCOs obtenus sont relativement faibles.

Des tests biologiques⁴² réalisés sur les facteurs Nod préparés par les équipes de Nicolaou *et coll.*³⁴ et de Beau *et coll.*^{36,38} montrent que leur activité est comparable à celle des facteurs Nod naturels. Ces études montrent également l'importance de la présence du groupement sulfate sur l'unité réductrice ainsi que l'importance de la présence et de la nature de la chaîne lipidique sur l'extrémité non réductrice.

Nous retiendrons que ces synthèses de LCOs se font en deux temps :

- construction du squelette tétrasaccharidique de chitine, soit par adjonctions successives de monosaccharides (et Ogawa *et coll.*^{39,40}), soit par couplage de deux disaccharides (Hui *et coll.*³⁵ et Fraser-Reid *et coll.*⁴¹) ;
- fonctionnalisation du squelette préparé du côté réducteur et non réducteur.

Afin d'étudier les mécanismes mis en jeu lors de l'association symbiotique plante/bactérie, plusieurs équipes ont réalisé la synthèse d'analogues de facteurs Nod en utilisant des stratégies similaires.

Synthèses d'analogues de facteurs Nod

A notre connaissance, le nombre de synthèses d'analogues de facteurs de nodulation décrites dans la littérature est relativement faible. L'objectif commun des synthèses décrites est une meilleure compréhension des mécanismes soit de reconnaissance moléculaire des facteurs Nod par la plante, soit de dégradation des facteurs de nodulation par les chitinases.

Deux grands types d'analogues ont été préparés : des analogues polysulfurés ainsi que des analogues pour lesquels une ou deux unités *N*-acétyl-*D*-glucosaminyle ont été remplacées par une ou deux unités *D*-glucosyle.

Synthèse de Lee

En 1996, Lee *et coll.*⁴³ ont préparé des analogues polysulfurés de facteurs Nod afin d'étudier l'action des chitinases et d'autres enzymes dans le processus de nodulation.

Ils ont préparé un tétrasaccharide pour lequel les trois atomes d'oxygène interglycosidiques sont remplacés par des atomes de soufre. Il est en effet connu⁴⁴ qu'une liaison thioglycosidique est généralement plus résistante aux glycosidases que la liaison *O*-glycosidique. Bien que les atomes d'oxygène et de soufre présentent une certaine similitude, ce dernier est néanmoins moins électro-négatif que celui d'oxygène et présente moins d'affinité pour les protons que l'atome d'oxygène. Il aura donc tendance à former moins facilement l'acide conjugué requis pour l'état de transition de l'hydrolyse enzymatique, ce qui se traduit par une meilleure résistance à l'hydrolyse par les glycosidases.

Pour introduire l'atome de soufre, l'équipe de Lee a déplacé un triflate en position 4 (Schéma 8, composé **60**) par un thiolate anomérique **61**, généré *in situ*. Le mécanisme de type S_N2 de cette substitution permet la formation d'une liaison thioglycosidique β-1,4.

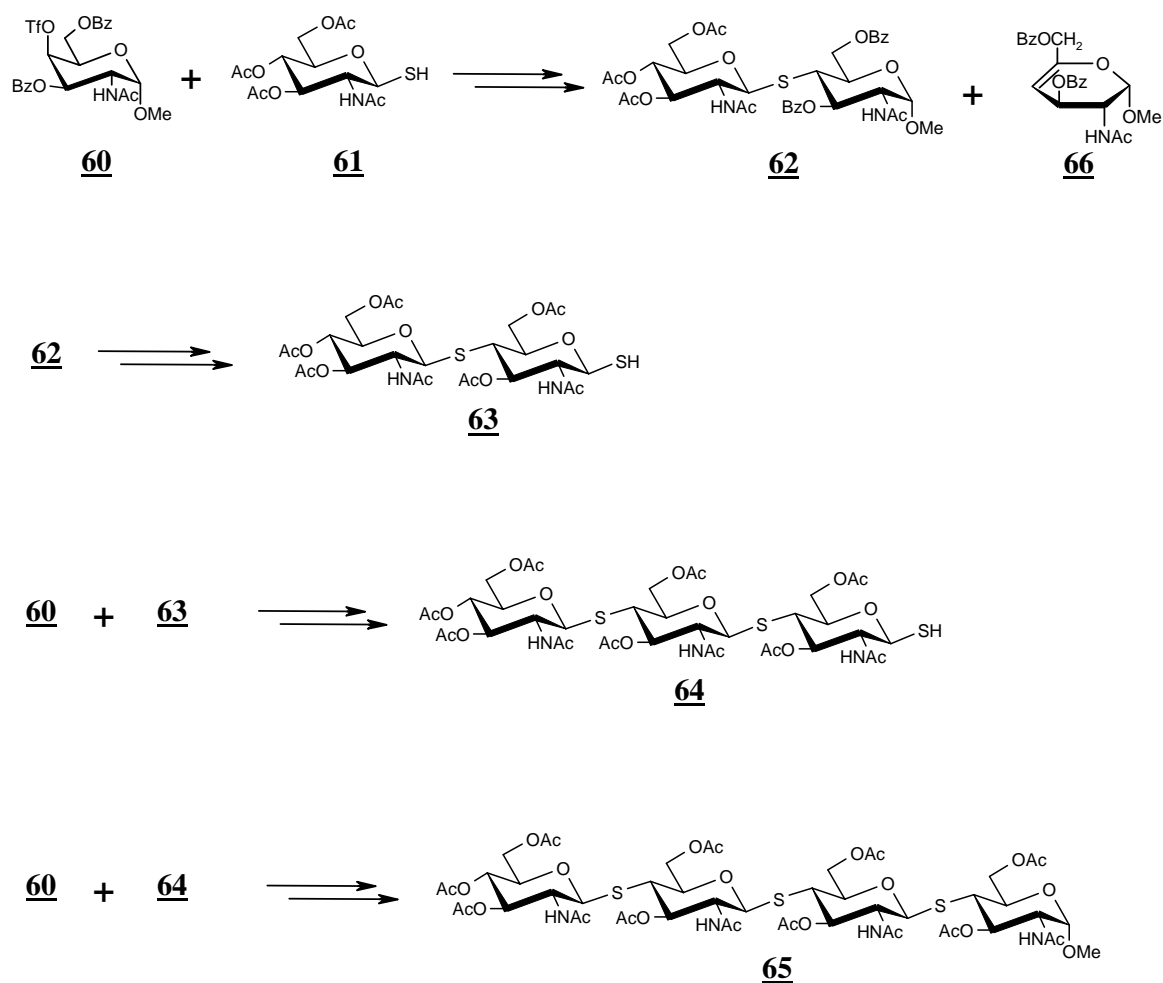


Schéma 8 : Synthèse de Lee *et coll.*⁴²

Le couplage du triflate **60** et du 1-thiol **61** conduit à la formation du thiodisaccharide **62** avec 63% de rendement et celle d'un produit secondaire **66**, issu d'une réaction d'élimination d'acide triflique.

Le thiotétrасaccharide **65** a ainsi été préparé par trois substitutions nucléophiles successives à partir des deux précurseurs **60** et **61** avec un rendement global de 2% à partir du composé **60**.

A notre connaissance, aucun résultat de tests biologiques n'a été décrit.

Synthèse de Robina

Robina *et coll.*^{45,46} se sont intéressés à la préparation d'analogues pour lesquels une ou deux unités de *N*-acétyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) ont été remplacées par une ou deux unités de *D*-glucose (Glc) pour des études conformationnelles et des tests biologiques, destinés à la compréhension du rôle des groupements acétamide dans le processus de nodulation et/ou dans l'action dégradante des chitinases.

Le Schéma 9 reproduit la synthèse de l'analogue **71** comportant deux unités Glc. Ces dernières sont introduites par glycosidation du thioglycoside **66** avec un dérivé de la *N*-acétyl-*D*-glucosamine **67**. Le trisaccharide issu de cette réaction est à son tour couplé au trichloroacétimidate **69** pour conduire au tétrasaccharide **70** qui, après déprotection, fournit le composé **71**.

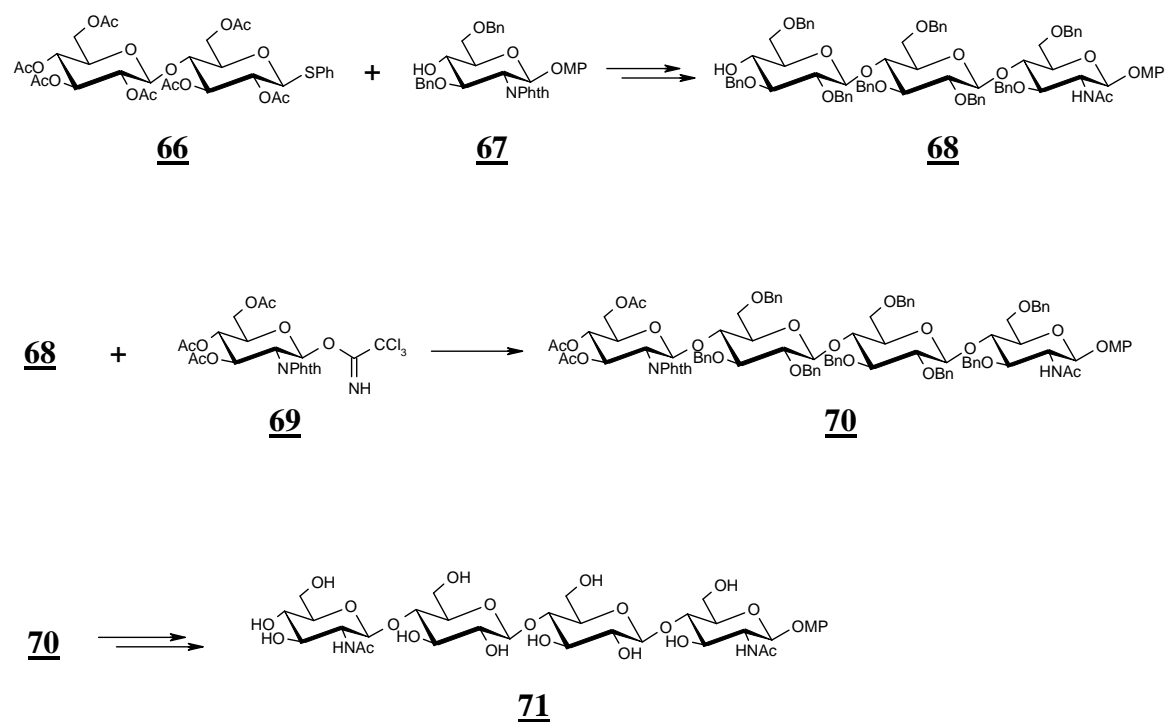


Schéma 9 : Synthèse de Robina *et coll.*^{45,46}

Une approche similaire a été utilisée pour préparer le tétrasaccharide **72**, obtenu à partir des deux donneurs **73** et **74** et de l'accepteur **75**, où une seule unité GlcNAc a été remplacée par une unité Glc (Schéma 10).

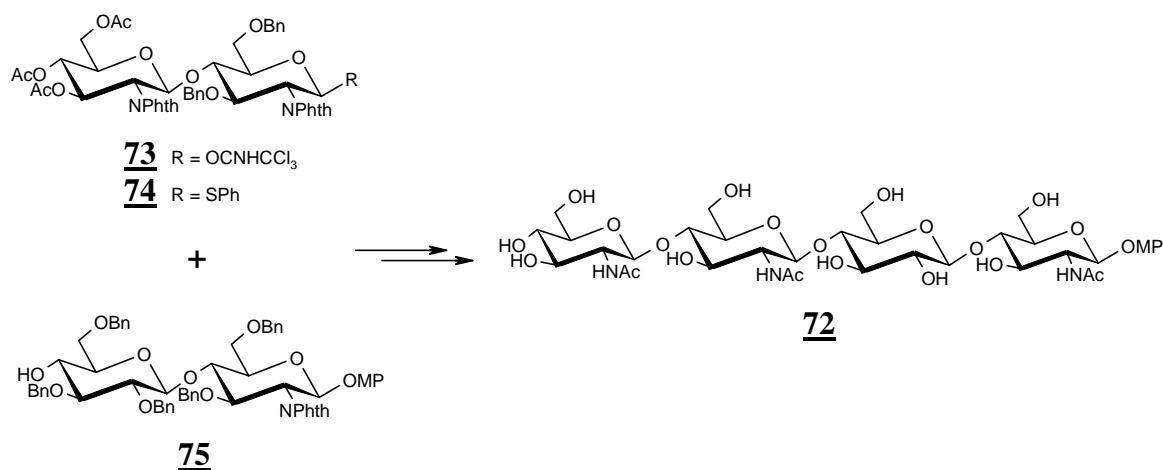
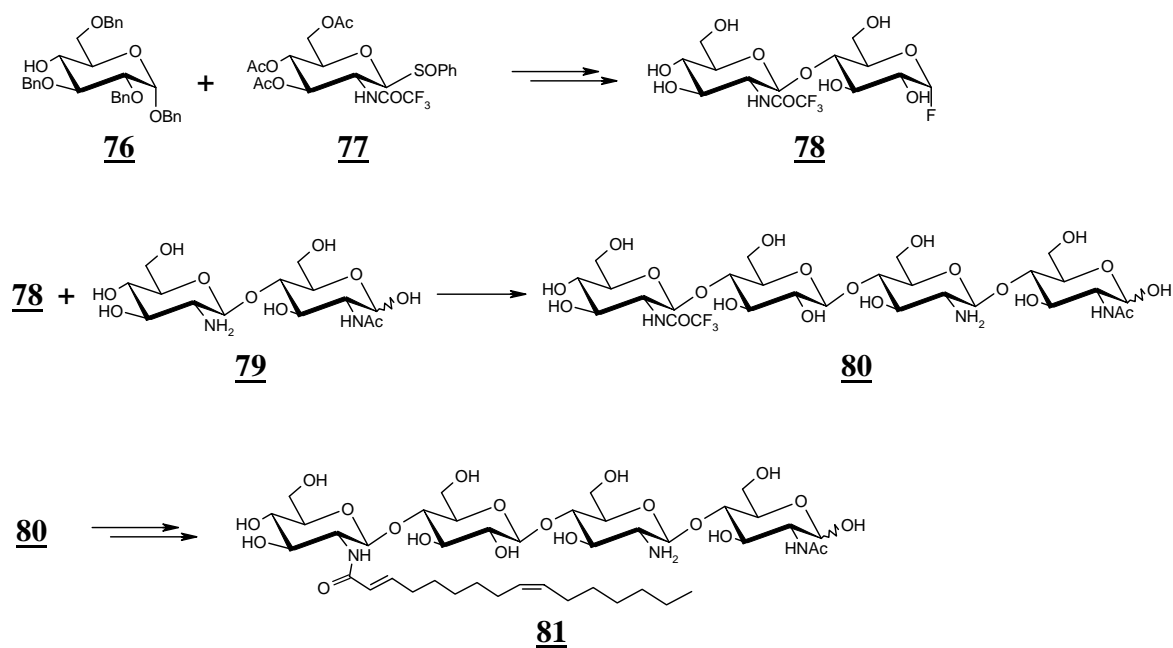


Schéma 10 : Synthèse de Robina *et coll.*^{45,46}

Des tests préliminaires basés sur un phénomène de défense de la plante vis-à-vis de la structure de chitine, précédant de futurs tests de nodulation, ont été réalisés sur des cellules de *Catharantus roseus*. Les résultats de ces tests montrent que le remplacement de deux unités GlcNAc par deux unités Glc se traduit par la perte d'activité du composé 72.

Synthèse de Driguez

Driguez *et coll.*⁴⁷ ont également décrit la synthèse d'un analogue de facteur Nod pour lequel une unité GlcNAc est remplacée par une unité Glc (Schéma 11).



Par ailleurs, il nous a paru important de concevoir un thiooligosaccharide fonctionnalisé à chacune de ses deux extrémités.

PARTIE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Formation de la liaison thioglycosidique

Plusieurs méthodes peuvent être envisagées pour former cette liaison sulfurée. Nous en citerons deux principales^{44,49} (Figure 7).

La première, dite de « glycosylation-substitution », implique un thiol accepteur de glycosyle et un donneur de glycosyle possédant un groupement partant (GP) en position anomérique.

La deuxième méthode est une substitution nucléophile de type S_N2 avec inversion de configuration, impliquant un thiolate anomérique formé *in situ*, et un groupement partant d'un autre saccharide. Le groupement partant le plus couramment utilisé est un groupement trifluorométhanesulfonyle (triflate).

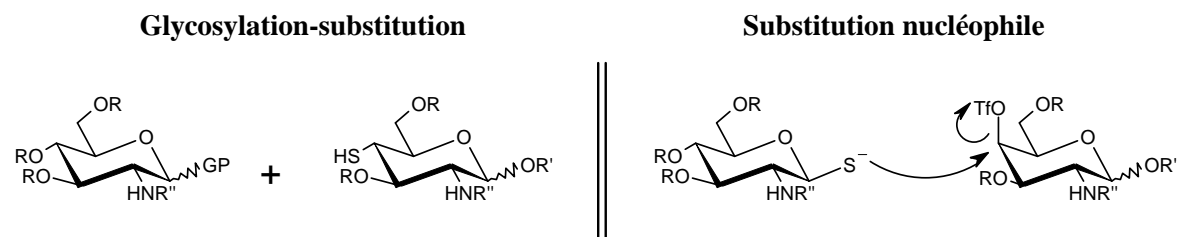
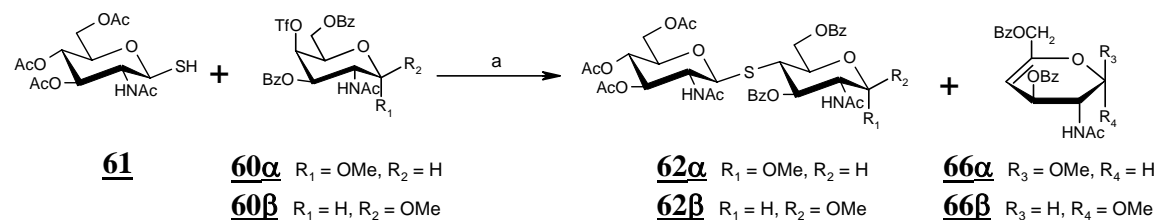


Figure 7

Comme indiqué dans le chapitre précédent, Lee *et coll.*⁴² ont privilégié la méthode de substitution nucléophile pour préparer des thiooligosaccharrides analogues de facteurs Nod (Schéma 12).



a : NaH ou cystéamine, DMF

Schéma 12

Cette méthode conduit à la formation du thiodisaccharide attendu **62**, avec des rendements variant entre 43% et 63% qui s'expliquent par la présence d'un sous-produit d'élimination **66**, pour lequel le rendement peut atteindre 25%. L'utilisation d'un triflate de configuration *D-galacto* et de conformation 4C_1 lors d'une réaction de substitution nucléophile ne semble donc pas constituer un bon choix.

Afin d'éviter la formation du sous-produit due à une réaction d'élimination, des travaux antérieurs du laboratoire^{50,51} ont permis, par la méthode de glycosylation-substitution, l'obtention du thiodisaccharide **84** β -1,4 et avec un rendement de 33% à partir du trichloroacétimidate **82** et du thiol **83** (Schéma 13).

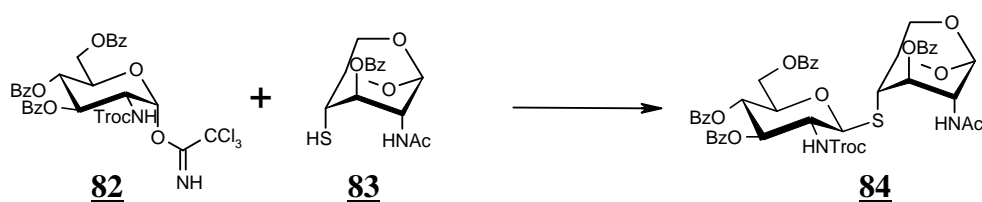


Schéma 13

Compte tenu du rendement moyen de la réaction, un autre donneur de glycosyle, le bromure **85**, a été utilisé. Le couplage de ce bromure **85** et de l'accepteur **86** permet d'obtenir le thiodisaccharide **87** avec un rendement de 64% (Schéma 14).

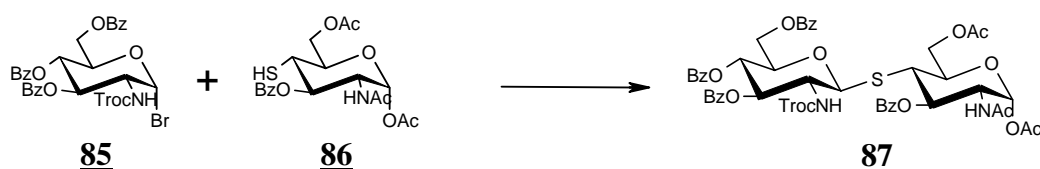


Schéma 14

Cette méthode a alors été appliquée à la préparation du thiotrisaccharide **90** (Schéma 15).

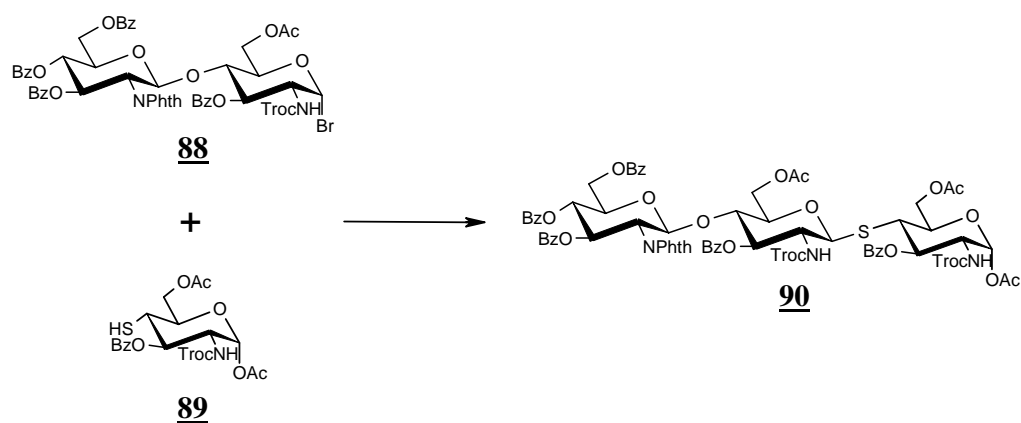
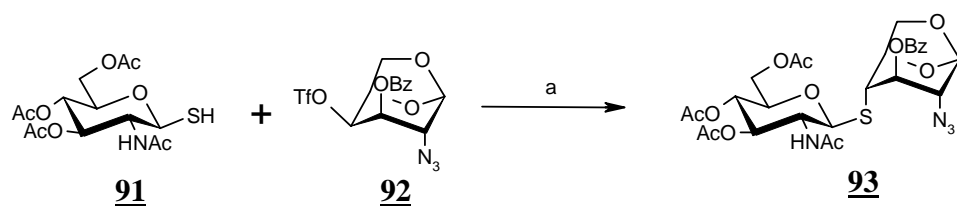


Schéma 15

Le thiotrisaccharide **90** est préparé par glycosylation du bromure anomérique **88** et du 4-thiol **89** avec un rendement de 49%. Le thiotrisaccharide **90** est, à notre connaissance, le premier thiotrisaccharide, précurseur d'analogues de facteur Nod, connu pour lequel un des atomes d'oxygène inter-osidique est remplacé par un atome de soufre et pour lequel l'acylation sélective du côté non-réducteur est possible.

Les rendements des réactions correspondant à ce type de couplage restant très variables, il a été envisagé de former la liaison thioglycosidique par substitution nucléophile de type S_N2 avec déplacement d'un groupement triflate par un thiolate anomérique en utilisant, non plus un triflate de conformation 4C_1 mais de conformation 1C_4 , l'élimination *trans* diaxiale n'étant alors plus possible (Schéma 16).

Le thiodisaccharide **93** est alors obtenu à partir du thiol **91** et du triflate 1,6-anhydro **92** avec un rendement de 70%.



a : NaH, DMF, 70%

Schéma 16

Ces résultats constituent une méthode efficace de préparation de thiooligosaccharides dérivés de chitine, possédant une liaison thioglycosidique β -1,4. Nous avons alors décidé

d'utiliser cette méthode pour la formation de la liaison sulfurée des analogues de facteurs Nod que nous envisageons de préparer.

Stratégie de synthèse

Nous nous sommes orienté dans un premier temps vers la préparation d'un thiotétrасaccharide de type **I**, analogue potentiel de facteurs Nod (Figure 8).

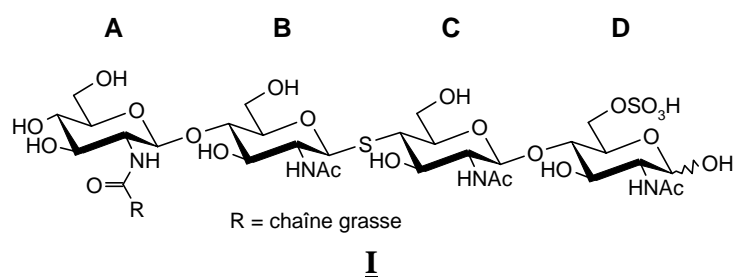


Figure 8

Dans la partie « Synthèses de facteurs Nod et d'analogues » (cf. page 21), nous avons rapporté différentes stratégies citées dans la littérature. Pour notre part, nous avons choisi une approche impliquant la formation de précurseurs communs de thiooligosaccharides pouvant conduire, selon différentes voies, à des thiotrisaccharides ainsi qu'à des thiotétrасaccharides (Schéma 17). Nous avons également envisagé de préparer des thiooligosaccharides par transfert enzymatique. Les précurseurs communs sont constitués par les thiodisaccharides de type **II**. Ces thiodisaccharides devraient conduire d'une part, à la formation du thiotrisaccharide de type **III** par extension du côté réducteur, et d'autre part, à la formation du thiotrisaccharide de type **IV** par extension du côté non réducteur. Ces deux types de thiotrisaccharides pourraient, à leur tour, conduire au tétrasaccharide **I**, précurseur d'analogues de facteurs Nod.

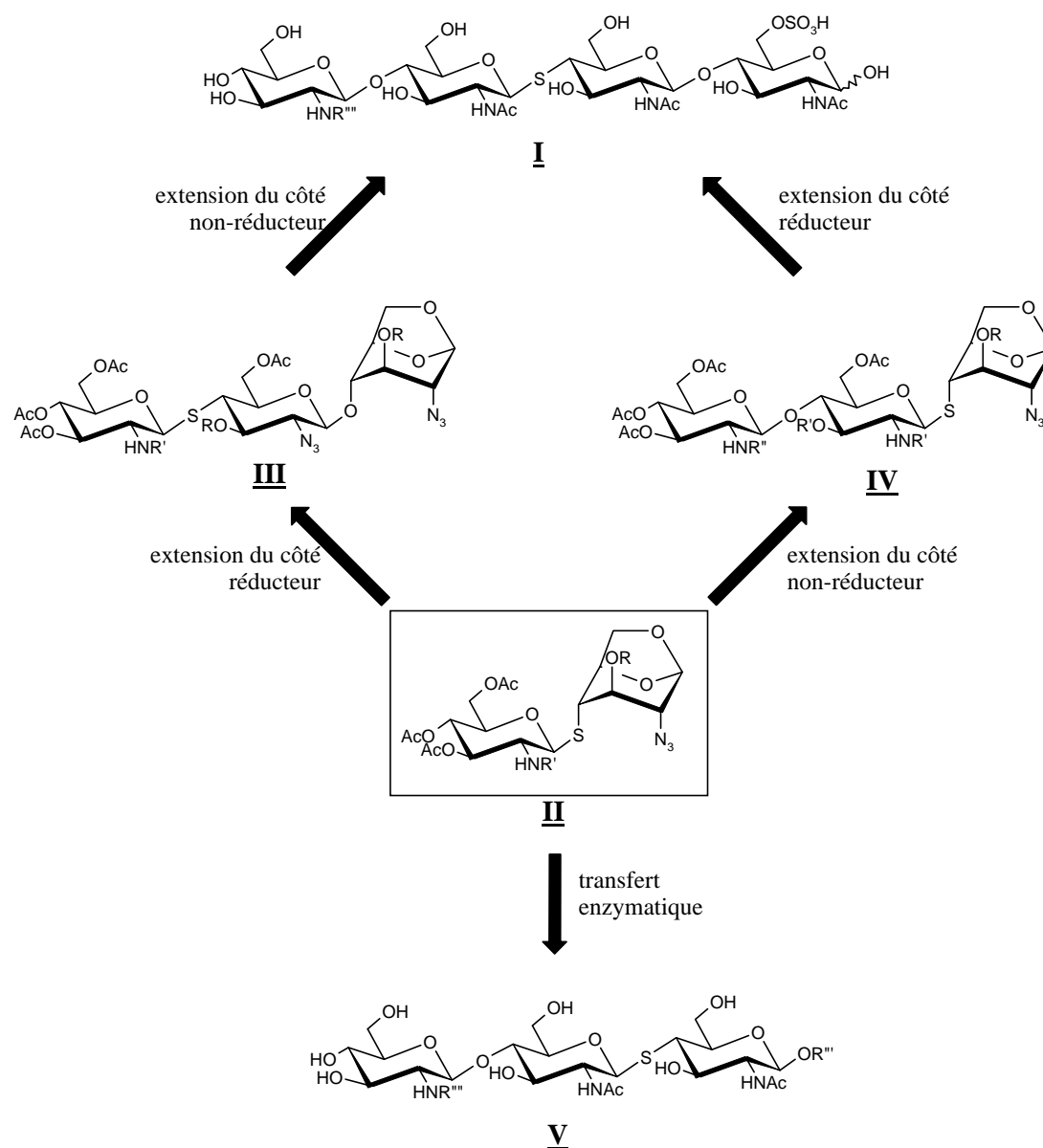


Schéma 17

Nous pouvons également envisager à partir du thiodisaccharide **II**, la préparation d'un thiotrisaccharide **V** par transfert enzymatique d'un oligonucléotide (UDP-glucosamine) sur un thiodisaccharide du côté non réducteur. Il est à noter que les thiotrisaccharides de type **III** et **IV** peuvent également constituer des précurseurs dans la synthèse de thiotétraccharides par transfert enzymatique.

Nous présenterons tout d'abord (Chapitre 2) les résultats concernant la synthèse de thiodisaccharides de type **II** et de leurs précurseurs. Nous exposerons, dans un second

temps, les résultats de synthèse de thiotrisaccharides de type **III** et **IV**. Enfin nous décrirons la synthèse d'un thiotétrasaccharide de type **I**.

Le Chapitre 3 sera consacré à la synthèse d'un thiotrisaccharide de type **V** par transfert enzymatique, ainsi qu'à la préparation d'un thiotrisaccharide, précurseur à la synthèse d'un thiotétrasaccharide par transfert enzymatique.

Synthèse chimique

Dans la perspective de préparer un thiotétrasaccharide fonctionnalisé de type **I**, nous avons défini le schéma rétrosynthétique Schéma 18.

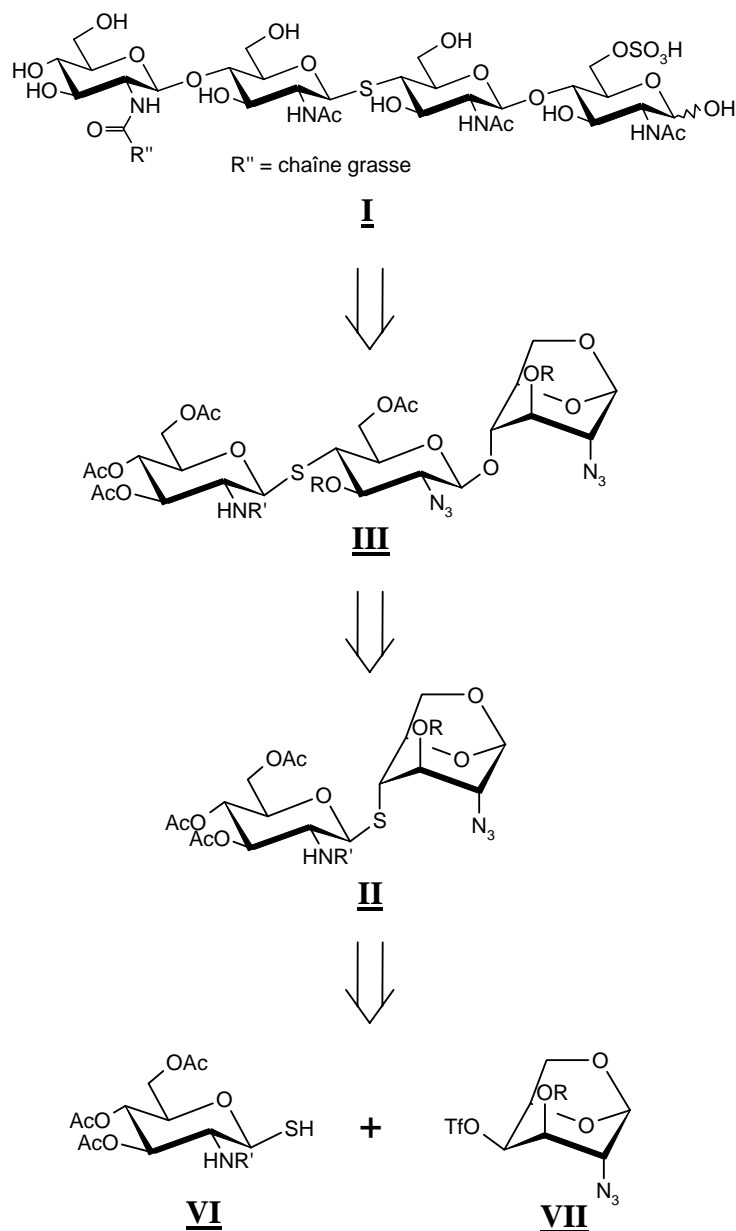


Schéma 18

Le thiotétrasaccharide de type **I** serait obtenu par glycosylation d'un dérivé du trisaccharide de type **III** par extension côté non réducteur. Ce dernier serait généré par

couplage du côté réducteur d'un thiodisaccharide de type **II**, après ouverture du pont *anhydro* et activation de la position anomérique, et d'un accepteur de type *anhydro*. Enfin la liaison thioglycosique serait obtenue par couplage du thiol **VI** et du triflate **VII**.

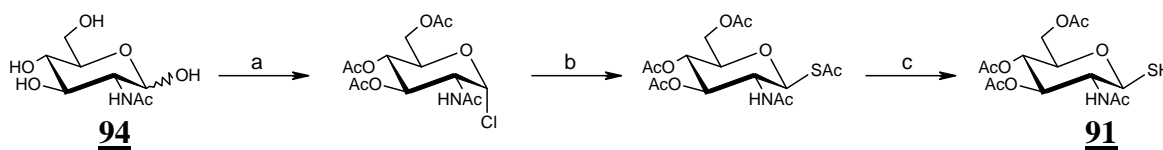
Nous décrivons dans la première partie la synthèse du thodisaccharide **II**, puis celle du thiotrisaccharide **III** dans une deuxième partie.

Synthèse d'un thiodisaccharide de type II

Une des difficultés réside dans le choix des groupements protecteurs de la fonction amine du 1-thiol et du groupe hydroxyle en position 3 de l'unité *anhydro*. Compte tenu des travaux antérieurs du laboratoire, nous avons choisi le groupement acétamide pour protéger la fonction amine et des groupements ester pour protéger les fonctions alcool du fait d'une déprotection plus aisée des esters par rapport à celle des éthers.

Synthèse du thiol 91

Ce thiol a été préparé avec un rendement global de 6% à partir de la *N*-acétyl-*D*-glucosamine⁵⁰ **94** par formation d'un thioacétate à partir du chlorure correspondant et par hydrolyse en présence de cystéamine (Schéma 19).



a : AcCl ; b : AcSH, KOH ; c : cystéamine, acétone

Schéma 19

Synthèse du triflate 92

Le triflate **92** de conformation 1C_4 permet d'éviter le produit secondaire d'élimination lors de la formation de la liaison thioglycosidique β -1,4. Sa préparation repose sur la formation préalable du pont 1,6-*anhydro*. Celui-ci est obtenu par déplacement d'un groupement phényloxyle en position anomérique par l'alcoolate en position 6 obtenu dans des

conditions basiques⁵²⁻⁵⁵ (Schéma 20). L'introduction du groupement azido en position 2 suivie de la triflation de la position 4 et d'une benzylation en 3, conduit⁵⁰ au triflate **92** avec un rendement de 9% à partir du triol.

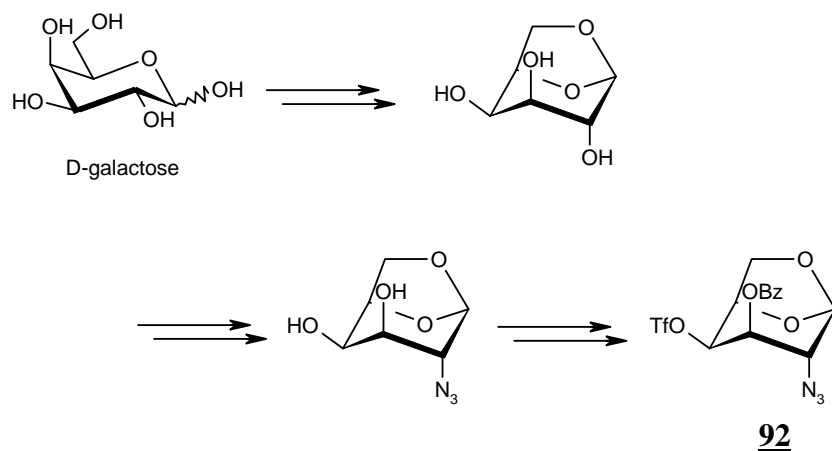
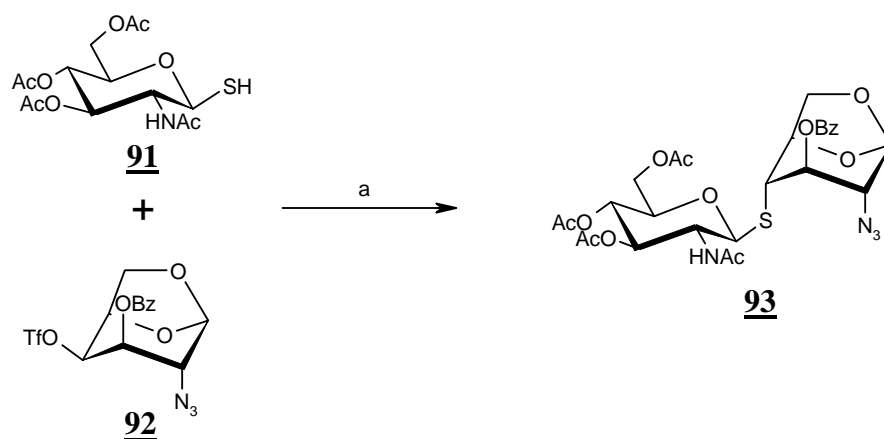


Schéma 20

Synthèse du thiodisaccharide 93

Les deux précurseurs étant disponibles au laboratoire⁵⁰, nous avons réalisé la réaction de substitution nucléophile pour former le thiodisaccharide **93**. Cette dernière est réalisée par l'intermédiaire du thiolate formé *in situ* par addition d'hydrure de sodium sur le thiol **91** dans le DMF (Schéma 21). Le thiodisaccharide **93** est ainsi obtenu avec l'excellent rendement de 96%.



a : NaH, DMF, 60°C, 96%

Schéma 21

Le spectre de RMN du proton présente les signaux caractéristiques du pont *anhydro*, notamment le singulet à 5.54 ppm, correspondant à H-1B (dans la suite de notre exposé, les unités des oligosaccharides préparés seront désignées de gauche à droite par les lettres A, B, C et D). On note également la présence d'un signal à 3.16 ppm correspondant à H-4B, se présentant sous la forme d'un singulet élargi, caractéristique d'un couplage *trans* diéquatorial très faible (Figure 9). Ceci confirme le mécanisme de type S_N2 avec inversion de configuration et formation d'une liaison β -1,4.

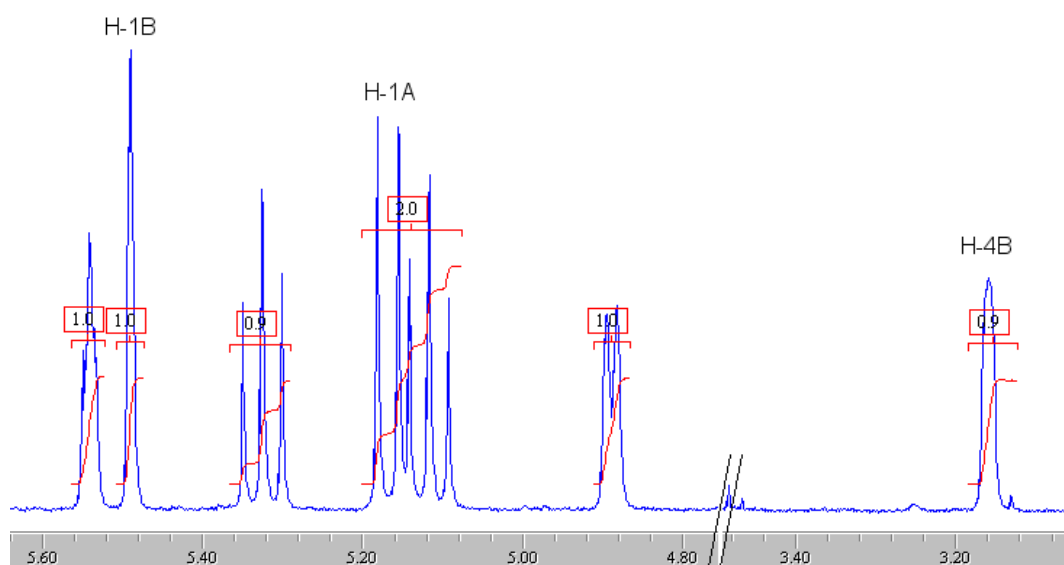


Figure 9

Nous confirmons donc l'efficacité de la méthode consistant à réaliser une réaction de substitution nucléophile entre un thiol anomérique et un monosaccharide de conformation 1C_4 possédant un bon groupement partant en position 4, pour former une liaison thioglycosidique β -1,4.

Synthèse d'un thiotrisaccharide de type III

Introduction

Selon le Schéma 17 (cf. page 56), la formation de thiotrisaccharides à partir du disaccharide **93**, équivalent au thiodisaccharide de type **II**, peut s'envisager soit du côté réducteur, soit du côté non réducteur. Nous étudierons, dans un premier temps, la synthèse de thiotrisaccharides par extension du côté réducteur (Schéma 22).

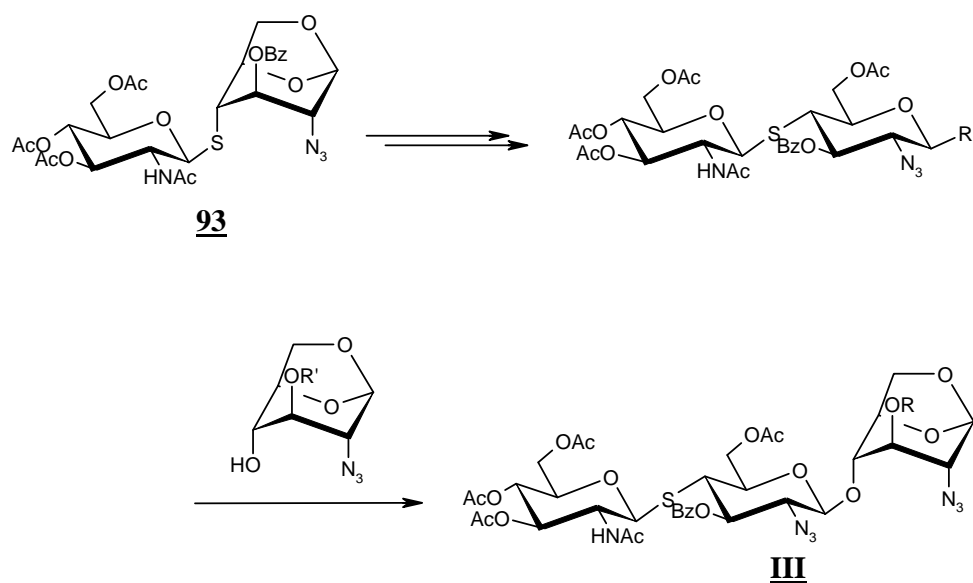


Schéma 22

Comme nous l'avons évoqué précédemment, un thiotrisaccharide **III** sera obtenu par glycosylation entre un donneur de glycosyle préparé à partir du thiodisaccharide **93** décrit précédemment, et un accepteur de type 1,6-*anhydro*, synthon commun à la préparation du thiodi- et du thiotri-saccharide.

Avant d'exposer nos résultats, nous ferons un bref rappel de quelques méthodes de glycosylation.

Quelques méthodes de glycosylation

La littérature décrit de nombreuses méthodes de glycosylations dont la sélectivité $\alpha:\beta$ dépend du protocole opératoire utilisé (choix du groupement activateur du donneur de glycosyle, du promoteur, du solvant et de la température). Ces méthodes reposent principalement sur deux étapes :

- l'activation de la position anomérique par formation d'un donneur de glycosyle stable (**étape d'activation**)
- le **transfert de glycosyle** vers l'accepteur durant un processus catalytique où la diastéréosélection est contrôlée essentiellement par la configuration de la position anomérique du donneur, par l'assistance anchimérique, par le principe de « double stéréo-

différenciation »⁵⁶, par l'influence du promoteur, du solvant et par le contrôle thermodynamique.

Méthode de Koënigs-Knorr

Une des premières méthodes de glycosylation utilisée pour la synthèse d'oligosaccharides complexes est la méthode élaborée par Koenigs et Knorr⁵⁷ en 1901.

Cette méthode consiste en l'activation de la position anomérique par un halogénure (chlorure ou bromure), conduisant à l'anomère α le plus stable⁵⁸. Les promoteurs généralement utilisés lors de la réaction de glycosylation sont des dérivés d'argent ou de mercure⁵⁹ (AgClO_4 , Ag_2CO_3 , Ag_2O , Ag-silicate, $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgBr_2 , ...).

L'activation se fait par le passage par l'ion oxocarbenium suivi de l'attaque de l'accepteur de glycosyle (Schéma 23).

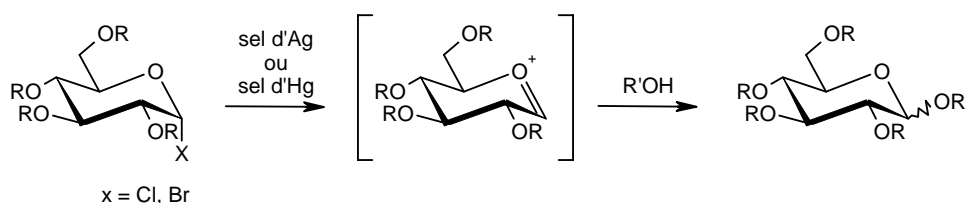


Schéma 23

La stéréosélectivité de la réaction dépend de divers facteurs, notamment de la nature du groupement en position 2. La présence d'un groupement participant en position 2 (type acétate ou acétamide) favorise l'approche de l'accepteur par la face β de l'ion acyloxonium et conduit à la formation majoritaire du β -glycoside. En revanche, la présence d'un groupement non participant en position 2 (benzyle par exemple) et l'utilisation d'un solvant peu polaire, favorisent parfois la formation majoritaire de l' α -glycoside.

Un autre facteur influençant la sélectivité est l'utilisation d'un catalyseur en phase hétérogène, comme le silicate d'argent qui, par interaction avec l'halogénure en position α , favorise l'obtention d'un glycoside β .

Outre la faible stabilité des halogénures, l'inconvénient de cette méthode est l'utilisation parfois nécessaire de métaux lourds en quantités importantes.

Activation du donneur sous forme de 1-fluorure

Une autre méthode de glycosylation est l'utilisation de 1-fluorures. Cette méthode décrite en 1981 par Mukaiyama *et al.*⁶⁰ a été largement utilisée en raison des avantages associés aux fluorures de glycosyle. En effet, la nature de la liaison C-F confère à ces composés une plus grande stabilité thermique et chimique que celle de leurs analogues chlorés ou bromés.

Ces donneurs sont obtenus soit à partir des hémiacétals correspondants par réaction en présence de DAST⁶¹, de HF.pyridine⁶² ou de Selectfluor⁶³, soit à partir de thioglycosydes par traitement au DAST/NBS⁶⁴.

L'étape de glycosylation, quant à elle, est réalisée en présence d'AgClO₄-SnCl₂⁵⁹, de BF₃.Et₂O⁶⁵ ou de Cp₂HfCl₂-AgOTf⁶⁶, le mécanisme de réaction étant similaire à la méthode de Koenigs-Knorr (Schéma 24).

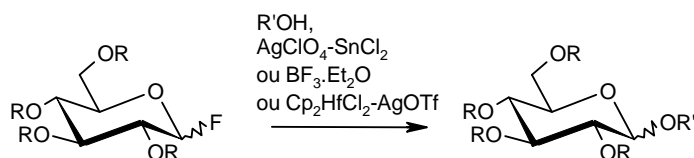


Schéma 24

Tout comme pour les chlorures ou les bromures, l'étape d'activation des fluorures nécessite souvent l'utilisation de métaux lourds, d'où la difficulté d'adapter ces conditions à plus grande échelle. De plus, la réactivité des fluorures reste faible.

