

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYNTHÈSE DE LIGANDS DISACCHARIDIQUES DE LA LECTINE PA-III DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA IMPLIQUÉE DANS LA FIBROSE KYSTIQUE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES EN CHIMIE

PAR
CATHY PRÉVILLE

SEPTEMBRE 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*Si c'était à refaire,
je ne le referais pas
mais je le regretterais*

*À celle qui est devenu
grâce à cet Autre*

REMERCIEMENTS

Après toutes ces années d'études, c'est ici que ce termine ce long périple et c'est le moment de rendre à César ce qui appartient à César. Tout d'abord, je remercie une personne sans qui rien n'aurait été possible, une personne passionnée par ce qu'il fait, une personne imaginative et créative, mon directeur de recherche M. Roy. Merci pour m'avoir fait confiance, pour votre patience et vos judicieux conseils.

Sincère remerciement à Dr. Karine Marotte qui a fait ses études post-doctorales au sein du groupe et avec qui j'ai travaillé conjointement sur ce projet. Une belle complicité c'est développée durant cette année et demie. Merci également à Myriam Moumé-Pymbock, une stagiaire en provenance de France.

Je tiens à faire un clin d'œil spécial à ma voisine de hotte, Isabelle. J'ai bien apprécié les moments passés à tes côtés. Un autre clin d'œil à Moh, personne toujours disponible, prête à dépanner et possédant de précieux conseils. Je ne peux passer sous silence nos deux Français, David et Régis avec qui nous avons bien rigolé. Finalement, tous les autres membres et ex-membres du groupe que je ne nommerai pas ici... par crainte d'en oublier.

Un gros merci au département de chimie de l'UQÀM, plus particulièrement à Mme Hoa Nguyen-Lethanh pour son expertise RMN. Également à Mme Alexandra Furtos et Karine Venne de l'UdeM pour les services de spectrométrie de masse ainsi qu'à Mme Tara Sprules de McGill pour les services de RMN 500 MHz. Évidemment, un merci tout spécial à nos collaborateurs en France, Prof. Anne Imberty et Charles Sabin.

Finalement, ce projet a été réalisé avec le support du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) pour une Chaire de Recherche du Canada en chimie thérapeutique décerné au Pr. René Roy.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES SCHÉMAS	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
RÉSUMÉ.....	XVII
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 MISE EN CONTEXTE	1
1.2 LA FIBROSE KYSTIQUE.....	1
1.3 LA GRANDE RESPONSABLE: PSEUDOMONAS AERUGINOSA	3
1.4 QUELQUES FACTEURS DE VIRULENCE CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA	4
1.4.1 Le quorum sensing	5
1.4.2 Le biofilm.....	5
1.4.3 Adhésion à la cellule hôte: les sucres, des indispensables	7
1.5 LA LECTINE PA-IIL	9
1.5.1 Ligands naturels de la PA-IIL	10
1.5.2 Structure co-cristallisée avec le Lewis a	13
1.6 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE.....	15
1.7 TESTS BIOLOGIQUES	17
1.7.1 Test d'inhibition compétitive ELLA.....	18
1.7.2 La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC).....	20
1.7.3 La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) d'un point de vue technique ...	22

CHAPITRE II	24
SYNTHÈSE DU DISACCHARIDE α-L-Fuc-(1\rightarrow4)-β-D-GlcNAc ET FORMATION DE GLYCOCLUSTERS	24
2.1 INTRODUCTION	24
2.2 SYNTHÈSE DU DISACCHARIDE α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc	24
2.2.1 Synthèse du donneur de glycosyle	26
2.2.2 Synthèse de l'accepteur de glycosyle	29
2.2.3 Synthèse du disaccharide	30
2.3 SYNTHÈSE DES DISACCHARIDES POSSÉDANT UN CYCLE TRIAZOLE EN POSITION ANOMÉRIQUE	32
2.3.1 Le triazole comme pharmacophore	33
2.3.2 Méthodes de synthèse des triazoles	34
2.3.3 Synthèse des dérivés triazoles	36
2.4 SYNTHÈSE DE GLYCOCLUSTERS	40
2.4.1 Synthèse des bras espaceurs divalents flexibles de type PEG	42
2.4.2 Synthèse des glycoclusters di- et trivalents par 'Click Chemistry'	43
2.5 CONCLUSIONS	47
CHAPITRE III	48
ÉVALUATION DE L'AFFINITÉ DES DÉRIVÉS DISACCHARIDIQUES ET DES GLYCOCLUSTERS À L'ÉGARD DE LA LECTINE PA-IIL	48
3.1 INTRODUCTION	48
3.2 INTERACTION DES DERIVES DISACCHARIDIQUES AVEC LA LECTINE PA-IIL	48
3.2.1 Tests ELLA	48
3.2.2 Valeurs thermodynamiques de l'interaction des disaccharides 18 et 20 avec la PA-IIL	51
3.2.3 Structures cristallines des inhibiteurs 18 et 20 en complexe avec PA-IIL	52
3.3 INTERACTION DES GLYCOCLUSTERS AVEC LA LECTINE PA-IIL	58
3.3.1 Tests ELLA	58

3.3.2 Valeurs thermodynamiques de l'interaction des glycoclusters avec la lectine PA-III.....	60
3.3.3 Effet de la multivalence.....	61
3.4 CONCLUSIONS	62
CHAPITRE IV	64
SYNTHÈSE DE DISACCHARIDES MODIFIÉS EN POSITION C-2 ET C-6	64
4.1 INTRODUCTION	64
4.2 ANALOGUE DISACCHARIDIQUE MODIFIÉ EN C-6 DE L'UNITÉ GlcNAc.....	65
4.3 ANALOGUES DISACCHARIDIQUES MODIFIÉS EN C-2	68
4.3.1 Disaccharide possédant un hydroxyle en position C-2	68
4.3.2 Disaccharide possédant un groupement phthalamide en C-2 et ses dérivés	71
4.4 CONCLUSIONS	74
CHAPITRE V.....	76
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	76
CHAPITRE VI	78
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	78
6.1 GÉNÉRALITÉS	78
6.2 PROTOCOLES GÉNÉRAUX.....	80
6.2.1 Désacétylation et débenzoylation par le méthanolate de sodium	80
6.2.2 Débenzoylation par hydrogénation catalytique.....	80
6.3 MODES OPÉRATOIRES ET CARACTÉRISATIONS	81

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
Figure 1.2: Modèle du développement d'un biofilm mature à partir de cellules planctoniques (mobiles) de <i>P. aeruginosa</i> . A. Structure de l'alginate (M = β -D-manuronate et G = α -L-guluronate) B. Exemple d'une homosérine lactone, 3O-C ₁₂ -HSL	6
Figure 1.3: Représentation schématique générale d'une bactérie avec une flagelle et plusieurs pilis ainsi qu'un agrandissement des vues des différents types de protéines liant les sucres pouvant être impliquées dans la reconnaissance avec la cellule hôte: a) toxines reconnaissant les glycolipides sur la surface des cellules, b) lectines solubles interagissant avec les mucines des cellules hôtes et c) les adhésines fimbriales	8
Figure 1.4: Colonisation chronique des poumons par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Figure 1.5: Structure cristalline de la lectine tétramérique PA-IIL comportant les ions calcium (en mauve) en complexe avec le L-fucose (en bâtonnet).....	10
Figure 1.6: Structures des principaux oligosaccharides présents dans le lait humain	11
Figure 1.7: Potentiel d'inhibition relatif au L-fucose (potentiel fixé à 1) d'oligosaccharides naturels présents dans le lait humain. Les chiffres entre parenthèse correspondent aux valeurs des IC ₅₀ en μ M.....	12
Figure 1.8: Surface électrostatique du site de liaison de PA-IIL contenant deux ions calcium (en rose) et les ligands trisaccharides Lewis a (à gauche) et Lewis x (à droite)	13
Figure 1.9: Agrandissement du site de liaison de PA-IIL en complexe avec le trisaccharide Lewis a. Les lignes pointillées jaunes représentent les liaisons hydrogène, les lignes pleines rouges représentent les liaisons de coordination, les ions calcium sont représentés comme des sphères oranges et les molécules d'eau sous forme de sphères bleues (code PDB 1W8H). À droite, représentation 2D des interactions.	14
Figure 1.10: Le trisaccharide Le ^a en complexe avec la lectine PA-IIL. L'unité galactose n'a pas d'interaction direct avec le site de liaison.....	16
Figure 1.11: Représentation schématique du principe du test ELLA de type 1	19
Figure 1.12: Représentation schématique du principe du test ELLA de type 2	19

Figure 1.13: Données microcalorimétriques brutes (gauche), intégrées puis ajustées au modèle théorique approprié (droite) (VP-ITC isothermal titration calorimeter (Microcal))	22
Figure 2.1: Transformations simples et efficaces des thioglycosides en différents donneurs de glycosyles	26
Figure 2.2: Mécanisme réactionnel d'une glycosylation catalysée par le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dont la stéréosélectivité est contrôlée par effet anchimérique	28
Figure 2.3: Effet anomérique	30
Figure 2.4: Mécanisme réactionnel bimoléculaire de type $\text{S}_{\text{N}}2$ de la synthèse du disaccharide $\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcNAc}$ utilisant NIS/TfOH comme promoteur	32
Figure 2.5: Formation des 1,2,3-triazoles dans les conditions thermiques via une cycloaddition 1,3-dipolaire	35
Figure 2.6: Synthèse de triazoles catalysée par le ruthénium à partir d'alcynes internes	36
Figure 2.7: Mécanisme du cycle catalytique	38
Figure 2.8: Principaux systèmes d'interactions possibles entre ligands divalents et protéines A) phénomène intramoléculaire, la chélation B) phénomène intermoléculaire, l'agrégation et la précipitation	41
Figure 2.9: Structures moléculaires des glycoclusters	46
Figure 4.1: Structure de l'accepteur GlcNPhth comportant un groupement PMB en position C-6	71
Figure 4.2: Structures moléculaires des disaccharides modifiés en position C-2 et C-6	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Conditions de réaction et rendement	39
Tableau 2.2: Conditions de réaction pour la synthèse des bras espaceurs de type PEG.....	43
Tableau 2.3: Conditions de réaction de la synthèse des glycoclusters di- et trivalent.....	45
Tableau 3.1: Valeurs d'ITC pour différents ligands de la lectine PA-IIL	51
Tableau 3.2: Valeurs thermodynamiques de l'interaction de PA-IIL avec le Le ^a et quelques analogues multivalents.....	60

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 2.1: Synthèse du donneur de thioglycoside 4	27
Schéma 2.2: Synthèse de l'accepteur 8	29
Schéma 2.3: Synthèse du disaccharide α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc 9	31
Schéma 2.4: Synthèse des régioisomères 1,4 et 1,5 via la réaction de Huisgen.....	37
Schéma 2.5: Synthèse des dérivés 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués via la 'Click Chemistry' ..	39
Schéma 2.6: Synthèse des bras espaceurs de type PEG	42
Schéma 4.1: Synthèse de l'accepteur de glycosyle 46	66
Schéma 4.2: Synthèse du disaccharide 52 modifié en position C-6	67
Schéma 4.3: Synthèse de l'accepteur Glc 57	69
Schéma 4.4: Synthèse du disaccharide Glc 60	70
Schéma 4.5: Synthèse de l'accepteur GlcNPhth 66	72
Schéma 4.6: Synthèse du disaccharide GlcNPhth	73
Schéma 4.7: Synthèse des disaccharides modifiés en C-2.....	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Angstrom
Ac	Acétyle
APTS	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
AcCl	Chlorure d'acétyle
Ac. asc.	Acide ascorbique
α	Alpha
β	Béta
Bn	Benzyle
BnBr	Bromure de benzyle
Boc	<i>t</i> -Butoxycarbonyle
^t BuOH	<i>tert</i> -Butanol
^t Bu	<i>tert</i> -Butyle
BzCl	Chlorure de benzoyle
Bz	Benzoyle
<i>c</i>	Concentration (g/100 mL)
C	Carbone
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHCl ₃	Chloroforme
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CH ₃ CN	Acétonitrile
cm	Centimètre
CuI	Iodure de cuivre
CuSO ₄	Sulfate de cuivre
DDQ	Dichloro dicyanoquinone

décomp.	Décomposition
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ϵ	Constante diélectrique
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
ELLA	E nzyme L inked L ectin A ssays, anglais
EtOAc	Acétate d'éthyle
Et ₂ O	Éther diéthylique
éq.	Équivalent
Et ₃ N	Triéthylamine
FK	Fibrose kystique
Fuc	L-fucose
Glc	D-glucose
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
GlcNPhth	N-phthalimido-D-glucose
H	Hydrogène
H ₂	Dihydrogène
h	Heure
HBr	Bromure d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HSL	Homosérines lactones
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentration en inhibiteur provoquant 50% d'inhibition
IR	Infrarouge
ITC	I sothermal T itration C alorimetry, anglais

K_a	Constante d'affinité
kcal/mol	Kilocalorie par mole
kJ/mol	Kilojoule par mole
K_d	Constante de dissociation
LiOH	Hydroxyde de lithium
litt.	Littérature
Le ^a	Lewis a
Le ^x	Lewis x
M	Concentration (mol/L)
min	Minute
mL	Millilitre
mmol	Millimolaire
Me	Méthyl
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
Ms	Mésyle
MsCl	Chlorure de mésyle
<i>m/Z</i>	Rapport masse/charge
NaCl	Chlorure de sodium
NaCNBH ₃	Cyanoborohydrure de sodium
NaH	Hydruure de sodium
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaN ₃	Azoture de sodium
NaOMe	Méthanolate de sodium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium

NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IIL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectine II
Pd(OH) ₂ /C	Dihydroxyde de palladium sur charbon
PEG	Poly (éthylène glycol)
p.f.	Point de fusion
Ph	Phényle
PhSH	Thiophénol
Phth	Phthalimido
PMB	<i>para</i> -Méthoxybenzyle
QS	<i>Quorum sensing</i>
rend.	Rendement
SM (ESI)	Spectrométrie de masse (électrospray)
SMHR	Spectrométrie de masse haute résolution
SnCl ₄	Tétrachlorure d'étain
Tamis mol.	Tamis moléculaire
TBAHS	Hydrogénosulfure de tétrabutylammonium
TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
TFA	Acide trifluoroacétique
TfOH	Acide trifluorométhanesulfonique
THF	Tétrahydrofurane
TMSN ₃	Azoture de triméthylsilyle
TMSOTf	Triméthylsilyltrifluorométhane sulfonate

t.p. Température pièce

μL Microlitre

μM Micromolaire

RÉSUMÉ

La fibrose kystique (FK) est la maladie génétique mortelle la plus répandue chez les jeunes Canadiens. La colonisation des poumons par une bactérie opportuniste, *Pseudomonas aeruginosa*, est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients FK. La maladie est causée par des mutations du gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui agit comme canal à ions chlorures. Ces modifications entraînent notamment une surexpression d'oligosaccharides fucosylés à la surface de l'épithélium pulmonaire. Le processus d'adhésion de la bactérie à la surface des cellules de l'épithélium pulmonaire est causé par la présence de deux lectines à la surface de la bactérie. Nous nous intéressons principalement à l'une d'entre elles, une lectine calcium dépendante qui reconnaît particulièrement le L-fucose (PA-IIL). Des études cristallographiques menées sur PA-IIL, en complexe avec divers ligands naturels tel que le Lewis a, ont permis d'identifier plusieurs éléments essentiels à l'obtention d'une forte interaction ligand-lectine. Basé sur ces études, le projet de recherche a consisté en la synthèse de différents analogues d'un disaccharide composé d'une unité fucose et glucosamine du type L-Fuc- α (1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc β intimement impliqué dans le site de liaison de la protéine. Différents glycoclusters du disaccharide ont été synthétisés en utilisant la 'Click Chemistry'. De plus, quelques disaccharides modifiés en position C-2 et C-6 ont aussi été synthétisés. Les disaccharides ainsi que les glycoclusters ont été testés sur la PA-IIL en utilisant un test d'inhibition compétitive (ELLA). Les dérivés disaccharidiques ont montrés une constante de dissociation ($K_d = 310$ nM) dans le même ordre de grandeur que celle du meilleur ligand naturel Lewis a ($K_d = 210$ nM) connu jusqu'à maintenant pour la PA-IIL.

Mots-clés: *Pseudomonas aeruginosa*, fibrose kystique, lectine PA-IIL, Lewis a, glycosylation, «click chemistry», glycoclusters

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Ce premier chapitre sera divisé en trois parties. La première fera un bref survol de la maladie qu'est la fibrose kystique, c'est-à-dire la cause de cette maladie, son lieu d'invasion, ses effets dévastateurs, la principale cause de décès chez les patients, etc. La deuxième partie quant à elle mettra en évidence les objectifs et hypothèses du projet de recherche. Finalement, la dernière partie traitera des tests biologiques employés lors de ce travail.

1.2 La fibrose kystique

La fibrose kystique est la maladie génétique mortelle la plus répandue chez les jeunes Canadiens selon la Fondation canadienne de la fibrose kystique. La maladie atteint essentiellement les tissus épithéliaux exocrines. On observe des dysfonctionnements dans de multiples tissus tels que les voies respiratoires, le pancréas, le foie, l'intestin, les vas déférents et les glandes sudoripares. Ceci conduit à de nombreux symptômes comme des insuffisances respiratoires et pancréatiques, une infertilité masculine et une modification de la concentration saline de la sueur.¹ Le gène responsable de cette maladie a été décrit en 1989 par les équipes de Lap-Chee Tsui (Canada), J. Riordan et F. Collins (USA) et code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés: la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). L'activité du canal CFTR est principalement

¹ May, T. B.; Shinabarger, D.; Maharaj, R.; Kato, J.; Chu, L.; DeVault, J. D.; Roychoudhury, S.; Zielinski, N. A.; Berry, A.; Rothmel, R. K. *Clin. Microbiol. Rev.* **1991**, *4*, 191.

associée à la diffusion de chlorure et à la régulation d'autres canaux ioniques épithéliaux.^{2,3} Des altérations au niveau du gène codant pour cette protéine entraînent notamment une modification de l'état de glycosylation des surfaces épithéliales et des mucines (principales composantes du mucus) pulmonaires et salivaires. Ces modifications se traduisent par une augmentation d'oligosaccharides fucosylés et une diminution du niveau de sialylation⁴ à la surface des cellules épithéliales et une augmentation du pourcentage d'oligosaccharides Lewis x (Le^x) sulfatés et sialylés au niveau des mucines pulmonaires et salivaires.⁵ De plus, les défauts génétiques provoquent une importante augmentation de la viscosité du mucus recouvrant les voies respiratoires créant ainsi un environnement propice aux infections bactériennes.^{6,7} L'augmentation de la salinité du liquide environnant l'épithélium inactive les molécules de défense antibactérienne facilitant ainsi la prolifération des bactéries.⁸ Certains traitements sont déjà en vigueur afin de soigner les complications respiratoires chez les patients comme le dextran,^{9,10} les broncho-dilatateurs¹¹ et une enzyme comme la dornase alfa humaine recombinante (rhDNase)¹² sont employés afin de réduire l'obstruction des voies respiratoires. Actuellement, la seule thérapie efficace reste encore la transplantation de poumon.

² Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.-S.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, J.-L.; Chou, M. L.; Drumm, M. C.; Collins, F. S.; Tsui, L.-C. *Science*. **1989**, *245*, 1066.

³ Collins, F. S. *Science*. **1992**, *256*, 774.

⁴ Scanlin, T. F.; Glick, M. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 241.

⁵ Scharfman, A. *et al. Glycobiology* **1999**, *9*, 757.

⁶ Engelhardt, J. F.; Yankaskas, J. R.; Ernst, S. A.; Yang, Y.; Marino, C. R.; Boucher, R. C.; Cohn, J. A.; Wilson, J. M. *Nat. Genet.* **1992**, *2*, 240.

⁷ Inglis, S. K.; Corboz, M. R.; Taylor, A. E.; Ballard, S. T. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, L372.

⁸ Smith, J. J.; Travis, S. M.; Greenberg, E. P.; Welsh, M. J. *Cell*. **1996**, *85*, 229.

⁹ Reisman, J. J.; Rivington-Law, B.; Corey, M. *J. Pediatr.* **1988**, *113*, 632.

¹⁰ Feng, W.; Garrett, H.; Speert, D. P.; King, M. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, *157*, 710.

¹¹ Konig, P.; Gayer, D.; Barbero, G. J.; *Pediatr. Pulmonol.* **1995**, *20*, 205.

¹² Fuchs, H. J.; Borowitz, D. S.; Christiansen, D. H. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 637.

1.3 La grande responsable: *Pseudomonas aeruginosa*

Les affections pulmonaires sont la principale cause de mortalité chez les patients fibrose kystique (FK).^{13,14} Comme mentionné précédemment, les modifications de la protéine CFTR provoquent entre autre une augmentation de la viscosité du mucus entraînant une occlusion progressive des voies respiratoires créant ainsi un environnement propice aux infections bactériennes opportunistes. Le mécanisme de défense naturel des voies pulmonaires faisant intervenir la clairance mucociliaire devient inactif chez les patients FK car le battement des cils est bloqué par la trop grande viscosité du mucus. Les tissus respiratoires des malades FK deviennent donc rapidement et abondamment colonisés par des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*. Une fois l'infection bactérienne installée il est très difficile, voir même impossible, de l'éradiquer. *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste qui tire avantage des brèches dans le système immunitaire des personnes immunodéprimées comme les grands brûlés, les personnes âgées ou les nouveau-nés ainsi que les personnes atteintes de fibrose kystique. En fait, *P. aeruginosa* représente l'une des trois plus grandes causes d'infections opportunistes chez l'humain.¹⁵ C'est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve principalement dans le sol ainsi que dans l'eau douce et salée. *P. aeruginosa* se présente sous la forme de bâtonnet gram négatif sécrétant un certains nombres de chromophores toxiques comme la pyocyanine,¹⁶ la pyoverdine¹⁷ et la pyocheline¹⁸ contribuant à sa virulence. La **Figure 1.1** illustre la bactérie exprimant le pigment vert pyocyanine.

¹³ Govan, J. R.; Deretic, V. *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 539.

¹⁴ Odeh, R.; Quinn, J. P.; *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *21*, 331.

¹⁵ Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warren, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R. E.; Lory, S.; Olson, M. V. *Nature*, **2000**, *406*, 959.

¹⁶ Hassan, H. M.; Fridovich, I. *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 156.

¹⁷ Haas, B.; Kraut, J.; Marks, J.; Zanker, S. C.; Castignetti, D. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 3997.

¹⁸ Britigan, B. E.; Roeder, T. L.; Rasmussen, G. T.; Shasby, D. M.; McCormick, M. L.; Cox, C. D. *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 2187.



Figure 1.1: Bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie très robuste, naturellement très résistante aux antibiotiques et s'adaptant rapidement aux attaques médicamenteuses. Les bactéries se défendent contre les grandes classes d'antimicrobiens selon certains mécanismes. Plusieurs espèces bactériennes possèdent des pompes d'efflux qui expulsent activement les antibiotiques à l'extérieur de la cellule. Ce mécanisme prévient l'accumulation de concentrations thérapeutiques d'antimicrobiens dans le cytoplasme de la bactérie. Le cas de *P. aeruginosa* ne peut être passé sous silence car il possède plus de 72 pompes distinctes qui lui permettent de résister à une multitude d'antibiotiques.¹⁹

1.4 Quelques facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa*

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production de plusieurs facteurs de virulence. On dénote son habileté à adhérer à la surface des cellules hôtes, de former un biofilm protecteur et de sécréter dans son environnement des enzymes hydrolytiques et des composés toxiques.²⁰ L'expression de ces facteurs de virulence est assujettie à des mécanismes de régulations complexes tels que le *quorum sensing* (QS).²¹

¹⁹ Hancock, R. E.; Brinkman, F. S. *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 17

²⁰ Aaron, S. D.; Kattachchi, D.; Ferris, W. *Eur. Respir. J.* **2004**, *24*, 631.

²¹ Smith, R. S.; Iglewski, B. H. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 56.

Nous allons aborder ici que quelques éléments parmi les nombreux facteurs de virulence exprimés par la bactérie *P. aeruginosa*.

1.4.1 Le quorum sensing

Comme mentionné plus haut, plusieurs facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* sont régulés par le *quorum sensing*. Mais qu'est-ce que le QS ? Au lieu d'employer le langage, la bactérie utilise des molécules de signalisation qu'elle relâche dans son environnement afin de communiquer et coordonner son comportement avec les autres bactéries d'une même espèce et ce en fonction de leurs nombres. Ces petites molécules produites par la bactérie, les homosérines lactones (HSL), permettent à la population de mesurer la densité cellulaire ou plutôt d'évaluer la concentration en bactéries. À une certaine densité cellulaire, la concentration d'HSL est assez grande pour permettre la transcription de facteurs de virulence. Ceci signifie que les bactéries opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent croître dans l'organisme hôte sans effets pathogènes jusqu'à ce qu'elles atteignent une certaine concentration. C'est alors qu'elles deviennent virulentes et leur nombre suffit à dépasser le système immunitaire hôte. Chez *P. aeruginosa*, il y a au moins deux types de *quorum sensing*: le système *las*²² et le système *rhl*.²³ Ces deux systèmes sont chacun responsables de la production de différents facteurs de virulence chez la bactérie.

1.4.2 Le biofilm

Un autre facteur contribuant à la grande virulence de *P. aeruginosa* est sa capacité de former un biofilm au sein duquel elle se développe. Ce biofilm est constitué entre autre

²² Gambello, M. J.; Iglewski, B. H. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 3000.

²³ Oschsner, U. A.; Koch, A. K.; Fiechter, A.; Reiser, J. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 2044.

d'alginate, un polysaccharide chargé négativement composé d'acides L-gulonique et D-mannuronique.²⁴ La présence de ce biofilm augmente la viscosité du mucus qui obstrue ainsi davantage les voies respiratoires. De plus, cette couche de biofilm assure une protection à la communauté bactérienne en constituant une barrière au passage efficace des antibiotiques^{1,25} et permettant une résistance à la phagocytose et aux anticorps. On peut distinguer trois étapes dans la formation du biofilm tel que l'illustre la **Figure 1.2**. Tout d'abord, il y a attachement des cellules planctoniques (mobiles) à la surface des muqueuses. Par la suite, il y a formation éventuelle de microcolonies et finalement, le système de *quorum sensing* de type *las* donne aux cellules bactériennes un signal de maturation permettant la production de polysaccharides et un biofilm mature se forme où l'expression de plusieurs facteurs de virulence est activée grâce au *quorum sensing*.

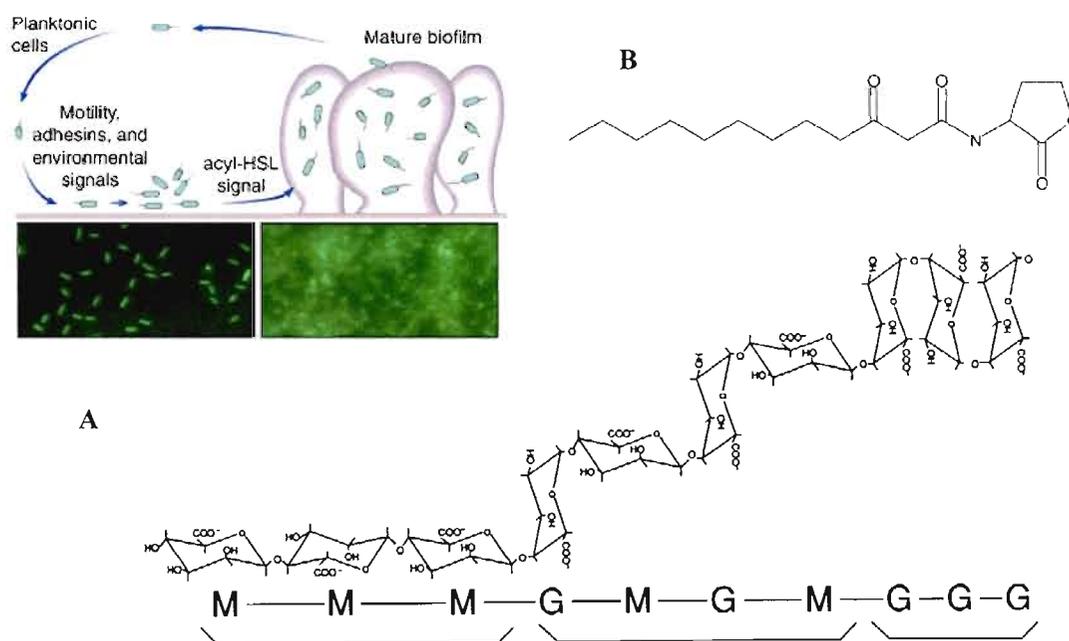


Figure 1.2: Modèle du développement d'un biofilm mature à partir de cellules planctoniques (mobiles) de *P. aeruginosa*.²⁶ **A.** Structure de l'alginate (M = β -D-mannuronate et G = α -L-gulonate) **B.** Exemple d'une homosérine lactone, 3O-C₁₂-HSL

²⁴ Evans, L. R.; Linker, A. *J. Bacteriol.* **1973**, *116*, 915.

²⁵ Anwar, H.; Strap, J. L.; Costerton, J. W. *Antimicrob. Agents Chem.* **1992**, *36*, 1347.

²⁶ Kolter, R.; Losick, R. *Science* **1998**, *280*, 226.

1.4.3 Adhésion à la cellule hôte: les sucres, des indispensables

Pour les organismes pathogènes, la capacité d'adhérer aux tissus des cellules hôtes est essentielle pour initier une infection et les glycoconjugués présents à la surface de ces cellules représentent une cible de choix pour les récepteurs des bactéries.²⁷ Les bactéries possèdent dans leur arsenal plusieurs types de lectines pouvant cibler les sucres présents à la surface des cellules hôtes. La **Figure 1.3** est une représentation schématique de ces différents récepteurs. *P. aeruginosa* produit une variété de lectines pouvant être impliquées dans la reconnaissance avec la cellule hôte et dans l'adhésion. Certaines d'entre elles sont localisées sur les pilis²⁸ ainsi que sur les flagelles.²⁹ Deux lectines solubles, PA-IL et PA-IIL, reconnaissant respectivement le D-galactose et le L-fucose de manière spécifique,³⁰ ont également été identifiées comme étant des éléments importants dans le processus d'adhésion. La PA-IL et PA-IIL sont des protéines tétramériques de 51 kDa³¹ et 47 kDa,³² respectivement. Elles sont toutes deux associées aux facteurs de virulence cytotoxique³³ et sont sous le contrôle du *quorum sensing*.³⁴

Tel que mentionné précédemment, l'altération génétique causant la fibrose kystique provoque notamment une surexpression d'oligosaccharides fucosylés à la surface des cellules épithéliales et des mucines pulmonaires. *Pseudomonas aeruginosa* colonise plus facilement les poumons d'une personne atteinte de FK puisqu'elle reconnaît particulièrement le L-fucose. La **Figure 1.4** illustre le processus de colonisation de *Pseudomonas*. Elle adhère à la surface pulmonaire via sa lectine PA-IIL et sous l'effet du *quorum sensing* elle initie la

²⁷ Beachey, E. H. *J. Infect. Dis.* **1981**, 143, 325.

²⁸ Hahn, H. P. *Gene* **1997**, 192, 99.

²⁹ Arora, S. K.; Ritchings, B. W.; Almira, E. C.; Lory, S.; Ramphal, R. *Infect. Immun.* **1998**, 66, 1000.

³⁰ Gilboa-Garber, N. *Methods Enzymol.* **1982**, 83, 378.

³¹ Avichezer, D.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.; Gilboa-Garber, N. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 23023.

³² Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2000**, 29, 53.

³³ Gilboa-Garber, N. In *Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Bog-Hansen, T.; Spengler, G. A., Eds.; Walter de Gruyter, Berlin, **1983**, Vol. 3, 495-502.

³⁴ Winzer, K.; Falconer, C.; Garber, N. C.; Diggle, S. P.; Camara, M.; Williams, P. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 6401.

formation du biofilm. Des études menées par Tielker *et al.*³⁵ ont démontré que la lectine PA-IIL était impliquée dans la formation du biofilm.

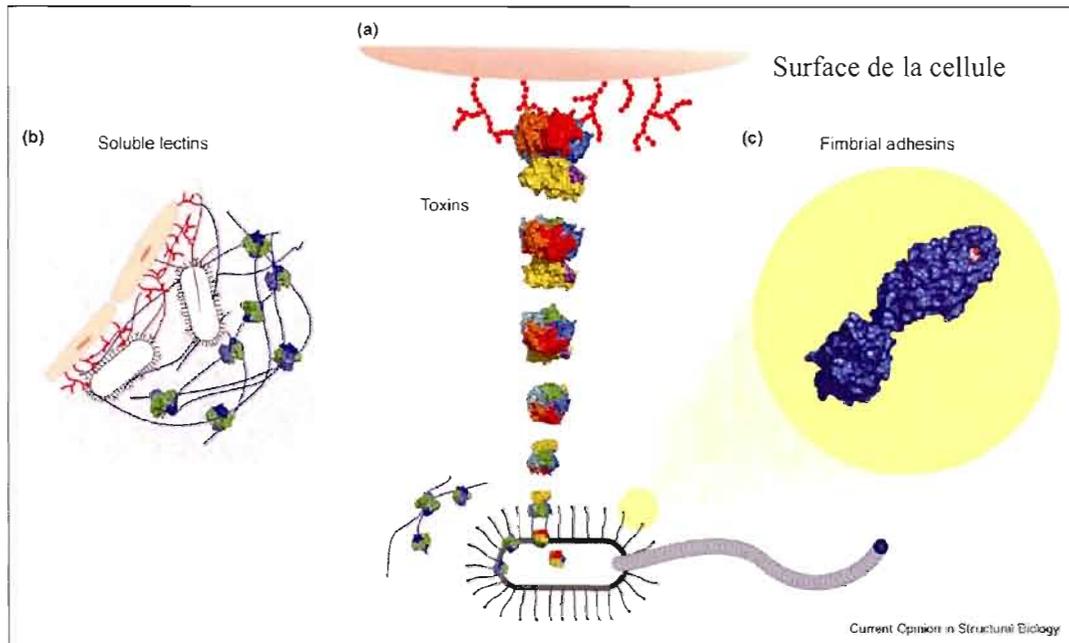


Figure 1.3: Représentation schématique générale d'une bactérie avec une flagelle et plusieurs pilis ainsi qu'un agrandissement des vues des différents types de protéines liant les sucres pouvant être impliquées dans la reconnaissance avec la cellule hôte: **a)** toxines reconnaissant les glycolipides sur la surface des cellules, **b)** lectines solubles interagissant avec les mucines des cellules hôtes et **c)** les adhésines fimbriales³⁶

Une fois l'infection installée, la protection des bactéries grâce au biofilm fait en sorte qu'il devient presque impossible de l'éradiquer par traitement antibiotique, d'où l'intérêt pour une thérapie alternative ou complémentaire à base d'agents anti-adhésion bactérienne. Il est donc important d'intervenir au stade précoce de l'infection, c'est-à-dire avant même l'adhésion de la bactérie à la surface de l'épithélium pulmonaire.

³⁵ Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E. *Microbiology* **2005**, *151*, 1313.

³⁶ Imberty, A.; Mitchell, E. P.; Wimmerova, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 525.

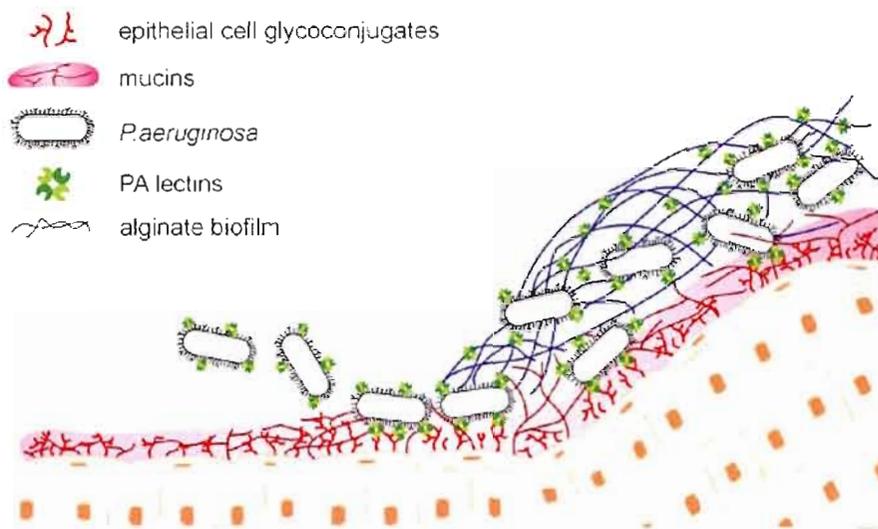


Figure 1.4: Colonisation chronique des poumons par *Pseudomonas aeruginosa*³⁷

1.5 La lectine PA-IIL

Parmi les deux lectines solubles produites par *Pseudomonas aeruginosa*, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la PA-IIL, caractérisée par une forte affinité pour le L-fucose³⁸ avec une constante d'affinité (K_a $1.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) rarement rencontrée lors d'une interaction protéine-sucre.³⁹ Des tests d'inhibitions d'hémagglutination ont montré qu'elle était également capable de reconnaître avec une affinité décroissante les monosaccharides suivants *p*-nitrophényl α -L-fucoside > L-fucose > L-galactose > D-arabinose > D-fructose et enfin le D-mannose, alors que le D-galactose n'est pas reconnu.³⁸ Cette protéine a été isolée du cytoplasme³⁰ de *Pseudomonas* et sa séquence d'acides aminés a pu être caractérisée.³² Des études ont également montrés que cette lectine se trouvait présente à la surface de la membrane cellulaire de *P. aeruginosa*.^{35,40} En 2002, Mitchell *et al.*⁴¹ ont résolu la structure

³⁷ Imbert, A.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. *Microb. Infect.* **2004**, *6*, 221.

³⁸ Garber, N.; Guempel, U.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, *48*, 331.

³⁹ Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387.

⁴⁰ Loris, R.; Tielker, D.; Jaeger, K.-E.; Wynn, L. *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 861.

crystalline de la lectine PA-IIL en complexe avec le L-fucose. Cette structure allait donner de précieuses informations quant aux interactions en jeu lors de la reconnaissance protéine-sucre et expliquer les raisons de cette affinité élevée pour le L-fucose. La **Figure 1.5** présente la structure de la lectine co-cristallisée avec le L-fucose. Elle se présente sous la forme d'un tétramère de quatre sous-unités indépendantes, chacune comportant deux ions calciums Ca^{2+} et liant un ligand L-fucose. Le site de liaison de PA-IIL sera vu et étudié en détail plus loin dans cette section.

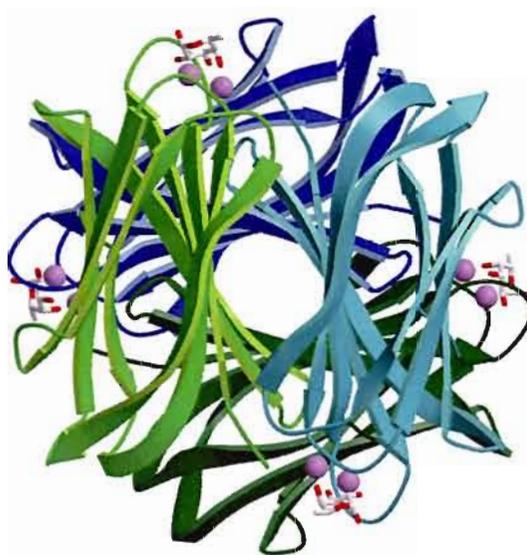


Figure 1.5: Structure cristalline de la lectine tétramérique PA-IIL comportant les ions calcium (en mauve) en complexe avec le L-fucose (en bâtonnet)⁴¹

1.5.1 Ligands naturels de la PA-IIL

En plus des analyses cristallographiques sur PA-IIL en complexe avec divers monosaccharides ainsi que de leurs évaluations comme inhibiteurs potentiels de l'adhésion de

⁴¹ Mitchell, E. P.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerova, M.; Gautier, C.; Pérez, S.; Wu, A. M.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. *Nature Struct. Biol.* **2002**, *9*, 918.

PA-IIL,^{41,42} des études menées par Perret *et al.*⁴³ ont pu mettre en évidence les interactions entre différents oligosaccharides présents dans le lait humain et la lectine PA-IIL. Ces études vont nous fournir de précieuses informations structurales concernant des composés qui pourraient devenir les fondements d'une nouvelle stratégie thérapeutique contre l'infection bactérienne de *P. aeruginosa*. La **Figure 1.6** présente les structures moléculaires des principaux oligosaccharides retrouvés dans le lait humain.

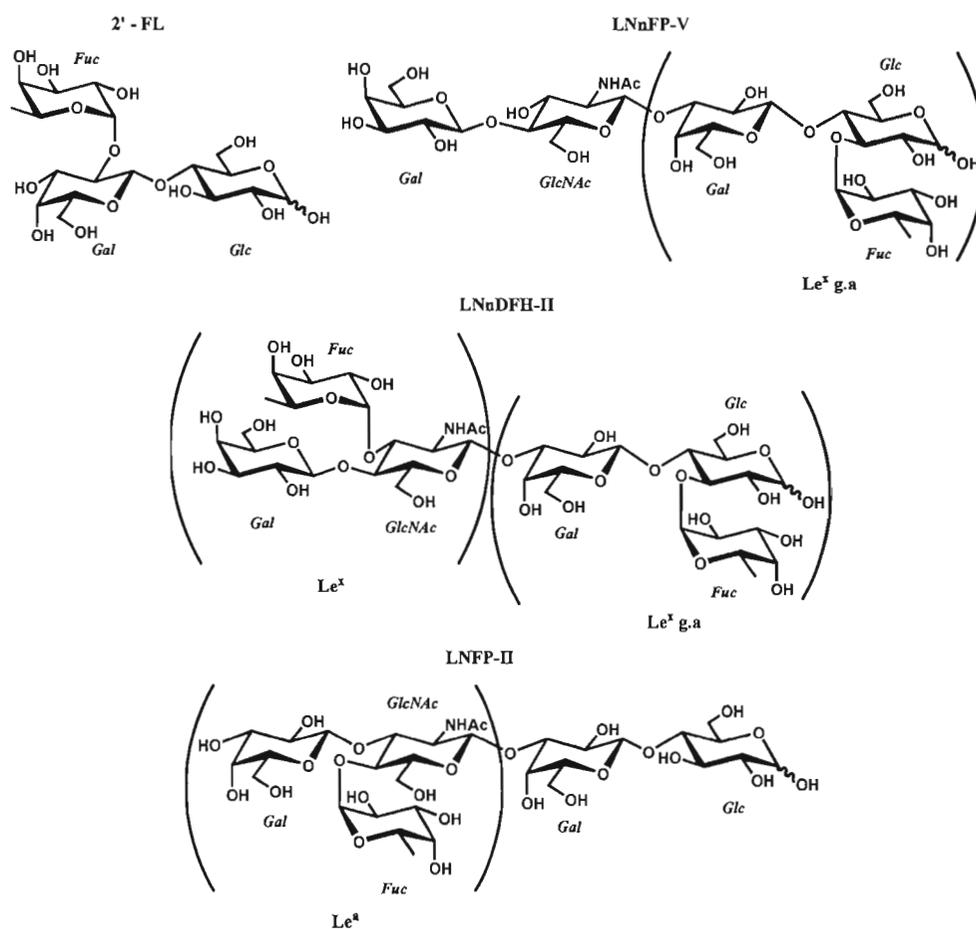


Figure 1.6: Structures des principaux oligosaccharides présents dans le lait humain

⁴² Sabin, C.; Mitchell, E. P.; Pokorna, M.; Gautier, C.; Utile, J.-P.; Wimmerova, M.; Imbert, A. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 982.