Activation du donneur sous forme de thioglycoside

La position anomérique peut être activée par un groupe thioalkyle. En raison de leur facilité de préparation et leur grande stabilité dans diverses conditions de réactions, ces thioglycosides sont des intermédiaires intéressants dans la synthèse oligosaccharidique car ils présentent deux avantages majeurs. D'une part, ils peuvent servir de groupe protecteur temporaire stable dans les conditions classiques de glycosylation et, d'autre part, ils

peuvent être transformés en d'autres donneurs de glycosyles comme des fluorures par réaction avec DAST-NBS⁶⁴.

Des sels métalliques (mercure, cuivre,...) ont été utilisés comme agent thiophile, comme par exemple HgSO₄ (Ferrier *et coll.*⁶⁷ en 1973). En 1983, Nicolaou *et coll.*⁶⁸ ont utilisé le NBS comme promoteur permettant des conditions de glycosylation plus douces. Enfin, en 1990, Fraser-Reid *et coll.*⁶⁹ et van Boom *et coll.*⁷⁰ ont décrit des glycosylations avec l'utilisation du couple NIS-TfOH comme promoteur.

Dans le cadre de l'utilisation d'un promoteur tel le NIS ou le NBS, le mécanisme de glycosylation est de type Koenigs-Knorr, c'est-à-dire qu'il y a d'abord réaction avec l'agent thiophile, puis formation de l'intermédiaire oxocarbénium et attaque de l'accepteur de glycosyle (Schéma 25).

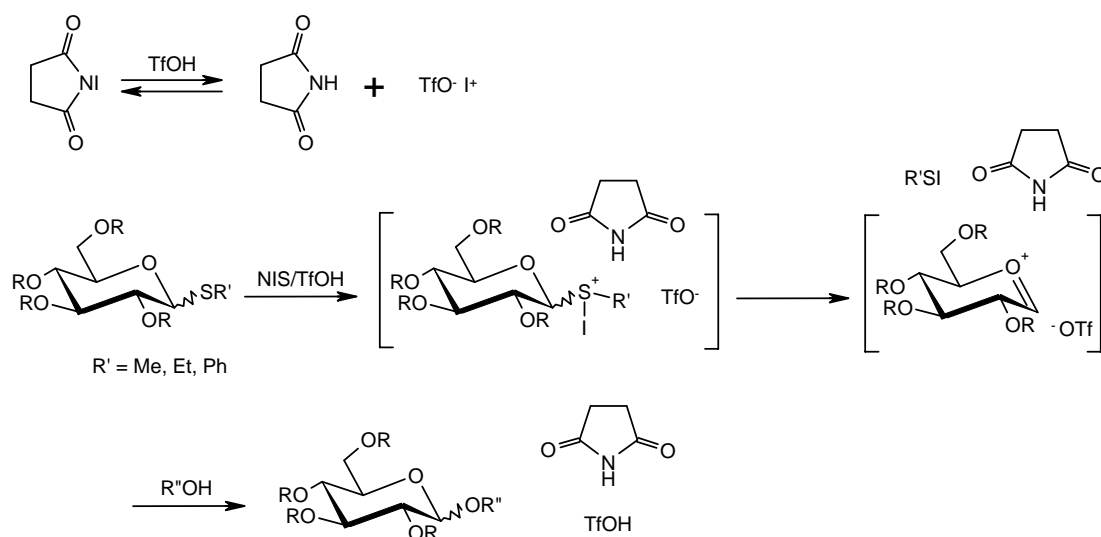


Schéma 25 (d'après Fraser-Reid *et coll.*⁶⁹)

L'application de cette méthode de glycosylation à la synthèse de thioanalogues de facteurs Nod se heurterait probablement à la désactivation de l'agent thiophile par l'atome de soufre, voire même à la coupure de la liaison thioglycosidique au profit de la formation d'une liaison *O*-glycosidique classique.

Activation du donneur sous forme de *n*-pentényle

L'utilisation du groupement *n*-pentényle en position anomérique est une méthode due à Fraser-Reid *et coll.*⁷¹. A l'origine⁷², ce groupement a été utilisé comme groupe protecteur de la position anomérique, retiré sélectivement par action de NBS dans un mélange CH₃CN-H₂O. En 1988, cette équipe remarqua que le fait de remplacer l'eau par un alcool conduisait au glycoside correspondant.

Les *n*-pentényl-glycosides sont préparés sous forme de mélange d'anomères à partir des hémiacétals correspondants par simple glycosylation avec l'alcool *n*-penténylique en présence d'un promoteur.

La glycosylation se fait d'abord (Schéma 26) par addition d'un agent électrophile sur l'oléfine, suivie du départ du substituant anomérique. Enfin l'alcool réagit sur l'ion oxocarbenium intermédiaire et donne le glycoside désiré.

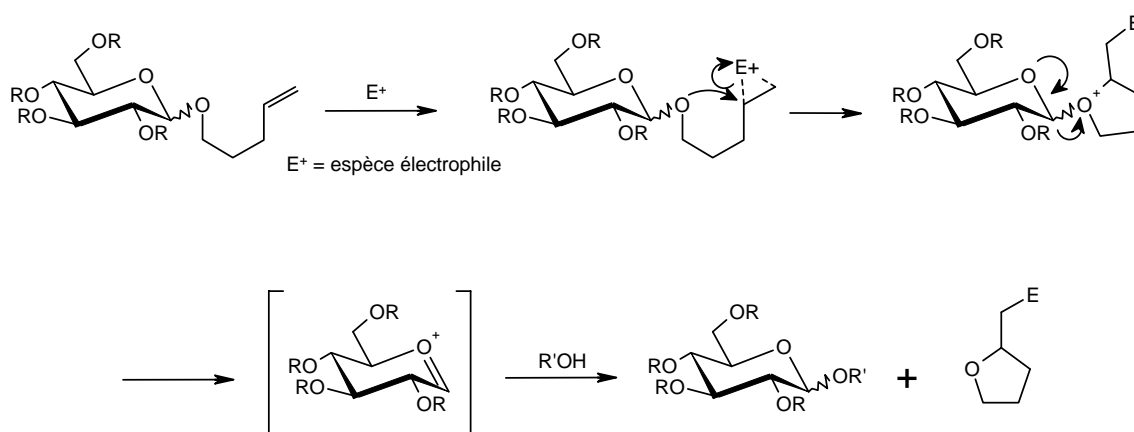


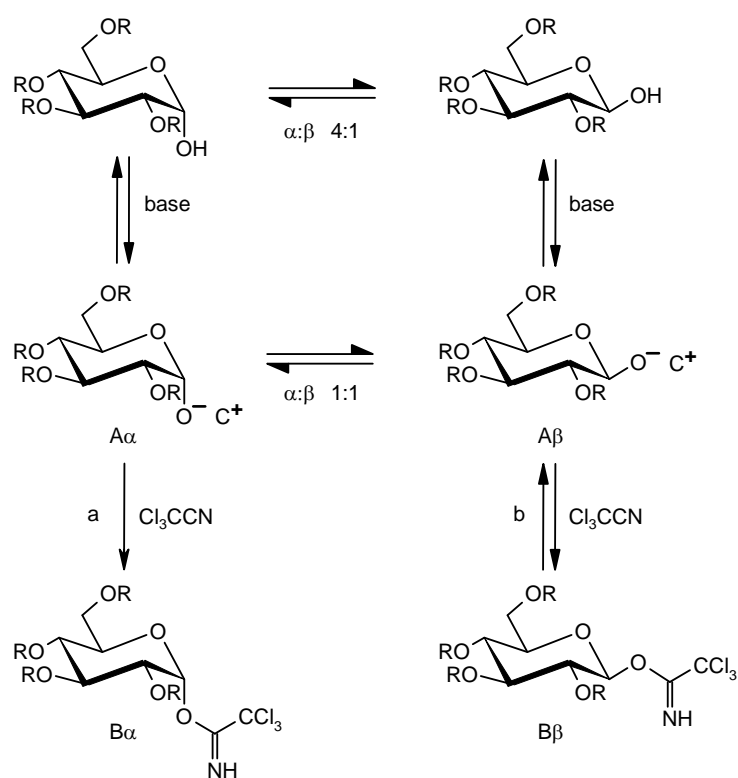
Schéma 26

Les promoteurs les plus utilisés pour l'étape de glycosylation sont I(collidine)₂ClO₄⁷¹ (IDCP), NIS-TfOH et NIS-TMSOTf⁷³.

Fraser-Reid *et coll.* ont proposé un concept désigné par « armed and disarmed sugar », reposant sur les différences électroniques des groupements ester et éther. En effet, la présence en position 2 d'un groupement ester, diminue la réactivité du donneur, alors que la présence d'un groupement éther, en augmente la réactivité.

Activation du donneur sous forme de trichloroacétimide

L'activation de la position anomérique par un groupement imidate a été décrite pour la première fois par Sinaÿ *et coll.*⁷⁴. Elle a été étendue au groupe trichloroacétimide par Schmidt *et coll.*⁷⁵ en 1980. Elle s'est imposée comme une méthode très efficace et est très utilisée pour la synthèse d'oligosaccharides complexes. Les trichloroacétimides (désormais plus utilisés que les imidates) sont facilement obtenus par traitement des hémiacétals saccharidiques par le trichloroacétonitrile en présence d'une base telle que K_2CO_3 , NaH ou DBU. Le choix de la base est très important puisqu'il conditionne le caractère thermodynamique (obtention de l'anomère α) ou le caractère cinétique (obtention de l'anomère β) de la réaction (Schéma 27).



R = Bn, C^+ = contre-ion de la base (Na^+ , K^+)
a : contrôle thermodynamique, b : contrôle cinétique

Schéma 27 : Obtention des imidates $B\alpha$ et $B\beta$ selon le contrôle thermodynamique ou cinétique (d'après Schmidt⁷⁶)

Le trichloroacétimide $B\beta$ est formé préférentiellement dans une réaction d'addition très rapide et réversible. Cependant, on constate une anomérisation lente due à une réaction catalysée par la base (rétro-réaction, anomérisation de $A\beta$ en $A\alpha$, suivie de la réaction sur

le Cl_3CCN) donnant pratiquement exclusivement l' α -trichloroacétimide $\text{B}\alpha$ thermodynamiquement le plus stable.

L'équilibre entre $\text{A}\beta$ et $\text{B}\beta$ est d'autant plus déplacé vers l'alcoolate que la base utilisée est forte. L'anomère α sera favorisé par le traitement par NaH ou DBU , alors que l'utilisation de K_2CO_3 favorisera dans une réaction rapide l'anomère β .

La glycosylation est ensuite réalisée dans des conditions douces puisque le promoteur est généralement un acide de Lewis utilisé en quantité catalytique. Les promoteurs les plus couramment utilisés sont $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ ⁷⁵ ou TMSOTf ⁷⁶.

La sélectivité de cette méthode peut être contrôlée par différents facteurs. Par exemple, la présence d'un groupe participant en position 2 favorise la formation d'un glycoside 1,2-*trans*. En l'absence d'un tel groupe les facteurs déterminants sont en premier lieu le promoteur et le solvant. Ainsi, une glycosylation à basse température avec $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ dans un solvant non polaire tel que CH_2Cl_2 est de type $\text{S}_{\text{N}}2$. L'obtention d'un β -glycoside à partir d'un α -trichloroacétimide est donc favorisée et inversement. En revanche, des conditions utilisant un acide Lewis plus fort, comme TMSOTf ou TfOH , dans un solvant plus polaire et à température plus élevée favorise le contrôle thermodynamique de la réaction, c'est-à-dire l'obtention de l' α -glycoside.

Enfin, une alternative à la création de liaison glycosidique par voie chimique est la glycosylation par transfert enzymatique qui présente plusieurs avantages : elle est stéréosélective, voire stéréospécifique, et ne nécessite pas de réactions de protection et de déprotection du substrat. Nous reviendrons plus en détail sur la synthèse enzymatique dans le Chapitre 3.

Conclusion

Nous venons de voir que les méthodes les plus intéressantes pour contrôler la sélectivité de la réaction de glycosylation, en l'absence de groupement participant en position 2, sont

celles employant des donneurs activés sous forme de thioglycosides ou de trichloroacétimidates. L'utilisation de thioglycosides n'étant pas compatible avec la présence de la liaison sulfurée de nos molécules, nous nous sommes naturellement orientés vers l'utilisation de trichloroacétimidates comme donneurs de glycosyle.

Synthèse d'un thiotrisaccharide de type III

Introduction

La synthèse d'un thiotrisaccharide de type **III** sera réalisée par glycosylation du trichloroacétimide **96a**, préparé à partir du dimère **93** et d'un accepteur de type 1,6-*anhydro* (Schéma 28). Cet *anhydro* aurait l'avantage d'être un précurseur commun dans la synthèse des thioanalogues et de protéger temporairement la position anomérique. Cette structure permettrait également de différencier le groupe hydroxyle en position 6 de l'unité réductrice.

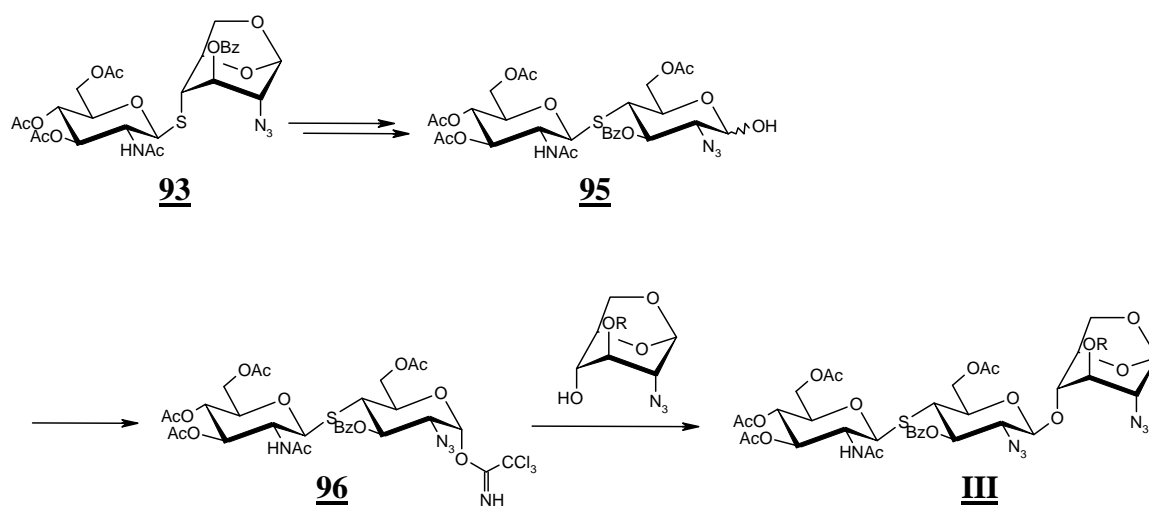
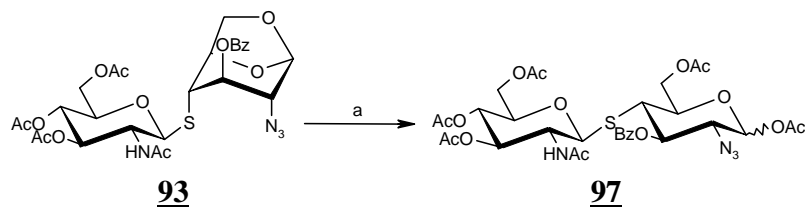


Schéma 28

Dans un premier temps, nous décrirons la synthèse du trichloroacétimide **96**, puis dans un deuxième temps, l'obtention d'un thiotrisaccharide **III**.

Synthèse du donneur de glycosyle **96**

La préparation du donneur **96** a été réalisée par ouverture du pont *anhydro*, désacétylation sélective et activation de la position anomérique (Schéma 29).



a : Ac₂O/TFA, 65°C, 79% (α : β 6:4)

Schéma 29

Le traitement du thiodisaccharide **93** en présence d'un mélange Ac₂O/TFA⁷⁷ fournit le composé **97** avec 79% de rendement sous la forme d'un mélange d'anomères (proportion α : β environ 6:4). La structure de ce composé est confirmée par spectrométrie de RMN du proton. En effet, on observe particulièrement la disparition des singulets caractéristiques de la présence du pont 1,6-*anhydro* et la présence de deux doublets à 6.40 ppm et à 5.58 ppm correspondant respectivement à H-1B α ($J = 3.5$ Hz) et à H-1B β ($J = 8.8$ Hz) (Figure 10).

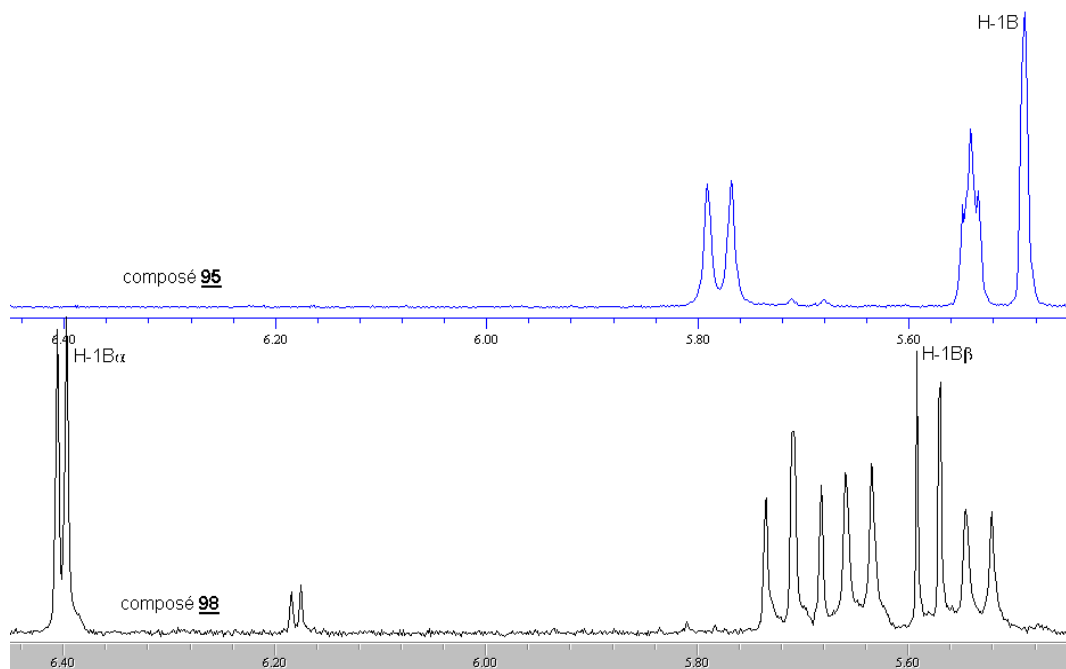
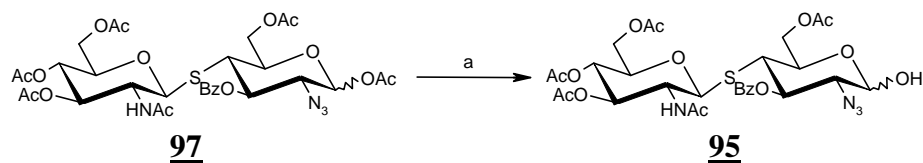


Figure 10

Les différentes méthodes de déprotection sélective de la position anomérique sont toutes basées sur le fait que cette position est plus réactive que la position 6. Parmi ces méthodes,

citons celles qui utilisent des amines comme la benzylamine^{78,79}, ou l'acétate d'hydrazine⁸⁰, ou l'ammoniac⁸¹.

Nous avons d'abord utilisé la benzylamine. Cependant, la purification par les méthodes classiques s'étant avérée délicate en raison de la présence du dérivé acétylé de la benzylamine, nous avons choisi par la suite la désacétylation par l'acétate d'hydrazine (Schéma 30).



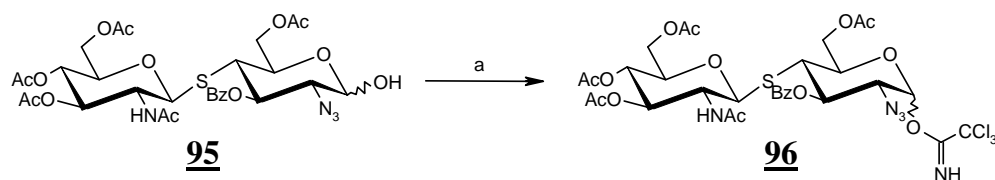
a : acétate d'hydrazine, DMF, 82% (α : β 75:25)

Schéma 30

L'hémiacétal **95** est alors obtenu à partir de l'acétate **97** avec un rendement de 82%.

La structure du composé **95** est confirmée par spectrométrie de RMN du proton : nous constatons la disparition des deux singulets à 2.25 et 2.20 ppm correspondant aux acétates anomériques. De plus, nous remarquons le déplacement des signaux du H-1B vers les champs forts.

Afin d'obtenir majoritairement le trichloroacétimidate α , nous avons réalisé la réaction dans les conditions décrites par Schmidt *et coll.*⁷⁶, c'est-à-dire par action d'une base forte en présence de Cl_3CCN (Schéma 31).



a : Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 , 85% (α : β 9:1)

Schéma 31

Le traitement de l'hémiacétal **95** en présence de DBU et de Cl_3CCN dans du CH_2Cl_2 , fournit majoritairement l'anomère α de l'imidate **96**. L'intégration des deux doublets, en

spectrométrie de RMN du proton, à 6.59 ppm et à 5.75 ppm, correspondant respectivement à H-1B α ($J = 3.5$ Hz) et H-1B β ($J = 8.4$ Hz) permet d'estimer le rapport $\alpha:\beta$ à 9:1.

Le donneur de glycosyle **96** étant préparé, il est nécessaire de mettre au point les conditions de glycosylation pour l'obtention du thiotrisaccharide **III**.

Essais de glycosylation avec les accepteurs **98** et **99**

Les deux accepteurs **98** et **99** étant disponibles au laboratoire⁵⁰, nous avons choisi de réaliser des essais de glycosylation entre ces deux accepteurs et le donneur de glycosyle **96** (Schéma 32).

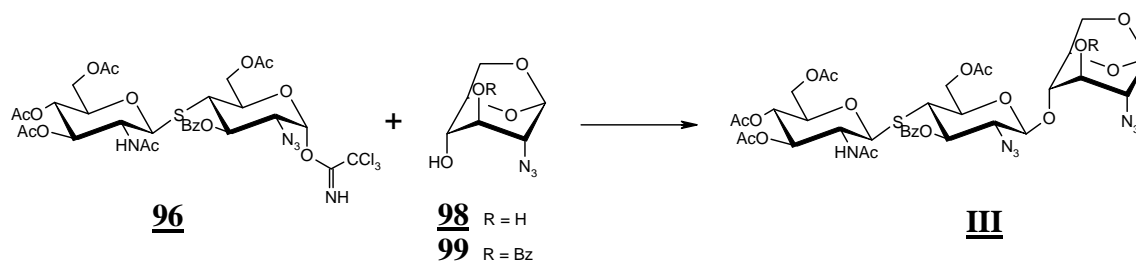


Schéma 32

Pour cela, nous avons utilisé le protocole opératoire décrit par l'équipe de J.-M. Beau³⁶ pour préparer des facteurs Nod : utilisation de BF₃.Et₂O dans le toluène à basse température.

Les différents essais effectués n'ont pas permis d'obtenir le thiotrisaccharide attendu. Seule la réaction avec l'accepteur **99** a permis, tout au plus, d'isoler un produit à l'état de traces dont le spectre de masse correspond à la masse du composé attendu.

Compte tenu de ces résultats, et en nous basant sur les travaux de Beau *et coll.*³⁸, nous avons décidé de réaliser la réaction de glycosylation avec un accepteur possédant un groupement benzyle à la place du groupement benzoate.

Essais de glycosylation avec l'accepteur **100**

Le dérivé *anhydro* **100** (Schéma 33) est préparé à partir du tri-*O*-acétyl-*D*-glucal en 5 étapes³⁸. La glycosylation du donneur **96** et de l'accepteur **100**, dans les conditions décrites précédemment, n'a pas permis d'obtenir le thiotrisaccharide correspondant. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, nous avons supposé que le donneur de glycosyle présentait une faible réactivité vis-à-vis de l'accepteur.

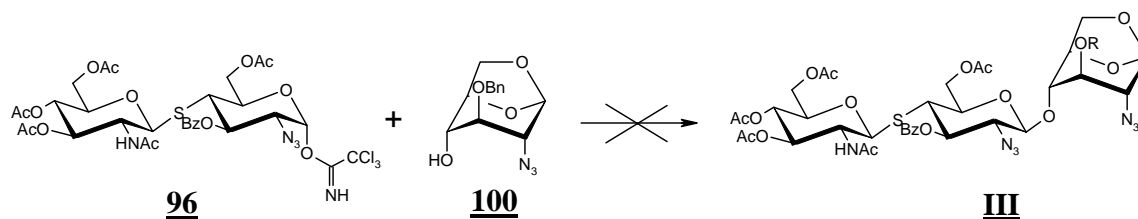


Schéma 33

Conclusion

Les différents essais de glycosylation réalisés à partir du donneur **96** et des trois accepteurs **98**, **99** et **100** n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné dans le paragraphe 1.2.3 (cf. page 36), Beau *et coll.* ont décrit des glycosylations similaires, à partir du même accepteur **100** et d'un donneur de glycosyle dont le groupe hydroxyle en position 3 est protégé par un groupement benzyle et non par un groupement benzoyle.

Nous avons donc remplacé le groupement benzoyle en position 3 de l'unité réductrice du donneur de glycosyle par un groupement benzyle. Nous décrirons plus loin (paragraphe 2.2.5, page 77) des essais de glycosylation mettant en jeu des molécules modèles qui conforteront le bien-fondé de notre choix.

Nous avons également envisagé de modifier d'autres groupements protecteurs, compte tenu de résultats antérieurs menés au laboratoire, concernant la synthèse de thiotrisaccharide à partir de l'extrémité non réductrice.

Synthèse de thiotrisaccharides de type IV par extension du côté non réducteur

Essais de glycosylation avec les accepteurs 102, 103 et 104

Différents essais de glycosylation ont été menés au laboratoire à partir de plusieurs accepteurs dérivés du thiodisaccharide 93, et du donneur de glycosyle 101 pour lequel la fonction amine est protégée sous la forme de phthalimide (Schéma 34).

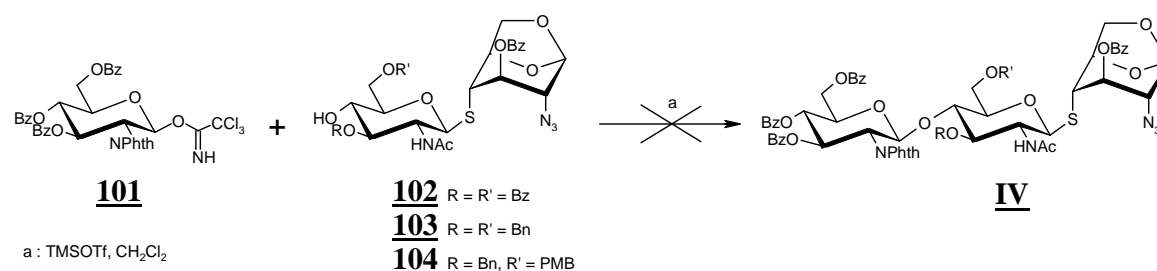


Schéma 34

Les différents accepteurs sont obtenus selon les procédés classiques, soit par benzylation sélective⁸² des positions 3 et 6 pour le composé 102, soit par protection sélective des groupes hydroxyle en position 4 et 6 par un groupement benzylidène (ou *p*-méthoxybenzylidène), suivie de la benzylation de la position 3 et de l'ouverture régiosélective de l'acétal pour les composés 103 et 104. Le donneur 101 étant disponible au laboratoire⁵¹, les glycosylations ont été réalisées en présence de TMSOTf dans du CH₂Cl₂ et à basse température.

La glycosylation avec l'accepteur 102 n'a permis d'isoler qu'un produit secondaire qui serait issu de la formation d'un imidate sur l'atome azote de l'unité non réductrice⁸³ du composé 102.

De leur côté, les réactions de glycosylation avec les accepteurs 103 et 104 n'ont permis d'observer que des traces des thiotrisaccharides attendus.

Ces résultats tendent à montrer que la réactivité du groupe hydroxyle en position 4 est relativement faible en présence de benzoates, et que la seule glycosylation possible est la *N*-glycosylation. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de liaisons hydrogène entre le groupe carbonyle du benzoate en position 3 et l'hydroxyle en position 4, rendant ce dernier moins réactif. Cependant, ces essais n'ont donné aucun résultat satisfaisant avec des

groupements benzyle. Ceci nous a donc conduit à considérer l'influence dans ces conditions du groupement acétamido de l'accepteur.

En effet, on peut citer^{84,85} deux exemples de glycosylation entre un trichloroacétimide possédant un groupement phthalimido en position 2 et un accepteur possédant un groupement benzyle en position 3 (Schéma 35).

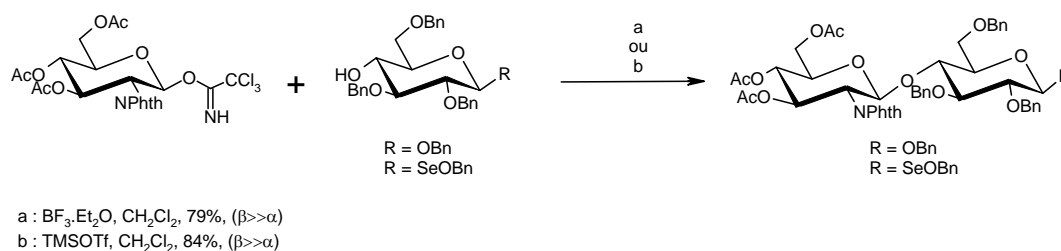


Schéma 35

Contrairement à nos résultats et pour un donneur similaire au composé **101** utilisé, le disaccharide est obtenu avec de bons rendements et une très bonne sélectivité et cela quel que soit le promoteur.

Conclusion

Ces différents essais laissent à penser que :

- une faible réactivité existe dans ces conditions de glycosylation et qu'elle proviendrait probablement de l'accepteur et non pas du donneur ;
- la présence de groupes benzyle en 3, ou en 6, améliore la réactivité par rapport à celle des benzoates ;
- et enfin, le groupement protecteur (acétamido) de la fonction amine de l'accepteur influe sur la réactivité et même conduit, dans certaines conditions, à la formation d'un produit secondaire (glycosylamine).

Ces résultats conduisent à envisager pour la suite de notre travail l'utilisation des groupements benzyle pour protéger les groupes hydroxyle. Quant à la protection de la fonction amine de l'accepteur, l'utilisation d'un groupement autre que le groupe acétamido

devrait être envisagée. En s'inspirant des travaux de l'équipe de J.-M. Beau³⁶, nous avons choisi d'utiliser le groupement carbamate de benzyle qui a la particularité, d'une part (contrairement au groupe acétamide) de ne pas former d'oxazoline, et d'autre part d'être stable dans diverses conditions acides et basiques.

Afin de mettre au point les conditions de glycosylation, nous avons choisi de préparer des molécules modèles relativement simples pour vérifier la faisabilité des réactions de glycosylation.

Synthèse de molécules modèles

Stratégie de synthèse

Nous avons choisi d'étudier plus précisément l'influence des groupements benzoate et benzyle sur la glycosylation pour des molécules similaires à celles que nous allons étudier. Pour cela nous avons préparé les deux molécules **105** et **106** (Schéma 36). L'objectif étant de « modéliser » la réaction de glycosylation, nous avons choisi comme accepteur le composé **100**.

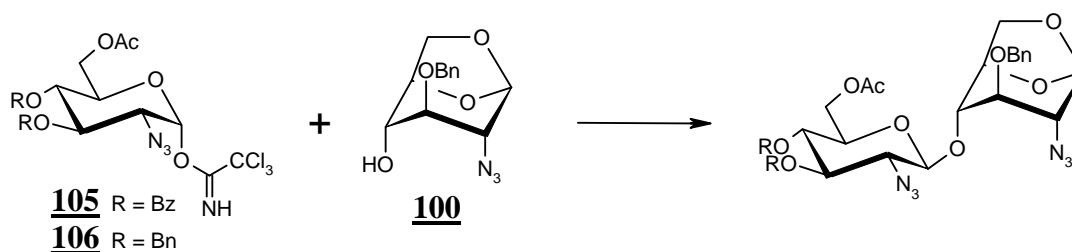


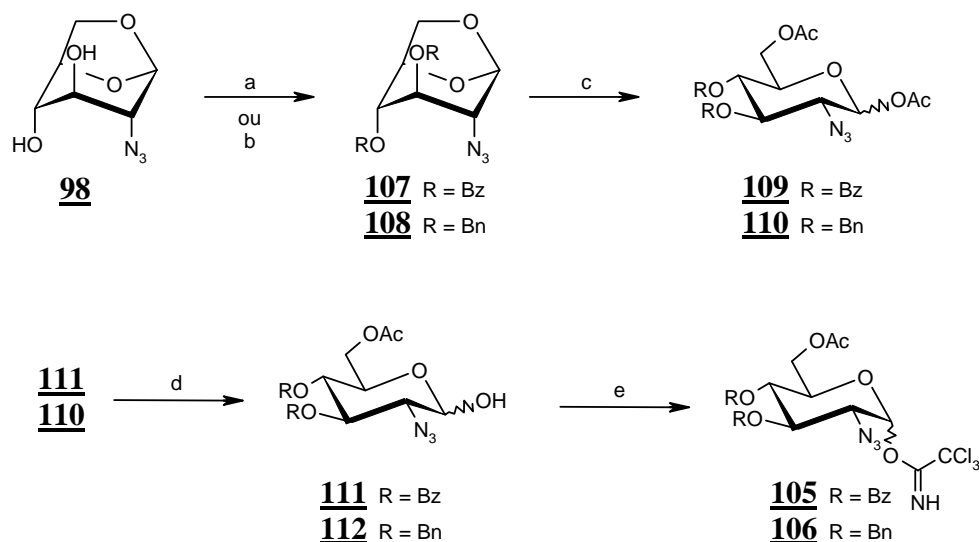
Schéma 36

Synthèse des donneurs de glycosyle **105** et **106**

Ces deux imidates sont obtenus à partir d'un même précurseur, le diol **98**, mentionné dans le paragraphe 2.2.3.3 (cf. page 73).

Dans un premier temps, les fonctions alcool sont protégées par benzylation ou par benzylation dans les conditions classiques (Schéma 37). Le pont 1,6-*anhydro* est alors

ouvert en milieu acide ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{TFA}$). La position anomérique est ensuite désacétylée sélectivement au moyen d'acétate d'hydrazine permettant ainsi d'obtenir les hémiacétals **111** et **112** avec respectivement 83% et 89% de rendement. La position anomérique est ensuite activée par le groupe trichloroacétimide pour fournir les donneurs de glycosyle **105** et **106** sous la forme de mélanges $\alpha:\beta$ dans les proportions respectives de 90:10 et 95:5.

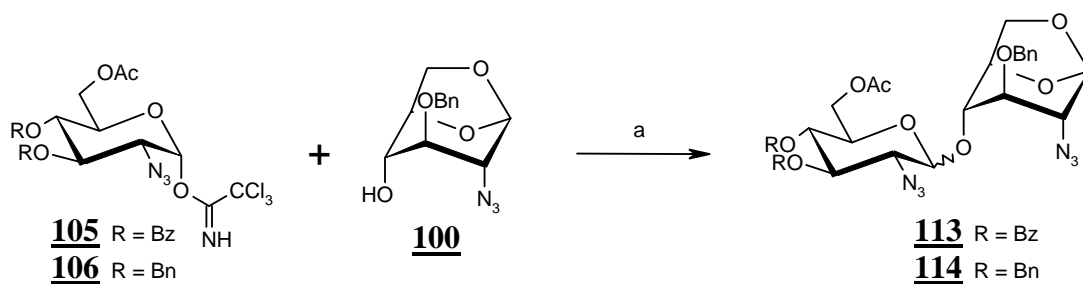


a : BzCl , pyridine, 87% ; b : BnBr , NaH , DMF , 89% ; c : $\text{Ac}_2\text{O}/\text{TFA}$, 90% pour **109** et 90% pour **110** ;
 d : acétate d'hydrazine, DMF , 83% pour **111** et 89% pour **112** ; e : Cl_3CCN , DBU , CH_2Cl_2 , 31% pour **105** et 83% pour **106**

Schéma 37

Synthèses des thiodisaccharides modèles **113** et **114**

La glycosidation du donneur **105** avec l'accepteur **100** dans les conditions décrites précédemment, donne le disaccharide **113** avec 27% de rendement et une proportion $\alpha:\beta$ de 4:6. Parallèlement, la glycosylation mettant en jeu le donneur **106** fournit le disaccharide **114** avec 77% de rendement et une proportion $\alpha:\beta$ de 3:7 (Schéma 38).



a : $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, PhCH_3 , -50°C , [27% pour 113 ($\alpha:\beta$ 4:6), 77% pour 114 ($\alpha:\beta$ 3:7)]

Schéma 38

Les rapports $\alpha:\beta$ ont été évalués par spectrométrie de RMN du proton par intégration des deux signaux correspondant à H-1 α et à H-1 β de l'unité B (Figure 11 et Figure 12).

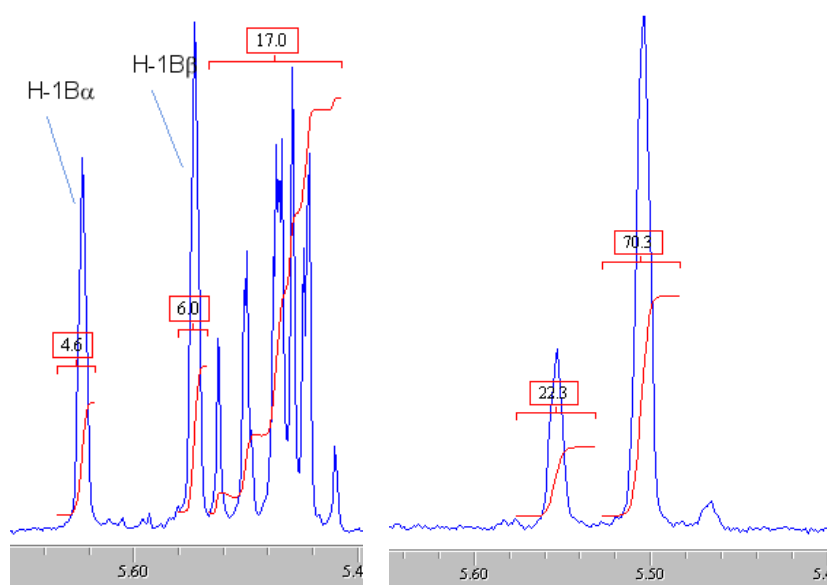


Figure 11 (composé 113)

Figure 12 (composé 114)

Ces résultats confirment que la présence de groupements benzyle en position 3 et 4 du donneur de glycosyle améliore la réactivité par rapport aux groupements benzoate, tout en induisant une meilleure sélectivité.

Conclusion

Compte tenu des différentes réactions de glycosylation réalisées, nous pensons que les meilleures conditions pour obtenir un thiotrisaccharide par extension du côté réducteur à partir d'un thiodisaccharide de type **II**, sont *a priori* :

- l'utilisation du promoteur $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ à basse température et dans le toluène
- l'utilisation d'un donneur et d'un accepteur possédant chacun un groupement benzyle en position 3

Si l'on tient compte également des travaux antérieurs de Beau *et coll.*^{36,38} et des résultats de nos divers essais, la position 2 du thiodisaccharide de type **II** ne devrait plus porter un groupement acétamido, mais un groupement azido ou carbamate. Afin de différencier la fonction amine de l'unité non réductrice du thiotrisaccharide en vue d'une fonctionnalisation, nous avons opté pour un groupement carbamate de benzyle.

Synthèse du thiotrisaccharide 115

Stratégie de synthèse

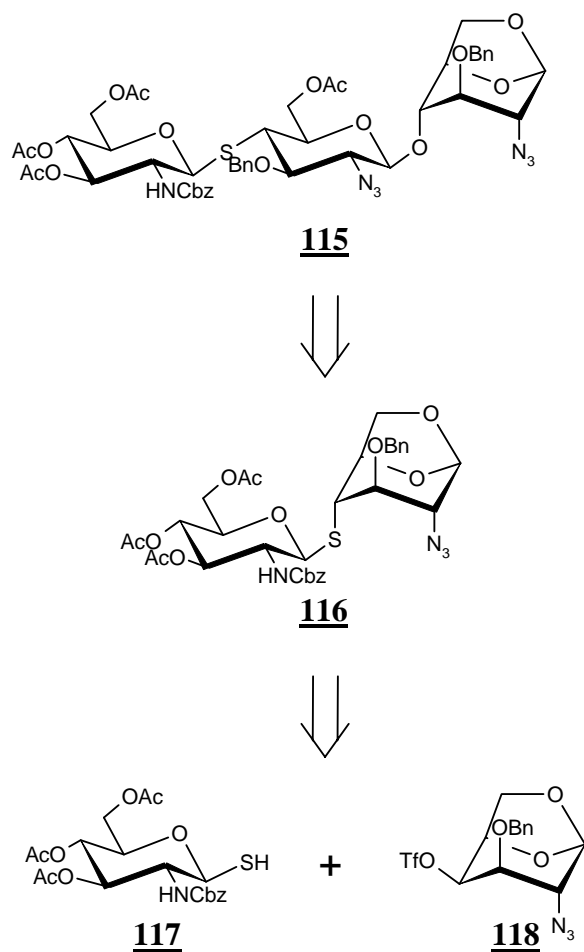


Schéma 39

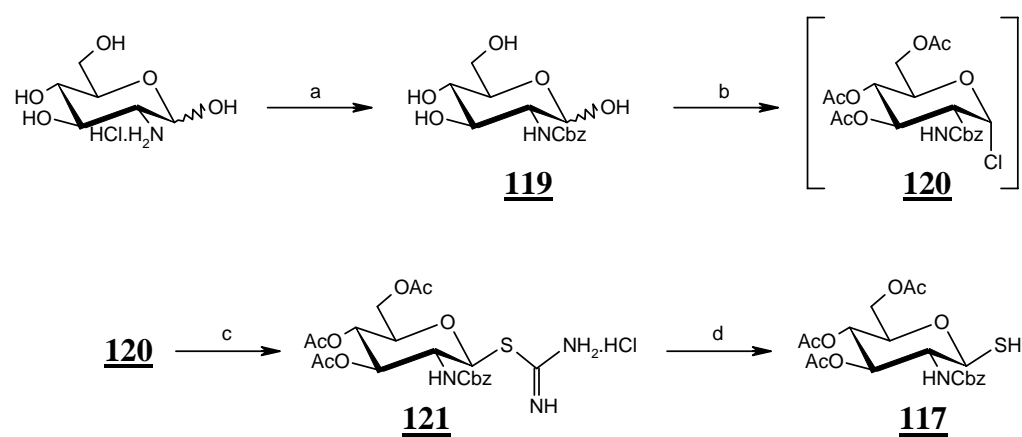
Le thiotrisaccharide **115** sera préparé à partir du thiodisaccharide **116**, par glycosylation du côté réducteur après ouverture du pont 1,6-*anhydro* (Schéma 39). La liaison thioglycosidique sera obtenue par substitution nucléophile entre le thiol **117**, dont la fonction amine est protégée par un groupement carbamate de benzyle, et le triflate **118**, dont l'hydroxyle en position 3 est protégé sous forme de benzyle pour conduire au thiodisaccharide **116**.

Synthèse du thiodisaccharide 116

Synthèse du thiol 117

Comme nous l'avons déjà mentionné (paragraphe 2.1.1, page 60), le groupe thiol anomérique peut être créé par action de l'acide thioacétique suivie d'une hydrolyse en présence de cystéamine⁸⁶. Une autre possibilité a été proposée par Horton et Wolfrom⁸⁷ qui ont montré que l'action de thiourée sur un halogénure anomérique en présence d'une base, conduit à une pseudothiourée qui est hydrolysée en thiol par le sulfite de sodium.

C'est cette dernière méthode que nous avons choisie pour la synthèse du thiol 117 (Schéma 40).



a : chloroformate de benzyle, NaHCO_3 , H_2O , 70% ; b : AcCl ; c : thiourée, acétone, KOH , 47% à partir de 119 ;
d : Na_2SO_3 , acétone/eau, 81%

Schéma 40

Après protection de la fonction amine du chlorhydrate de la *D*-glucosamine par le groupement carbamate de benzyle⁸⁸, le triol est acétylé selon les conditions de Stevens *et al.*⁸⁹ en présence d' AcCl et conduit à l' α -chlorure 120. L'atome de soufre est ensuite introduit par action de thiourée, conduisant au chlorhydrate de la pseudothiourée 121 avec un rendement de 47% à partir de 119. Le thiol est alors obtenu par traitement au sulfite de sodium dans un mélange acétone/eau avec un rendement de 81%.

Ces résultats montrent que cette méthode d'introduction de l'atome de soufre est plus efficace que celle utilisée pour la synthèse du thiol 91 (paragraphe 2.1.1, cf. page 60), puisqu'elle donne un meilleur rendement (25%) que la méthode employant le passage par un thioacétate (6%).

La structure du composé **117** est confirmée par spectrométrie de RMN du proton dans le DMSO- d_6 (Figure 13). On observe notamment à 7.53 ppm le doublet correspondant au proton de l'amine et à 4.75 ppm le doublet correspondant au H-1 avec une constante de couplage de 10.1 Hz caractéristique d'un couplage 1,2 *trans* diaxial ; les signaux des protons aromatiques caractérisent la présence du groupement carbamate de benzyle.

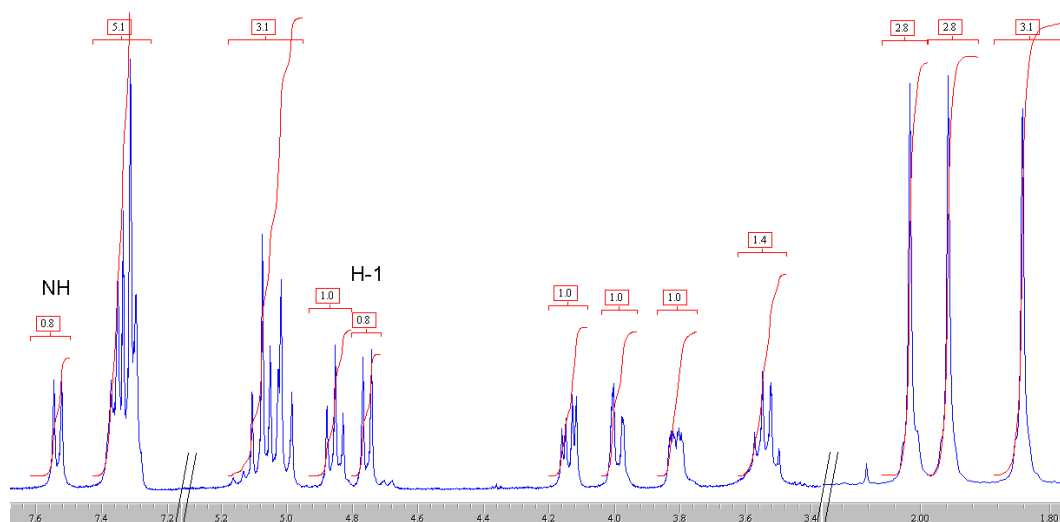
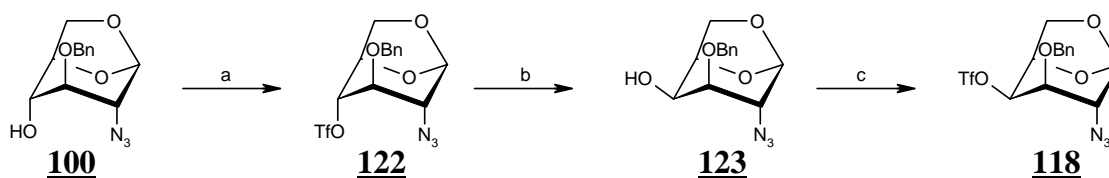


Figure 13

Synthèse du triflate **118**

Le schéma de synthèse utilisé pour le triflate benzoylé **92**, décrit précédemment (paragraphe 2.1.2, page 60), ne peut être appliqué à la synthèse du triflate benzylé **118**. En effet, la dernière étape consiste en une triflation de la position 4, suivie *in situ* de la benzoylation de la position 3. Dans le cas du composé **118**, la triflation suivie de la benzoylation ne donnerait pas le composé attendu en raison de l'instabilité du triflate dans les conditions de la benzoylation (NaH).

Nous avons donc choisi d'utiliser le composé **100**, décrit précédemment (Schéma 33, page 74), en série *D-gluco* et de réaliser une inversion de configuration de l'atome de carbone 4. Dans ce but, nous avons adapté la méthode décrite par Lee *et coll.*⁴² pour réaliser une inversion de configuration de monosaccharides de conformation 4C_1 et de configuration *D-gluco* (Schéma 41).



a : Tf_2O , pyridine, CH_2Cl_2 , -15°C , quantitatif ; b : NaNO_2 , DMF, 68% ; c : Tf_2O , pyridine, CH_2Cl_2 , -15°C , 94%

Schéma 41

L'inversion de configuration est réalisée par l'attaque nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}2$ sur un triflate. Le substituant ainsi introduit est ensuite hydrolysé pour libérer la nouvelle fonction alcool. Les agents nucléophiles généralement utilisés sont le formiate de potassium ou le nitrite de potassium ou de sodium⁹⁰.