⁴³ Perret, S.; Sabin, C.; Dumon, C.; Pokorna, M.; Gautier, C.; Galanina, O.; Ilia, S.; Bovin, N.; Nicaise, M.; Desmadril, M.; Gilboa-Garber, N.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Imbert, A. *Biochem. J.* **2005**, *389*, 325.

L'étude de l'affinité de ces oligosaccharides à l'égard de la lectine a été effectuée par test ELLA. Il semble que le potentiel d'inhibition soit directement dépendant de la liaison entre l'unité fucose et le reste de l'oligosaccharide (**Figure 1.7**). En effet, les oligosaccharides comportant une unité fucose liée en position 2 du galactose (2'-FL) sont de faibles inhibiteurs. De façon similaire, les composés de la série Le^x, comportant un fucose lié en position 3 d'un résidu GlcNAc, lient de façon moins efficace la PA-III que les monomères fucose. Au contraire, les composés de la série Le^x g.a. (Le^x glucose analog), dans lesquels l'unité GlcNAc est remplacée par une unité Glc, sont approximativement 6 fois meilleurs que le fucose. Les meilleurs inhibiteurs sont ceux de la série Le^a qui contiennent un fucose lié en position 4 de l'unité GlcNAc. Ces derniers sont 8 à 10 fois meilleurs inhibiteurs que le fucose. Ces résultats démontrent également que la présence d'un groupe sialyl n'augmente pas le potentiel d'inhibition des oligosaccharides Le^a et Le^x. De plus, la longueur de la chaîne d'oligosaccharides contenant l'épitope Le^x g.a. ou Le^a ne modifie en rien la force de l'interaction indiquant que seulement la partie des épitopes Lewis sont responsables de la grande affinité.

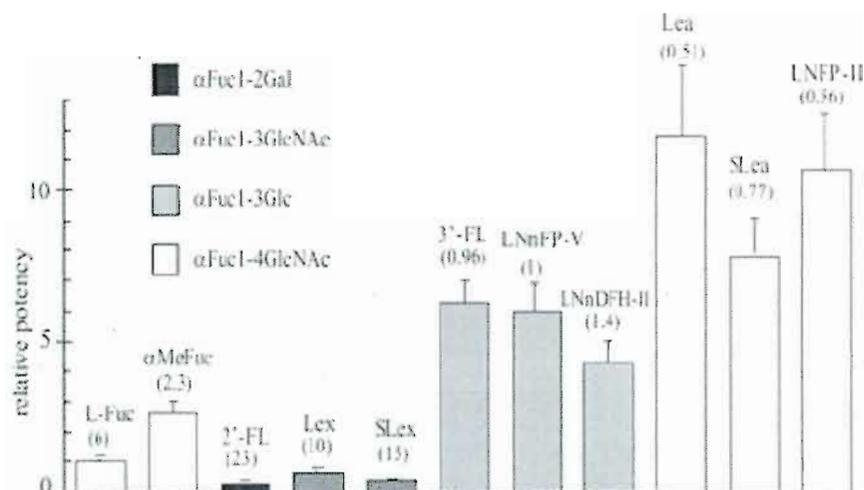


Figure 1.7: Potentiel d'inhibition relatif au L-fucose (potentiel fixé à 1) d'oligosaccharides naturels présents dans le lait humain. Les chiffres entre parenthèse correspondent aux valeurs des IC₅₀ en μM⁴³

On en conclut que l'affinité de PA-IIL est maximale pour les oligosaccharides dont le résidu fucose est lié en position 4 de l'unité GlcNAc et non en position 3.⁴³ La **Figure 1.8** permet de rationaliser cette observation. Dans le cas du Lewis a, la liaison Fuc- $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc favorise une interaction entre O-6 de GlcNAc et la chaîne protéique. Toutefois, dans le cas du Lewis x, la liaison Fuc- $\alpha(1\rightarrow3)$ GlcNAc oriente le groupe N-acétyle dans la même position créant ainsi un encombrement stérique défavorable avec la chaîne protéique, déformant le trisaccharide et affaiblissant la liaison avec la lectine. Finalement, le Le^a est jusqu'à maintenant le meilleur ligand naturel connu pour la lectine PA-IIL avec une constante de dissociation de 210 nM.³⁸

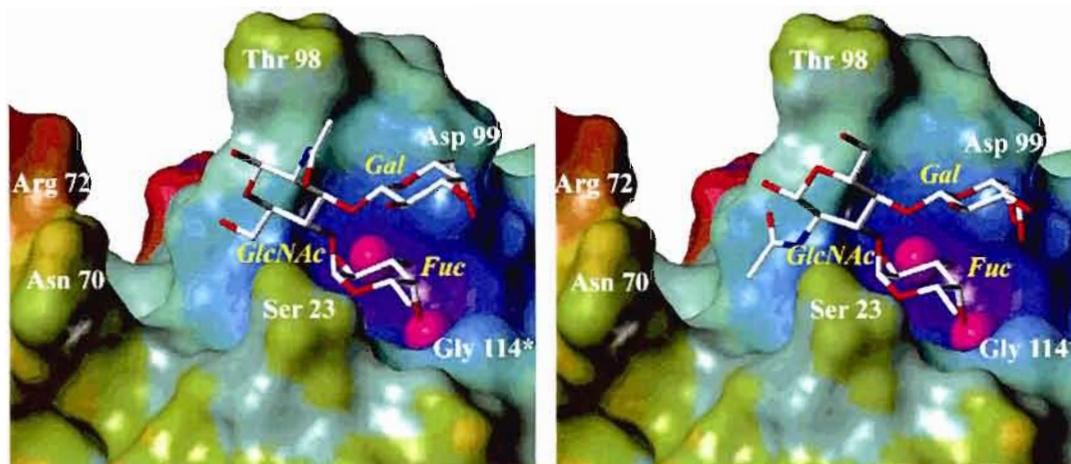


Figure 1.8: Surface électrostatique du site de liaison de PA-IIL contenant deux ions calcium (en rose) et les ligands trisaccharides Lewis a (à gauche) et Lewis x (à droite)⁴¹

1.5.2 Structure co-cristallisée avec le Lewis a

L'analyse du mode de liaison du trisaccharide Le^a avec la PA-IIL révèle de nombreuses interactions entre le sucre et la protéine. Ce trisaccharide est composé d'une unité L-fucose, D-glucosamine et D-galactose de structure Gal β 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 4]GlcNAc β . La

Figure 1.9 est un agrandissement du site de liaison de PA-IIL en complexe avec le trisaccharide Le^a. Les trois monosaccharides du Le^a interagissent autant de façon direct, par des liaisons hydrogène et de coordination avec les ions calcium, qu'indirect, via la présence de molécules d'eau dans le site, avec la surface de la protéine.

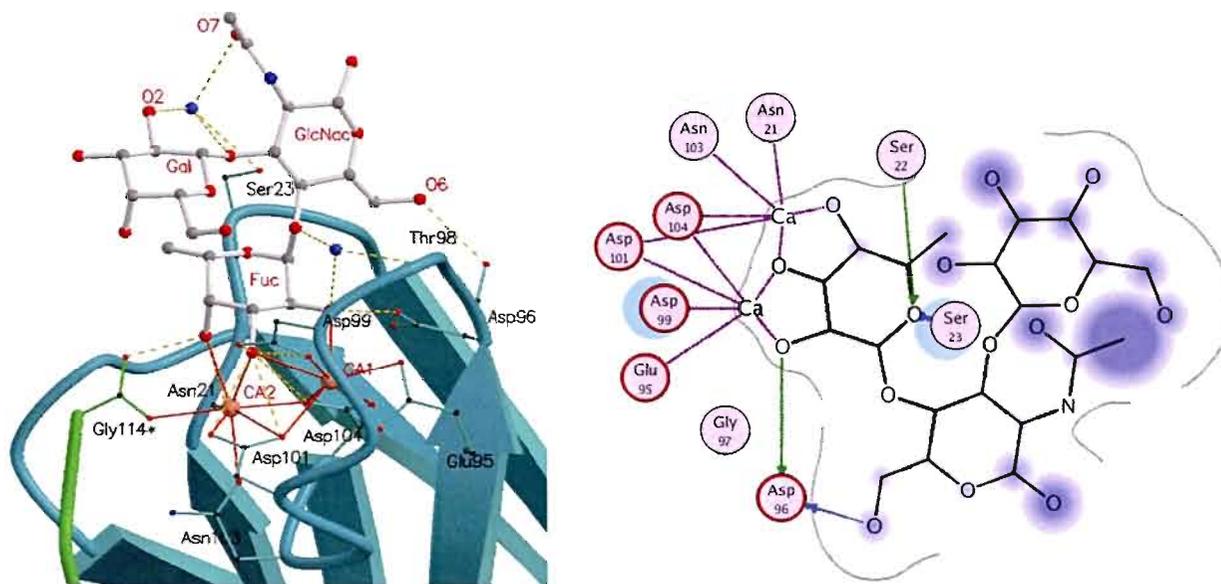


Figure 1.9: Agrandissement du site de liaison de PA-IIL en complexe avec le trisaccharide Lewis a. Les lignes pointillées jaunes représentent les liaisons hydrogène, les lignes pleines rouges représentent les liaisons de coordination, les ions calcium sont représentés comme des sphères oranges et les molécules d'eau sous forme de sphères bleues (code PDB 1W8H). À droite, représentation 2D des interactions.

Tout d'abord, à la **Figure 1.9**, on peut y voir les deux ions calcium formant des liaisons de coordination avec les groupements hydroxyles O-2, O-3 et O-4 du fucose. La présence des deux ions calcium dans le site de liaison semble pouvoir expliquer deux particularités de la lectine PA-IIL, sa faible spécificité⁴⁰ et sa grande affinité.⁴⁴ Une stéréochimie particulière, soit deux groupements hydroxyles vicinaux équatoriaux et un axial,

⁴⁴ Mitchell, E. P.; Sabin, C.; Snajdrova, L.; Budova, M.; Perret, S.; Gautier, C.; Hofr, C.; Gilboa-Garber, N.; Koca, J.; Wimmerova, M.; Imberty, A. *Proteins: Struct. Funct. Bioinfo.* **2005**, *58*, 735.

est essentielle pour la liaison aux ions calcium.⁴⁵ Plusieurs liaisons hydrogène sont établies entre le fucose et les acides aminés du site de liaison. L'hydroxyle O-2 du fucose forme une liaison hydrogène avec l'Asp96, tandis que l'hydroxyle O-3 en forme plusieurs avec l'Asp99, Asp101 et Asp104. Quant à l'hydroxyle O-4, il établit deux liaisons hydrogène avec l'Asn21 et Gly114. L'oxygène endocyclique O-5 du fucose forme une liaison hydrogène avec le groupement NH de la Ser23. Le groupe méthyl en C-6 du fucose établit, quant à lui, un contact hydrophobe avec Thr145. En ce qui concerne l'unité glucosamine, elle établit une liaison hydrogène directe avec l'Asp96 de la chaîne protéique. Deux molécules d'eau sont conservées dans le site de liaison. Une première forme des liaisons hydrogène avec O-2 et O-1 (oxygène anomérique) du fucose stabilisant ainsi sa configuration alpha et également avec Thr98 du site de liaison. Quant à la deuxième molécule d'eau, elle relie les hydroxyles O-1 et O-2 du galactose avec la Ser23 de la chaîne protéique via la formation de liaisons hydrogène. Elle établit également une liaison hydrogène avec O-7 du groupement amide de la glucosamine.

1.6 Objectifs et hypothèses du projet de recherche

Le but ultime de ce travail est de faire la synthèse de composés qui pourront agir comme agents anti-adhésion de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à la surface de l'épithélium pulmonaire des patients atteints de la fibrose kystique. Plus concrètement, fabriquer des molécules qui seront plus attrayantes pour la bactérie que celles présentes à la surface des poumons. Ainsi, *Pseudomonas* pourra être éliminée des voies respiratoires et les infections pulmonaires mortelles enrayées. Ces composés actifs amélioreront, éventuellement, l'espérance et la qualité de vie des malades. Avant d'arriver à l'accomplissement de ce but ultime, un long processus de recherche doit être enclenché afin de mieux comprendre et définir le système sur lequel nous allons travailler. Jusqu'à maintenant dans ce chapitre, nous avons mis en évidence certains faits concernant la fibrose

⁴⁵ Sudakevitz, D.; Kostlanova, N.; Blatman-Jan, G.; Mitchell, E. P.; Lerrer, B.; Wimmerova, M.; Katcoff, D. J.; Imberty, A.; Gilboa-Garber, N. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 691.

kystique. Nous possédons maintenant les outils nécessaires permettant d'établir nos objectifs et hypothèses de travail.

Des tests ELLA effectués antérieurement ont montré que les oligosaccharides naturels pouvant se lier efficacement au domaine de reconnaissance de PA-IIL sont ceux possédant un résidu fucose lié en position 4 d'une unité glucosamine. Ainsi, le trisaccharide Le^a est jusqu'à maintenant le meilleur ligand naturel de la lectine PA-IIL avec une constante de dissociation de 210 nM. Les données cristallographiques suggèrent que le disaccharide $\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcNAc}$ du Le^a participe à l'essentiel des interactions avec la protéine. En effet, l'unité galactose n'a aucune interaction directe avec le site de liaison et sort complètement du site (**Figure 1.10**). Il peut donc constituer le motif commun d'une série d'inhibiteurs potentiels plus simples à être synthétisée et testée en ELLA.

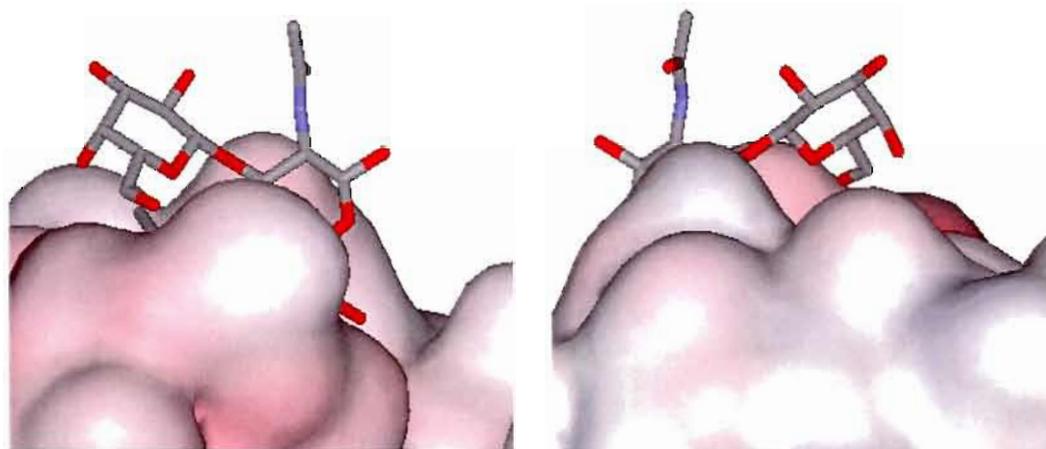


Figure 1.10: Le trisaccharide Le^a en complexe avec la lectine PA-IIL. L'unité galactose n'a pas d'interaction direct avec le site de liaison

L'objectif de mon travail est de faire la synthèse de différents analogues du disaccharide $\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcNAc}$ contenu dans le trisaccharide Le^a . Ces ligands pourront être évalués pour leurs potentiels inhibiteurs de l'adhésion de PA-IIL. Nous croyons fortement que la suppression de l'unité galactose n'affectera en rien l'affinité vis-à-vis la

lectine. Le disaccharide arborera une fonction azoture en position anomérique et sera soumis à la chimie dite 'Click Chemistry' afin de former des hétérocycles fonctionnalisés et pouvoir augmenter son affinité avec la protéine. De plus, cet azoture pourra être un point d'attache pour la synthèse de différents glycoclusters et pouvoir aller chercher un effet dit de multivalence avec la lectine. La chimie des sucres sera également mise à profit dans la synthèse de composés modifiés en C-2 et C-6 de l'unité glucosamine. Ces modifications permettront peut-être d'augmenter l'affinité des disaccharides avec la protéine. De plus, les modifications en C-2 permettront également d'évaluer la contribution du groupement acétamido de l'unité glucosamine dans la reconnaissance avec la lectine.

1.7 Tests biologiques

La cristallographie des protéines nous permet d'obtenir des renseignements au niveau de leurs structures puisqu'elle fournit une image tridimensionnelle de ces macromolécules. Si la connaissance de la structure d'une protéine nous permet d'appréhender les forces d'interactions, les conflits stériques, c'est-à-dire les côtés statiques d'une interaction, elle ne nous permet pas de bien comprendre son mécanisme réactionnel. La cristallographie offre une image figée d'une interaction qui en milieu biologique est dynamique. C'est pourquoi l'utilisation d'autres techniques devient nécessaire pour la compréhension du mécanisme réactionnel. Ainsi, les tests de compétition entre ligands nous renseignent davantage sur la spécificité d'une protéine tandis que la microcalorimétrie nous permet d'accéder aux grandeurs thermodynamiques au cours d'une interaction. La complémentarité de ces techniques permet d'élucider le rôle et le mécanisme réactionnel d'une protéine et ainsi pouvoir planifier la synthèse de nouvelles molécules à être fabriquées par nous les chimistes afin qu'elles interagissent de façon plus efficace avec les protéines.

Les tests biologiques ont été menés au CERMAV (Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales) à Grenoble en France, sous la direction du Pr. Anne Imberty. Ces tests ont permis d'obtenir des informations quant au potentiel inhibiteur des dérivés

disaccharidiques, les valeurs d' IC_{50} ainsi que quelques valeurs thermodynamiques pour certains candidats.

1.7.1 Test d'inhibition compétitive ELLA

Une des méthodes utilisées pour l'étude de la reconnaissance lectine-sucre est la méthode ELLA (**E**nzyme **L**inked **L**ectin **A**ssay). Elle consiste à évaluer le pouvoir d'une molécule donnée à inhiber l'interaction entre une protéine et un ligand de référence. Dans notre cas, le ligand est l' α -L-fucose car il s'agit du ligand monosaccharide de référence utilisé lors d'études avec la lectine PA-IIL. Deux types de tests ELLA ont été menés sur les dérivés disaccharides. Ces tests ont tous été réalisés sur des microplaques en polystyrène de 96 puits. Dans le cas du test ELLA de type 1 (**Figure 1.11**), c'est la lectine PA-IIL qui a été immobilisée au fond des puits tandis que pour le test de type 2 (**Figure 1.12**), c'est plutôt un polymère de poly[N-(2-hydroxyéthyl)acrylamide] (PAA) contenant du fucose en ramification (PAA-fucose) qui a été fixé au fond des puits. Les espaces n'ayant pas été recouverts par la lectine ou le fucose ont été bloqués par de l'albumine de sérum bovin (BSA) afin d'éviter les interactions non spécifiques avec la plaque. Des lavages ont été effectués avant et après ajout du BSA. Dans le cas du test de type 1, la plaque a été incubée avec l'inhibiteur et le L-fucose biotinylé. Inversement, dans le cas du test de type 2, la plaque a été incubée avec l'inhibiteur et la lectine PA-IIL biotinylée. Différentes concentrations en inhibiteurs ont été testées pour empêcher l'interaction entre la lectine et le L-fucose. Par la suite, un lavage a été effectué afin d'éliminer les sucres (inhibiteurs et fucose) ne s'étant pas liés à la lectine. La visualisation des résultats s'effectue grâce à l'interaction de la streptavidine couplée à une peroxydase qui catalyse la formation d'un composé coloré à partir d'un substrat commercial. Les courbes obtenues permettent d'estimer l' IC_{50} (concentration en inhibiteur provoquant 50% d'inhibition).

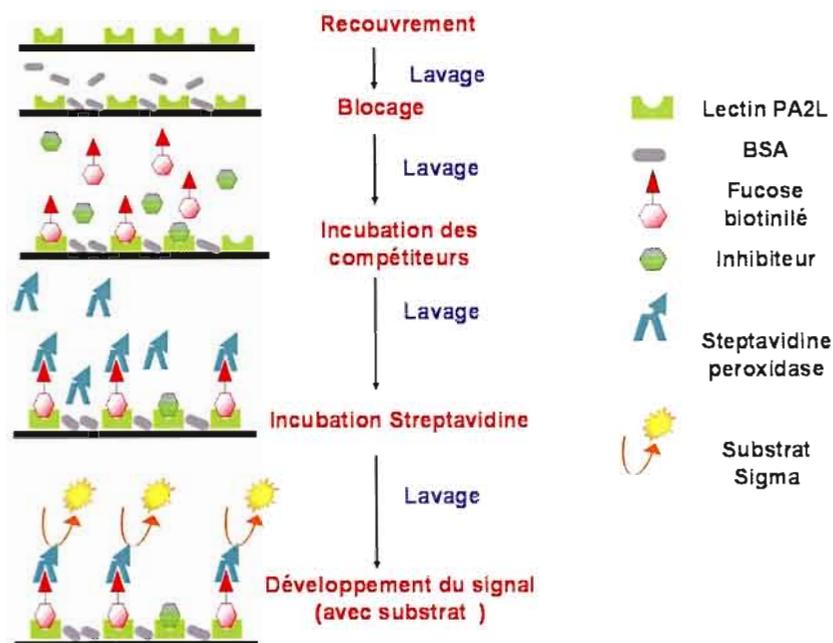


Figure 1.11: Représentation schématique du principe du test ELLA de type 1

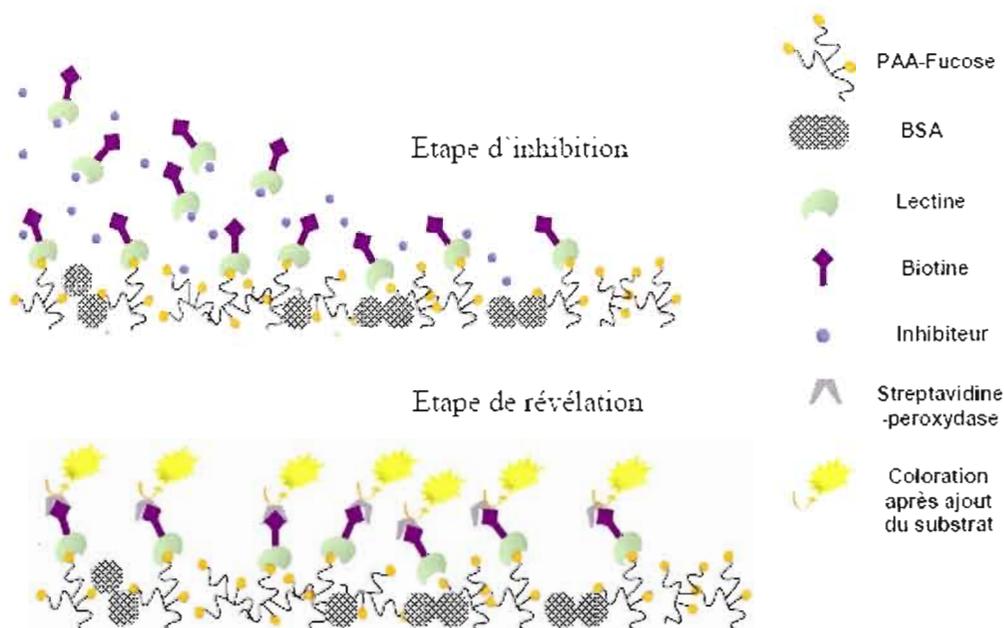


Figure 1.12: Représentation schématique du principe du test ELLA de type 2

1.7.2 La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC)

La microcalorimétrie de titration isotherme est une technique thermodynamique qui permet l'étude des interactions entre deux espèces. Lorsque ces deux espèces interagissent, de la chaleur est soit générée ou absorbée. En mesurant ces chaleurs d'interactions à température constante, la détermination directe de la stoechiométrie (n), de la constante d'affinité (K_a) et des variations d'enthalpie (ΔH°) et d'entropie (ΔS°) peuvent être déterminées.

L'interaction non covalente entre une macromolécule M et un ligand L peut s'écrire selon l'équation suivante:



La constante d'affinité, c'est-à-dire la tendance que la réaction s'effectue dans le sens de la formation du complexe ML, s'exprime comme étant le rapport des concentrations de la forme complexée sur les formes libres des molécules:

$$K_a = \frac{[ML]}{[M] + [L]} = \frac{1}{K_d} \quad \text{où } K_d = \text{constante de dissociation}$$

D'un point de vue thermodynamique, la constante d'affinité K_a est fonction de l'énergie libre (énergie libre de Gibbs) de l'interaction et peut aussi s'exprimer de la façon suivante:

$$K_a = e^{-\Delta G/RT} \quad \text{ou } T \text{ est la température et } R = 8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

Plus cette constante est élevée, plus l'affinité du ligand pour la protéine est forte. La réaction est spontanée lorsque ΔG° est négatif. Cette énergie est en fait la contribution de deux termes thermodynamiques, l'enthalpie (ΔH°) et l'entropie (ΔS°):

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Les contributions enthalpiques dans une interaction ligand-protéine sont principalement dues à la formation de liaisons hydrogène et aux interactions de Van der Waals. Une enthalpie d'interaction favorable nécessite un placement correct des groupes donneurs et accepteurs d'hydrogène dans le site de liaison. Pour la protéine comme pour le ligand, ce sont des groupements polaires qui interviennent dans ce type d'interaction et leur enthalpie de désolvatation est défavorable.

La contribution entropique peut provenir de deux phénomènes. Le premier est dû à un réaménagement du solvant, l'eau, s'opérant autour et surtout dans le site de liaison bien solvaté de la protéine lors de la reconnaissance. Bien souvent cette entropie de solvation est favorable puisque les molécules d'eau présentes dans les premières sphères de solvation de la protéine et/ou du ligand sont en quelque sorte, chassées et relarguées (augmentation du désordre) dans la solution par le rapprochement des surfaces hydrophobes. Le deuxième phénomène est dû à une diminution des degrés de liberté du ligand ou de la protéine lors de l'interaction. Cette contribution entropique est souvent défavorable. En effet, un ligand en solution peut par exemple adopter plusieurs conformations dues aux rotations autour des angles de torsion. L'interaction entre la protéine et le ligand contraint celui-ci dans une seule conformation engendrant ainsi une perte en entropie.

Finalement, des systèmes peuvent être caractérisés par des constantes d'affinité de même valeur et par conséquent par la même différence d'énergie libre (ΔG°) mais avoir des contributions enthalpiques et entropiques fort différentes.

1.7.3 La microcalorimétrie de titration isotherme (ITC) d'un point de vue technique

La microcalorimétrie de titration isotherme est la seule méthode permettant de calculer tous les paramètres caractérisant l'interaction récepteur-ligand en une seule expérience.

Le principe est le suivant: la protéine située dans la cellule de mesure d'un calorimètre isotherme est progressivement saturée, à température constante, par l'injection d'aliqouts d'un ligand à l'aide d'une seringue; à chaque ajout de ligand correspond un échange thermique caractérisant l'interaction protéine-ligand, signal proportionnel à la quantité de complexe formé. Les quantités de chaleur mesurées permettent d'obtenir l'isotherme de liaison et les paramètres de l'interaction qui sont déterminés au moyen de modèles proposés par un logiciel de traitement des résultats.

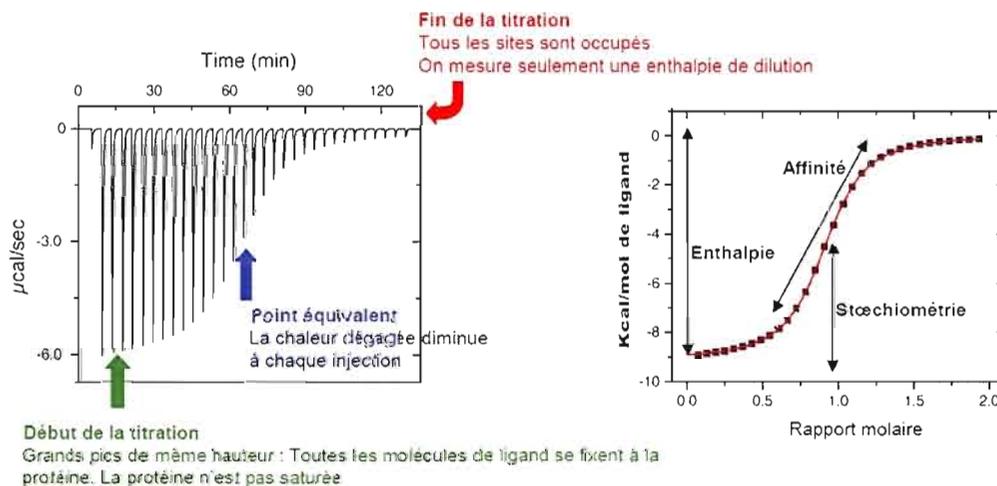


Figure 1.13: Données microcalorimétriques brutes (gauche), intégrées puis ajustées au modèle théorique approprié (droite) (VP-ITC isothermal titration calorimeter (Microcal))

Au début de la titration, des quantités importantes de chaleur sont dégagées, indiquant la formation du complexe protéine-ligand. En fin de réaction, tous les sites de

liaison sont déjà occupés et chaque nouvel ajout de ligand a comme seule conséquence sa dilution dans la cellule de mesure. La variation d'enthalpie ΔH° , la constante d'association K_a et la stoechiométrie n peuvent être déterminées avec un ajustement de la courbe expérimentale sur le modèle théorique approprié (**Figure 1.13**).⁴⁶

⁴⁶ Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. *Anal Biochem.* **1989**, *179*, 131.

CHAPITRE II

SYNTHÈSE DU DISACCHARIDE α -L-Fuc-(1→4)- β -D-GlcNAc ET FORMATION DE GLYCOCLUSTERS

2.1 Introduction

Tel que mentionné dans le précédent chapitre, la lectine PA-IIL possède une grande affinité et sélectivité vis-à-vis les oligosaccharides contenant une unité fucose liée en position 4 d'une unité GlcNAc. Ce chapitre exposera donc la synthèse de différents analogues d'un disaccharide du type α -L-Fuc-(1→4)- β -D-GlcNAc. Différentes réactions de cyclisation non concertée catalysée par le cuivre ('Click Chemistry') permettront la formation d'hétérocycles, de type 1,2,3-triazole-4 substitué, en position anomérique. Afin d'augmenter les interactions ligand-lectine généralement assez faibles (de l'ordre du millimolaire), différents systèmes glycoconjugués multivalents, communément nommés glycoclusters, ont été synthétisés en utilisant la 'Click Chemistry' et seront présentés à la toute fin de ce chapitre.

2.2 Synthèse du disaccharide α -L-Fuc-(1→4)- β -D-GlcNAc

L'étude structurale de glycolipides membranaires,⁴⁷ ainsi que de certaines glycoprotéines⁴⁸ solubles douées d'activité antigénique de groupe sanguin, a montré que le L-fucose était souvent lié au moyen d'une liaison glycosidique α , tel que dans les structures des

⁴⁷ Hakomori, S.; Jeanloz, R. W. in D. Aminoff (Ed.) *Blood and Tissue Antigens*, Academic Press, New York, 1970, 149.

⁴⁸ Kabat, E. A. in D. Aminoff (Ed.) *Blood and Tissue Antigens*, Academic Press, New York, 1970, 187.

trisaccharides Lewis a et Lewis x.⁴⁸ Étant donné l'intérêt biologique des di- ou oligosaccharides renfermant l' α -L-fucose à l'extrémité non réductrice, la synthèse chimique de ces composés a représenté un défi important. C'est ainsi que Flowers *et al.*⁴⁹ se sont attaqués à la synthèse de tels glycosides 1,2-*cis* en couplant un bromure de fucosyle perbenzylé, activé en présence de sels de mercure, avec une unité glucosamine possédant un hydroxyle libre (réaction de glycosylation de Koenigs-Knorr⁵⁰). Cependant, une très mauvaise stéréosélectivité a été obtenue mais pouvant être améliorée, comme l'avait démontré Ishikawa et Fletcher,⁵¹ en ajoutant dans le milieu, selon la nature de l'halogénure, des ions bromure ou chlorure. Cette méthode de glycosylation via une anomérisation *in situ* catalysée par les ions halogénures fut employée par plusieurs groupes afin de réaliser la synthèse de disaccharides α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc avec de bons rendements et une bonne stéréosélectivité.^{52,53,54,55}

L'instabilité et la sensibilité des halogénures comme donneur de glycosyle a initié l'utilisation des thioglycosides comme donneurs dans la synthèse d'oligosaccharides. Le succès de l'utilisation de thioglycoside provient de plusieurs facteurs: 1) la stabilité des groupements thio en position anomérique vis-à-vis une grande variété de conditions de réactions utilisées pour l'introduction de groupes protecteurs et fonctionnels, 2) leur facilité de préparation au laboratoire, 3) leur stabilité chimique, c'est-à-dire qu'ils peuvent être conservés à température pièce et purifiés par colonne chromatographique sans dégradation, 4) leur transformation simple et efficace en d'autres donneurs de glycosyles (**Figure 2.1**) et finalement 5) leur fonction thio peut être activée par une grande variété de promoteurs thiophiliques.⁵⁶

⁴⁹ Deiter-Juszynski, M.; Flowers, H. M. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 219.

⁵⁰ Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957.

⁵¹ Ishikawa, T.; Fletcher, Jr., H. G. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 563.

⁵² Jacquinet, J.-C.; Sinaÿ, P. *Carbohydr. Res.* **1975**, *42*, 251.

⁵³ Lemieux, R. U.; Bundle, D. R.; Baker, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4076.

⁵⁴ Surjit, R.; Matta, K. L. *Carbohydr. Res.* **1983**, *117*, 101.

⁵⁵ Peters, T.; Weimar, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 237.

⁵⁶ Pour une revue récente de l'utilisation des thioglycosides voir: Codée, J. D. C.; Litjens, E. J. N.; van den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, 769.

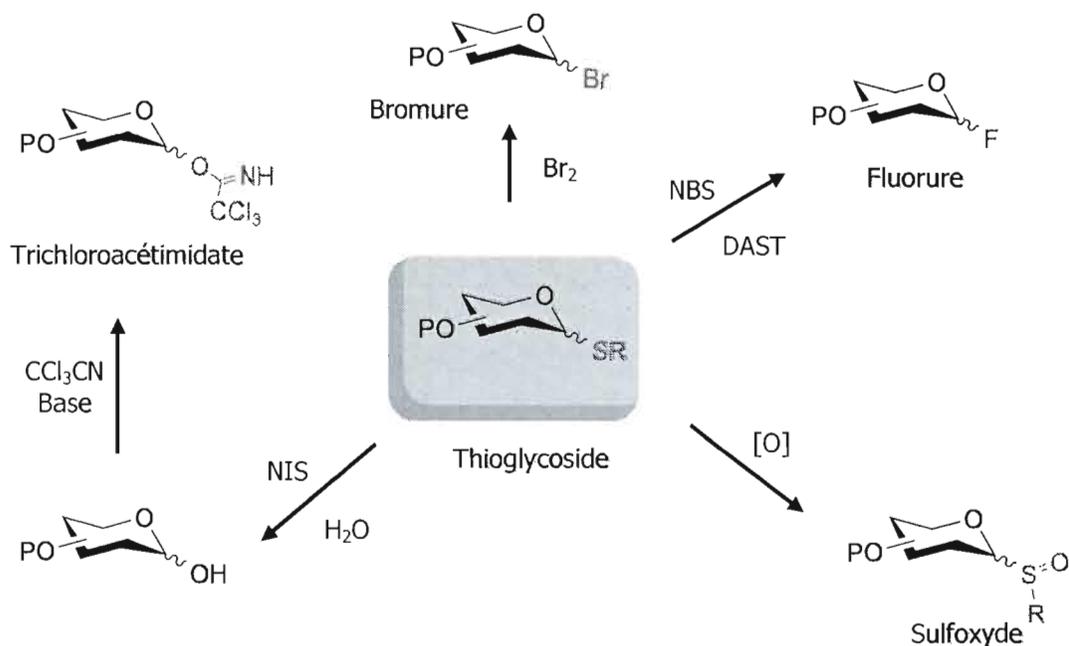


Figure 2.1: Transformations simples et efficaces des thioglycosides en différents donneurs de glycosyles

Il a été montré qu'en utilisant des donneurs de thiofucosides, possédant des groupes protecteurs appropriés, il était possible d'effectuer des α -fucosylations procédant avec une bonne stéréosélectivité.^{57,58,59} Compte tenu des multiples avantages liés à leur utilisation et de leur efficacité, nous avons décidé d'inclure l'emploi des thioglycosides comme donneurs dans notre stratégie de synthèse nous menant au disaccharide α -L-Fuc-(1→4)- β -D-GlcNAc.

2.2.1 Synthèse du donneur de glycosyle

⁵⁷ Kameyama, A.; Ishida, H.; Kiso, M.; Hasegawa, A. *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 549.

⁵⁸ Loon, H. *Carbohydr. Res.* **1995**, *139*, 105.

⁵⁹ Tsukida, T.; Yoshida, M.; Kurohawa, K.; Nakai, Y.; Achiha, T.; Kiyoi, T.; Kondo, H. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6876.

Le donneur de thioglycoside a été préparé en utilisant la procédure publiée par Komba *et al.*⁶⁰ La première étape consiste en une réaction de glycosylation entre l' α -L-fucose tétraacétylé⁶¹ et le thiophénol en présence de l'acide de Lewis étherate de trifluorure de bore ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) comme promoteur (voir **Schéma 2.1**). L'acide de Lewis catalyse la réaction facilitant le départ du groupement acétate en position anomérique, permettant ainsi la formation de l'ion oxonium et l'attaque subséquente du nucléophile. La **Figure 2.2** en présente le mécanisme réactionnel. Cette réaction s'est effectuée à température pièce, afin de favoriser la formation du produit cinétique, et a permis d'obtenir les thioglycosides désirés **1** et **2** sous forme d'un mélange d'anomères dans un ratio 4/1 en faveur de l'anomère β ($J_{1,2} = 9.9$ Hz). Les ratios anomériques ont été déterminés par RMN ^1H . La constante de couplage $J_{1,2}$ entre le proton anomérique (H-1) et le proton en position 2 (H-2) dépend de la valeur de l'angle dièdre formé entre les liaisons C-H. Selon la courbe de Karplus,⁶² un fucoside β (*trans* diéquatorial) devrait avoir une constante de couplage $J_{1,2}$ d'environ 10 Hz tandis que celle d'un fucoside α (axial-équatorial) devrait être d'environ 4 Hz. Ces valeurs peuvent légèrement varier selon la nature du substituant en position anomérique.

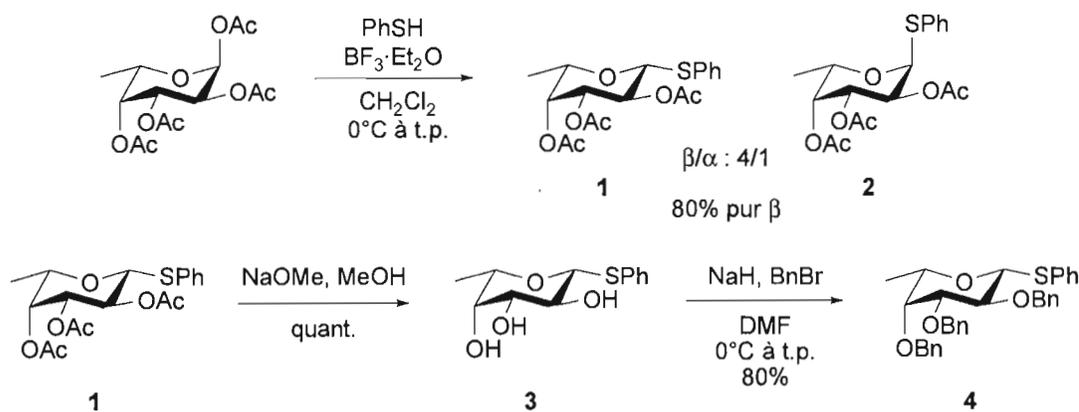


Schéma 2.1: Synthèse du donneur de thioglycoside **4**

⁶⁰ Komba, S.; Ishida, H.; Kiso, M.; Hasegawa, A. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1833.

⁶¹ Prihar, H. S.; Behrman, E. J. *Biochemistry.* **1973**, *12*, 997.

⁶² a) Karplus, M.; *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11. b) Karplus, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870.

Lors d'une réaction de glycosylation, la stéréosélectivité est contrôlée par plusieurs facteurs dont l'effet anomérique et l'effet anchimérique, c'est-à-dire l'effet d'un groupement dit participant en position 2. L'assistance anchimérique du groupement acétate en position 2, tel que démontré dans la **Figure 2.2**, a pour effet de bloquer la face α du sucre par la formation de l'ion acyl oxycarbénium. Ainsi, l'attaque du nucléophile par la face β est fortement favorisée. On obtient finalement de façon majoritaire le glycoside 1,2-*trans* dont la stéréosélectivité a été contrôlée par effet anchimérique.

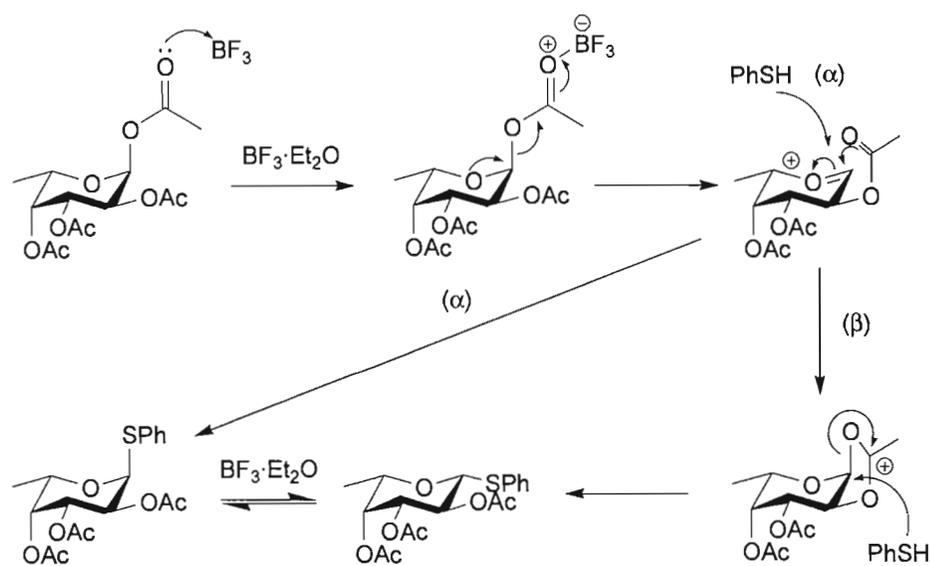


Figure 2.2: Mécanisme réactionnel d'une glycosylation catalysée par le $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dont la stéréosélectivité est contrôlée par effet anchimérique

Les dernières étapes consistent en une dé-*O*-acétylation du composé **1** par transestérification dans les conditions de Zemplén (NaOMe/MeOH) suivi d'une *O*-benzylation en utilisant le bromure de benzyle en présence d'hydrure de sodium dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF). Nous obtenons finalement notre donneur de thiofucoside **4** prêt à être utilisé dans la réaction de glycosylation nous menant au disaccharide $\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcNAc}$.

2.2.2 Synthèse de l'accepteur de glycosyle

La première étape de cette séquence de réactions (**Schéma 2.2**) consiste en une acétylation/halogénéation anomérique de la *N*-acétyl-D-glucosamine en présence de chlorure d'acétyle via la formation de HCl *in situ*.⁶³ Le composé **5** est obtenu dans un ratio 6/1 en faveur de l'anomère α .