La triflation du groupement hydroxyle du dérivé *anhydro* **100** fournit le triflate **122** avec un rendement quantitatif. L'attaque nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}2$ par le nitrite de sodium sur le triflate **122**, suivie d'une hydrolyse, génère le composé **123** de configuration *D-galacto* avec un rendement de 68%. La réaction de triflation permet d'obtenir le composé **118** avec un rendement de 64% à partir du dérivé **100**.

L'étude du spectre de RMN du proton confirme l'inversion de configuration. La comparaison des spectres des composés **100** et **123** permet de noter le changement de multiplicité et de déplacement chimique des signaux des protons H-3 et H-4 (Figure 14). Sur le spectre de RMN du proton du composé **100**, le doublet à 3.66 ppm correspondant à H-4 devient un multiplet à 4.04 ppm pour le composé **123**, en accord avec les couplages axiaux-équatoriaux entre H-4 et H-3 et entre H-4 et H-5 de l'ordre de 5.4 Hz. On note également le changement de forme du signal de H-3, dû au couplage avec H-4.

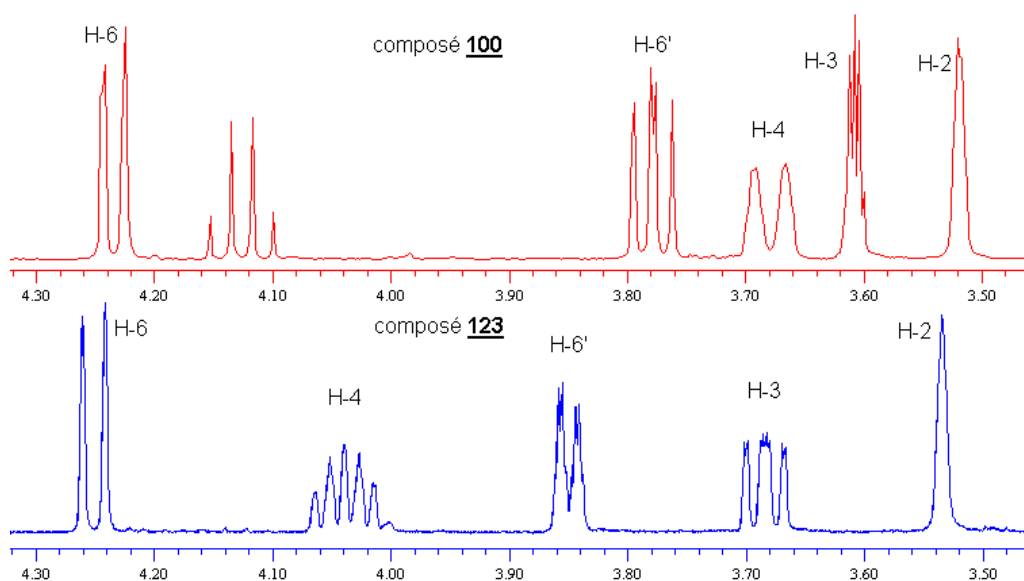
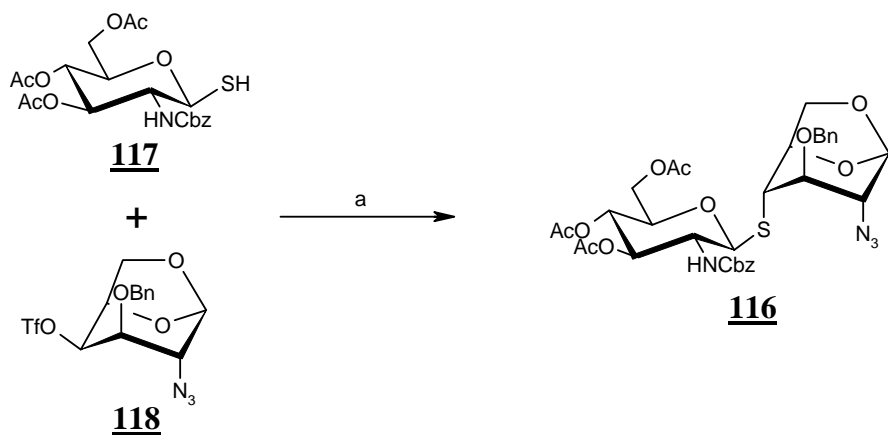


Figure 14

Synthèse du thiodisaccharide **116**

La réaction de substitution nucléophile de type S_N2 utilisant le thiol **117** et portant sur le triflate **118**, en présence de NaH, conduit au thiodisaccharide **116** attendu avec un rendement de 88% (Schéma 42).



a : NaH, DMF, 88%

Schéma 42

Ce résultat confirme que la formation de la liaison thioglycosidique selon une réaction de substitution donne de très bons rendements et présente une excellente stéréosélectivité. En effet, le spectre de RMN du proton (Figure 15) prouve que la stéréoisométrie de la liaison

formée est β -1,4 (H-1A : doublet à 4.89 ppm présentant une constante de couplage de 11.1 Hz) et que la configuration de l'unité réductrice est de type *gluco* confirmant la réaction de type S_N2 (singulet élargi à 3.19 ppm, dû à H-4B, caractéristique d'un couplage *trans* diéquatorial avec H-3B).

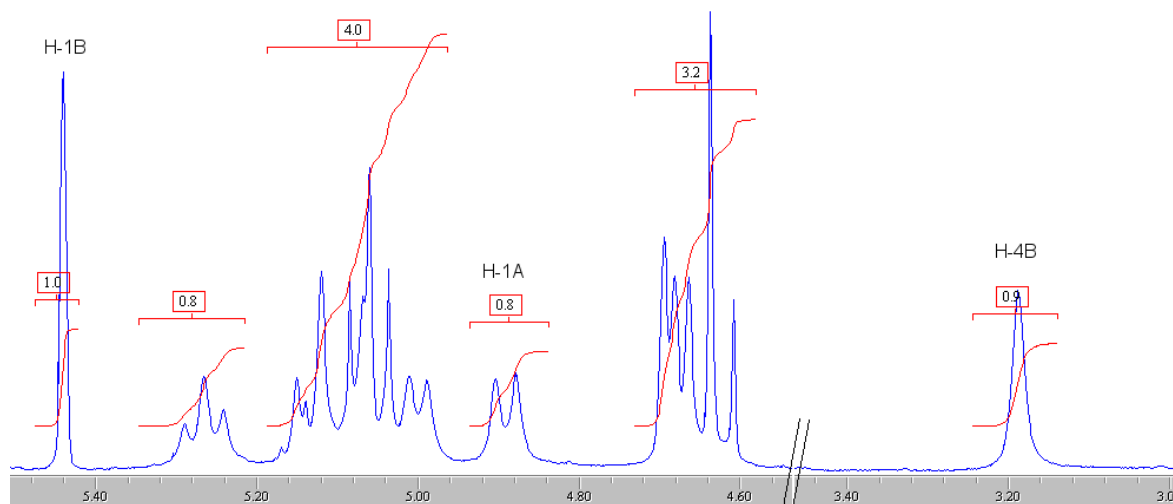


Figure 15

Ayant préparé ce thiodisaccharide, dont la fonction amine de l'unité (A) et le groupe hydroxyle en position 4 de l'unité (B) sont protégés, respectivement, par un carbamate de benzyle et un groupement benzyle, nous avons alors envisagé la synthèse du thiotrisaccharide **115**, décrit précédemment (Schéma 43).

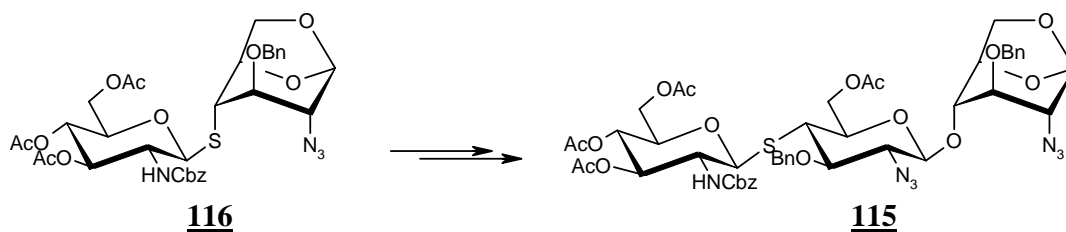


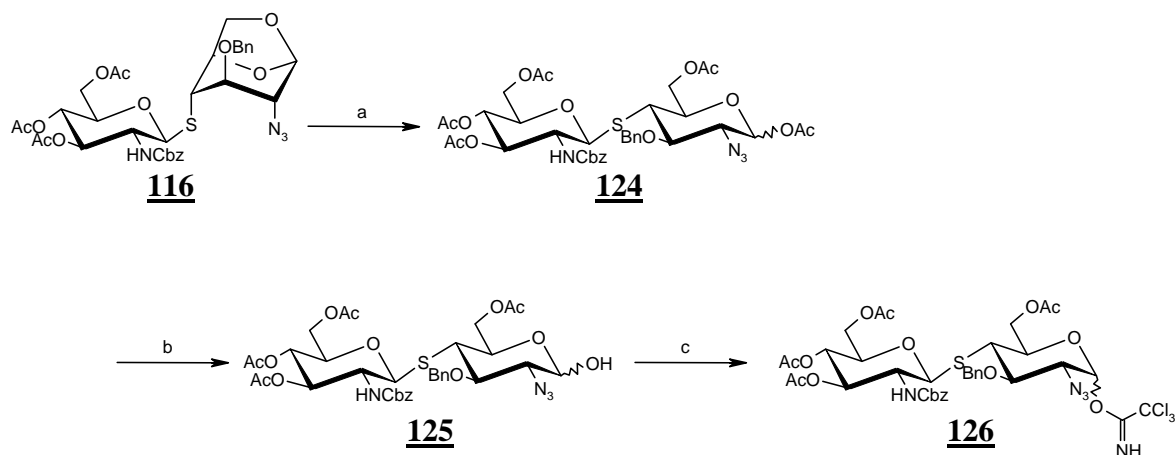
Schéma 43

Synthèse du thiotrisaccharide 115

La préparation du thiotrisaccharide **115** nécessite la synthèse d'un donneur de glycosyle, en l'occurrence un trichloroacétimide, suivie d'une glycosylation.

Préparation du donneur de glycosyle **126**

L'acétylase du pont 1,6-*anhydro* en présence d'un mélange Ac₂O/TFA (9/1) conduit à l'acétate **124** avec 96% de rendement (Schéma 44).



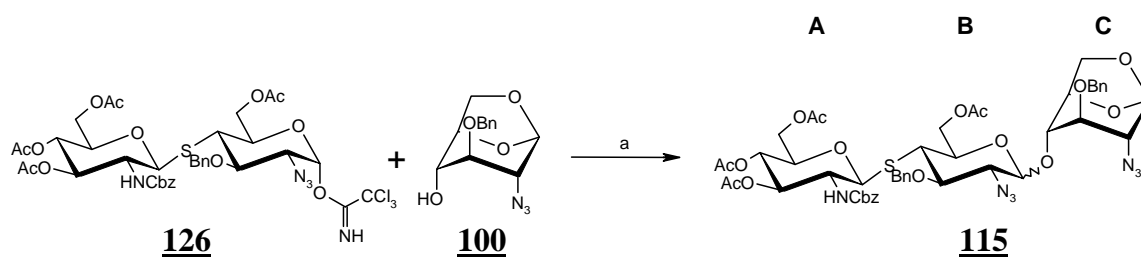
a : Ac₂O/TFA (9/1), 96% (α : β 75:25) ; b : acétate d'hydrazine, DMF, 81% (α : β 6:4) ; c : Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂, 82% (α : β 8:2)

Schéma 44

La position anomérique est ensuite déprotégée sélectivement par action d'acétate d'hydrazine dans le DMF pour fournir l'hémiacétal **125** sous la forme d'un mélange d'anomères (α : β 6:4) avec un rendement de 81%. Enfin, la position anomérique est activée sous la forme d'un trichloroacétimide **126** (mélange d'anomères α et β dans le rapport 8:2) avec un rendement de 82%.

Synthèse du thiotrisaccharide **115**

Dans un premier temps, la réaction de glycosylation est réalisée dans les conditions mises au point pour la synthèse des molécules modèles **113** et **114** (cf. page 77) (BF₃.Et₂O dans le toluène et à basse température) (Schéma 45, Tableau 3, entrée 1). Les résultats n'étant pas satisfaisants (rendement de 24% et rapport α : β environ de 3:1) nous avons réalisé de nombreux essais afin de les améliorer. Ces essais, rassemblés dans le Tableau 3, montrent l'influence de paramètres tels que le solvant, le promoteur et la température.



a : voir tableau 3 pour détails

Schéma 45

Entrée	Promoteur	Solvant	Température (°C)	Rendement (%)	Rapport $\alpha:\beta$
1	BF ₃ .Et ₂ O (0.1 éq.)	PhCH ₃	-78 à -20	24	3:1
2	TESOTf (0.1 éq.)	PhCH ₃	-78 à -20	20	2:1
3	TESOTf (0.2 éq.)	CH ₃ CN	-30 à -10	29	1:2
4	BF ₃ .Et ₂ O (0.2 éq.)	CH ₂ Cl ₂	-78 à -20	57	1:4.7
5	BF ₃ .Et ₂ O (0.3 éq.)	CH ₂ Cl ₂	-78 à -20	30	1:4
6	BF ₃ .Et ₂ O (0.3 éq.)	CH ₂ Cl ₂	température ambiante	*	1:1
7	BF ₃ .Et ₂ O (0.2 éq.)	CH ₂ Cl ₂ / <i>n</i> - Hex 1/3.2	-78 à -20	47	1:3.9
8	BF ₃ .Et ₂ O (0.3 éq.)	CH ₂ Cl ₂ / <i>n</i> - Hex 1/3.2	-78 à -20	*	1:3.7
9	BF ₃ .Et ₂ O (0.2 éq.)	CH ₂ Cl ₂ / <i>n</i> - Hex 5/8	-78 à -20	60	1:3.8

Tableau 3 : Influence de divers paramètres sur l'obtention du thiotrisaccharide 115* les deux anomères n'ont pas été isolés et le rapport $\alpha:\beta$ a été estimé par spectrométrie de RMN du proton

Les rapports $\alpha:\beta$ ont été estimés par spectrométrie de RMN du proton en se basant sur les deux singulets correspondant à H-1C α et à H-1C β respectivement à 5.56 ppm et à 5.52 ppm (Figure 16).

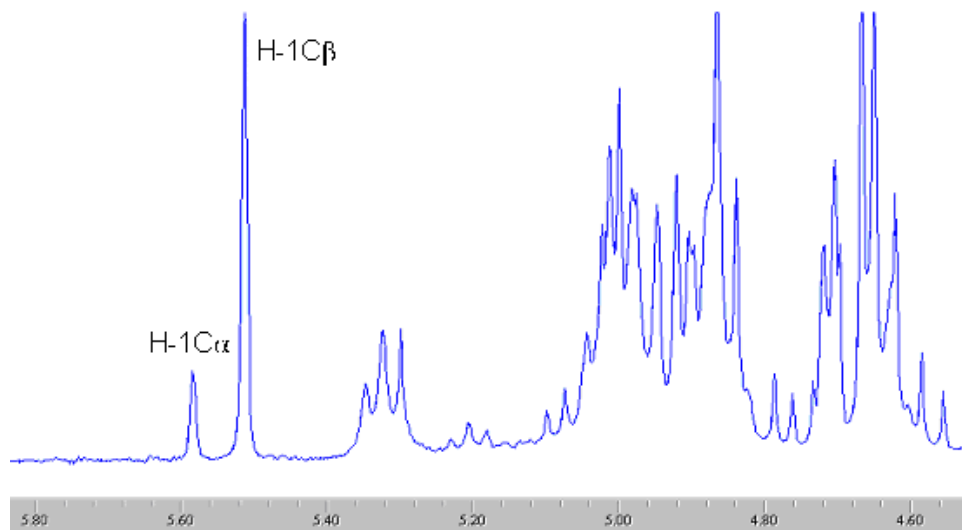
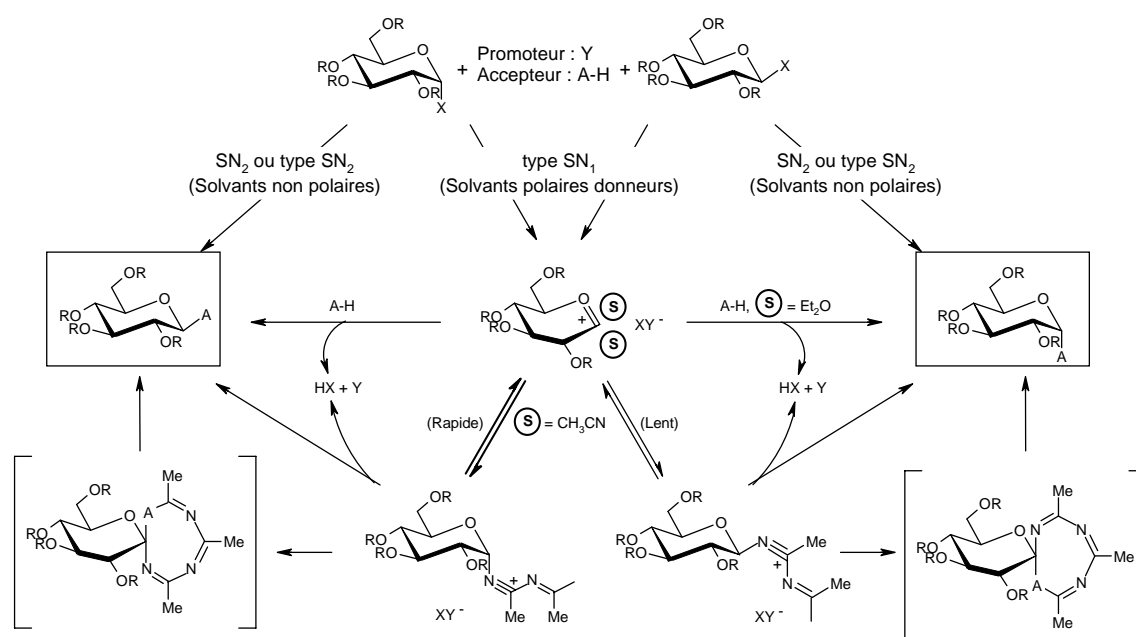


Figure 16

Le deuxième essai correspond à une glycosylation avec le TESOTf dans le toluène (entrée 2). Nous avons observé une relative amélioration du rapport $\alpha:\beta$ (2:1) mais le rendement reste très faible (20%).

Nous avons ensuite utilisé l'acétonitrile (entrée 3), solvant connu pour participer à la réaction⁹¹ et favoriser (en l'absence de groupe participant en position 2) la formation du β -glycoside (Schéma 46).

Schéma 46 : Réactions de glycosylation suivant le solvant utilisé (d'après Schmidt⁹¹)

En effet, l'utilisation de l'acétonitrile conduit plus rapidement à la formation de l'intermédiaire conjugué α -nitrilium-nitrile fournissant le β -glycoside, qu'à la formation du conjugué β -nitrilium-nitrile, pourtant thermodynamiquement plus stable, qui conduit à l' α -glycoside. Les résultats observés lors de cet essai sont en accord avec les études de Schmidt *et coll.*⁹¹, puisque nous obtenons le thiotrisaccharide **115** sous la forme d'un mélange anomérique en faveur de l'anomère β (1:2).

Afin d'augmenter la proportion de l'anomère β , nous avons choisi d'utiliser du $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans le CH_2Cl_2 à basse température, conditions connues^{36,75,76,91} pour favoriser la formation de l'anomère β . Ce résultat est confirmé (entrée 4) : le thiotrisaccharide **115** est obtenu majoritairement sous sa forme β (1:4.7) avec un rendement de 57%.

D'autres essais de glycosylation ont été poursuivis dans le but d'étudier l'influence de différents facteurs tels que le solvant, la température et la quantité de promoteur, sur la stéréochimie de la réaction (entrées 5-9).

De manière globale, on peut déduire que l'utilisation du mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$ comme solvant (entrées 7 et 9), comparativement à l'utilisation de CH_2Cl_2 seul, ne conduit pas à de nettes améliorations de la sélectivité de la réaction (le rapport $\alpha:\beta$ est de 1:3.9 et 1:3.8 au lieu de 1:4.7).

Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration en promoteur (entrées 5 et 8). L'utilisation de plus grandes quantités de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.3 éq. contre 0.2 éq.) n'améliore pas la sélectivité mais diminue le rendement de la réaction qui chute de 57% à 30%. Ceci pourrait s'expliquer par l'hydrolyse de l'imidate due à la présence d'une quantité trop importante d'acide de Lewis.

Comme on pouvait le prévoir, la température a une influence sur la sélectivité et sur le rendement de la glycosylation (entrées 5 et 6). A plus haute température, le produit obtenu sous contrôle thermodynamique (anomère α) est favorisé. En effet, dans les mêmes conditions d'utilisation de promoteur et de solvant, la glycosylation réalisée à -78°C donne le thiotrisaccharide **115** avec un rapport $\alpha:\beta$ de 1:4, alors que la réaction à température ambiante fournit ce même thiotrisaccharide avec un rapport $\alpha:\beta$ de 1:1.

Ces différents essais montrent que les meilleurs résultats sont obtenus par utilisation de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.2 éq.) dans le CH_2Cl_2 à basse température. Ce sont ces conditions que nous avons utilisées finalement pour la synthèse du thiotrisaccharide **115**, obtenu avec 57% de rendement et un rapport $\alpha:\beta$ de 1:4.7 (entrée 4).

La glycosylation conduisant à un mélange des deux anomères ($\alpha:\beta$ environ 1:4.7), plusieurs essais de purification par chromatographie avec divers éluants, différentes phases stationnaires (silice et alumine) et différents débits ont été réalisés sans donner de résultats satisfaisants. Ce travail faisant l'objet d'une collaboration entre notre laboratoire et celui du Pr. Auzanneau à l'université de Guelph (Ontario, Canada), financée par le Fonds France-Canada pour la Recherche (FFCR), la mise au point de la séparation des deux anomères a été effectuée lors de mon séjour au Canada. Cette séparation a été réalisée par HPLC sur un appareil Waters[®] avec une colonne phase normale (PrepNova Pack[®], silice 125 Å, 40 × 100 mm) et un système d'éluants composé d'acétate d'éthyle et d'hexane. La détection a été réalisée par un détecteur UV calibré à 270 nm.

Les meilleures conditions mises au point pour la séparation sont décrites dans la partie expérimentale et comme le montre la Figure 17, elles permettent une séparation efficace des deux anomères avec des temps de rétention de 56.9 min pour l'anomère β et de 68.5 min pour l'anomère α .

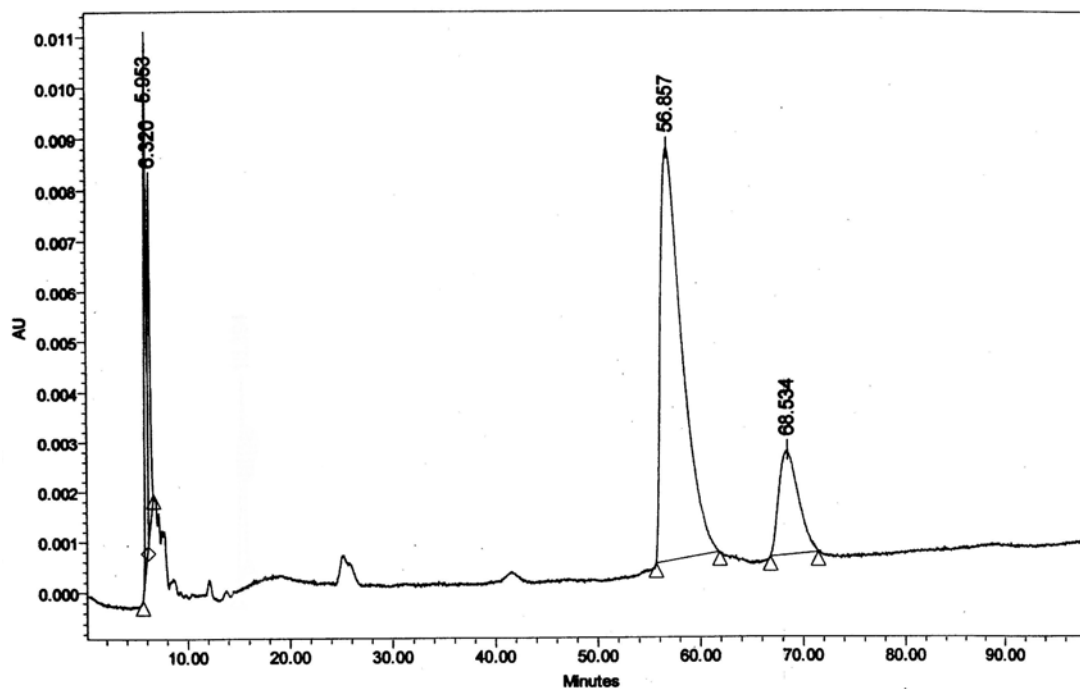


Figure 17

La réalisation de différentes injections en HPLC préparative nous a permis d'obtenir les deux anomères α et β avec les rendements respectifs de 10% et 47%.

Conclusion

Nous avons donc mis au point une synthèse efficace du thiotrisaccharide **115** à partir des deux monosaccharides **117** et **118** avec un rendement global de 26% à partir du triflate **118** (Schéma 47). Nous avons également développé une méthode originale de préparation d'un monosaccharide 1,6-*anhydro* en série *D-galacto* par inversion de configuration.

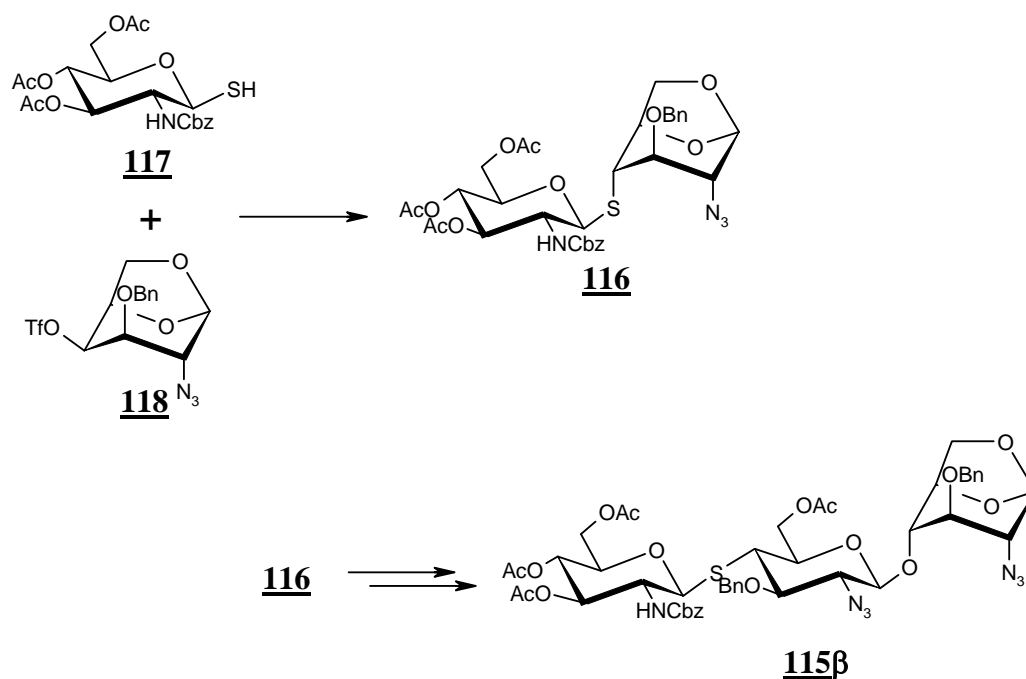


Schéma 47

Le thiotrisaccharide **115β** est un précurseur de la synthèse de thiotétracosaccharides, analogues potentiels de facteurs Nod. Nous avons donc envisagé la synthèse d'un thiotétracosaccharide par extension du côté non réducteur, par glycosylation d'un accepteur, dérivant du thiotrisaccharide **115β**, et d'un donneur de glycosyle possédant un groupement protecteur de la fonction amine différent des groupements protecteurs des autres atomes d'azote.

Synthèse du thiotétracosaccharide 136

Dans le but de préparer un thiotétracosaccharide et en tenant compte des résultats obtenus précédemment, nous avons choisi de préparer un accepteur dérivant du trisaccharide **115β** qui sera couplé avec un donneur de glycosyle activé sous la forme d'un trichloroacétimidate (Schéma 48).

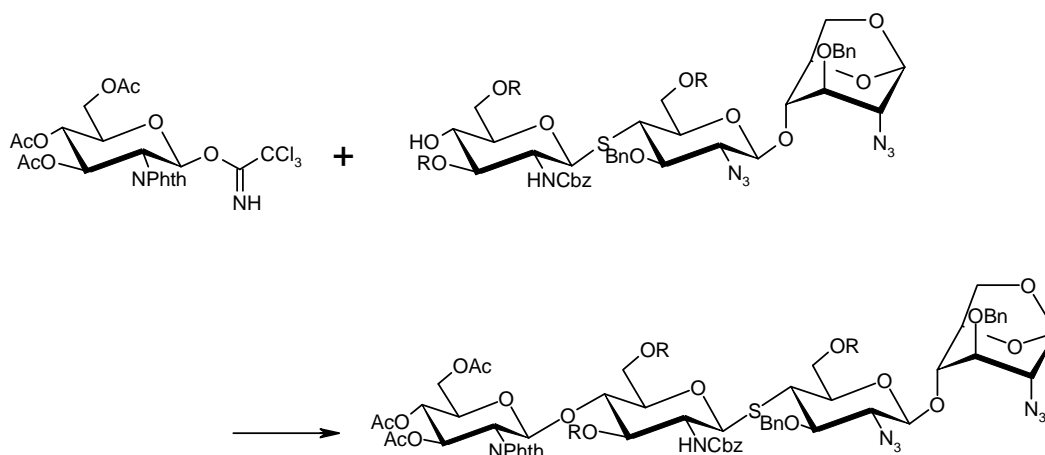
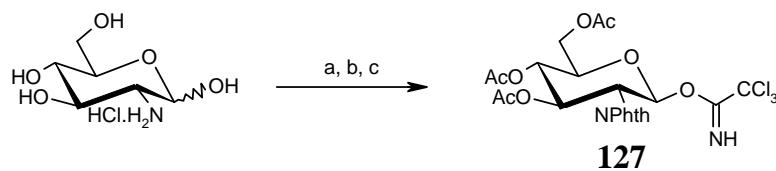


Schéma 48

La fonction amine de ce dernier sera protégée par un groupement phtalimido relativement facile à introduire et à hydrolyser⁹² et permettant, outre la différenciation des fonctions amine en vue de leur fonctionnalisation, une bonne sélectivité

Synthèse du donneur de glycosyle 127

La synthèse de cet imidate est réalisée selon le mode opératoire décrit dans la littérature^{41,93} en trois étapes à partir du chlorhydrate de la *D*-glucosamine (Schéma 49).



a : anhydride phtalique, NaHCO₃, Ac₂O, pyridine ; b : acétate d'hydrazine, DMF ;
c : Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂

Schéma 49

Après protection de la fonction amine par le groupement phtalimido et acétylation *in situ* des groupes hydroxyle, la position anomérique est désacétylée sélectivement en présence d'acétate d'hydrazine. Le trichloroacétimide **127** est alors obtenu selon les conditions classiques de Schmidt^{75,76,91} en utilisant le DBU comme base.

Synthèse de l'accepteur de glycosyle

Le schéma de synthèse envisagé pour préparer l'accepteur de glycosyle, repose sur la formation préalable d'un benzylidène acétal (Schéma 50).

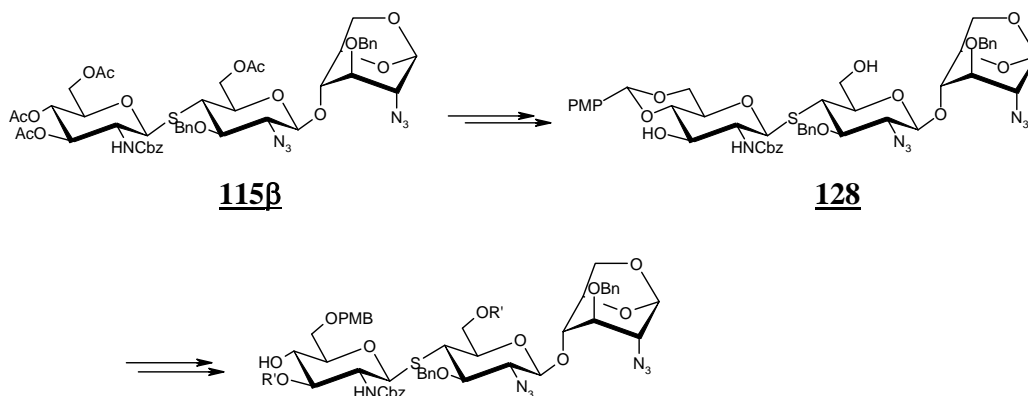


Schéma 50

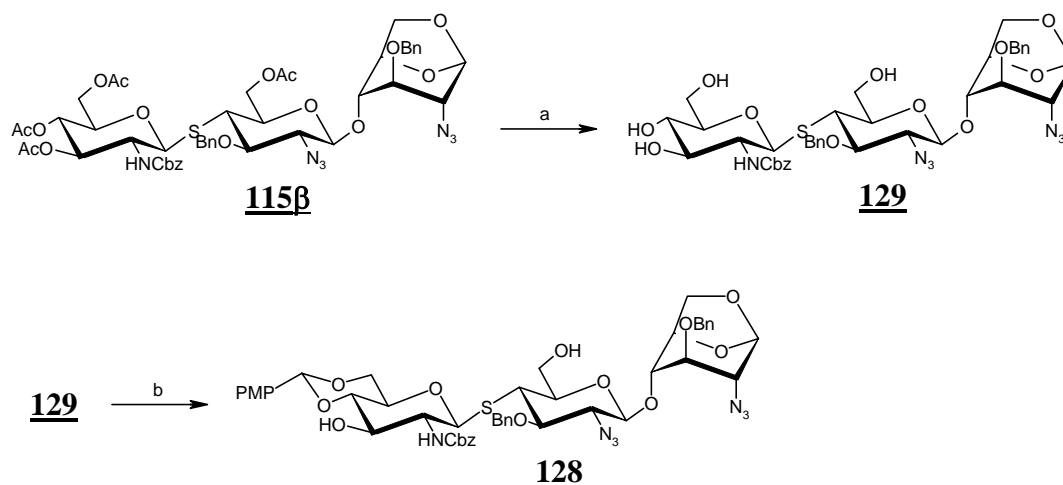
Nous avons opté pour l'utilisation d'un benzylidène de type *p*-méthoxybenzylidène. En effet, l'ouverture de cet acétal ainsi que l'hydrolyse du groupement *p*-méthoxybenzyle, correspondant en position 6, sont relativement faciles à mettre en oeuvre⁹². Après protection des groupes hydroxyle 3 et 6 du thiotrisaccharide **128**, l'ouverture sélective de l'acétal devrait conduire à l'accepteur attendu.

Préparation du thiotrisaccharide **128**

Parmi les méthodes de formation d'acétals de type benzylidène les plus utilisées, on peut citer celle basée sur une transacétalation en milieu acide de l' α,α -diméthoxytoluène dans le DMF en présence d'APTS^{94,95}. Il existe également une méthode de protection en milieu basique utilisant des dérivés d' α,α -dihalogénotoluène. Par exemple, l'utilisation d' α,α -dibromotoluène à reflux dans de la pyridine⁹⁶ a permis la protection des positions 4 et 6 de l' α -*D*-glucopyranoside de méthyle avec un rendement de 86%. Parmi ces différentes méthodes, nous avons choisi la transacétalation en milieu acide.

Dans un premier temps, le thiotrisaccharide **115β** est désacétylé selon les conditions de Zemplén (méthanolate de sodium dans le MeOH) pour fournir le polyol **129** avec un rendement de 90%. Les groupes hydroxyle 4 et 6 de l'unité non réductrice sont alors protégés par le groupe *O*-*p*-méthoxybenzylidène par action du diméthylacétal du *p*-

anisaldéhyde en présence d'acide camphorsulfonique dans l'acétonitrile. Le diol **128** est ainsi obtenu avec un rendement de 73% (Schéma 51).



a : MeONa, MeOH, 90% ; b : diméthylacétal de *p*-anisaldéhyde , CSA, CH₃CN, 73%

Schéma 51

De nombreux essais ont été nécessaires pour mettre au point les conditions précises de cette protection. Tout d'abord, la réaction a été réalisée dans le DMF et le CH₂Cl₂ avec des rendements relativement faibles (moins de 50%), le temps de réaction variant d'une à plusieurs heures. L'utilisation de l'acétonitrile a permis d'augmenter considérablement le rendement (73%) et de réduire le temps de réaction (5 min).

La présence sur le spectre de RMN du proton d'un singulet à 5.43 ppm correspondant au proton acétalique ainsi que celle d'un doublet à 6.86 ppm correspondant à deux protons aromatiques du groupe *p*-méthoxybenzylidène, confirment la structure de l'acétal **128** (Figure 18).

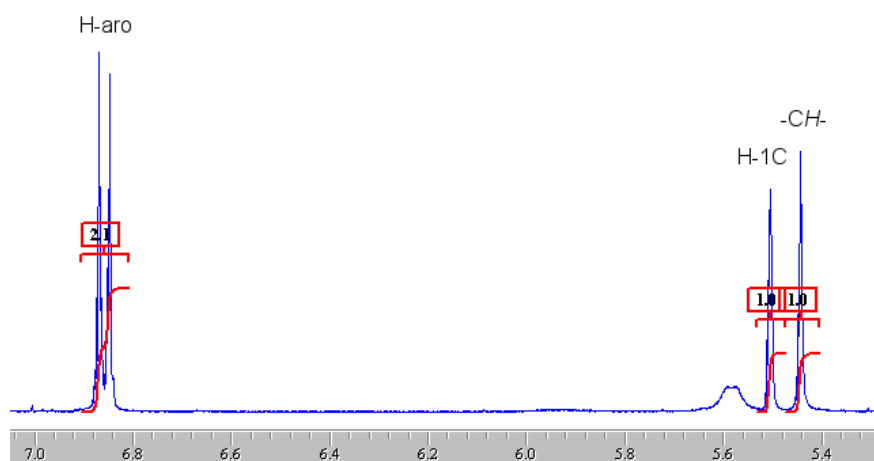
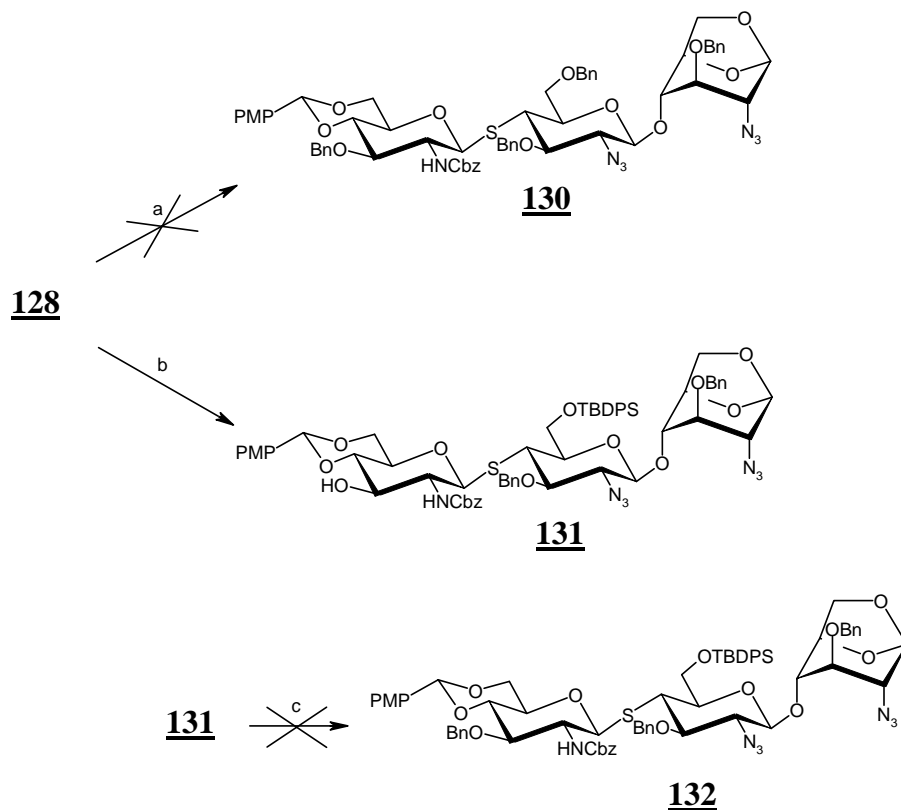


Figure 18

Protection des groupes hydroxyle en positions 3 (unité A) et 6 (unité B)

Protection sous forme d'éther

La protection des fonctions alcool par des groupements benzyle a pour but d'introduire en position 3 un groupement favorisant la glycosylation (cf. conclusions précédentes).



a : BnBr, BaO, Ba(OH)₂·8H₂O, DMF ; b : TBDPSCI, imidazole, DMF, 74% ; c : BnBr, KOH, dioxane

Schéma 52

L'essai de benzylation du diol **128**, en présence de BaO, Ba(OH)₂.8H₂O dans le DMF⁹⁷, conditions donnant de bons résultats pour les dérivés de la *D*-glucosamine, n'a pas conduit au produit **130** attendu (Schéma 52). Il est à noter que des benzylations dans ces conditions ont conduit^{98,99} à la formation de sous-produits issus d'une cyclisation intramoléculaire.

Nous avons alors envisagé une autre méthode décrite pour la benzylation de dérivés de *D*-glucosamine dont la fonction amine est protégée sous forme de carbamate de benzyle⁹⁹. Nous avons au préalable protégé le groupe hydroxyle en position 6 par silylation pour fournir le thiotrisaccharide **131** avec 74% de rendement. La benzylation du groupe hydroxyle en position 4 du composé **131**, au moyen de BnBr et de KOH dans le dioxane^{99,100} n'a cependant pas conduit à la protection attendue.

Un produit secondaire **133** (Figure 19) a été isolé avec un rendement de 22%. Sa structure est confirmée par spectrométrie de RMN du proton et du carbone.

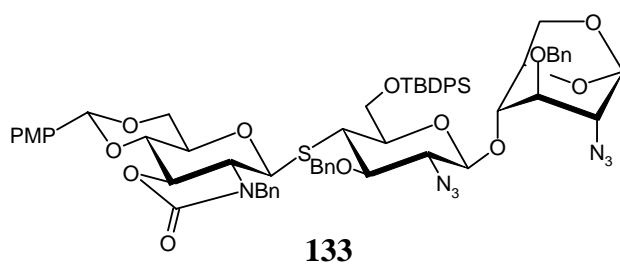


Figure 19

Le spectre de RMN du proton (Figure 20) montre la présence de 29 protons aromatiques (34 attendus pour **132**). De plus, on observe un doublet à 4.62 ppm, possédant une très forte constante de couplage inhabituelle ($J = 15.6$ Hz), correspondant à un proton du $-CH_2-$ du benzyle porté par l'atome d'azote.

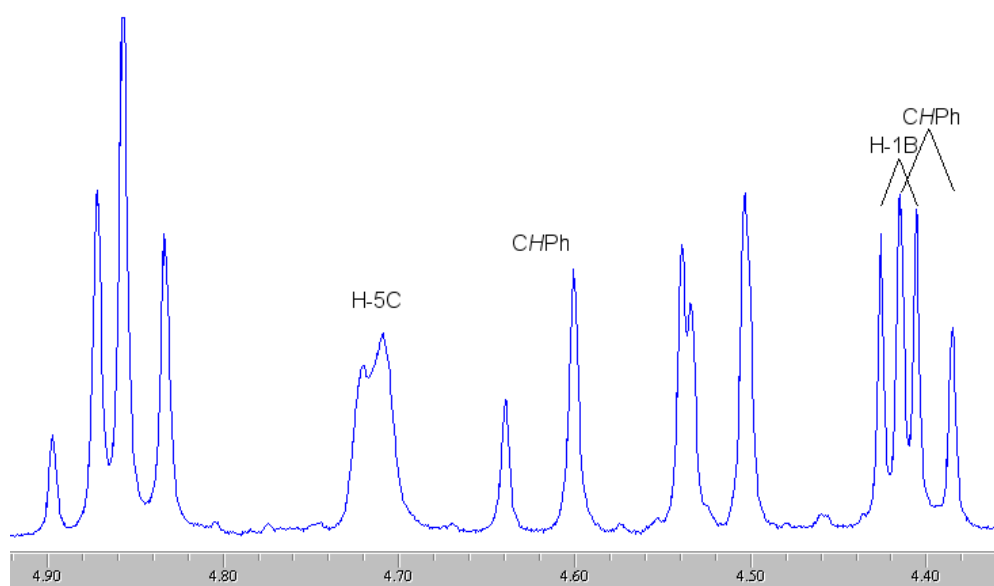


Figure 20

On observe également sur le spectre de RMN du carbone un signal à 47.98 ppm correspondant à l'atome de carbone du groupe méthylène du substituant benzyle porté par l'atome d'azote (Figure 21). Généralement, les atomes de carbone de méthylènes des groupements benzyle, portés par un oxygène, ont des déplacements chimiques compris entre 70 et 90 ppm.

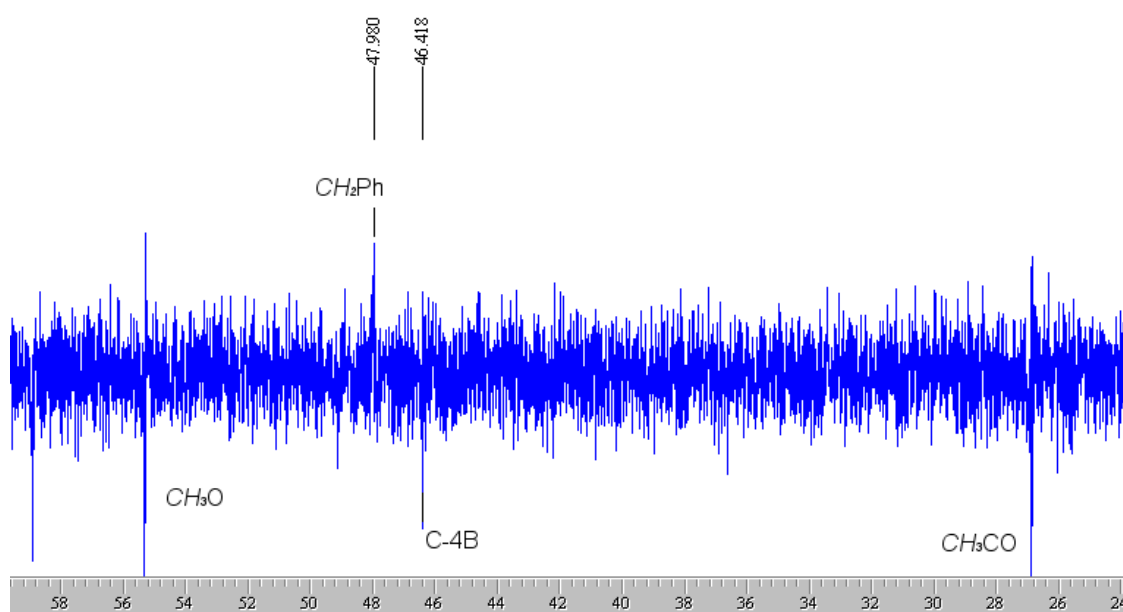


Figure 21

Le même type de sous-produit a déjà été observé par Wessel *et al.*⁹⁹ qui ont décrit les signaux caractéristiques en RMN du proton comme étant deux doublets à 4.54 et 4.06 ppm

avec une constante de couplage géminale de 14.8 Hz. Un aplatissement du cycle pyranosique entraîne l'abaissement de la constante de couplage $J_{1,2}$ et l'augmentation de $J_{2,3}$. Ces caractéristiques spectrales sont en accord avec celles observées pour la benzylation du composé **131**.

Compte tenu des résultats obtenus lors des différents essais de benzylation, nous nous sommes orientés vers la protection des deux groupes hydroxyle libres sous forme d'acétates.

Protection sous forme d'acétate

Le composé **128** est acétylé dans les conditions classiques pour fournir le composé diacétylé **134** avec un rendement de 97% (Schéma 53).