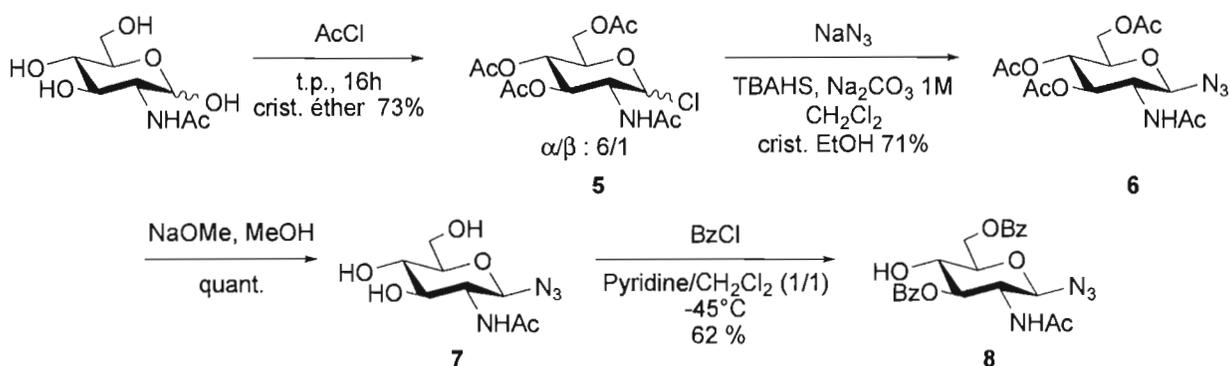


Schéma 2.2: Synthèse de l'accepteur **8**

La stéréosélectivité de cette réaction est contrôlée par l'effet anomérique. L'effet anomérique est la tendance qu'a un substituant électro-négatif en position anomérique à vouloir être en position axiale. Comme l'illustre la **Figure 2.3**, cet effet s'explique par la stabilisation encourue par la délocalisation du doublet d'électron libre de l'oxygène endocyclique vers l'orbitale σ^* antiliante du lien C-Cl en position anomérique, ce qui contribue à stabiliser la configuration α du glycoside. Un autre élément à considérer est l'interaction dipôle-dipôle des liaisons C-O et C-Cl. Dans le cas de l'anomère β , où le substituant est en position équatoriale, les dipôles sont parallèles et déstabilisent la configuration β . Chez l'anomère α , les dipôles ne sont pas orientés dans le même sens et cela contribue à la stabilisation de cet anomère.

⁶³ Horton, D. *Methods Carbohydr. Chem.* **1972**, *6*, 282.

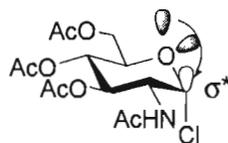


Figure 2.3: Effet anomérique.

Le dérivé β -azoture **6** a été obtenu via une catalyse par transfert de phase selon la méthode mise au point au sein de notre équipe⁶⁴ en utilisant le NaN_3 comme source d'azoture et le TBAHS (hydrogénosulfure de tétrabutylammonium) comme catalyseur de transfert de phase (IR ν : 2122 cm^{-1} N_3 , $^3J_{1,2} = 9.3\text{ Hz}$). Ce composé a été par la suite désacétylé dans les conditions de Zemplén pour nous donner le triol **7** qui a été soumis à une *bis*-benzoylation régiosélective effectuée à basse température en présence de chlorure de benzoyle dans la pyridine.⁶⁵ L'hydroxyle en position C-6 sera évidemment benzoylé en premier lieu puisqu'il occupe une position primaire. L'alignement des dipôles de la liaison anomère et de celle en C-3 a pour effet d'augmenter la nucléophilicité de cet hydroxyle et ainsi favoriser sa benzoylation au profit de l'hydroxyle en C-4.

2.2.3 Synthèse du disaccharide

Une réaction de glycosylation a été effectuée entre le donneur de thiofucoside **4** et l'accepteur *bis*-benzoylé **8** en présence de NIS et une quantité catalytique d'acide trifluorométhanesulfonique (TfOH)⁶⁶ dans le chloroforme à -15°C (**Schéma 2.3**). Cette

⁶⁴ a) Roy, R.; Tropper, F. D.; Andersson, F. O.; Braun, S. *Synthesis*. **1992**, 7, 618. b) Roy, R. In *Handbook of Phase Transfert Catalysis*. Sasson, Y.; Neumann, R., Eds.; Chapman & Hall: Hampshire, U. K., **1997**, 244. c) Roy, R.; Tropper, F. D.; Cao, S.; Kim, J. M. *Phase-transfert Catalysis. Mechanism and Syntheses*, ACS Symposium Series, M. E. Halpen, Ed.; ACS: Washington, **1997**, 659, 163.

⁶⁵ Meinjohanns, E.; Meldal, M.; Paulsen, H.; Bock, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*. **1995**, 4, 405.

⁶⁶ Veeneman, G. H.; van Leeuwen, S. H.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1331.

glycosylation stéréosélective a permis d'obtenir le disaccharide désiré **9** avec un excellent rendement de 94%. Cette glycosylation est stéréosélective puisque seulement l'anomère α a été obtenu ($^3J_{1',2'} = 3.3$ Hz).

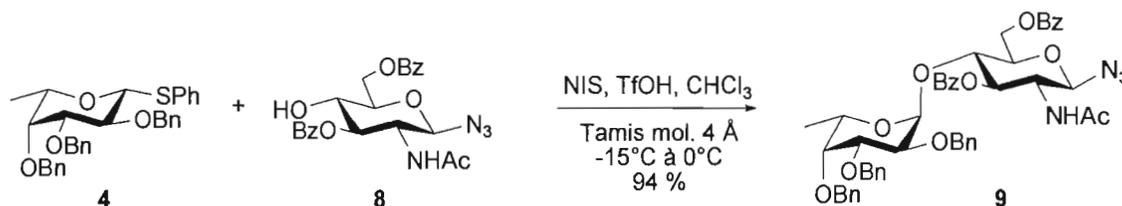


Schéma 2.3: Synthèse du disaccharide α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc **9**

Le haut degré de sélectivité de cette réaction peut s'expliquer en regardant de plus près son mécanisme réactionnel. La **Figure 2.4** présente donc le mécanisme de la réaction de glycosylation utilisant le NIS/TfOH⁶⁶ comme promoteur. Les intermédiaires β - et α -iodosulfonium-oxocarbone **A** et **C**, respectivement, subiront une glycosylation selon un mécanisme bimoléculaire de type S_N2, tandis que l'intermédiaire fucosyloxocarbone **B** subira, quant à lui, une glycosylation de type S_N1 conduisant à la formation d'un mélange d'anomères α/β dont l'anomère α sera majoritaire à cause de l'effet anomérique. La réactivité plus élevée du donneur de thioglycoside de configuration β explique la raison de son utilisation au profit du thioglycoside α lors de la synthèse du disaccharide. En effet, la paire d'ions rapprochés β (**A**) réagira plus rapidement puisqu'elle est thermodynamiquement moins stable que la paire d'ions rapprochés α (**C**, effet anomère stabilisant) favorisant ainsi la formation du produit de configuration α .^{67,68,69,70}

⁶⁷ Vermeer, H. J.; van Dijk, C. M.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 193.

⁶⁸ Lemieux, R. U.; Hendriks, K. B.; Stick, R. V.; James, K. J. *Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056.

⁶⁹ Rachaman, E. S.; Eby, R.; Schuerch, C. *Carbohydr. Res.* **1978**, *67*, 147.

⁷⁰ Flowers, H. M. *Methods Enzymol.* **1978**, *50*, 93.

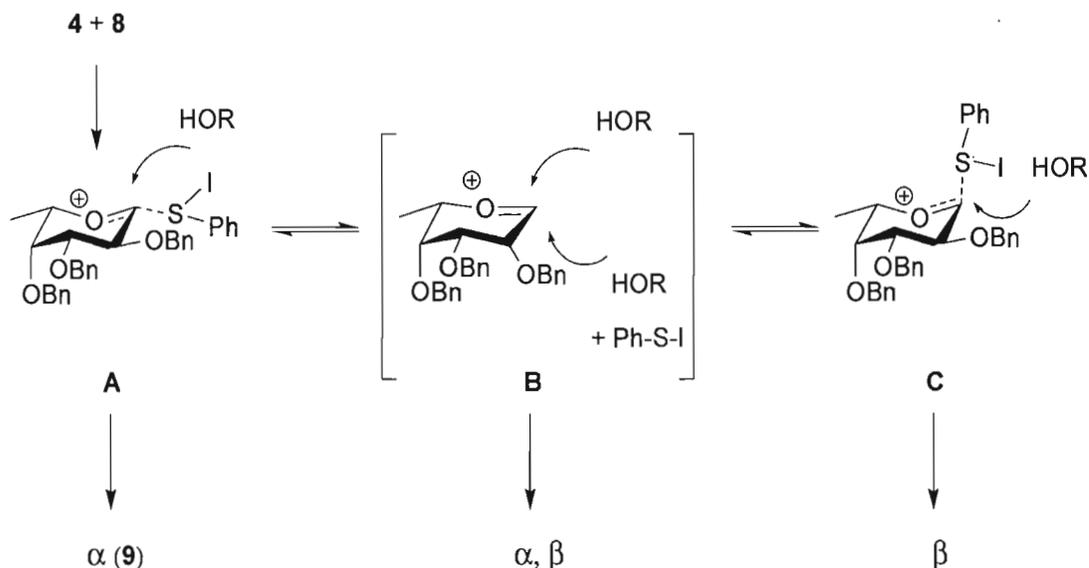


Figure 2.4: Mécanisme réactionnel bimoléculaire de type S_N2 de la synthèse du disaccharide α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc utilisant NIS/TfOH comme promoteur⁶⁷

De plus, il ne faut pas oublier que la stéréosélectivité d'une réaction de glycosylation est influencée par le groupement protecteur en position 2 du donneur de glycosyle. La stéréosélectivité en présence d'un groupe non participant, tel qu'un benzyle, sera contrôlée par l'effet anomérique et dirigée vers la formation d'un glycoside 1,2-*cis*.

2.3 Synthèse des disaccharides possédant un cycle triazole en position anomérique

La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à la synthèse d'hétérocycles de type 1,2,3-triazole en position anomérique du disaccharide α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc. Les hétérocycles sont une classe de composés cycliques dans lesquels un atome ou plus du cycle est remplacé par un hétéroatome. Approximativement deux tiers des publications en chimie concernent de près ou de loin les hétérocycles. De par leur structure particulière et leur

stabilité en milieu physiologique, les hétérocycles aromatiques représentent une classe de pharmacophores convoités en chimie médicinale. En effet, ces hétérocycles peuvent présenter des atomes donneurs et accepteurs de pont hydrogène et ils ont aussi la capacité d'effectuer des interactions de transfert de charge avec des résidus aromatiques présents dans les protéines. Il n'est donc pas surprenant de les rencontrer dans la structure de plusieurs médicaments. Un très grand nombre de substances naturelles sont ou contiennent des hétérocycles. Il n'y a qu'à penser aux bases de l'ADN (adénine, cytosine, guanine, thymine et uracile), aux sucres (carbohydrates), aux vitamines, aux alcaloïdes, etc. Il existe une multitude de façon de synthétiser des hétérocycles, pour en nommer que quelques unes: la chimie employant des métaux de transition, celle utilisant les composés carbonylés (Hantzsch, Knorr, Gewald, etc.), la réaction d'hétéro-Diels-Alder, les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire, etc. La réaction qui fera l'objet de la deuxième partie de ce chapitre est la réaction de 'Click Chemistry', puissante méthode de synthèse d'hétérocycles à cinq membres triazoles substitués en position 1 et 4.

2.3.1 Le triazole comme pharmacophore

Les propriétés physicochimiques favorables des cycles triazoles en font des pharmacophores de choix en chimie médicinale. L'unité 1,2,3-triazole présente une grande stabilité chimique. En effet, il est presque impossible à oxyder ou à réduire même à haute température.⁷¹ De plus, il n'est pas susceptible d'être clivé par hydrolyse, problème communément rencontré avec divers *O*-glycosides en milieu physiologique.^{72,73} Les triazoles possèdent un large moment dipolaire d'environ 5 Debye⁷⁴ et les atomes d'azote de leur structure peuvent agir comme accepteur de pont hydrogène. Les triazoles sont donc plus que seulement des composés biocompatibles, ils peuvent se lier de façon efficace aux cibles biologiques à travers de ponts hydrogène, d'interactions dipôle-dipôle ou ion-dipôle et par

⁷¹ Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today*. **2003**, *8*, 1128.

⁷² Driguez, H. *Top. Curr. Chem.* **1997**, *187*, 85.

⁷³ Driguez, H. *ChemBioChem*. **2001**, *2*, 311.

⁷⁴ Purcell, W. P.; Singer, J. A. *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 4316.

des complexes de transfert de charge (π -stacking'). Il n'est donc pas surprenant que les 1,2,3-triazoles soient fort attrayants en chimie thérapeutique. Ils ont déjà fait leurs preuves en ayant notamment démontré une activité anti-VIH,^{75,76} antimicrobienne contre les bactéries Gram positives⁷⁷ ainsi qu'une activité agoniste sélective au niveau des récepteurs β_3 adrénergiques.⁷⁸

2.3.2 Méthodes de synthèse des triazoles

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen⁷⁹ entre un azoture et un alcyne est sans aucun doute la meilleure méthode de synthèse des 1,2,3-triazoles. Cependant, à cause de son énergie d'activation élevée (24-26 kcal/mol), cette réaction de cycloaddition [3+2] est souvent très lente même à des températures élevées (80-120°C/heures-jours) et conduit à un mélange des régioisomères 1,4 et 1,5 (**Figure 2.5**). Bien qu'il existe plusieurs méthodes pouvant influencer la régiochimie de la cycloaddition en utilisant les propriétés électroniques du substrat, elles sont bien souvent ni fiables ni générales car elles nécessitent habituellement un substituant fortement électroattracteur sur l'alcyne.^{80,81} En 2002, les groupes de Sharpless⁸² et de Meldal⁸³ ont, de façon indépendante, mis au point une méthode de synthèse

⁷⁵ Alvarez, R.; Velazquez, S.; San-Felix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Perno, C.-F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4185.

⁷⁶ Velazquez, S.; Alvarez, R.; Perez, C.; Gago, F. De Clercq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 481.

⁷⁷ Genin, M. J.; Allwine, D. A.; Anderson, D. J.; Barbachyn, M. R.; Emmert, D. E.; Garmon, S. A.; Graber, D. R.; Grega, K. C.; Hester, J. B.; Hutchinson, D. K.; Morris, J.; Reischer, R. J.; Ford, C. W.; Zurenko, G. E.; Hamel, J. C.; Schaadt, R. D.; Stapert, D.; Yagi, B. H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 953.

⁷⁸ Brockunier, L. L.; Parmee, E. R.; Ok, H. O.; Candelore, M. R.; Cascieri, M. A.; Colwell, L. F.; Deng, L.; Feeney, W. P.; Forrest, M. J.; Hom, G. J.; MacIntyre, D. E.; Tota, L.; Wyvratt, M. J.; Fisher, M. H.; Weber, A. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2111.

⁷⁹ Huisgen, R. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Padwa, A., Ed.; Wiley: New York, **1984**.

⁸⁰ Padwa, A. In *Comprehensive Organic Synthesis*, Trost, B. M., Ed.; Pergamon: Oxford, **1991**, Vol. 4, 1069.

⁸¹ Fan, W.-Q.; Katritzky, A. R. In *Comprehensive Heterocycle Chemistry II*, Katritzky, A. R., Rees, C. W., Scriven, E. F. V., Ed.; Pergamon: Oxford, **1996**, Vol. 4, 101.

⁸² Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V. Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.

⁸³ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.

régiospécifique des 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués utilisant le cuivre(I) comme catalyseur afin de promouvoir la réaction de l'azoture avec l'alcyne terminal. Ce processus de cyclisation catalysé par le cuivre est en fait 10^7 fois plus rapide que la méthode classique de cyclisation thermique.⁸⁴ Cette réaction, baptisée 'Click Chemistry', peut être réalisée dans des systèmes aqueux (par exemple un mélange H₂O/BuOH) en utilisant comme catalyseur des sels de cuivre(II) réduits *in situ* en Cu(I) par un agent réducteur tel que l'ascorbate de sodium. Les sels de cuivre(I), comme par exemple l'iodure de cuivre, peuvent aussi être directement utilisés en l'absence d'agent réducteur.^{82,83} Cependant, cette méthode nécessite l'emploi d'au moins 1 équivalent d'une base azotée (par exemple, 2,6-lutidine, triéthylamine, pyridine ou diisopropyléthylamine) et la méthode est sensible à l'oxygène qui peut oxyder le Cu(I) en Cu(II), qui devient alors inactif dans le cycle catalytique.

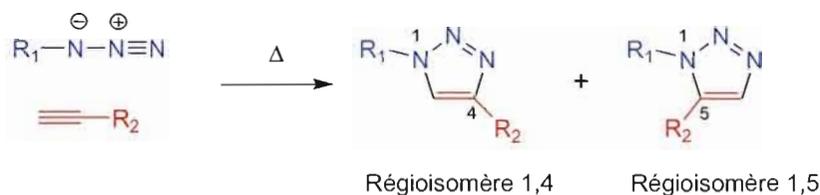


Figure 2.5: Formation des 1,2,3-triazoles dans les conditions thermiques via une cycloaddition 1,3-dipolaire

Le grand succès de la 'Click Chemistry' a souligné le besoin d'obtenir de façon sélective l'autre régioisomère, soit le 1,5-triazole. Ainsi, Sharpless *et al.* sont parvenus à obtenir sélectivement ce régioisomère par l'addition d'un Grignard acétylénique sur un dérivé azoture.⁸⁵ Un aspect intéressant de cette méthodologie est la possibilité d'isoler l'intermédiaire réactionnel et de le piéger avec un électrophile pour la formation d'un triazole 1,4,5-trisubstitué. Un peu plus d'un an après, ce même groupe a publié une méthode plus utile d'obtenir le régioisomère 1,5 en utilisant un catalyseur au ruthénium(II) afin de

⁸⁴ Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210.

⁸⁵ Krasinski, A.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1237.

promouvoir la cycloaddition entre l'alcyne et l'azoture.⁸⁶ Ce système au ruthénium permet, contrairement à celui utilisant le Cu(I), l'utilisation d'alcyne interne. Ainsi, lorsqu'un mélange de diphenyl acétylène et d'azoture de benzyle est porté à reflux dans le benzène en présence de 1% mol de $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ pendant 2 h, l'azoture est complètement transformé en triazole **A** (Figure 2.6). La réaction non catalysée est très lente et seulement une faible trace du triazole est détectée même après 24 h à reflux.

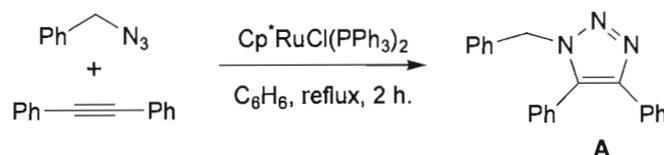


Figure 2.6: Synthèse de triazoles catalysée par le ruthénium à partir d'alcynes internes⁸⁶

La 'Click Chemistry' est une puissante méthode de synthèse et elle compte diverses applications dans les domaines de la chimie en phase solide,^{83,87} de surface,⁸⁸ des polymères,^{89,90} des peptides,⁹¹ des sucres pour la préparations de glycomimétiques,^{92,93,94,95} etc.

2.3.3 Synthèse des dérivés triazoles

⁸⁶ Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998.

⁸⁷ Löber, S.; Rodriguez-Loaiza, P.; Gmeiner, P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1753.

⁸⁸ Devaraj, N. K.; Dinolfo, P. H.; Chidsey, C. E. D.; Collman, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1794.

⁸⁹ Helms, B.; Mynar, J. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15020.

⁹⁰ Sumerlin, B. S.; Tsarevsky, N. V.; Louche, G.; Lee, R. Y.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2005**, *38*, 7540.

⁹¹ Walsh, C. T.; Lin, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998.

⁹² Périon, R.; Ferrières, V.; Garcia-Moreno, M. I.; Ortiz Mellet, C.; Duval, R.; Garcia Fernandez, J. M.; Plusquellec, D. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9118.

⁹³ Bryan, M. C.; Lee, L. V.; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *14*, 3185.

⁹⁴ Lin, H.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998.

⁹⁵ Casas-Solvas, J. M.; Vargas-Berenguel, A.; Capitan-Vallvey, L. F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3687.

Le disaccharide **9**, possédant un azoture en position anomérique, a été soumis à plusieurs réactions de cycloaddition en présence de différents alcynes (voir **Schéma 2.5**) menant à la synthèse d'hétérocycles triazoles. Cette réaction efficace et régiosélective, communément appelée 'Click Chemistry', possède de larges applications au niveau de la préparation de familles d'analogues.

Les conditions classiques de synthèse des 1,2,3-triazoles selon la méthode de Huisgen⁷⁹ ont tout d'abord été appliquées en chauffant à reflux un mélange du disaccharide **9** et de l'alcyne **10** dans le toluène. Très rapidement, il a été possible de voir la décomposition du disaccharide. Par contre, lorsque nous avons effectué cette réaction à 75°C, il a été possible d'obtenir les régioisomères-1,5 **13** et -1,4 **15**, séparables par colonne chromatographique sur gel de silice, dans des rendements de 38% et 45% respectivement (**Schéma 2.4**).

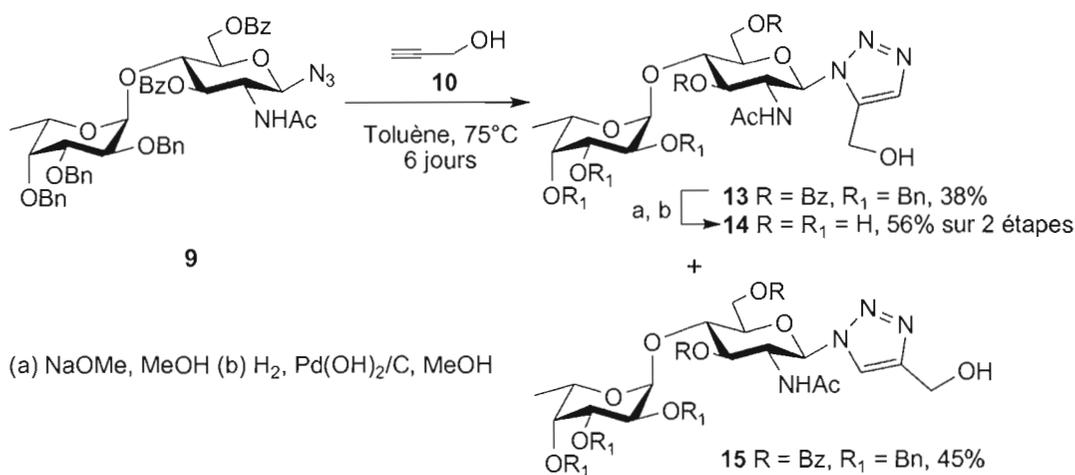


Schéma 2.4: Synthèse des régioisomères 1,4 et 1,5 via la réaction de Huisgen

La synthèse régiosélective des 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués a été réalisée en utilisant la réaction de cyclisation non concertée catalysée par le cuivre. Le mécanisme du cycle catalytique de la réaction de 'Click Chemistry' proposé par Sharpless *et al.*⁸⁴ est présenté à la **Figure 2.7**. La régiospécificité de cette réaction peut être expliquée par la complexation du cuivre sur l'alcyne et l'azoture (étape A et B) avant la formation de la

liaison C-N (étape C).⁹⁶ De plus, la complexation du cuivre s'effectue sur le côté riche de l'azoture (électrophile mou-nucléophile mou), dirigeant ainsi la formation du cycle triazole vers le régioisomère-1,4.

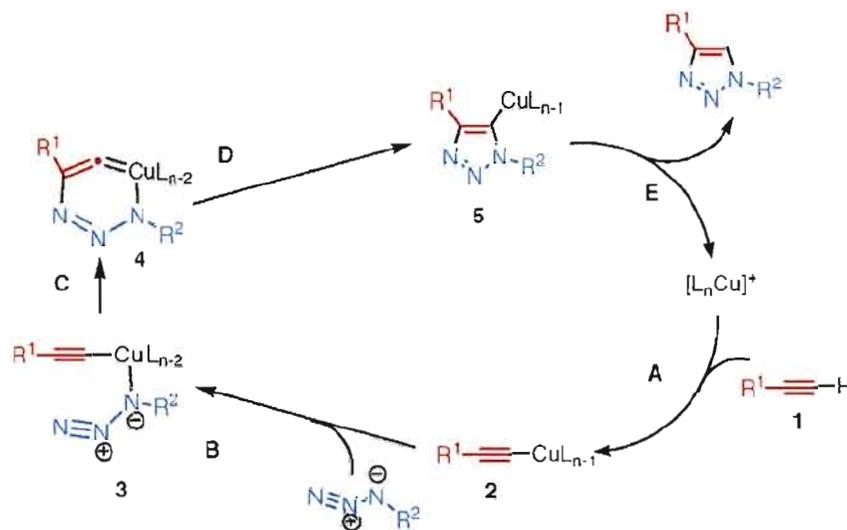
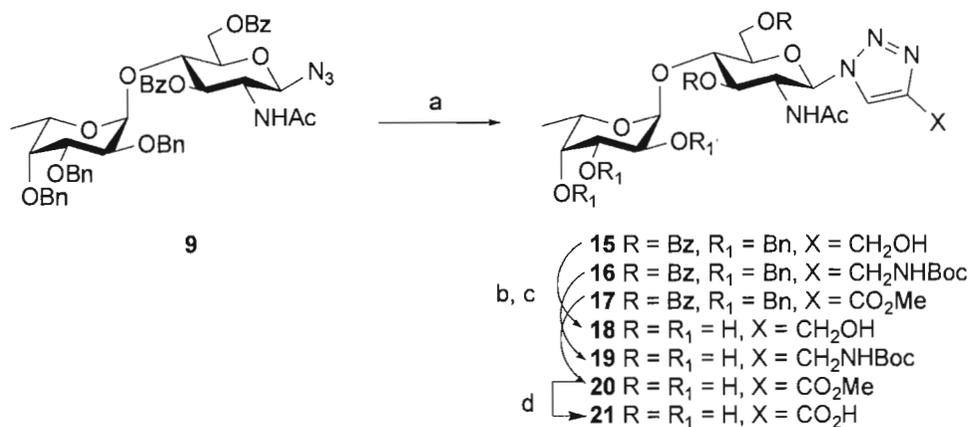


Figure 2.7: Mécanisme du cycle catalytique⁸⁴

La 'Click Chemistry' a été réalisée en utilisant comme catalyseur le cuivre(I) généré *in situ* dans le milieu réactionnel (Schéma 2.5). Ainsi, l'addition de sulfate de cuivre(II) et d'acide ascorbique à un mélange du disaccharide **9** et de l'alcyne **10**, **11**⁹⁷ ou **12** dans un mélange *tert*-butanol/eau (1:1 v/v) a permis d'obtenir les 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués **15**, **16** et **17** respectivement. La cyclisation entre l'azoture **9** et l'alcool propargylique **10** ou le *N*-Boc propargylamine **11**⁹⁷ a été réalisée à température pièce et a été complétée après 16-18h donnant les disaccharides **15** et **16** avec de bons rendements (80% et 89% respectivement). Cependant, lorsque l'azoture **9** a été couplé avec le propiolate de méthyl **12** dans les mêmes conditions, seulement 48% du triazole désiré a été obtenu après 24h de réaction. Le problème peut provenir de la faible solubilité des produits de départ. Par contre, en chauffant le mélange réactionnel à 55°C pendant 4 h, le triazole désiré **17** a été obtenu avec un rendement de 77%.

⁹⁶ Fokin, V. V.; Wu, P. *AldrichimicaActa* **2007**, *40*, 7.

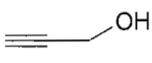
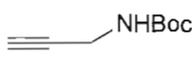
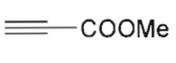
⁹⁷ Moloney, G. P.; Martin, G. R.; Mathews, N.; Hobbs, H.; Dodsworth, S; Sang, P. Y.; Knight, C.; Maxwell, M.; Glen, R.C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1999**, 2713.



(a) pour les conditions de réactions voir **Tableau 2.1** (b) NaOMe, MeOH (c) H₂, Pd(OH)₂/C, MeOH (d) LiOH, H₂O, MeOH, 68%

Schéma 2.5: Synthèse des dérivés 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitués via la 'Click Chemistry'

Tableau 2.1: Conditions de réaction et rendement

Azoture	Alcynes	Conditions de réaction	Produits ^a	Rend. (%)	Produits déprotégés ^a	Rend. (%) ^b
9	 10	CuSO ₄ , ac. asc. 'BuOH/H ₂ O (1:1) t. p., 18 h	15	80	18	84
9	 11 ⁹⁷	CuSO ₄ , ac. asc. 'BuOH/H ₂ O (1:1) t. p., 16 h	16	89	19	87
9	 12	CuSO ₄ , ac. asc. 'BuOH/H ₂ O (1:1) 55°C, 4 h	17	77	20	86

^avoir **Schéma 2.5** pour les structures

^brendement pour 2 étapes: débenzylation et débenzylation

Les produits finaux ont été obtenus après deux étapes de déprotection. La première consiste en une débenzoylation dans les conditions de Zemplén suivie d'une purification et la deuxième en une étape de débenzoylation par hydrogénation catalytique utilisant le catalyseur au palladium de Pearlman. Les rendements sont rapportés dans le **Tableau 2.1** et sont pour les deux étapes. Le dérivé méthyl ester **20** a été soumis à une saponification en utilisant l'hydroxyde de lithium pour donner, après traitement, le dérivé acide **21** dans un rendement de 68%.

2.4 Synthèse de glycoclusters

Une forte reconnaissance protéine-sucre est nécessaire pour l'application pratique d'une stratégie de compétition. Or, l'affinité relativement faible (de l'ordre du millimolaire) souvent rencontrée dans les interactions ligand-lectines représente la contrainte majeure accompagnant la conception de molécules actives basées sur ce type de reconnaissance. Des études ont démontré que la multivalence était une approche efficace pour augmenter de manière significative la force d'interaction des ligands synthétiques.^{98,99}

Différents systèmes multivalents ont été jusqu'à ce jour développés. Que ce soit les modèles possédant un haut niveau de valence comme les systèmes polymériques^{100,101} et dendrimériques^{102,103} ou bien ceux à plus faible valence tels que les glycoclusters,^{104,105} ils ont tous montrés une grande efficacité à l'égard de différentes protéines. En effet, notre groupe a récemment montré qu'un glycocluster tétravalent de D-mannose était environ 100 fois plus

⁹⁸ Roy, R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 692.

⁹⁹ Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.

¹⁰⁰ Mann, D. A.; Kanai, M.; Maly, D. J.; Kiessling, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10575.

¹⁰¹ Reuter, J. D.; Myc, A.; Hayes, M. M.; Gan, Z.; Roy, R.; Qin, D.; Yin, R.; Piehler, L. T.; Esfand, R.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R., Jr. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271.

¹⁰² Zanini, D.; Roy, R. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 187.

¹⁰³ Zanini, D.; Roy, R. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3486.

¹⁰⁴ Dam, T. K.; Roy, R.; Das, S. K.; Oscarson, S.; Brewer, C. F. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14223.

¹⁰⁵ Touaibia, M.; Shiao, T. C.; Papadopoulos, A.; Vaucher, J.; Wang, Q.; Benhamioud, K.; Roy, R. *Chem. Comm.* **2007**, 380.

efficace que son monomère comme inhibiteur de l'agglutination de *E. coli* avec une levure de boulanger (concentration d'inhibition de 370 mM et 3.96 mM pour le D-mannose et le glycocluster tétravalent, respectivement).¹⁰⁵

Selon la longueur du bras espaceur du ligand multivalent, deux types de phénomènes peuvent se produire. Le ligand, par un phénomène intramoléculaire, peut se lier à plusieurs sites de la même protéine (chélation), et on observe un effet coopératif dû à la multivalence. Selon un phénomène intermoléculaire, le ligand peut se lier à plusieurs protéines et on constate la formation d'un agrégat qui précipite en solution. La **Figure 2.8** illustre ces deux phénomènes pour un système divalent mais sont extrapolables à un système de N résidus. Le phénomène d'agrégation et de précipitation est fréquemment rencontré puisque les lectines sont très souvent multimériques et bon nombre d'entre elles présentent des sites de reconnaissance relativement éloignés dans l'espace (environ 40 Å).

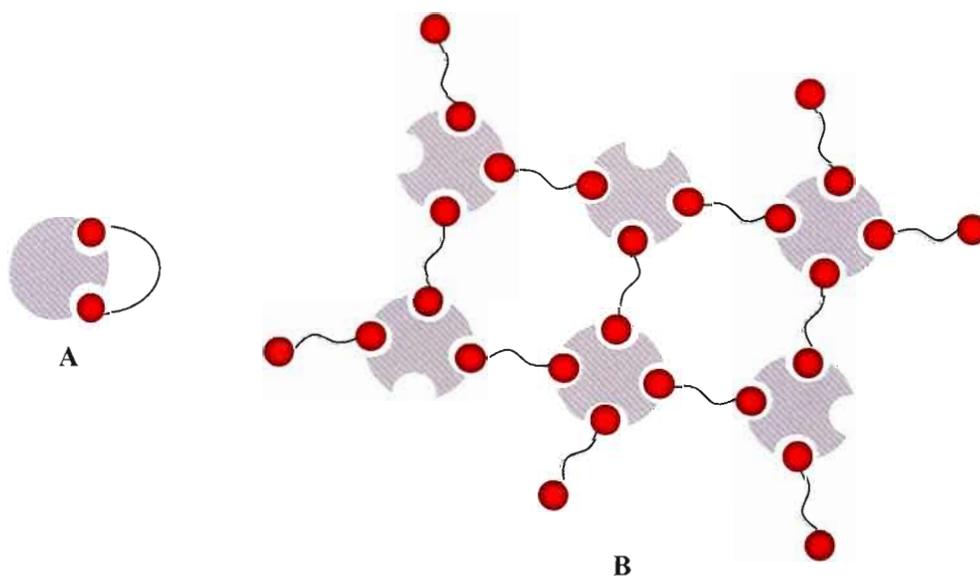
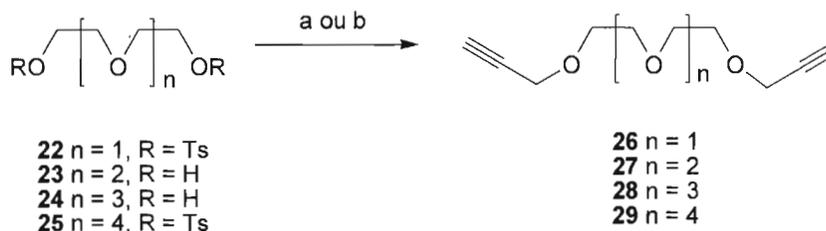


Figure 2.8: Principaux systèmes d'interactions possibles entre ligands divalents et protéines
A) phénomène intramoléculaire, la chélation **B)** phénomène intermoléculaire, l'agrégation et la précipitation

Ainsi, afin de voir l'influence de la multivalence sur l'affinité des dérivés disaccharidiques à l'égard de la lectine PA-IIL et d'évaluer la distance idéale entre les unités sucres pour une bonne affinité, des glycoclusters di- et trivalent, flexibles et semi-rigides, ont été synthétisés. Ces systèmes multivalents seront réalisés en utilisant des bras espaceurs propargylés couplés au disaccharide **9**, possédant un azoture en position anomérique, à l'aide de la 'Click Chemistry'.

2.4.1 Synthèse des bras espaceurs divalents flexibles de type PEG

La première étape a été de réaliser la synthèse des quatre bras espaceurs flexibles *bis*-propargylés de type poly (éthylène glycol). Les composés **26** et **29**¹⁰⁶ ont été synthétisés à partir des *bis*-tosylates **22** et **25** et les composés **27**¹⁰⁷ et **28** à partir des tri- et tétraéthylène glycol **23** et **24**, respectivement (Schéma 2.6).



a) et b) voir **Tableau 2.2** pour les conditions de réaction

Schéma 2.6: Synthèse des bras espaceurs de type PEG

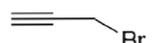
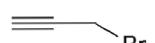
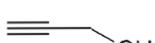
Aux composés **22** et **25** a été ajouté un mélange d'alcool propargylique et de NaH dans le THF et après une nuit à 55°C les bras espaceurs divalents **26** et **29** ont été obtenus avec des rendements de 47% (non optimisé) et 90% respectivement. À un mélange du

¹⁰⁶ McPhee, M. M.; Kerwin, S. M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9385.

¹⁰⁷ Yao, Z. J.; Wu, H. P.; Wu, Y. L. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2484.

composé **23** ou **24** et de NaH dans le THF ont été ajoutés le bromure de propargyle et une quantité catalytique de TBAI. Après environ 2 jours d'agitation à température pièce, les composés **27** et **28** ont été obtenus avec des rendements de 69% et 87% respectivement (**Tableau 2.2**).

Tableau 2.2: Conditions de réaction pour la synthèse des bras espaceurs de type PEG

PEG	Conditions de réactions	Temps	Produit	Rend. (%)
22	 THF sec, NaH, 55°C	1 nuit	26	47
23	 THF sec, NaH, TBAI	2 jours	27	69
24	 THF sec, NaH, TBAI	2.5 jours	28	87
25	 THF sec, NaH, 55°C	1 nuit	29	90

2.4.2 Synthèse des glycoclusters di- et trivalents par 'Click Chemistry'

Tout d'abord, le disaccharide **9** a été couplé au bras espaceur semi-rigide **30**¹⁰⁸ par 'Click Chemistry' en suivant les conditions de réaction décrites précédemment. Le dimère **36** a été obtenu avec un faible rendement de 48% en effectuant la réaction à température de la pièce mais lorsqu'elle a été chauffée à 53°C pendant 40 min, le rendement a atteint les 83%. Le **Tableau 2.3** présente les conditions de réaction et les rendements obtenus pour la synthèse de chacun des glycoclusters. Afin d'éviter le chauffage, d'autres conditions de

¹⁰⁸ Rijikers, D. T. S.; van Esse, G. W.; Merckx, R.; Brouwer, A. J.; Jacobs, H. J. F.; Pieters, R. J.; Liskamp, R. M. J. *Chem. Commun.*, **2005**, 36, 4581.

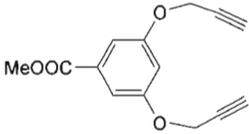
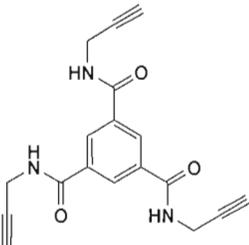
réaction ont été envisagées. Alors, l'iodure de cuivre comme source de cuivre(I), le tétrahydrofurane, un solvant moins polaire, et une base ont été utilisés pour la synthèse des prochains glycoclusters.⁸³

Ainsi, un léger excès du disaccharide **9** et les bras espaceurs propargylés **26**, **27**, **28** ou **29** ont été dissous dans le THF et traités à température de la pièce avec l'iodure de cuivre (0.6 éq.) et la DIPEA (2.0 éq.). Les dimères **32-35** ont donc été obtenus en formant, de façon régiosélective, le cycle 1,2,3-triazole substitué en position 1 et 4 dans d'excellents rendements (> 81%). De la même façon, le bras espaceur trivalent **31**¹⁰⁹ a été couplé au disaccharide **9** pour donner le trimère **37** dans un rendement de 85%.

Comme pour les monomères, des étapes de déprotection ont été réalisées. Soit une première de débenzoylation dans les conditions classiques de Zemplén et une deuxième étape de débenzylation par hydrogénation catalytique utilisant le catalyseur au palladium de Pearlman. Les rendements sont rapportés dans le **Tableau 2.3** et sont pour les deux étapes. Les structures des glycoclusters finaux sont présentées à la **Figure 2.9**.

¹⁰⁹ Giguère, D.; Patnam, R.; Bellefleur, M.-A.; St-Pierre, S.; Sato, S.; Roy, R. *Chem. Comm.* **2006**, 2379.

Tableau 2.3: Conditions de réaction de la synthèse des glycoclusters di- et trivalent

Azoture	Alcynes	Conditions de réaction	Produits ^a	Rend. (%)	Produits déprotégés ^a	Rend. (%) ^b
9	 26	CuI, DIPEA, THF, t. p. 1 nuit	32	quant.	38	95
9	 27	CuI, DIPEA, THF, t. p. 1 nuit	33	quant.	39	55
9	 28	CuI, DIPEA, THF, t. p. 1 nuit	34	81	40	79
9	 29	CuI, DIPEA, THF, t. p. 1 nuit	35	quant.	41	56
9	 30	CuSO ₄ , ac. asc. 'BuOH/H ₂ O (1:1) 53°C, 40 min	36	83	42	96
9	 31	CuI, DIPEA, THF, t. p. 1 nuit	37	85	43	65

^avoir **Figure 2.9** pour les structures^brendement pour 2 étapes: débenzylation et débenzylation

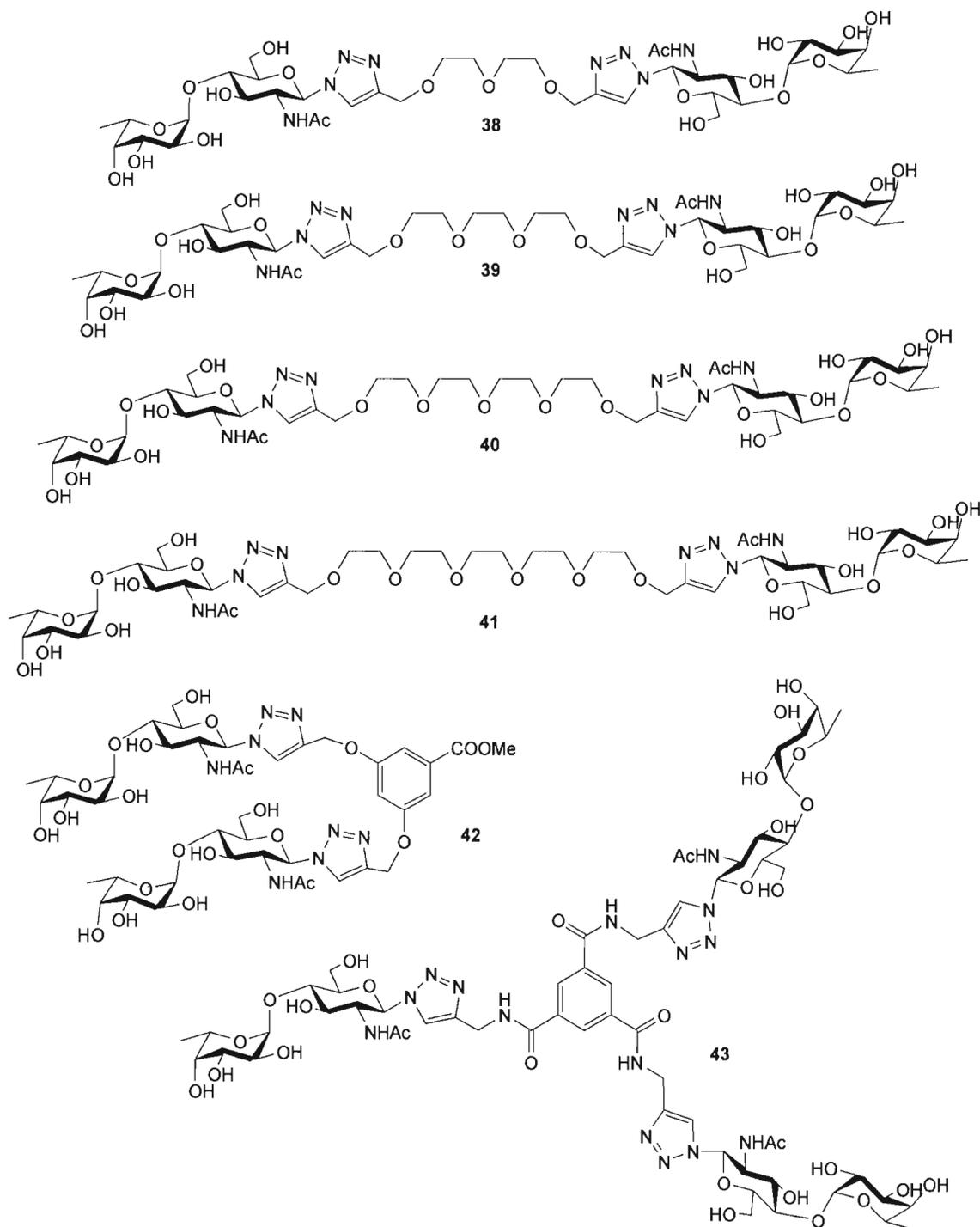


Figure 2.9: Structures moléculaires des glycoclusters

2.5 Conclusions

Tout d'abord, la synthèse du disaccharide α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc contenu dans le trisaccharide Le^a a été obtenue de façon stéréosélective avec un rendement de 94%. Par la suite, différents analogues de ce disaccharide ont été synthétisés en introduisant en position anomérique un hétérocycle aromatique de type 1,2,3-triazole substitué en position 1 et 4 en utilisant la réaction de cyclisation catalysée par le Cu(I), la 'Click Chemistry'. La synthèse du régioisomère-1,5 a été réalisée suite à une cyclisation thermique de Huisgen et a permis d'obtenir le 1,2,3-triazole substitué après séparation chromatographique. Des glycoclusters di- et trivalent, flexibles et semi-rigides, ont été synthétisés à l'aide de la 'Click Chemistry' afin de voir l'influence de la multivalence sur l'affinité des dérivés disaccharidiques à l'égard de la lectine PA-IIL et d'évaluer la distance idéale entre les unités sucres pour une bonne affinité. Finalement, les différents disaccharides et glycoclusters seront soumis à des tests d'inhibition compétitive ELLA afin d'évaluer leurs potentiels d'inhibition de l'adhésion de PA-IIL à l' α -L-fucose. Les résultats obtenus pour l'ensemble de ces dérivés seront présentés au chapitre suivant.

CHAPITRE III

ÉVALUATION DE L’AFFINITÉ DES DÉRIVÉS DISACCHARIDIQUES ET DES GLYCOCLUSTERS À L’ÉGARD DE LA LECTINE PA-IIL

3.1 Introduction

Une étape primordiale dans le processus de synthèse d’agents thérapeutiques est la validation de leurs activités vis-à-vis la cible, ici la PA-IIL. Ainsi, dans ce chapitre seront exposés et discutés des résultats des tests biologiques ELLA, des valeurs thermodynamiques obtenues par ITC pour les différents disaccharides α -L-Fuc-(1→4)- β -D-GlcNAc et glycoclusters ainsi que des structures cristallographiques obtenues pour deux disaccharides. Tous ces résultats ont été recueillis au CERMAV (Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales) à Grenoble en France par Charles Sabin, sous la direction du Pr. Anne Imberty. Les résultats concernant les disaccharides seront présentés en premier lieu et seront suivis de ceux relatifs aux glycoclusters.

3.2 Interaction des dérivés disaccharidiques avec la lectine PA-IIL

3.2.1 Tests ELLA

Les dérivés disaccharidiques ont été évalués pour leurs capacités à inhiber l’adhésion de la lectine PA-IIL, fixée au fond des puits d’une microplaque, à un polymère de L-fucose biotinylé. Ce type de test ELLA a été décrit au chapitre 1 à la section 1.7.1 (**Figure 1.11**). Ce

dernier a été utilisé par Imberty *et al.*¹¹⁰ pour l'évaluation des interactions entre les oligosaccharides présents dans le lait humain et la PA-IIL. Dans l'étude des disaccharides, un second test utilisant un polymère de L-fucose immobilisé au fond des puits a été réalisé afin de pouvoir mesurer l'inhibition de l'interaction avec la lectine PA-IIL biotinylée. Ce test a également été présenté au chapitre 1 dans la section 1.7.1 (**Figure 1.12**). Jusqu'à présent, il n'est pas clairement défini si la lectine agit comme une entité mobile dans la partie extracellulaire ou fixe à la surface de la membrane cellulaire de la bactérie. L'utilisation des deux méthodologies permet donc de simuler les deux situations.

Les différents dérivés du disaccharide α -L-Fuc-(1→4)- β -D-GlcNAc possèdent des potentiels d'inhibition similaires dans les tests ELLA (**Figure 3.1**). Quelques différences ont été observées entre les deux méthodes d'analyses dépendant si la lectine ou le ligand polymérique sont fixés au fond des puits. Dans l'ensemble, les valeurs d'IC₅₀ observés sont dans le même éventail que ceux obtenus avec le trisaccharide Le^a (60 μ M et 70 μ M avec les deux méthodes de tests ELLA). Afin de prouver que les résultats obtenus en ELLA ne sont pas dûs à des interactions non spécifiques avec la partie D-GlcNAc du disaccharide, le dérivé D-GlcNAc de la **Figure 3.2** a été testé en ELLA et ne présente aucune affinité avec la lectine PA-IIL. Les résultats suggèrent que la partie aglyconique du disaccharide ne doit pas interagir avec la surface de la protéine compte tenu des similitudes obtenus dans les tests ELLA. Les ligands disaccharidiques ont montré les valeurs d'affinités les plus élevées déterminées jusqu'à maintenant pour la lectine PA-IIL. Ainsi, ces résultats confirment l'hypothèse émise disant que la structure entière du trisaccharide Le^a n'est pas nécessaire pour une interaction optimale. Par conséquent, le disaccharide α -L-Fuc-(1→4)- β -D-GlcNAc est suffisamment efficace pour constituer un motif commun dans le développement de glycomimétiques.

¹¹⁰ Perret, S.; Sabin, C.; Dumon, C.; Pokorna, M.; Gautier, C.; Galanina, O.; Ilia, S.; Bovin, N.; Nicaise, M.; Desmadril, M.; Gilboa-Garber, N.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Imberty, A. *Biochem. J.* **2005**, *389*, 325.

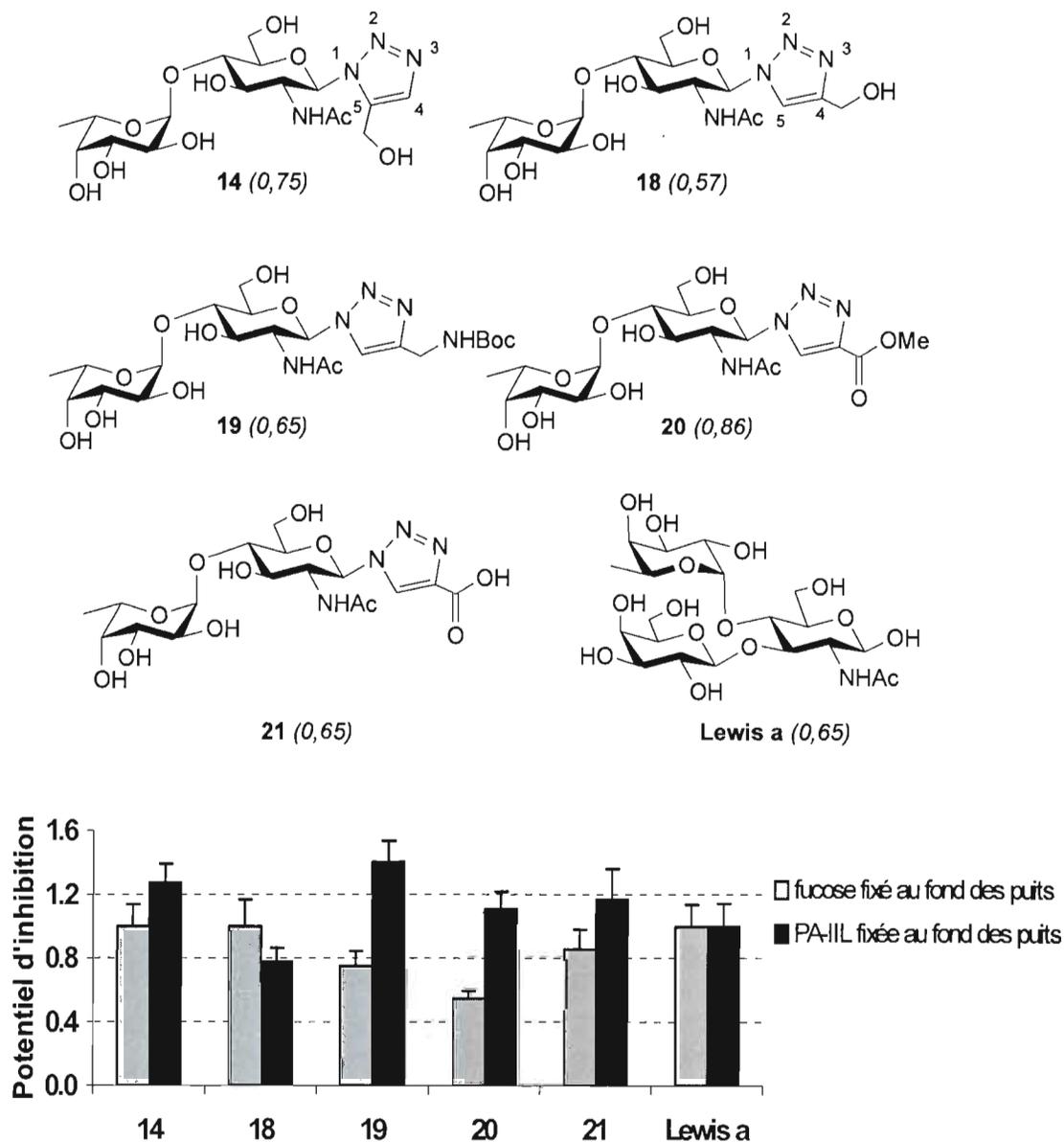


Figure 3.1: Dérivés disaccharidiques avec leurs IC₅₀ (μM, moyenne entre les 2 méthodes) indiqués en italique. Le graphique représente le potentiel d'inhibition (relatif au Le^a, IC₅₀ de 65 μM) des dérivés envers l'interaction PA-IIL/fucose

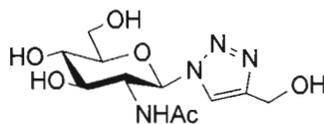


Figure 3.2: Témoin négatif utilisé pour les tests ELLA

3.2.2 Valeurs thermodynamiques de l'interaction des disaccharides **18** et **20** avec la PA-IIL

Des expériences de microcalorimétrie de titration (ITC) ont été réalisées afin de confirmer l'affinité du meilleur ligand **18** et également du composé **14** à l'égard de la lectine PA-IIL (**Tableau 3.1**). Pour le composé **18**, sur une moyenne de trois expériences, une constante d'association de $3.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($K_d = 310 \text{ nM}$) a été déterminée. De la même façon, le composé **14** présente une forte affinité. L'affinité des dérivés disaccharidiques est du même ordre de grandeur que celle obtenue ($K_d = 210 \text{ nM}$) pour le trisaccharide Le^a, laquelle est environ 14 fois meilleur que le L-fucose.¹¹⁰

Tableau 3.1: Valeurs d'ITC pour différents ligands de la lectine PA-IIL

	K_a (10^6 M^{-1})	K_d (nM)	n	$-\Delta G$ (kJ/mol)	$-\Delta H$ (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
L-Fucose ¹¹⁰	0.34	2900	0.96	31.5	31.2	-0.3
Le ^{a110}	4.7	210	1.08	38.1	34.9	-3.1
18	3.2	310	0.98	37.1	43.4	6.3
20	3.4	290	0.80	37.3	36.7	-0.6

Pour tous les ligands présentés au **Tableau 3.1**, l'interaction est clairement dominée par l'enthalpie, avec de grandes valeurs exothermiques. Le composé **18** possède la plus grande valeur d'enthalpie ($\Delta H = -43.4$ kJ/mol) avec une contribution entropique défavorable ($T\Delta S = -6.3$ kJ/mol), comportement classique dans les interactions protéine-sucre. Cette situation est en fait différente de celle du Le^a qui possède une entropie de liaison favorable ($T\Delta S = +3.1$ kJ/mol). Le composé **20** a un comportement intermédiaire en ne présentant aucune contribution entropique, comme il avait été précédemment observé pour le fucose. Les différences de valeurs thermodynamiques entre les deux disaccharides peuvent être expliquées par leurs niveaux de flexibilité différents.

3.2.3 Structures cristallines des inhibiteurs **18** et **20** en complexe avec PA-IIL

Il a été possible d'obtenir des cristaux de la lectine PA-IIL en complexe avec les inhibiteurs **18** et **20**. Les complexes ont été obtenus par trempage (24 heures dans une solution de 10 mM en inhibiteur) de cristaux de PA-IIL préalablement co-cristallisés avec du L-fucose. Les cristaux ont été obtenus avec une résolution de 1.3 Å. La **Figure 3.3** présente la structure de la lectine PA-IIL co-cristallisée avec le disaccharide **18**. Il est possible d'observer que le disaccharide occupe 3 sites sur 4. Une analyse de l'empilement a indiqué que l'accès au quatrième site était bloqué par l'interaction d'un tétramère voisin.

Les disaccharides **18** et **20** se lient de façon similaire à la PA-IIL et une carte de densité électronique de bonne qualité a été obtenue pour les deux ligands (**Figure 3.4**). Les atomes les plus éloignés du site de liaison (groupement hydroxyméthyl de **18** et méthyl ester de **20**) possèdent une plus faible densité électronique indiquant une certaine flexibilité.



Figure 3.3: Structure de la lectine PA-IIL en complexe avec le disaccharide **18**. La protéine est représentée en ruban, les atomes de calcium en sphères et les ligands en bâtonnets

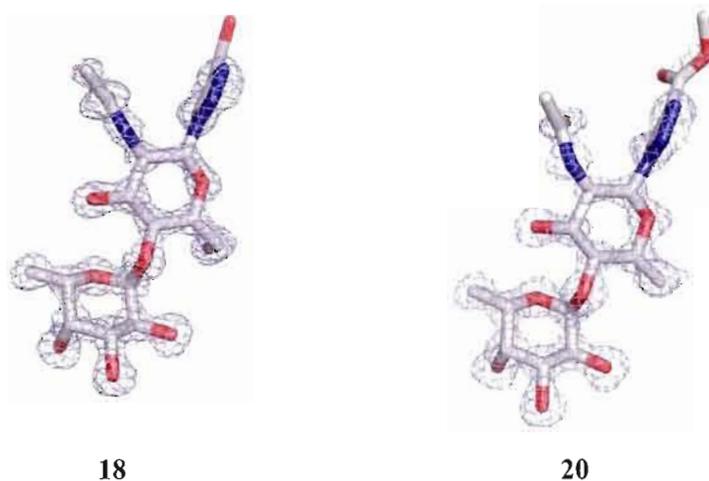


Figure 3.4: Cartes de densité électronique (contour à 1.0 sigma) pour les deux disaccharides **18** et **20** complexés avec la PA-IIL

En regardant en détail l'interaction entre les ligands et la protéine, il est possible de remarquer que le cycle triazole et ses substituants n'établissent aucun contact avec le site de

liaison (**Figure 3.5**). Cette observation confirme l'hypothèse avancée suite aux résultats obtenus par ELLA. Il avait été suggéré que la partie aglyconique ne devait établir de contact avec la surface de la protéine compte tenu des résultats similaires obtenus pour les différents disaccharides dans les tests ELLA. Puisqu'il n'existe pas de différence significative dans les modes de liaisons des disaccharides **18** et **20**, seulement l'interaction de l'inhibiteur **18** avec la PA-IIL sera discutée dans les paragraphes suivants.

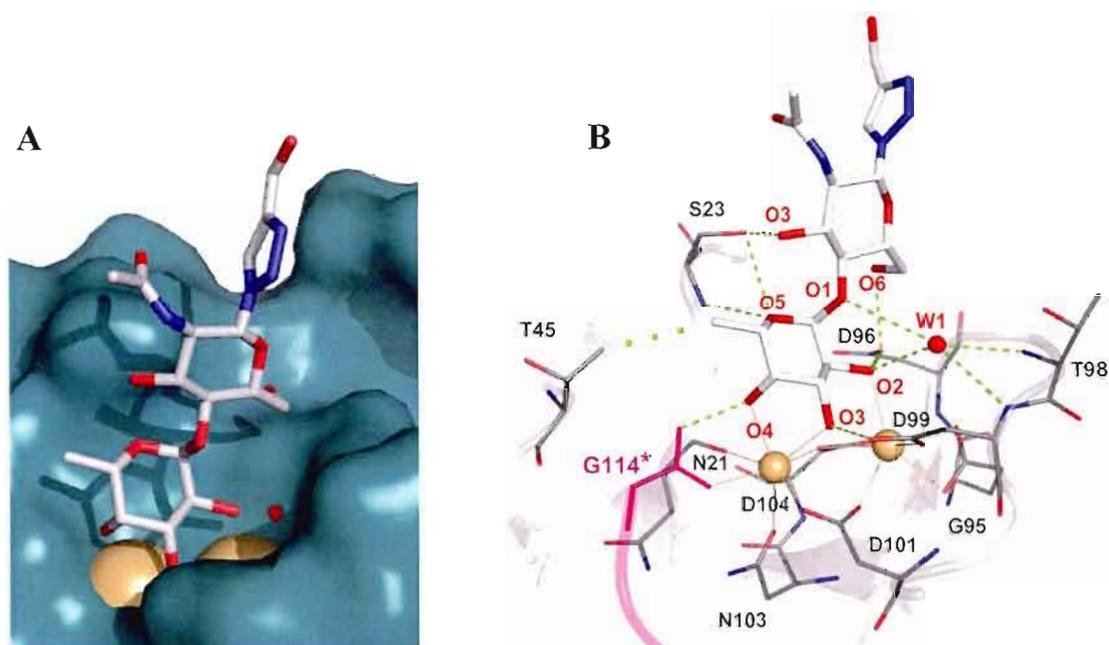


Figure 3.5: Site de liaison de la PA-IIL en complexe avec le disaccharide **18**. **A** Surface de Connolly de la protéine. Les atomes de calcium sont représentés comme des sphères orange, les molécules d'eau comme des sphères rouges et le ligand en bâtonnet. **B** Détail des interactions avec les liaisons hydrogène (en vert) les liaisons de coordination (en orange) et les contacts hydrophobiques (en jaune)

Les 3 sites de liaison occupés par l'inhibiteur sont très similaires. Dans tous les cas, les hydroxyles O-2, O-3 et O-4 du résidu L-fucose participe à des liaisons de coordination avec les ions calcium, comme il a été décrit précédemment.^{111,112} Ce résidu est également

¹¹¹ Mitchell, E. P.; Sabin, C.; Snajdrova, L.; Budova, M.; Perret, S.; Gautier, C.; Hofr, C.; Gilboa-Garber, N.; Koca, J.; Wimmerova, M.; Imberty, A. *Proteins: Struct. Funct. Bioinfo.* **2005**, *58*, 735.

impliqué dans le même réseau de liaisons hydrogène que décrit auparavant avec les différents acides aminés de la chaîne protéique (**Figure 3.4 B**). L'oxygène endocyclique du L-fucose forme une liaison hydrogène avec le groupe amine de la Ser23 de la chaîne protéique. Une molécule d'eau, constamment conservée dans toutes les structures cristallines de PA-IIL en complexe avec des mono- et oligosaccharides,^{110,111,112,113} effectue des liaisons hydrogène avec le O-2 et O-1 du résidu L-fucose ainsi qu'avec les atomes d'azote de Thr98 et Asp99. Les contacts hydrophobiques sont limités à l'interaction entre le C-6 du groupement méthyl de l'unité L-fucose et le résidu Thr45 de la chaîne protéique.

Le résidu GlcNAc établit une liaison hydrogène entre l'oxygène O-6 et Asp96 ainsi qu'une nouvelle liaison hydrogène entre l'oxygène O-3 et la Ser23. L'orientation de l'unité GlcNAc est significativement différente de celle observée dans la structure cristalline de la PA-IIL en complexe avec le Le^a.

Le fait que la PA-IIL présente une aussi grande affinité pour les dérivés disaccharidiques α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc ($K_d = 310$ nM) que pour le trisaccharide Le^a ($K_d = 210$ nM) est plutôt surprenant puisque ces deux molécules ont des comportements conformationnels différents. Le trisaccharide Le^a, ainsi que les autres molécules d'antigène de groupe sanguin, n'adopte qu'une seule conformation en solution compte tenu de l'encombrement stérique entre les résidus fucose et le galactose.^{114,115} Les disaccharides sont des molécules plus flexibles avec plus de liberté conformationnelle provenant de la rotation possible autour de la liaison glycosidique. Bien que la rotation autour de la liaison régie par l'angle Φ (O₅-C₁-O₁-C₄) soit restreinte par des effets stéréo-électroniques faisant référence à l'effet exo-anomérique, la rotation autour de la liaison régie par l'angle Ψ (C₁-O₁-C₄-C₅) est plus flexible avec des minimums d'énergie correspondant à différentes orientations des groupements y étant rattachés. Des études conformationnelles réalisées sur un dérivé α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc en solution ont démontré que les résultats des analyses obtenues par

¹¹² Mitchell, E. P.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerova, M.; Gautier, C.; Pérez, S.; Wu, A. M.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A. *Nature Struct. Biol.* **2002**, *9*, 918.

¹¹³ Loris, R.; Tielker, D.; Jaeger, K.-E.; Wyns, L. *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 861.

¹¹⁴ Imberty, A.; Mikros, E.; Koca, J.; Mollicone, R.; Oriol, R.; Pérez, S. *Glycoconj. J.* **1995**, *12*, 331.

¹¹⁵ Lemieux, R. U.; Bock, K.; Delbaere, L. T. J.; Koto, S.; Rao, V. S. R. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 631.

RMN ne peuvent être expliqués seulement que lorsque la solution est considérée comme étant un mélange de différentes conformations.¹¹⁶

Le disaccharide **18** adopte des conformations similaires dans les 3 sites de liaison de PA-IIL avec des valeurs moyennes d'angle Φ ($O_5-C_1-O_1-C_4$) et Ψ ($C_1-O_1-C_4-C_5$) de -80° et -123° , respectivement. Comme le montre la **Figure 3.6**, cette conformation est nettement différente de celle adoptée par le Le^a dans le site de liaison ($\Phi = -75^\circ$ et $\Psi = -100^\circ$).¹¹⁰ Il en résulte une modification de l'orientation du résidu GlcNAc dans le site de reconnaissance ainsi qu'un changement au niveau du réseau de liaisons hydrogène. Pendant que le résidu GlcNAc au sein du complexe PA-IIL/ Le^a n'établit qu'une seule liaison hydrogène entre l'oxygène O-6 et un oxygène de la chaîne principale, l'orientation dans le complexe PA-IIL/disaccharide permet la formation de liaisons hydrogène entre O-6 et le groupement carboxylate de Asp96 et également entre O-3 et l'hydroxyle de Ser23. La différence au niveau des liaisons hydrogène d'O-6 de l'unité GlcNAc est due au changement de conformation de la liaison glycosidique ainsi qu'au changement d'orientation du groupement hydroxyle en C-6. Ce groupement adopte l'orientation habituelle *gauche-trans* (*gt*) (O-6 anti à C-4) dans le Le^a comparativement à une orientation *gauche-gauche* (*gg*) dans le dérivé **18** (**Figure 3.7**).

Comme on pouvait s'y attendre pour les disaccharides, une contribution entropique non favorable ($\Delta S = -6.3$ kJ/mol) a été observée pour le composé **18**. Cette entropie défavorable s'explique par la flexibilité des liaisons glycosidiques en solution. Toutefois, le fort réseau de liaisons hydrogène généré par le composé **18** se répercute dans une enthalpie de liaison élevée compensant ainsi pour le coût entropique. Finalement, l'affinité résultante pour la PA-IIL se retrouve dans le même éventail que pour la structure rigide du trisaccharide Le^a .

¹¹⁶ Weimar, T.; Peters, T.; Pérez, S.; Imberty, A. *Theochem. J. Mol. Struct.* **1997**, 395, 297.

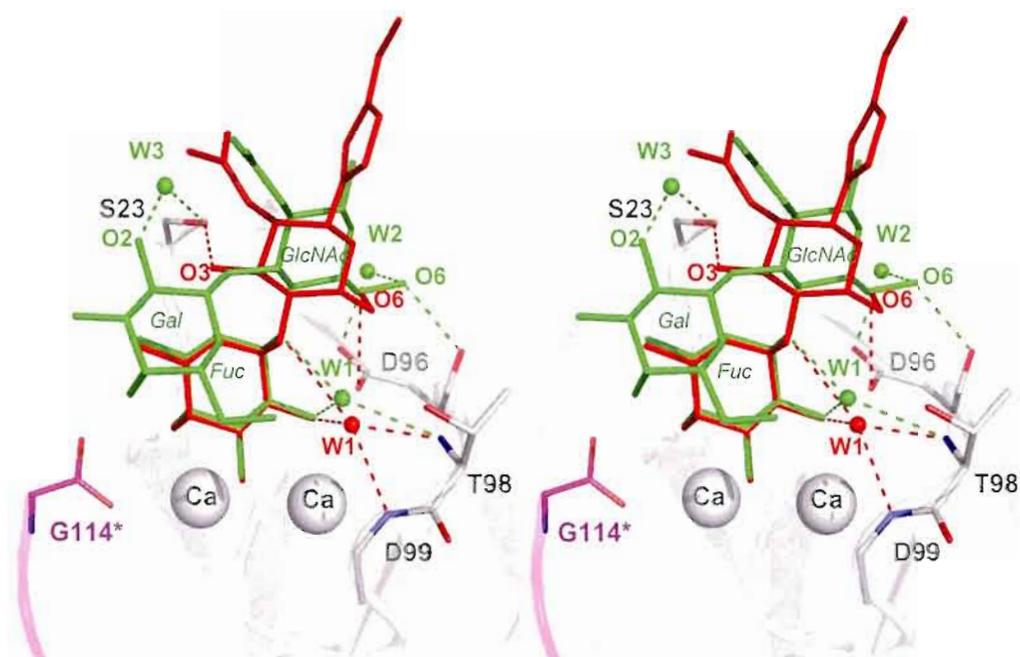


Figure 3.6: Image stéréoscopique de la superposition du disaccharide **18** (bâtonnet rouge) et du trisaccharide Le^a (bâtonnet vert, code PDB 1W8H) dans le site de liaison de la lectine PA-IIL

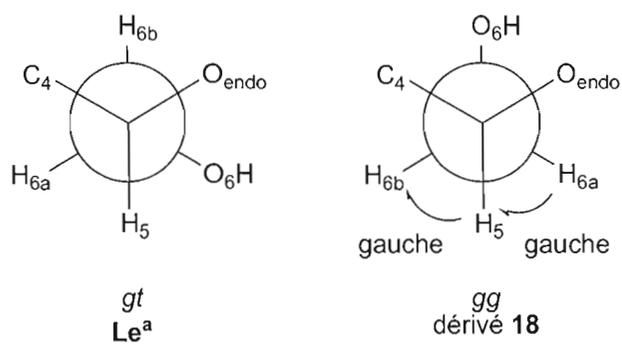


Figure 3.7: Conformation de l'hydroxyle O-6 dans le Le^a et le disaccharide **18**

3.3 Interaction des glycoclusters avec la lectine PA-IIL

3.3.1 Tests ELLA

La **Figure 3.8** présente les résultats des tests ELLA réalisés sur les glycoclusters. Tous les dimères (**38-42**) ont présenté des potentiels d'inhibition 2 à 3 fois meilleurs que le Le^a . Les différences obtenues entre les deux méthodes de mesures utilisées sont faibles. En ce qui concerne les dimères linéaires, les IC_{50} ne semblent pas dépendre de la longueur de la chaîne PEG mais plutôt de leurs géométries dans l'espace (**Figure 3.9**). Ainsi, le dimère **42** possédant un cœur aromatique semi-rigide est le meilleur inhibiteur au niveau des tests ELLA avec un IC_{50} de 220 nM, donc 3 fois meilleur que le Le^a . La flexibilité de la molécule et sa disposition géométrique semblent également jouer un rôle puisque le trimère **43**, ayant un cœur aromatique rigide, possède un IC_{50} inférieur au Le^a dans les tests ELLA.

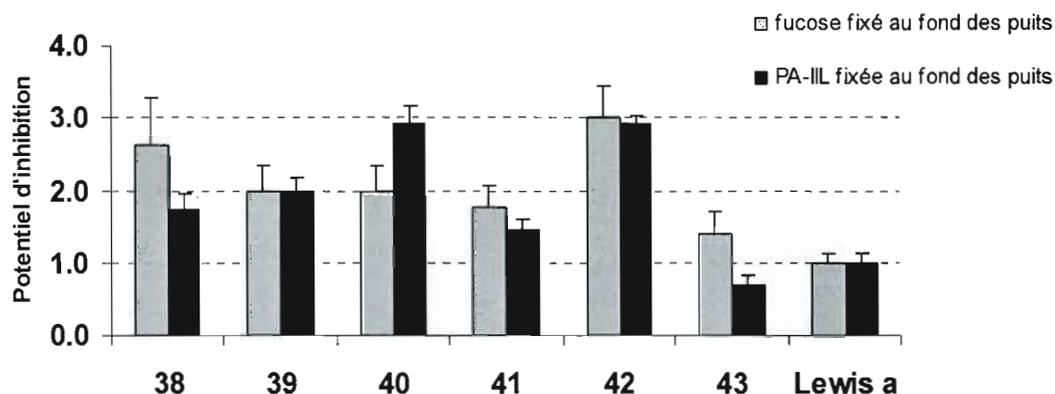


Figure 3.8: Graphique représentant le potentiel d'inhibition (relatif au Lewis a, IC_{50} de 65 μ M) des glycoclusters vis-à-vis l'interaction PA-IIL/fucose

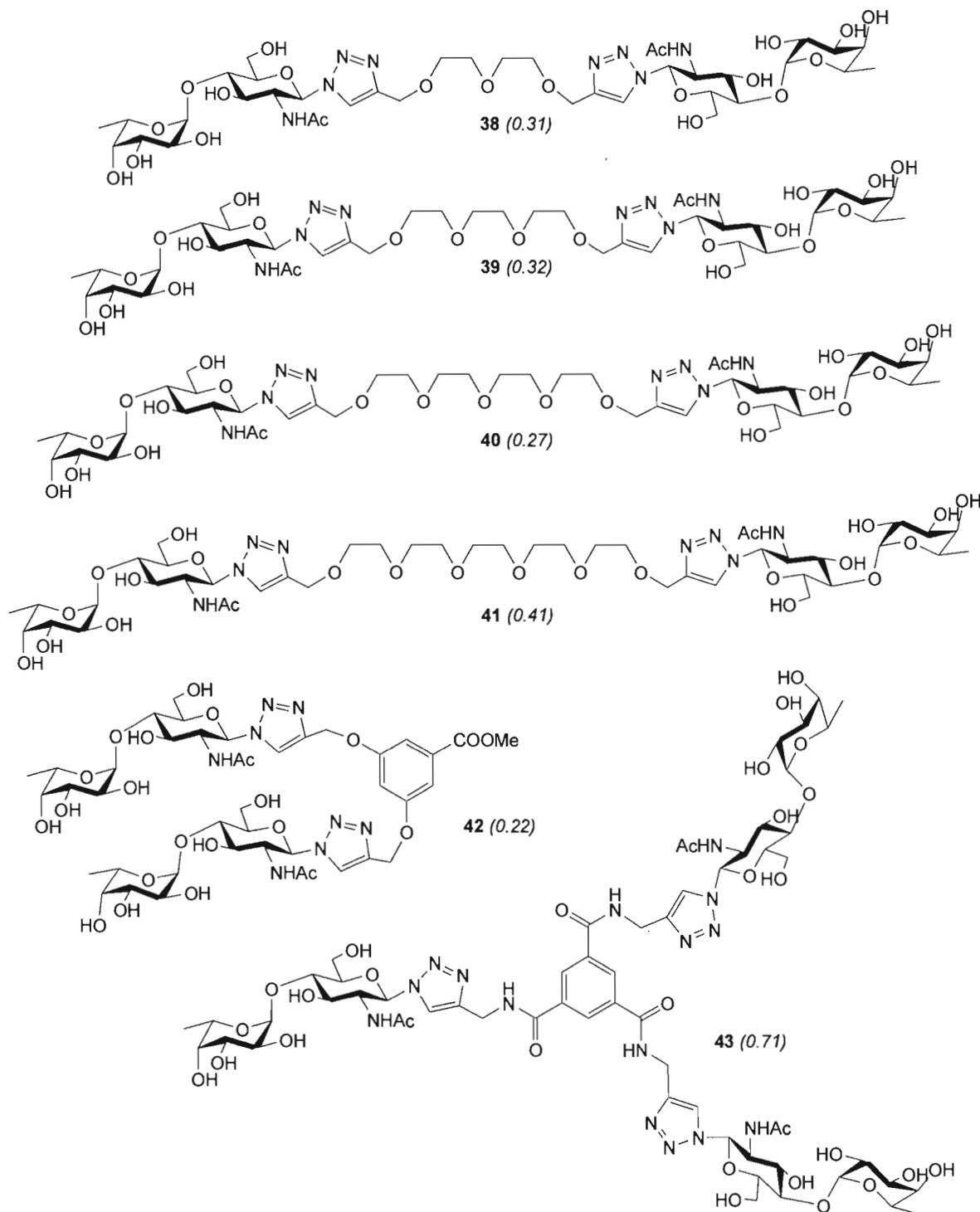


Figure 3.9: Dimères et trimères avec leurs IC_{50} (μM moyenne entre les 2 méthodes) indiqués en italique

3.3.2 Valeurs thermodynamiques de l'interaction des glycoclusters avec la lectine PA-IIL

Dans tous les tests de microcalorimétrie de titration, l'addition des molécules divalentes et trivalente à la lectine PA-IIL a donné lieu à la précipitation de la protéine sous forme d'agrégats insolubles. À haute concentration en protéine, toutes les molécules testées possédaient un niveau de valence ainsi qu'une géométrie appropriée pour qu'il y ait formation d'agrégats avec la lectine tétramérique. Les tests ont donc été menés à plus faible concentration en protéine et seulement une partie de la courbe, juste avant la formation d'agrégats insolubles, a été utilisée pour les calculs des contributions thermodynamiques.

Tableau 3.2: Valeurs thermodynamiques de l'interaction de PA-IIL avec le Le^a et quelques analogues multivalents

	K_a ($\times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$)	K_d (nM)	n	$-\Delta G$ (kJ/mol)	$-\Delta H$ (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
Lewis a ¹¹⁰	470 ± 20	210	1.08 ± 0.01	38.1 ± 0.1	35.0 ± 0.1	-3.1
41	1104 ± 14	90	0.66 ± 0.01	40.2 ± 0.2	69.5 ± 1.0	29.3
42	576 ± 4	170	0.62 ± 0.01	38.6 ± 0.1	73.9 ± 1.6	35.3
43	968 ± 90	100	1.11 ± 0.11	39.9 ± 0.2	37.2 ± 0.7	-2.7

Comme montré dans le **Tableau 3.2**, les deux composés divalents **41** et **42** présentent des stoechiométries entre 0.6 et 0.7 indiquant que les disaccharides se lient de façon efficace aux deux extrémités en solution. Le dimère linéaire **41** possède le degré d'affinité le plus élevé pour la lectine PA-IIL avec une constante de dissociation de 90 nM.

Ces deux composés divalents doivent payer une contribution entropique élevée non favorable mais cette pénalité est compensée par une enthalpie de liaison très élevée (-69.5 kJ/mol pour **41** et -73.9 kJ/mol pour **42** comparativement à -35.0 kJ/mol pour le Le^a). Étrangement, le trimère **43**, présentant également une haute affinité pour la PA-IIL, possède

un comportement vraiment différent en solution. En effet, une stoechiométrie près de 1 trouvée pour le trimère **43** signifie que, lorsque le ligand n'est pas fortement concentré, il a tendance à se lier seulement à une molécule tétramérique de PA-IIL. Ainsi, une fois qu'un disaccharide s'est lié, les deux autres disaccharides ne sont pas facilement accessibles aux autres protéines. Néanmoins, il a été possible d'observer la formation d'un précipité lorsque la concentration est élevée, indiquant que le ligand est capable de se lier aux sites de liaisons de plusieurs protéines. Comme on pouvait s'y attendre, la rigidité du trimère lui a prévalu une contribution entropique favorable ($T\Delta S = 2.7$ kJ/mol).

3.3.3 Effet de la multivalence

Les dimères du disaccharide **18** ont effectivement été les meilleurs inhibiteurs testés mais leurs potentiels d'inhibition ne sont que deux ou trois fois supérieur à ceux des disaccharides monomères. La forte pénalité entropique observée en microcalorimétrie résulte sans doute de la perte de flexibilité des chaînes PEG espaçant les disaccharides. Compte tenu des longueurs de chaîne courtes et de la topologie de la protéine, la chélation de plusieurs sites de liaison n'est pas possible. Seule la formation d'un réseau de type *-protéine-ligand-protéine-* est possible et ceci résulte en la formation d'un précipité. Étrangement, le composé **42**, le plus rigide des dimères, est celui qui a montré la meilleure affinité pour la PA-IIL dans les tests ELLA, mais ce fut le dimère linéaire **41** qui a présenté un niveau d'affinité le plus élevé en solution, comme l'ont montré les résultats en microcalorimétrie. Le trimère est le plus rigide des glycoclusters compte tenu de la structure de son cœur. Cette rigidité lui a prévalu une contribution entropique favorable mais un certain conflit stérique, empêchant l'approche efficace de molécules de PA-IIL, pouvant expliquer la faible affinité observée durant les tests ELLA.

3.4 Conclusions

Les tests ELLA ainsi que les analyses de microcalorimétrie ont confirmé l'hypothèse que nous avons émise disant que seule l'unité α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc du trisaccharide Le^a était nécessaire à une bonne reconnaissance de la part de la lectine PA-IIL. En effet, des valeurs d'IC₅₀ dans le même éventail et parfois même supérieures au Le^a ont été trouvées. En n'oubliant pas que le Le^a est le meilleur ligand naturel de la lectine PA-IIL, les disaccharides font parties des meilleurs inhibiteurs de l'adhésion de PA-IIL synthétisés jusqu'à ce jour.^{117,118,119} La complexité structurale du meilleur ligand naturel a donc été simplifiée.

Comme on devait s'y attendre, les résultats des analyses ITC nous ont révélé une contribution entropique non favorable pour les disaccharides. Cette entropie défavorable s'explique par la flexibilité de la liaison glycosidique en solution. Le coût entropique est cependant compensé par de fortes interactions enthalpiques.

Les structures cristallines de deux dérivés disaccharidiques ont révélé une orientation différente de l'unité GlcNAc dans le site de liaison de PA-IIL. Cette observation a permis de nous expliquer les fortes contributions enthalpiques trouvées pour le disaccharide. De plus, les structures cristallines ont indiqué que le substituant aglyconique n'avait aucune interaction directe avec la protéine.

Suite à tous ces résultats, la synthèse de disaccharides possédant un substituant aglyconique moins complexe que les cycles triazole (ex.: -OMe) devrait être envisagée. Afin de compenser les pertes entropiques encourues par le disaccharide, la synthèse de dérivés modifiés à différentes positions de l'unité GlcNAc pourrait être envisagée afin d'améliorer les interactions enthalpiques avec la lectine.

¹¹⁷ Deguise, I.; Lagnoux, D.; Roy, R. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1321.

¹¹⁸ Johansson, E. M. V.; Kolomiets, E.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1291.

¹¹⁹ Kolomiets, E.; Johansson, E. M. V.; Renaudet, O.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1465.

L'effet de multivalence recherché par la synthèse de glycoclusters a effectivement été observé au niveau des tests ELLA et d'ITC. Cependant, leurs potentiels d'inhibition ne sont que deux ou trois fois supérieurs à ceux des disaccharides. Les glycoclusters constitués des chaînes de type PEG se sont avérés trop flexibles, entraînant des coûts entropiques élevés. Celui utilisant le cœur trivalent aromatique est plus rigide (contribution entropique favorable) mais un conflit stérique empêche l'approche efficace de la protéine PA-IIL. Un équilibre entre rigidité, flexibilité et espacement entre les unités sucres doit être recherché au niveau de la structure d'un composé multivalent afin d'obtenir la meilleure affinité possible avec la protéine.

CHAPITRE IV

SYNTHÈSE DE DISACCHARIDES MODIFIÉS EN POSITION C-2 ET C-6

4.1 Introduction

À la lumière des observations et résultats obtenus au chapitre précédent, nous avons entrepris la synthèse d'analogues du disaccharide **18** modifiés en position C-2 et C-6 de l'unité GlcNAc. Le substituant en position anomérique du disaccharide restera inchangé malgré le fait que le cycle triazole ne soit pas en contact directe avec le site actif de la protéine. De cette façon, il sera possible de comparer avec rigueur les résultats qui seront obtenus lors des tests biologiques avec ceux des disaccharides déjà testés et d'évaluer la contribution des modifications apportées aux différentes positions. Ces modifications permettront d'améliorer les interactions enthalpiques (liaisons hydrogène, interactions ioniques) avec la PA-IIL afin de pallier les pertes entropiques dues à la flexibilité de la liaison glycosidique du disaccharide en solution. Comme il a été souligné dans le chapitre 3, l'hydroxyle de la position C-6 de l'unité GlcNAc est à proximité d'un acide aspartique (Asp96), qui, comme nous le savons, est chargé négativement en milieu physiologique. L'insertion, à cette position, d'un groupement chargé positivement en milieu physiologique pourra former une interaction de type ionique, plus forte que les liaisons hydrogène, avec l'acide aspartique. En l'occurrence, la synthèse d'un disaccharide possédant une amine en C-6 de l'unité GlcNAc a été réalisée et sera exposée dans la première partie de ce chapitre. De plus, par l'introduction de groupements aromatiques et sulfonamide en position C-2, il sera possible d'évaluer la contribution du groupement acétamido dans la reconnaissance avec la protéine. Ces modifications feront l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

4.2 Analogue disaccharidique modifié en C-6 de l'unité GlcNAc

Afin de pouvoir effectuer des modifications en position C-6, il a fallu retravailler le plan de synthèse du disaccharide. Il fallait obtenir, durant la synthèse, la possibilité de déprotéger sélectivement la position 6 de l'unité GlcNAc. Pour ce faire, il a été choisi d'effectuer la synthèse d'un accepteur possédant un groupement *para*-méthoxybenzyle en position C-6 provenant de l'ouverture régiosélective d'un acétal. Ce groupement pourra être clivé sélectivement sans déprotéger les groupements benzyles présents sur l'unité fucose du disaccharide.

Ainsi, les hydroxyles en position 4 et 6 du triol **7**, dont la synthèse a été décrite à la section 2.2.2, ont été protégés sous forme d'acétal en utilisant l'anisaldéhyde diméthyl acétal, une quantité catalytique d'acide *para*-toluènesulfonique et le tout solubilisé dans un mélange CH₃CN/DMF et chauffé à 55°C. L'acétal correspondant **44**¹²⁰ a été obtenu avec un rendement de 74% (**Schéma 4.1**). L'hydroxyle libre en position 3 a été protégé sous forme de benzoate à l'aide du chlorure de benzoyle et a permis d'obtenir le composé **45** avec un rendement de 84%. Par la suite, ce composé a été soumis à une ouverture régiosélective de l'acétal afin d'obtenir l'hydroxyle libre en position 4 et le groupement *para*-méthoxybenzyle en position 6 qui pourra, dans des étapes futures, être déprotégé de façon sélective. Ainsi, l'ouverture régiosélective a été réalisée en utilisant la méthode adaptée de Johansson *et al.*¹²¹ et a permis d'obtenir l'accepteur de glycosyle **46** avec un rendement de 77%.