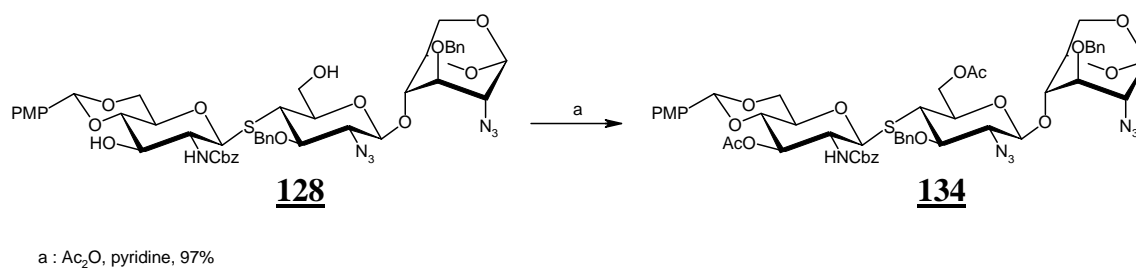
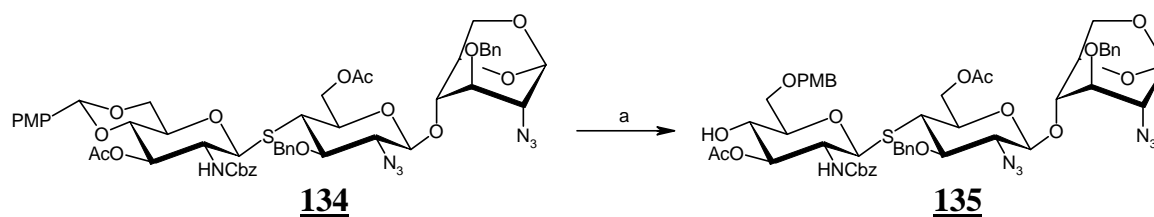


Schéma 53

Synthèse de l'accepteur **135**

La méthode la plus utilisée pour l'ouverture sélective d'un *p*-méthoxybenzylidène, permettant d'obtenir un groupe hydroxyle libre en position 4, utilise le NaBH₃CN et le TFA dans le DMF¹⁰¹. Nous avons appliqué ce procédé et obtenu l'accepteur **135** avec un rendement de 79% (Schéma 54).



a : NaBH₃CN, TFA, DMF, 79%

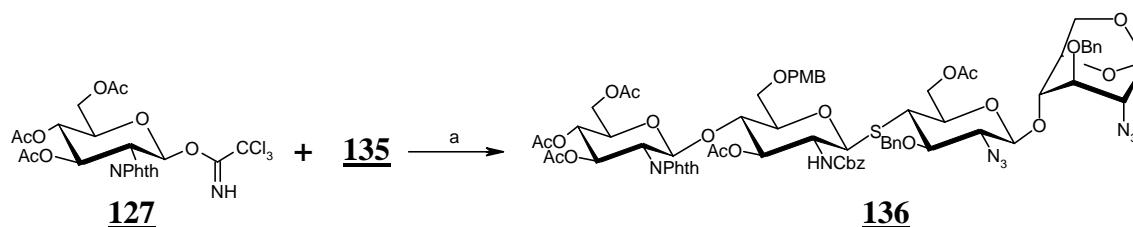
Schéma 54

L'étude du spectre de RMN du proton confirme la structure du composé **135** : présence de deux singulets à 2.02 et à 1.93 ppm, correspondant au deux groupes acétate en position 3 et 6. De plus, sur le spectre du carbone en JMOD, on constate l'apparition d'un signal pair supplémentaire, correspondant au CH₂ du groupe *p*-méthoxybenzyle introduit.

L'accepteur **135** a donc été préparé en quatre étapes à partir du thiotrisaccharide **115** avec un rendement global de 50%.

Synthèse du thiotétrasaccharide 136

La glycosylation a été réalisée dans les conditions mises au point lors de la formation du thiotrisaccharide **115**. Le couplage du donneur **127** et de l'accepteur **135**, en présence de BF₃.Et₂O dans le CH₂Cl₂ et à basse température, fournit le thiotétrasaccharide **136** avec 72% de rendement (Schéma 55).



a : BF₃.Et₂O, CH₂Cl₂, 72%, (α:β 0:1)

Schéma 55

La stéréosélectivité de la glycosylation est excellente puisque la formation d'un composé unique est observée. Il s'agit de l'anomère β car le spectre de RMN du proton révèle à 5.34

ppm un doublet correspondant à H-1A et possédant une constante de couplage $J_{1,2}$ de 8.4 Hz, caractéristique d'un couplage 1,2 *trans* diaxial. Cette attribution est confirmée par l'absence d'un doublet de faible constante de couplage qui correspondrait à H-1A α (Figure 22).

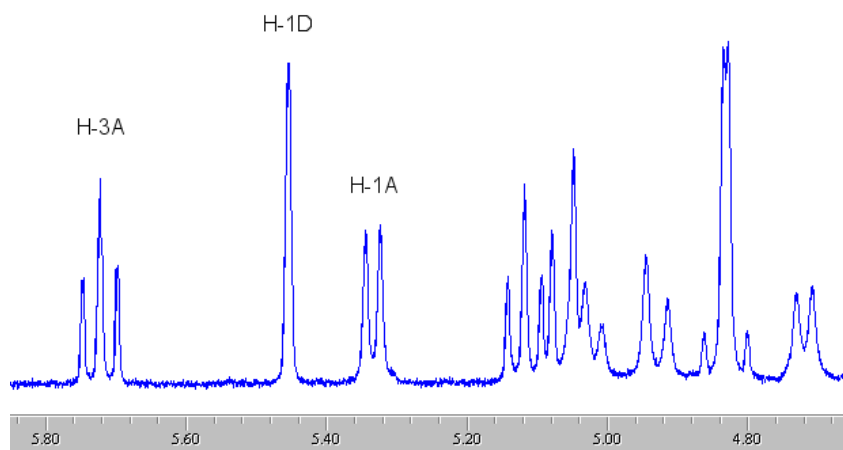


Figure 22: Spectre de RMN du proton du composé 136

Conclusion sur la synthèse chimique du thiotétrasaccharide 136

Nous avons décrit dans ce chapitre la synthèse du thiotétrasaccharide 136, précurseur d'analogues de facteurs Nod, à partir des deux monosaccharides 117 et 118 et avec un rendement global de 9% (Schéma 56).

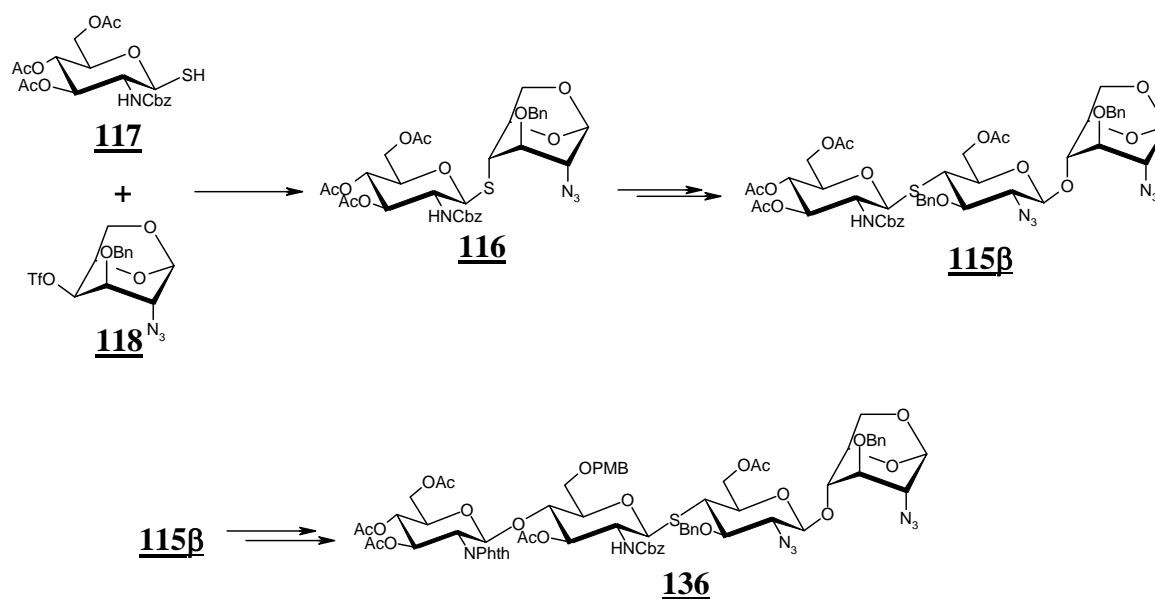


Schéma 56

La préparation du thiotétracosaccharide **136** a nécessité de longues mises au point, notamment pour le choix des groupements protecteurs et des conditions de glycosylation.

La détermination de la nature des groupements protecteurs nous a conduit à reconsidérer l'approche de la synthèse du précurseur thiodisaccharidique de type **II**. Après avoir mis au point la synthèse du triflate **118** par inversion de configuration de l'atome de carbone 4, nous avons amélioré la réaction de substitution nucléophile de type S_N2 entre le thiol anomérique **117** et le triflate **118** de conformation 1C_4 , permettant l'introduction de la liaison thioglycosidique avec un rendement de 88%.

Une étude de l'influence de différents facteurs (promoteur, solvant, température) lors de la réaction de glycosylation nous a permis de mettre au point la préparation du thiotrisaccharide **115β**, obtenu avec 47% de rendement.

Ces conditions de glycosylation, nous ont également permis de former le thiotétracosaccharide **136** avec un rendement de 72%.

Comme nous l'avons souligné précédemment, la synthèse de facteurs Nod ou d'analogues est basée sur la préparation d'un squelette chitinique suivie de sa fonctionnalisation. Ayant préparé le thiotétracosaccharide **136** présentant ce squelette, des travaux ultérieurs devraient permettre sa fonctionnalisation.

Nous avons également envisagé, afin notamment de limiter le nombre d'étapes, de préparer des thioanalogues de facteurs Nod par transfert enzymatique sur des thiodi- et des thiotri-saccharides.

Synthèse par voie enzymatique

La voie enzymatique est une alternative à l'obtention par voie chimique de précurseurs d'analogues de facteurs Nod. Elle permet globalement d'éviter des étapes de protection-déprotection.

A partir d'un thiotrisaccharide et par extension du côté non réducteur, nous envisageons l'obtention d'un thiotétraccharide qui, après fonctionnalisation, serait un analogue potentiel de facteurs de nodulation (Schéma 57). La chaîne grasse pourrait plus aisément être introduite, du fait de la présence d'une amine libre sur l'extrémité non réductrice.

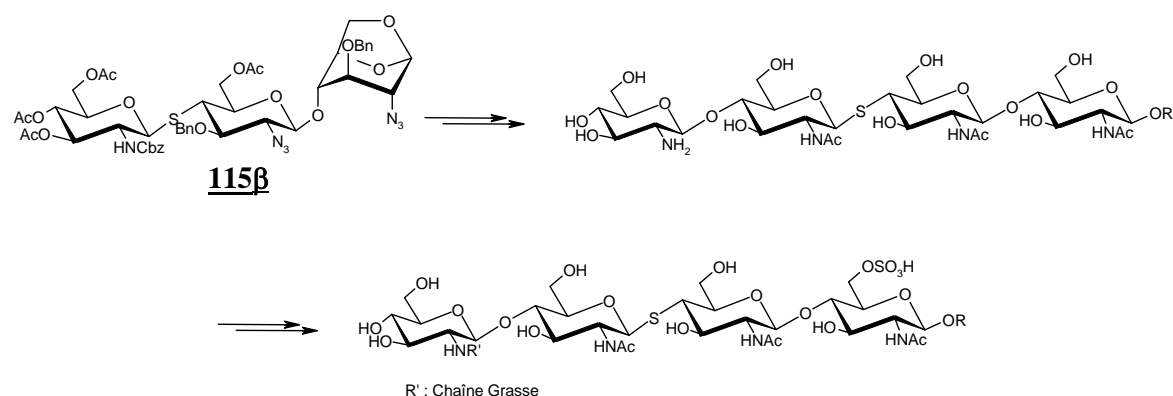


Schéma 57

Nous avons appliqué ce schéma original dans le cas de thiooligosaccharides pour préparer, dans un premier temps, un thiotrisaccharide. La mise au point pour l'obtention du thiotrisaccharide nous permettra d'envisager la préparation d'un thiotétraccharide par transfert enzymatique.

Quelques rappels bibliographiques

La synthèse chimique de biomolécules souvent complexes est limitée par l'utilisation de protections fonctionnelles menant souvent à des procédés multistades aux faibles rendements globaux. Une alternative à ces handicaps est la mise en jeu d'enzymes.

Les réactions enzymatiques présentent deux principaux avantages par rapport aux méthodes classiques de synthèses osidiques¹⁰² :

- La compatibilité avec les milieux aqueux. La plupart des réactions couramment utilisées en chimie organique sont incompatibles avec l'eau qui est pourtant le milieu le mieux adapté aux réactions impliquant des composés polaires, protiques et hydrophiles tels que les sucres. Les enzymes agissent généralement en solution aqueuse, à pH proche de la neutralité et à température ambiante. L'utilisation d'enzymes évite donc de recourir à des réactions de protection-déprotection des groupements fonctionnels.
- La spécificité. Tout d'abord, les réactions mettant en jeu des enzymes, sont considérées comme chimiospécifiques. De plus, ces réactions présentent un caractère de régiospécificité vis-à-vis des groupes hydroxyle présents et donc de la possibilité de multiréactions. Enfin, les enzymes sont stéréospécifiques et ne réagissent qu'avec certains centres stéréogéniques.

Malgré les techniques d'immobilisation sur support permettant d'utiliser les enzymes plusieurs fois, l'isolement de ces dernières reste un travail laborieux, expliquant notamment le coût non négligeable de ces enzymes.

A titre d'exemple, la β -1,4 galactosyltransférase (GalT, EC 2.4.1.38) est isolée à partir du lait de vache¹⁰³. Tout d'abord, le lait dépourvu de graisse est centrifugé à grande vitesse pour éliminer la caséine puis le mélange est traité par chromatographie sur colonne d'UDP-hexanolamine en utilisant comme éluant un mélange GlcNAc et EDTA, permettant ainsi l'obtention la β -1,4 galactosyltransférase.

Deux grands groupes d'enzymes peuvent être utilisés dans la synthèse oligosaccharidique¹⁰⁴ :

- les glycosyltransférases transfèrent des monosaccharides activés généralement sous forme de nucléosides, sur des chaînes d'oligo- ou de poly-saccharides (Schéma 58).
- les glycosylhydrolases, outre la coupure des liaisons glycosidiques, peuvent former des liaisons interglycosidiques dans certaines conditions entraînant l'inversion de l'équilibre.

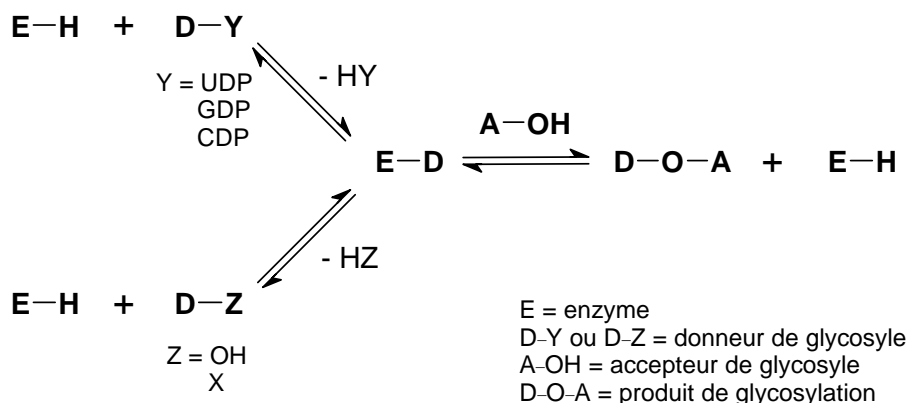
GlycosyltransféraseGlycosylhydrolase

Schéma 58 (d'après Stiller *et al.*¹⁰⁵)

Nous exposerons essentiellement l'utilisation des glycosyltransférases car les glycosylhydrolases présentent quelques inconvénients majeurs dans la synthèse saccharidique. En effet, la plupart du temps, ces enzymes ne sont pas régiospécifiques ; elles entraînent la formation de nombreux produits et par conséquent des difficultés de purification se traduisant par des rendements faibles. De plus, beaucoup de glycosylhydrolases catalysent la formation prépondérante de liaisons 1-6¹⁰⁶ alors que les structures de la plupart des glycoconjugués possèdent les liaisons 1-2, 1-3 ou 1-4.

Les glycosyltransférases, quant à elles, ont le grand avantage d'être régiospécifiques. Dans la plupart des cas, ces enzymes sont hautement spécifiques vis-à-vis de l'accepteur et il est possible de glycosyler seulement un saccharide présent dans un mélange de sucres ou en tant que partie d'une structure oligosaccharidique complexe.

Souvent, les oligosaccharides supérieurs sont préparés de manière chimioenzymatique : c'est-à-dire que des méthodes chimiques sont utilisées pour la synthèse des oligosaccharides accepteurs et les glycosyltransférases sont utilisées pour les étapes finales de glycosylation. Une alternative est l'utilisation des glycosylhydrolases, abondantes, pour synthétiser de « petits » oligosaccharides et les glycosyltransférases pour les dernières étapes de la glycosylation pour lesquelles la régiospécificité doit être maximale¹⁰⁷.

Les glycosyltransférases nécessitent l'activation du sucre à transférer, sous forme de nucléoside¹⁰⁸. Ces nucléosides peuvent être préparés soit par voie chimique¹⁰⁹, soit par voie enzymatique¹¹⁰. La plupart des monosaccharides comme le *D*-glucose, le *D*-galactose, la *N*-

acétyl-*D*-glucosamine, la *N*-acétyl-*D*-galactosamine ou le *D*-xylose, sont activés *via* leur dérivé uridine-5'-diphosphate (UDP), alors que le *D*-mannose ou le L-fucose sont activés en tant que dérivé du guanosine-5'-diphosphate (GDP) (Figure 23).

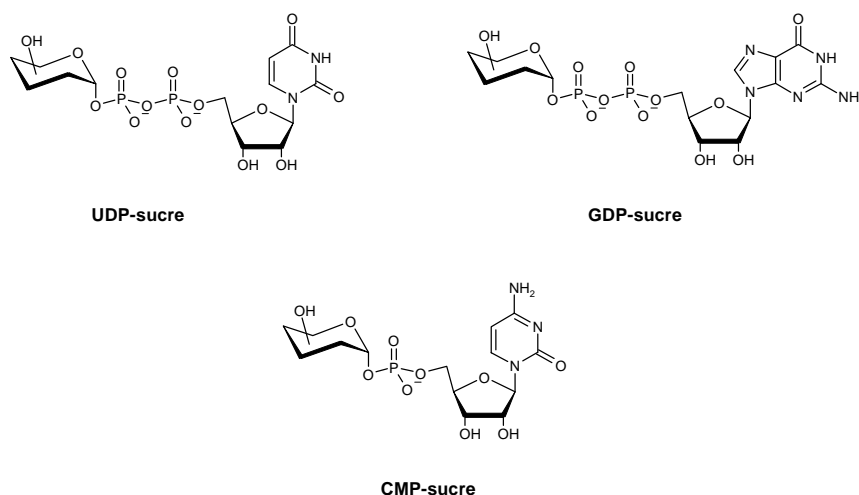


Figure 23

Ces nucléosides sont généralement préparés à partir d'un saccharide-1-phosphate et d'un nucléotide triphosphate. Comme les nucléotides triphosphates sont extrêmement chers, des méthodes ont été développées pour les préparer à partir de monophosphates moins coûteux, comme le cytosine-5'-monophosphate¹¹¹ (CMP) ou le guanosine-5'-monophosphate¹¹² (GMP) (Figure 24).

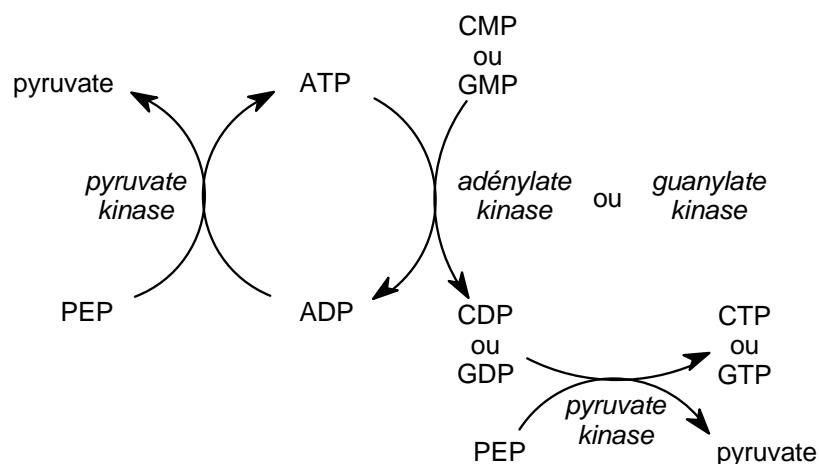


Figure 24 (d'après Stiller *et al.*¹⁰⁵)

Le CMP ou le GMP sont convertis en CDP ou en GDP par action respectivement de l'adénylate kinase ou de la guanylate kinase. Dans ce processus, une unité de phosphate est apportée par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) qui est transformée en adénosine-5'-diphosphate (ADP). La régénération de l'ATP et la phosphorylation de CDP ou de GDP, respectivement, en CTP ou en GTP, est réalisée par l'action de la pyruvate kinase en

présence de phosphoénolpyruvate (PEP). La combinaison de ces deux réactions enzymatiques permet la synthèse de CTP ou de GTP à partir des monophosphates correspondants moins coûteux.

A titre d'exemple, la biosynthèse des antigènes A et B du groupe sanguin est catalysée par les glycosyltransférases GTA (EC 2.4.1.40) et GTB (EC 2.4.1.37)¹¹³ (Schéma 59).

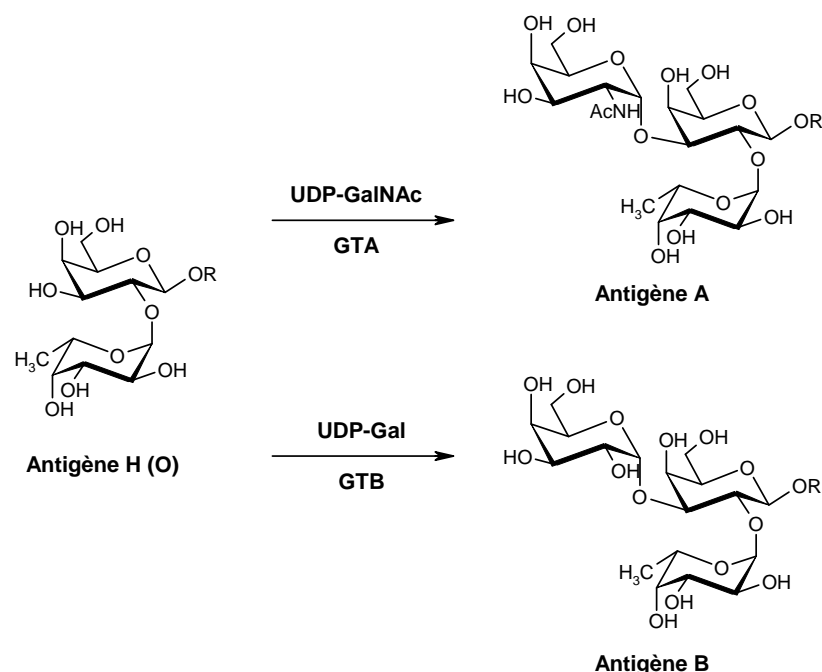


Schéma 59

La GTA catalyse le transfert d'une unité de *N*-acétyl-*D*-galactosamine (GalNAc) à partir de l'UDP-*N*-acétyl-*D*-galactosamine (UDP-GalNAc) sur l'antigène H (O) pour fournir l'antigène A. La GTB utilise le même accepteur mais catalyse le transfert d'une unité de *D*-galactose (Gal) à partir de l'UDP-*D*-galactose (UDP-Gal) pour former l'antigène B.

La technique utilisée au laboratoire met en jeu la β-1,4 galactosyltransférase et l'UDP-*D*-glucosamine (UDP-GlcNH₂). En effet la β-1,4-galactosyltransférase, qui n'est pas spécifique d'un substrat, peut aussi bien transférer de l'UDP-*D*-glucose, de l'UDP-4-désoxy-*D*-glucose, de l'UDP-*L*-arabinose^{107,114} que l'UDP-*D*-glucosamine¹¹⁵.

Dans le cadre du programme de collaboration franco-canadienne, les transferts enzymatiques ont été réalisés au sein du laboratoire du Pr. Auzanneau. Dans un premier temps, le transfert a été réalisé sur un thiodisaccharide. Il a été également envisagé de l'appliquer à la préparation d'un thiotétrасaccharide.

Synthèse du thiotrisaccharide 138

Stratégie de synthèse

La β -1,4 galactosyltransférase transfère une unité de *D*-glucosamine sur l'unité non réductrice d'un sucre dérivé de la chitine. La synthèse d'un thiotrisaccharide par transfert enzymatique nécessite la préparation d'un thiodisaccharide totalement déprotégé, constitué de deux unités de *D*-glucosamine. Nous avons envisagé d'introduire en position anomérique du thiodisaccharide un groupement persistant sous forme d'un anomère unique afin d'éviter les problèmes de purification et d'identification des produits obtenus après le transfert enzymatique. Nous avons donc choisi le groupement allyle qui possède plusieurs avantages (Schéma 60).

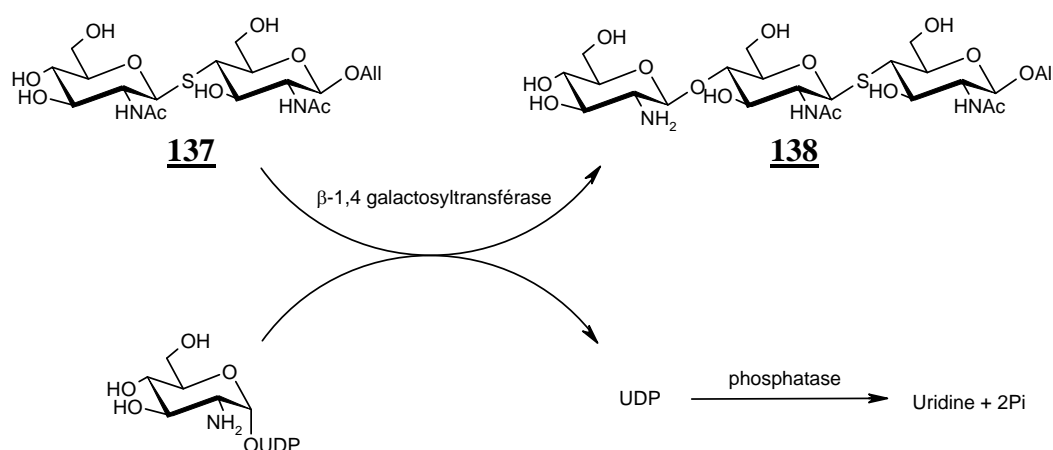


Schéma 60

En effet, en plus de son rôle protecteur de la position anomérique, il permettrait, dans une perspective de greffage sur support solide des analogues de facteurs Nod obtenus, d'étudier la relation structure-activité entre les chitinases et leurs substrats, par l'étude de l'hydrolyse de ces analogues. Cette immobilisation permettrait également de mieux comprendre le mécanisme de reconnaissance des facteurs Nod par leurs récepteurs membranaires sur les poils racinaires, en étudiant les interactions entre les analogues de facteurs Nod immobilisés et ces récepteurs.

Le thiodisaccharide **137** nécessaire au transfert enzymatique, sera préparé à partir du thiodisaccharide **139** obtenu à partir du 1-thiol **91** et du triflate **118** par substitution nucléophile (Schéma 61).

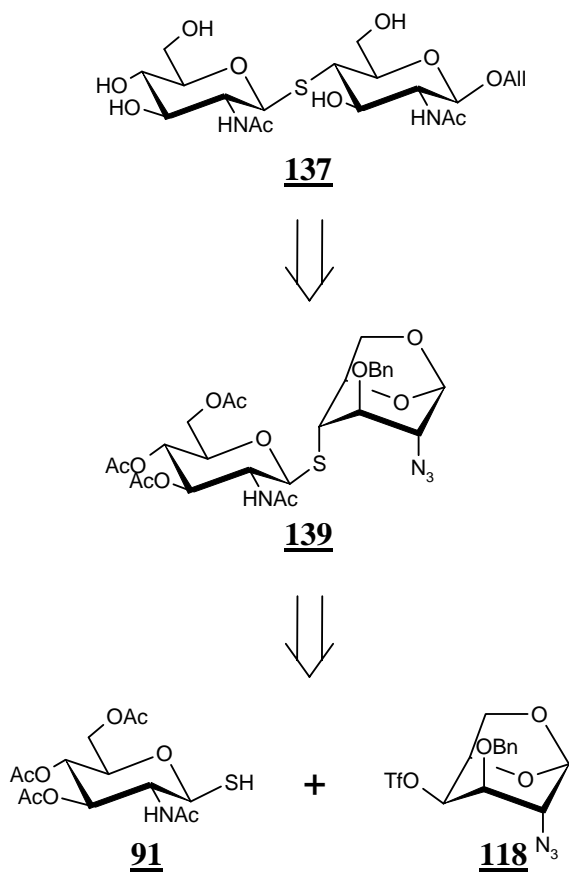
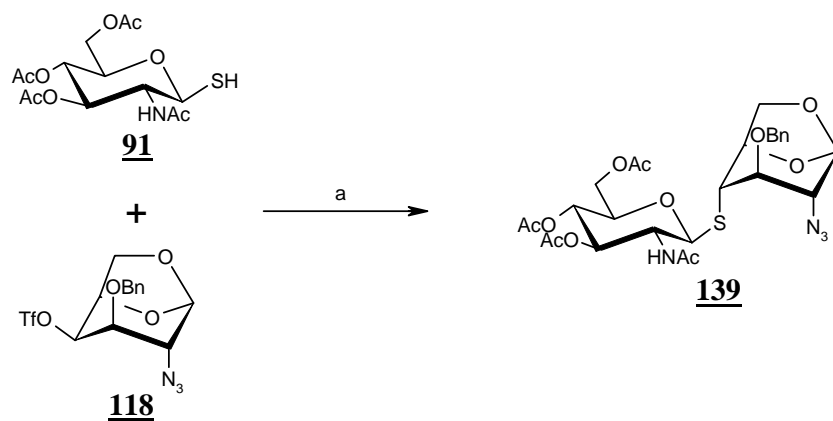


Schéma 61

Synthèse de l'accepteur 137

Synthèse du thiodisaccharide **139**

La réaction de substitution nucléophile entre le 1-thiol **91** disponible au laboratoire et le triflate **118**, dans les conditions précédemment décrites, conduit au thiodisaccharide **139** avec un rendement de 90% (Schéma 62).



a : NaH, DMF, 90%

Schéma 62

La formation d'une liaison β est démontrée par l'apparition sur le spectre de RMN du proton, à 4.93 ppm, d'un doublet correspondant à H-1A caractérisé par une constante de couplage de 10.4 Hz. La configuration *gluco*, et par conséquent la substitution de type S_N2 est confirmée par la présence d'un singulet élargi à 3.82 ppm correspondant à H-4B (Figure 25).

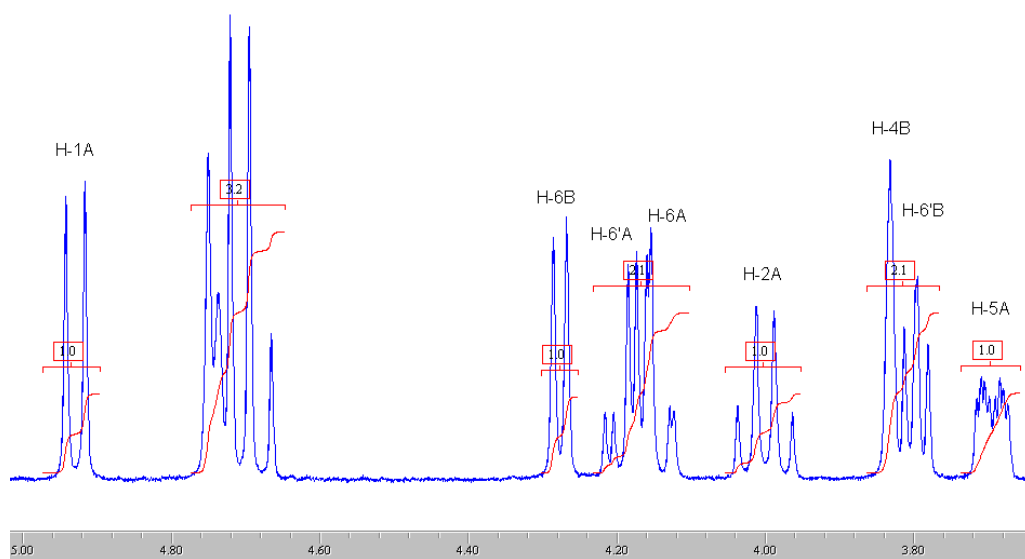


Figure 25

Synthèse du thiodisaccharide 137

Le Schéma 63 présente la stratégie utilisée pour accéder au thiodisaccharide 137, accepteur de glycosyle.

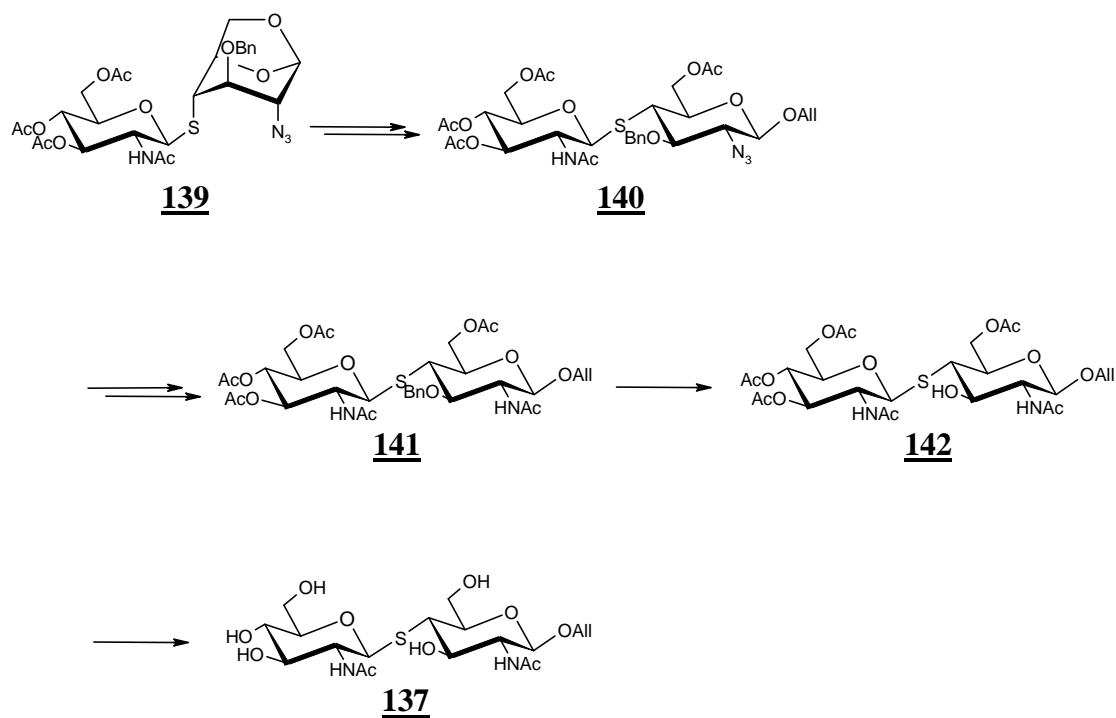


Schéma 63

L'allyl-glycoside **140** a été préparé par glycosylation suivant le procédé décrit précédemment (paragraphe 2.3.3.2, page 87). La réduction de l'azoture en présence de zinc suivie de l'acétylation *in situ* fournit le composé **141**. L'expérience du laboratoire montre que la réaction de débenzylation par hydrogénolyse en présence de Pd/C est inefficace sur des thiooligosaccharides. Nous avons alors opté pour la méthode utilisée par Padrón *et al.*¹¹⁶ ou Rodebaugh *et al.*¹¹⁷ consistant à réaliser des réactions de débenzylation au moyen de chlorure de fer (FeCl₃) dans le CH₂Cl₂. Nous avons alors réalisé la débenzylation du thiodisaccharide **141** en présence de FeCl₃. Cette débenzylation n'a pas formé le composé **142** escompté. En effet, nous avons isolé (rendement de 51%) un produit dont les spectres de RMN du proton semblent être en accord avec la structure proposée sur la Figure 26.

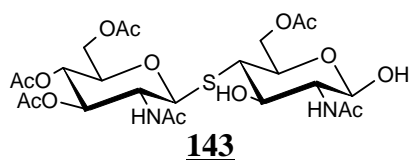


Figure 26

Sur le spectre de RMN du proton du composé **143**, on peut constater la disparition à la fois des signaux correspondant aux protons aromatiques, mais également ceux relatifs aux protons allyliques. On remarque également la présence du seul anomère β .

Le groupement allyle n'étant pas stable dans les conditions de la débenzylation en présence de FeCl_3 , nous avons décidé de réaliser la débenzylation avant l'introduction de ce groupement.

Nouvelle stratégie de synthèse

La débenzylation du groupe hydroxyle en position 3 est réalisée avant l'introduction du groupement allyle en position anomérique. La réduction du groupement azido et la désacétylation des groupements hydroxyle devraient fournir le thiodisaccharide **137** (Schéma 64).

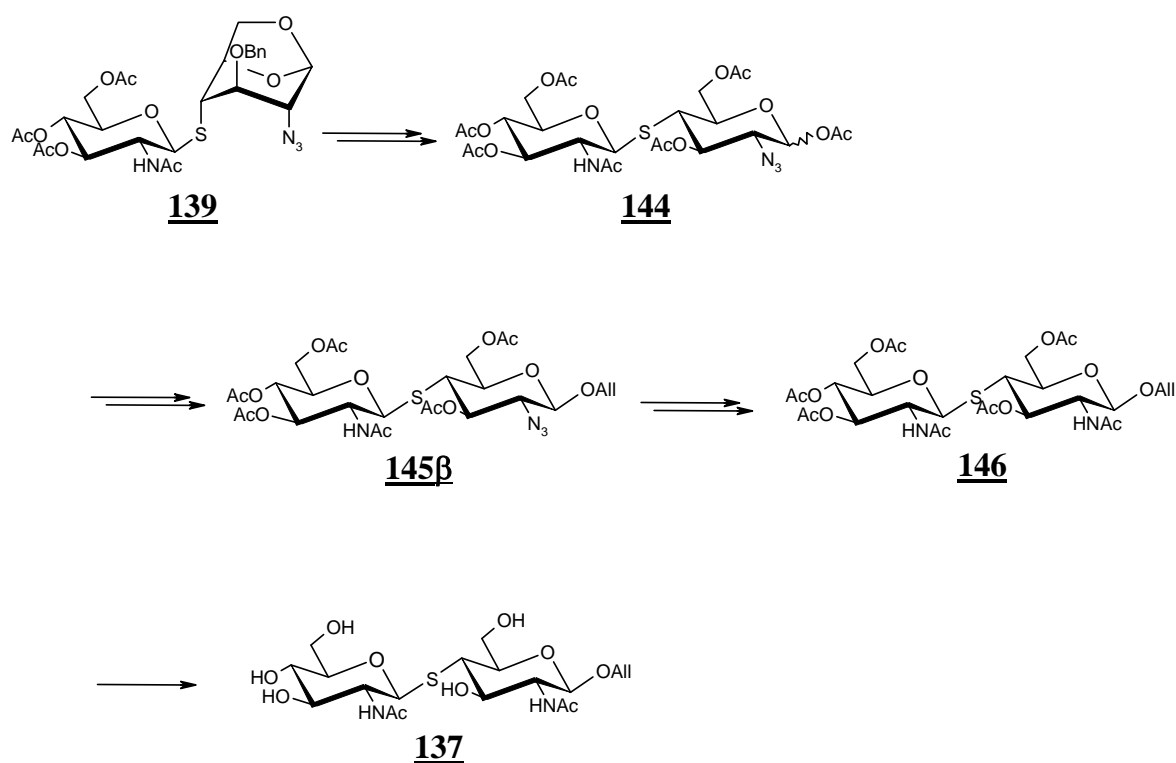
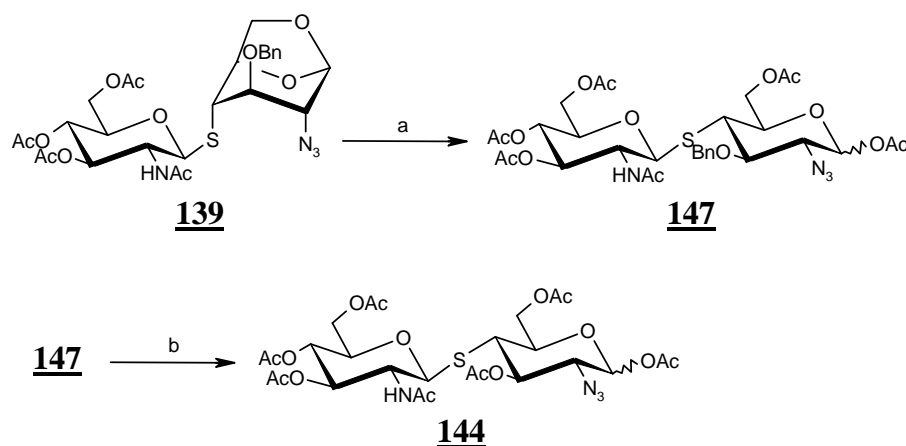


Schéma 64

Synthèse du thiodisaccharide **144**

Le thiodisaccharide **147** est obtenu avec 96% de rendement par acétylolyse du pont 1,6-*anhydro* (Schéma 65).



a : Ac₂O/TFA (9/1), 96% (α : β 65:35) ; b : 1) FeCl₃, CH₂Cl₂, 2) Ac₂O, pyridine, 62% (α : β 80:20)

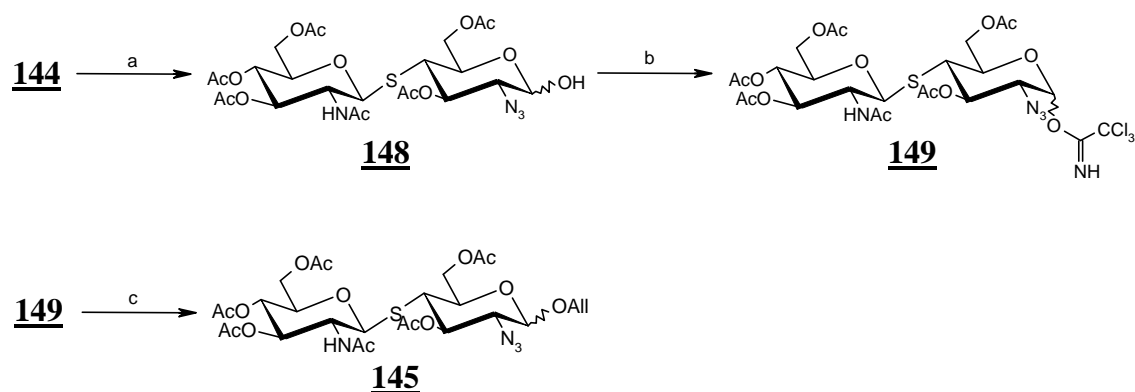
Schéma 65

Le composé **147** est ensuite débenzylé selon les conditions précédemment évoquées (FeCl₃, CH₂Cl₂), puis acétylé *in situ* pour fournir le thiodisaccharide **144** avec 62% de rendement. La modification du rapport α : β entre les composés **147** et **144**, en faveur de l'anomère α , proviendrait de l'hydrolyse préférentielle de l'acétate β lors de la débenzylation.

En accord avec la structure du thiodisaccharide **144**, le spectre de RMN du proton montre l'absence de signaux correspondant aux protons aromatiques et l'apparition d'un signal supplémentaire correspondant à l'acétate anomérique.

Synthèse du thiodisaccharide **145**

Le thiodisaccharide **145** est obtenu en 3 étapes à partir du composé **144**. La déprotection sélective de ce dernier par l'acétate d'hydrazine fournit l'hémiacétal **148** avec 75% de rendement. Le trichloroacétimidate **149** est ensuite obtenu par traitement avec le DBU et Cl₃CCN dans le CH₂Cl₂, avec un rendement de 95% (rapport α : β 85:15) (Schéma 66).



a : acétate d'hydrazine, DMF, 75% ($\alpha:\beta$ 70:30) ; b : Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 , 95% ($\alpha:\beta$ 85:15) ; c : AlIOH , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 83% ($\alpha:\beta$ 10:90)

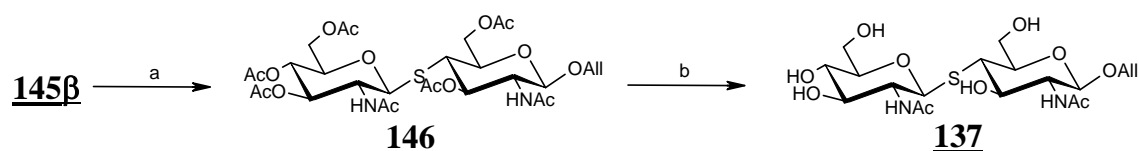
Schéma 66

La glycosylation du donneur **149** avec l'alcool allylique dans les conditions précédemment mises au point génère l'allyle **145** avec 83% de rendement et une bonne sélectivité ($\alpha:\beta$ environ 10:90).

De nombreux essais de purification par chromatographie sur différentes phases stationnaires et avec différents éluants ont été nécessaires pour isoler l'anomère β . Les meilleures conditions se sont avérées être l'utilisation d'un gel d'alumine comme phase stationnaire ainsi qu'une phase mobile constituée d'un mélange acétate d'éthyle-cyclohexane.

Synthèse du thiodisaccharide **137**

Après séparation des deux anomères, l'allyl-glycoside **145 β** est engagé dans la réduction du groupement azido par le zinc en présence d'acide acétique¹¹⁸ pour conduire au dérivé **146** avec un rendement de 47% (Schéma 67).



a : 1) Zn, AcOH, THF, 2) Ac_2O , 45% ; b : MeONa, MeOH, 72%

Schéma 67

La désacétylation selon Zemplén fournit le polyol **137** avec 72% de rendement.

Synthèse du thiotrisaccharide 138 par transfert enzymatique

Pour réaliser ce transfert, nous nous sommes inspirés des travaux préliminaires du laboratoire¹¹⁹ montrant la possibilité de former le thiotrisaccharide **152** à partir de l'accepteur **151** en présence de β -1,4 galactosyltransférase (Schéma 68).

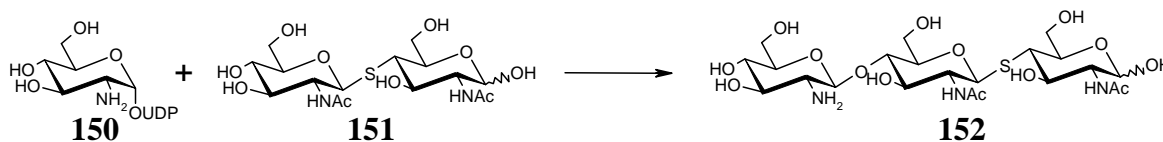
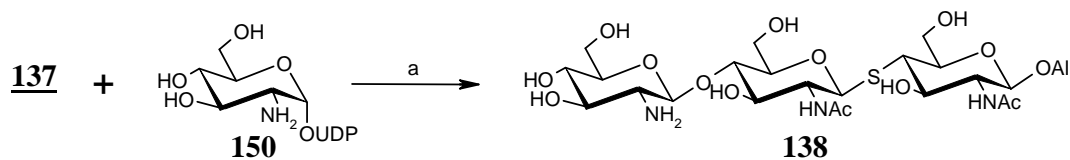


Schéma 68

Nous avons donc repris ces conditions pour la préparation du thiotrisaccharide **138** à partir de l'accepteur **137** et de l'UDP-GlcNH₂ **150** (préparé et fourni par l'équipe du Pr. O. Hindsgaul, Université d'Alberta) en utilisant la β -1,4 galactosyltransférase, extraite de lait de vache (isolée dans le laboratoire du Pr. M. Palcic, Université d'Alberta) (Schéma 69).



a : β -1,4 galactosyltransférase, MnCl₂ (1 M), α -lactalbumine, alcaline phosphatase, H₂O, 41%

Schéma 69

Le thiodisaccharide **137** est incubé avec l'UDP-glucosamine et la β -1,4 galactosyltransférase dans un milieu tamponné (MnCl₂, 1M) en présence d' α -lactalbumine et de l'alkaline phosphatase pendant 14 jours. L'alkaline phosphatase sert à éliminer le nucléotide diphosphate généré lors du transfert enzymatique (Schéma 70).

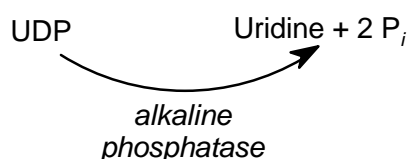


Schéma 70

Le mélange réactionnel est ensuite purifié par chromatographie de perméation de gel, type Bio-Gel P2, puis sur résine échangeuse d'ions. Après plusieurs lyophilisations successives, le thiotrisaccharide **138** est isolé avec un rendement satisfaisant de 41%. La structure est confirmée par l'étude du spectre de RMN du proton (Figure 27).