La prochaine étape a consisté en la réalisation de la réaction de glycosylation entre le donneur de thiofucoside **4** et l'accepteur **46**. Différentes conditions de réactions ont été tentées afin d'obtenir le disaccharide désiré dans les meilleurs rendements possibles. Finalement, le disaccharide **47** de configuration α ($^3J_{1,2'} = 3.6$ Hz, H-1') a été obtenu dans un rendement de 50% lorsque la glycosylation a été réalisée dans le chloroforme à -45°C en utilisant NIS/TMSOTf comme promoteur (voir **Schéma 4.2**). Il est connu depuis longtemps

¹²⁰ Unverzagt, C.; Kunz, H. *J. Prakt. Chem.* **1992**, 334, 570.

¹²¹ a) Johansson, R.; Samuelsson, B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1984**, 2371. b) Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7736.

que l'hydroxyle en position 4 de la glucosamine est un faible nucléophile et que parfois les réactions de glycosylation y sont difficiles. Cette faible réactivité à longterm a été attribuée à l'encombrement stérique pouvant y avoir à cette position.¹²² Récemment, Crich *et al.* ont proposé une explication alternative basée sur la formation d'une liaison hydrogène impliquant le groupement amide de la glucosamine diminuant la réactivité de l'accepteur dans une réaction de glycosylation.¹²³ Toutes ces raisons peuvent expliquer le faible rendement obtenu pour la glycosylation de l'accepteur **46**.

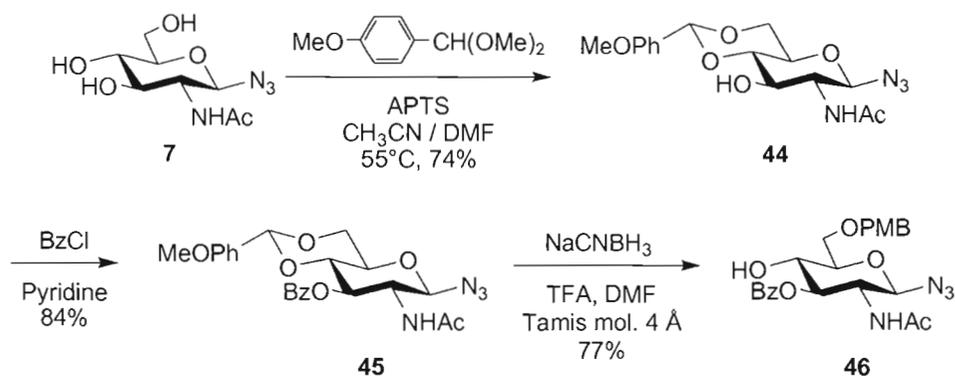


Schéma 4.1: Synthèse de l'accepteur de glycosyle **46**

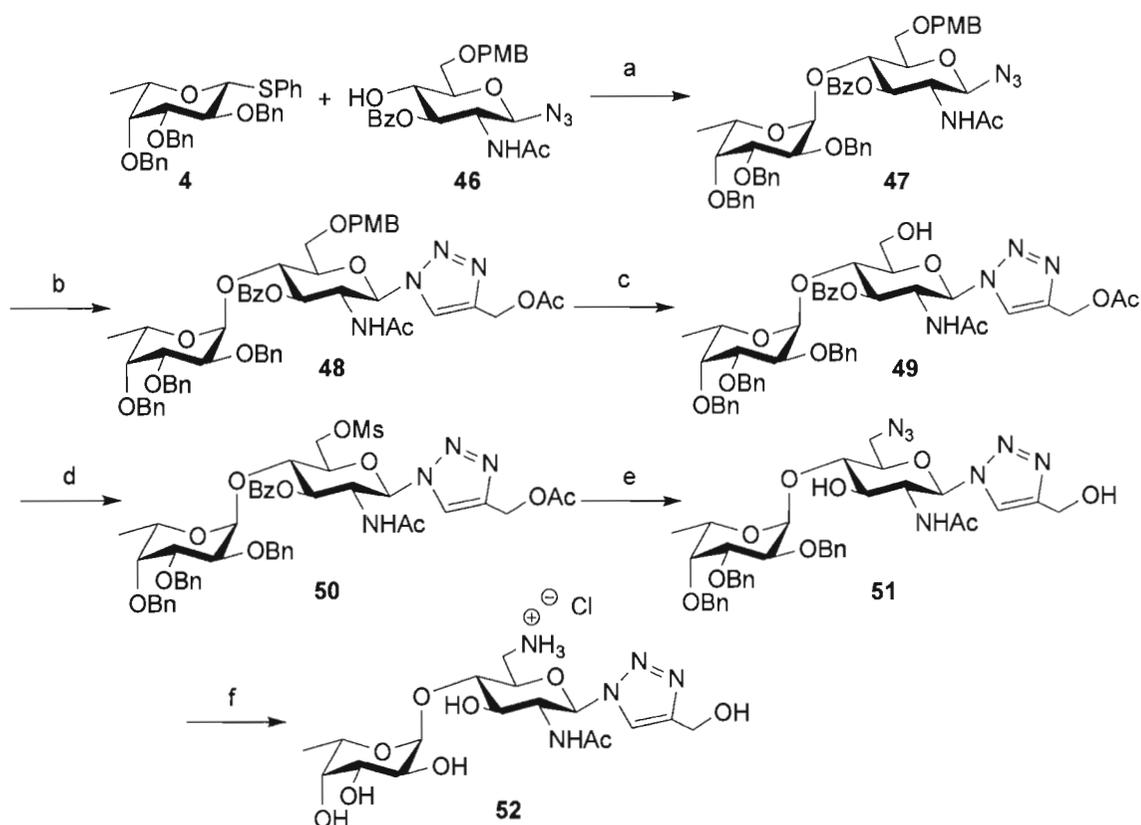
Par la suite, le composé **47** a été soumis à une 'Click Chemistry' dans les mêmes conditions que décrites précédemment en utilisant l'acétate propargylique et a permis d'obtenir spécifiquement le 1,2,3-triazole **48** substitué en position 1 et 4 dans un rendement de 88%. La prochaine étape a été de déprotéger de façon sélective le groupement *para*-méthoxybenzyle en laissant intacte les groupements benzyles présents sur la molécule. Cette déprotection chimiosélective a été réalisée en utilisant le DDQ dans un mélange dichlorométhane/eau à température ambiante.¹²⁴ Ainsi, le composé **49** possédant l'hydroxyle libre en position 6 a été obtenu avec un rendement de 73%. Par la suite, le groupe partant mésyle en position 6, introduit à l'aide du MsCl (**50**, 87%), a été déplacé selon un mécanisme S_N2 par un ion azoture à l'aide de l'azoture de sodium. Ensuite, ce composé a été soumis à

¹²² Paulsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 155.

¹²³ Crich, D.; Dudkin, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6819.

¹²⁴ Crich, D.; Prasanna, J.; Hutton, T. K. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3064.

une déprotection des groupes esters dans les conditions classiques de Zemplén et a permis d'obtenir le composé **51** dans un excellent rendement de 94% (rend. sur 2 étapes). La dernière étape, en plus de déprotéger les groupements benzyles du fucose, a permis la réduction de l'azoture en fonction amine. Ainsi, l'hydrogénation du composé **51** à l'aide du catalyseur de Pearlman a permis d'obtenir le composé **52** modifié en position C-6 dans un excellent rendement de 92%.



a) NIS, TMSOTf, CHCl₃, Tamis mol. 4 Å, -45°C, 50% **b)** acétate propargylique, CuSO₄, Ac. asc., THF/H₂O (1:1), 50°C, 88% **c)** DDQ, CH₂Cl₂, H₂O, 73% **d)** MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 87% **e)** i) NaN₃, DMF, 80°C, ii) NaOMe/MeOH, 94% 2 étapes **f)** H₂, Pd(OH)₂, 1M HCl/MeOH, 92%

Schéma 4.2: Synthèse du disaccharide **52** modifié en position C-6

4.3 Analogues disaccharidiques modifiés en C-2

Cette section sera consacrée à la synthèse d'analogues disaccharidiques modifiés en position C-2 de l'unité Glc. Dans un premier temps, la synthèse d'un disaccharide possédant un hydroxyle à cette position (disaccharide Glc) sera exposée. Dans un deuxième temps, la synthèse d'un disaccharide possédant en position C-2 un groupement phthalamide (disaccharide GlcNPhth) sera discutée. Ce dernier nous donnera la possibilité, suite à la déprotection du groupe phthalamide, d'effectuer une librairie de produits modifiés à cette position. Comme mentionné plus haut, les modifications effectuées en C-2 vont nous permettre d'évaluer la contribution du groupement acétamido au niveau de l'interaction avec le site de liaison de PA-III et peut être d'améliorer l'affinité de notre ligand dissaccharidique envers la lectine.

4.3.1 Disaccharide possédant un hydroxyle en position C-2

La même stratégie que celle employée pour la préparation du dissaccharide GlcNAc modifié en position C-6 a été utilisée pour la synthèse de ce disaccharide Glc. Un accepteur Glc possédant un groupement *para*-méthoxybenzyle en position C-6 a donc été synthétisé. Dans le futur, cet accepteur, en plus d'être modifié en position C-2, permettra également d'effectuer des modifications de façon sélectives en position C-6. Le **Schéma 4.3** présente le chemin synthétique menant à l'obtention de cet accepteur de glycosyle. Le glucose peracétylé **53**¹²⁵ a été soumis à une solution de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique afin d'introduire en position anomérique un bromure qui a été déplacé, selon une catalyse par transfert de phase, par un ion azoture (IR, ν : 2118 cm^{-1} , N_3). Ainsi, le dérivé azoté **54**¹²⁶ de configuration β a été obtenu avec un excellent rendement de 94% sur deux étapes. Les groupements acétates ont été clivés dans les conditions de Zemplén et les hydroxyles 4 et 6 ont été protégés sous forme d'acétal en utilisant l'anisaldéhyde diméthyl acétal pour donner

¹²⁵ Tai, C.-A.; Kulkarni, S. S.; Hung, S.-C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8719.

¹²⁶ Micheel, F.; Klemer, A. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1961**, *16*, 85.

le dérivé **55**.¹²⁷ Par la suite, les hydroxyles 2 et 3 ont été protégés par des groupements benzyles à l'aide d'hydrure de sodium et de bromure de benzyle pour donner le composé **56** (80%). Finalement, ce composé a été soumis à une ouverture régiosélective de l'acétale permettant d'obtenir l'hydroxyle libre en position 4. L'ouverture a été réalisée en utilisant le cyanoborohydrure de sodium en présence d'acide trifluoroacétique et a permis d'obtenir l'accepteur **57** dans un excellent rendement de 90%.

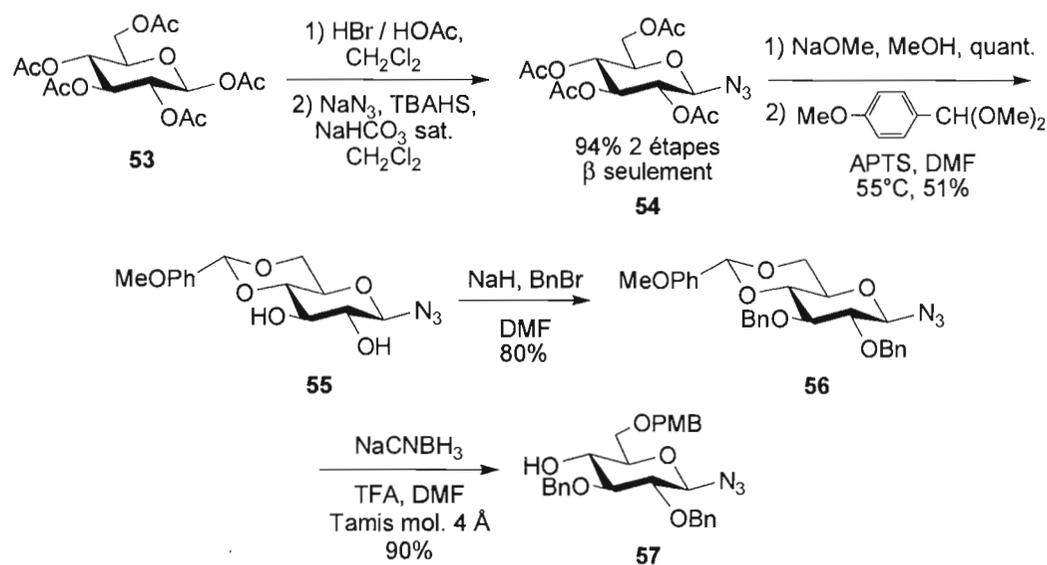


Schéma 4.3: Synthèse de l'accepteur Glc **57**

Le Schéma 4.4 présente les étapes effectuées afin d'obtenir le disaccharide Glc prêt à être testé avec la lectine PA-IIL. Évidemment, la première étape a consisté en la synthèse du disaccharide. Cette étape n'a pas été sans difficulté. Plusieurs facteurs comme la température, le promoteur, le donneur et l'accepteur eux-mêmes peuvent influencer la formation ou non du disaccharide lors de la réaction de glycosylation. Ainsi, plusieurs conditions de réaction ont été essayées afin d'obtenir le disaccharide **58** dans le meilleur rendement possible. À chaque essai, il était possible de voir l'apparition sur plaque CCM de plusieurs taches dont deux très rapprochées. Il a été possible de séparer par colonne chromatographique ces deux produits et de confirmer que l'un d'eux était le disaccharide désiré **58** (δ 5.05 ppm, $^3J_{1-2'} = 3.6$ Hz, H-1') et que l'autre, de par son spectre RMN et de masse, était l'accepteur fucosylé en position 4 et

¹²⁷ Chong, P. Y.; Petillo, P. A. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2113.

6. Le disaccharide **58** a été obtenu, en utilisant NIS/TMSOTf comme promoteur dans le chloroforme à -15°C , dans un faible rendement de 25% et le trisaccharide avec un rendement de 34%. Les rendements obtenus démontrent l'instabilité du groupement *para*-méthoxybenzyle dans les conditions acides de la glycosylation. Puisque la quantité de produit obtenu était suffisante pour les prochaines étapes et que nous ne savions pas encore le potentiel inhibiteur de ce disaccharide vis-à-vis la PA-IIL, il a été jugé bon de ne pas optimiser cette réaction. Cependant, compte tenu des résultats, changer la structure de l'accepteur serait la première option à envisager afin d'augmenter le rendement de la réaction de glycosylation.

Le disaccharide a par la suite été soumis à la réaction de click en utilisant l'acétate propargylique dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Cette réaction a permis de récupérer le dérivé triazole **59** dans un rendement de 85%. Deux étapes de déprotections, un Zemplén et une hydrogénation, ont permis d'obtenir le disaccharide Glc **60** de façon quantitative.

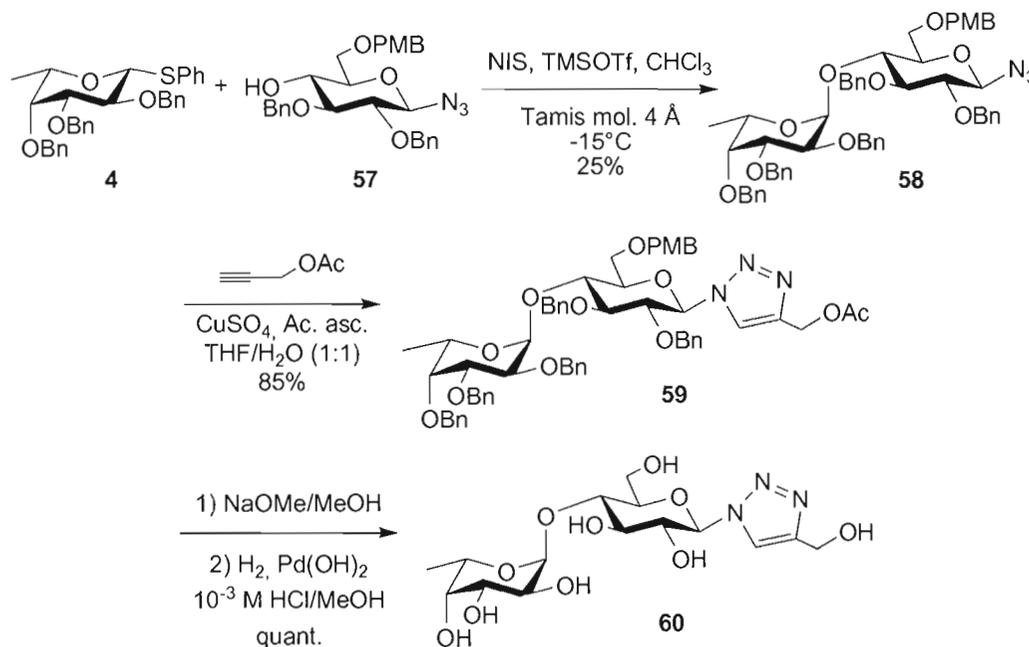


Schéma 4.4: Synthèse du disaccharide Glc **60**

4.3.2 Disaccharide possédant un groupement phthalamide en C-2 et ses dérivés

Dans un premier temps, l'accepteur GlcNPhth comportant le groupement *para*-méthoxybenzyle en position C-6 a été synthétisé (**Figure 4.1**). Suite aux problèmes rencontrés lors de la synthèse du disaccharide Glc et des quelques tentatives infructueuses de glycosylation entre l'accepteur de la **Figure 4.1** et le donneur de thiofucosides **4**, il a été décidé d'utiliser une autre stratégie de synthèse afin d'obtenir le disaccharide désiré. L'avantage que nous donnait l'utilisation de cet accepteur était la possibilité d'effectuer des modifications en position 2 et éventuellement en position 6 sans être obligé de refaire la synthèse d'un autre disaccharide. Finalement, il a été décidé de passer par la formation d'un benzylidène en position 4 et 6 du GlcNPhth et de faire une ouverture régiosélective de cet acétal afin de nous donner la position C-4 libre pour la fucosylation et un groupement benzyle en C-6. Le **Schéma 4.5** nous présente la synthèse de cet accepteur.

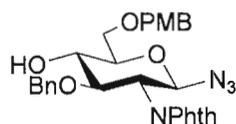


Figure 4.1: Structure de l'accepteur GlcNPhth comportant un groupement PMB en position C-6

Le composé peracétylé **61**¹²⁸ a été soumis à une réaction de glycosylation en présence d'azoture de triméthylsilyle et du tétrachlorure d'étain comme acide de Lewis dans le dichlorométhane. Cette réaction, contrôlée par l'effet anchimérique du groupement phthalamide, a permis d'obtenir le composé **62**¹²⁹ de configuration β avec un excellent rendement de 92% (δ 5.66 ppm, $^3J_{1,2} = 9.6$ Hz, H-1). Ce composé a par la suite été soumis à une étape de déprotection et les hydroxyles 4 et 6 du triol résultant **63** ont été protégés sous forme de benzylidène à l'aide du benzaldéhyde diméthylacétal en présence d'acide dans le THF à reflux pour donner l'acétal **64**¹³⁰ dans un rendement de 65%. L'hydroxyle en position

¹²⁸ Baker, B. R.; Joseph, J. P.; Schaub, R. E.; Williams, J. H. *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 1786.

¹²⁹ Szilagy, L.; Gyorgydeak. *Z. Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 21.

¹³⁰ Kunz, H.; Bröder, W. *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 221.

3 a par la suite été protégé sous forme de benzyle en utilisant l'hydrure de sodium et le bromure de benzyle pour donner le composé **65** (85%). Ce dernier a été soumis à une ouverture régiosélective de l'acétale selon la méthode de Garegg *et al.*¹³¹ pour donner l'accepteur GlcNPhth **66** dans un excellent rendement de 89%.

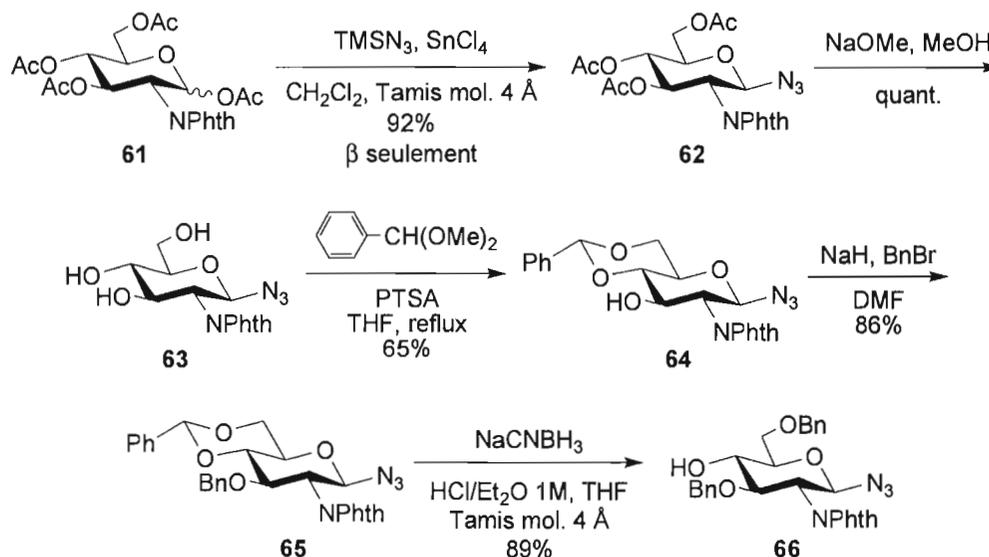


Schéma 4.5: Synthèse de l'accepteur GlcNPhth **66**

Basé sur un article de Pratt et Bertozzi¹³² qui utilisait le même accepteur, la réaction de glycosylation entre le donneur **4** et l'accepteur **66** a été réalisée à l'aide de NIS/TfOH comme promoteur dans le dichlorométhane à -15°C (voir Schéma 4.6). Cette glycosylation stéréosélective a permis d'obtenir le disaccharide **67** de configuration α ($^3J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1') dans un rendement de 68%. Ce disaccharide a par la suite été soumis à la réaction de click dans les mêmes conditions que décrites auparavant pour donner le composé **68** dans un rendement de 51%. Les deux dernières étapes ont consistées en la déprotection de l'acétate propargylique par le méthanolate de sodium et des groupements benzyles par une hydrogénation utilisant le catalyseur au palladium de Pearlman donnant ainsi le disaccharide **69** dans un rendement de 65% sur deux étapes.

¹³¹ a) Garegg, P. J.; Hultberg, H. *Carbohydr. Res.* **1981**, 93, C10. b) Garegg, P. J.; Hultberg, H.; Wallin, S. *Carbohydr. Res.* **1982**, 108, 97.

¹³² Pratt, M. R.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6149.

Le **Schéma 4.7** présente la synthèse des disaccharides modifiés en position C-2 à partir du disaccharide **67**. Pour ce faire, le groupement phthalamide a été déprotégé à l'aide de l'éthylènediamine dans le *tert*-butanol à 95°C pour donner le disaccharide **70** avec l'amine libre en C-2 dans un rendement de 88%.¹³³ Nous avons par la suite fait réagir l'amine libre avec le chlorure de benzoyle et le chlorure de benzènesulfonyle selon la méthode utilisée par Hindsgaul *et al.*¹³⁴ afin d'obtenir un amide et une sulfonamide aromatique en C-2, composés **71** (77%) et **72** (70%) respectivement. Ces modifications vont nous permettre de voir l'effet d'un groupement aromatique à cette position sur l'affinité avec PA-IIL. De plus, il sera possible d'évaluer la contribution de l'amide et de la sulfonamide puisque le groupement aromatique reste constant dans les deux analogues.

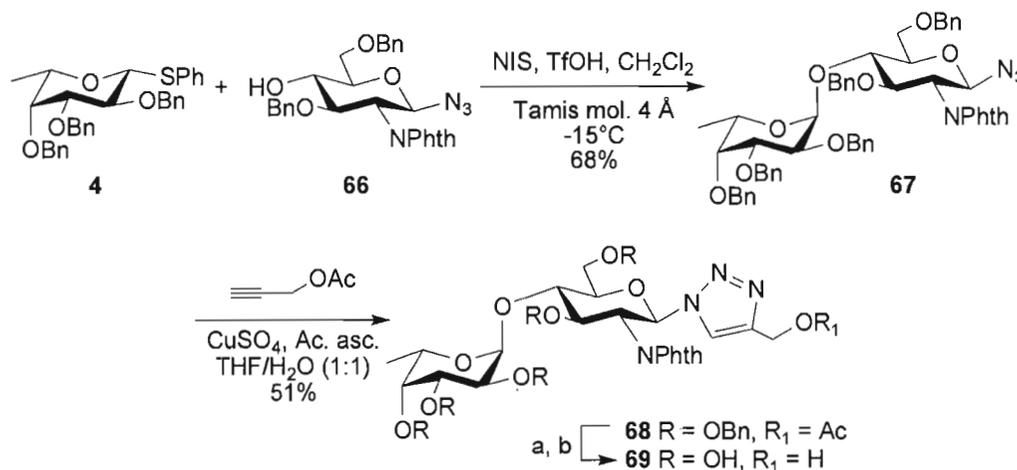


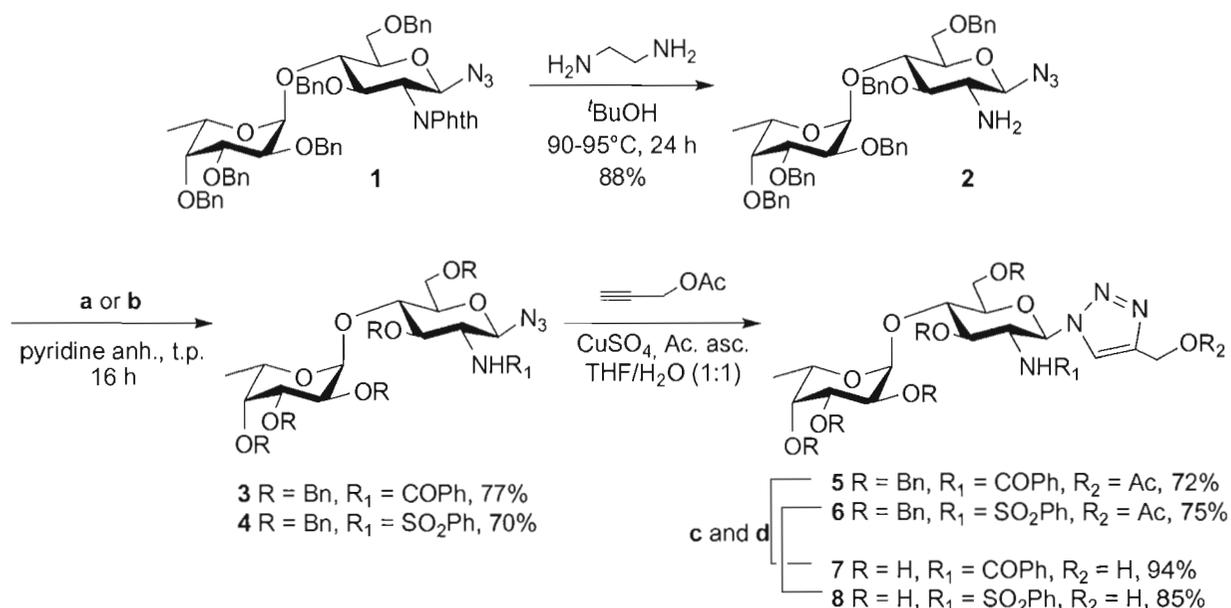
Schéma 4.6: Synthèse du disaccharide GlcNPhth

Par la suite, ces deux composés ont été soumis à la réaction de click utilisant l'acétate propargylique pour donner les disaccharides **73** et **74** dans des rendements de 72% et 75% respectivement. Finalement, les disaccharides déprotégés **75** et **76** ont été obtenus suite aux

¹³³ Rabuka, D.; Hindsgaul, O. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 2127.

¹³⁴ Fort, S.; Kim, H.-Y.; Hindsgaul, O. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7146.

étapes de déprotections usuelles par le méthanolate de sodium et une hydrogénation utilisant un catalyseur au palladium avec des rendements de 94% et 85% respectivement.



a) chlorure de benzoyle b) chlorure de benzenesulfonyle c) NaOMe/MeOH d) $\text{H}_2, \text{Pd}(\text{OH})_2, 1\text{M HCl}/\text{MeOH}$

Schéma 4.7: Synthèse des disaccharides modifiés en C-2

4.4 Conclusions

La synthèse de disaccharides modifiées en position C-2 et C-6 a été réalisée. Quelques problèmes ont été rencontrés lors des synthèses mais il a été possible de les surmonter et d'atteindre nos objectifs. Ainsi, les disaccharides **47** et **58** ont été synthétisés en utilisant NIS/TMSOTf comme promoteur et le disaccharide **67** en utilisant NIS/TfOH. La **Figure 4.2** présente les structures moléculaires des différents disaccharides modifiés en position C-2 et C-6. En espérant que les modifications apportées permettront une augmentation de l'affinité avec la PA-IIL, ces disaccharides ont été envoyés à nos

collaborateurs en France afin d'être testés par inhibition compétitive ELLA. Compte tenu des informations recueillies par cristallographie présentées au chapitre 3 et connaissant bien le site de liaison de la PA-III, le dérivé **52** devrait être un très bon candidat. Les résultats des tests ELLA nous orienteront sur les modifications futures à être réalisées.

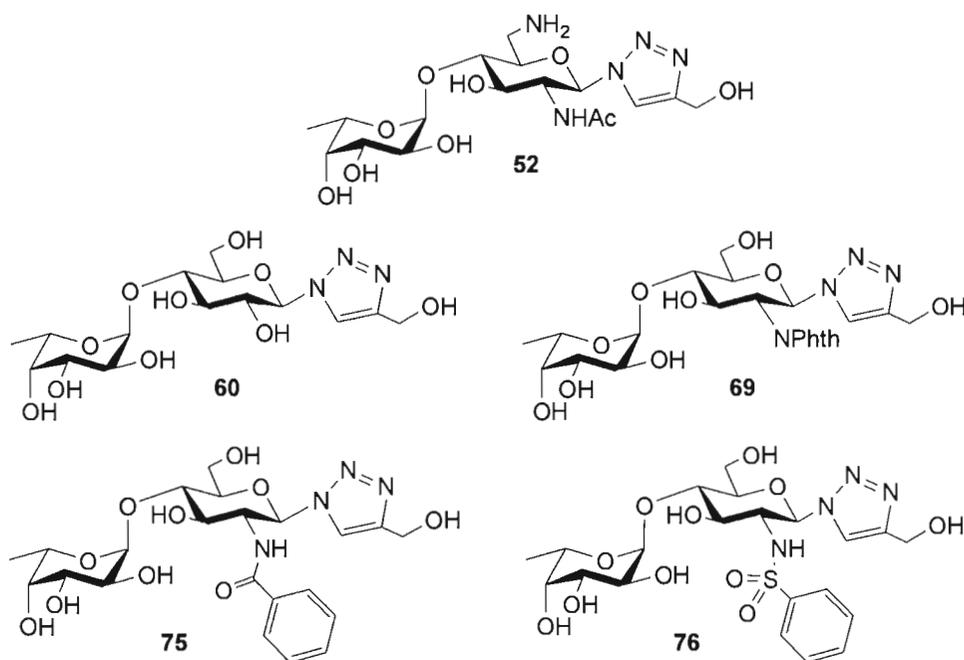


Figure 4.2: Structures moléculaires des disaccharides modifiés en position C-2 et C-6

CHAPITRE V

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Avant de se lancer à la recherche d'un nouveau composé actif, il est essentiel de se fixer une cible thérapeutique. Ici, cette cible a été la lectine PA-IIL, protéine soluble présente à la surface et dans le cytoplasme de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie, responsable de la majorité des décès chez les patients atteints de fibrose kystique, colonise les poumons en adhérant à la surface de l'épithélium pulmonaire par le biais de sa lectine PA-IIL. Des études antérieures réalisées par l'équipe du Pr. Anne Imberty ont permis d'élucider la structure de cette lectine et de mieux comprendre son interaction avec différents ligands naturels. Possédant toutes ces informations, nous avons fait la synthèse de différents analogues du disaccharide α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc pouvant agir comme inhibiteurs potentiels de l'adhésion de la bactérie *P. aeruginosa* à la surface de l'épithélium pulmonaire des patients atteints de la fibrose kystique.

Plusieurs ligands ayant tous en commun le disaccharide α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc et possédant en position anomérique différents cycle 1,2,3-triazole ont été synthétisés. Les cycles triazoles ont été obtenus en utilisant la 'Click Chemistry' faisant intervenir la cyclisation d'un azoture et d'un alcyne terminal catalysée par la présence de Cu(I). Ils ont tous présenté une forte affinité pour la lectine PA-IIL même qu'elle est environ 10 fois plus élevée que celle observée pour le L-fucose. Des études d'ITC ont établi que la constante de dissociation pour le disaccharide **18** était de 310 nM, dans la même gamme que celle mesurée pour le trisaccharide Le^a ($K_d = 210$ nM) qui est le ligand naturel possédant la meilleure affinité à l'égard de la lectine PA-IIL. Ces résultats ont également confirmé l'hypothèse de départ disant que la totalité du trisaccharide Le^a n'était pas nécessaire pour une bonne reconnaissance avec la protéine. L'obtention de structures cristallines de la PA-IIL en complexe avec les disaccharides **18** et **20** ont donné de précieuses informations quant au mode de liaison des disaccharides avec la lectine.

La synthèse de glycoclusters di- et trivalents mettant à profit la réaction de 'Click Chemistry' a été réalisée. Cependant, leurs potentiels d'inhibition ne sont que deux ou trois fois supérieurs à ceux des disaccharides contrairement à ce que nous nous attendions. Un équilibre entre rigidité, flexibilité et espacement entre les unités sucres doit être recherché au niveau de la structure d'un composé multivalent afin d'obtenir la meilleure affinité possible avec la protéine.

Deux publications ont résulté du travail présenté aux chapitres 2 et 3. La première publication présente tous les résultats des synthèses et des tests biologiques relatifs aux disaccharides.¹³⁵ Quant à la deuxième, elle présente les résultats des synthèses et des tests biologiques relatifs aux glycoclusters.¹³⁶

Le chapitre 4 a présenté la synthèse de disaccharides modifiés en position C-2 et C-6 de l'unité glucosamine. La chimie des sucres a été mise à profit et beaucoup de travail a été réalisé afin d'obtenir les disaccharides désirés. Ces modifications devraient augmenter l'affinité de la PA-IIL vis-à-vis nos dérivés. Lorsque nous aurons reçu les résultats des tests ELLA et ITC pour ces dérivés nous serons en mesure de pouvoir orienter les prochaines modifications à être effectuées.

¹³⁵ Marotte, K.; Sabin, C.; Préville, C.; Moumé-Pymbock, M.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Imberty, A.; Roy, R. *ChemMedChem*. Sous presse.

¹³⁶ Marotte, K.; Préville, C.; Sabin, C.; Moumé-Pymbock, M.; Imberty, A.; Roy, R. *Org. Biomol. Chem.* Accepté.

CHAPITRE VI

MATÉRIEL ET MÉTHODES

6.1 Généralités

L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice (Merck 60 F254) en utilisant des systèmes d'éluants appropriés. La révélation des plaques a été effectuée par irradiation sous lumière UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) et par trempage dans des révélateurs appropriés: une solution oxydante de molybdate (préparée à partir de 25 g de molybdate d'ammonium et de 10 g de sulfate cérique dissout dans 900 ml d'eau et 100 mL d'acide sulfurique concentré) ou un mélange acide (acide sulfurique/méthanol/eau: 5/45/45) ou un mélange de ninhydrine dans l'éthanol, puis par chauffage à 300°C.

Les produits bruts ont été purifiés et séparés par chromatographie rapide sous pression d'air sur colonne de gel de silice (Silice-P Flash Silica Gel, Silicycle) avec l'éluant indiqué. Les solvants employés pour la chromatographie étaient de qualité ACS et n'ont pas été distillés avant leur utilisation. Les solvants ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif Büchi utilisé sous pression réduite. Les solvants utilisés lors des réactions ont été distillés comme indiqués ci-dessous puis conservés sur tamis moléculaire, sur hydroxyde de potassium ou sur hydrure de calcium. Le dichlorométhane a été distillé sur anhydride phosphorique (P_2O_5), la pyridine sur hydroxyde de potassium, le THF sur sodium/benzophénone et le DMF sur ninhydrine. Lors des étapes de glycosylation, les solvants utilisés ont été fraîchement distillés. Les réactions se sont déroulées dans des ballons secs sous atmosphère d'azote. Tous les réactifs chimiques et solvants employés lors des expériences ont été de grade HPLC.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ^1H RMN et ^{13}C RMN ont été enregistrés avec un appareil Varian-Gemini 300BB ou Varian INOVA 500 MHz. Les spectres du ^1H ont été enregistrés à une fréquence de 300 MHz ou 500 MHz et ceux du ^{13}C à 75 MHz ou 125 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm). Pour les composés protégés et/ou solubles dans le chloroforme, la référence utilisée a été le signal du CHCl_3 résiduel dans le chloroforme deutéré (CDCl_3) à 7.27 ppm ou bien le triméthylsilane à 0 ppm pour les spectres du proton et le pic central du signal du CDCl_3 pour les spectres du carbone ($\delta = 77.0$ ppm). Pour les composés déprotégés, les échantillons ont été analysés après lyophilisation dans l'eau lourde afin d'échanger les protons labiles par des deutériums. Les mesures ont été effectuées dans l'eau lourde enrichie d'acétone. La référence utilisée a été le signal du méthyl de l'acétone à 2.22 ppm pour les spectres du proton et à 30.9 ppm pour les spectres du carbone. Les constantes de couplage (J) ont été calculées en hertz (Hz). Pour les composés les plus complexes, des expériences de type COSY (COrelated SpectroscopY), DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfert) ou HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) ont été réalisées afin d'attribuer au mieux les signaux. La notation utilisée pour la description des spectres est la suivante : s (singulet), s app. (singulet apparent), s larg. (singulet large), bd (doublet large), d (doublet), dd (doublet de doublets), ddd (doublet de doublets dédoublés), t app. (triplet apparent), m (multiplet), q app. (quadruplet apparent), H-Ar (protons aromatiques), Bn-H (proton du benzyle), Bz-H (proton du benzoyle), Ph-H (proton du phényle), Phth-H (proton du phtalimido).

Les mesures de masse nominale ont été réalisées sur un instrument LC-MSD et celles de masse exacte sur un instrument LC-MSD-Tof de la compagnie Agilent technologies en ionisation par électrospray (IES). Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) ont été enregistrés sur un appareil Bomem MB-Series. Les liquides ont été examinés tels quels en déposant une goutte entre deux pastilles de chlorure de sodium. Les solides ont été mis en solution dans le chloroforme et déposé sous forme de film sur les pastilles de NaCl. Les points de fusion ont été enregistrés avec un appareil Fisher-John et n'ont pas été corrigés. Les valeurs de rotation optique ont été déterminées à l'aide d'un appareil JASCO P-1010 et ont été enregistrés à température de la pièce. Les lyophilisations ont été effectuées sur un appareil Freeze Mobile 24 (Virtis).

6.2 Protocoles généraux

6.2.1 Désacétylation et débenzoylation par le méthanolate de sodium

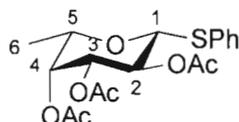
Le composé a été dissous dans le MeOH (0.1M) ou dans un mélange MeOH/THF dans le cas où la dissolution ne serait pas totale). Une quantité catalytique (généralement 0.1 équivalent) de méthanolate de sodium a été ajoutée et le mélange a été agité à température ambiante. Lorsque la déprotection est terminée, la solution a été neutralisée par une résine H^+ (Amberlite IR-120), filtrée et concentrée. Si nécessaire, le produit a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice.

6.2.2 Débenzoylation par hydrogénation catalytique

Le composé a été dissous dans le méthanol (0.02 M à 0.05M) ou bien dans un mélange MeOH/THF dans le cas où la dissolution ne serait pas totale et hydrogénéolysé en présence de dihydroxyde de palladium sur charbon à 20%. Lorsque la déprotection est terminée, le mélange a été filtré sur célite, évaporé et, si nécessaire, une colonne chromatographique sur gel de silice a été effectuée.

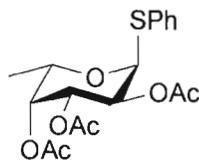
6.3 Modes opératoires et caractérisations

2,3,4-Tri-*O*-acétyl-1-thio- β -L-fucopyranoside de phényle (1)⁶⁰



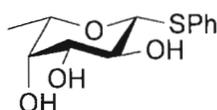
Le L-fucose peracétylé⁶¹ (308.5 mg, 0.928 mmol) a été dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (3 mL, 0.3M). La température de la solution a été abaissée à 0°C avant d'ajouter le thiophénol (2 éq., 190 μ L) puis le trifluorure de bore-diéthyléther (1.2 éq., 140 μ L). La solution a été agitée 3h sous atmosphère d'azote en laissant remonter relativement rapidement la température jusqu'à température ambiante (CCM, 7:3, hexanes/EtOAc). Le mélange réactionnel a été lavé par une solution saturée de NaHCO₃, de NaCl et finalement par de l'eau. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium et concentrée. Une purification par colonne chromatographique (9:1, hexanes/EtOAc à 8.5:1.5, hexanes/EtOAc) a permis de séparer l'anomère α (69.8 mg, 20%) de l'anomère β (290.1 mg, 80%) se présentant sous la forme d'une huile. $[\alpha]_D^{24} = -4.1$ (*c* 0.9, CHCl₃), litt.⁶⁰ $[\alpha]_D = -3.0$ (*c* 0.9, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 1.19 (d, 3H, ³*J*₆₋₅ = 6.3 Hz, H-6), 2.09, 2.15, 2.18 (s, 3 x 3H, CH₃CO), 3.85 (m, 1H, H-5), 4.72 (d, 1H, ³*J*₁₋₂ = 9.9 Hz, H-1), litt.⁶⁰ 4.71 (d, 1H, ³*J*₁₋₂ = 9.9 Hz, H-1), 5.06 (dd, 1H, ³*J*₃₋₄ = 3.3 Hz, ³*J*_{3,2} = 9.9 Hz, H-3), 5.23 (t, 1H, H-2), 5.27 (dd, 1H, ³*J*₄₋₅ < 1Hz, H-4), 7.28-7.56 (m, 5H, H-Ar).

2,3,4-Tri-*O*-acétyl-1-thio- α -L-fucopyranoside de phényle (2)



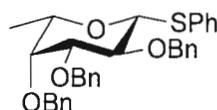
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)): 1.08 (d, 3H, ³J_{6,5} = 6.6 Hz, H-6), 1.96, 2.04, 2.11 (s, 3 x 3H, CH₃CO), 4.56 (ddd, 1H, ³J_{5,4} = 1.1 Hz, ³J_{5,6} = 6.6 Hz, H-5), 5.23 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 3.0 Hz, ³J_{3,2} = 11.3 Hz, H-3), 5.26-5.33 (m, 2H, H-2, H-4), 5.88 (d, 1H, ³J_{1,2} = 5.0 Hz, H-1), 7.18-7.40 (m, 5H, H-Ar).

1-Thio-β-L-fucopyranoside de phényle (3)⁶⁰



Le thiofucoside peracétylé **1** (276.0 mg, 0.721 mmol) a été désacétylé selon le protocole général (CCM, 7:1, CH₂Cl₂/MeOH). Le produit désiré a été obtenu quantitativement et se présente sous la forme d'un solide blanc. p.f.: 88-90°C, litt.⁶⁰ p.f.: 91-92°C; [α]_D²² = +69.9 (c 1.0, MeOH), litt.⁶⁰ [α]_D = +68.0 (c 0.6, MeOH).