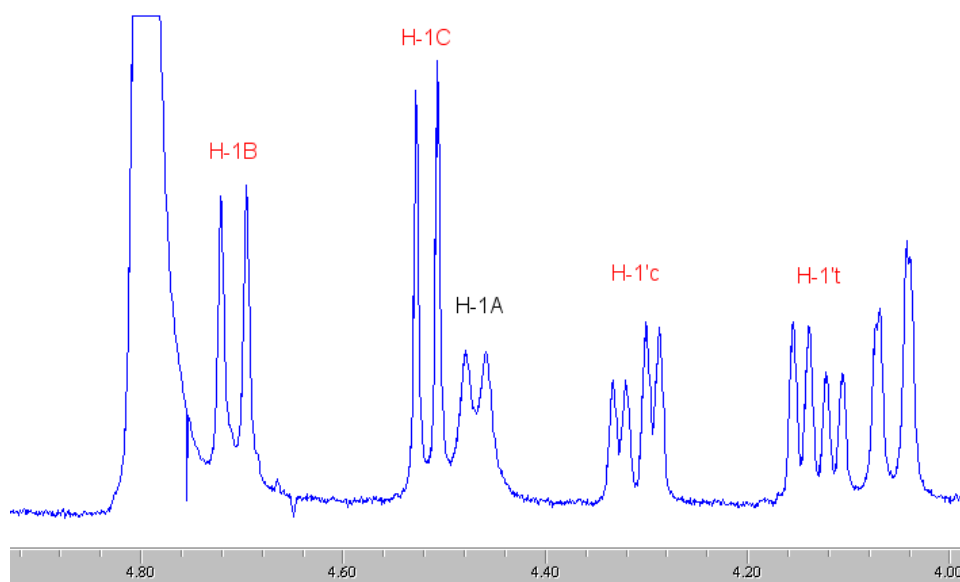


Figure 27

On observe notamment le doublet à 4.46 ppm, correspondant à H-1A, présentant une constante de couplage de 7.9 Hz, caractéristique d'un couplage *trans* diaxial et donc d'une liaison de type β .

Conclusion

Nous avons donc réalisé la synthèse de manière efficace du thiodisaccharide **137** à partir des deux précurseurs **91** et **118** en huit étapes et avec un rendement global de 11% (Schéma 71).

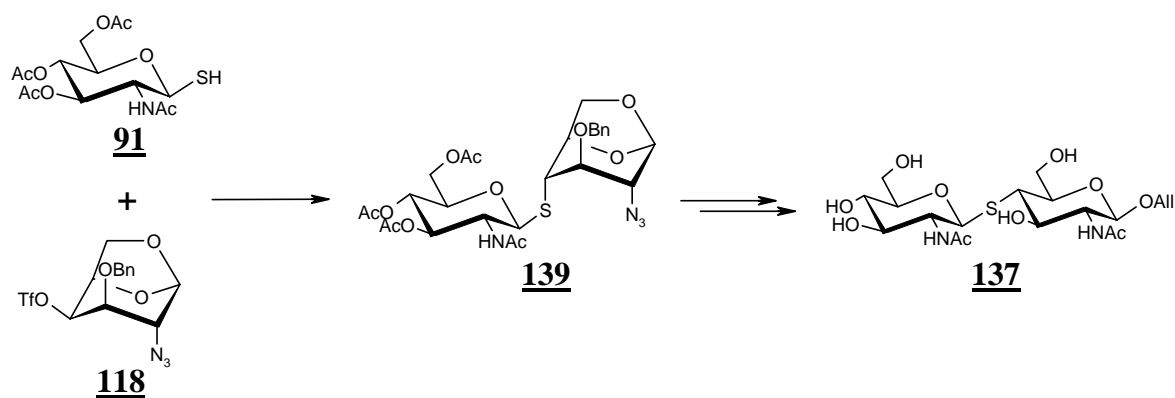


Schéma 71

La synthèse chimioenzymatique du thiotrisaccharide **138**, catalysée par une glycosyltransférase, constitue une voie intéressante dans la synthèse de thiooligosaccharides. Elle permet d'obtenir un thiotrisaccharide en neuf étapes à partir du triflate **118** et avec un rendement global de 5%. Ce transfert devrait permettre également de glycosyler des thiooligosaccharides fonctionnalisés, fournissant ainsi des analogues de facteurs Nod pour tester leur efficacité à induire une nodulation.

Ce transfert sur le thiodisaccharide **137** ayant donné des résultats satisfaisants, nous envisageons d'effectuer la même réaction sur un thiotrisaccharide accepteur de glycosyle pour obtenir un thiotétrasaccharide.

Synthèse du thiotétrasaccharide 153

Stratégie de synthèse

L'obtention d'un thiotétrasaccharide par transfert enzymatique nécessite la préparation de l'accepteur **154** dont les fonctions amine sont protégées sous la forme d'acétamide et la position anomérique « bloquée » (Schéma 72).

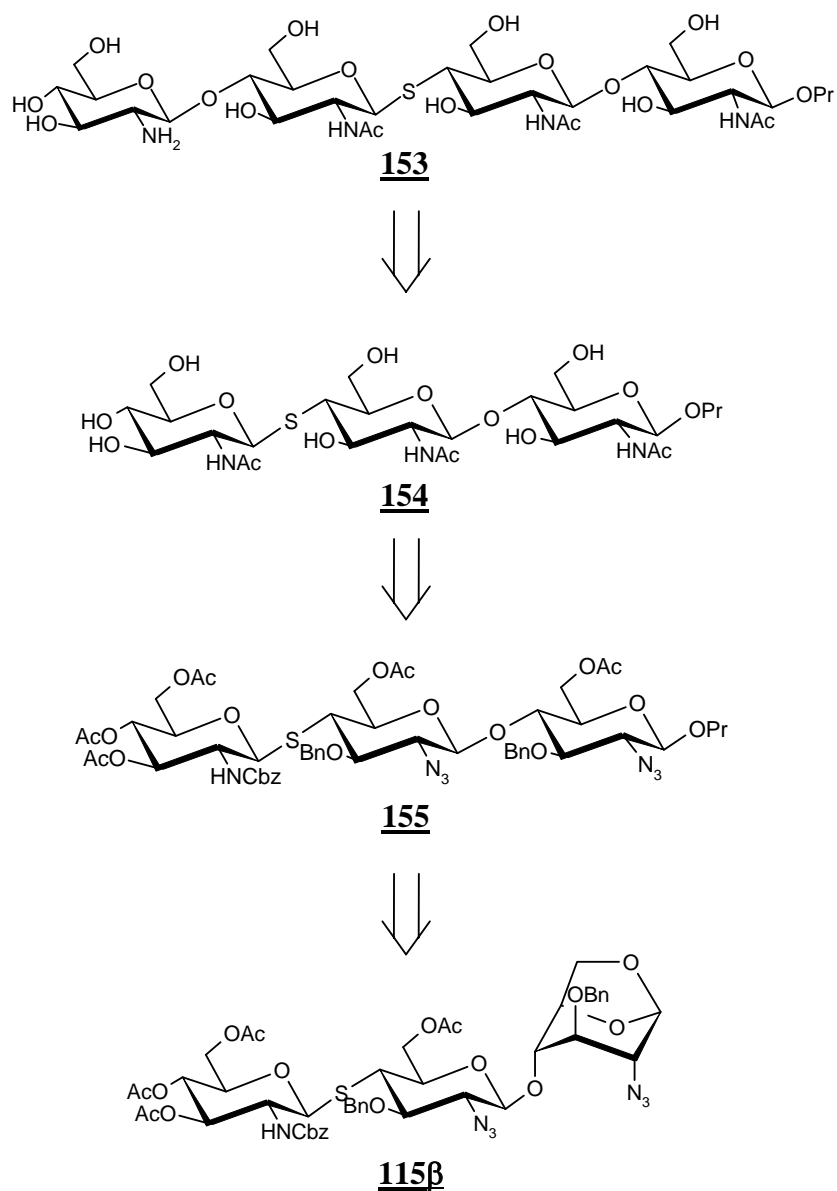
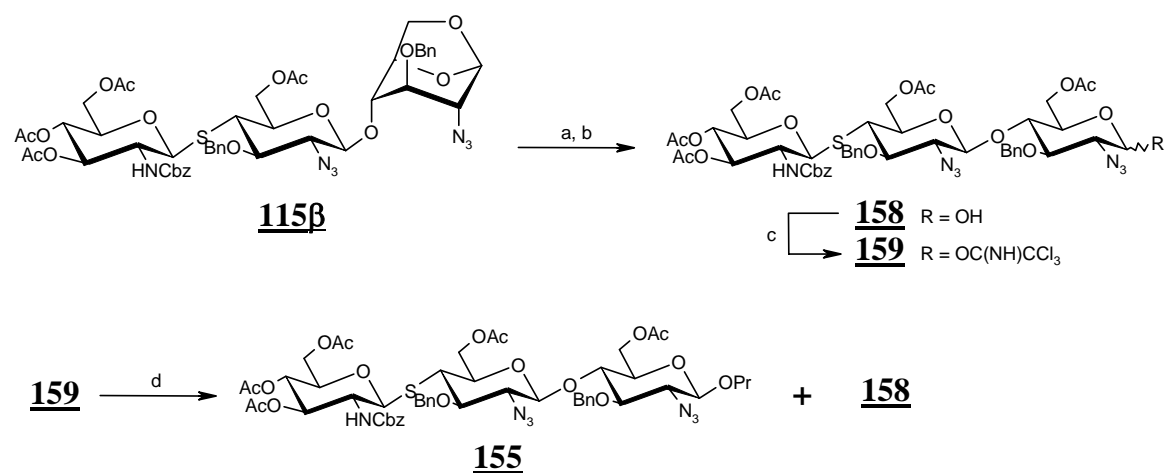


Schéma 72

Le thiotrisaccharide **154** serait préparé à partir du précurseur **155** possédant un groupement propyle en position anomérique. Ce groupement a été choisi afin d'éviter les problèmes d'hydrolyse du groupement allyle rencontrés lors de la préparation du thiodisaccharide **137** (page 112). Le thiotrisaccharide **154** serait obtenu selon les procédés utilisés pour la préparation du thiodisaccharide **137**, à partir du précurseur **115β** dont la synthèse a été décrite précédemment (paragraphe 2.3.2, page 82).

Synthèse du thiotrisaccharide 160

Synthèse du thiotrisaccharide 155



a : Ac₂O/TFA, 74% (α:β 75:25) ; b : acétate d'hydrazine, DMF, 76% (α:β 50:50) ; c : Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂, 92% (α:β 90:10) ; d : PrOH, BF₃·Et₂O, CH₂Cl₂, 68%

Schéma 73

Le thiotrisaccharide **155** est préparé selon les synthèses précédemment décrites : le thiotrisaccharide **115β** est traité en milieu acide (TFA) puis acétylé *in situ* pour fournir, après désacétylation sélective de la position anomérique, l'hémiacétal **158** sous la forme d'un mélange d'anomères (α:β environ 50:50) avec un rendement de 56% (Schéma 73). La position anomérique est alors activée au moyen du groupement trichloroacétimide selon les procédures de Schmidt^{75,76}, pour fournir le donneur **159** avec un rendement de 92% et une diastéréosélectivité de 80%. Le rapport α:β a été estimé, sur le spectre de RMN du proton, par l'évaluation des aires des signaux correspondant aux protons H-1Bα et H-1Bβ.

L'introduction du groupement propyle est réalisée par glycosylation dans les conditions utilisées précédemment. Le thiotrisaccharide **155** est ainsi obtenu avec un rendement de 68% et l'hémiacétal **158** formé est obtenu avec un rendement de 30%.

La présence sur le spectre de RMN du proton d'un seul doublet à 4.28 ppm, correspondant à H-1C et possédant une constante de couplage $J_{1,2}$ de 7.5 Hz, confirme la formation unique de l'anomère β et donc l'excellente stéréosélectivité de la glycosylation. On peut également noter la présence d'un triplet à 0.98 ppm et d'un multiplet à 1.69 ppm correspondant, respectivement, aux trois protons H-3' et aux deux protons H-2' du groupement propyle, confirmant ainsi la structure du produit de glycosylation (Figure 28).

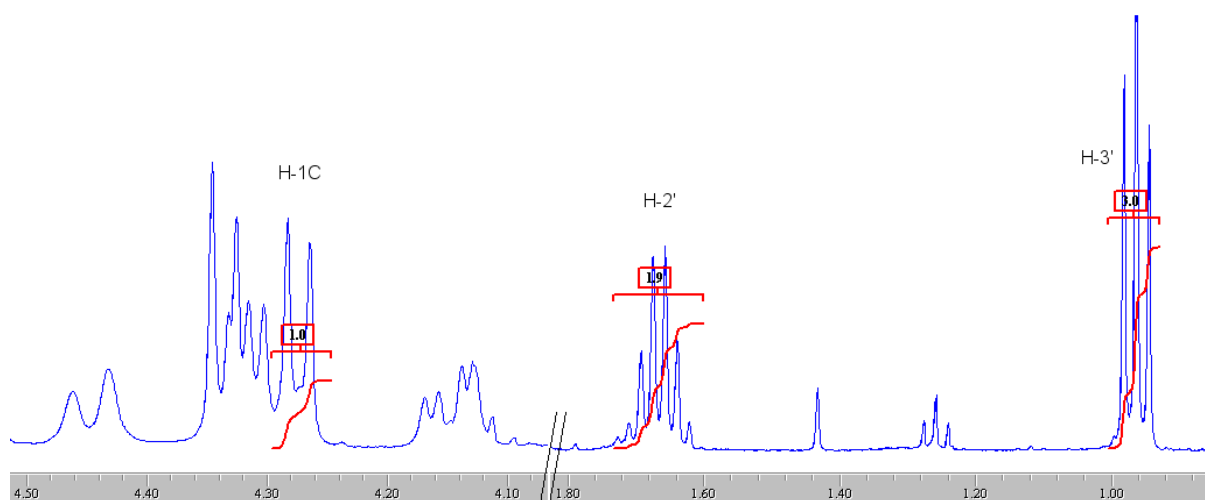
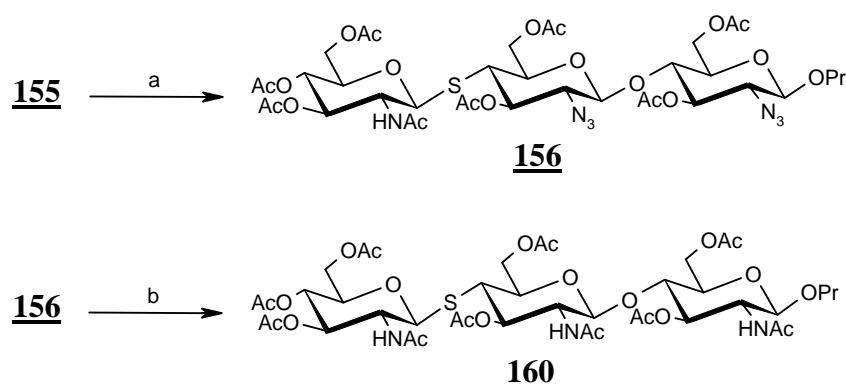


Figure 28

Synthèse du thiotrisaccharide **160**

a : 1) FeCl_3 , CH_2Cl_2 , 2) Ac_2O , pyridine, 21% ; b : 1) Zn, AcOH, THF, 2) Ac_2O , 9%

Schéma 74

Le traitement du thiotrisaccharide **155** en présence de FeCl_3 , suivi d'une acétylation *in situ*, fournit le thiotrisaccharide **156** pour lequel les groupements benzyle et carbamate de benzyle ont été « clivés » (Schéma 74). En effet, la littérature¹²⁰ rapporte que le groupement carbamate de benzyle serait instable dans les conditions mettant en jeu des acides de Lewis de type AlCl_3 . Le composé **156** est ainsi obtenu avec un rendement de 21%. Le spectre de RMN du proton confirme l'absence totale de signaux correspondant aux protons aromatiques.

La réduction des groupements azoture réalisée, comme pour le thiodisaccharide **145**, en présence de zinc solide et d'acide acétique, a permis d'obtenir le composé **160** avec un rendement de 9%.

Compte tenu des faibles rendements obtenus lors des étapes de débenzylation et de réduction (respectivement de 21% et de 9%), une mise au point de ces étapes est en cours avant de procéder à l'étape finale de désacétylation des groupements hydroxyle.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons réalisé une synthèse efficace du thiodisaccharide **137**, accepteur de la glycosylation par transfert enzymatique. Pour cela, nous avons utilisé des méthodes originales de débenzylation au moyen de FeCl_3 et de réduction au moyen de zinc solide, permettant, dans le cas de la débenzylation, de s'affranchir d'une hydrogénéolyse classique rendue inefficace par la présence de l'atome de soufre (Schéma 75).

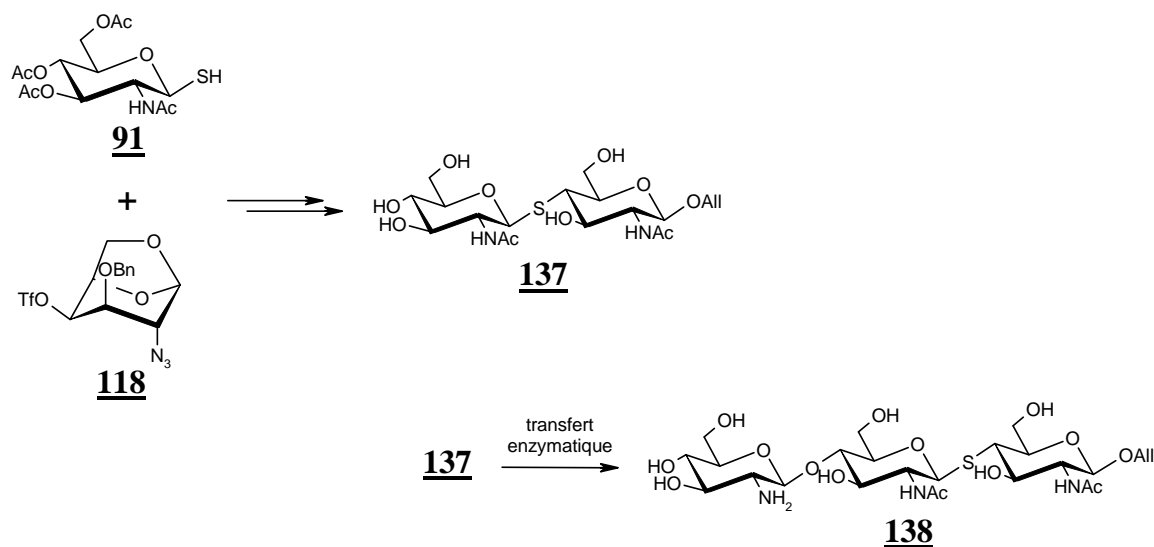


Schéma 75

Nous avons également amélioré les conditions opératoires du transfert enzymatique réalisé au moyen d'une β -1,4 galactosyltransférase, permettant d'obtenir le thiotrisaccharide **138** avec un rendement acceptable de 41%.

Cependant, des progrès pour la synthèse de l'accepteur **154** nécessaire à la préparation du thiotétraccharide **153** par transfert enzymatique, restent à accomplir. Actuellement, des

synthèses sur des quantités relativement importantes sont en cours de réalisation au laboratoire dans l'objectif d'optimiser les étapes et d'obtenir suffisamment d'accepteur pour réaliser la synthèse d'un thiotétraccharide par voie enzymatique.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de recherche consistait en la préparation d'analogues sulfurés de facteurs de nodulation intervenant dans la symbiose entre certaines plantes légumineuses et des bactéries de la famille *Rhizobium*, permettant à ces plantes de fixer l'azote atmosphérique. L'intérêt de ces analogues serait, dans un premier temps, de mieux comprendre les différents mécanismes intervenant au cours de cette association symbiotique et, à plus long terme, d'employer ces analogues comme une alternative à l'utilisation d'engrais azotés.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la synthèse de deux thiooligosaccharides, précurseurs d'analogues de facteurs Nod. Nous avons dans un premier temps préparé le thiotrisaccharide **115 β** à partir des deux monosaccharides **117** et **118** (Schéma 76).

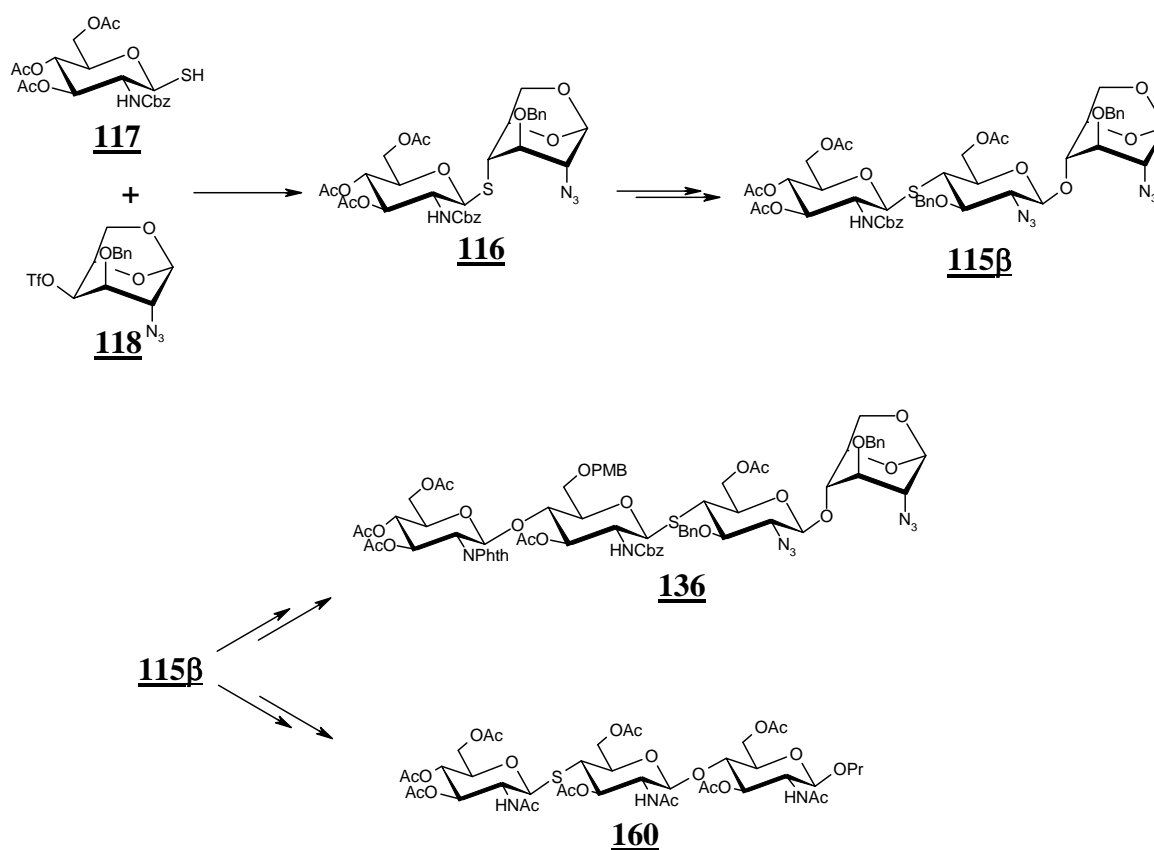


Schéma 76

Nous avons amélioré la formation de la liaison thioglycosidique du thiodisaccharide **116**. Nous avons également préparé de façon efficace le thiotrisaccharide **115** majoritairement sous sa forme β . Enfin, nous avons appliqué ces conditions à la préparation du thiotétracosaccharide **136**, obtenu exclusivement sous la forme de l'anomère β .

Le thiotrisaccharide **115 β** a également servi de précurseur dans la synthèse du thiotrisaccharide **160** qui devrait générer un thiotrisaccharide accepteur de glycosyle pour la glycosylation par voie enzymatique.

Nous avons également réalisé la synthèse du thiotrisaccharide **138** par voie enzymatique, à partir des deux monosaccharides **91** et **118**, grâce à l'emploi de la β -1,4 galactosyltransférase (Schéma 77).

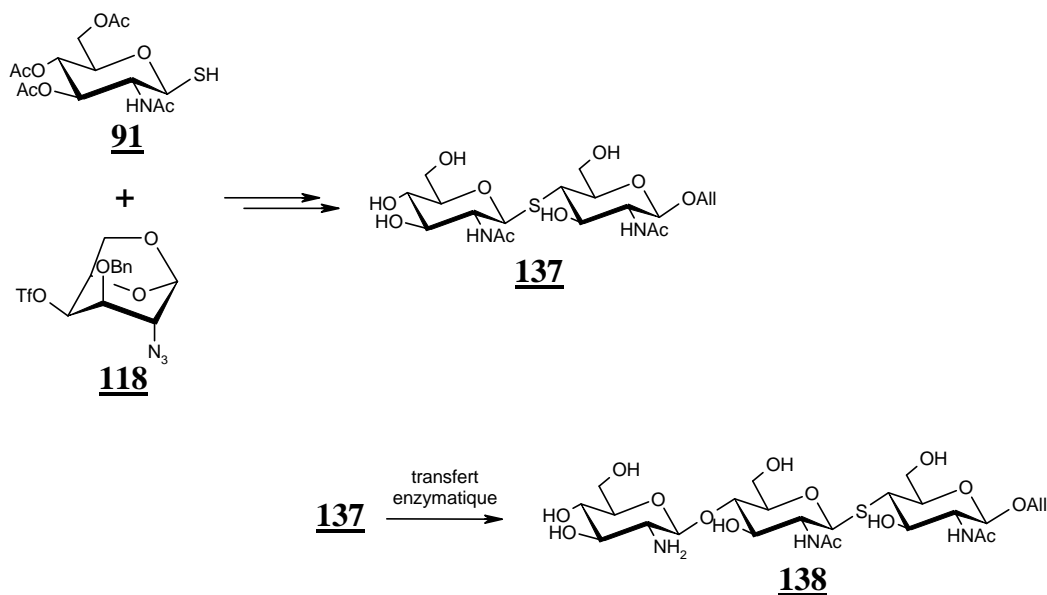


Schéma 77

Cette voie enzymatique constitue une alternative intéressante à la préparation chimique de thiooligosaccharides. Elle permet d'envisager de glycosyler des dérivés (sulfatés, par exemple) du thiodisaccharide **137**, ou de thiotrisaccharides, pour conduire à des analogues de facteurs de nodulation (Schéma 78).

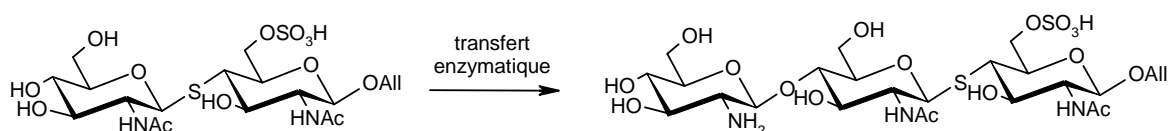


Schéma 78

La poursuite de ce travail consisterait à fonctionnaliser l'analogue chitinique **136**. Nous pourrions ainsi envisager la préparation de différents analogues de facteurs Nod possédant une chaîne grasse sur l'atome d'azote de l'unité non réductrice et, soit un hydroxyle libre en position 6 de l'autre unité terminale, soit un groupement sulfate. Cet hydroxyle en position 6 ne pouvant être que difficilement différentiable, la sulfatation pourrait être réalisée par voie enzymatique¹²¹. L'introduction de la chaîne grasse sur l'atome d'azote de l'unité non réductrice étant possible grâce à la présence du groupement phtalimido, nous pourrions obtenir un analogue de facteur Nod (Schéma 79).

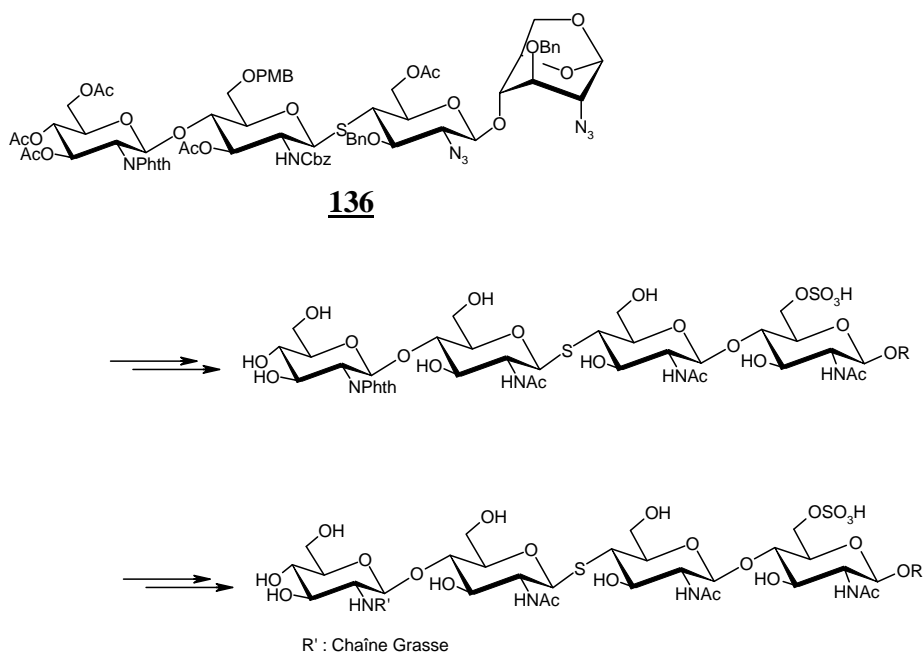
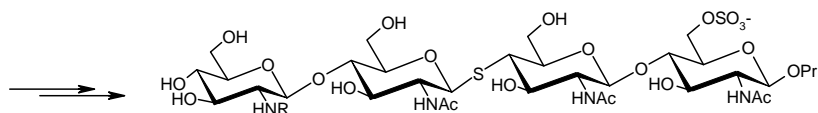
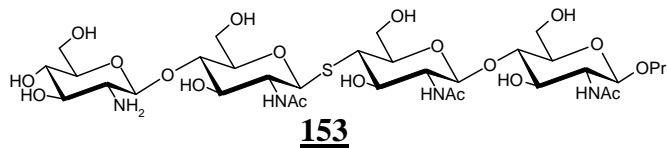
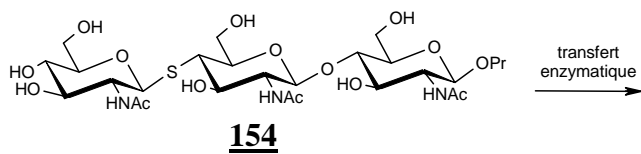


Schéma 79

Ce composé serait le premier thiotétraccharide analogue potentiel de facteurs Nod.

Dans la même perspective, la synthèse du thiotrisaccharide **154** devra être améliorée pour permettre, par transfert enzymatique, la synthèse du thiotétraccharide **153** qui, après fonctionnalisation, devrait générer à son tour un analogue de facteur Nod (Schéma 80).



R : Chaîne Grasse

Schéma 80

Ces analogues de facteurs Nod devrait être testés afin d'évaluer leur activité de nodulation ainsi que leur résistance vis-à-vis des chitinases. S'il s'avère que ces thiooligosaccharides présentent une activité de nodulation, ils pourraient à long terme, constituer une alternative à l'utilisation massive d'engrais azotés. Ils pourraient ainsi être considérés comme de nouveaux « engrais verts ».

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Généralités

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC 400 (400 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au solvant, utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz et les abréviations utilisées signifient respectivement :

- | | |
|------------------------|---------------------------------------|
| - s : singulet | - dd : doublet de doublet |
| - se : singulet élargi | - ddd : doublet de doublet de doublet |
| - d : doublet | - dt : doublet de triplet |
| - t : triplet | - dq : doublet de quadruplet |
| - q : quadruplet | - td : triplet de doublet |
| - m : multiplet | - qd : quadruplet de doublet |

Les spectres de résonance magnétique du carbone ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC 400 (100 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, le solvant étant pris comme référence interne.

Les attributions ont été réalisées à partir des spectres de RMN de corrélation proton-proton (COSY) et proton-carbone (HETCOR).

Les points de fusion (F) ont été mesurés sur un appareil Büchi Melting Point B-545.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Jasco DIP 370.

Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60 F₂₅₄ (Merck) ou d'alumine 60 F₂₅₄ (Merck). Le révélateur utilisé est une solution éthanolique d'acide sulfurique (10%).

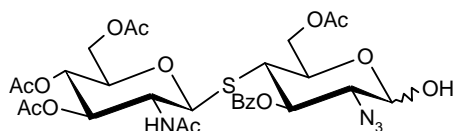
Les spectres de masse haute résolution (Electrospray) ont été effectués au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest à Rennes.

Les analyses élémentaires ont été réalisées par le Service Central d'Analyses du CNRS à Lyon.

Solvants et réactifs

Tous les solvants utilisés ont été préalablement distillés selon les procédures standard¹²².

4-S-(2-Acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-6-O-acétyl-2-azido-3-O-benzoyl-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranose



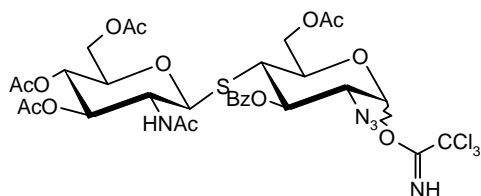
95

À une solution du composé 97 (489 mg, 0.661 mmol) dans le DMF (6 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (74 mg, 0.803 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à température ambiante et dilué avec de l'AcOEt (25 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de NaCl (2 x 15 mL) et de l'eau (2 x 15 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l'AcOEt (2 x 15 mL) et les phases organiques sont combinées, séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:1, puis 3:2 et 7:3 AcOEt-toluène) pour donner l'hémiacétal 95 (377 mg, 82%). Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport $\alpha:\beta$ de 75:25.

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 8.15 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 7.65 (m, 1 H α , 1 H β , H-aro), 7.50 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 5.82 (dd, 1 H α , $J_{2,3} + {}_{3,4}$ 21.2 Hz, H-3B α), 5.68 (d, 1 H α , $J_{\text{NH},2}$ 9.8 Hz, NH α), 5.57 (d, 1 H β , $J_{\text{NH},2}$ 9.8 Hz, NH β), 5.48 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 2.9 Hz, H-1B α), 5.24 (dd, 1 H β , $J_{2,3}$ 9.8 Hz, $J_{3,4}$ 10.8 Hz, H-3B β), 5.14-4.99 (m, 2 H α , 2 H β , H-3A α , H-3A β , H-4A α et H-4A β), 4.96 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 10.8 Hz, H-1A α), 4.89 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 10.3 Hz, H-1A β), 4.78 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 7.9 Hz, H-1B β), 4.65-4.47 (m, 3 H α , 2 H β , H-5B α , H-6B α , H-6B β , H-6'B α et H-6'B β), 4.25-4.15 (m, 2 H α , 2 H β , H-2A α , H-2A β , H-6'A α et H-6'A β), 4.05-3.98 (m, 1 H α , 2 H β , H-5B β , H-6A α et H-6A β), 3.80-3.71 (m, 1 H α , 1 H β , H-5A α et H-5A β), 3.68-3.60 (m, 1 H α , 1 H β , H-2B α et H-2B β), 3.05 (t, 1 H α , J 10.8 Hz, H-4B α), 3.02 (t, 1 H β , J 10.8 Hz, H-4B β), 2.11 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.10 (s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α , CH₃CO β), 2.08 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.05, (m, 6 H α , 6 H β , 2 x CH₃CO α et 2 x CH₃CO β) et 2.00 (2 s, 3 H α , 3H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

4-S-(2-Acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-6-O-acétyl-2-azido-3-O-benzoyl-2-désoxy-4-thio- α , β -D-glucopyranosyl trichloroacétimide

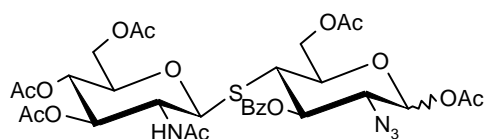
96

À une solution de l'hémiacétal 95 (350 mg, 0.502 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (12 mL) est ajouté du trichloroacétonitrile (1 mL, 10 mmol) et du DBU (20 μL , 0.134 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h sous Ar à température ambiante. Les solvants sont éliminés et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (silice préalablement neutralisée par des lavages avec une solution de NEt_3 dans de l'AcOEt, 5%) (3:7 AcOEt-toluène) pour donner l'imide 96 (360 mg, 85%) sous forme d'un solide vitreux. Le spectre de RMN du proton dans CDCl_3 montre que l'anomère α est majoritaire (90%).

RMN ^1H (CDCl_3) pour l'anomère α

δ 8.84 (s, 1 H, NH-B), 8.07 (m, 2 H, H-aro), 7.65 (m, 1 H, H-aro), 7.50 (m, 2 H, H-aro), 6.59 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 3.5 Hz, H-1B), 5.81 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.3 Hz, $J_{3,4}$ 10.8 Hz, H-3B), 5.67 (d, 1 H, $J_{\text{NH},2}$ 9.8 Hz, NH-A), 5.12-5.02 (m, 2 H, H-3A et H-4A), 4.89 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 10.7 Hz, H-1A), 4.65 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 2.9 Hz, $J_{6,6'}$ 11.8 Hz, H-6B), 4.55-4.45 (m, 2 H, H-5B et H-6'B), 4.25-4.19 (m, 1 H, H-2A), 4.13-3.95 (m, 3 H, H-2B, H-6A et H-6'A), 3.65-3.57 (m, 1 H, H-5A), 3.19 (t, 1 H, J 10.8 Hz, H-4B), 2.08, 2.05, 2.04 et 2.00 (4 s, 15 H, 5 x CH_3CO).

4-S-(2-Acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-1,6-di-O-acétyl-2-azido-3-O-benzoyl-2-désoxy-4-thio- α , β -D-glucopyranose

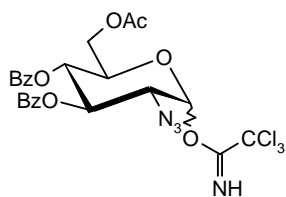


97

Le dérivé *anhydro*⁵⁰ **93** (250 mg, 0.636 mmol) est dissous dans un mélange 9:1 Ac₂O-TFA (30 mL). La solution est agitée pendant 14 h à température ambiante et 6 h à 65 °C. Les solvants sont évaporés et les traces résiduelles d'acide sont coévaporées avec du toluène. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (de 2:1 à 6:1 AcOEt-CH) pour fournir le composé **97** sous forme d'un mélange d'anomères (200 mg, 79%). Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α : β de 55:45.

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 8.09 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 7.55 (m, 1 H α , 1 H β , H-aro), 7.50 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 6.40 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.5 Hz, H-1B α), 5.71 (t, 1 H α , $J_{2,3+3,4}$ 20.6 Hz, H-3B α), 5.65 (d, 1 H α , $J_{\text{NH},2}$ 9.8 Hz, NH α), 5.58 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 8.8 Hz, H-1B β), 5.53 (d, 1 H β , $J_{\text{NH},2}$ 9.8 Hz, NH β), 5.32 (t, 1 H β , $J_{2,3+3,4}$ 20.6 Hz, H-3B β), 5.16 (t, 1 H α , $J_{2,3+3,4}$ 19.2 Hz, H-3A α), 5.09 (t, 1 H β , $J_{2,3+3,4}$ 19.7 Hz, H-3A β), 5.01-4.94 (m, 1 H α , 1 H β , H-4A α et H-4A β), 4.91 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 10.3 Hz, H-1A α), 4.87 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 10.8 Hz, H-1A β), 4.64-4.55 (m, 1 H α , 1 H β , H-6'B α et H-6'B β), 4.50 (m, 1 H β , H-6B β), 4.46-4.38 (m, 2 H α , H-5B α et H-6B α), 4.29-4.13 (m, 2 H α , 3 H β , H-6A α , H-6A β , H-2A α , H-2A β et H-5B β), 4.04 (dd, 1 H α , $J_{5,6'}$ 7.4 Hz, $J_{6,6'}$ 12.3 Hz, H-6'A α), 3.96 (dd, 1 H β , $J_{5,6'}$ 7.4 Hz, $J_{6,6'}$ 12.3 Hz, H-6'A β), 3.90-3.70 (m, 2 H α , 2 H β , H-2B α , H-2B β , H-5A α et H-5A β), 3.13 (t, 1 H α , $J_{3,4+4,5}$ 21.2 Hz, H-4B α), 3.05 (1 H β , $J_{3,4+4,5}$ 21.6 Hz, H-4B β) 2.25 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.20 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.25 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.09 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.08 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.07-2.03 (m, 9 H α , 6 H β , 3 x CH₃CO α , 2 x CH₃CO β), 2.01 (s, 3 H α , CH₃CO α) et 2.00 (s, 3 H β , CH₃CO β).

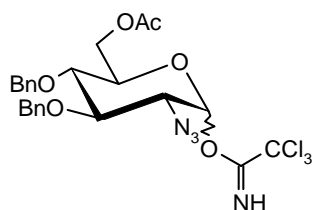
6-O-Acétyl-2-azido-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy- α,β -D-glucopyranosyl trichloracétimide**105**

À une solution de l'hémiacétal **111** (520 mg, 1.14 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (15 mL) est ajouté du trichloroacétonitrile (2.29 mL, 22.85 mmol) et une solution de DBU dans CH_2Cl_2 (0.67 M, 494 μL , 0.296 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h sous Ar à température ambiante. Les solvants sont éliminés et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (silice préalablement neutralisée par des lavages avec une solution de NEt_3 dans de l'AcOEt, 5%) (1:7, 1:5 puis 1:3 AcOEt-CH) pour donner l'imide **105** (213 mg, 31%) sous forme d'un solide vitreux. Le spectre de RMN du proton dans CDCl_3 montre que l'anomère α est majoritaire (90%).

Rf = 0.46 (CH-AcOEt 2:1)

RMN ^1H (CDCl_3) pour l'anomère α

δ 8.90 (s, 1 H, NHCCl_3) 8.00-7.40 (m, 10 H, H-aro), 6.64 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 3.9 Hz, H-1), 6.01 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ ou $J_{3,4+4,5}$ 19.7 Hz, H-3 ou H-4), 5.62 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ ou $J_{3,4+4,5}$ 19.8 Hz, H-3 ou H-4), 4.44 (m, 1 H, H-5), 4.25 (m, 2 H, H-6 et H-6'), 3.95 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.8 Hz, H-2) et 2.02 (s, 3 H, CH_3CO).

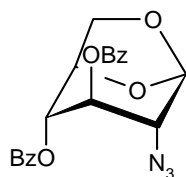
6-O-Acétyle-2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-désoxy- α,β -D-glucopyranosyl trichloracétimide**106**

À une solution de l'hémiacétal **112** (545 mg, 1.28 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (15 mL) sont ajoutés du trichloroacétonitrile (2.56 mL, 25.5 mmol) et une solution de DBU dans CH_2Cl_2 (0.67 M, 442 μL , 0.333 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h sous Ar à température ambiante. Les solvants sont concentrés et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (silice préalablement neutralisée par des lavages avec une solution de NEt_3 dans de l'AcOEt, 5%) (1:7, 1:5 puis 1:3 AcOEt-CH) pour donner l'imide **106** (670 mg, 83%) sous forme de solide vitreux. Le spectre de RMN du proton dans CDCl_3 montre que l'anomère α est majoritaire (>95%).

Rf = 0.56 (CH-AcOEt 2:1)

RMN ^1H (CDCl_3) pour l'anomère α

δ 8.76 (s, 1 H, NHCCl_3), 7.44-7.28 (m, 10 H, H-aro), 6.42 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 3.8 Hz, H-1), 4.96 (s, 2 H, CH_2Ph), 4.89 (m, 1 H, CHPh), 4.61 (m, 1 H, CHPh), 4.33-4.24 (m, 2 H, H-6 et H-6'), 4.05 (m, 2 H, H-3 ou H-4 et H-5), 3.70 (m, 2 H, H-2 et H-3 ou H-4) et 2.05 (s, 3 H, CH_3CO).

1,6-Anhydro-2-azido-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose107

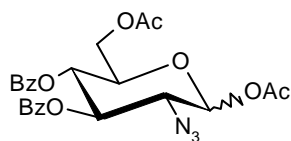
À une solution du dérivé *anhydro* **98** (400 mg, 2.14 mmol) dans de la pyridine anhydre (7 mL) est ajouté du chlorure de benzoyle (845 μ L, 7.28 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante puis traité par du méthanol (10 mL). Les solvants sont concentrés, le résidu est dissous dans du CH_2Cl_2 (20 mL) et lavé successivement avec une solution d'HCl 1M (2 x 15 mL), une solution saturée de NaHCO_3 (2 x 15 mL) et de l'eau (2 x 15 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec du CH_2Cl_2 (2 x 15 mL) et les phases organiques combinées sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:7 puis 1:4 AcOEt-CH) pour donner le dérivé *anhydro* dibenzoylé **107** (738 mg, 87%) sous forme de cristaux blancs.

Rf = 0.46 (CH-AcOEt 4:1)

F 109°C, lit.⁵¹ 108-109°C

RMN ^1H (CDCl_3)

δ 7.45-7.30 (m, 10 H, H-aro), 5.66 (se, 1 H, H-3), 5.37 (m, 1 H, H-4), 5.11 (se, 1 H, H-1), 4.87 (se, 1 H, H-5), 4.36 (d, 1 H, $J_{6,6'}$ 8 Hz, H-6'), 3.98 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 5.8 Hz, H-6) et 3.48 (se, 1 H, H-2).

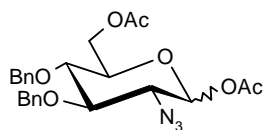
1,6-Di-O-acétyl-2-azido-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy- α,β -D-glucopyranose109

Le composé **107** (700 mg, 1.77 mmol) est dissous dans un mélange 4.6:1 Ac₂O-TFA (49.2 mL). La solution obtenue est agitée pendant 6 h à température ambiante. Les solvants sont évaporés et les traces résiduelles d'acide sont coévaporées avec du toluène. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:7, 1:5, 1:3 et 1:1 AcOEt-CH) pour fournir le composé **109** sous forme d'un mélange d'anomères (790 mg, 90%). Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α : β de 80:20.

Rf = 0.20 (CH-AcOEt 4:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 8.00-7.85 (m, 4 H α , 4 H β , H-aro), 7.50 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 7.35-7.35 (m, 4 H α , 4 H β , H-aro), 6.45 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.6 Hz H-1 α), 5.94 (dd, 1 H α , $J_{2,3 + 3,4}$ ou $J_{3,4 + 4,5}$ 20.1 Hz, H-3 α ou H-4 α), 5.75 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 8.4 Hz, H-1 β), 5.61-5.48 (m, 1 H α , 2 H β , H-3 α ou H-4 α , H-3 β et H-4 β), 4.32-4.14 (m, 3 H α , 2 H β , H-5 α , H-6 α , H-6' α , H-6 β et H-6' β), 4.04 (m, 1 H β , H-5 β), 3.90 (dd, 1 H β , $J_{2,3}$ 9.7 Hz, H-2 β), 3.83 (dd, 1 H α , $J_{2,3}$ 10.5 Hz, H-2 α), 2.30 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.25 (s, 3 H β , CH₃CO β) et 2.10 (s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

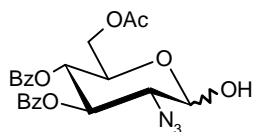
1,6-Di-O-acétyl-2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-désoxy- α,β -D-glucopyranose**110**

Le dérivé *anhydro*³⁸ **108** (670 mg, 1.82 mmol) est dissous dans un mélange 4.6:1 Ac₂O-TFA (37.4 mL) et la solution est agitée pendant 1.5 h à température ambiante. Les solvants sont évaporés et les traces résiduelles d'acide sont coévaporées avec du toluène. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:4 AcOEt-CH) pour donner le mélange d'anomères du diacétate **110** (770 mg, 90%) ; le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport $\alpha:\beta$ de 80:20.

Rf = 0.30 (CH-AcOEt 4:1)

RMN ¹H (CDCl₃) pour l'anomère α

δ 7.43-7.25 (m, 10 H, H-aro), 6.24 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 3.8 Hz, H-1), 3.98-3.83 (m, 3 H, CH₂Ph et CHPh), 4.60 (d, 1 H, J 10.7 Hz, CHPh), 4.27 (m, 2 H, H-6 et H-6'), 3.98 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10 Hz, $J_{3,4}$ 9.2 Hz, H-3), 3.94 (m, 1 H, H-5), 3.65 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 10.3 Hz, H-4), 3.73 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.3 Hz, H-2), 2.18 et 2.04 (2 s, 6 H, 2 x CH₃CO).

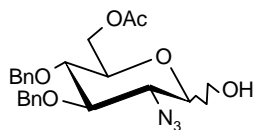
6-O-Acétyle-2-azido-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy- α,β -D-glucopyranose**111**

À une solution du diacétate **109** (740 mg, 1.49 mmol) dans le DMF (10 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (164 mg, 1.79 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante et de l'acétate d'hydrazine supplémentaire est ajouté (42 mg, 0.456 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 h et dilué avec de l'AcOEt (40 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de NaCl (2 x 20 mL) et de l'eau (2 x 20 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l'AcOEt (2 x 20 mL) et les phases organiques sont combinées, séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:1, puis 3:2 et 7:3 AcOEt-toluène) pour donner l'hémiacétal **111** (560 mg, 83%). Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport $\alpha:\beta$ de 70:30.

Rf = 0.30 (CH-AcOEt 2:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 8.00-7.85 (m, 4 H α , 4 H β , H-aro), 7.55 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 7.38 (m, 4 H α , 4 H β , H-aro), 6.02 (dd, 1 H α , $J_{3,4}$ 10.1 Hz, $J_{4,5}$ 9.5 Hz, H-4 α), 5.55-5.48 (m, 2 H α , 2 H β , H-1 α , H-3 α , H-3 β et H-4 β), 4.95 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 7.7 Hz, H-1 β), 4.52 (m, 1 H α , H-5 α), 4.30-4.20 (m, 2 H α , 2 H β , H-6 α , H-6' α , H-6 β et H-6' β), 3.95 (m, 1 H β , H-5 β), 3.72 (dd, 1 H β , $J_{2,3}$ 10.2 Hz, H-2 β), 3.58 (dd, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.2 Hz, $J_{2,3}$ 10.5 Hz, H-2 α), 2.09 et 2.05 (2 s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

6-O-Acétyle-2-azido-3,4-di-O-benzyle-2-désoxy- α,β -D-glucopyranose**112**

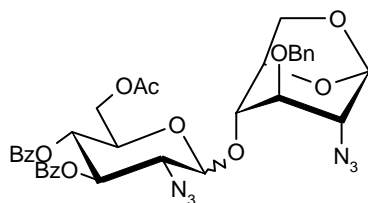
À une solution du diacétate **110** (720 mg, 1.53 mmol) dans du DMF (10 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (169 mg, 1.84 mmol). Le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante puis de l'acétate d'hydrazine supplémentaire (42 mg, 0.456 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante et dilué avec de l'AcOEt (40 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de NaCl (2 x 20 mL) et de l'eau (2 x 20 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l'AcOEt (2 x 20 mL) et les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:6, 1:4, 1:3, 1:2 et 1:1 AcOEt-CH) pour donner le mélange d'anomères de l'hémiacétal **112** (585 mg, 89%). Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport $\alpha:\beta$ de 70:30.

Rf = 0.40 (CH-AcOEt 2:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.43-7.38 (m, 10 H α , 10 H β , H-aro), 5.32 (m, 1 H α , H-1 α), 4.95-4.82 (m, 3 H α et 3 H β , 3 x CHPh α et 3 x CHPh β), 4.64-4.56 (m 1 H α , 2 H β , CHPh α , CHPh β et H-1 β), 4.39-4.31 (m, 1 H α , 1 H β , H-6 α et H-6 β) 4.23 (dd, 1 H α , $J_{5,6'}$ 4.3 Hz, $J_{6,6'}$ 11.9 Hz, H-6' α), 4.21-4.10 (m, 1 H α , 1 H β , H-6' β et H-5 α), 4.06 (dd, 1 H α , $J_{2,3}$ 9 Hz, $J_{3,4}$ 10.1 Hz, H-3 α), 3.61-3.48 (m, 1 H α , 3 H β , H-4 α , H-4 β , H-3 β et H-5 β), 3.46 (dd, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.6 Hz, H-2 α), 3.39 (dd, 1 H β , $J_{1,2}$ 8.0 Hz, $J_{2,3}$ 9.1 Hz, H-2 β) et 2.04 (s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

4-O-(6-O-Acétyle-2-azido-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy- α,β -D-glucopyranosyl)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy- α,β -D-glucopyranose



113

Une suspension de l'alcool **100** (120 mg, 0.434 mmol) et de l'imidate **105** (186 mg, 0.310 mmol) dans du toluène anhydre (10 mL), contenant du tamis moléculaire 4 Å activé (450 mg), est agitée à température ambiante pendant 30 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à -50°C et une solution de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans CH_2Cl_2 (0.16 M, 196 μL , 0.031 mmol) est ajoutée. La réaction est suivie par CCM (1:2 AcOEt-CH) et une solution de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans du CH_2Cl_2 (0.16 M, 300 μL et 196 μL , 0.077 mmol) est ajoutée en deux fois pendant 6 h. De la triéthylamine (100 μL) est ajoutée et le mélange réactionnel est agité pendant 14 h à température ambiante. Le tamis moléculaire est filtré et lavé avec du CH_2Cl_2 , le filtrat est dilué avec du CH_2Cl_2 (40 mL) et lavé avec de l'eau (2 x 30 mL). La phase organique est séchée, concentrée et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:7, 1:5 puis 1:4 AcOEt-toluène) pour donner le mélange d'anomères du disaccharide **113** (60 mg, 27%) sous forme de solide vitreux. Le spectre de RMN du proton dans CDCl_3 montre un rapport $\alpha:\beta$ de 40:60.

Rf = 0.34 (CH-AcOEt 2:1)

RMN ^1H (CDCl_3)

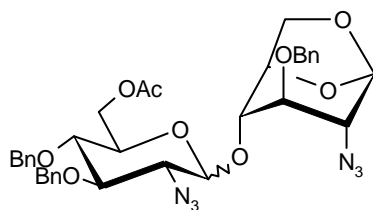
δ 7.99-7.87 (m, 4 H α , 4 H β , H-aro), 7.56-7.48 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 7.44-7.32 (m, 9 H α , 9 H β , H-aro), 6.09 (dd, 1 H α , $J_{2,3}$ 10.8 Hz, $J_{3,4}$ 9.2 Hz, H-3A α), 5.65 (se, 1 H α , H-1B α), 5.55 (se, 1 H β , H-1B β), 5.53-5.42 (m, 1 H α , 2 H β , H-3A β , H-4A α et H-4A β), 5.14 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.7 Hz, H-1A α), 4.99 (m, 1 H α , H-5B α), 4.80-4.72 (m, 1 H α , 2 H β , CHPh α , CHPh β et H-5B β), 4.70-4.58 (m, 2 H α , 2 H β , CHPh α , CHPh β , H-1A β et H-5A α), 4.30 (dd, 1 H α , $J_{5,6}$ 2.6 Hz, $J_{6,6'}$ 12.3 Hz, H-6A α), 4.25-4.12 (m, 2 H α , 3 H β , H-6A β , H-6'A α , H-6'A β , H-6B α et H-6B β), 4.03 (se, 1 H β , H-4B β), 3.93 (se, 1 H α , H-4B α), 3.88-3.73 (m, 1 H α , 4 H β , H-3B β , H-2A β , H-5A β , H-6'B α et H-6'B β), 3.68 (se, 1 H α , H-3B α), 3.44

(dd, 1 H α , H-2A α), 3.28 (se, 1 H β , H-2B β), 3.18 (se, 1 H α , H-2B α), 2.07 (s, 3 H α , CH₃CO α) et 1.97 (s, 3 H β , CH₃CO β).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₃₅H₃₄N₆O₁₁ [M + Na]⁺ : 737.2183
- Trouvée : 737.2186

4-O-(6-O-Acétyle-2-azido-3,4-di-O-benzyle-2-désoxy- α,β -D-glucopyranosyl)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy- α,β -D-glucopyranose



114

Une suspension de l'alcool **100** (240 mg, 0.864 mmol) et de l'imidate **106** (380 mg, 0.665 mmol) dans du toluène anhydre (15 mL) contenant du tamis moléculaire 4 Å activé (650 mg) est traitée comme décrit pour la synthèse du composé **113**, avec une solution de BF₃.Et₂O (solution dans CH₂Cl₂, 0.16M, 421 μ L). Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:7, 1:5 puis 1:4 AcOEt-toluène) pour donner le disaccharide **114** (350 mg, 77%) sous forme de solide vitreux. Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α : β de 30:70.

Rf = 0.57 (CH-AcOEt 2:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.40-7.25 (m, 15 H α , 15 H β , H-aro), 5.56 (se, 1 H α , H-1B α), 5.50 (se, 1 H β , H-1B β), 4.93 (d, 1 H α , 1 H β , *J* 10.7 Hz, CHPh α et CHPh β), 4.89-4.84 (m, 3 H α , 1 H β , 2 x CHPh α , CHPh β et H-1A α), 4.82 (d, 1 H β , *J* 10.7 Hz, CHPh β), 4.77 (m, 1 H α , H-5B α), 4.74-4.69 (m, 1 H α , 2 H β , CHPh α , CHPh β et H-5B β), 4.62 (d, 1 H α , 1 H β , *J* 10.7 Hz, CHPh α , CHPh β), 4.59 (d, 1H α , 1 H β , *J* 10.7 Hz, CHPh α et CHPh β), 4.36 (d, 1 H β , *J*_{1,2} 8 Hz, H-

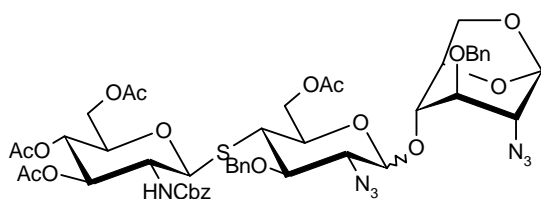
1A β), 4.35-4.28 (m, 1 H α , 1 H β , H-6A α et H-6A β), 4.21-4.06 (m, 4 H α , 2 H β , H-3A α , H-5A α , H-6'A α , H-6'A β , H-6B α et H-6B β), 3.97 (se, 1 H β , H-4B β), 3.83-3.77 (m, 2 H α , 1 H β , H-6'B α , H-6'B β et H-3B α), 3.75 (se, 1 H β , H-3B β), 3.58-3.49 (m, 2 H α , 2 H β , H-2A β , H-4A α , H-4A β et H-4B α), 3.41 (t, 1 H β , J 9.1 Hz, H-3A β), 3.38-3.31 (m, 1 H α , 1 H β , H-2A α , H-5A β), 3.25 (se, 1 H β , H-2B β), 3.18 (se, 1 H α , H-2B α), 2.02 (s, 3 H α , CH₃CO α) et 1.97 (s, 3 H β , CH₃CO β).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₃₅H₃₈N₆O₉ [M + Na]⁺ : 709.2598
- Trouvée : 709.2599

4-O-[6-O-Acétyl-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranose 115 α et

4-O-[6-O-Acétyl-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio- α -D-glucopyranosyl]-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranose 115 β



115

Une suspension de l'alcool **100** (1.50 g, 5.41 mmol) et de l'imidate **126** (2.48 g, 2.70 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (100 mL) contenant du tamis moléculaire 3 Å (800 mg) est agité sous Ar à température ambiante pendant 1 h. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à - 78°C et une solution de BF₃.Et₂O (68 μL, 0.540 mmol) est ajoutée. La température de la solution est ramenée, pendant 1 h, à - 20°C et la solution est agitée pendant 2.5 h à - 20°C. La triéthylamine (100μL) est ajoutée au mélange puis le tamis

moléculaire est filtré. Le filtrat est dilué avec du CH₂Cl₂ (75 mL) et lavé avec de l'eau (2 x 100 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec du CH₂Cl₂ (2 x 75 mL) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (5:1, 4:1, 3:1 puis 2:1, cyclohexane-AcOEt) pour donner le trisaccharide **115** (1.59 g, 57%) sous forme d'un mélange d'anomères. Les anomères ont été séparés par HPLC (Waters PrepNova Pack® silica 125 Å, 40 x 100 mm, concentration de l'échantillon 40 mg/mL, volume injecté 8 mL, débit 15 mL/min de 65:35 hexane-AcOEt) pour donner les trisaccharides **115α** (276 mg, 10%) et **115β** (1.30 g, 47%).

Données analytiques pour **115β**

$$[\alpha]_D^{23} - 12^\circ \text{ (c 1.0, CHCl}_3\text{)}$$

$$\mathbf{Rf} = 0.49 \text{ (CH-AcOEt 1:1)}$$

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.48-7.24 (m, 15 H, H-aro), 5.52 (s, 1 H, H-1C), 5.32 (m, 1 H, H-3A), 5.06-4.82 (m, 6 H, 2 x CH₂Ph, H-1A et H-4A), 4.77 (d, 1 H, *J*_{NH,2} 8 Hz, NH-A), 4.75-4.59 (m, 4 H, CH₂Ph, H-5C et H-6B), 4.41 (d, 1 H, *J*_{1,2} 8 Hz, H-1B), 4.27 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} 5 Hz, *J*_{6,6'} 12 Hz, H-6'B), 4.20-4.12 (m, 2 H, H-6C et H-6'A), 4.07 (d, *J*_{6,6'} 12 Hz, H-6A), 3.96 (s, 1 H, H-4C), 3.81 (t, 1 H, *J* 6.7 Hz, H-6'C), 3.76 (s, 1 H, H-3C), 3.63 (m, 1 H, H-5A), 3.57 (t, 1 H, *J* 8.7 Hz, H-2B), 3.54-3.41 (m, 2 H, H-2A et H-5B), 3.27-3.20 (m, 2 H, H-2C et H-3B), 2.90 (t, 1 H, *J* 10.9 Hz, H-4B), 2.04, 2.02, 2.01 et 1.91 (4 s, 12 H, 4 x CH₃CO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 170.44, 170.39, 170.23, 169.40 (COCH₃ et NCOCH₂Ph), 137.61 (C-*ipso*), 101.68 (C-1B), 100.68 (C-1C), 82.23 (C-1A), 79.37 (C-3B), 77.22 (C-3C, C-4C), 75.84 (C-5A), 75.11 (2 x CH₂Ph), 74.71 (C-5B), 74.53 (C-5C), 72.51 (CH₂Ph et C-3A), 68.48 (C-4A), 67.00 (C-2B), 65.00 (C-6C), 64.12 (C-6B), 62.12 (C-6A), 59.23 (C-2C), 55.99 (C-2A), 45.76 (C-4B).

Analyse élémentaire :

- Calculée pour C₄₈H₅₅N₇O₁₇S : C, 55.75; H, 5.36; N, 9.48
- Trouvée : C, 55.93; H, 5.41; N, 9.19

Données analytiques pour **115α**

$[\alpha]_D^{23} + 14^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

Rf = 0.49 (CH-AcOEt 1:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.42-7.25 (m, 15 H, H-aro), 5.56 (s, 1 H, H-1C), 5.20 (m, 1 H, H-3A), 5.07 (t, 1 H, *J* 9.6 Hz, H-4A), 5.02-4.92 (m, 3 H, 2 x *CHPh* et H-1A), 4.90 (d, 1 H, *J*_{1,2} 3.4 Hz, H-1B), 4.85-4.74 (m, 3 H, *CHPh*, H-5C et NH-A), 4.72 (d, 1 H, *J* 11.9 Hz, *CHPh*), 4.63 (m, 2 H, H-6'B, *CHPh*), 4.57 (d, 1 H, *J* 10.4 Hz, *CHPh*), 4.43-4.33 (m, 2 H, H-5B et H-6B), 4.22-4.14 (m, 2 H, H-6A et H-6'C), 4.11 (m, 1 H, H-6C), 4.01 (t, 1 H, *J* 10 Hz, H-3B), 3.87 (s, 1 H, H-4C), 3.83-3.64 (m, 3 H, H-5A, H-2A et H-6'A), 3.53 (s, 1 H, H-3C), 3.31 (dd, 1 H, *J*_{1,2} 3.2 Hz, *J*_{2,3} 9.7 Hz, H-2B), 3.14 (s, 1 H, H-2C), 2.88 (t, 1 H, *J* 10.9 Hz, H-4B), 2.06, 2.04, 2.02 et 1.87 (4 s, 12 H, 4 x CH₃CO).

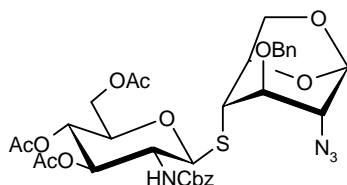
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 170.65, 170.42, 169.39 (*COCH*₃ et *NCOCH*₂Ph), 137.50, 136.80, 135.96 (*C-ipso*), 101.04 (*C-1B*), 100.75 (*C-1C*), 81.92 (*C-1A*), 78.69 (*C-3C*), 77.45 (*C-4C*), 75.92 (*C-3B*), 75.63 (*CH*₂Ph), 74.86 (*C-5A* et *C-5C*) 73.19 (*C-3A*), 72.93 (*CH*₂Ph), 70.30 (*C-5B*), 68.18 (*C-4A*), 67.00 (*CH*₂Ph), 64.82 (*C-2B*), 64.73 (*C-6A*), 63.89 (*C-6B*), 61.84 (*C-6C*), 58.37 (*C-2C*), 55.43 (*C-2A*), 47.26 (*C-4B*).

Analyse élémentaire :

- Calculée pour C₄₈H₅₅N₇O₁₇S : C, 55.75; H, 5.36; N, 9.48
- Trouvée : C, 55.86; H, 5.56; N, 9.18

4-S-(3,4,6-Tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranose

**116**

À une suspension de NaH (55% dans l'huile, 459 mg, 10.5 mmol) dans du DMF (10 mL), est ajoutée une solution du thiol **117** (4.6 g, 10.1 mmol) dans du DMF (90 mL) à 0°C. Le mélange réactionnel est agité pendant 10 min à 0°C puis pendant 10 min à 20°C. Cette solution est ajoutée au triflate **118** (3.45 g, 8.42 mmol) et agitée pendant 1 h à 20°C. Le milieu est neutralisé par addition d'acide acétique (8 mL) et agité pendant encore 30 min. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (7:1 à 1:1 toluène-AcOEt) pour fournir le thiodisaccharide **116** (5.32 g, 88%) sous forme de solide vitreux.

Rf = 0.40 (PhCH₃-AcOEt 3:1)

$[\alpha]_D^{22} - 13^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃)

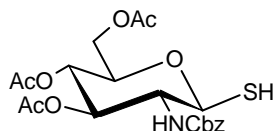
δ 7.40-7.29 (m, 10 H, H-aro), 5.44 (s, 1 H, H-1B), 5.27 (t, 1 H, *J* 9.7 Hz, H-3A), 5.13 (d, 1 H, *J* 12.2 Hz, CHPh), 5.18-4.96 (m, 3 H, CHPh, NH et H-4A), 4.89 (d, 1 H, *J*_{1,2} 11.1 Hz, H-1A), 4.74-4.58 (m, 3 H, CH₂Ph et H-5B), 4.22 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 7.3 Hz, H-6B), 4.18 (dd, 1 H, *J*_{6,6'} 12.3 Hz, *J*_{5,6'} 4.5 Hz, H-6'A), 4.11 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} 2.1 Hz, H-6A), 3.84 (s, 1 H, H-3B), 3.76 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} 5.5 Hz, H-6'B), 3.74-3.60 (m, 2 H, H-2A et H-5A), 3.52 (s, 1 H, H-2B), 3.19 (s, 1 H, H-4B), 2.01, 2.02 et 1.95 (3 s, 9 H, 3 x CH₃CO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 170.68, 170.58, 169.48 (C=O), 128.67, 128.58, 128.25, 128.12, 128.03, 127.74 (C-aro), 100.20 (C-1B), 84.07 (C-1A), 78.88, 76.30, 76.12, 73.17, 72.50, 68.43, 67.85, 67.13, 62.11, 60.42, 55.33, 44.77, 32.35, 20.73, 20.67 et 20.60 (CH₃CO)

Analyse élémentaire :

- Calculée pour $C_{33}H_{38}N_4O_{12}S$: C, 55.46; H, 5.36; N, 7.84
- Trouvée : C, 55.70; H, 5.34; N, 7.45

3,4,6-Tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-1-thio- β -D-glucopyranose**117**

À une solution de chlorhydrate de pseudothiourée **121** (8.25 g, 15.8 mmol) dans un mélange acétone/eau (35 mL/ 210 mL) est ajouté du sulfite de sodium (3.98 g, 31.6 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 22 h à 20°C. Le pH est ajusté à 5 par addition d'une solution de HCl 5% et la solution est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Les phases organiques sont lavées avec une solution saturée de NaCl (100 mL) et de l'eau (100 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec du CH_2Cl_2 (2 x 100 mL). Les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu est recristallisé dans de l'éthanol pour fournir le thiol **117** (5.67 g, 81%) sous forme de poudre blanche.

Rf = 0.85 ($CHCl_3$ -MeOH 9:1)

F 128.0°C

$[\alpha]_D^{22} + 7^\circ$ (c 0.99, $CHCl_3$)

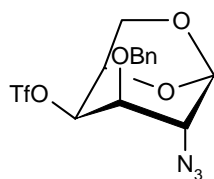
RMN 1H (DMSO- d_6)

δ 7.53 (d, 1 H, $J_{NH,2}$ 9.7 Hz, NH), 7.40-7.27 (m, 5 H, H-aro), 5.11-4.98 (m, 3 H, CH_2Ph et H-4), 4.85 (t, 1 H, J 9.6 Hz, H-3), 4.75 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 10.1 Hz, H-1), 4.14 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 12.2 Hz, $J_{5,6'}$ 4.8 Hz, H-6'), 3.99 (m, 1 H, H-6), 3.81 (m, 1 H, H-5), 3.54 (ddd, 1 H, H-2), 2.01, 1.95 et 1.84 (3 s, 3 x CH_3CO)

Analyse élémentaire :

- Calculée pour $C_{20}H_{25}NO_9S$: C, 52.74; H, 5.53; N, 3.08
- Trouvée : C, 52.39; H, 5.46; N, 3.17

1,6-Anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-O-trifluoromethanesulfonyl-β-D-galactopyranose



118

Le triflate **118** est synthétisé à partir du composé **123** (1.70 g, 6.11 mmol) selon la même procédure que pour l'obtention du composé **122**. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (98:2 CHCl₃-AcOEt) pour donner le triflate **118** (2.35 g, 94%) sous la forme d'un solide vitreux.

Rf = 0.57 (CHCl₃)

$[\alpha]_D^{22} + 32^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

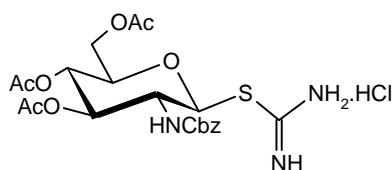
RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.45-7.30 (m, 5 H, H-aro), 5.48 (se, 1 H, H-1), 5.09 (t, 1 H, *J* 4.4 Hz, H-4), 4.71 (d, 1 H, *J* 11.8 Hz, CHPh), 4.65-4.60 (m, 2 H, H-5, CHPh), 4.58 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 7.9 Hz, H-6), 4.00 (m, 1 H, H-3), 3.79 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} 5 Hz, H-6') et 3.66 (se, 1 H, H-2).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₁₄H₁₄F₃N₃O₆S [M + Na]⁺ : 432.0453
- Trouvée : 432.0448

Chlorhydrate de 2-S-(3,4,6-Tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-pseudothiourée

**121**

Un mélange du carbamate⁸⁸ **119** (10.7 g, 34.15 mmol) et de chlorure d'acétyle (40 mL) est agité à 20°C pendant 20 h. Le mélange est alors dilué avec du CH₂Cl₂ (150 mL) et lavé successivement avec solution saturée froide de NaHCO₃ et une solution saturée de NaCl. Les phases aqueuses sont réextraites avec du CH₂Cl₂ (4 x 50mL) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées pour donner le chlorure⁸⁹ **120**. Le sirop (12.8 g, 27.9 mmol) est dissous dans de l'acétone anhydre (130 mL), puis de la thiourée (4 g, 52.5 mmol) est ajoutée à la solution. Le mélange est porté à reflux pendant 7 h puis refroidi à 20°C. La pseudothiourée **121**, sous forme de solide, est filtrée et lavée avec de l'acétone pour donner un solide blanc (8.5 g, 47 %).

Rf = 0.55 (CH-AcOEt 1:1)

F 184.0°C

$[\alpha]_D^{22}$ - 5° (c 1.0, MeOH)

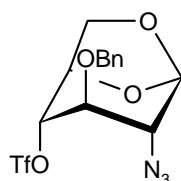
RMN ¹H (MeOD)

δ 7.38-7.28 (m, 5 H, H-aro), 5.56 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 10.7 Hz, H-1), 5.31 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ 19.1 Hz, H-3), 5.16 (d, 1 H, J 12.4 Hz, CHPh), 5.13-5.01 (m, 2 H, CHPh et H-4), 4.29 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 12.4 Hz, $J_{5,6'}$ 4.9 Hz, H-6'), 4.21 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ 2.2 Hz, H-6), 4.08 (m, 1 H, H-5), 3.88 (dd, 1 H, $J_{1,2+2,3}$ 20.2 Hz, H-2), 2.08 (s, 3 H, CH₃CO), 2.02 (s, 3 H, CH₃CO) et 1.90 (s, 3 H, CH₃CO).

Analyse élémentaire :

- Calculée pour C₂₁H₂₈ClN₃O₉S : C, 47.24; H, 5.29; N, 7.87
- Trouvée : C, 46.80; H, 5.36; N, 7.74

1,6-Anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-O-trifluoromethanesulfonyl-β-D-glucopyranose

**122**

À une solution d'anhydride triflique (2.3 mL, 13.9 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (15 mL) et refroidie à -15°C, est ajouté goutte à goutte une solution de pyridine anhydre (3 mL) dans du CH₂Cl₂ fraîchement distillé (10 mL) et refroidie à -15°C. Ce mélange est ajouté à une solution de dérivé 1,6-*anhydro* **100** (2.56 g, 9.24 mmol) dans du CH₂Cl₂ (15 mL), refroidie à -15°C. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h à -15°C. La solution est ramenée à 20°C, diluée avec du CH₂Cl₂ (100 mL) et lavée successivement avec une solution de HCl 5%, une solution saturée de NaHCO₃ et de l'eau. Les phases aqueuses sont réextraites avec du CH₂Cl₂ (50 mL) et les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées pour donner le triflate **122** (3.78 g, quant.).

R_f = 0.60 (CHCl₃)

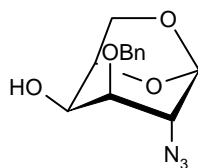
$[\alpha]_D^{22} + 25^\circ$ (c 0.99, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.45-7.30 (m, 5 H, H-aro), 5.57 (se, 1 H, H-1), 4.81 (se, 1 H, H-4), 4.76 (d, 1 H, *J*_{5,6'} 5.9 Hz, H-5), 4.69 (se, 2 H, CH₂Ph), 4.19 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 8.2 Hz, H-6), 3.85 (dd, 1H, H-6'), 3.77 (se, 1 H, H-3) et 3.37 (se, 1 H, H-2).

Analyse élémentaire :

- Calculée pour C₁₄H₁₄F₃N₃O₆S : C, 41.08; H, 3.45; N, 10.27
- Trouvée : C, 41.25; H, 3.48; N, 10.21

1,6-Anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-β-D-galactopyranose123

À une solution du triflate **122** (3.78 g, 9.24 mmol) dans du DMF anhydre (30 mL) est ajouté du NaNO₂ (6.38 g, 92.4 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 20 h à 20°C. Le DMF est alors concentré sous pression réduite et coévaporé avec du toluène. Le résidu est dilué avec du CH₂Cl₂ (100 mL) et lavé successivement avec solution saturée de NaCl et de l'eau. Les phases aqueuses sont réextraites avec du CH₂Cl₂ (2 x 50 mL) et les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées. Le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (98:2 CHCl₃-AcOEt) pour fournir l'alcool **123** (1.75 g, 68%) sous forme de solide vitreux.

Rf = 0.23 (CHCl₃)

$[\alpha]_D^{22} + 28^\circ$ (*c* 1.1, CHCl₃)

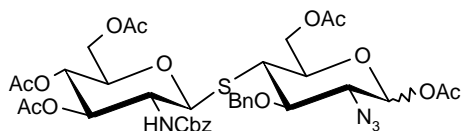
RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.45-7.30 (m, 5 H, H-aro), 5.45 (se, 1 H, H-1), 4.75 (d, 1 H, *J* 11.3 Hz, CHPh), 4.53 (d, 1 H, *J* 11.3 Hz, CHPh), 4.45 (m, 1 H, H-5), 4.25 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 7.5 Hz, H-6), 4.04 (m, 1 H, H-4), 3.85 (d, 1 H, *J*_{3,4} 5.4 Hz, H-3), 3.68 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} 6 Hz, H-6'), 3.53 (se, 1 H, H-2) et 3.05 (d, 1 H, *J*_{4,OH} 9.6 Hz, OH)

Analyse élémentaire :

- Calculée pour C₁₃H₁₅N₃O₄ : C, 56.31; H, 5.45; N, 15.15
- Trouvée : C, 56.25; H, 5.39; N, 14.99.

1,6-Di-O-acétyl-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranose



124

Le thiodisaccharide **116** (5.31 g, 0.074 mmol) est dissous dans un mélange Ac₂O-TFA (9:1, 80 mL) et la solution est agitée pendant 4 h à température ambiante. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et les traces résiduelles d'acide sont éliminées par coévaporation au toluène. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (9:1, 8:1, 7:1, 6:1 puis 5:1 toluène-acétone) pour donner le mélange anomérique du composé **124** (5.84 g, 96%). Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport $\alpha:\beta$ de 75:25.

Rf = 0.65 (PhCH₃-AcOEt 1:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.45-7.20 (m, 10 H α , 10 H β , H-aro), 6.27 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.2 Hz, H-1B α), 5.45 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 7.3 Hz, H-1B β), 5.33 (m, 1 H α , 1 H β , H-3A α et H-3A β), 5.02-4.84 (m, 6 H α , 6 H β , 2 x CH₂Ph α , 2 x CH₂Ph β , H-4A α , H-4A β , H-1A α et H-1A β), 4.47 (dd, 1 H α , 1 H β , $J_{6,6'}$ 12.4 Hz, $J_{5,6'}$ 4.2 Hz, H-6'B α et H-6'B β), 4.38 (d, 1 H α , 1 H β , H-6A α et H-6A β), 4.15 (dd, 1 H α , 1 H β , $J_{6,6'}$ 12.3 Hz, $J_{5,6'}$ 4.6 Hz, H-6'A α et H-6'A β), 4.01 (m, 2 H α , 1 H β , H-6A α , H-6A β et H-5B α), 3.80-3.72 (m, 1 H α , 1 H β , H-3B α et H-5B β), 3.65-3.55 (m, 3 H α , 3 H β , H-2B α , H-2B β , H-2A α , H-2A β , H-5A α et H-5A β), 3.40 (m, 1 H β , H-3B β), 2.99 (t, 1 H α , 2, $J_{3,4+4,5}$ 20.8 Hz, H-4B α), 2.96 (m, 1 H β , H-4B β), 2.19, 2.07, 2.03, 2.01 et 1.91 (5 s, 15 H α , 15 H β , 5 x CH₃CO α et 5 x CH₃CO β).

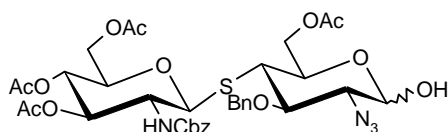
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

170.77, 170.60, 170.46, 169.51, 168.75 (C=O), 137.41 (C-*ipso*), 128.57, 128.52, 128.25, 128.21, 128.06 (C-*aro*), 90.54 (C-1B), 83.40 (C-1A), 77.01, 75.86, 75.82, 75.13, 72.62, 68.49, 67.08, 64.01, 63.22, 62.31, 46.74, 46.43, 21.00, 20.97, 20.68, 20.65 et 20.52 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour $C_{37}H_{44}N_4O_{15}S$ $[M + Na]^+$: 839.2422
- Trouvée : 839.2424

6-O-Acétyle-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranose

125

À une solution de l'acétate **124** (5.84 g, 7.15 mmol) dans du DMF (70 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (920 mg, 9.99 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 5 h à température ambiante. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et les traces résiduelles de DMF sont éliminées par coévaporation au toluène. Le résidu est dilué dans de l'AcOEt (150 mL), la solution est lavée successivement avec une solution saturée de NaCl (2 x 100 mL) et de l'eau (2 x 100 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l'AcOEt (100 mL) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Une chromatographie sur gel de silice du résidu (3:1, 2:1, 1:1 toluène-AcOEt) donne le mélange d'anomères de l'hémiacétal **125** (4.5 g, 81%). Le spectre de RMN du proton dans $CDCl_3$ montre un rapport $\alpha:\beta$ de 60:40.

Rf = 0.42 (PhCH₃-AcOEt 1:1)

RMN ¹H ($CDCl_3$)

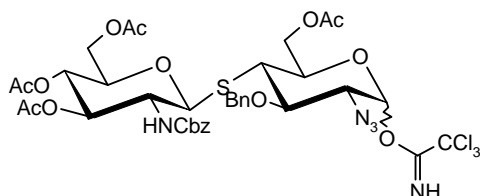
δ 7.43 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 7.35-7.28 (m, 6 H α , 6 H β , H-aro), 7.24 (m, 2 H α , 2 H β , H-aro), 5.37 (se, 1 H α , H-1B α) 5.32-5.25 (m, 1 H α , 1 H β , H-3A α et H-3A β), 5.08-4.83 (m, 7 H α , 7 H β , 2 x CH₂Ph α , 2 x CH₂Ph β , H-1A α , H-1A β , H-4A α , H-4A β , NH α et NH β), 4.60 (m, 2 H β , H-1B β et H-6B β), 4.53-4.40 (m, 2 H α , H-6B α et H-6'B α), 4.32 (dd, 1 H β , $J_{6,6'}$ 11.8 Hz, $J_{5,6'}$ 5.4 Hz, H-6'B β), 4.27 (ddd, 1 H α , $J_{4,5}$ 11.2 Hz, $J_{5,6'}$ 4.1 Hz, $J_{5,6}$ 3.1 Hz, H-5B α), 4.18-4.03 (m, 2 H α , 2 H β , H-6A α , H-6A β , H-6'A α et H-6'A β), 3.90 (t, 1 H α ,

$J_{2,3+3,4}$ 19.8 Hz, H-3B α), 3.70-3.58 (m, 2 H α , 3 H β , H-5B β , H-2A α , H-2A β , H-5A α et H-5A β), 3.49 (dd, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.2 Hz, $J_{2,3}$ 9.6 Hz, H-2B α), 3.41 (dd, 1 H β , $J_{1,2}$ 8 Hz, $J_{2,3}$ 9.3 Hz, H-2B β), 3.31 (dd, 1 H β , $J_{3,4}$ 10,5 Hz, H-3B β), 2.95 (t, 1 H α , $J_{4,5}$ 10,5 Hz, H-4B α), 2.90 (t, 1 H β , J 10,5 Hz, H-4B β), 2.09-2.08 (2 s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 2.06 (s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 2.01 (s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β) et 1.91 (s, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₃₅H₄₂N₄O₁₄S [M + Na]⁺ : 797.2316
- Trouvée : 797.2312

6-O-Acétyle-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyle-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranosyl trichloroacétimide



126

À une solution d'hémiacetal **125** (4 g, 5.16 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (60 mL), sont ajoutés du trichloroacétonitrile (10.3 mL, 103 mmol) et du DBU (200 μ L, 1.34 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h sous Ar à température ambiante. Les solvants sont évaporés et le résidu est purifié par chromatographie sur gel d'alumine (2:1, 1:1, 1:2 et 1:3 cyclohexane-AcOEt) pour donner l'imide **126** (3.91 g, 82%) sous forme de solide vitreux. Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α : β de 80:20.

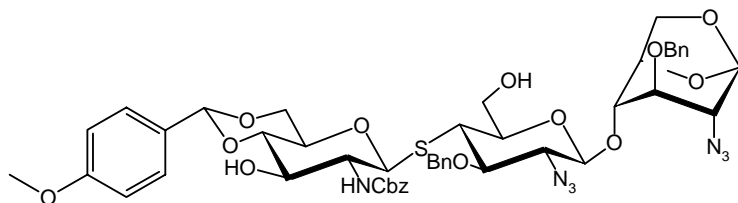
Rf = 0.52 (CH-AcOEt 1:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 8.76 (s, 1 H α , NHCCl₃ α), 8.73 (s, 1 H β , NHCCl₃ β), 7.48-7.26 (m, 10 H α , 10 H β ,

H-aro), 6.47 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.3 Hz, H-1B α), 5.61 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 8.6 Hz, H-1B β), 5.33 (m, 1 H α , 1 H β , H-3A α et H-3A β), 5.08-4.08 (m, 7 H α , 7H β , 2 x CH₂Ph α , 2 x CH₂Ph β , H-1A α , H-1A β , NH-A α , NH-A β , H-4A α et H-4A β), 4.54-4.43 (m, 2 H α , 2 H β , H-6B α , H-6B β , H-6'B α et H-6'B β), 4.22-4.07 (m, 2 H α , 2 H β , H-5B α , H-5B β , H-6'A α et H-6'A β), 4.01 (dd, 1 H α , $J_{5,6}$ 2.1 Hz, $J_{6,6'}$ 12.3 Hz, H-6A α), 3.86 (t, 1 H α , 1 H β , $J_{2,3+3,4}$ 19.6 Hz, H-3B α et H-3B β), 3.77-3.70 (m, 1 H α , 1 H β , H-2B et H-2B β), 3.66-3.52 (m, 2 H α , 2 H β , H-2A α , H-2A β , H-5A α et H-5A β), 3.07 (t, 1 H α , J 10.7 Hz, H-4B α), 3.00 (t, 1 H β , J 10.7 Hz, H-4B β), 2.12-1.99 (m, 9 H α , 9 H β , 3 x CH₃CO α et 3 x CH₃CO β) et 1.94-1.89 (m, 3 H α , 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

1,6-Anhydro-2-azido-4-O-[2-azido-3-O-benzyl-4-S-(2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-4,6-O-(4-méthoxybenzylidène)- β -D-glucopyranosyl)-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranose



128

À une solution de **129** (2.034 g, 2.34 mmol) dans du CH₃CN anhydre (40 mL) est ajouté du diméthyl acétal de *p*-anisaldéhyde (920 μ l, 5.41 mmol) et du CSA (18 mg, 0.08 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous Ar pendant 5 min puis le milieu est neutralisé par addition de NEt₃. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (98:2 à 90:10 CHCl₃-MeOH) pour donner le composé **128** (1.59 g, 69 %).

R_f = 0.36 (CHCl₃-MeOH 95:5)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.49-7.24 (m, 17 H, H-aro), 6.86 (m, 2 H, H-aro), 5.63 (se, 1 H, NH), 5.50 (s, 1 H, H-

1C), 5.43 (s, 1 H, *CHPh*), 5.16 (d, 1 H, *J* 12.2 Hz, *CHPh*), 5.06-4.94 (m, 2 H, 2 × *CHPh*), 4.90-4.78 (m, 2 H, H-1A et *CHPh*), 4.73-4.65 (m, 2 H, H-5C et *CHPh*), 4.55 (d, 1 H, *J* 12.1 Hz, *CHPh*), 4.22 (d, 1 H, *J*_{1,2} 8.1 Hz, H-1B), 4.15 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 7.3 Hz, H-6C), 4.08 (m, 1 H, H-6A ou H-6'A), 4.00-3.84 (m, 3 H, H-3A, H-4C et H-6B ou H-6'B), 3.83-3.70 (m, 5 H, CH₃O, H-6'C et H-3C), 3.62-3.34 (m, 6 H, H-6'A ou H-6A, H-6'B ou H-6B, H-2A, H-2B, H-5A et H-4A), 3.31 (s, 1 H, H-2C), 3.13 (m, 1 H, H-3B) et 3.07-2.94 (m, 2 H, H-4B et H-5B).

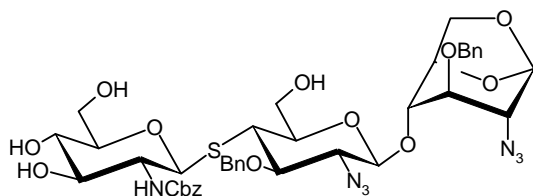
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 160.23 (C=O), 137.74, 137.26, 136.23, 129.45 (C-*ipso*), 128.69, 128.51, 128.34, 128.26, 128.13, 127.87, 127.72, 127.64 et 113.68 (C-*aro*), 102.12 (C-1B), 101.73 (*CHPh*), 100.31 (C-1C), 86.10 (C-1A), 81.06 (C-4A), 80.47 (C-3B), 77.84 (C-3C), 76.89 (C-5B), 75.87 (C-4C), 75.69 (*CH*₂Ph), 74.67 (C-5C), 72.29 (C-3A et *CH*₂Ph), 70.16 (C-5A), 68.37 (C-6A), 67.04 (*CH*₂Ph), 66.88 (C-2B), 65.03 (C-6C), 61.62 (C-6B), 58.90 (C-2C), 57.56 (C-2A), 55.28 (*CH*₃O) et 47.00 (C-4B).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₄₈H₅₃N₇O₁₄S [M + Na]⁺ : 1006.3269
- Trouvée : 1006.3270

1,6-Anhydro-2-azido-4-O-[2-azido-3-O-benzyl-4-S-(2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranose



129

À une solution de **115 β** (2.91 g, 2.81 mmol) dans du MeOH anhydre (35 mL) est ajouté du MeONa (200 mg, 3.70 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante

sous Ar pendant 2h, puis le milieu est neutralisé par addition de résine H⁺. La solution est filtrée puis le filtrat est dilué dans du CHCl₃ (50 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (50 mL) et la phase aqueuse est réextraite avec du CHCl₃ (2 × 40 mL). Les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (98:2 à 90:10 CHCl₃-MeOH) pour fournir l'alcool **129** (2.195 g, 90 %).

Rf = 0.42 (CHCl₃-MeOH 9:1)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆)

δ 7.46-7.22 (m, 13 H, H-aro), 7.19-7.11 (m, 2 H, H-aro), 5.53 (s, 1 H, H-1C), 5.16-5.09 (m, 2 H, OH-3A et OH-4A), 5.05-4.92 (m, 2 H, 2 × CHPh), 4.85 (m, 1 H, OH-6A), 4.81-4.66 (m, 6 H, 2 × CHPh, OH-6B, H-1A, H-1B et H-5C), 4.62 (m, 2 H, 2 × CHPh), 4.11 (m, 1 H, H-6B ou H-6'B), 4.00 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 6.9 Hz, H-6C), 3.96 (s, 1 H, H-4C), 3.84 (s, 1 H, H-3C), 3.76-3.55 (m, 5 H, H-6A ou H-6'A, H-6B ou H-6'B, H-6'C, H-5B et H-3B), 3.44-3.18 (m, 6 H, H-6A ou H-6'A, H-2B, H-3A ou H-4A, H-2A, H-5A et H-2C), 3.06 (m, 1 H, H-3A ou H-4A) et 2.80 (t, 1 H, *J* 10.5 Hz, H-4B).

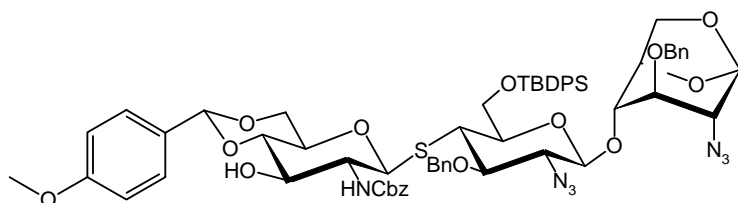
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 155.87 (C=O), 138.54, 138.03 et 136.66 (C-*ipso*), 128.20, 128.13, 127.96, 127.71 et 127.47 (C-*aro*), 100.02 (C-1B), 99.59 (C-1B), 81.96 (C-1A), 80.71 (C-2B ou C-4A ou C-5A), 78.85 (C-3B), 77.32 (C-3C), 76.89 (C-5B), 75.19 (C-2B ou C-4A ou C-5A), 74.42 (CH₂Ph), 74.02 (C-4C ou C-5C), 73.89 (C-4C ou C-5C), 71.30 (CH₂Ph), 70.73 (C-3A ou C-4A), 66.87 (C-2B ou C-4A ou C-5A), 65.38 (CH₂Ph), 64.43 (C-6C), 61.74 (C-6A ou C-6B), 61.35 (C-6A ou C-6B), 58.67 (C-2C), 56.80 (C-2A) et 46.38 (C-4B).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₄₀H₄₇N₇O₁₃S [M + Na]⁺ : 888.2850
- Trouvée : 888.2842

1,6-Anhydro-2-azido-4-O-[2-azido-3-O-benzyl-4-S-(2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-4,6-O-(4-méthoxybenzylidène)-β-D-glucopyranosyl)-6-O-(*tert*-butyldiphénylsilyl)-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranosyl]-3-O-benzyl-2-désoxy-β-D-glucopyranose

**131**

À une solution de **128** (100 mg, 0.10 mmol) dans du DMF anhydre (2 mL) est ajouté de l'imidazole (33 mg, 0.48 mmol) et du chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyl (70 µl, 0.28 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous Ar pendant 22h. Le mélange est dilué dans du CH₂Cl₂ (10 mL) et lavé avec de l'eau (10 mL). La phase aqueuse est réextraite avec du CH₂Cl₂ (2 × 10 mL) et les phases organiques, réunies, sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (3:1 à 1:1 CH-AcOEt) pour donner le composé **131** (92 mg, 74 %).

Rf = 0.77 (CHCl₃-MeOH 95:5)

RMN ¹H (CDCl₃)

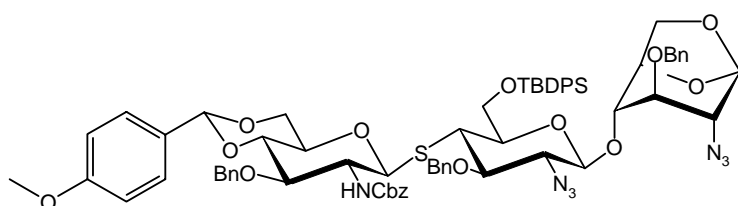
δ 7.71 (d, 2 H, *J* 7.1 Hz, H-aro), 7.63 (d, 2 H, *J* 7.1 Hz, H-aro), 7.54-7.18 (m, 23 H, H-aro), 6.91 (d, 2 H, *J* 8.6 Hz, H-aro), 5.58 (s, 1 H, H-1C), 5.43 (s, 1 H, CHPh), 5.12-4.92 (m, 3 H, 3 × CHPh), 4.82 (d, 1 H, *J* 10.0 Hz, CHPh), 4.75 (d, 1 H, *J*_{5,6'} 5.5 Hz, H-5C), 4.60 (d, 1 H, *J* 12.2 Hz, CHPh), 4.55 (d, 1 H, *J*_{1,2} 9.9 Hz, H-1A), 4.49 (d, 1 H, *J* 12.2 Hz, CHPh), 4.39 (d, 1 H, *J*_{1,2} 8.1 Hz, H-1B), 4.16-3.96 (m, 4 H, H-6C, H-6A ou H-6'A, H-6'B et H-4C), 3.92 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 11.2 Hz, H-6B), 3.85-3.76 (m, 5 H, CH₃O, H-3C et H-6'C), 3.58-3.36 (m, 5 H, H-2B, H-6'A ou H-6A, H-2A, H-3A et H-4A), 3.26-3.10 (m, 5 H, H-2C, H-4B, H-5B, H-3B et H-5A) et 1.09 (s, 9 H, 3 × CH₃Si).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 162.38 (C=O), 139.83 (C-*ipso*), 138.03, 137.66, 135.63, 134.52, 132.25, 131.41, 130.51, 130.38, 130.22, 130.04, 129.89, 129.69, 129.50, 115.78 (C-*aro*), 103.78 (C-1B ou CHPh), 103.49 (CHPh ou C-1B), 102.88 (C-1C), 85.00 (C-1A), 82.97 (C-4A), 82.32 (C-3B), 79.86

(C-5B), 79.48 (C-4C), 78.50 (C-3C), 77.94 (CH_2Ph), 76.17 (C-5C), 74.48 (C-3A), 74.35 (CH_2Ph), 71.65 (C-5A), 70.40 (C-6A), 69.16 (CH_2Ph), 68.89 (C-2B), 67.11 (C-6C), 64.83 (C-6B), 61.12 (C-2C), 59.20 (C-2A), 57.38 (CH_3O), 48.04 (C-4B) et 28.89 (CH_3Si).

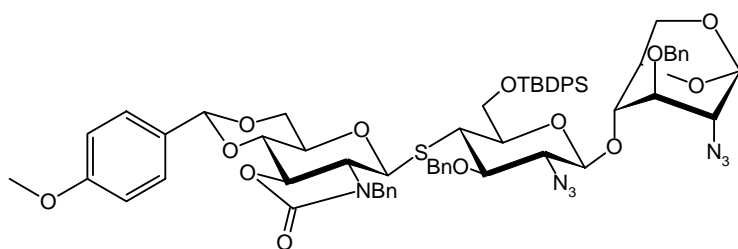
1,6-Anhydro-2-azido-4-O-[2-azido-3-O-benzyl-4-S-(3-O-benzyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy-4,6-O-(4-méthoxybenzylidène)- β -D-glucopyranosyl)-6-O-(t-butylidiphénylsilyl)-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranose



132

À une solution de **131** (23 mg, 0.019 mmol) dans du dioxane anhydre (1 mL) est ajouté du KOH (3 mg, 0.053 mmol) et du BnBr (22 μ l, 0.188 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 2h puis est ramené à température ambiante. La solution est versé dans de l'eau (5 mL), puis le mélange est extrait par du CH_2Cl_2 (5×5 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (3:1 à 1:1 CH-AcOEt) pour fournir, non pas le composé attendu **132**, mais le composé **133** (5 mg, 22%) dont la structure est confirmée par RMN.