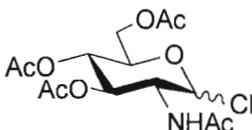
2,3,4-Tri-O-benzyl-1-thio-β-L-fucopyranoside de phényle (4)⁶⁰



À une solution du composé **3** (171.7 mg, 0.670 mmol) dans 7 mL de DMF sec (0.1M), refroidit à 0°C, a été ajouté le NaH en suspension dans l'huile (120.5 mg, NaH 60% wt). Le mélange réactionnel a été agité pendant 30 min à 0°C et le bromure de benzyle (360 μL) a été ajouté. Le mélange a été agité pendant 1.5h à température pièce et quelques gouttes de méthanol ont été ajoutées. La solution a été évaporée, reprise dans l'éther et a été extraite 3 fois avec de l'éther. Les phases organiques réunies ont été lavées avec une solution de NaCl, évaporées et séchées sur sulfate de sodium. Le composé **4** a été recristallisé (éther/hexanes) et obtenu avec un rendement de 80% (282.0 mg). p.f.: 102-104°C, litt.⁶⁰ p.f.: 107-109°C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)): 1.27 (d, 3H, ³J_{6,5} = 6.3 Hz, H-6), litt.⁶⁰ 1.26 (d, 3H, ³J_{6,5} = 6.4 Hz, H-6), 3.50-3.63 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3.93 (dd, 1H, ³J_{2,3} = 9.3

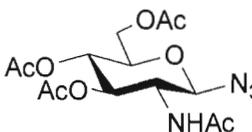
Hz, H-2), 4.61 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.6$ Hz, H-1), 4.65-4.82 (m, 5H, 5 x CH_2Ph), 5.02 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 7.33-7.59 (m, 20H, H-Ar).

Chlorure de 2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-désoxy- α,β -D-glucopyranosyle (5)⁶³



La *N*-acétyl-D-glucosamine (2.00 g, 9.041 mmol) a été déposée dans un ballon de 25 mL muni d'un barreau magnétique et a été bouché avec un septum. Par la suite, le chlorure d'acétyle (4 mL) a été ajouté. Après 16h d'agitation à température ambiante la solution obtenue est claire, rosée et légèrement visqueuse. Le mélange a été repris dans le CH_2Cl_2 , puis lavé par un mélange eau-glace (afin d'éliminer l'excès de chlorure d'acétyle) et par une solution glacée saturée de $NaHCO_3$ (afin de neutraliser la phase organique). Les lavages doivent être effectués rapidement afin d'éviter la dégradation du dérivé chloré en position anomérique. La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et partiellement évaporée afin d'éviter le début de la cristallisation. Le dérivé chloré a été facilement obtenu (2.4140 g, 73%) suite à une cristallisation dans l'éther dans un ratio 6:1 en faveur de l'anomère alpha.

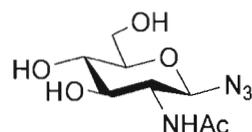
Azoture de 2-acétamido-3,4,6-tri-*O*-acétyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyle (6)



Le dérivé chloré **5** (2.0512g, 5.608 mmol) a été dissous dans 20 mL CH_2Cl_2 (10 mL/g). Une solution de Na_2CO_3 1M (20 mL, 10 mL/g) a été ajoutée ainsi que le TBAHS (2.8721 g, 8.459 mmol, 1.5 éq.) et le NaN_3 (764.8 mg, 11.764 mmol, 2 éq.). Les deux phases ont été agitées vigoureusement pendant 3h à température ambiante. La phase organique a été séparée et lavée avec de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée. Une première cristallisation

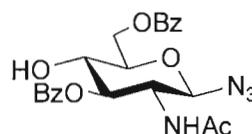
dans l'éthanol à chaud permet d'obtenir le composé azoté **6** (1.4825 g, 71%) de configuration pur β sous forme d'aiguille blanche. p.f.: 160-162°C, litt.¹³⁷ p.f.: 160-161°C. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 1.99, 2.04, 2.05, 2.11 (4 x s, 12H, 3 x OAc, NAc), 3.78 (m, 1H, H-5), 3.92 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 9.1 Hz, ³J_{2,3} = 10.4 Hz, H-2), 4.17 (dd, 1H, ³J_{6a,5} = 2.3 Hz, ²J_{6a-6b} = 12.5 Hz, H-6a), 4.28 (dd, 1H, ³J_{6b,5} = 5.0 Hz, ²J_{6b-6a} = 12.5 Hz, H-6b), 4.75 (d, 1H, ³J_{1,2} = 9.3 Hz, H-1), litt.¹³⁷ 4.74 (d, 1H, ³J_{1,2} = 9.3 Hz, H-1), 5.11 (t app., 1H, ³J_{4,3} \equiv ³J_{4,5} = 10.0 Hz, H-4), 5.25 (t app., 1H, ³J_{3,2} \equiv ³J_{3,4} = 10.4 Hz, H-3), 5.59 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz, NHAc). **IR (film, cm⁻¹)** ν : 2122 (N₃), 1748 (carbonyle).

Azoture de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyle (7)



Le composé **6** (1.3 g, 3.491 mmol) a été désacétylé selon le protocole général décrit et a permis d'obtenir quantitativement le produit **7** (860 mg). p.f.: 138-140°C, litt.¹³⁸ p.f.: 142°C; $[\alpha]_D^{24} = -23.3$ (c 1.0, H₂O), litt.¹³⁸ $[\alpha]_D = -30.0$ (c 1.0, H₂O).

Azoture de 2-acétamido-3,6-di-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyle (8)



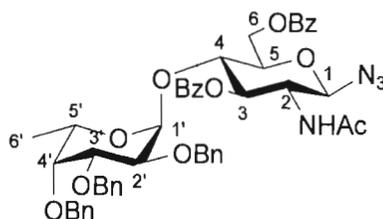
Le composé **7** (510.3 mg, 2.073 mmol) a été préalablement coévaporé (2x) avec de la pyridine anhydre et séché sous vide pendant une nuit. Il a été par la suite dissous dans un mélange CH₂Cl₂ anh./pyridine anh. (1:1, 20 mL/20 mL) et plongé dans un bain à -45°C. Le chlorure de benzoyle (525 μ L, 4.556 mmol, 2.2 éq.) a été ajouté goutte à goutte pendant

¹³⁷ Thiem, J.; Wiemann, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 80.

¹³⁸ Michell, F. ; Wulff, H. *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 1521.

environ 15-20 min. Le mélange réactionnel a été agité à -45°C pendant 3h et la température a été laissée remontée à température pièce. Après l'addition de quelques gouttes de méthanol, la solution a été diluée avec du CH_2Cl_2 et la phase organique a été successivement lavée avec une solution de HCl 3%, NaHCO_3 et H_2O . Elle a été séchée sur Na_2SO_4 et concentrée. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (1:1, hexanes/EtOAc) pour donner 583.9 mg (62%) de l'accepteur *bis*-benzoylé **8** sous forme d'un solide blanc. p.f.: 170°C (décomp.); $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -36.1$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 1.90 (s, 3H, CH_3CO), 3.48 (s larg., 1H, OH), 3.84 (m, 2H, H-4, H-5), 4.15 (dd, 1H, $^3J_{2,1} = 9.3$ Hz, $^3J_{2,3} = 10.4$ Hz, H-2), 4.63 (d, 1H, $^2J_{6a,6b} = 12.6$ Hz, H-6a), 4.78 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.3$ Hz, H-1), 4.80 (dd, 1H, $^3J_{6b,5} = 3.8$ Hz, $^2J_{6b,6a} = 12.1$ Hz, H-6b), 5.45 (t app., 1H, H-3), 6.00 (s larg., 1H, *NHAc*), 7.40-8.10 (m, 10H, H-Ar). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 23.2 (NHCOCH_3), 53.8, 63.3, 68.9, 75.4, 76.3, 88.7 (C-1), 128.5, 128.6, 128.8, 129.3, 129.9, 133.5, 133.8, 167.2 (C=O), 167.5 (C=O), 170.7 (C=O). SM (ESI): m/Z calc. pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7$: 454.2; trouvé: 455.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

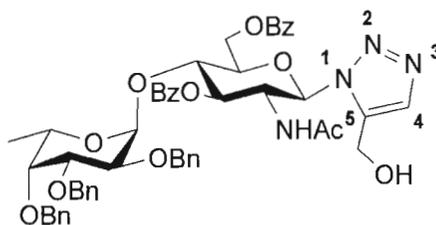
Azoture de (2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyle (9)



Le donneur de thioglycoside **4** (695.0 mg, 1.3 mmol, 1.2 éq.) et l'accepteur **8** (500 mg, 1.1 mmole, 1.0 éq.) ont été dissous dans du CH_2Cl_2 sec (16.5 mL, 0.1M). Après ajout de tamis moléculaire 4\AA , la solution a été agitée 1h à température ambiante avant d'être plongée dans un bain à -15°C . Le *N*-iodosuccinimide (322 mg, 1.4 mmol, 1.3 éq.) et l'acide trifluorométhanesulfonique (78 μL , 0.880 mmol, 0.8 éq.) ont alors été ajoutés. Le mélange a été agité 1h à -15°C , puis neutralisé avec une goutte de triéthylamine. Le tamis moléculaire a été filtré et la phase organique a été lavée par une solution à 10% de thiosulfate de sodium.

Les phases aqueuses ont été extraites 3 fois par de petits volumes de dichlorométhane. Les phases organiques réunies ont été séchées sur sulfate de sodium et concentrées. L'huile obtenue a été purifiée par colonne chromatographique sur gel de silice (1:1, hexanes/EtOAc) pour donner 900.2 mg (94%) du disaccharide **9** sous forme de mousse. Le produit peut être précipité dans l'éther pour donner une poudre blanche. p.f.: 164-166°C; $[\alpha]_D^{22} = -68.3$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)): 0.64 (d, 3H, ³J_{6',5'} = 6.6 Hz, H-6'), 1.78 (s, 3H, CH₃CO), 3.48 (s app., 1H, H-4'), 3.71 (m, 1H, H-5'), 3.85 (dd, 1H, ³J_{3',4'} = 2.5 Hz, ³J_{3',2'} = 10.2 Hz, H-3'), 3.90 (m, 1H, H-5), 3.95 (dd, 1H, ³J_{2',1'} = 3.3 Hz, H-2'), 4.01 (t app, 1H, ³J = 9.1 Hz, H-4), 4.17 (m, 1H, H-2), 4.51 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.63-4.74 (m, 4H, 2 x CH₂Ph, H-1, H-6a), 4.78 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.81 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, CH₂Ph), 4.84 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, CH₂Ph), 4.87 (d, 1H, H-1'), 4.96 (dd, 1H, ³J_{6b,5} = 2.2 Hz, ²J = 12.4 Hz, H-6b), 5.41 (dd, 1H, ³J₃₋₂ = 8.5 Hz, H-3), 5.74 (d, 1H, ³J_{NH-2} = 9.3 Hz, NHAc), 7.18-7.98 (m, 21H, H-Ar), 7.97 (2 x bd, 2 x 2H, ⁴J = 8.5 Hz, H-Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ(ppm)): 16.0, 23.1, 53.9, 62.8, 67.7, 72.7, 74.0, 74.3, 74.8, 75.2, 75.4, 75.5, 79.2, 88.5, 100.0, 127.4, 127.5, 127.6, 127.8, 128.1, 128.3, 128.3, 128.4, 128.6, 129.0, 129.8, 129.9, 133.1, 133.6, 138.0, 138.3, 138.5, 166.0, 167.0, 170.3. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₄₉H₅₀N₄O₁₁: 870.3; trouvé: 871.4 [M + H]⁺.

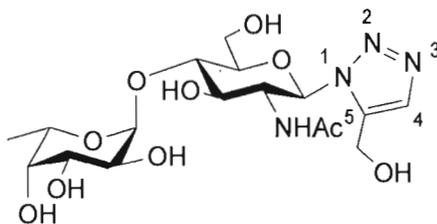
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-5-méthanol (13)



Le disaccharide **9** (150.0 mg, 0.172 mmol) a été dissous dans 1.5 mL de toluène (0.1M) et l'alcool propargylique **10** (11 μ L, 0.190 mmol, 1.1 éq.) a été ajouté. Le mélange a été agité sous tube scellé pendant 6 jours à 75°C. Lorsque la réaction a été terminée (CCM, 30:1, CH₂Cl₂/MeOH), le mélange a été concentré et les régioisomères ont été séparés par

chromatographie sur gel de silice (20:1, CH₂Cl₂/MeOH). Les régioisomères-1,5 et 1,4 ont été obtenus avec des rendements de 38% (57.5 mg) et 45% (67.9 mg) respectivement. Analyse du composé **13**: $[\alpha]_D^{21} = -48.5$ (*c* 0.71, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 0.63 (d, 3H, ³J_{6'-5'} = 6.4 Hz, H-6'), 1.63 (s, 3H, CH₃CO), 3.61 (s app., 1H, H-4'), 3.81 (m, 1H, H-5'), 3.88 (dd, 1H, ³J_{3'-4'} = 2.5 Hz, ³J_{3'-2'} = 10.4 Hz, H-3'), 4.00-4.08 (m, 2H, H-2', CH₂OH), 4.21 (m, 1H, H-5), 4.33 (m, 1H, H-4), 4.49 (d, 1H, ²J = 11.6 Hz, CH₂Ph), 4.53 (d, 1H, ²J = 11.3 Hz, CH₂Ph), 4.61 (d, 1H, ²J = 11.6 Hz, CH₂Ph), 4.71-4.94 (m, 6H, 3 x CH₂Ph, H-6a, 2 x CH₂OH), 5.01-5.10 (m, 3H, H-6b, H-2, H-1'), 5.83 (dd, 1H, ³J₃₋₄ = 9.0 Hz, ³J₃₋₂ = 10.5 Hz, H-3), 6.16 (d, 1H, ³J₁₋₂ = 10.0 Hz, H-1), 6.69 (d, 1H, ³J_{NH-2} = 9.7 Hz, NHAc), 7.16-7.68 (m, 21H, H-Ar), 7.66 (s, 1H, H-triazole), 8.03-8.14 (m, 4H, H-Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 15.9, 22.6, 52.6, 53.6, 62.0, 67.8, 71.9, 74.1, 74.5, 74.7, 75.0, 75.7, 77.2, 77.3, 79.4, 87.7, 101.0, 127.3, 127.4, 127.5, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6, 128.6, 128.7, 129.5, 129.7, 130.0, 133.4, 134.0, 135.3, 137.7, 138.3, 138.4, 165.9, 167.7, 171.5. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₅₂H₅₄N₄O₁₂: 927.0; trouvé: 950.3 [M + Na]⁺.

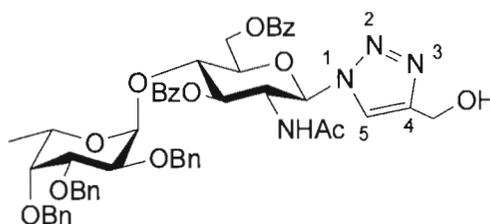
1-[(α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-5-méthanol (14**)**



Le disaccharide **13** (55.9 mg, 0.060 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (10:1, CH₂Cl₂/MeOH), 34.5 mg (79%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (30.9 mg, 0.043 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 13.6 mg (71%) du produit déprotégé **14** sous forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 166-169°C; $[\alpha]_D^{22} = -114.7$ (*c* 1.0, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.18 (d, 3H, ³J_{6'-5'} = 6.5 Hz, H-6'), 1.81 (s, 3H, CH₃CO), 3.76-4.04 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6, H-2', H-3', H-

4'), 4.35-4.50 (m, 2H, H-2, H-5'), 4.84 (s, 2H, CH₂O), 5.01 (d, 1H, ³J_{1,2} = 3.0 Hz, H-1'), 5.88 (d, 1H, ³J_{1,2} = 9.7 Hz, H-1), 7.76 (s, 1H, H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.3, 52.6, 56.1, 60.4, 67.7, 68.7, 70.1, 72.6, 73.0, 77.4, 79.1, 85.4, 100.4, 134.0, 138.9, 174.7. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₁₇H₂₈N₄O₁₀: 448.2; trouvé: 471.3 [M + Na]⁺.

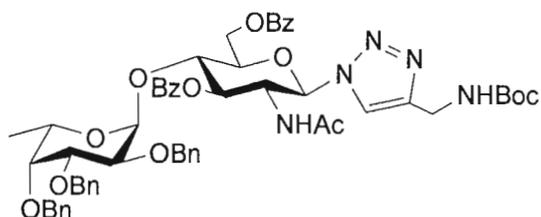
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1→4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthanol (15)



Le disaccharide **9** (40.0 mg, 0.046 mmol, 1.0 éq.) a été dissous dans un mélange *tert*-butanol/eau (v/v 1:1, 0.04M). Le sulfate de cuivre (2.3 mg, 0.0092 mmol, 0.2 éq.), l'acide ascorbique (3.6 mg, 0.018 mmol, 0.4 éq.) et l'alcool propargylique **10** (3.5 μ L, 0.055 mmol, 1.2 éq.) ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été agité à température pièce pendant 18h. Le produit a été extrait avec du dichlorométhane. La phase organique a été lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium puis par une solution saturée de chlorure de sodium. Les phases organiques réunies ont été séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (20:1, CH₂Cl₂/MeOH) a permis de recueillir 34.1 mg (80%) du produit **15** sous forme d'huile légèrement jaune. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -49.8$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 0.57 (d, 3H, ³J_{6'-5'} = 6.4 Hz, H-6'), 1.44 (s, 3H, CH₃CO), 3.50 (s app., 1H, H-4'), 3.72 (m, 1H, H-5'), 3.85 (dd, 1H, ³J_{3'-4'} = 2.3 Hz, ³J_{3'-2'} = 10.3 Hz, H-3'), 3.95 (dd, 1H, ³J_{2'-1'} = 3.3 Hz, H-2'), 4.13 (m, 1H, H-5), 4.17 (m, 1H, H-2), 4.46 (d, 1H, ²J = 11.4 Hz, CH₂Ph), 4.58-4.71 (m, 7H, H-4, H-6a, 3 x CH₂Ph, 2 x CH₂OH), 4.77, 4.80 (2 x d, 2 x 1H, ²J = 11.4 Hz, CH₂Ph), 4.89 (d, 1H, H-1'), 4.96 (bd, 1H, ²J = 12.4 Hz, H-6b), 5.71 (m, 1H, H-3), 6.03 (d, 1H, ³J_{1,2} = 9.9 Hz, H-1), 6.74 (d, 1H, ³J_{NH-2} = 9.4 Hz, NHAc), 7.10-7.60 (m, 21H, H-Ar), 7.79 (s, 1H, H-triazole), 7.94, 8.00 (2 x bd, 2 x

2H, $^3J = 7.2$ Hz, H-Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 16.0, 22.6, 53.7, 56.3, 62.5, 67.7, 72.4, 74.4, 74.5, 74.9, 75.0, 75.7, 76.7, 77.3, 79.3, 86.2, 100.7, 127.4, 127.4, 127.5, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.9, 129.6, 129.7, 129.9, 133.2, 133.7, 137.8, 138.3, 138.5, 165.9, 167.1, 170.7. SM (ESI): m/Z calc. pour $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{12}$: 927.0; trouvé: 950.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

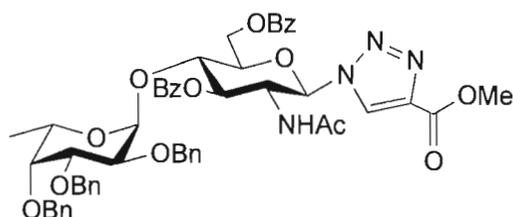
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-*tert*-butyl méthylcarbamate (16)



Le disaccharide **9** (150.0 mg, 0.172 mmol) a été dissous dans un mélange $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v, 0.04M). Le *N*-Boc propargylamine **11**⁹⁷ (32.1 mg, 0.210 mmol, 1.2 éq.), le sulfate de cuivre (8.6 mg, 0.034 mmol, 0.2 éq.) et l'acide ascorbique (13.6 mg, 0.069 mmol, 0.4 éq.) ont été ajoutés. Après 16h d'agitation à température ambiante, la solution a été extraite par EtOAc et lavée avec des solutions saturées de NaHCO_3 et de NaCl . Les phases organiques ont été réunies, séchées sur Na_2SO_4 et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (20:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) a permis de recueillir 157.2 mg (89%) du produit **16** sous forme d'huile incolore. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -50.3$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 0.59 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.3$ Hz, H-6'), 1.38 (s, 9H, ^tBu), 1.54 (s, 3H, CH_3CO), 3.59 (s app., 1H, H-4'), 3.77 (m, 1H, H-5'), 3.87 (bd, 1H, $^3J_{3',2'} = 10.7$ Hz, H-3'), 3.98 (dd, 1H, $^3J_{2',1'} = 3.6$ Hz, H-2'), 4.20-4.30 (m, 2H, H-4, H-5), 4.30-4.40 (m, 2H, CH_2NHBoc), 4.48, 4.52 (2 x d, 2 x 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 4.60 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.67-4.85 (m, 5H, 3 x CH_2Ph , H-2, H-6a), 4.95 (d, 1H, H-1'), 5.06 (bd, 1H, $^2J = 12.4$ Hz, H-6b), 5.13 (m, 1H, NHBoc), 5.85 (m, 1H, H-3), 6.11 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.9$ Hz, H-1), 6.93 (s app., 1H, NHAc), 7.11-7.62 (m, 21H, H-Ar), 7.78 (s, 1H, H-triazole), 8.00-8.07 (m, 4H, H-Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 15.9, 22.6, 28.2, 36.0, 53.6, 62.3, 67.7, 72.1,

74.3, 74.6, 74.9, 75.7, 76.8, 77.2, 79.4, 86.1, 100.8, 120.5, 127.3, 127.4, 127.7, 128.0, 128.1, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.8, 129.6, 129.7, 129.9, 133.2, 133.8, 137.7, 138.3, 138.4, 145.8, 155.5, 165.7, 167.4, 170.3. **SM (ESI):** m/Z calc. pour $C_{17}H_{26}N_4O_{11}$: 1026.1; trouvé: 1027.4 $[M + H]^+$.

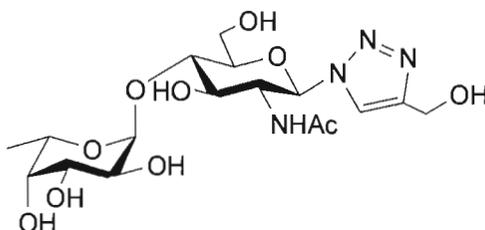
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylate de méthyle (17)



Le disaccharide **9** (50.0 mg, 0.057 mmol) a été dissous dans un mélange t BuOH/ H_2O (1:1 v/v, 0.04M). Le propiolate de méthyl **12** (6.1 μ L, 0.069 mmol, 1.2 éq.), le sulfate de cuivre (2.9 mg, 0.011 mmol, 0.2 éq.) et l'acide ascorbique (4.5 mg, 0.023 mmol, 0.4 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité 4h à 55°C. La solution a été extraite avec EtOAc. La phase organique a été lavée successivement par une solution saturée de $NaHCO_3$ et de NaCl. Les phases organiques ont été réunies, séchées sur Na_2SO_4 et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (1:1, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 42.0 mg (77%) du composé **17** sous forme d'huile incolore. $[\alpha]_D^{22} = -59.0$ (c 1.0, $CHCl_3$). **1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)):** 0.58 (d, 3H, $^3J_{6'-5'} = 6.3$ Hz, H-6'), 1.58 (s, 3H, CH_3CO), 3.60 (s app., 1H, H-4'), 3.74-3.80 (m, 1H, H-5'), 3.86 (dd, 1H, $^3J_{3'-4'} = 2.5$ Hz, $^3J_{3'-2'} = 10.2$ Hz, H-3'), 3.88 (s, 3H, CH_3O), 3.98 (dd, 1H, $^3J_{2'-1'} = 3.6$ Hz, H-2'), 4.27 (m, 1H, H-4), 4.48, 4.53 (2 x d, 2 x 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 4.60 (d, 1H, $^2J = 11.3$ Hz, CH_2Ph), 4.69-4.84 (m, 6H, H-2, H-5, H-6a, 3 x CH_2Ph), 4.95 (d, 1H, H-1'), 5.08 (bd, 1H, $^2J = 12.4$ Hz, H-6b), 5.83 (m, 1H, H-3), 6.13 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 9.9$ Hz, H-1), 6.54 (s app., 1H, $NHAc$), 7.12-8.07 (m, 25H, H-Ar), 8.37 (s, 1H, H-triazole). **^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)):** 15.9, 22.6, 52.2, 53.9, 62.3, 67.8, 72.1, 74.3, 74.4, 74.5, 75.0, 75.7, 77.2, 79.4, 86.5, 101.0, 126.5, 127.4, 127.5, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.7, 129.6, 129.7, 129.9, 133.3,

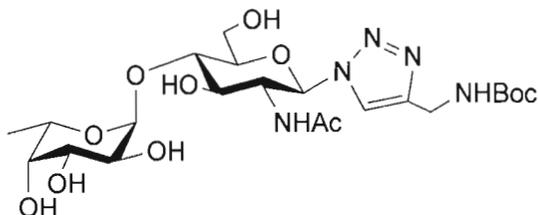
134.0, 137.7, 138.2, 138.3, 140.2, 160.6, 165.7, 167.5, 170.5. **SM (ESI):** m/Z calc. pour $C_{53}H_{54}N_4O_{13}$: 955.0; trouvé: 978.3 $[M + Na]^+$.

1-[(α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthanol (18)



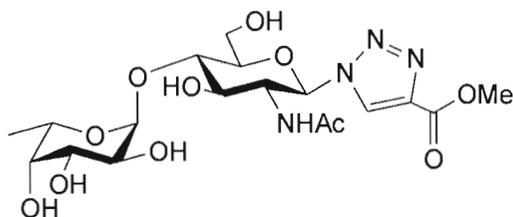
Le disaccharide **15** (90.0 mg, 0.097 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (20:1, $CH_2Cl_2/MeOH$), 60.0 mg (86%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (57.0 mg, 0.079 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 34.8 mg (98%) du produit déprotégé **18** sous forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 168-170°C; $[\alpha]_D^{22} = -114.7$ (c 1.0, MeOH). **1H -RMN (300 MHz, D_2O /Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)):** 1.18 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.0$ Hz, H-6'), 1.83 (s, 3H, CH_3CO), 3.77-4.02 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6, H-2', H-3', H-4'), 4.29 (m, 1H, H-2), 4.40 (m, 1H, H-5'), 4.72 (s, 2H, CH_2O), 5.02 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.0$ Hz, H-1'), 5.86 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.6$ Hz, H-1), 8.20 (s, 1H, H-triazole). **^{13}C -RMN (75 MHz, D_2O /Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)):** 15.9, 22.3, 55.2, 56.5, 60.3, 67.7, 68.7, 70.1, 72.6, 72.9, 77.2, 79.0, 86.9, 100.4, 123.3, 147.8, 174.9. **SM (ESI):** m/Z calc. pour $C_{17}H_{28}N_4O_{10}$: 448.2; trouvé: 471.3 $[M + Na]^+$.

1-[(α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-*tert*-butyl méthylcarbamate (19)



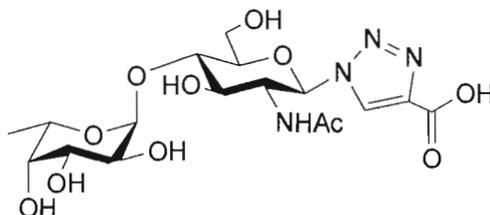
Le disaccharide **16** (135.0 mg, 0.132 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (20:1, CH₂Cl₂/MeOH), 93.6 mg (87%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (89.2 mg, 0.110 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 60.1 mg (quant.) du produit déprotégé **19** sous forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 186-188°C (décomp.); $[\alpha]_D^{22} = -103.2$ (*c* 1.0, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.18 (d, 3H, ³J_{6',5'} = 6.6 Hz, H-6'), 1.41 (s, 9H, 'Bu), 1.82 (s, 3H, CH₃CO), 3.76-4.00 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6, H-2', H-3', H-4'), 4.27 (m, 1H, H-2), 4.33 (m, 2H, CH₂NH), 4.39 (m, 1H, H-5'), 5.01 (d, 1H, ³J_{1'-2'} = 3.6 Hz, H-1'), 5.83 (d, 1H, ³J₁₋₂ = 9.9 Hz, H-1), 8.08 (s, 1H, H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.3, 28.3, 35.9, 56.4, 60.3, 67.7, 68.7, 70.1, 72.6, 73.0, 77.2, 79.0, 86.8, 100.4, 122.9, 158.6, 174.7. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₂₂H₃₇N₅O₁₁: 547.2; trouvé: 570.4 [M + Na]⁺.

1-[(2,3,4- α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate de méthyle (20)



Le disaccharide **17** (60.0 mg, 0.063 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (20:1, CH₂Cl₂/MeOH), 42.6 mg (91%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (40.1 mg, 0.054 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 24.1 mg (94%) du produit déprotégé **20**. $[\alpha]_D^{22} = -97.9$ (*c* 0.66, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.18 (d, 3H, ³J_{6-5'} = 6.5 Hz, H-6'), 1.83 (s, 3H, CH₃CO), 3.80-4.04 (m, 11H, CH₃O, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6, H-2', H-3', H-4'), 4.28 (m, 1H, H-2), 4.41 (m, 1H, H-5'), 5.02 (d, 1H, ³J_{1'-2'} = 3.0 Hz, H-1'), 5.93 (d, 1H, ³J₁₋₂ = 9.8 Hz, H-1), 8.82 (s, 1H, H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.2, 53.4, 56.6, 60.3, 67.8, 68.7, 70.1, 72.6, 72.8, 77.1, 79.1, 87.2, 100.5, 128.8, 140.0, 162.7, 174.8. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₁₈H₂₈N₄O₁₁: 476.2; trouvé: 499.3 [M + Na]⁺.

1-[(2,3,4- α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-acide carboxylique (21**)**

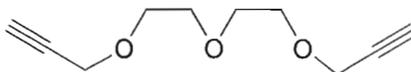


L'ester méthylique **20** (13.4 mg, 0.028 mmol) a été dissous dans un mélange MeOH/H₂O (2:1 v/v). L'hydroxyde de lithium (2 éq.) a été ajouté et après 1 h à température de la pièce, la réaction est complétée. Le milieu réactionnel a été neutralisé avec une résine Amberlite IR-120 (H+), filtré et concentré. Une purification par colonne chromatographique (2:1, CH₂Cl₂/MeOH) suivie d'une microfiltration (filtre nylon 0.22 μ m) a permis de recueillir 8.8 mg (68%) du dérivé acide **21**. $[\alpha]_D^{22} = -106.7$ (*c* 0.45, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.17 (d, 3H, ³J_{6-5'} = 6.6 Hz, H-6'), 1.83 (s, 3H, CH₃CO), 3.79-4.02 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6, H-2', H-3', H-4'), 4.31 (m, 1H, H-2), 4.41 (m, 1H, H-5'), 5.01 (d, 1H, ³J_{1'-2'} = 3.6 Hz, H-1'), 5.89 (d, 1H, ³J₁₋₂ = 9.8 Hz, H-1), 8.41 (s, 1H, H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.3,

56.4, 60.3, 67.7, 68.7, 70.1, 72.6, 72.9, 77.2, 79.1, 86.8, 100.4, 126.7, 145.6, 167.8, 174.5.

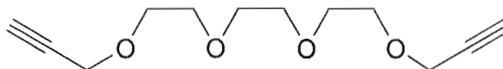
SM (ESI): m/Z calc. pour $C_{17}H_{26}N_4O_{11}$: 462.2; trouvé: 485.3 $[M + Na]^+$.

Bis-(*O*-propargyl)diéthylèneglycol (26)



L'alcool propargylique (105 μ L, 1.8 mmol, 5 éq.) a été dissous dans 3.6 mL de THF anhydre. La température a été abaissée à 0°C et le NaH (72.3 mg, 1.8 mmol, 5 éq.) a été ajouté. Ce mélange a été agité 10 min et transféré à l'aide d'une canule à une solution de *bis-O*-tosyl-diéthylène glycol **22** commercial (150.0 mg, 0.36 mmol) dans le THF (3.6 mL) à 0°C. Après une nuit à 55°C sous atmosphère d'azote, le milieu réactionnel a été repris dans l'acétate d'éthyle et lavé à l'eau. La phase aqueuse a été extraite 3 fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies ont été séchées sur sulfate de sodium puis concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (3:1, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 31.1 mg (47%) du produit *bis*-propargylé **26** connu¹³⁹ sous forme d'huile légèrement jaune. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 2.43 (t, 2H, ⁴J = 2.2 Hz, CH₂-C≡CH), 3.70 (m, 8H, O-CH₂), 4.21 (d, 4H, CH₂-C≡CH).

Bis-(*O*-propargyl)triéthylèneglycol (27)



À une solution de triéthylène glycol **23** (222 μ L, 1.7 mmol) dans le THF anhydre (5.5 mL) refroidit à 0°C a été ajouté le NaH (171.7 mg, 4.3 mmol, 2.5 éq.). Après 5 min d'agitation, une quantité catalytique d'iodure de tétrabutylammonium et le bromure de propargyl (538 μ L, 5 mmol, 3 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité 2 jours à température pièce sous atmosphère d'azote. Quelques gouttes de méthanol ont été ajoutées

¹³⁹ Yao, Z.-J.; Wu, H.-P.; Wu, Y.-L. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2484.

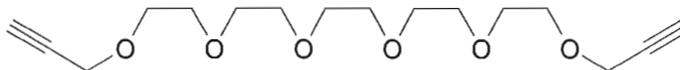
et le mélange a été concentré. Le produit brut a été dissous dans l'acétate d'éthyle, lavé avec de l'eau et la phase organique a été séchée sur sulfate de sodium. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (7:3, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 261.0 mg (69%) du produit **27**¹³⁹ sous forme d'huile légèrement jaune. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)): 2.43 (t, 2H, ⁴J = 2.5 Hz, CH₂-C≡CH), 3.70 (m, 12H, O-CH₂), 4.22 (d, 4H, CH₂-C≡CH).

Bis-(O-propargyl)tétraéthylèneglycol (28)



À une solution de tétraéthylène glycol **24** (222 µL, 1.3 mmol) dans le THF anhydre (6.5 mL) refroidit à 0°C a été ajouté le NaH (129.0 mg, 3.2 mmol, 2.5 éq.). Après 5 min d'agitation, une quantité catalytique d'iodure de tétrabutylammonium et le bromure de propargyl (416 µL, 3.9 mmol, 3 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité 2.5 jours à température pièce sous atmosphère d'azote. Quelques gouttes de méthanol ont été ajoutées et le mélange a été concentré. Le produit brut a été dissous dans l'acétate d'éthyle, lavé avec de l'eau et la phase organique a été séchée sur sulfate de sodium. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (1:1, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 303.1 mg (87%) du dérivé *bis*-propargylé **28**¹⁴⁰ sous forme d'huile légèrement jaune. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)): 2.44 (t, 2H, ⁴J = 2.2 Hz, CH₂-C≡CH), 3.70 (m, 16H, O-CH₂), 4.21 (d, 4H, CH₂-C≡CH).

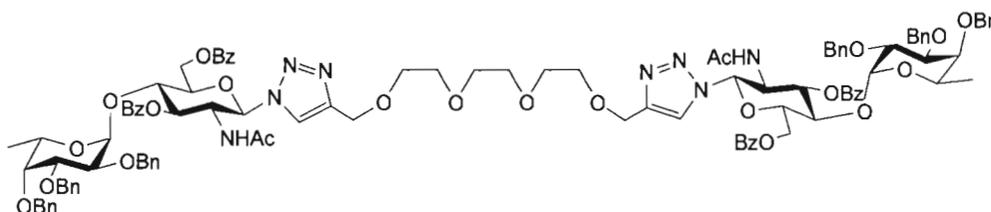
Bis-(O-propargyl)pentaéthylèneglycol (29)



¹⁴⁰ (a) McPhee, M. M.; Kerwin, S. M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9385. (b) McPhee, M. M.; Kerwin, S. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *9*, 2809.

Hz, 2 x CH_2Ph), 4.56-4.78 (m, 12H, 2 x H-6a, 6 x CH_2Ph , 4 x OCH_2 -triazole), 4.83 (m, 2H, 2 x H-2), 4.83 (d, 2H, $^2J = 11.8$ Hz, 2 x CH_2Ph), 4.87 (d, 2H, $^2J = 11.3$ Hz, 2 x CH_2Ph), 4.97 (d, 2H, $^3J_{1,2'} = 3.4$ Hz, 2 x H-1'), 5.06 (bd, 2H, $^2J = 11.1$ Hz, 2 x H-6b), 5.80 (m, 2H, 2 x H-3), 6.14 (d, 2H, $^3J_{1,2} = 10.0$ Hz, 2 x H-1), 6.74 (d, 2H, $^3J_{NH-2} = 9.3$ Hz, 2 x $NHAc$), 7.10-7.65 (m, 42H, H-Ar), 7.88 (s, 2H, 2 x H-triazole), 8.02-8.09 (m, 8H, H-Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)): 16.0, 22.6, 53.8, 62.8, 64.2, 67.9, 69.5, 70.4, 72.6, 74.3, 74.8, 74.9, 75.4, 76.0, 77.7, 79.3, 86.0, 100.7, 121.8, 127.5, 127.7, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 129.3, 129.7, 129.8, 133.1, 133.6, 138.0, 138.5, 138.6, 145.3, 165.9, 167.0, 170.4.

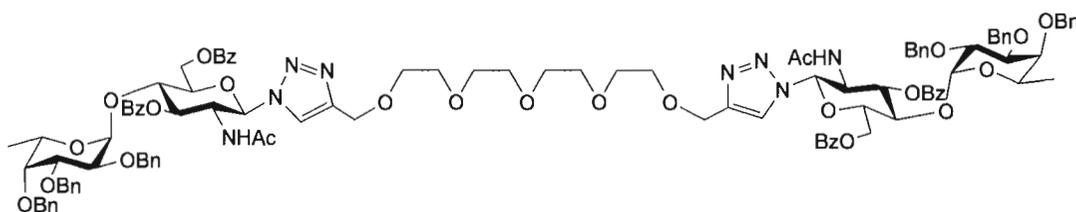
***Bis-O*-[1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3,6-di-*O*-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyl] triéthylèneglycol (33)**



Le disaccharide **9** (100.0 mg, 0.110 mmol, 2.1 éq.) et le linker *bis*-propargylé **27** (12.4 mg, 0.055 mmol, 1.0 éq.) ont été dissous dans le THF (1.15 mL). L'iodure de cuivre (6.2 mg, 0.032 mmol, 0.6 éq.) et la *N,N'*-diisopropyléthylamine (19 μ L, 0.110 mmol, 2.0 éq.) ont été ajoutés. La solution a été agitée pendant une nuit à température ambiante puis concentrée. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (25:1, $CH_2Cl_2/MeOH$) a permis de recueillir 108.6 mg (quant.) de dimère protégé **33** sous forme d'huile. $[\alpha]_D^{21} = -41.6$ (*c* 1.0, $CHCl_3$). 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)): 0.65 (d, 6H, $^3J_{6,5'} = 6.4$ Hz, 6 x H-6'), 1.58 (s, 6H, 2 x CH_3CO), 3.48-3.56 (m, 14H, 2 x H-4', 12 x CH_2O), 3.76 (m, 2H, 2 x H-5'), 3.89 (dd, 2H, $^3J_{3',4'} = 2.3$ Hz, $^3J_{3',2'} = 10.4$ Hz, 2 x H-3'), 3.97 (dd, 2H, $^3J_{2',1'} = 3.3$ Hz, 2 x H-2'), 4.07 (m, 2H, 2 x H-5), 4.14 (m, 2H, 2 x H-4), 4.52 (d, 2H, $^2J = 11.5$ Hz, 2 x CH_2Ph), 4.57-4.89 (m, 18H, 2 x H-6a, 10 x CH_2Ph , 4 x OCH_2 -triazole, 2 x H-2), 4.91 (m, 2H, $^3J_{1',2'} = 3.3$ Hz, 2 x H-1'), 4.97 (bd, 2H, $^2J = 11.1$ Hz, 2 x H-6b), 5.72 (m, 2H, 2 x H-3), 6.10 (d, 2H, $^3J_{1,2} = 10.0$ Hz, 2 x H-1), 6.45 (d, 2H, $^3J_{NH-2} = 9.3$ Hz, 2 x $NHAc$),

7.17-7.62 (m, 42H, H-Ar), 7.82 (s, 2H, 2 x H-triazole), 7.95-8.09 (m, 8H, H-Ar). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 16.0, 22.6, 53.9, 62.7, 64.2, 67.8, 69.5, 70.4, 70.5, 72.5, 74.3, 74.7, 75.0, 75.2, 76.0, 76.9, 77.6, 79.3, 86.1, 100.8, 121.7, 127.5, 127.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 129.2, 129.7, 129.9, 133.1, 133.6, 138.0, 138.5, 138.6, 145.4, 165.8, 167.1, 170.4. **SM (ESI)**: m/Z calc. pour $\text{C}_{110}\text{H}_{118}\text{N}_8\text{O}_{26}$: 1968.2; trouvé: 1991.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Bis-O-[1-[(2,3,4-Tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3,6-di-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthyl] tétraéthylèneglycol (34)

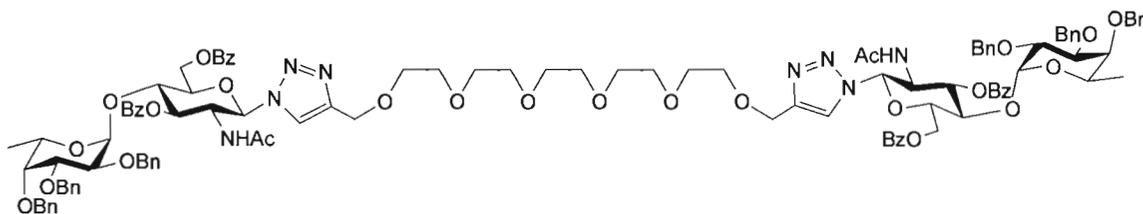


Le disaccharide **9** (100.0 mg, 0.110 mmol, 2.1 éq.) et le linker *bis*-propargylé **28** (14.8 mg, 0.055 mmol, 1.0 éq.) ont été dissous dans le THF (1.15 mL). L'iodure de cuivre (6.2 mg, 0.032 mmol, 0.6 éq.) et la *N,N'*-diisopropyléthylamine (19 μL , 0.110 mmol, 2.0 éq.) ont été ajoutés. La solution a été agitée pendant une nuit à température ambiante puis concentrée. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (20:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) a permis de recueillir 89.6 mg (81%) de dimère **34** sous forme d'huile. $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -41.1$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 0.64 (d, 6H, $^3J_{6',5'} = 6.3$ Hz, 6 x H-6'), 1.59 (s, 6H, 2 x CH_3CO), 3.53-3.69 (m, 18H, 2 x H-4', 16 x CH_2O), 3.82 (m, 2H, 2 x H-5'), 3.93 (bd, 2H, $^3J_{3',2'} = 10.5$ Hz, 2 x H-3'), 4.03 (dd, 2H, $^3J_{2',1'} = 3.3$ Hz, 2 x H-2'), 4.25-4.38 (m, 4H, 2 x H-4, 2 x H-5), 4.54 (d, 2H, $^2J = 11.4$ Hz, 2 x CH_2Ph), 4.56-4.92 (m, 18H, 2 x H-6a, 10 x CH_2Ph , 4 x $\text{OCH}_2\text{-triazole}$, 2 x H-2), 5.00 (d, 2H, $^3J_{1',2'} = 3.3$ Hz, 2 x H-1'), 5.11 (bd, 2H, $^2J = 12.4$ Hz, 2 x H-6b), 5.90 (m, 2H, 2 x H-3), 6.17 (d, 2H, $^3J_{1,2} = 9.9$ Hz, 2 x H-1), 6.77 (d, 2H, $^3J_{\text{NH}-2} = 9.9$ Hz, 2 x NHAc), 6.68-7.12 (m, 42H, H-Ar), 7.89 (s, 2H, 2 x H-triazole), 8.03-8.15 (m, 8H, H-Ar). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 16.0, 22.6, 53.9, 62.6, 64.2, 67.8, 69.5, 70.4, 70.5, 72.4, 74.3, 74.7, 75.0, 76.0, 76.9, 77.6, 79.4, 86.1, 100.9, 121.5, 127.4, 127.5, 127.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.37, 128.4, 128.5, 128.6, 129.1,

129.7, 129.76, 129.8, 129.9, 133.1, 133.6, 137.9, 138.4, 138.5, 145.4, 165.8, 167.2, 170.4.

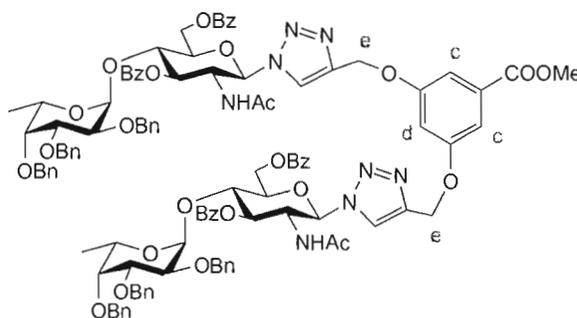
SM (ESI): m/z calc. pour $C_{112}H_{122}N_8O_{27}$: 2012.2; trouvé: 2035.5 $[M + Na]^+$.

Bis-O-[1-[(2,3,4-Tri-O-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3,6-di-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthyl] pentaéthylèneglycol (35)



Le disaccharide **9** (100.0 mg, 0.110 mmol, 2.1 équ.) et le linker *bis*-propargylé **29** (17.1 mg, 0.054 mmol, 1.0 équ.) ont été dissous dans le THF (1.15 mL). L'iodure de cuivre (6.2 mg, 0.032 mmol, 0.6 équ.) et la *N,N'*-diisopropyléthylamine (19 μ L, 0.110 mmol, 2.0 équ.) ont été ajoutés. La solution a été agitée pendant une nuit à température ambiante puis concentrée. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (20:1, $CH_2Cl_2/MeOH$) a permis de recueillir 115.6 mg (quant.) de dimère protégé **35** sous forme d'huile. $[\alpha]_D^{21} = -41.9$ (c 1.0, $CHCl_3$). **1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)):** 0.54 (d, 6H, $^3J_{6-5'} = 6.3$ Hz, 6 x H-6'), 1.50 (s, 6H, 2 x CH_3CO), 3.47-3.58 (m, 22H, 2 x H-4', 20 x CH_2O), 3.73 (m, 2H, 2 x H-5'), 3.83 (bd, 2H, $^3J_{3'-2'} = 10.4$ Hz, 2 x H-3'), 3.93 (dd, 2H, $^3J_{2'-1'} = 3.3$ Hz, 2 x H-2'), 4.27-4.38 (m, 4H, 2 x H-4, 2 x H-5), 4.53 (d, 2H, $^2J = 11.4$ Hz, 2 x CH_2Ph), 4.56-4.92 (m, 18H, 2 x H-6a, 10 x CH_2Ph , 4 x OCH_2 -triazole, 2 x H-2), 5.00 (d, 2H, $^3J_{1'-2'} = 3.4$ Hz, 2 x H-1'), 5.12 (bd, 2H, $^2J = 12.2$ Hz, 2 x H-6b), 5.91 (m, 2H, 2 x H-3), 6.17 (d, 2H, $^3J_{1-2} = 10.0$ Hz, 2 x H-1), 6.82 (d, 2H, $^3J_{NH-2} = 9.6$ Hz, 2 x $NHAc$), 6.69-7.16 (m, 42H, H-Ar), 7.89 (s, 2H, 2 x H-triazole), 8.04-8.13 (m, 8H, H-Ar). **^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)):** 15.9, 22.6, 53.7, 62.5, 64.1, 67.7, 69.4, 70.3, 70.37, 70.4, 72.2, 74.3, 74.6, 74.8, 74.9, 75.8, 76.8, 77.3, 79.3, 86.1, 100.8, 121.5, 127.4, 127.5, 127.7, 128.1, 128.16, 128.2, 128.3, 128.4, 128.49, 128.5, 128.6, 129.0, 129.7, 129.9, 133.2, 133.7, 137.8, 138.3, 138.4, 145.3, 165.8, 167.2, 170.5. **SM (ESI):** m/z calc. pour $C_{114}H_{126}N_8O_{28}$: 2056.3; trouvé: 2057.8 $[M + H]^+$.

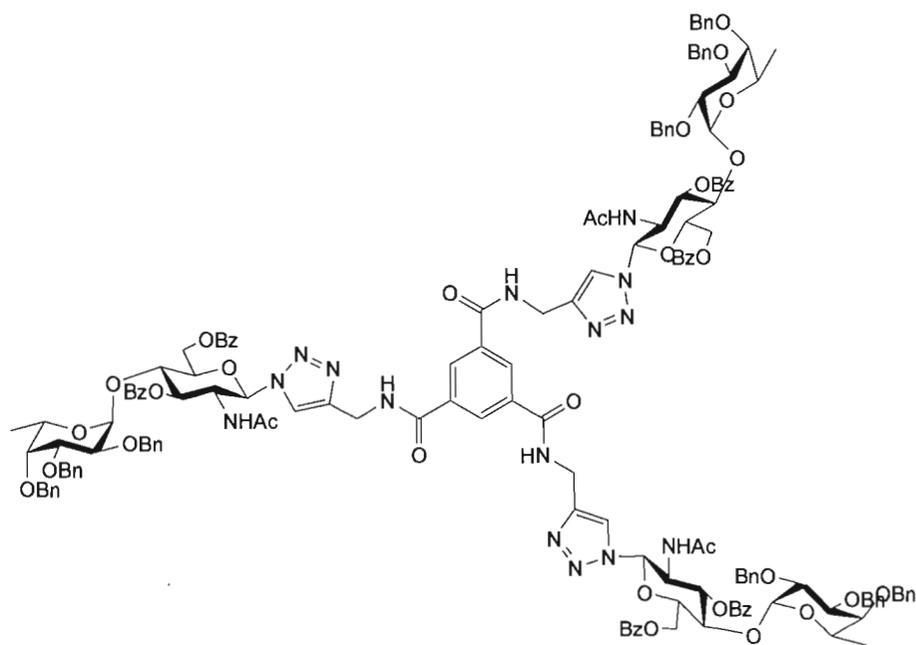
Dimère (36)



Le disaccharide **9** (150.0 mg, 0.170 mmol, 2.1 éq.) et le linker **30**¹⁰⁸ (20.0 mg, 0.082 mmol, 1.0 éq.) ont été dissous dans une solution *tert*-butanol/eau (v/v 1:1, 0.04M). Le sulfate de cuivre (17.2 mg, 0.069 mmol, 0.8 éq.) et l'acide ascorbique (27.2 mg, 0.140 mmol, 1.6 éq.) ont alors été ajoutés. Après 40 min à 53°C, le mélange laiteux du début a laissé place à une solution incolore contenant un précipité orange. La solution a été extraite par de l'acétate d'éthyle et la phase organique a été lavée successivement par une solution saturée de NaHCO₃ et de NaCl. Les phases organiques réunies ont été séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (30:1, CH₂Cl₂/MeOH) a permis de recueillir 134.2 mg (83%) du dimère **36** désiré sous la forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 130-132°C; $[\alpha]_D^{22} = -42.3$ (*c* 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 0.60 (d, 6H, ³*J*_{6'-5'} = 6.6 Hz, 6 x H-6'), 1.52 (s, 6H, 2 x CH₃CO), 3.57 (s app., 2H, 2 x H-4'), 3.77 (m, 2H, 2 x H-5'), 3.81-3.83 (m, 5H, CH₃O, 2 x H-3'), 3.97 (dd, 2H, ³*J*_{2'-1'} = 3.0 Hz, ³*J*_{2'-3'} = 10.4 Hz, 2 x H-2'), 4.16-4.28 (m, 4H, 2 x H-4, 2 x H-5), 4.48 (d, 2H, ²*J* = 11.3 Hz, CH₂Ph), 4.54-4.87 (m, 14H, 2 x H-2, 2 x H-6a, 10 x CH₂Ph), 4.93 (d, 2H, 2 x H-1'), 5.04 (bd, 2H, ²*J* = 11.8 Hz, 2 x H-6b), 5.10 (s app., 4H, 4 x H-e), 5.80 (m, 2H, 2 x H-3), 6.07 (bd, 2H, ³*J*₁₋₂ = 9.1 Hz, 2 x H-1), 6.39 (s app., 2H, 2 x NHAc), 6.68 (s app., 1H, H-d), 7.13-7.61 (m, 44H, H-Ar, 2 x H-c), 7.90 (s, 2H, H-triazole), 7.98-8.06 (m, 8H, H-Ar). **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 15.9, 22.6, 29.7, 36.4, 41.2, 52.2, 53.8, 61.9, 62.5, 67.8, 72.3, 74.4, 75.0, 75.8, 77.3, 79.3, 86.2, 100.9, 106.0, 106.7, 108.8, 127.4, 127.5,

127.8, 128.1, 128.2, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 128.9, 129.6, 129.7, 129.9, 132.0, 133.2, 133.8, 137.8, 138.3, 138.5, 159.1, 165.9, 166.5, 167.3, 170.5. **SM (ESI):** m/Z calc. pour $C_{112}H_{112}N_8O_{26}$: 1986.1; trouvé: 1987.0 $[M + H]^+$.

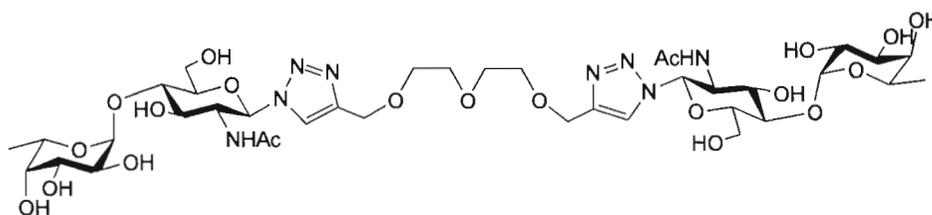
Trimère (37)



Une solution du cœur trivalent **31**¹⁰⁹ (14.2 mg, 0.044 mmol) et du disaccharide **9** (119.8 mg, 0.138 mmol, 3.1 équ.) dans le THF (1.8 mL, 0.024 M) a été préparée. L'iodure de cuivre (7.7 mg, 0.051 mmol, 1.2 équ.) et la *N,N'*-diisopropyléthylamine (46 μ L, 0.263 mmol, 6.0 équ.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité toute la nuit à température ambiante. Lorsque la réaction a été terminée (CCM, 20:1, $CH_2Cl_2/MeOH$) le solvant a été évaporé et le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (20:1, $CH_2Cl_2/MeOH$). Le composé **37** a été obtenu avec un rendement de 85% (110.3 mg) sous la forme d'un solide jaunâtre. p.f.: 170–173°C; $[\alpha]_D^{21} = -37.8$ (c 0.8, $CHCl_3$). **¹H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$ + TMS, δ (ppm)):** 0.61 (d, 9H, $^3J_{6',5'} = 6.3$ Hz, 9 x H-6'), 1.25 (s, 9H, 3 x CH_3CO), 3.49 (s app., 3H, 3 x H-4'), 3.76 (m, 3H, 3 x H-5'), 3.93 (s app., 6H, 3 x H-2', 3 x H-3'), 4.12 (s app., 6H, 3 x H-2, 3 x H-5), 4.48-5.06 (m, 42H, 3 x H-1, 3 x H-3, 3 x H-4, 6 x

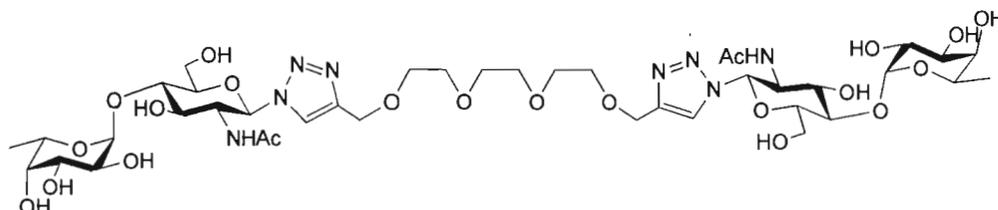
H-6, 3 x H-1', 18 x CH₂Ph, 6 x CH₂NH) 5.85, 6.20 (s app., 6H, 3 x NHAc, 3 x CH₂NH), 7.11-7.92 (m, 81H, 78 x H-Ar, 3 x H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 16.0, 22.5, 35.4, 67.7, 72.6, 74.2, 74.9, 75.5, 77.2, 79.3, 100.6, 127.4, 127.5, 127.6, 128.1, 128.2, 128.2, 128.3, 128.4, 129.4, 129.7, 133.2, 138.0, 138.4, 138.6, 166.1, 166.3, 171.2. **SM (ESI):** *m/z* calc. pour C₁₆₅H₁₆₅N₁₅O₃₆: 2932.2; trouvé: 1478.1 [M + H + Na]²⁺.

Bis-O-[1-[(α-L-fucopyranosyl)-(1→4)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthyl] diéthylèneglycol (38)



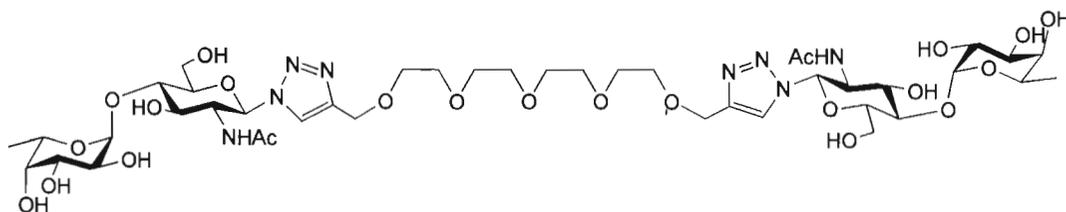
Le dimère **32** (66.0 mg, 0.034 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (10:1, CH₂Cl₂/MeOH), 50.8 mg (98%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (48.0 mg, 0.032 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 29.9 mg (97%) du produit déprotégé **38** sous forme d'huile. $[\alpha]_D^{22} = -107.1$ (*c* 1.0, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.18 (d, 6H, ³J_{6,5'} = 6.6 Hz, 6 x H-6'), 1.81 (s, 6H, 2 x CH₃CO), 3.67 (s app., 8H, 8 x CH₂O), 3.77-4.03 (m, 16H, 2 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5, 4 x H-6, 2 x H-2', 2 x H-3', 2 x H-4'), 4.28 (m, 2H, 2 x H-2), 4.40 (m, 2H, 2 x H-5'), 4.69 (m, 4H, 4 x OCH₂-triazole), 5.02 (d, 2H, ³J_{1,2'} = 3.3 Hz, 2 x H-1'), 5.86 (d, 2H, ³J_{1,2} = 9.7 Hz, 2 x H-1), 8.26 (s, 2H, 2 x H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.3, 56.5, 60.3, 63.5, 67.7, 68.7, 69.4, 70.0, 70.1, 72.6, 72.9, 77.2, 79.0, 86.9, 100.4, 124.4, 144.7, 174.7. **SM (ESI):** *m/z* calc. pour C₃₈H₆₂N₈O₂₁: 966.4; trouvé: 989.4 [M + Na]⁺.

Bis-O-[1-[(α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthyl] triéthylène glycol (39)



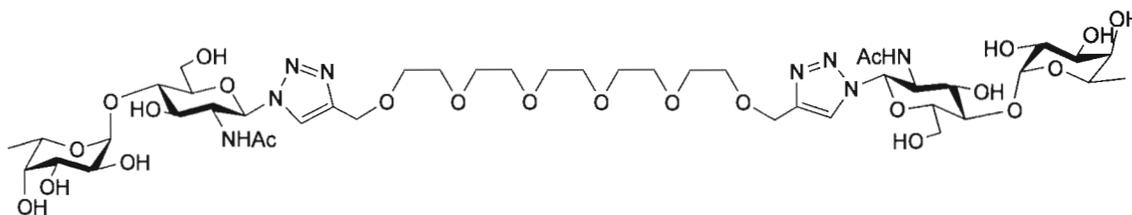
Le dimère **33** (95.7 mg, 0.049 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (10:1, CH₂Cl₂/MeOH), 35.6 mg (55%) de produit débenzoylé. Ce produit (32.0 mg, 0.021 mmol) a été dissous dans une solution de HCl 10⁻³M dans le MeOH et a été soumis à une étape de débenzylation suivant le protocole général décrit. Il a été possible de récupérer 21.1 mg (quant.) du produit déprotégé **39** sous forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 153-156°C; [α]_D²² = -80.5 (c 1.0, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.18 (d, 6H, ³J_{6-5'} = 6.5 Hz, 6 x H-6'), 1.82 (s, 6H, 2 x CH₃CO), 3.68 (s app., 12H, 12 x CH₂O), 3.75-4.03 (m, 16H, 2 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5, 4 x H-6, 2 x H-2', 2 x H-3', 2 x H-4'), 4.28 (m, 2H, 2 x H-2), 4.39 (m, 2H, 2 x H-5'), 4.69 (m, 4H, 4 x OCH₂-triazole), 5.01 (d, 2H, ³J_{1-2'} = 3.1 Hz, 2 x H-1'), 5.86 (d, 2H, ³J₁₋₂ = 9.7 Hz, 2 x H-1), 8.25 (s, 2H, 2 x H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.3, 56.5, 60.3, 63.5, 67.7, 68.7, 69.4, 70.0, 70.1, 70.2, 72.6, 72.9, 77.2, 79.0, 86.9, 100.4, 124.4, 144.7, 174.7. SM (ESI): m/Z calc. pour C₄₀H₆₆N₈O₂₂: 1010.4; trouvé: 1033.4 [M + Na]⁺.

Bis-O-[1-[(α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthyl] tétraéthylène glycol (40)



Le dimère **34** (80.0 mg, 0.040 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (20:1, CH₂Cl₂/MeOH), 52.6 mg (83%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (47.0 mg, 0.029 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 29.6 mg (95%) du produit déprotégé **40** sous forme d'huile. $[\alpha]_D^{22} = -80.3$ (*c* 1.0, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.18 (d, 6H, ³J_{6',5'} = 6.5 Hz, 6 x H-6'), 1.82 (s, 6H, 2 x CH₃CO), 3.65-3.70 (s app., 16H, 16 x CH₂O), 3.77-4.03 (m, 16H, 2 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5, 4 x H-6, 2 x H-2', 2 x H-3', 2 x H-4'), 4.28 (m, 2H, 2 x H-2), 4.39 (m, 2H, 2 x H-5'), 4.69 (m, 4H, 4 x OCH₂-triazole), 5.01 (d, 2H, ³J_{1',2'} = 3.5 Hz, 2 x H-1'), 5.86 (d, 2H, ³J_{1,2} = 9.8 Hz, 2 x H-1), 8.26 (s, 2H, 2 x H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.3, 56.5, 60.3, 63.5, 67.7, 68.7, 69.4, 70.0, 70.1, 70.2, 72.6, 72.9, 77.2, 79.0, 86.9, 100.4, 124.4, 144.7, 174.7. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₄₂H₇₀N₈O₂₃: 1054.5; trouvé: 1055.5 [M + H]⁺.

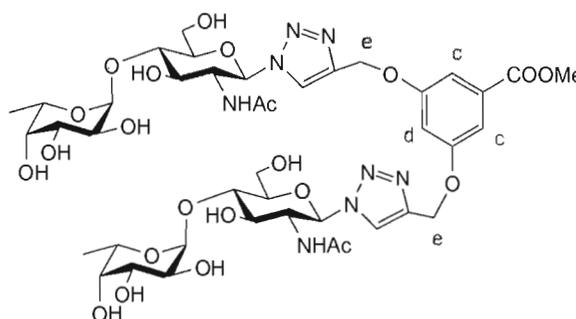
Bis-O-[1-[(α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthyl] pentaéthylèneglycol (41)



Le dimère **35** (78.5 mg, 0.038 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (15:1, CH₂Cl₂/MeOH), 39.1 mg (62%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (32.6 mg, 0.020 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 20.6 mg (95%) du produit déprotégé **41** sous forme d'une huile incolore. $[\alpha]_D^{22} = -96.1$ (*c* 1.0, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.18 (d, 6H, ³J_{6',5'} = 6.1 Hz, 6 x H-6'), 1.82 (s, 6H, 2 x CH₃CO), 3.63-3.75 (s app., 20H, 20 x CH₂O), 3.77-4.03 (m, 16H, 2 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5,

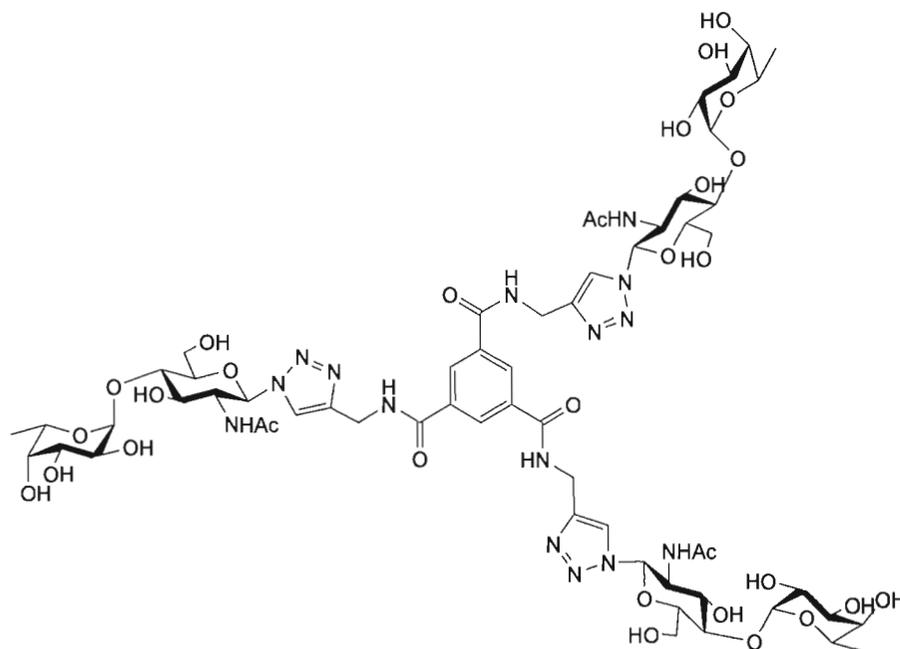
4 x H-6, 2 x H-2', 2 x H-3', 2 x H-4'), 4.28 (m, 2H, 2 x H-2), 4.38 (m, 2H, 2 x H-5'), 4.70 (m, 4H, 4 x OCH₂-triazole), 5.02 (d, 2H, ³J_{1-2'} = 3.5 Hz, 2 x H-1'), 5.87 (d, 2H, ³J₁₋₂ = 9.8 Hz, 2 x H-1), 8.26 (s, 2H, 2 x H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.3, 56.5, 60.3, 63.5, 67.7, 68.7, 69.4, 70.0, 70.1, 70.2, 72.6, 72.9, 77.2, 79.0, 86.9, 100.4, 124.4, 144.7, 174.7. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₄₄H₇₄N₈O₂₄: 1098.5; trouvé: 1099.4 [M + H]⁺.

Dimère (42)



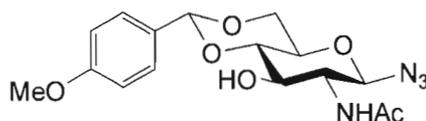
Le dimère **36** (135.0 mg, 0.132 mmol) a été débenzoylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (15:1, CH₂Cl₂/MeOH), 83.4 mg (79%) de produit débenzoylé. Une étape de débenzylation de ce composé (78.7 mg, 0.050 mmol) suivant le protocole général décrit a permis de récupérer 45.6 mg (96%) du produit déprotégé **42** sous forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 207-209°C (décomp.); [α]_D²² = -115.9 (*c* 1.0, MeOH). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 1.17 (d, 6H, ³J_{6-5'} = 6.1 Hz, 6 x H-6'), 1.69 (s, 6H, 2 x CH₃CO), 3.75-3.05 (m, 19H, 2 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5, 4 x H-6, 2 x H-2', 2 x H-3', 2 x H-4', CH₃O), 4.27 (m, 2H, 2 x H-2), 4.38 (m, 2H, 2 x H-5'), 5.02 (d, 2H, ³J_{1-2'} = 3.2 Hz, 2 x H-1'), 5.29 (s app., 4H, 4 x H-e), 5.85 (d, 2H, ³J₁₋₂ = 9.8 Hz, 2 x H-1), 6.90 (s app., 1H, H-d), 7.29 (m, 2H, 2 x H-c), 8.29 (s, 2H, H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1), δ (ppm)): 15.9, 22.1, 53.5, 56.3, 60.3, 61.8, 61.9, 67.7, 68.7, 70.1, 72.6, 73.0, 77.2, 79.0, 86.9, 100.4, 108.8, 110.1, 124.6, 132.5, 143.9, 159.1, 169.0, 174.5. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₄₂H₆₀N₈O₂₂: 1028.9; trouvé: 1051.1 [M + Na]⁺.

Trimère (43)



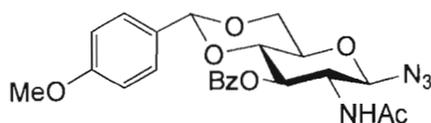
Le trimère **37** (109.1 mg, 0.037 mmol) a été débénylé selon le protocole général et a permis d'obtenir, après colonne chromatographique (9:1, CH₂Cl₂/MeOH), 61.4 mg (71%) de produit débénylé. Une étape de débénylation de ce composé (44.3 mg, 0.019 mmol) suivant le protocole général décrit suivie d'une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (9:1 CH₃CN/H₂O à 7:3 CH₃CN/H₂O) a permis d'obtenir le trimère **43** sous la forme d'un solide blanc (18.7 mg, 65%). p.f.: 194-196°C (décomp.); $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -62.0$ (*c* 0.6, DMSO). ¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm)): 1.15 (d, 9H, ³*J*_{6',5'} = 6.6 Hz, 9 x H-6'), 1.75 (s, 9H, 3 x CH₃CO), 3.78-3.95 (m, 24H, 3 x H-3, 3 x H-4, 3 x H-5, 6 x H-6, 3 x H-2', 3 x H-3', 3 x H-4'), 4.25 (t app., 3H, ³*J*_{2,1} = 9.6 Hz, 3 x H-2), 4.37 (m, 3H, 3 x H-5'), 4.68 (s, 6H, 3 x CH₂N), 4.99 (d, 3H, ³*J*_{1',2'} = 3.3 Hz, 3 x H-1'), 5.81 (d, 3H, ³*J*₁₋₂ = 9.6 Hz, 3 x H-1), 8.18 (s, 3H, 3 x H-triazole), 8.31 (s, 3H, H-Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm)): 15.9, 22.2, 35.6, 56.4, 60.3, 67.7, 68.7, 70.0, 72.6, 72.9, 77.2, 79.0, 86.9, 100.4, 123.3, 129.9, 135.3, 169.2, 174.6. SM (ESI): *m/z* calc. pour C₆₀H₈₇N₁₅O₃₀: 1497.6; trouvé: 1498.6 [M + H]⁺.

Azoture de 2-acétamido-2-désoxy-4,6-*O*-*p*-méthoxybenzylidène-β-D-glucopyranosyle (44)



Le triol **7** (947.8 mg, 3.849 mmol) a été dissous dans 4.6 mL CH₃CN (0.8M) et 1 mL de DMF sec a été ajouté afin de favoriser la dissolution du triol. L'anisaldéhyde diméthyl acétal (1.3 mL, 7.634 mmol, 2 éq.) et le *APTS* (155.9 mg, 0.820 mmol, 0.2 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité 4h à 55°C et quelques gouttes de Et₃N ont alors été ajoutées. Le produit désiré précipite au fond du ballon. Il a été filtré et lavé avec du CH₂Cl₂ froid. Il a été possible de récupérer 1.0422 g (74%) de produit **44** sous la forme de cristaux blanc. p.f.: 184-186°C, litt.¹²⁰ p.f.: 188°C. **SM (ESI):** *m/z* calc. pour C₁₆H₂₀N₄O₆: 364.1; trouvé: 365.1 [M + H]⁺.

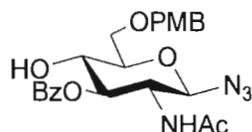
Azoture de 2-acétamido-3-*O*-benzoyl-2-désoxy-4,6-*O*-*p*-méthoxybenzylidène-β-D-glucopyranosyle (45)



À une solution du composé **44** (975.6 mg, 2.678 mmol) dans la pyridine (27 mL, 0.1M) a été ajouté le chlorure de benzoyle (0.8 mL, 6.943 mmol, 2.5 éq.). La solution a été agitée à température ambiante pendant une nuit puis concentrée. Le produit brut a été dissous dans EtOAc et la phase organique a été lavée avec une solution saturée de NaHCO₃ (2x), H₂O et séchée sur Na₂SO₄. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (1:1, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 1.054g (84%) du produit **45** sous forme d'un solide blanc. p.f.: 182-184°C (décomp.); [α]_D²¹ = -136.8 (*c* 0.8, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz,**

CDCl_3 , δ (ppm): 1.94 (s, 3H, NAc), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.79-3.89 (m, 3H, H-4, H-5, H-6a), 4.34-4.40 (m, 2H, H-2, H-6b), 4.55 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.3$ Hz, H-1), 5.52 (s, 1H, CHPhOMe), 5.62 (t app., 1H, $^3J = 9.9$ Hz, H-3), 6.26 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, NHAc), 6.84, 7.31 (m, 4H, Ph-H), 7.43-8.04 (m, 5H, Bz-H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 23.2, 53.9, 55.2, 68.5, 72.4, 78.6, 89.5, 101.3, 113.6, 127.2, 128.6, 129.9, 133.7, 170.4. SM (ESI): m/Z calc. pour $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7$: 468.1; trouvé: 469.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

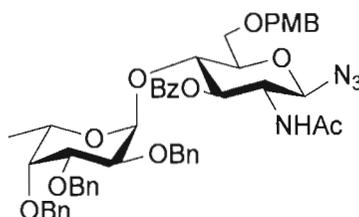
Azoture de 2-acétamido-3-O-benzoyl-2-désoxy-6-O-p-méthoxybenzyl- β -D-glucofuranosyle (46)



À une solution du composé **45** (1.0 g, 2.13 mmol) dans le DMF sec (30 mL, 0.07 M) a été ajouté le cyanoborohydrure de sodium (706.0 mg, 10.67 mmol, 5 éq.) et le tamis moléculaire 3 Å fraîchement activé. Le mélange a été agité pendant 10 min à température ambiante et ensuite refroidit à 0°C. L'acide trifluoroacétique (1.6 mL, 21.54 mmol, 10 éq.) a alors été ajouté goutte à goutte. La température du mélange réactionnel a été maintenue 1 h à 0°C et par la suite, laissée revenir à température ambiante. Le mélange a été agité pendant 1 jour. La solution a été filtrée, diluée avec CH_2Cl_2 et une solution saturée glacée de NaHCO_3 a été ajoutée. La phase aqueuse a été séparée et extraite avec CH_2Cl_2 (2x). Les phases organiques réunies ont été lavées avec une solution saturée de NaHCO_3 (1x), de NaCl (1x), séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Une cristallisation dans le CH_2Cl_2 a permis de récupérer 773.3 mg (77%) du produit **46** sous forme d'une solide blanc. p.f.: 172-174°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -63.1$ (c 0.5, CHCl_3). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 1.88 (s, 3H, NAc), 3.70-3.84 (m, 6H, OMe, H-5, 2 x H-6), 3.94 (t app., 1H, $^3J_{4,3} = ^3J_{4,5} = 9.2$ Hz, H-4), 4.15 (q app., 1H, $^3J_{2,1} = 9.3$ Hz, $^3J_{2,\text{NH}} = 9.1$ Hz, $^3J_{2,3} = 9.2$ Hz, H-2), 4.51 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2PhOMe), 4.57 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2PhOMe), 4.62 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.3$ Hz, H-1), 5.34 (ddd, 1H, $^3J_{3,2} = ^3J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3), 5.96 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},2} = 9.1$ Hz, NHAc), 6.90, 7.25 (m, 4H, Ph-H), 7.41, 7.59, 8.00 (m, 5H, Bz-H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 23.2, 53.5,

55.3, 69.5, 70.5, 73.5, 75.7, 76.3, 88.7, 113.9, 128.6, 128.9, 129.4, 129.5, 129.9, 133.7, 167.5, 170.5. **SM (ESI):** m/Z calc. pour $C_{23}H_{26}N_4O_7$: 470.1; trouvé: 493.1 $[M + Na]^+$.

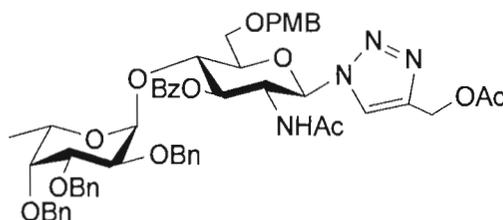
Azoture de (2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3-*O*-benzoyl-2-désoxy-6-*O*-*p*-méthoxybenzyl- β -D-glucopyranosyle (47)



Le donneur de thioglycoside **4** (495.6 mg, 0.941 mmol, 1.5 éq.) et l'accepteur **46** (294.1 mg, 0.625 mmol, 1.0 éq.) ont été dissous dans 32 mL de $CHCl_3$ non stabilisé à l'éthanol (0.03M du donneur). Après ajout de tamis moléculaire 4Å, la solution a été agitée 1h à température ambiante avant d'être plongée dans un bain à $-45^\circ C$. Le *N*-iodosuccinimide (447.3 mg, 1.889 mmol, 3 éq.) et le TMSOTf (57 μL , 0.312 mmol, 0.5 éq.) ont alors été ajoutés. Le mélange a été agité 3h à $-45^\circ C$, puis neutralisé avec de la triéthylamine. Le tamis moléculaire a été filtré et la phase organique a été lavée par une solution saturée de thiosulfate de sodium. Les phases aqueuses ont été extraites 3 fois par de petits volumes de chloroforme. Les phases organiques réunies ont été séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (7:3, hexanes/EtOAc) pour donner 276.5 mg (50%) du disaccharide **47** sous forme d'un solide jaunâtre. p.f.: $50-54^\circ C$; $[\alpha]_D^{22} = -69.0$ (c 0.75, $CHCl_3$). **1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)):** 0.67 (d, 3H, $^3J_{6,5} = 6.6$ Hz, H-6'), 1.79 (s, 3H, NAc), 3.49 (s app., 1H, H-4'), 3.69-3.93 (m, 8H, H-3', H-5', H-5, 2 x H-6, OMe), 3.96 (dd, 1H, $^3J_{2,1'} = 3.6$ Hz, $^3J_{2',3'} = 10.2$ Hz, H-2'), 4.08 (t app., 1H, $^3J_{4,3} = 8.8$ Hz, H-4), 4.21 (q app., 1H, $^3J_{2,1} \cong ^3J_{2-NH} \cong ^3J_{2,3} = 9.3$ Hz, H-2), 4.40 (s app., 2H, CH_2PhOMe), 4.52 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 4.61 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 4.62 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.1$ Hz, H-1), 4.69 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.76 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, CH_2Ph), 4.79 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 4.87 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 5.02 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 5.41 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 8.8$ Hz, $^3J_{3,2} = 10.2$ Hz, H-3), 5.88 (d,

1H, $^3J_{\text{NH}_2} = 9.3$ Hz, *NHAc*), 6.85-8.00 (m, 24H, H-Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 16.0, 23.0, 53.9, 55.2, 67.3, 67.7, 72.6, 73.0, 74.2, 74.3, 74.5, 74.8, 76.0, 79.3, 88.3, 99.1, 113.7, 127.3, 127.5, 127.7, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 129.1, 129.8, 130.2, 133.5, 138.2, 138.4, 138.5, 157.2, 159.1, 167.1, 170.2. SM (ESI): *m/z* calc. pour $\text{C}_{50}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{11}$: 886.3; trouvé: 887.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

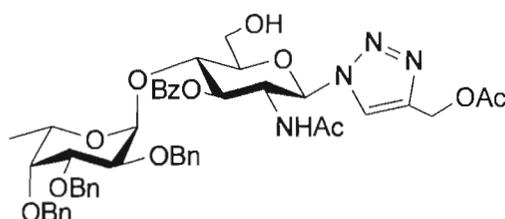
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3-*O*-benzoyl-2-désoxy-6-*O*-*p*-méthoxybenzyl- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyle acétate (48)



Le disaccharide **47** (227.3 mg, 0.256 mmol) a été dissous dans un mélange THF/ H_2O (1:1 v/v, 0.04M). L'acétate propargylique (51 μL , 0.513 mmol, 2 éq.), le sulfate de cuivre (32.4 mg, 0.130 mmol, 0.5 éq.) et l'acide ascorbique (46.0 mg, 0.232 mmol, 0.9 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à 50°C. Du dichlorométhane a été ajouté et le mélange a été lavé avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse a été extraite 3x avec CH_2Cl_2 . Les phases organiques réunies ont été relavés avec une solution saturée de NH_4Cl , séchées sur Na_2SO_4 et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (9.8:0.2, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) a permis de recueillir 223.4 mg (88%) du produit **48** sous forme d'un solide amorphe. p.f.: 78-80°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -52.5$ (*c* 0.43, CHCl_3). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 0.59 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.3$ Hz, H-6'), 1.57 (s, 3H, *NHAc*), 2.03 (s, 3H, *OAc*), 3.63 (s app., 1H, H-4'), 3.74-3.84 (m, 6H, H-3', H-5', H-6a, *OMe*), 3.96-4.09 (m, 3H, H-2', H-5, H-6b), 4.22-4.50 (m, 6H, 5 x *OCH}_2\text{Ph}*, H-4), 4.58 (m, 1H, $^2J = 10.8$ Hz, *OCH}_2\text{Ph}*), 4.65 (m, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, *OCH}_2\text{Ph}*), 4.79 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, *OCH}_2\text{Ph}*), 4.80 (q app., 1H, $^3J_{2,1} = 10.2$ Hz, H-2), 5.11 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 5.24 (s, 2H, 2 x *CH}_2\text{OAc}*), 5.84 (t app., 1H, $^3J = 10.1$ Hz, H-3), 6.05 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 10.2$ Hz, H-1), 6.80-7.60 (m, 23H, *NHAc*, H-Ar), 8.00 (m, 2H, H-Ar), 8.04 (s, 1H, H-triazole). ^{13}C -RMN

(75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 15.9, 20.6, 22.5, 53.6, 55.1, 57.4, 67.3, 71.7, 73.0, 74.2, 74.4, 74.9, 75.0, 77.2, 78.7, 79.4, 86.4, 99.7, 113.7, 122.3, 127.0, 127.3, 127.4, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.6, 128.8, 129.0, 129.9, 130.0, 133.8, 138.0, 138.4, 138.5, 143.4, 159.1, 167.7, 170.1, 170.5. SM (ESI): m/z calc. pour C₅₅H₆₀N₄O₁₃: 984.4; trouvé: 1007.3 [M + Na]⁺.

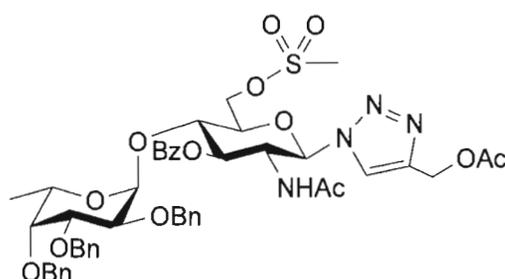
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3-*O*-benzoyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyle acétate (49)



À une solution du disaccharide **48** (264.6 mg, 0.269 mmol) dans le CH₂Cl₂ (7 mL, 0.04M) et H₂O (4-5 gouttes) a été ajouté le DDQ (125.7 mg, 0.543 mmol, 2 éq.) à température ambiante. Après 3h, une solution saturée de NaHCO₃ a été ajoutée et le mélange a été extrait avec CH₂Cl₂ (2x). Les phases organiques réunies ont été lavées plusieurs fois avec une solution saturée de NaHCO₃ et séchées sur Na₂SO₄ et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (9.8:0.2, CH₂Cl₂/MeOH) a permis de recueillir 169.6 mg (73%) du produit **49**. p.f.: 88-90°C; $[\alpha]_D^{22} = -58.4$ (c 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)):** 0.77 (d, 3H, ³ $J_{6',5'}$ = 6.6 Hz, H-6'), 1.58 (s, 3H, NAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 3.35 (m, 1H, OH), 3.58 (s app., 1H, H-4'), 3.75-3.90 (m, 5H, H-3', H-5', H-5, 2 x H-6), 3.98 (dd, 1H, ³ $J_{2'-1'}$ = 3.4 Hz, ³ $J_{2'-3'}$ = 10.3 Hz, H-2'), 4.08 (t app., 1H, ³ J = 9.1 Hz, H-4), 4.55 (d, 1H, ² J = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.59 (q app., 1H, ³ J = 9.9 Hz, H-2), 4.69 (m, 3H, 3 x OCH₂Ph), 4.85 (d, 1H, ² J = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.87 (d, 1H, ³ $J_{1'-2'}$ = 3.3 Hz, H-1'), 4.90 (d, 1H, ² J = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 5.17 (d, 1H, ² J = 13.0 Hz, CH₂OAc), 5.22 (d, 1H, ² J = 13.0 Hz, CH₂OAc), 5.64 (dd, 1H, ³ J = 9.2 Hz, 10.3 Hz, H-3), 5.99 (2 x d, 2H, ³ J = 9.9 Hz, 9.3 Hz, NHAc, H-1), 7.30-7.55 (m, 18H, H-Ar), 7.94 (m, 3H, H-Ar, H-triazole). **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)):** 16.0, 20.8, 22.7, 53.9, 57.5, 61.9, 68.0, 72.4, 74.4, 74.8, 74.9, 76.2,

77.2, 78.0, 78.3, 78.8, 86.3, 101.1, 122.8, 127.4, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.1, 129.8, 133.4, 137.3, 138.2, 143.2, 166.8, 170.3, 170.7. **SM (ESI):** m/Z calc. pour $C_{47}H_{52}N_4O_{12}$: 864.3; trouvé: 887.2 $[M + Na]^+$.

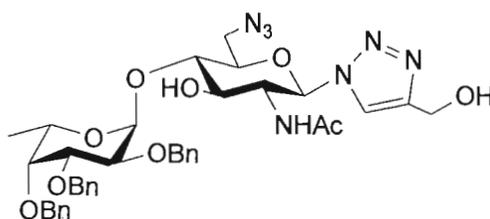
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-3-*O*-benzoyl-2-désoxy-6-*O*-méthyle- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyle acétate (50)



À une solution du disaccharide **49** (141.5 mg, 0.164 mmol) dans le CH_2Cl_2 sec (5 mL, 0.03M) a été ajoutée la triéthylamine (92 μ L, 0.653 mmol, 4 éq.). La température du mélange réactionnel a été abaissée à $0^\circ C$ et le $MsCl$ (38 μ L, 0.489 mmol, 3 éq.) a été ajouté. Après une nuit à température ambiante, le mélange a été lavé avec une solution saturée de $NaHCO_3$ et de $NaCl$. La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 et concentrée. Une colonne chromatographique sur gel de silice (9.8:0.2, $CH_2Cl_2/MeOH$) a permis de récupérer 134.9 mg (87%) du produit **50**. p.f.: $94-96^\circ C$; $[\alpha]_D^{21} = -54.9$ (c 1.0, $CHCl_3$). **1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)):** 0.68 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.3$ Hz, H-6'), 1.57 (s, 3H, NAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.77 (s, 3H, SO_2CH_3), 3.62 (s app., 1H, H-4'), 3.80 (q app., 1H, $^3J_{5',6'} = 6.3$ Hz, H-5'), 3.87 (dd, 1H, $^3J_{3',4'} = 2.5$ Hz, $^3J_{3',2'} = 10.4$ Hz, H-3'), 4.02 (dd, 1H, $^3J_{2',1'} = 3.5$ Hz, $^3J_{2',3'} = 10.4$ Hz, H-2'), 4.11 (m, 2H, H-4, H-5), 4.89 (m, 1H, H-6a), 4.53 (d, 1H, $^2J = 11.3$ Hz, OCH_2Ph), 4.69 (m, 4H, H-2, 3 x OCH_2Ph), 4.85 (m, 3H, H-6b, 3 x OCH_2Ph), 4.98 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 5.21 (s app., 2H, 2 x CH_2OAc), 5.80 (dd, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, 10.4 Hz, H-3), 6.18 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.9$ Hz, H-1), 6.77 (d, 1H, $^3J_{NH,2} = 9.3$ Hz, NHAc), 7.24-7.60 (m, 18H, H-Ar), 7.97 (m, 3H, H-Ar, H-triazole). **^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)):** 15.9, 20.7, 22.5, 37.3, 57.3, 67.9, 68.0, 72.3, 74.0, 74.5, 74.9, 75.7, 76.1, 76.5, 77.3, 79.2, 85.6, 101.0, 122.9, 127.3, 127.5, 127.9, 128.0, 128.1, 128.3, 128.4, 128.5, 128.9, 129.8, 133.6, 137.8, 138.2, 138.4,

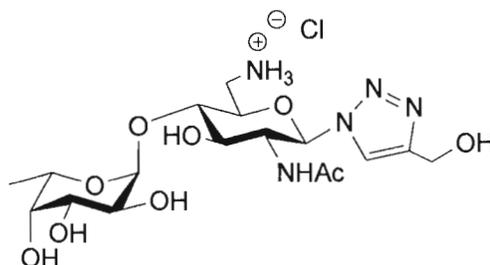
143.2, 166.8, 170.5, 170.7. **SM (ESI)**: m/Z calc. pour $C_{48}H_{54}N_4O_{14}S$: 942.3; trouvé: 943.3 [$M + H$]⁺.