1,6-Anhydro-2-azido-4-O-[2-azido-3-O-benzyl-4-S-(2-(N-benzyl)amino-2-N:3-O-carbonyl-2-désoxy-4,6-O-(4-méthoxybenzylidène)- β -D-glucopyranosyl)-6-O-(t-butylidiphénylsilyl)-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranose



133

Rf = 0.48 (CH-AcOEt 2:1)

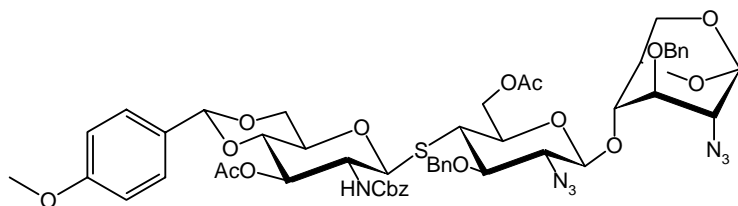
RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.70-7.60 (m, 4 H, H-aro), 7.52-7.18 (m, 23 H, H-aro), 6.91 (m, 2 H, H-aro), 5.59 (s, 1 H, H-1C), 5.46 (s, 1 H, CHPh), 4.92-4.82 (m, 3 H, CH₂Ph et H-1A), 4.71 (m, 1 H, H-5C), 4.62 (d, 1 H, *J* 15.6 Hz, CHPh), 4.56-4.48 (m, 2 H, 2 × CHPh), 4.44-4.36 (m, 2 H, H-1B et CHPh), 4.15-4.08 (m, 2 H, H-6C et H-6'A), 3.90 (m, 1 H, H-4C), 3.89-3.74 (m, 8 H, CH₃O, H-4A, H-3C, H-6'C, H-6B et H-6'B), 3.69 (t, 1 H, *J* 10.6 Hz, H-3A), 3.63 (d, 1 H, *J* 10.1 Hz, H-6A), 3.57 (dd, 1 H, *J*_{2,3} 9.3 Hz, H-2B), 3.46 (t, 1 H, *J*_{3,4+4,5} 22.1 Hz, H-4B), 3.29 (t, 1 H, *J*_{1,2} 9.8 Hz, H-2A), 3.25-3.17 (m, 4 H, H-3B, H-5A, H-2C et H-5B) et 1.12 (s, 9 H, 3 × CH₃Si).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 159.04 (C=O), 137.64 (C-*ipso*), 136.01, 135.39 (C-*aro*), 133.38, 132.24 (C-*ipso*), 130.43, 130.24 (C-*aro*), 128.88 (C-*ipso*), 128.60, 128.52, 128.47, 128.33, 128.21, 128.09, 127.89, 127.50, 127.35, 113.67 (C-*aro*), 101.43, 101.39 (C-1B et CHPh), 100.83 (C-1C), 83.83 (C-1A), 79.59 (C-3B), 78.43 (C-4A et C-3A), 77.76 (C-5B et C-4C), 76.44 (C-3C), 75.50 (CH₂Ph), 74.01 (C-5C), 72.51 (C-5A), 72.32 (CH₂Ph), 68.14 (C-6A), 66.71 (C-2B), 65.04 (C-6C), 62.69 (C-6B), 61.78 (C-2A), 58.94 (C-2C), 55.33 (CH₃O), 47.98 (CH₂Ph), 46.42 (C-4B) et 26.90 (CH₃Si).

4-O-[6-O-Acétyle-4-S-(3-O-acétyle-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy-4,6-O-(4-méthoxybenzylidène)-β-D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranosyl]-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-β-D-glucopyranose



134

À une solution de **128** (850 mg, 0.864 mmol) dans de la pyridine anhydre (6 mL) est ajouté de l'Ac₂O (2.5 mL, 25.9 mmol). Le mélange est agité sous Ar et à température ambiante pendant 1h puis les solvants sont éliminés sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (2:1 à 1:2 CH-AcOEt) pour fournir le thiotrisaccharide **134** (910 mg, 99%).

Rf = 0.61 (CH-AcOEt 1:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.47-7.41 (m, 2 H, H-aro), 7.39-7.26 (m, 15 H, H-aro), 6.91-6.85 (m, 2 H, H-aro), 5.52 (s, 1 H, H-1C), 5.44 (s, 1 H, CHPh), 5.28 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ 19.5 Hz, H-3A), 5.12 (d, 1 H, J 12.3 Hz, CHPh), 5.07 (d, 1 H, $J_{NH,2}$ 8.7 Hz, NH), 5.00-4.85 (m, 3 H, CH₂Ph et CHPh), 4.78-4.60 (m, 4 H, H-1A, H-5C et CH₂Ph), 4.50 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 12.0 Hz, $J_{5,6}$ 1.7 Hz, H-6B), 4.38-4.28 (m, 2 H, H-1B et H-6'B), 4.20-4.12 (m, 2 H, H-6C et H-6'A ou H-6A), 3.96 (m, 1 H, H-4C), 3.84-3.78 (m, 4 H, CH₃O, H-6'C), 3.76 (s, 1 H, H-3C), 3.70-3.58 (m, 3 H, H-2A, H-4A et H-6A ou H-6'A), 3.53 (t, 1 H, $J_{1,2+2,3}$ 17.6 Hz, H-2B), 3.47-3.33 (m, 2 H, H-5A et H-5B), 3.23 (s, 1 H, H-2C), 3.19 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ 19.9 Hz, H-3B), 2.82 (t, 1 H, J 10.8 Hz, H-4B), 2.02 (s, 3 H, CH₃CO) et 1.93 (s, 3 H, CH₃CO).

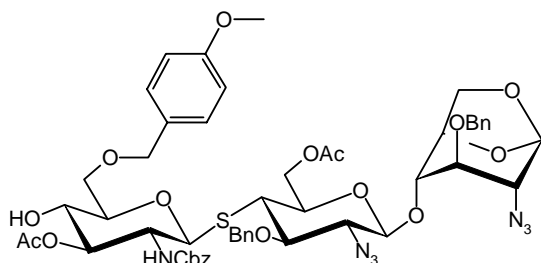
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 170.54, 160.20 (C=O), 137.64, 137.52, 129.22 (C-*ipso*), 128.58, 128.44, 128.06, 127.98, 127.59, 127.52, 113.61 (C-*aro*), 101.82 (C-1B), 101.46 (CHPh), 100.61 (C-1C), 85.16 (C-1A), 79.90 (C-3B), 78.44 (C-4A), 77.08 (C-3C), 76.91 (C-4C), 75.69 (CH₂Ph), 74.73 (C-5B ou C-5C), 74.61 (C-5C ou C-5B), 72.42 (CH₂Ph), 71.94 (C-3A), 70.62 (C-5A), 68.29 (C-6A), 66.98 (CH₂Ph), 66.74 (C-2B), 64.98 (C-6C), 63.04 (C-6B), 59.06 (C-2C), 56.24 (C-2A), 55.29 (CH₃O), 47.08 (C-4B), 20.88 et 20.64 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₅₂H₅₇N₇O₁₆S [M + Na]⁺ : 1090.3480
- Trouvée : 1090.3463

4-O-[6-O-Acétyl-4-S-(3-O-acétyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy-6-O-(4-méthoxybenzyl)- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranose



135

Une suspension du composé **134** (890 mg, 0.833 mmol) et de NaBH₃CN (261 mg, 4.16 mmol) dans du DMF anhydre (18 mL) contenant du tamis moléculaire 3 Å (800 mg) est agité sous Ar à température ambiante pendant 20 min. Le mélange réactionnel est refroidi à 0°C et du TFA (802 µL, 10.4 mmol) est ajouté. La solution est ensuite agitée sous Ar à température ambiante pendant 25h. La solution est filtrée sur Celite® et la Celite est lavée avec du CH₂Cl₂ (40 mL). Le filtrat est lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ (30 mL) puis la phase aqueuse est réextraite avec du CH₂Cl₂ (2 × 20 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:2 à 2:1 CH-AcOEt) pour donner l'accepteur **135** (705 mg, 79%).

Rf = 0.25 (CH-AcOEt 1:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.50-7.15 (m, 17 H, H-aro), 6.85 (m, 2 H, H-aro), 5.48 (s, 1 H, H-1C), 5.14-5.03 (m, 2 H, CHPh et NH), 5.03-4.92 (m, 2 H, H-3A et CHPh), 4.92-4.84 (m, 2 H, CH₂Ph), 4.66-4.56 (m, 4 H, H-1A, H-5C et CH₂Ph), 4.50-4.39 (m, 3 H, H-6B et CH₂Ph), 4.33 (dd, 1 H, *J*_{6,6'} 12.1 Hz, *J*_{5,6'} 4.3 Hz, H-6'B), 4.31 (d, 1 H, *J*_{1,2} 8.1 Hz, H-1B), 4.07 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 6.5 Hz, H-6C), 3.92 (m, 1 H, H-4C), 3.78 (s, 3 H, CH₃O), 3.74 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} 7.2 Hz, H-6'C), 3.70-3.56 (m, 5 H, H-2A, H-5B, H-6A, H-6'A et H-4A), 3.56-3.48 (m, 3 H, H-5A, H-2B et H-3C), 3.29 (t, 1 H, *J*_{1,2+2,3} 19.7 Hz, H-3B), 3.21 (s, 1 H, H-2C), 3.09 (se, 1 H, OH), 2.96 (t, 1 H, *J* 10.8 Hz, H-4B), 1.98 (s, 3 H, CH₃CO) et 1.95 (s, 3 H, CH₃CO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

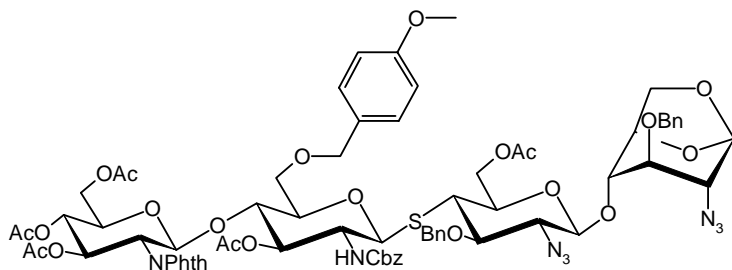
δ 171.82, 170.68, 159.33 (C=O), 137.77, 137.53, 129.55 (C-*ipso*), 129.14, 128.55, 128.46,

128.24, 128.01, 127.50, 113.90 (C-*aro*), 101.74 (C-1B), 100.55 (C-1C), 82.77 (C-1A), 78.54 (C-3B), 77.97 (C-5A), 76.80 (C-3C et C-4C), 76.08 (C-3A), 74.67 (CH₂Ph), 74.61 (C-5C), 74.44 (C-5B ou C-4A), 73.27 (CH₂Ph), 72.31 (CH₂Ph), 70.67 (C-4A ou C-5B), 70.35 (C-6A), 66.91 (CH₂Ph), 66.73 (C-2B), 64.95 (C-6C), 63.49 (C-6B), 59.18 (C-2C), 55.25 (C-2A et CH₃O), 45.95 (C-4B), 20.84 et 20.74 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₅₂H₅₉N₇O₁₆S [M + Na]⁺ : 1092.3637
- Trouvée : 1092.3647

4-O-[6-O-Acétyle-4-S-(3-O-acétyle-4-O-[3,4,6-tri-O-acétyle-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl]-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-6-O-(4-méthoxybenzyle)-β-D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranosyl]-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-β-D-glucopyranose



136

Une suspension de l'alcool **135** (682 mg, 0.637 mmol) et de l'imidate **127** (185 mg, 0.319 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (42 mL) contenant du tamis moléculaire 4 Å en poudre (1.7 g) est agité sous Ar à température ambiante pendant 30 min. Le mélange réactionnel est refroidi à – 50°C et une solution de BF₃.Et₂O (269 µL, 0.0636 mmol) est ajouté. La solution est réchauffée pendant 1 h jusqu'à – 20°C. Au bout de 15 min, l'imidate ayant été totalement consommé, une solution d'imidate dans du CH₂Cl₂ anhydre (185 mg, 0.319 mmol) est ajoutée au mélange réactionnel. Après 50 min d'agitation à – 20°C, une solution d'imidate (92 mg, 0.159 mmol) est de nouveau ajoutée au milieu pour consommer l'accepteur n'ayant pas réagi. Après 1h40, la réaction est neutralisée par de la triéthylamine

(150 μ L) et le milieu est agité à température ambiante pendant 10 minutes. Le tamis est filtré, le filtrat est dilué avec du CH_2Cl_2 (50 mL) et lavé avec une solution saturée de NaCl (50 mL). Les phases aqueuses sont réextraites au CH_2Cl_2 (2×50 mL) et les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées pour donner un résidu qui est purifié par chromatographie sur gel de silice (3:1 à 1:1, $\text{PhCH}_3/\text{AcOEt}$). Une chromatographie d'exclusion stérique (LH20 1:1 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$) est nécessaire pour donner le composé **136** (685 mg, 72%).

Rf = 0.55 ($\text{PhCH}_3\text{-AcOEt}$ 3:2)

RMN ^1H (CDCl_3)

δ 7.83 (m, 2 H, H-aro), 7.70 (m, 2 H, H-aro), 7.42-7.20 (m, 15 H, H-aro), 7.15 (d, 2 H, J 8.1 Hz H-aro), 6.85 (d, 2 H, J 8.1 Hz H-aro), 5.73 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ 19.6 Hz, H-3A), 5.45 (s, 1 H, H-1D), 5.34 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8.4 Hz, H-1A), 5.13 (t, 1 H, J 9.6 Hz, H-4A), 5.11-4.98 (m, 2 H, H-3B et CHPh), 4.93 (d, 1 H, J 12.7 Hz, CHPh), 4.88-4.79 (m, 2 H, CH_2Ph), 4.74 (d, 1 H, $J_{\text{NH},2}$ 9.1 Hz, NH), 4.62-4.43 (m, 4 H, H-1B, H-5D, CH_2Ph et H-6C), 4.38 (m, 1 H, H-6'A), 4.31-4.16 (m, 5 H, H-6'C, CH_2Ph , H-1C et H-2A), 4.06-3.97 (m, 2 H, H-6A et H-6D), 3.88 (s, 1 H, H-4D), 3.86-3.76 (m, 4 H, H-4B et CH_3O), 3.71 (t, 1 H, J 6.7 Hz, H-6'D), 3.65-3.44 (m, 4 H, H-5A, H-2B, H-5C et H-2C), 3.42 (s, 1 H, H-3D), 3.40-3.15 (m, 5 H, H-6B, H-6'B, H-5B, H-3C et H-2D), 2.87 (t, 1 H, J 10.7 Hz, H-4C), 2.07, 2.02, 1.95, 1.93 et 1.84 (5 s, 15 H, $5 \times \text{CH}_3\text{CO}$).

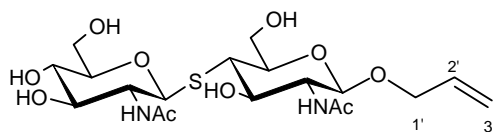
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

δ 170.54, 170.42, 170.11, 169.42, 159.19, 155.63 (C=O), 137.62, 136.20 ($\text{C-}ipso$), 134.49 ($\text{C-}aro$), 131.24, 129.96 ($\text{C-}ipso$), 128.95, 128.51, 128.44, 128.08, 127.96, 127.44, 123.64, 113.76 ($\text{C-}aro$), 101.74 (C-1C), 100.55 (C-1D), 97.06 (C-1A), 82.12 (C-1B), 78.18 (C-5B et C-3C), 76.94 (C-3D et C-4D), 74.61 (C-5D), 74.36 (CH_2Ph), 74.29 (C-5C ou C-4B), 73.96 (C-4B ou C-5C), 72.95 (C-3B), 72.50 (CH_2Ph), 72.29 (CH_2Ph), 71.80 (C-5A), 70.52 (C-3A), 68.59 (C-6B), 68.47 (C-4A), 66.94 (CH_2Ph), 66.74 (C-2C), 64.90 (C-6D), 63.54 (C-6C), 61.56 (C-6A), 59.17 (C-2D), 55.82 (C-2B), 55.24 (CH_3O), 54.86 (C-2A), 45.75 (C-4C), 20.77, 20.68, 20.57, 20.50 et 20.37 (CH_3CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour $\text{C}_{72}\text{H}_{78}\text{N}_8\text{O}_{25}\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1509.4697
- Trouvée : 1509.4689

Allyl 4-S-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-acétamido-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranoside

**137**

À une solution de **146** (300 mg, 0.434 mmol) dans du MeOH anhydre (3 mL) est ajouté du MeONa (75 mg, 1.39 mmol) puis le mélange est agité à température ambiante sous Ar pendant 4h. De l'eau est ajoutée puis le pH ajusté à 7 par addition de résine Amberlite® IR 120. La résine est éliminée puis le solvant est évaporé. Le résidu est cristallisé dans un mélange acétone-MeOH (2:1) pour donner le composé **137**, avec un rendement de 72% (150 mg) sous la forme de cristaux blancs.

Rf = 0.38 (CHCl₃-MeOH 2:1)

F 299°C (décomposition)

$[\alpha]_D^{25}$ - 41° (c 1.0, H₂O)

RMN ¹H (D₂O)

δ 5.92 (m, 1 H, H-2'), 5.40-5.22 (m, 2 H, H-3't et H-3'c), 4.74 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 10.4 Hz, H-1A), 4.55 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8.5 Hz, H-1B), 4.35 (dd, 1 H, $J_{1',1'}$ 12.9 Hz, $J_{1',2'}$ 4.5 Hz, H-1'a), 4.17 (dd, 1 H, $J_{1',2'}$ 6.0 Hz, H-1'b), 4.09 (d, 1 H, $J_{6,6'}$ 11.8 Hz, H-6B), 3.98-3.85 (m, 2 H, H-6A et H-6'B), 3.82-3.54 (m, 6 H, H-2A, H-6'A, H-2B, H-5B, H-3B et H-3A), 3.54-3.40 (m, 2 H, H-4A et H-5A), 2.89 (t, 1 H, J 10.5 Hz, H-4B) et 2.04 (s, 6 H, 2 × CH₃CO).

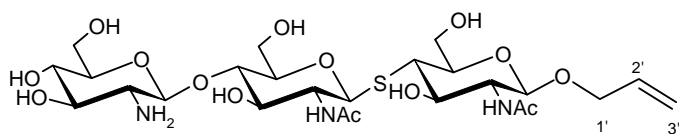
RMN ¹³C (100 MHz, D₂O)

δ 172.61, 172.53 (COCH₃), 131.31 (C-2'), 116.24 (C-3'), 97.73 (C-1B), 81.76 (C-1A), 77.79 (C-4A ou C-5A), 74.36 (C-5B), 72.85 (C-3A), 69.36 (C-3B), 68.35 (C-1'), 67.60 (C-5A ou C-4A), 59.42 (C-6B), 58.74 (C-6A), 54.84 (C-2B), 52.93 (C-2A), 46.13 (C-4B) et 20.13 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₁₉H₃₂N₂O₁₀S [M + Na]⁺ : 503.1675
- Trouvée : 503.1672

Allyl 4-S-(2-acétamido-4-O-[2-amino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl]-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-acétamido-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranoside

**138**

Le thiodisaccharide **137** (5.45 mg, 0.01135 mmol) est incubé pendant 14 jours avec de l'UDP-GlcNH₂ **150** (8.9 mg, 0.0137 mmol) et de la β-1,4-galactosyltransférase (5.6 unités) dans 1 mL d'un milieu tampon composé de MnCl₂ (25 μl, 5 mmol, solution à 1 M) et en présence d'α-lactalbumine (45 μl, solution à 25 mg.mL⁻¹) et d'alkaline phosphatase (1 unité). Le brut réactionnel est alors purifié par chromatographie de perméation de gel de type Bio-Gel P2 (NH₄⁺AcO⁻ 0.25 M, 0.32 mL.min⁻¹), puis par passage sur une résine échangeuse d'ions, AG MP-1 (H₂O MilliQ) pour donner le composé **138** pur (3 mg, 41%) après lyophilisation.

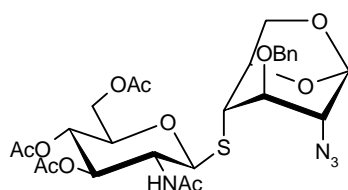
RMN ¹H (100 MHz, D₂O)

δ 5.88 (m, 1 H, H-2'), 5.35-5.19 (m, 2 H, H-3't et H-3'c), 4.71 (d, 1 H, *J*_{1,2} 10.1 Hz, H-1B), 4.52 (d, 1 H, *J*_{1,2} 8.4 Hz, H-1C), 4.46 (d, 1 H, *J*_{1,2} 8.0 Hz, H-1A), 4.30 (dd, 1 H, *J*_{1',1'} 13.1 Hz *J*_{1',2'} 6.3 Hz, H-1'a), 4.12 (dd, 1 H, *J*_{1',1'} 13.0 Hz *J*_{1',2'} 6.4 Hz, H-1'b), 4.05 (dd, 1 H, *J*_{6,6'} 12.0 Hz, *J*_{6,5} 1.4 Hz, H-6C), 3.96-3.82 (m, 3 H, H-6B, H-6'C et H-3B ou H-4B ou H-5B), 3.82-3.64 (m, 6 H, H-6'B, H-6A, H-6'A, H-2B, H-2C et H-3B ou H-4B ou H-5B), 3.63-3.52 (m, 3 H, H-5C, H-3C et H-3B ou H-4B ou H-5B), 3.46 (m, 1 H, H-4A ou H-5A), 3.42-3.32 (m, 2 H, H-3A et H-4A ou H-5A), 2.85 (t, 1 H, *J* 10.8 Hz, H-4C), 2.66 (m, 1 H, H-2A), 2.03 (s, 3 H, CH₃CO) et 2.02 (s, 3 H, CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₂₅H₄₃N₃O₁₄S [M + H]⁺ : 642.2544
- Trouvée : 642.2563

4-S-(2-Acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranose

**139**

À une suspension de NaH (55% dans l'huile, 2.33 g, 53.4 mmol) dans du DMF (10 mL), est ajoutée une solution du thiol **91** (17.6 g, 42.8 mmol) dans du DMF (300 mL) à 0°C. Le mélange réactionnel est agité pendant 10 min à 0°C puis 10 min à 20°C. Cette solution d'alcoolate est ajoutée au triflate **118** (18.65 g, 51.3 mmol) et agitée pendant 1 h à 20°C. Le milieu est ensuite neutralisé par addition d'acide acétique (20 mL) et agité pendant 30 min. Les solvants sont éliminés sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:0 à 1:4 toluène-AcOEt) pour donner le thiodisaccharide **139** (24.55 g, 90%) sous la forme de cristaux blancs.

Rf = 0.47 (CHCl₃-MeOH 95:5)

F 183.0°C

$[\alpha]_D^{25} - 44^\circ$ (*c* 0.99, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.41-7.36 (m, 5 H, H-aro), 5.54 (d, 1 H, *J*_{NH,2} 9.1 Hz, NH), 5.44 (s, 1 H, H-1B), 5.26 (t, 1 H, *J*_{2,3+3,4} 19.8 Hz, H-3A), 5.09 (t, 1 H, *J*_{3,4+4,5} 19.5 Hz, H-4A), 4.93 (d, 1 H, *J*_{1,2} 10.4 Hz, H-1A), 4.76-4.70 (m, 2 H, CHPh, H-5B), 4.67 (d, 1 H, *J* 11.9 Hz, CHPh), 4.27 (d, 1 H, *J*_{6,6'} 7.4 Hz, H-6B), 4.19 (dd, 1 H, *J*_{6,6'} 12.4 Hz, *J*_{5,6'} 4.7 Hz, H-6'A), 4.14 (dd, 1 H, *J*_{5,6} 2.3 Hz, H-6A), 4.00 (td, 1 H, *J*_{2,3} 10.4 Hz, H-2A), 3.82 (m, 1 H, H-4B), 3.77 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} 5.6 Hz, H-6'B), 3.68 (m, 1 H, H-5A), 3.52 (s, 1 H, H-3B), 3.23 (s, 1 H, H-2B), 2.06, 2.05, 2.03 et 1.95 (4 s, 12 H, 4 x CH₃CO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

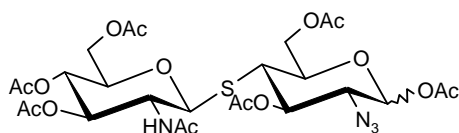
δ 170.88, 170.58, 170.23 et 169.37 (COCH₃), 137.45 (C-*ipso*), 128.60, 128.04 et 127.69 (C-*aro*), 100.07 (C-1B), 83.39 (C-1A), 78.60 (C-4B), 76.14 (C-5A et C-5B), 73.34 (C-3A),

72.30 (CH_2Ph), 68.25 (C-4A), 67.76 (C-6B), 62.04 (C-6A), 60.15 (C-3B), 53.75 (C-2A), 44.00 (C-2B) et 23.34, 20.68 et 20.62 (CH_3CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour $C_{27}H_{34}N_4O_{11}S$ $[M + Na]^+$: 645.1843
- Trouvée : 645.1845

1,3,6-Tri-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranose



144

À une solution du thiodisaccharide **147** (22.68 g, 31.30 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (220 mL) est ajouté du $FeCl_3$ (20.39 g, 125.70 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 1.5 h sous Ar à température ambiante. Le solvant est éliminé et le résidu est dissous dans la pyridine (210 mL) puis de l' Ac_2O (105 mL, 1.113 mol) est ajouté. La solution est agitée à température ambiante pendant 1.5 h. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le résidu est dissous dans de l' $AcOEt$ (350 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution de HCl , 1 N (250 mL), une solution saturée de $NaHCO_3$ (250 mL) et une solution saturée de $NaCl$ (250 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l' $AcOEt$ (2 x 250 mL) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le composé **144** (13.1 g, 62 %) est obtenu sous la forme de cristaux blancs après une cristallisation dans l'éthanol et une purification par chromatographie sur gel de silice (0:1 à 9:1 $AcOEt-CH$). Le spectre de RMN du proton dans $CDCl_3$ montre un rapport $\alpha:\beta$ de 80:20.

Rf = 0.50 ($CHCl_3$ -MeOH 95:5)

RMN 1H ($CDCl_3$)

δ 6.33 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.3 Hz, H-1B α), 5.77 (d, 1 H α , $J_{NH,2}$ 9.8 Hz, NH α), 5.69 (d, 1 H β ,

$J_{\text{NH},2}$ 10.1 Hz, NH β), 5.49 (d, 1 H β , J 8.6 Hz, H-1B β), 5.43 (t, 1 H α , $J_{2,3+3,4}$ 21.0 Hz, H-3B α), 5.11 (t, 1 H α , $J_{2,3+3,4}$ 19.4 Hz, H-3A α), 5.08-4.91 (m, 1 H α et 3 H β , H4A α , H4A β , H3A β et H3B β), 4.74 (d, 1 H α et 1 H β , $J_{1,2}$ 10.4 Hz, H-1A α et H-1A β), 4.60 (dd, 1 H α , $J_{6,6'}$ 12.5 Hz, $J_{5,6'}$ 3.9 Hz, H-6'B α), 4.55 (dd, 1 H β , $J_{6,6'}$ 12.5 Hz, $J_{5,6'}$ 4.6 Hz, H-6'B β), 4.46 (m, 1 H β , H-6B β), 4.40-4.29 (m, 2 H α , H-5B α et H-6B α), 4.28-4.13 (m, 2 H α et 2 H β , H-2A α , H-2A β , H-6A α et H-6A β), 4.10-4.00 (m, 1 H α et 1 H β , H-6'A α et H-5B β), 3.95 (dd, 1 H β , $J_{6,6'}$ 12.1 Hz, $J_{5,6'}$ 7.9 Hz, H-6'A β), 3.76-3.63 (m, 2 H α et 2 H β , H-2B α , H-2B β , H-5A α et H-5A β), 2.95 (t, 1 H α , J 11.2 Hz, H-4B α), 2.86 (t, 1 H β , $J_{3,4+4,5}$ 21.7 Hz, H-4B β), 2.22 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.19 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.19-2.18 (2 s, 6 H β , 2 x CH₃CO β), 2.13 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.07 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.06-2.01 (m, 9 H α et 9 H β , 3 x CH₃CO α et 3 x CH₃CO β), 1.95 (s, 3 H α , CH₃CONH α) et 1.92 (s, 3 H β , CH₃CONH β).

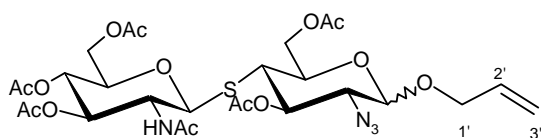
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) pour l'anomère α

δ 171.27, 170.61 et 170.32 (COCH₃), 90.28 (C-1B), 82.27 (C-1A), 75.94 (C-5A), 74.15 (C-3A), 71.12 (C-5B), 68.51 (C-4A), 67.82 (C-3B), 63.04 et 62.91 (C-6B et C-6A), 61.75 (C-2B), 51.87 (C-2A), 45.77 (C-4B) et 23.00, 20.89, 20.74 et 20.55 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₂₆H₃₆N₄O₁₅S [M + Na]⁺ : 699.1796
- Trouvée : 699.1796

Allyl 3,6-di-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-2-désoxy-4-thio- α , β -D-glucopyranoside



145

Une solution de l'imidate **149** (8.868 g, 11.39 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (140 mL) contenant du tamis moléculaire 4Å (8 g) est agitée sous Ar à température ambiante pendant 1 h puis 10 min à - 45°C. De l'alcool allylique (1.55 mL, 22.77 mmol) puis du BF₃.Et₂O

(0.919 mL, 3.415 mmol) sont ajoutés à cette solution qui est réchauffée à -10°C en 2 h. La triéthylamine (200 μL) est ajoutée et le mélange est agité à température ambiante pendant 20 min. Le tamis moléculaire est filtré et le filtrat est dilué avec du CH_2Cl_2 (250 mL), lavé avec une solution saturée de NaCl (250 mL). La phase aqueuse est réextraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 100 mL) et les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel d'alumine (1:2, 1:1, 3:1, 5:1 puis 1:0, AcOEt-CH) pour donner l'allyle glycoside **145** (6.410 g, 83%) sous forme de cristaux blancs. Le spectre de RMN du proton dans CDCl_3 montre un rapport $\alpha:\beta$ de 10:90.

Données analytiques pour **145**

Rf = 0.58 (CH-AcOEt 1:1, Al_2O_3)

F 187.3 $^{\circ}\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3)

δ 5.94 (m, 1 H, H-2'), 5.70 (d, 1 H, $J_{\text{NH},2}$ 9.7 Hz, NH), 5.34 (dd, 1 H, $J_{3't,2'}$ 17.2 Hz, $J_{3't,3'c}$ 1.5 Hz, H-3't), 5.26 (dd, 1 H, $J_{3'c,2'}$ 10.4 Hz, $J_{3'c,3't}$ 1.5 Hz, H-3'c), 5.08-4.96 (m, 2 H, H-3A et H-4A), 4.93 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 9.9 Hz, $J_{3,4}$ 11.0 Hz, H-3B), 4.72 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 10.7 Hz, H-1A), 4.54-4.49 (m, 2 H, H-6B et H-6'B), 4.43-4.35 (m, 2 H, H-1B et H-1'a), 4.25-4.09 (m, 3 H, H-2A, H-6A et H-1'b), 4.01 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 12.3 Hz, $J_{5,6'}$ 6.4 Hz, H-6'A), 3.84 (m, 1 H, H-5B), 3.69 (m, 1 H, H-5A), 3.52 (dd, 1 H, $J_{1,2}$ 8.1 Hz, $J_{2,3}$ 9.7 Hz, H-2B), 2.83 (t, 1 H, J 10.9 Hz, H-4B), 2.17, 2.09, 2.07, 2.04, 2.02 et 1.92 (6 s, $6 \times \text{CH}_3\text{CO}$).

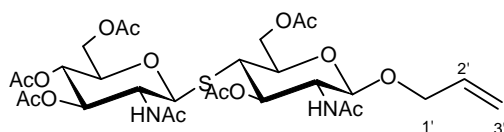
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

δ 171.27, 170.85, 170.47, 170.16, 169.67, 169.26 (C=O), 133.02 (C-2'), 118.09 (C-3'), 100.83 (C-1B), 81.72 (C-1A), 75.65 (C-5A), 74.14 (C-3A), 73.48 (C-5B), 70.32 (C-6B), 69.84 (C-3B), 68.25 (C-4A), 65.02 (C-2B), 63.48 (C-1'), 62.69 (C-6A), 51.92 (C-2A), 46.15 (C-4B), 22.99, 21.06, 20.80 et 20.62 (CH_3CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 697.2003
- Trouvée : 697.1996

Allyl 3,6-di-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-acétamido-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranoside

**146**

À une solution de **145β** (5.410 g, 8.02 mmol) dans du THF anhydre (260 mL) sont ajoutés du zinc en poudre (52.42 g, 801.9 mmol) et de l'AcOH (22.9 mL, 400.9 mmol). Le mélange réactionnel est agité, sous Ar, à température ambiante pendant 1h30, puis de l'Ac₂O (140 mL) est ajouté au milieu. Le mélange réactionnel est agité à nouveau pendant 1h30 à température ambiante, puis la solution est filtrée sur Celite[®] et le filtrat est évaporé. Le résidu est dissous dans de l'AcOEt (300 mL) et lavé successivement avec de l'eau (200 mL), une solution saturée de NaHCO₃ (200 mL) et une solution saturée de NaCl (200 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l'AcOEt (6 × 100 mL). Les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:0 et 95:5 CHCl₃-MeOH) pour fournir le composé **146** (2.505 g, 45%) sous forme de cristaux blancs.

Rf = 0.33 (CHCl₃-MeOH 9:1)

F 238.0°C

$[\alpha]_D^{25} - 54^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 5.87 (m, 1 H, H-2'), 5.78 (d, 1 H, *J*_{NH,2} 9.4 Hz, NH-A), 5.74-5.65 (m, 2 H, H-3B et NH-B), 5.27 (dd, 1 H, *J*_{3',1,2'} 17.2 Hz, *J*_{3',1,3'c} 1.6 Hz, H-3't), 5.21 (dd, 1 H, *J*_{3',c,2'} 10.3 Hz, *J*_{3',c,3't} 1.6 Hz, H-3'c), 5.12-4.98 (m, 2 H, H-3A et H-4A), 4.91 (d, 1 H, *J*_{1,2} 8.3 Hz, H-1B), 4.74 (d, 1 H, *J*_{1,2} 10.5 Hz, H-1A), 4.53 (m, 2 H, H-6B et H-6'B), 4.32 (m, 1 H, H-1'a), 4.23-4.12 (m, 2 H, H-2A et H-6A), 4.10-4.02 (m, 2 H, H-6'A et H-1'b), 3.90 (m, 1 H, H-5B), 3.74 (m, 1 H, H-5A), 3.46 (m, 1 H, H-2B), 2.83 (t, 1 H, *J* 10.8 Hz, H-4B), 2.11 (s, 3 H, CH₃CO), 2.10 (s, 3 H, CH₃CO), 2.07 (s, 3 H, CH₃CO), 2.04 (s, 3 H, CH₃CO), 2.02 (s, 3 H, CH₃CO), 1.99 (s, 3 H, CH₃CO) et 1.92 (s, 3 H, CH₃CO).

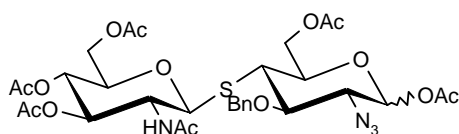
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

δ 170.65 et 169.75 (COCH_3), 133.56 (C-2'), 117.83 (C-3'), 98.77 (C-1B), 82.16 (C-1A), 75.70 (C-5A), 74.26 (C-3A), 73.42 (C-5B), 70.00 (C-1'), 68.87 (C-3B), 68.23 (C-4A), 63.63 (C-6B), 62.57 (C-6A), 57.27 (C-2B), 52.17 (C-2A), 46.71 (C-4B) et 23.49, 23.01, 20.97, 20.87 et 20.64 (CH_3CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 713.2204
- Trouvée : 713.2200

1,6-Di-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranose

147

Le thiodisaccharide **139** (24.55 g, 38.58 mmol) est dissous dans un mélange Ac_2O -TFA (9:1, 166 mL) et la solution est agitée pendant 6.5 h à 40°C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et les traces résiduelles d'acide sont éliminées par coévaporation au toluène. Une purification par chromatographie sur gel de silice (3:2 à 0:1 toluène-AcOEt) du résidu donne un mélange anomérique du composé **147** (22.98 g, 96%) sous la forme de cristaux blancs. Le spectre de RMN du proton montre un rapport $\alpha:\beta$ de 65:35.

Rf = 0.63 (CHCl_3 -MeOH 95:5)

RMN ^1H (CDCl_3)

δ 7.50-7.30 (m, 5 H_α et 5 H_β , H-aro), 6.29 (d, 1 H_α , $J_{1,2}$ 3.2 Hz, H-1B α), 5.58 (d, 1 H_α , $J_{1,2}$ 8.6 Hz, H-1A α), 5.47 (m, 2 H_β , H-1B β et H-1A β), 5.30 (t, 1 H_α et 1 H_β , $J_{2,3+3,4}$ 19.7 Hz, H-3A α et H-3A β), 5.08-4.95 (m, 2 H_α et 2 H_β , CHPh_α , CHPh_β , H-4A α et H-4A β), 4.95-4.85 (m, 2 H_α et 2 H_β , CHPh_α , CHPh_β , NH_α et NH_β), 4.57-4.0 (m, 2 H_α et 2 H_β , H-6'B α , H-6B' β , H-6B α et H-6B β), 4.19 (dd, 1 H_α , $J_{6,6'}$ 12.5 Hz, $J_{5,6'}$ 4.9 Hz, H-6'A α),

4.11-3.96 (m, 2 H α et 2 H β , H-5B α , H-6A α , H-6'A β et H-6A β), 3.89-3.77 (m, 1 H α et 2 H β , H-2A α , H-2A β et H-5B β), 3.73 (t, 1 H α , J 10.1 Hz, H-3B α), 3.69-3.63 (m, 2 H α et 1 H β , H-5A α , H-5A β et H-2B α), 3.60 (t, 1 H β , $J_{1,2 + 2,3}$ 17.9 Hz, H-2B β), 3.41 (t, 1 H β , $J_{2,3 + 3,4}$ 20.0 Hz, H-3B β), 2.98 (t, 1 H α , $J_{3,4 + 4,5}$ 21.4 Hz, H-4B α), 2.93 (t, 1 H β , $J_{3,4 + 4,5}$ 21.2 Hz, H-4B β), 2.20-2.17 (2 s, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 2.12 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.09 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.05-2.00 (m, 6 H α et 12 H β , 2 x CH₃CO α et 4 x CH₃CO β), 1.71 (s, 3 H α , CH₃CONH α) et 1.68 (s, 3 H β , CH₃CONH β).

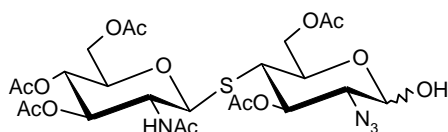
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) pour l'anomère α

δ 170.47 et 168.66 (COCH₃), 128.56, 128.16, 127.64 et 127.55 (C-*aro*), 90.39 (C-1B), 83.60 (C-1A), 77.00 (C-3B), 75.61 (CH₂Ph), 75.21 (C-5A), 72.78 (C-3A), 72.52 (C-5B), 68.20 (C-4A), 63.88 (C-2B), 63.23 (C-6B), 62.08 (C-6A), 54.48 (C-2A), 46.77 (C-4B) et 23.06, 20.95 et 20.62 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₃₁H₄₀N₄O₁₄S [M + Na]⁺ : 747.2159
- Trouvée : 747.2158

3,6-Di-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranose



148

À une solution du composé **144** (12.82 g, 18.93 mmol) dans du DMF (110 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (2.1 g, 22.79 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous Ar pendant 1 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et les traces résiduelles de DMF sont éliminées par coévaporation au toluène. Le résidu est dissous dans de l'AcOEt (200 mL) et la phase organique est lavée successivement avec de l'eau (150 mL) et une solution saturée de NaCl (150 mL). Les phases aqueuses sont

réextraites avec de l'AcOEt (2 x 250 mL) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:0 à 95:5 CHCl₃-MeOH) pour donner le composé **148** (8.955 g), sous forme vitreuse et avec un rendement de 75 %. Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α : β de 70:30.

Rf = 0.43 (CHCl₃-MeOH 95:5)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 5.90 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 9.9 Hz, H-1A α), 5.81 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 9.9 Hz, H-1A β), 5.55 (t, 1 H α , J 10.5 Hz, H-3B α), 5.40 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.1 Hz, H-1B α), 5.09 (t, 1 H α , J 9.5 Hz, H-3A α), 5.08-4.97 (m, 1 H α , 3 H β , H-3A β , H-3B β , H-4A α et H-4A β), 4.82 (d, 1 H α , $J_{\text{NH},2}$ 10.4 Hz, NH α), 4.78 (d, 1 H β , $J_{\text{NH},2}$ 10.5 Hz, NH β), 4.69 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 7.9 Hz, H-1B β), 4.57 (dd, 1 H α , $J_{6,6'}$ 11.8 Hz, $J_{5,6'}$ 3.7 Hz, H-6'B α), 4.55 (m, 1 H α et 2 H β , H-5B α , H-6B β et H-6'B β), 4.44 (dd, 1 H α , $J_{5,6}$ 1.6 Hz, H-6B α), 4.26-4.16 (m, 2 H α et 2 H β , H-2A α , H-2A β , H-6A α et H-6A β), 4.01 (dd, 1 H α et 1 H β , $J_{6,6'}$ 12.3 Hz, $J_{5,6'}$ 6.0 Hz, H-6'A α et H-6'A β), 3.92 (m, 1 H β , H-5B β), 3.73 (m, 1 H α et 1 H β , H-5A α et H-5A β), 3.50 (m, 1 H α et 1 H β , H-2B α et H-2B β), 2.91-2.82 (m, 1 H α et 1 H β , H-4B α et H-4B β), 2.17 (s, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 2.10 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.09 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.07 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.06 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.03 (s, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 2.01 (s, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 1.94 (s, 3 H α , CH₃CO α) et 1.92 (s, 3 H β , CH₃CO β).

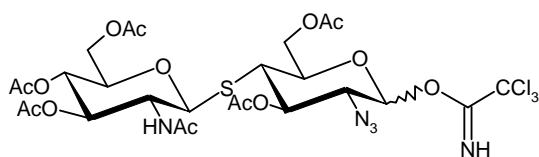
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 170.81, 170.72, 170.13, 169.41 (C=O), 96.08 (C-1B β), 91.75 (C-1B α), 81.88 (C-1A α), 81.70 (C-1A β), 75.53 (C-5A α), 75.44 (C-5A β), 74.25 (C-3A α), 74.14 (C-3A β), 73.55 (C-5B β), 70.13 (C-3B β), 68.61 (C-5B α), 68.42 (C-4A α), 68.25 (C-4A β), 67.92 (C-3B α), 66.20 (C-2B β), 63.48 (C-6B α et C-6B β), 63.18 (C-2B α), 62.50 (C-6A α et C-6A β), 52.04 (C-2A α et C-2A β), 46.25 (C-4B α), 46.11 (C-4B β), 22.93, 21.07, 20.86, 20.74 et 20.62 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₂₄H₃₄N₄O₁₄S [M + Na]⁺ : 657.1690
- Trouvée : 657.1714

3,6-Di-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio- α,β -D-glucopyranosyl trichloroacétimide



149

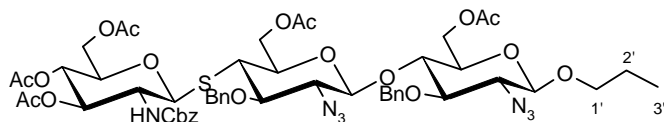
À une solution d'hémiacetal **148** (8.74 g, 13.75 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (130 mL) sont ajoutés du trichloroacétonitrile (27.5 mL, 275 mmol) et du DBU (532 μL , 3.57 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 45 min sous Ar et à température ambiante. Le solvant est éliminé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (silice préalablement neutralisée par des lavages avec une solution de NEt_3 , 5% dans de l'AcOEt) (1:0 à 95:5 CHCl_3 -MeOH) pour donner l'imide **149** (10.18 g, 95%) sous forme d'huile. Le spectre de RMN du proton dans CDCl_3 montre un rapport α : β de 85:15.

Rf = 0.60 (CHCl_3 -MeOH 95:5)

RMN ^1H (CDCl_3)

δ 8.81 (s, 1 H α , $\text{NHCCl}_3\alpha$), 8.73 (s, 1 H β , $\text{NHCCl}_3\beta$), 6.52 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 3.4 Hz, H-1B α), 5.78 (d, 1 H α , $J_{\text{NH},2}$ 9.9 Hz, NH α), 5.70 (d, 1 H β , $J_{\text{NH},2}$ 10.2 Hz, NH β), 5.66 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 8.5 Hz, H-1B β), 5.52 (t, 1 H α , $J_{2,3+3,4}$ 21.1 Hz, H-3B α), 5.11-5.00 (m, 2 H α et 2 H β , H-3A α , H-3A β , H-3B β et H-4A α), 4.95 (t, 1 H β , $J_{3,4+4,5}$ 19.4 Hz, H-4A β), 4.78-4.68 (m, 1 H α et 1 H β , H-1A β et H-1A α), 4.66-4.55 (m, 1 H α et 1 H β , H-6B' α et H-6B' β), 4.50-4.38 (m, 2 H α et 1 H β , H-5B α , H-6B α et H-6B β), 4.28-4.17 (m, 1 H α et 2 H β , H-2A α , H-2A β et H-6A β), 4.09 (dd, 1 H α , $J_{6,6'}$ 12.4 Hz, $J_{5,6}$ 2.8 Hz, H-6A α), 4.06-3.98 (m, 1 H α et 1 H β , H-6'A α et H-5B β), 3.94 (dd, 1 H β , $J_{6,6'}$ 12.0 Hz, $J_{5,6'}$ 8.4 Hz, H-6A' β), 3.88-3.78 (m, 1 H α et 1 H β , H-2B α et H-2B β), 3.74 (m, 1 H β , H-5A β), 3.54 (m, 1 H α , H-5A α), 3.01 (t, 1 H α , J 11.0 Hz, H-4B α), 2.93 (t, 1 H β , J 11.0 Hz, H-4B β), 2.20 (s, 3 H β , $\text{CH}_3\text{CO}\beta$), 2.19 (s, 3 H α , $\text{CH}_3\text{CO}\alpha$), 2.14 (s, 3 H β , $\text{CH}_3\text{CO}\beta$), 2.06 (s, 3 H α , $\text{CH}_3\text{CO}\alpha$), 2.05-2.03 (m, 6 H α et 6 H β , $2 \times \text{CH}_3\text{CO}\alpha$ et $2 \times \text{CH}_3\text{CO}\beta$), 2.02 (s, 3 H α et 3 H β , $\text{CH}_3\text{CO}\alpha$ et $\text{CH}_3\text{CO}\beta$), 1.95 (s, 3 H α , $\text{CH}_3\text{CO}\alpha$) et 1.93 (s, 3 H β , $\text{CH}_3\text{CO}\beta$).

Propyl 4-O-[6-O-acétyl-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-6-O-acétyl-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranoside

**155**

À une solution de **159** (450 mg, 0.363 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (7.5 mL) contenant du tamis moléculaire 4Å (100 mg), est ajouté, à -45°C , de l'alcool propylique (54 μL , 0.727 mmol) et une solution de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans le CH_2Cl_2 ($C = 0.2367 \text{ M}$, 460 μL , 0.1089 mmol). Le mélange réactionnel est agité sous Ar et réchauffé de -45°C à -20°C en 1 h. De la triéthylamine (25 μL) est alors ajoutée et le milieu est agité à température ambiante pendant 20 minutes. Le tamis est filtré et le filtrat est dilué avec du CH_2Cl_2 (20 mL) et lavé avec une solution saturée de NaCl (20 mL). Les phases aqueuses sont réextraites au CH_2Cl_2 ($2 \times 20 \text{ mL}$) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées pour donner un résidu qui est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:0 à 1:2, CH/AcOEt) pour donner le composé **155** (280 mg, 68%) et le composé **158** (119 mg, 0.109 mmol, 30%).

Rf = 0.62 (CH-AcOEt 1:1)

$[\alpha]_D^{25} - 27^\circ$ (c 0.99, CHCl_3)

RMN ^1H (CDCl_3)

δ 7.47 (m, 15 H, H-aro), 5.30 (m, 1 H, H-3A), 5.06-4.82 (m, 8 H, $5 \times \text{CHPh}$, H-4A, H-1A et NH), 4.77 (d, 1 H, J 11.4 Hz, CHPh), 4.55 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 11.9 Hz, $J_{5,6}$ 1.8 Hz, H-6C), 4.44 (d, 1 H, $J_{6,6'}$ 11.9 Hz, H-6B), 4.37-4.29 (m, 3 H, H-1B, H-6'B et H-6'C), 4.28 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 7.5 Hz, H-1C), 4.15 (m, 1 H, H-6'A), 4.01 (m, 1 H, H-6A), 3.91-3.80 (m, 2 H, H-4C et H-1'a), 3.65-3.55 (m, 2 H, H-5A et H-5C), 3.54-3.34 (m, 6 H, H-2A, H-1'b, H-5B, H-3C, H-2C et H-2B), 3.26 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ 19.9 Hz, H-3B), 2.85 (t, 1 H, J 10.8 Hz, H-4B), 2.14 (s, 3 H, CH_3CO), 2.02 (s, 3 H, CH_3CO), 2.01 (s, 3 H, CH_3CO), 1.96 (s, 3 H, CH_3CO), 1.90 (s, 3 H, CH_3CO), 1.68 (m, 1 H, H-2'a), 1.67 (m, 1 H, H-2'b) et 0.97 (t, 3 H, J 7.2 Hz, $3 \times \text{H-3'}$).

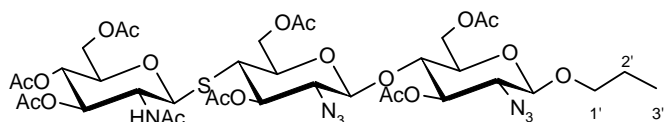
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

δ 170.63, 170.55, 170.51, 170.29 et 169.43 (COCH_3), 155.46 (NHCOCH_3), 138.30, 137.6 et 136.10 (C-*ipso*), 128.51, 128.44, 128.26, 128.16, 128.08, 127.85, 127.70 et 127.64 (C-*aro*), 101.99 (C-1C), 100.92 (C-1B), 82.58 (C-1A), 80.33 (C-3C), 79.92 (C-3B), 77.28 (C-4C), 75.70 (C-5A), 75.57 (CH_2Ph), 74.51 (CH_2Ph), 74.48 (C-5B), 72.90 (C-5C), 72.48 (C-3A), 72.05 (C-1'), 68.28 (C-4A), 68.07 (C-2C ou C-2B), 66.95 (CH_2Ph), 66.02 (C-2B ou C-2C), 63.69 (C-6B), 62.65 (C-6C), 61.99 (C-6A), 55.85 (C-2A), 46.32 (C-4B), 22.79 (C-2'), 20.90, 20.79, 20.66, 20.58, 20.44 (CH_3CO) et 10.42 (C-3').

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour $\text{C}_{53}\text{H}_{65}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{S}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1158.3954
- Trouvée : 1158.3948

***Propyl 4-O-[3,6-di-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy- β -D-gluco-
pyranosyl)-2-azido-2-désoxy-4-thio- β -D-gluco-
pyranosyl]-3,6-di-O-
acétyl-2-azido-2-désoxy- β -D-gluco-
pyranoside***

**156**

À une solution du thiotrisaccharide **155** (211 mg, 0.185 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (3 mL) est ajouté du FeCl_3 (361 mg, 2.228 mmol, 12 éq.) et le mélange réactionnel est agité pendant 1.5 h sous Ar à température ambiante. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu est dissous dans la pyridine (4.8 mL) puis de l' Ac_2O (700 μl) est ajouté à la solution. Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 h. La réaction n'étant pas totalement terminée, 400 μl d' Ac_2O et 1 mL de pyridine sont à nouveau ajoutés au milieu qui est agité pendant 17 h. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le résidu est dissous dans de l' AcOEt (20 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution de HCl, 1 N (20 mL), une solution saturée de NaHCO_3 (20 mL) et une solution

saturée de NaCl (20 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l'AcOEt et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (98:2 CHCl₃-MeOH) pour donner le composé **156** ainsi que des sous produits plus polaires résultant sûrement d'une acétylation partielle. Ces sous produits ont été soumis à une acétylation dans les mêmes conditions que précédemment, suivi d'une extraction comme décrit précédemment. Une dernière purification par chromatographie sur gel de silice (98:2 CHCl₃-MeOH) ainsi qu'une chromatographie d'exclusion stérique (LH20 1:1 CHCl₃-MeOH) ont permis d'obtenir le composé **156** (36 mg, 21%).

Rf = 0.59 (CHCl₃-MeOH 95:5)

$[\alpha]_D^{25} - 54^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

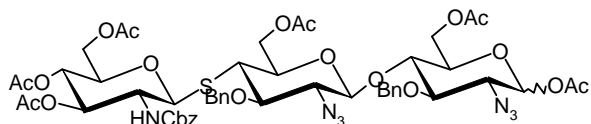
RMN ¹H (CDCl₃)

δ 5.73 (d, 1 H, $J_{\text{NH},2}$ 9.8 Hz, NH-A), 5.10-4.97, (3 H, H-3A, H-3C et H-4A), 4.93 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 9.7 Hz, $J_{3,4}$ 11.0 Hz, H-3B), 4.74 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 10.6 Hz, H-1A), 4.51 (m, 2 H, H-6C et H-6'B), 4.43 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 12.2 Hz, $J_{5,6}$ 1.7 Hz, H-6B), 4.37 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8.1 Hz, H-1C), 4.31-4.14 (m, 4 H, H-1B, H-6A, H-6'C et H-2A), 4.07 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 12.5 Hz, $J_{5,6'}$ 5.0 Hz, H-6'A), 3.92-3.79 (m, 2 H, H-1'a et H-5B), 3.77-3.63 (m, 3 H, H-5A, H-5C et H-4C), 3.52 (td, 1 H, $J_{1'b,2'a} = J_{1'b,2'b}$ 6.7 Hz, $J_{1'a,1'b}$ 9.5 Hz, H-1'b), 3.44 (dd, 1 H, $J_{2,1}$ 8.1 Hz, H-2B), 3.39 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.2 Hz, H-2C), 2.77 (t, 1 H, J 11.0 Hz, H-4B), 2.14 (s, 3 H, CH₃CO), 2.12 (s, 6 H, 2 × CH₃CO), 2.06 (2 s, 6 H, 2 × CH₃CO), 2.03 (s, 3 H, CH₃CO), 2.01 (s, 3 H, CH₃CO), 1.91 (s, 3 H, CH₃CO), 1.67 (m, 2 H, H-2'a et H-2'b) et 0.96 (t, 3 H, $J_{3',2'} + 3',2''$ 14.8 Hz, 3 × H-3').

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 171.06, 170.84, 170.59, 170.34, 170.21, 169.98, 169.73, 169.21 (COCH₃), 101.90 (C-1C), 100.58 (C-1B), 81.79 (C-1A), 76.07 (C-4C ou C-5C), 75.51 (C-5A), 74.13 (C-4A ou C-3A), 73.60 (C-5B), 72.84 (C-5C ou C-4C), 72.28 (C-1'), 71.25 (C-3C), 70.03 (C-3B), 68.12 (C-3A ou C-4A), 65.11 (C-2B), 64.04 (C-2C), 63.61 (C-6B), 62.37 (C-6A ou C-6C), 62.17 (C-6C ou C-6A), 51.94 (C-2A), 45.87 (C-4B), 22.98 (NHCOCH₃), 22.74 (C-2'), 20.95, 20.86, 20.64, 20.59 (CH₃CO) et 10.38 (C-3').

4-O-[6-O-Acétyle-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyle-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-4-thio- β -D-glucopyranosyl]-1,6-di-O-acétyle-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy- α,β -D-glucopyranose

**157**

Le composé **115 β** (1.425 g, 1.378 mmol) est dissous dans un mélange Ac₂O/TFA (14.25 mL/1.6 mL) et la solution est agitée à 40°C sous Ar pendant 4h. La solution est alors concentrée et le résidu purifié par chromatographie sur gel d'alumine (1:1 et 1:2, CH₂Cl₂/AcOEt) pour donner le composé vitreux **157** (1.162 g) avec un rendement de 74%. Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α : β de 75:25.

R_f = 0.50 (CH₂Cl₂/AcOEt 1:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.42-7.20 (m, 15 H α et 15 H β , H-aro), 6.20 (d, 1 H α , $J_{1,2}$ 2.9 Hz, H-1C α), 5.43 (d, 1 H β , $J_{1,2}$ 7.3 Hz, H-1C β), 5.29 (m, 1 H α et 1 H β , H-3A α et H-3A β), 5.11 (d, 1 H α et 1 H β , J 11.3 Hz, CHPh α et CHPh β), 5.06-4.81 (m, 7 H α et 7 H β , H-4A α , H-4A β , 4 \times CHPh α , 4 \times CHPh β , NH-A α , NH-A β , H-1A α et H-1A β), 4.78-4.70 (m, 1 H α et 1 H β , CHPh α et CHPh β), 4.54-4.28 (m, 5 H α et 5 H β , H-6C α , H-6C β , H-6'C α , H-6'C β , H-6B α , H-6B β , H-6'B α , H-6'B β , H-1B α et H-1B β), 4.21-3.95 (m, 3 H α et 2 H β , H-6A α , H-6A β , H-6'A α , H-6'A β et H-5C α), 3.94-3.84 (m, 2 H α et 2 H β , H-3C α , H-3C β , H-4C α et H-4C β), 3.74 (m, 1 H β , H-5C β), 3.62 (m, 1 H α et 1 H β , H-5A α et H-5A β), 3.58-3.46 (m, 3 H α et 3 H β , H-2A α , H-2A β , H-2C α , H-2C β , H-5B α et H-5B β), 3.43 (t, 1 H α , $J_{1,2+2,3}$ 17.7 Hz, H-2B α), 3.41 (t, 1 H β , $J_{1,2+2,3}$ 17.6 Hz, H-2B β), 3.32 (t, 1 H α , $J_{2,3+3,4}$ 19.2 Hz, H-3B α), 3.27 (t, 1 H β , J 9.7 Hz, H-3B β), 2.89 (t, 1 H α , $J_{3,4+4,5}$ 21.6 Hz, H-4B α), 2.86 (t, 1 H β , $J_{3,4+4,5}$ 21.8 Hz, H-4B β), 2.18 (se, 3 H α , CH₃CO α), 2.13 (se, 3 H α , CH₃CO α), 2.01 (se, 6 H β , 2 \times CH₃CO β), 1.95 (se, 3 H β , CH₃CO β), 1.91 (se, 3 H α , CH₃CO α), 1.89 (se, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

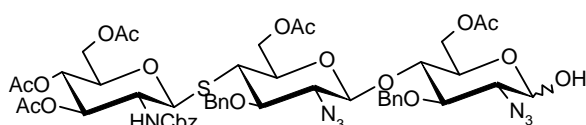
δ 170.57, 170.34, 169.43, 168.78 (COCH₃), 155.47 (NHCOCH₃), 138.06, 137.40, 136.07

(C-*ipso*), 128.52, 128.45, 128.30, 128.14, 128.04, 127.90, 127.78, 127.54 (C-*aro*), 101.23 (C-1B α), 100.89 (C-1B β), 92.50 (C-1C β), 90.07 (C-1C α), 82.76 (C-1A α et C-1A β), 79.98 (C-3B α et C-3B β), 78.16 (C-3C α et C-3C β), 77.25 (C-4C α et C-4C β), 75.68 (C-5A α et C-5A β), 75.59, 75.07 ($2 \times$ CH₂Ph α et $2 \times$ CH₂Ph β), 74.55 (C-5B α et C-5B β), 73.87 (C-5C β), 72.53 (C-3A α et C-3A β), 71.06 (C-5C α), 68.22 (C-2B α et C-2B β), 68.04 (C-4A α et C-4A β), 66.97 (CH₂Ph α et CH₂Ph β), 64.63 (C-2C β), 63.64 (C-6B α et C-6B β), 62.16 (C-2C α), 62.09 (C-6C α et C-6C β), 61.90 (C-6A α et C-6A β), 55.82 (C-2A α et C-2A β), 46.45 (C-4B α et C-4B β), 20.95, 20.88, 20.75, 20.65, 20.59, 20.54 (CH₃CO).

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₅₂H₆₁N₇O₂₀S [M + Na]⁺ : 1158.3590
- Trouvée : 1158.3573

4-O-[6-O-Acétyle-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyle-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- β -D-glucoopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy-4-thio- β -D-glucoopyranosyl]-6-O-acétyle-2-azido-3-O-benzyle-2-désoxy- α , β -D-glucoopyranose



158

À une solution de **157** (1.115 g, 0.98 mmol) dans du DMF anhydre (6 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (140 mg, 1.50 mmol). Le mélange est agité sous Ar à température ambiante pendant 2 h. Le DMF est évaporé et le résidu est dissous dans de l'AcOEt (50 mL) et lavé successivement avec de l'eau (50 mL) et une solution saturée de NaCl (50 mL). Les phases aqueuses sont réextraites par de l'AcOEt ($2 \times$ 50 mL) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (1:0 à 1:2, CH-AcOEt) pour donner le composé **158** (819 mg, 76%) pur. Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α : β de 1:1.

Rf = 0.33 (CH-AcOEt 1:1)

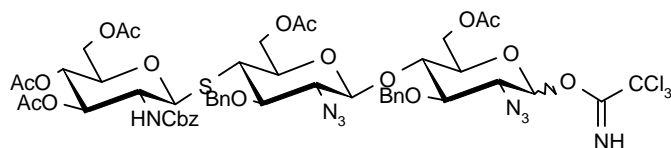
RMN ¹H (CDCl₃)

δ 7.42-7.20 (m, 15 H α et 15 H β , H-aro), 5.34-5.24 (m, 2 H α ou 2 H β et 1 H β ou 1 H α , H-1C α ou H-1C β , H-3A α et H-3A β), 5.09 (d, 1 H β , J 11.2 Hz, *CHPh* β), 5.06-4.80 (m, 7 H α et 6 H β , 5 \times *CHPh* α , 4 \times *CHPh* β , H-4A α , H-4A β , H-1A α et H-1A β), 4.76 (d, 1 H β , J 11.1 Hz, *CHPh* β), 4.73 (d, 1 H α , J 11.2 Hz, *CHPh* α), 4.64-4.52 (m, 2 H α ou 2 H β et 1 H β ou 1 H α , H-1C β ou H-1C α , H-6C α et H-6C β), 4.48-4.26 (m, 4 H α et 4 H β , H-6B α , H-6B β , H-1B α , H-1B β , H-6'C α , H-6'C β , H-6'B α et H-6'B β), 4.22 (m, 1 H α ou 1 H β , H-5C α ou H-5C β), 4.15 (m, 1 H α et 1 H β , H-6'A α et H-6'A β), 4.06-3.96 (m, 2 H β ou 2 H α et 1 H α ou 1 H β , H-6A α , H-6A β et H-3C β ou H-3C α), 3.90-3.80 (m, 1 H α et 1 H β , H-4C α et H-4C β), 3.66-3.58 (m, 2 H α ou 2 H β et 1 H β ou 1 H α , H-5A α , H-5A β et H-5C α ou H-5C β), 3.57-3.24 (m, 6 H α ou 6 H β et 5 H β ou 5 H α , H-5B α , H-5B β , H-2A α , H-2A β , H-3C α ou H-3C β , H-2C α , H-2C β , H-2B α , H-2B β , H-3B α et H-3B β), 2.93-2.83 (m, 1 H α et 1 H β , H-4B α et H-4B β), 2.14 (s, 3 H α , CH₃CO α), 2.13 (s, 3 H β , CH₃CO β), 2.01 (s, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 2.00 (s, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β), 1.94 (s, 3 H β , CH₃CO β), 1.92 (s, 3 H α , CH₃CO α) et 1.89 (s, 3 H α et 3 H β , CH₃CO α et CH₃CO β).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)

δ 170.58, 170.35, 169.44 (COCH₃), 155.49 (NHCOCH₃), 137.47 (C-*ipso*), 128.51, 128.45, 128.29, 128.10, 127.88, 127.66 (C-*aro*), 101.13 (C-1B α et C-1B β), 95.96 (C-1C α ou C-1C β), 91.79 (C-1C α ou C-1C β), 82.73 (C-1A α et C-1A β), 80.37 (C-3B α ou C-3B β), 79.91 (C-3B α ou C-3B β), 77.79 (C-4C α ou C-4C β), 77.42 (C-3C α ou C-3C β), 77.34 (C-4C α ou C-4C β), 75.69 (C-5A α et C-5A β), 75.59 (CH₂Ph α et CH₂Ph β), 74.84 (CH₂Ph α et CH₂Ph β), 74.47 (C-5B α , C-5B β et C-3C α ou C-3C β), 73.19 (C-5C α ou C-5C β), 72.54 (C-3A α et C-3A β), 69.03 (C-5C α ou C-5C β), 68.26 (C-4A α et C-4A β), 68.07 (C-2B α et C-2B β), 66.99 (C-2C β ou C-2C α , CH₂Ph α et CH₂Ph β), 63.66 (C-6B α et C-6B β), 63.46 (C-2C α ou C-2C β), 62.47 (C-6C α et C-6C β), 61.96 (C-6A α et C-6A β), 55.82 (C-2A α et C-2A β), 46.46 (C-4B α et C-4B β), 20.95, 20.76, 20.66, 20.58, 20.45 (CH₃CO).

4-O-[6-O-Acétyle-4-S-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranosyl]-6-O-acétyl-2-azido-3-O-benzyl-2-désoxy-α,β-D-glucopyranosyl trichloroacétimide

**159**

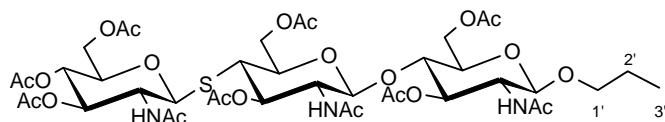
À une solution de **158** (470 mg, 0.43 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (8 mL) est ajouté du trichloroacétonitrile (862 μL, 8.59 mmol) et du DBU (16 μL, 0.11 mmol). Le milieu est agité sous Ar à température ambiante pendant 1 h, puis le solvant est évaporé. L'imide **159** (450 mg, 84%) est obtenu après une purification par chromatographie sur gel de silice (silice préalablement neutralisée par des lavages avec une solution de NEt₃ dans de l'AcOEt, 5%) (2:1 à 1:2, CH-AcOEt). Le spectre de RMN du proton dans CDCl₃ montre un rapport α:β de 90:10.

Rf = 0.52 (CH-AcOEt 1:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 8.75 (s, 1 H_α, NHCCl₃α), 8.74 (s, 1 H_β, NHCCl₃β), 7.46-7.20 (m, 15 H_α et 15 H_β, H-aro), 6.36 (d, 1 H_α, *J*_{1,2} 3.5 Hz, H-1C_α), 5.62 (d, 1 H_β, *J*_{1,2} 8.5 Hz, H-1C_β), 5.28 (m, 1 H_α, H-3A_α), 5.14 (d, 1 H_α, *J* 10.8 Hz, CHPh_α), 5.08-4.79 (m, 7 H_α et 9 H_β, H-4A_α, H-4A_β, NH-A_α, NH-A_β, 4 × CHPh_α, 5 × CHPh_β, H-3A_β, H-1A_α et H-1A_β), 4.75 (d, 1 H_α et 1 H_β, *J* 11.5 Hz, CHPh_α et CHPh_β), 4.51 (dd, 1 H_α et 1 H_β, *J*_{6,6'} 12.0 Hz, *J*_{5,6} 2.0 Hz, H-6C_α et H-6C_β), 4.46-4.29 (m, 4 H_α et 4 H_β, H-6'C_α, H-6'C_β, H-6B_α, H-6B_β, H-6'B_α, H-6'B_β, H-1B_α et H-1B_β), 4.20-4.10 (m, 2 H_α et 1 H_β, H-6'A_α, H-6'A_β et H-5C_α), 4.07-3.92 (m, 3 H_α et 3 H_β, H-6A_α, H-6A_β, H-3C_α, H-3C_β, H-4C_α et H-4C_β), 3.78 (m, 1 H_β, H-5C_β), 3.67-3.58 (m, 2 H_α et 2 H_β, H-2C_α, H-2C_β, H-5A_α et H-5A_β), 3.57-3.40 (m, 3 H_α et 3 H_β, H-2A_α, H-2A_β, H-5B_α, H-5B_β, H-2B_α et H-2B_β), 3.30 (t, 1 H_α et 1 H_β, *J*_{2,3 + 3,4} 19.7 Hz, H-3B_α et H-3B_β), 2.88 (t, 1 H_α et 1 H_β, *J* 11.0 Hz, H-4B_α et H-4B_β), 2.14 (s, 3 H_α et 3 H_β, CH₃CO_α et CH₃CO_β), 2.02 (s, 6 H_α et 6 H_β, 6 × CH₃CO_α et 6 × CH₃CO_β), 1.92 (s, 3 H_α et 3 H_β, CH₃CO_α et CH₃CO_β) et 1.88 (s, 3 H_α et 3 H_β, CH₃CO_α et CH₃CO_β).

Propyl 2-acétamido-4-O-[2-acétamido-3,6-di-O-acétyl-4-S-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-désoxy-4-thio-β-D-glucopyranosyl]-3,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranoside

**160**

À une solution de **156** (36 mg, 0.038 mmol) dans du THF anhydre (3.5 mL) est ajouté du zinc (660 mg, 10.07 mmol) et de l'AcOH (286 µL, 5.00 mmol). Le mélange réactionnel est agité sous Ar pendant 4 h. De l'Ac₂O (2 mL) est alors ajouté et la réaction est poursuivie pendant 15h. La solution est filtrée sur Celite[®] et la Celite[®] lavée à l'AcOEt. Les solvants sont concentrés et le résidu est dissous dans de l'AcOEt (10 mL) puis lavé avec de l'eau (10 mL). Les phases aqueuses sont réextraites avec de l'AcOEt (5 × 10 mL) et les phases organiques réunies sont séchées et concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (98:2 à 95:5, CHCl₃-MeOH) pour donner le composé **160** (3.5 mg, 9.4%)

Rf = 0.52 (CHCl₃-MeOH 9:1)

RMN ¹H (CDCl₃)

δ 5.97 (m, 1 H, NH-B), 5.72 (d, 1 H, $J_{\text{NH},2}$ 10.2 Hz, NH-A), 5.64 (d, 1 H, $J_{\text{NH},2}$ 9.1 Hz, NH-C), 5.44 (t, 1 H, $J_{2,3+3,4}$ 20.6 Hz, H-3B), 5.23 (m, 1 H, H-3C), 5.13-5.03 (m, 2 H, H-3A et H-4A), 4.80-4.68 (m, 2 H, H-1B et H-1A), 4.58-4.49 (m, 2 H, H-6B et H-1C), 4.48-4.40 (m, 2 H, H-6'B et H-6C), 4.32-4.08 (m, 4 H, H-2A, H-6'A, H-6A et H-6'C), 3.93-3.65 (m, 6 H, H-5A, H-5B, H-2C, H-4C, H-5C et H-1'a), 3.57 (m, 1 H, H-2B), 3.46-3.36 (m, 1 H, H-1'b), 2.81 (t, 1 H, $J_{3,4+4,5}$ 21.4 Hz, H-4B), 2.13 (s, 6 H, 2 × CH₃CO), 2.09 (s, 3 H, CH₃CO), 2.04 (s, 3 H, CH₃CO), 2.03 (s, 3 H, CH₃CO), 2.02 (s, 3 H, CH₃CO), 1.97 (s, 3 H, CH₃CO), 1.96 (s, 3 H, CH₃CO), 1.91 (s, 3 H, CH₃CO), 1.59 (m, 2 H, H-2'a et H-2'b) et 0.90 (t, 3 H, $J_{3',2'+3',2''}$ 14.8 Hz, 3 × H-3').

Masse Haute Résolution (E.S.) :

- Calculée pour C₄₁H₆₁N₃O₂₂S [M + Na]⁺ : 1002.3365
- Trouvée : 1002.3360

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

www.unifa.fr

Kijne, J. W. *The Rhizobium infection process in Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G. ; Burris, R. H. et Evans, H. J. ed.), Chapman and Hall Ltd., New York, **1992**, pp. 349-398.

Caetano-Anolles, G. ; Crist-Estes, D. K. et Bauer, W. D. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 3164-3169.

Maxwell, C. A. et Philips, D. A. *Plant Physiol.* **1990**, *96*, 1552-1558.

Spaink, H. ; Wijffelman, C. A. ; Pees, E. ; Okker, R. J. H. et Lugtenberg, B. J. J. *Nature* **1987**, *328*, 337-340.

Ardourel, M. ; Demont, N. ; Debellé, F. ; Maillet, F. ; de Billy, F. ; Promé, J.-C. ; Dénarié, J. et Truchet, G. *Plant Cell.* **1994**, *6*, 1357-1374.

Bohlool, B. B. et Schmidt, E. L. *Science* **1974**, *185*, 269-271.

Brewin, N. J. et Kardialsky, I. V. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 92-98.

van Brussel, A. A. N. ; Zaat, S. A. J. ; Canter Cremers, H. C. J. ; Wijffelman, C. A. ; Pees, E. ; Tak, T. et Lugtenberg, B. J. J. *J. Bacteriol.* **1986**, *169*, 517-522.

Vijn, I. ; Neves, L. ; van Kammmen, A. ; Fraussen, H. J. et Bisseling, T. *Science* **1993**, *260*, 1764-1765.

Turgeon, B. G. et Bauer, W. D. *Planta* **1985**, *163*, 328-349.

Truchet, G. ; Debellé, F. ; Vasse, J. ; Terzaghi, B. ; Garnerone, A.-M. ; Rosenberg, C. ; Batut, J. ; Maillet, F. et Dénarié, J. *J. Bacteriol.* **1985**, *164*, 1200-1210.

Morot-Gaudry, J.-F. *Assimilation de l'azote chez les plantes : aspects physiologique, biochimique et moléculaire*, INRA, Paris, **1997**.

Losyck, R. et Kaiser, D. *Sci. Am.* **1997**, *176*, 52-57.

Lerouge, P. ; Roche, P. ; Faucher, C. ; Maillet, F. ; Truchet, G. ; Promé, J.-C. et Dénarié, J. *Nature* **1990**, *344*, 781-784.

Dénarié, J. ; Debellé, F. et Promé, J.-C. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 503-535 et références citées.

John, M. ; Röhrig, H. ; Schmidt, J. ; Wieneke, U. et Schell, J. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1993**, *90*, 625-629.

Atkinson, E. ; Palcic, M. ; Hindsgaul, O. et Long, S. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1994**, *91*, 8418-8422.

Roche, P. ; Debellé, F. ; Maillet, F. ; Lerouge, P. ; Faucher, C. ; Truchet, G. ; Dénarié, J. et Promé, J.-C. *Cell* **1991**, *67*, 1131-1143.

Spaink, H. P. ; Sheeley, D. M. ; von Brussel, A. A. N. ; Glushka, J. ; York, W. S. ; Tak, T. ; Geiger, O. ; Kennedy, E. P. ; Reinhold, V. N. et Lugtenberg, B. J. J. *Nature* **1991**, *354*, 125-130.

Minic, Z. ; Leproust-Lecoester, L. ; Laporte, J. ; Kouchkovsky, Y. D. et Brown, S. C. *Biochem. J.* **2000**, *345*, 255-262.

Kondorosi, E. ; Pierre, M. ; Cren, M. ; Haumann, U. ; Buiré, M. ; Hoffmann, B. ; Schell, J. et Kondorosi, A. *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 885-896.

Cren, M. ; Kondorosi, A. et Kondorosi, E. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 518-519.

Coronado, C. ; Zuanazzi, J. A. S. ; Sallaud, S. ; Quirion, J.-C. ; Esnault, R. ; Husson, H. P. ; Kondorosi, A. et Ratet, P. *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 533-542.

Zuanazzi, J. A. S. ; Clergeot, P. H. ; Quirion, J.-C. ; Husson, H. P. ; Kondorosi, A. et Ratet, P. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1998**, *11*, 784-794.

Collinge, D. B. ; Kragh, K. M. ; Mikkelsen, J. D. ; Nielsen, K. K. ; Rasmussen, U. et Vad, K. *Plant J.* **1993**, *3*, 31-40.

Vasse, J. ; de Billy, F. et Truchet, G. *Plant J.* **1993**, *4*, 555-566.

Stahelin, C. ; Schultze, M. ; Kondorosi, E. et Kondorosi, A. *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 1607-1614.

Balland-Vanney, M. thèse de doctorat de l'Université Paris XI Orsay, D.U. 6571, **2001**.

BecFerté, M.-P. ; Khishnan, H. B. ; Savagnac, A. ; Pueppke, S. G. et Promé, J.-C. *FEBS Lett.* **1996**, *393*, 273-279.

Gil-Serrano, A. M. ; Franco-Rodriguez, G. ; Tejero-Mateo, P. ; Thomas-Oates, J. ; Spaink, H. P. ; Ruiz-Sainz, J. E. ; Megias, M. et Lamrabet, Y. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 435-454.

Kohring, B. O. ; Baier, R. ; Niebaus, K. ; Pühler, A. et Flaschel, A. *Glycoconjugate J.* **1999**, *14*, 963-971.

Price, N. P. J. ; Talmont, F. ; Wieruszeski, J.-M. ; Promé, D. et Promé, J.-C. *Carbohydr. Res.* **1996**, *289*, 115-136.

Nicolaou, K. C. ; Bockovich, N. J. ; Carcanague, D. R. ; Hummel, C. W. et Even L.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8701-8702.

Wang, L. X. ; Li, C. ; Wang, Q. W. et Hui, Y. Z. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7763-7766 et *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 621-628.

- Tailler, D.; Jacquinet, J.-C. et Beau, J.-M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1827-1828.
- Paulsen, H. et Stenzel, W. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 2334-2347 et 2348-2357.
- Tailler, D. ; Jacquinet, J.-C. ; Noirot, A.-M. ; Beau, J.-M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1992**, 3163-3164.
- Ikeshita, S.; Sakamoto, A.; Nakahara, Yu.; Nakahara, Yo. et Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3123-3126.
- Ikeshita, S.; Nakahara, Y. et Ogawa, T. *Carbohydr. Res.* **1995**, *266*, C1-C6.
- Debenham, J. S. ; Rodebaugh, R. et Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6478-6479.
- Demont-Caulet, N. ; Maillet, F. ; Tailler, D. ; Jacquinet, J.-C. ; Promé, J.-C. ; Nicolaou, K. C. ; Truchet, G. ; Beau, J.-M. et Dénarié, J. *Plant. Physiol.* **1999**, *120*, 83-92.
- Wang, L. X. ; Lee, Y. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1996**, 581-591.
- Gelas, J. ; Defaye, J. *Studies in Natural Products Chemistry*, ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V. : Amsterdam **1991**, *8*, 315-357.
- Robina, I. ; Lopez-Barba, E. ; Jimenez-Barbero, J. ; Martin-Pastor, M. et Fuentes, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1207-1224.
- Robina, I. ; Gómez-Bujedo, S ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Fuentes, J. et Spink, H. P. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 521-530.
- Bernard-Peyre Mantegazza, N. thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier, Grenoble I, D.U. 0146, **2001**. Gonzales, L. ; Bernabe, M. ; Espinosa, J.-F. ; Tejero-Mateo, P. ; Gil-Serrano, A. ; Mantegazza, N. ; Imberty, A. ; Driguez, H. et Jimenez-Barbero, J. *Carbohydr. Res.* **1999**, *318*, *1-4*, 10-19.
- Fort, S. ; Boyer, V. ; Greffe, L. ; Davies, G. J. ; Moroz, O. ; Christiansen, L. ; Schülein, M. ; Cottaz, S. et Driguez, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5429-5437.
- Andrews, J. S. et Pinto, B. M. *Carbohydr. Res.* **1995**, *270*, 51-62.
- Auzanneau, F.-I. ; Bennis, K. ; Fanton, E. ; Promé, D. ; Defaye, J. ; Gelas, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1998**, 3629-3635.
- Auzanneau, F.-I. ; Mialon, M. ; Promé, D. ; Promé, J.-C., Gelas, J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6460-6465.
- Baker, R. ; Boyes, R. H. O. ; Broom, D. M. P. ; O'Mahony, M. J. et Swain C. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1987**, 1613-1622.
- Paulsen, H. ; Kolar, C. et Stenzel, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1976**, *7*, 440-441.
- Gent, P. A. ; Gigg, R. et Penglis, A. A. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1976**, 1395-1404.

- Collins, P. M. et Ferrier, R. J. *Monosaccharides : Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley and sons Ltd., **1995**, 266-277.
- Spijker, N. M. et van Boeckel, A. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 180-183.
- Koenigs, W. et Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957.
- Collins, P. M. et Ferrier, R. J. *Monosaccharides : Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley and sons Ltd., **1995**.
- Toshima, K. et Tatsuta, K. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531 et références citées.
- Mukaiyama, T ; Murai, Y. et Shoda, S.-I. *Chem. Lett.* **1981**, 431-432.
- Rosenbrook Jr., W. ; Riley, D. A. et Lartey, P. A. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3-4. Posner, G. H. et Haines, S. R. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5-8.
- Olah, G. A. ; Welch, J. T. ; Vankar, Y. D. ; Nojima, M. ; Kerekes, I. et Olah, J. A. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3872-3881.
- Burkart, M. ; Zhang, Z. ; Hung, S.-C. et Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11743-11746.
- Nicolaou, K. C. ; Dolle, R. E. ; Papahatjis, D. P. et Randall, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4189-4192.
- Nicolaou, K. C. ; Chucholowski, A. ; Dolle, R. E. et Randall, J. L.. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 1155-1156.
- Suzuki, K. ; Maeta, H. ; Suzuki, T. et Matsumoto, M. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6879-6682.
- Ferrier, R. J. ; Hay, R. W. et Vethaviasar, N. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 55-60.
- Nicolaou, K. C. ; Seitz, S. P. et Papahatjis, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2430-2434.
- Konradsson, P. ; Udodong, U. E. et Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.
- Veeneman, G. H. ; van Leeuwen, S. H. et van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 9, 1331-1334.
- Fraser-Reid, B. , Konradsson, P. ; Mootoo, D. R. et Udodong, U. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 823-825.
- Mootoo, D. R. ; Date, V. et Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2662-2663.
- Konradsson, P. ; Mootoo, D. R. ; McDevitt, R. E. et Fraser-Reid, B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 270-272.
- Pougny, J. R. et Sinaÿ, P. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 4073. Pougny, J. R. ; Jacquinet, J.-C. ; Nassr, M. ; Milat, M. L. et Sinaÿ, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 6762.
- Schmidt, R. R. et Michel, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 731-732.

- Schmidt, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212-235.
- Verduyin, R. ; Elie, C. J. J. ; Dreef ; C. E. ; van der Marel, G. A. et van Boom, J. H. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1990**, *109*, 591-593. Paulsen, H. et Lockhoff, O. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 3102.
- Horito, S. ; Asano, K. ; Umemura, K. ; Hashimoto, H. et Yoshimura, J. *Carbohydr. Res.* **1983**, *121*, 175-185.
- Sim, M. M. ; Kondo, H. et Wong, C.-H. *J. Amer. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260-2267.
- Excoffier, G. ; Gagnaire, D. et Utille, J.-P. *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 368-373.
- McReynolds, K. D. ; Bhat, A. ; Conboy, J. C. ; Saavedra, S. S. et Gervay-Hague, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 625-638.
- Kitov, P. I. et Bundle, D. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, *8*, 838-853.
- Liao, L. et Auzanneau, F.-I. *Org. Lett.* **2003**, *15*, 2607-1610.
- Mehta, S. et Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3269-3276.
- Pohlentz, G. ; Marlis, I. et Egge, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 1151-1166.
- Gadelle, A. ; Defaye, J. et Pedersen, C. *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 497-498.
- Horton, D. et Wolfrom, M. L. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 1794-1800.
- Onodera, K. et Komano, T. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3932-3933.
- Stevens, C. L. et Nagarajan, K. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *5*, 1124-1148.
- Afza, N. ; Malik, A. ; Latif, F. et Voelter, W. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, *10*, 1929-1934.
- Schmidt, R. R. et Kinzy, W. *Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-213.
- Wu, X. ; Grathwohl, M. et Schmidt, R. R. *Organic Lett.* **2001**, *3*, 747-750.
- Kotchekov, N. K. ; Byramova, N. E. ; Tsvetkov, Y. E. et Backinowsky, L. V. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3363-3375.
- Evans, M. E. *Carbohydr. Res.* **1972**, *21*, 473-475.
- Horton, D. et Weckerle, W. *Carbohydr. Res.* **1975**, *44*, 227-240.
- Garegg, P. J. et Swahn, C. G. *Methods Carbohydr. Chem.* **1980**, *8*, 317-319.
- Jacquinet, J.-C. ; Petitou, M. ; Duchaussoy, P. ; Lederman, I. ; Choay, J. ; Torri, G. et Sinaÿ, P. *Carbohydr. Res.* **1984**, *130*, 222-241.
- Wyss, P. C. et Kiss, J. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 1833-1846.
- Wessel, H. P. ; Plessis, I. ; Cassel, S. et Arnold, W. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 789-806.
- Laesecke, K. ; Köhn, A. et Schmidt, R. R. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, *8*, 1429-1438.
- Györgydeák, Z. *Liebigs, Ann. Chem.* **1991**, *12*, 1291-1300.

Enzymes in Carbohydrate Synthesis, ed. Bednarski, M. D. and Simon, A. S., American Chemical Society, Washington DC, **1991**.

Palcic, M. M. ; Li, H. ; Zanini, D. ; Bhella, R. S. et Roy, R. *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 433-442.

Carbohydrates : Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry, ed. Ogura, H. ; Hasegawa, A. and Suami, T., Kodansha Ltd. and VCH Publishers, **1992**.

Stiller, R. et Thiem, J. *Carbohydrates : Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry*, ed. Ogura, H. ; Hasegawa, A. and Suami, T., Kodansha Ltd. and VCH Publishers, **1992**, 177-187

Dey, P. M. et Pridham, J. B. *Adv. Enzymol.* **1972**, *36*, 91-130.

Nilsson, K. G. I. *Carbohydr. Res.* **1989**, *188*, 9-17.

Watkins, W. M. *Carbohydr. Res.* **1986**, *146*, 1.

Takaku, H. ; Konishi, T. et Hata, T. *Chem Lett.* **1977**, 655-658.

Simon, A. S. ; Grabowski, S. et Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1834-1841.

Simon, A. S. ; Bednarski, M. D. et Whitesides, G. M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1123-1136.

Stiller, R. et Thiem, J. *Synlett* **1990**, 709-710.

Qian, X. ; Sujino, K. ; Palcic, M. M. et Ratcliffe, R. M. *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21*, 911-942.

Toone, E. J. ; Simon, A. S. ; Bednarski, M. D. et Whitesides, G. M. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5365-5422.

Atkinson, E. M. ; Palcic, M. M. ; Hindsgaul, O. et Long, S. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8418-8422.

Padrón, J. I. et Vásquez, J. T. *Tetrahedron : Asymmetry* **1995**, *6*, 857-858.

Rodebaugh, R. ; Debenham, J. S. et Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5477-5478.

Qui, D. et Koganty, R. D. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 45-48.

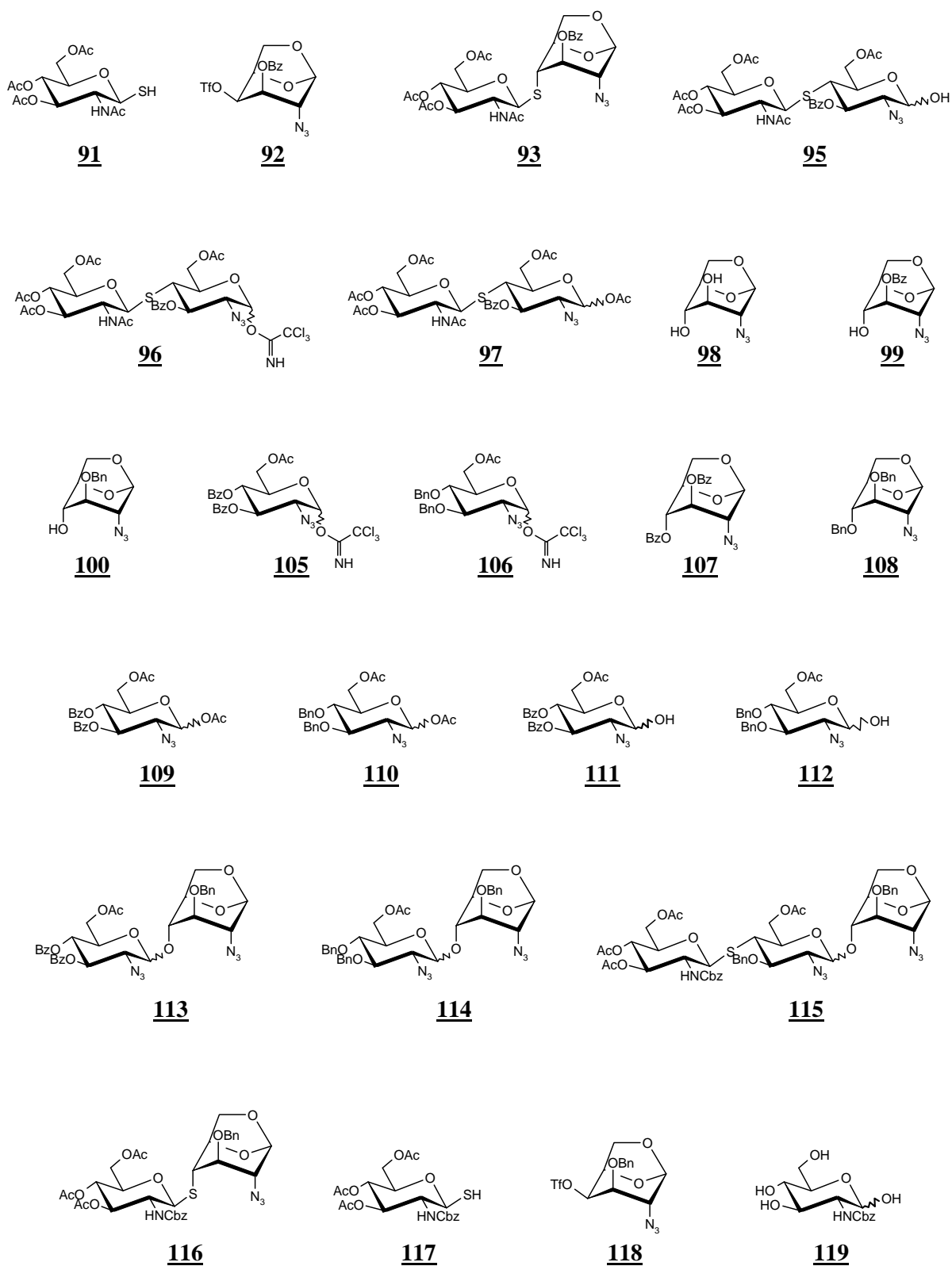
Bennis, K. ; Fanton, E. ; Chou, S. ; Mialon, M. ; Palcic, M. ; Hindsgaul, O. ; Gelas, J. et Auzanneau, F.-I. *Thiooligosaccharides, Analogues de Facteurs Nod : synthèses chimiques et chimioenzymatiques*, communication par affiche au Congrès du Groupe Français des Glucides (GFG), Trégastel, juin **1998**.

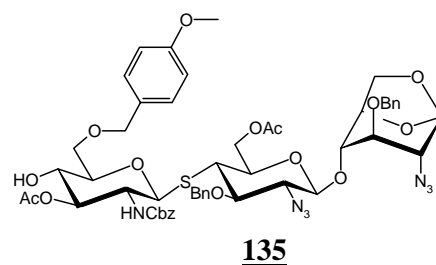
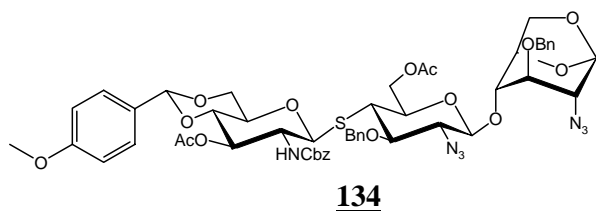
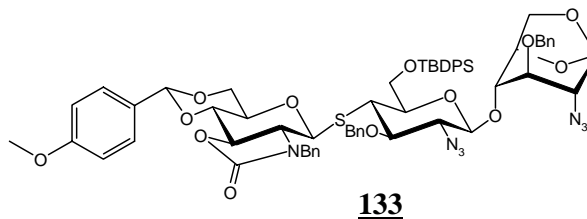
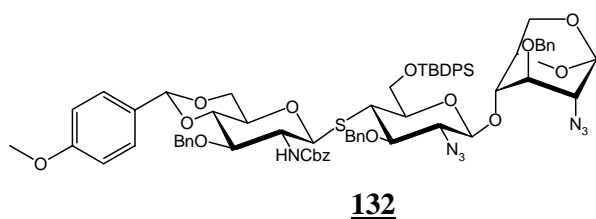
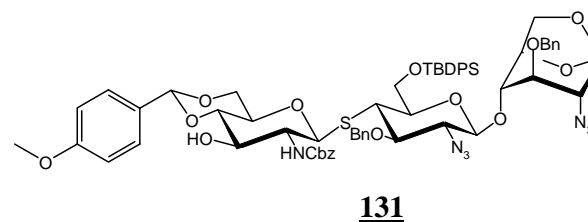
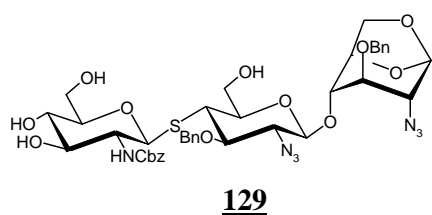
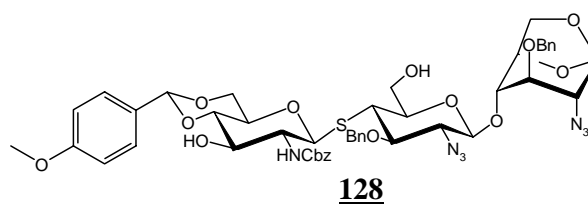
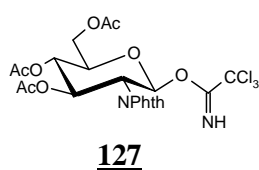
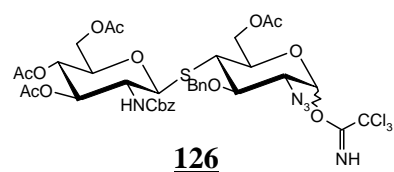
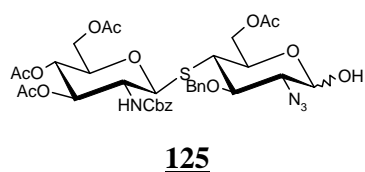
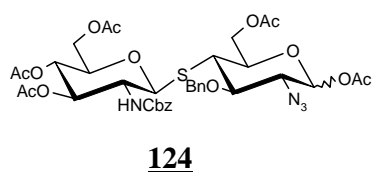
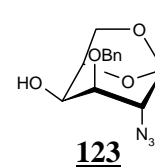
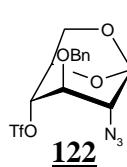
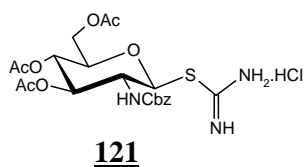
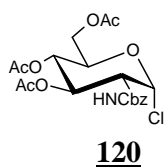
Greene, T. H. et Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd ed.*, ed. John Wiley and Sons, Wiley-Interscience Publication, **1991**.

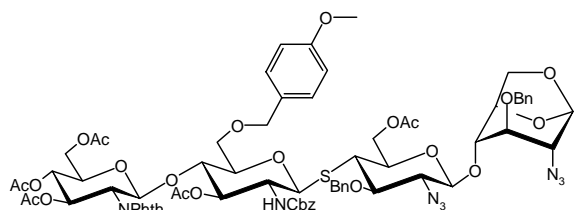
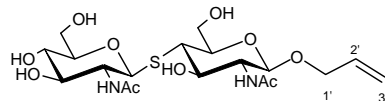
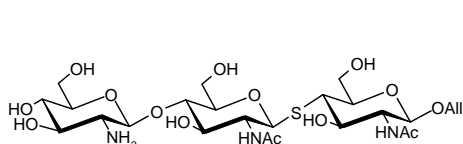
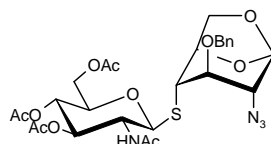
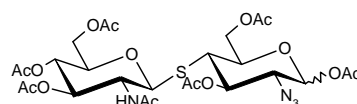
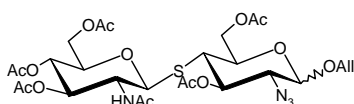
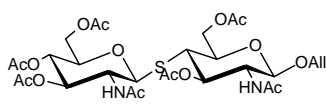
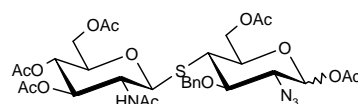
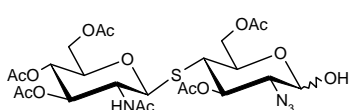
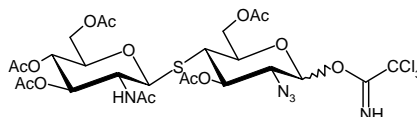
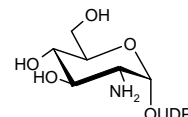
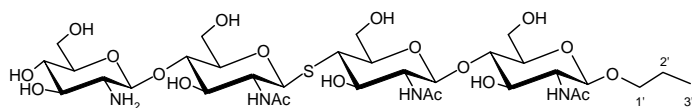
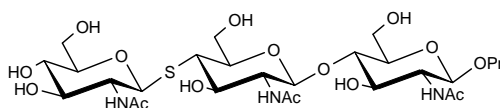
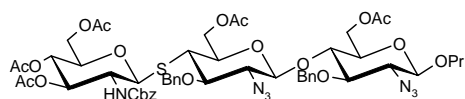
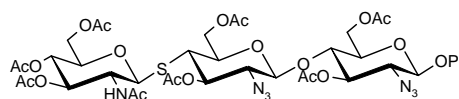
Burkart, M. D. ; Izimi, M. ; Chapman, E. ; Lin, C.-H. et Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5565-5574.

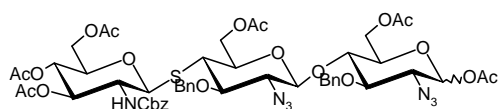
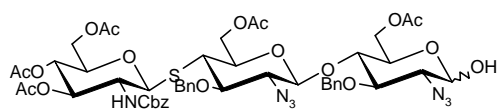
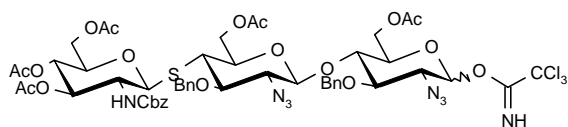
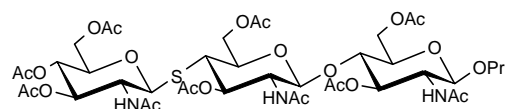
Perrin, D. D. et Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3ème ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.

ANNEXES





**136****137****138****139****144****145****146****147****148****149****150****153****154****155****156**

**157****158****159****160**