1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-6-azido-2,6-di-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthanol (51)



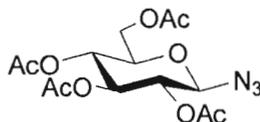
Le disaccharide **50** (129.5 mg, 0.137 mmol) a été dissous dans 5 mL (0.03M) de DMF, le NaN_3 (22.6 mg, 0.344 mmol, 2.5 éq.) a été ajouté et le mélange réactionnel a été chauffé à 80°C pendant une nuit. De l'éther a été ajouté et le mélange a été lavé avec de l'eau. La phase aqueuse a été extraite 3x avec l'éther. Les phases organiques réunies ont été séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées. Le produit récupéré a été déprotégé (débenzoylation/désacétylation) selon le protocole général décrit. Après 27h, la solution a été évaporée et le produit a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (9.8:0.2, $CH_2Cl_2/MeOH$) et a permis de récupérer 96.1 mg (94% sur 2 étapes) du produit **51**. p.f.: 188-190°C; $[\alpha]_D^{23} = -5.0$ (c 0.57, $CHCl_3$). **1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm))**: 1.19 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.3$ Hz, H-6'), 1.69 (s, 3H, NAc), 3.48-3.93 (m, 6H, H-3', H-4', H-4, H-5, 2 x H-6), 4.05 (t app., $^3J = 9.9$ Hz, H-3), 4.14 (m, 2H, $^3J_{2',1'} = 3.6$ Hz, H-2', H-3'), 4.25 (q app., 1H, $^3J = 9.6$ Hz), 4.63-4.84 (m, 7H, 2 x $^2J = 11.5$ Hz, 2 x CH_2OH , 5 x OCH_2Ph), 4.97 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, OCH_2Ph), 5.03 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 6.07 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.9$ Hz, H-1), 7.25-7.42 (m, 16H, NAc, 15 x H-Ar), 7.91 (s, 1H, H-triazole). **^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm))**: 16.1, 22.7, 55.5, 55.7, 68.1, 72.4, 72.7, 74.1, 74.9, 75.7, 77.2, 79.0, 81.1, 85.5, 100.3, 121.2, 127.3, 127.6, 127.7, 127.8, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 138.0, 138.2, 138.4, 147.8, 171.8. **IR (film, cm^{-1})** ν : 2101 (N_3), 1675 (carbonyle). **SM (ESI)**: m/Z calc. pour $C_{38}H_{45}N_7O_9$: 743.3; trouvé: 766.3 [$M + Na$]⁺.

1-[(α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acétamido-6-amino-2,6-di-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthanol (**52**)



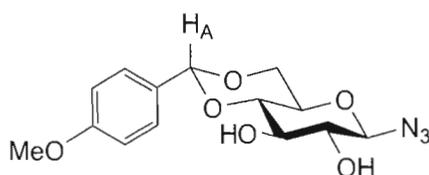
Le composé **51** (10 mg, 0.013 mmol) a été dissous dans une solution de HCl 10^{-3} M dans le MeOH et a été soumis à une étape de débenzylation suivant le protocole général décrit. Il a été possible de récupérer 6 mg (92%) du produit déprotégé **52** sous forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 178-181°C (décomp.); $[\alpha]_D^{23} = -71.2$ (c 0.6, H₂O). **¹H-RMN (500 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm))**: 1.18 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.8$ Hz, H-6'), 1.83 (s, 3H, NAc), 3.31 (dd, 1H, $^3J_{6a-5} = 9.8$ Hz, $^2J = 13.2$ Hz, H-6a), 3.71 (m, 2H, H-4, H-6b), 3.84 (m, 3H, H-2', H-3', H-4'), 3.94 (t app., 1H, $^3J = 9.8$ Hz, H-3), 4.11 (t app., 1H, $^3J_{5-6} = 9.8$ Hz, H-5), 4.34 (m, 2H, H-5', H-2), 4.73 (s, 2H, 2 x CH₂OH), 4.99 (d, 1H, $^3J_{1'-2'} = 3.4$ Hz, H-1'), 5.92 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 9.8$ Hz, H-1), 8.19 (s, 1H, H-triazole). **¹³C-RMN (125 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm))**: 15.6 (C-6'), 22.3 (COCH₃), 40.7 (C-6), 55.1 (CH₂OH), 56.1, 68.0, 68.7, 70.0, 72.5, 72.7, 74.9 (C-5), 80.3 (C-4), 86.5 (C-1), 101.2 (C-1'), 123.4 (triazole-CH), 147.8 (triazole-C-quaternaire), 174.9 (COCH₃). **SMHR (ESI)**: m/Z calc. pour C₁₇H₃₀N₅O₉⁺: 448.2038; trouvé: 448.2045.

Azoture de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyle (**54**)



Le glucose peracétylé **53**¹⁴¹ (2.0675 g, 5.297 mmol) a été dissous dans 10 mL de CH₂Cl₂ sec. La température a été abaissée à 0°C et 6 mL d'une solution de HBr 33 wt. % dans l'acide acétique a été ajoutée goutte à goutte. Après 3h, le mélange réactionnel a été lavé avec une solution saturée glacée de NaHCO₃ (2x), de l'eau et une solution saturée de NaCl. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ et évaporée. Le dérivé bromé a été immédiatement dissous dans 22 mL (1 mL/100 mg) de CH₂Cl₂. Une solution de NaHCO₃ saturée (22 mL) a été ajoutée ainsi que le TBAHS (1.8039 g, 5.313 mmol, 1 éq.) et le NaN₃ (1.7290 g, 26.596 mmol, 5 éq.). Les deux phases ont été agitées vigoureusement pendant 3h à température ambiante. La phase organique a été séparée et lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée. Le produit a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice et a permis d'obtenir le dérivé azoté **54** (1.8562 g, 94% sur 2 étapes) sous forme de cristaux blanc. p.f.: 124-126°C, litt.¹²⁶ p.f.: 129°C; $[\alpha]_D^{22} = -33.0$ (c 1.0, CHCl₃), litt.¹²⁶ $[\alpha]_D = -33.0$ (c 1.0, CHCl₃). IR (film, cm⁻¹) ν: 2118 (N₃), 1751 (carbonyle).

Azoture de 4,6-O-p-méthoxybenzylidène-β-D-glucopyranosyle (**55**)

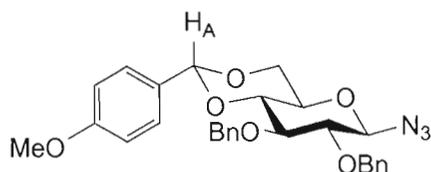


Le composé **54** a été désacétylé (1.8562 g, 4.972 mmol) suivant le protocole général décrit et a permis de récupérer quantitativement le tétraol intermédiaire. À une solution du tétraol (904.1 mg, 4.407 mmol) dans le DMF sec (3.8 mL) a été ajouté l'anisaldéhyde diméthyl acétal (1.9 mL, 11.157 mmol, 2.5 éq.) et le APTS (251.5 mg, 1.322 mmol, 0.3 éq.). Après une nuit à 55°C, quelques gouttes de triéthylamine ont été ajoutées et la solution a été évaporée. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (1:1, hexanes/EtOAc) et a permis d'obtenir le composé **55** (725.2 mg, 51%). p.f.: 135-137°C, litt.¹²⁷ p.f.: 138-139°C (décomp.). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ(ppm)): 2.71 (s larg., 2H, 2 x OH), 3.45 (t app., 1H, ³J_{2,1} = 8.8 Hz, H-2), 3.54 (m, 2H, 2 x H-6), 3.75 (m, 2H, H-3, H-5),

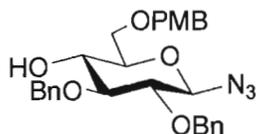
¹⁴¹ Tai, C.-A.; Kulkarni, S. S.; Hung, S.-C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8719.

3.82 (s, 3H, OMe), litt.¹²⁷ 3.80 (s, 3H), 4.37 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, 10.4 Hz, H-4), 4.68 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 8.5$ Hz, H-1), litt.¹²⁷ 4.64 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-1), 5.51 (s, 1H, H-A), 6.90, 7.41 (2 x d, 2 x 2H, $J = 8.8$ Hz, H-Ar).

Azoture de 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-*p*-méthoxybenzylidène- β -D-glucopyranosyle (**56**)

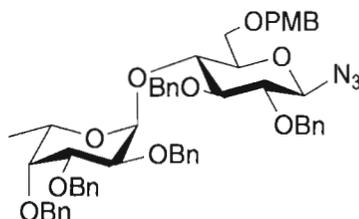


À une solution du composé **55** (725.2 mg, 2.243 mmol) dans 23 mL de DMF sec (0.1M), refroidit à 0°C, a été ajouté le NaH en suspension dans l'huile (300.0 mg, NaH 60% wt, 3 équ.). Le mélange réactionnel a été agité pendant 1h à 0°C et le bromure de benzyle (0.8 mL, 6.688 mmol, 3 équ.) a été ajouté. Le mélange a été agité pendant une nuit à température pièce et quelques gouttes de méthanol ont été ajoutées. La solution a été évaporée, reprise dans un mélange éther-hexanes et a été extraite 3 fois avec ce même mélange. Les phases organiques réunies ont été lavées avec une solution de NaCl, évaporées et séchées sur sulfate de sodium. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (9.5:0.5 à 9:1, hexanes/EtOAc) et a permis d'obtenir le composé **56** sous forme d'un solide blanc (1.1295 g, 80%). p.f.: 89-91°C, litt.¹²⁷ p.f.: 90-92°C (décomp.). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 3.40 (t app., 1H, $^3J_{2-1} = 8.5$ Hz, H-2), 3.50 (m, 1H, H-5), 3.70 (t app., 1H, $^3J = 9.3$ Hz, H-3), 3.79 (m, 2H, 2 x H-6), 3.83 (s, 3H, OMe), 4.38 (dd, 1H, $^3J = 5.0$ Hz, 10.4 Hz, H-4), 4.74 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 8.5$ Hz, H-1), litt.¹²⁷ 4.75 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-1), 4.80 (d, 1H, $^2J = 11.3$ Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.85 (s app., 2H, 2 x OCH₂Ph), 4.94 (d, 1H, $^2J = 11.3$ Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.55 (s, 1H, H-A), litt.¹²⁷ 5.57 (s, 1H, H-A), 6.92 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, 2 x H-PhOMe), 7.36 (m, 10H, Bn-H), 7.41 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, 2 x H-PhOMe).

Azoture de 2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-méthoxybenzyl-β-*D*-glucopyranosyle (57)

À une solution du composé **56** (821.2 mg, 1.631 mmol) dans le DMF sec (22 mL, 0.075 M) a été ajouté le cyanoborohydrure de sodium (567.0 mg, 9.023 mmol, 5.5 équ.) et le tamis moléculaire 3 Å fraîchement activé. Le mélange a été agité pendant 15 min à température ambiante et ensuite refroidit à 0°C. L'acide trifluoroacétique (1.21 mL, 16.290 mmol, 10 équ.) a été ajouté goutte à goutte. La température du mélange réactionnel a été maintenue 1 h à 0°C et par la suite, laissée revenir à température ambiante. Le mélange a été agité pendant 42 h. La solution a été filtrée, diluée avec CH₂Cl₂ et une solution saturée glacée de NaHCO₃ a été ajoutée. La phase aqueuse a été séparée et extraite avec CH₂Cl₂ (3x). Les phases organiques réunies ont été lavées avec une solution saturée de NaHCO₃, de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (8:2, hexanes/EtOAc) et a permis d'obtenir le composé **57** sous forme d'huile incolore (738.0 mg, 90%). $[\alpha]_D^{24} = -28.3$ (*c* 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 2.64 (s larg., 1H, OH), 3.36 (t app., 1H, ³*J*₂₋₁ = 8.8 Hz, H-2), 3.46-3.55 (m, 2H, H-3, H-5), 3.62 (m, 1H, H-4), 3.73 (m, 2H, 2 x H-6), 3.82 (s, 3H, OMe), 4.51 (d, 1H, ²*J* = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.56 (d, 1H, ²*J* = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.65 (d, 1H, ³*J*₁₋₂ = 8.5 Hz, H-1), 4.76 (d, 1H, ²*J* = 11.0 Hz, 1 x CH₂PhOMe), 4.78 (d, 1H, ²*J* = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.89 (d, 1H, ²*J* = 11.0 Hz, 1 x CH₂PhOMe), 4.94 (d, 1H, ²*J* = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 x *H*-PhOMe), 7.28 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2 x *H*-PhOMe), 7.37 (m, 10H, Bn-*H*). **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 55.2 (OCH₃), 69.4 (C-6), 71.3 (C-4), 73.3 (C-3), 75.1, 75.3, 76.1, 81.2, 84.2, 90.1 (C-1), 113.8, 113.9, 127.7, 127.9, 128.0, 128.2, 128.4, 128.5, 129.4, 129.7, 129.8, 137.7, 138.3, 159.3. **SM (ESI)**: *m/z* calc. pour C₂₈H₃₁N₃O₆: 505.2; trouvé: 528.3 [M + Na]⁺.

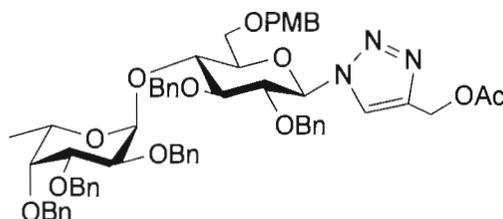
Azoture de (2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-méthoxybenzyl- β -D-glucopyranosyle (**58**)



Le donneur de thioglycoside **4** (108.2 mg, 0.205 mmol, 2.7 éq.) et l'accepteur **57** (38.9 mg, 0.077 mmol, 1.0 éq.) ont été dissous dans 7 mL de CHCl_3 non stabilisé à l'éthanol (0.03M du donneur). Après ajout de tamis moléculaire 4Å, la solution a été agitée 1.5h à température ambiante avant d'être plongée dans un bain à -15°C . Le *N*-iodosuccinimide (58.0 mg, 0.245 mmol, 3.2 éq.) et le TMSOTf (7 μL , 0.038 mmol, 0.5 éq.) ont alors été ajoutés. Le mélange a été agité 2h à 0°C , puis neutralisé avec de la triéthylamine. Le tamis moléculaire a été filtré et la phase organique a été lavée par une solution saturée de thiosulfate de sodium. La phase aqueuse a été extraite 1x par un petit volume de chloroforme. Les phases organiques réunies ont été séchées sur sulfate de sodium et concentrées. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (9:1, hexanes/EtOAc) pour donner 17.9 mg (25%) du disaccharide désiré **58** sous forme d'huile incolore. Le produit a été utilisé pour la prochaine étape sans être totalement caractérisé. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 0.68 (d, 3H, $^3J_{6'-5'} = 6.3$ Hz, H-6'), 3.33 (s app., 1H, H-4'), 3.42 (t app., 1H, $^3J_{2-1} = 8.8$ Hz, H-2), 3.53 (m, 1H, H-5), 3.60 (t app., 1H, $^3J_{3-4} = 9.3$ Hz, H-3), 3.69 (m, 2H, 2 x H-6), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.84 (m, 2H, $^3J_{3'-2'} = 10.4$ Hz, $^3J_{4-3} = 9.3$ Hz, H-3', H-4), 3.95 (m, 1H, H-5'), 3.98 (dd, 1H, $^3J_{2'-1'} = 3.6$ Hz, $^3J_{2'-3'} = 10.2$ Hz, H-2'), 4.38 (s, 2H, 2 x CH_2PhOMe), 4.54-5.01 (m, 10H, 10 x OCH_2Ph), 4.61 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 8.5$ Hz, H-1), 5.05 (d, 1H, $^3J_{1'-2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 6.84 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 2 x *H*-PhOMe), 7.21-7.40 (m, 27 H, 25 x Bn-*H*, 2 x *H*-PhOMe). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 16.2 (C-6'), 55.2 (OCH₃), 66.7, 67.8, 72.7, 72.9, 74.3, 74.7, 75.0, 75.5, 76.2, 77.6, 79.3, 82.3, 83.2, 90.1 (C-1), 97.5 (C-1'), 113.7, 127.4, 127.5, 127.6, 127.7, 127.9, 128.1, 128.2, 128.31, 128.32, 128.33, 128.4, 128.5, 129.3, 130.0,

137.6, 138.3, 138.6, 138.7, 159.1. **SMHR (ESI):** m/Z calc. pour $C_{55}H_{59}N_3O_{10}$: 921.4201; trouvé: 944.4102 $[M + Na]^+$.

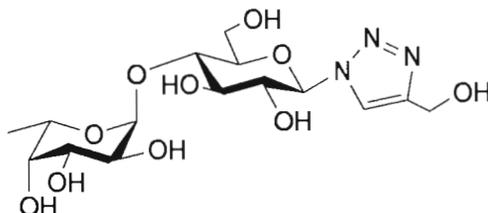
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-*p*-méthoxybenzyl- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyl acétate (59)



Le disaccharide **58** (31.4 mg, 0.034 mmol) a été dissous dans un mélange THF/H₂O (1:1 v/v, 1.5 mL/1.5 mL). L'acétate propargylique (5 μ L, 0.050 mmol, 1.5 éq.), le sulfate de cuivre (4.5 mg, 0.018 mmol, 0.5 éq.) et l'acide ascorbique (3.5 mg, 0.018 mmol, 0.9 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à température pièce. Du dichlorométhane a été ajouté et le mélange a été lavé avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse a été extraite 3x avec CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies ont été séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (6.5:3.5, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 29.7 mg (85%) du produit **59** sous forme d'huile. Le produit a été utilisé directement pour la dernière étape sans être totalement caractérisé. **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)):** 0.68 (d, 3H, ³J_{6'-5'} = 6.6 Hz, H-6'), 2.05 (s, 3H, OAc), 3.33 (s app., 1H, H-4'), 3.69-3.87 (m, 7H, H-3', H-3, H-4, H-5, OMe), 3.96-4.05 (m, 4H, H-2', H-5', H-2, H-6a), 4.30 (s, 2H, 2 x CH₂PhOMe), 4.44 (d, 1H, ²J = 10.4 Hz, H-6b), 4.55-5.03 (m, 10H, 10 x OCH₂Ph), 5.07 (d, 1H, ³J_{1'-2'} = 3.6 Hz, H-1'), 5.21 (s app., 2H, 2 x CH₂OAc), 5.59 (d, 1H, ³J₁₋₂ = 9.0 Hz, H-1), 6.79-7.40 (m, 29 H, 25 x Bn-H, 4 x H-PhOMe), 7.72 (s, 1H, H-triazole). **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)):** 16.2 (C-6'), 20.8 (COCH₃), 55.2 (OCH₃), 57.5 (triazole-CH₂OAc), 66.8, 67.8, 72.8, 72.9, 74.4, 74.8, 75.5, 76.1, 78.6, 79.3, 81.5, 83.8, 87.6 (C-1), 97.6 (C-1'), 113.7, 122.9 (triazole-CH), 127.3, 127.51, 127.55, 127.59, 127.6, 127.8, 128.0, 128.1, 128.2, 128.32,

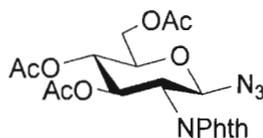
128.36, 128.38, 128.4, 128.9, 129.3, 129.8, 136.4, 136.7, 137.1, 138.0, 138.3, 138.5, 138.6, 138.7, 138.8, 139.1, 143.1, 159.2, 170.8 (CO).

1-[(α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthanol (60)



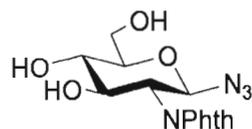
Le disaccharide **59** (29.7 mg, 0.029 mmol) a été désacétylé selon le protocole général décrit. Le produit résiduel a été dissous dans une solution de HCl 10^{-3} M dans le MeOH et a été soumis à une étape de débenzylation suivant le protocole général décrit. Il a été possible de récupérer 8.4 mg (71% sur 2 étapes) du produit déprotégé **60** sous forme d'un solide blanc amorphe. p.f.: 156-158°C (décomp.); $[\alpha]_D^{24} = -97.4$ (*c* 0.5, MeOH). **1 H-RMN (500 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm))**: 1.19 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.8$ Hz, H-6'), 3.73-3.97 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-3, H-4, H-5, 2 x H-6), 4.03 (t app., 1H, $^3J_{2-1} = 9.3$ Hz, H-2), 4.41 (dd app., 1H, $^3J_{5',6'} = 6.8$ Hz, H-5'), 4.76 (s, 2H, 2 x CH₂OH), 4.99 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 4.4$ Hz, H-1'), 5.76 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 9.3$ Hz, H-1), 8.23 (s, 1H, H-triazole). **13 C-RMN (125 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm))**: 15.9 (C-6'), 55.2 (triazole-CH₂OH), 60.2, 67.7, 68.7, 70.1, 72.6, 73.3, 75.3, 76.8, 78.9, 88.0 (C-1), 100.4 (C-1'), 123.9 (triazole-CH). **SM (ESI)**: *m/z* calc. pour C₁₅H₂₅N₃O₁₀: 407.2; trouvé: 430.2 [M + Na]⁺.

Azoture de 3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyle (62)

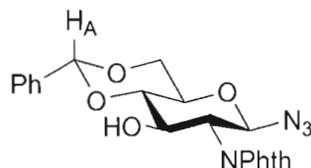


Le composé peracétylé **61**¹²⁸ (410.3 mg, 0.859 mmol) a été dissous dans 4.3 mL de CH₂Cl₂ sec (0.2M) et du tamis moléculaire 4Å fraîchement activé a été ajouté. La solution a été agitée 30 min à température pièce. La température a été par la suite abaissée à 0°C et le SnCl₄ 1M (0.86 mL, 0.859 mmol, 1 éq.) a été ajouté. Le mélange réactionnel a été agité pendant 20 min à 0°C et le TMSN₃ (137 µL, 1.032 mmol, 1.2 éq.) a été ajouté. Après 4h à température pièce, le tamis moléculaire a été filtré et la solution a été diluée avec CH₂Cl₂. La phase organique a été successivement lavée avec une solution saturée de NaHCO₃, de l'eau, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et concentrée. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (6:4, hexanes/EtOAc) et a permis d'obtenir le dérivé azoté **62** (362.2 mg, 92%) de configuration pur β sous forme d'un solide blanc. Le produit peut être cristallisé dans l'éthanol à chaud. p.f.: 134-136°C, litt.¹²⁹ p.f.: 142-143°C; [α]_D²³ = +25.1 (c 1.0, CHCl₃), litt.¹²⁹ [α]_D = +38.0 (c 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 1.87, 2.05, 2.14 (3 x s, 9H, 3 x OAc), 3.98 (m, 1H, H-5), 4.20 (dd, 1H, ³J_{6a-5} = 2.3 Hz, H-6a), 4.23 (dd, 1H, ³J₂₋₁ = 9.4 Hz, H-2), 4.36 (dd, 1H, ³J_{6b-5} = 4.7 Hz, ²J_{6b-6a} = 12.6 Hz, H-6b), 5.20 (dd, 1H, ³J₄₋₅ = 10.2 Hz, H-4), 5.66 (d, 1H, ³J₁₋₂ = 9.6 Hz, H-1), 5.82 (dd, 1H, ³J₃₋₄ = 9.1 Hz, H-3), 7.77, 7.88 (2 x m, 2 x 2H, H-Ar). **IR (film, cm⁻¹)** ν: 2118 (N₃), 1748, 1715 (carbonyle).

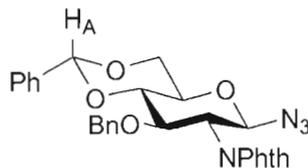
Azoture de 2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyle (**63**)



Le composé **62** (1.9612 g, 3.491 mmol) a été désacétylé selon le protocole général décrit et a permis d'obtenir le produit entièrement déprotégé **63** (1.0624 g, 75%). p.f.: 186-190°C, litt.¹²⁹ p.f.: 187-189°C; [α]_D²⁴ = -20.4 (c 0.5, H₂O), litt.¹²⁹ [α]_D = -24.0 (c 0.5, H₂O).

Azoture de 4,6-*O*-benzylidène-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyle (64)

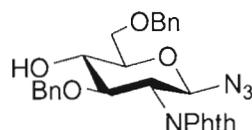
Le triol **63** (1.2901 g, 3.860 mmol) a été dissous dans 39 mL (0.1M) de THF sec et la benzaldéhyde diméthyl acétal (6 mL, 39.973 mmol, 10 éq.) ainsi que le *APTS* ont été ajoutés. Après 2h à reflux, quelques gouttes de Et₃N ont été ajoutées et le solvant a été évaporé. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (7:3, hexanes/EtOAc) et a permis d'obtenir le composé **64** (1.0608 g, 65%). $[\alpha]_D^{24} = -45.4$ (*c* 1.0, CHCl₃), litt.¹³⁰ $[\alpha]_D^{22} = -48.3$ (*c* 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ(ppm))**: 2.73 (d, 1H, ³*J*_{OH-4} = 3.0 Hz, OH), 3.63 (t app., 1H, ³*J* = 9.1 Hz, H-4), 3.74 (m, 1H, H-5), 3.85 (t app., 1H, ²*J*_{6a-6b} = 10.2 Hz, H-6a), 4.17 (t app., 1H, ³*J*₂₋₁ = 9.5 Hz, H-2), 4.43 (dd, 1H, ³*J*_{6b-5} = 4.4 Hz, ²*J*_{6b-6a} = 10.2 Hz, H-6b), 4.68 (m, 1H, H-3), 5.47 (d, 1H, ³*J*₂₋₁ = 9.3 Hz, H-1), litt.¹³⁰ 5.53 (d, 1H, ³*J*₂₋₁ = 9.6 Hz, H-1), 5.59 (s, 1H, H-A), 7.37-7.72 (m, 5H, Ph-*H*), 7.75-7.89 (m, 4H, Phth-*H*).

Azoture de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyle (65)

À une solution du composé **64** (793.3 mg, 1.878 mmol, 1 éq.) dans 10 mL de DMF sec, refroidit à 0°C, a été ajouté le NaH en suspension dans l'huile (90.1 mg, NaH 60% poids, 1.2 éq.) et l'iodure de tétrabutylammonium (141.6 mg, 0.376 mmol, 0.2 éq.). Le mélange réactionnel a été agité pendant 1h à 0°C et le bromure de benzyle (272 μL, 2.251 mmol, 1.2

éq.) a été ajouté. Le mélange a été agité pendant une nuit à température de la pièce et quelques gouttes de méthanol ont été ajoutées. La solution a été évaporée, repris dans un mélange éther-hexanes et a été extraite 3 fois avec ce même mélange. Les phases organiques réunies ont été lavées avec une solution de NaCl, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et concentrées. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (7:3, hexanes/EtOAc) et a permis d'obtenir le composé **65** (824.5 mg, 86%). $[\alpha]_D^{24} = +41.3$ (c 1.0, CHCl₃), litt.¹³⁰ $[\alpha]_D^{22} = +42.6$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 3.81 (m, 3H, H-4, H-5, H-6a), 4.18 (t app., ³J_{3,4} = 9.5 Hz), 4.80 (m, 2H, H-2, H-6b), 4.54 (d, 1H, ²J = 12.4 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.82 (d, 1H, ²J = 12.4 Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.46 (d, 1H, ³J_{2,1} = 9.6 Hz, H-1), litt.¹³⁰ 5.41 (d, 1H, ³J_{2,1} = 9.5 Hz, H-1), 5.67 (s, 1H, H-A), 6.91-7.88 (m, 14H, H-Ar).

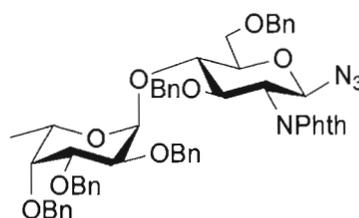
Azoture de 3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyle (**66**)



À une solution du composé **65** (824.5 mg, 1.609 mmol, 1 éq.) dans le THF (80 mL), a été ajouté du tamis moléculaire 4Å. Après 1h à température ambiante, le NaCNBH₃ (1.3702 g, 20.714 mmol, 13 éq.) a été ajouté et la solution a été agitée 20 min à t.p. La température du mélange a été abaissée à 0°C et une solution de HCl/Et₂O 1M a été ajoutée jusqu'à ce qu'il n'y est plus de dégagement de gaz (18 mL). Après 3.5 h à t.p., de la triéthylamine a été ajoutée et le tamis a été filtré. Le mélange a été successivement lavé avec une solution saturée de NH₄Cl, NaHCO₃ et de NaCl. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (7:3, hexanes/EtOAc) et a permis d'obtenir le composé **66** (738.0 mg, 89%). $[\alpha]_D^{24} = +12.4$ (c 1.0, CHCl₃), litt.¹³⁰ $[\alpha]_D^{22} = +14.7$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 2.94 (bd, 1H, OH), 3.71-3.90 (m, ³J_{6a,5} = 4.5 Hz, ²J_{6a,6b} = 10.2 Hz, 4H, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 4.10 (t app., 1H, H-2), 4.28 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 8.5 Hz, ³J_{3,2} = 10.7 Hz, H-3), 4.53 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.60 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.68 (d, 1H, ²J = 11.8 Hz, 1

x OCH₂Ph), 4.76 (d, 1H, ²J = 12.1 Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.38 (d, 1H, ³J_{2,1} = 9.3 Hz, H-1), litt.¹³⁰ 5.36 (d, 1H, ³J_{2,1} = 9.4 Hz, H-1), 6.95-7.00, 7.04-7.07, 7.30-7.42 (m, 10H, Bn-H), 7.72, 7.83 (2 x s larg., 4H, Phth-H).

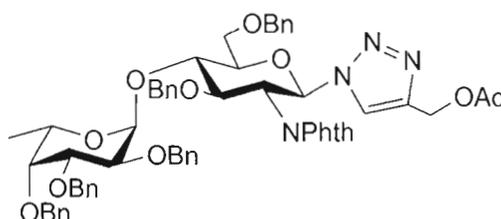
Azoture de (2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyle (67)



Le donneur de thioglycoside **4** (330.2 mg, 0.627 mmol, 1.7 éq.) et l'accepteur **66** (187.8 mg, 0.365 mmole, 1.0 éq.) ont été dissous dans 18 mL de CH₂Cl₂ sec (0.02M de l'accepteur). Après ajout de tamis moléculaire 4Å, la solution a été agitée 1h à température ambiante avant d'être plongée dans un bain à -15°C. Le *N*-iodosuccinimide (216.8 mg, 0.915 mmol, 2.5 éq.) et l'acide trifluorométhanesulfonique (16 µL, 0.178 mmol, 0.5 éq.) ont alors été ajoutés. Le mélange a été agité 30 min à -15°C, puis neutralisé avec une goutte de triéthylamine. Le tamis moléculaire a été filtré et la phase organique a été lavée par une solution saturée de thiosulfate de sodium et de NaCl. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (8:2, hexanes/EtOAc) pour donner 231.8 mg (68%) du disaccharide **67** sous forme d'huile légèrement jaune. $[\alpha]_D^{25} = -21.9$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 0.82 (d, 3H, ³J_{6',5'} = 6.3 Hz, H-6'), 3.45 (s app., 1H, H-4'), 3.74-3.83 (m, 3H, H-5, 2 x H-6), 3.87 (dd, 1H, ³J_{3',4'} = 2.7 Hz, ³J_{3',2'} = 10.9 Hz, H-3'), 3.95-4.01 (m, 2H, H-5', H-4), 4.05 (dd, 1H, ³J_{2',1'} = 3.6 Hz, ³J_{2',3'} = 10.2 Hz, H-2'), 4.20 (dd, 1H, ³J_{2,1} = 9.3 Hz, ³J_{2,3} = 10.4 Hz, H-2), 4.33 (d, 1H, ²J = 11.8 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.47 (m, 2H, 1 x OCH₂Ph, H-3), 4.58-4.78 (m, 6H, 6 x OCH₂Ph), 4.84 (d, 1H, ²J = 11.8 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.93 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.19 (d, 1H, ³J_{1',2'} = 3.6 Hz, H-1'), 5.32 (d, 1H, ³J_{1,2} = 9.3 Hz, H-1), 6.91-6.97, 7.26-7.40, 7.67-7.75 (m, 29H, H-Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃,

δ (ppm): 16.3 (C-6'), 55.5, 66.9, 68.3, 72.7, 73.2, 74.4, 74.7, 74.8, 76.2, 77.2, 77.8, 79.3, 79.4, 85.5 (C-1), 97.9 (C-1'), 123.5, 127.0, 127.2, 127.4, 127.5, 127.54, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.28, 128.3, 128.4, 131.4, 134.0, 137.8, 138.1, 138.3, 138.4, 138.5, 138.6, 167.6 (C=O). SM (ESI): m/Z calc. pour $C_{55}H_{54}N_4O_{10}$: 930.3; trouvé: 953.3 [M + Na]⁺.

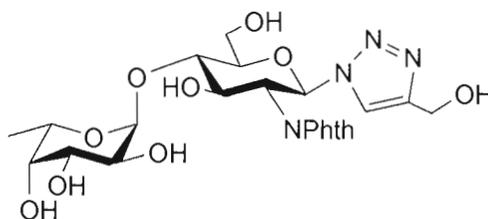
1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyl acétate (68)



Le disaccharide **67** (59.7 mg, 0.064 mmol) a été dissous dans un mélange THF/H₂O (1:1 v/v, 2 mL/2 mL). L'acétate propargylique (10 μ L, 0.101 mmol, 1.5 éq.), le sulfate de cuivre (12.7 mg, 0.051 mmol, 0.8 éq.) et l'acide ascorbique (17.0 mg, 0.086 mmol, 1.3 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à température pièce. Du dichlorométhane a été ajouté et le mélange a été lavé avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse a été extraite 2x avec CH₂Cl₂. Les phases organiques réunies ont été séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (6:4, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 33.4 mg (51%) du produit **68** sous forme d'huile incolore. $[\alpha]_D^{22} = -27.6$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 0.85 (d, 3H, ³ $J_{6',5'}$ = 6.6 Hz, H-6'), 2.06 (s, 3H, OAc), 3.46 (s app., 1H, H-4'), 3.79 (m, 2H, 2 x H-6), 3.90 (dd, 1H, ³ $J_{3',4'}$ = 2.7 Hz, ³ $J_{3',2'}$ = 10.4 Hz, H-3'), 3.96 (m, 1H, H-5), 3.99-4.15 (m, 3H, H-2', H-5', H-4), 4.37 (m, 3H, 3 x OCH₂Ph), 4.53-4.75 (m, 6H, 4 x OCH₂Ph, H-2, H-3), 4.81 (d, 1H, ² J = 11.8 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.87 (d, 1H, ² J = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.95 (d, 1H, ² J = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.13 (s, 2H, 2 x CH₂OAc), 5.20 (d, 1H, ³ $J_{1',2'}$ = 3.8 Hz, H-1'), 6.49 (d, 1H, ³ $J_{1,2}$ = 9.9 Hz, H-1), 6.92-6.95, 7.26-7.43, 7.62 (m, 29H, H-Ar), 7.83 (s, 1H, H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 16.3

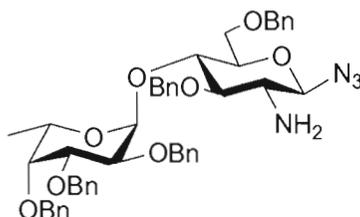
(C-6'), 20.8 (COCH₃), 55.9, 57.4 (triazole-CH₂OAc), 67.0, 68.2, 72.8, 73.1, 74.4, 74.5, 74.7, 75.1, 76.1, 77.2, 77.3, 78.5, 79.2, 79.3, 83.6 (C-1), 97.9, (C-1'), 121.6, 123.6, 127.0, 127.3, 127.5, 127.56, 127.6, 127.64, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 130.9, 134.1, 137.5, 137.8, 138.3, 138.4, 138.6, 143.1, 166.7 (CO-NPhth), 168.2 (CO-NPhth), 170.6 (COCH₃). **SM (ESI):** *m/z* calc. pour C₆₀H₆₀N₄O₁₂: 1028.4; trouvé: 1029.4 [M + H]⁺.

1-[(α-L-Fucopyranosyl)-(1→4)-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthanol (69)



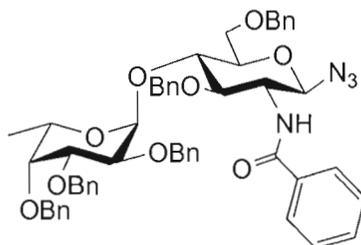
Le disaccharide **68** (33.0 mg, 0.032 mmol) a été désacétylé selon le protocole général décrit. Le produit résiduel a été dissous dans une solution de HCl 10⁻³M dans le MeOH et a été soumis à une étape de débenzylation suivant le protocole général décrit. Il a été possible de récupérer 11.1 mg (65% sur 2 étapes) du produit déprotégé **69** sous forme de mousse. $[\alpha]_D^{23} = -85.3$ (c 0.5, MeOH). **¹H-RMN (300 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1) δ (ppm)):** 1.13 (d, 3H, ³J_{6',5'} = 6.8 Hz, H-6'), 3.81-4.07 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-3, H-4, H-5, 2 x H-6), 4.35 (dd app., 1H, ³J_{5',6'} = 6.3 Hz, H-5'), 4.62 (s, 2H, 2 x triazole-CH₂OH), 4.68 (m, 1H, H-2), 5.04 (d, 1H, ³J_{1',2'} = 3.6 Hz, H-1'), 6.66 (d, 1H, ³J_{1,2} = 8.5 Hz, H-1), 7.79-7.86 (m, 4H, Phth-H), 8.24 (s, 1H, H-triazole). **¹³C-RMN (75 MHz, D₂O/Acétone (v/v 600:1) δ (ppm)):** 15.9 (C-6'), 55.0, 57.4 (triazole-CH₂OAc), 60.2, 67.7, 68.8, 70.1, 72.6, 77.6, 79.3, 83.8 (C-1), 100.5 (C-1'), 123.4, 124.4, 124.6, 130.7, 131.1, 135.8, 148.0, 169.6 (CO-NPhth), 170.3 (CO-NPhth). **SMHR (ESI):** *m/z* calc. pour C₂₃H₂₈N₄O₁₁: 536.1755; trouvé: 537.1812 [M + H]⁺.

Azoture de (2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-amino-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyle (70)



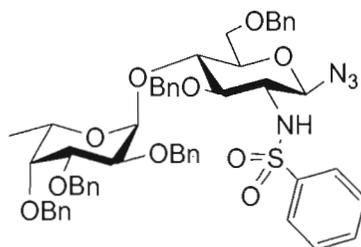
À une solution du disaccharide **67** (813.9 mg, 0.874 mmol) dans le *t*BuOH (44 mL, 0.02M) a été ajoutée l'éthylènediamine. Après 1 jours à 90-95°C, le mélange a été évaporé et coévaporé 3x avec du toluène. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (1.5:8.5 à 2:8, MeOH/CH₂Cl₂) et a permis de recueillir 617.8 mg (88%) du produit **70** sous forme d'huile incolore. $[\alpha]_D^{24} = -58.6$ (*c* 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)):** 0.82 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.6$ Hz, H-6'), 2.85 (t app., 1H, $^3J_{2,1} = 9.6$ Hz, H-2), 3.44 (m, 2H, H-4', H-3), 3.58 (m, 1H, H-5), 3.76 (s larg., 2H, 2 x H-6), 3.88 (dd, 1H, $^3J_{3',4'} = 2.7$ Hz, H-3'), 3.93 (dd, 1H, $^3J = 9.3$ Hz, H-4), 4.03 (m, 2H, $^3J_{2',1'} = 3.6$ Hz, H-2', H-5'), 4.42 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.6$ Hz, H-1), 4.46 (m, 2H, 2 x OCH₂Ph), 4.57 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.61 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.74-4.84 (m, 5H, 5 x OCH₂Ph), 4.93 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.13 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 7.28-7.39 (m, 25H, H-Ar). **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)):** 16.4 (C-6'), 56.8 (C-2), 66.8, 68.3, 72.7, 73.1, 73.2, 73.9, 74.4, 74.8, 76.2, 78.0, 79.4, 84.3, 91.5 (C-1), 97.8 (C-1'), 127.1, 127.4, 127.5, 127.6, 127.7, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.41, 128.43, 138.1, 138.3, 138.5, 138.6. **SM (ESI):** *m/z* calc. pour C₄₇H₅₂N₄O₈: 800.3; trouvé: 801.2 [M + H]⁺.

Azoture de (2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-(benzamido)-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyle (71)



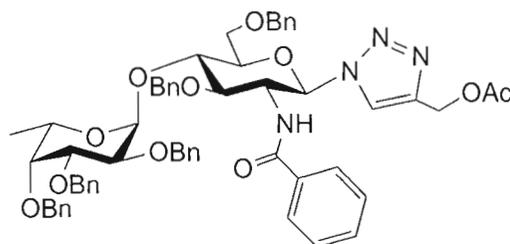
Le disaccharide **70** (49.2 mg, 0.061 mmol) a été dissous dans 6 mL de pyridine sec et le chlorure de benzoyle (35 μ L, 0.304 mmol, 5 eq.) a été ajouté. Après 1 nuit à température pièce, quelques gouttes de MeOH ont été ajoutées. Le solvant a été évaporé et une coévaporation (2x) avec du toluène a été effectuée. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (8:2, toluène/EtOAc) et a permis de recueillir 42.8 mg (77%) du produit **71** sous forme d'un solide blanc. p.f.: 122-124°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -51.3$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 0.90 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.3$ Hz, H-6'), 3.48 (s app., 1H, H-4'), 3.77 (dd, 1H, $^3J_{3',4'} = 2.5$ Hz, $^3J_{3',2'} = 10.2$ Hz, H-3'), 3.84-4.00 (m, 6H, H-5', H-2, H-4, H-5, 2 x H-6), 4.06-4.14 (m, 2H, H-2', H-3), 4.46-4.68 (m, 7H, 7 x OCH_2Ph), 4.72 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.81 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.94 (d, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 5.18 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 5.32 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 6.9$ Hz, H-1), 6.72 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}-2} = 8.2$ Hz, NH), 7.22-7.37, 7.69 (m, 30H, H-Ar). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 16.4 (C-6'), 54.3, 66.9, 68.9, 72.1, 72.8, 73.1, 73.2, 74.0, 74.7, 75.7, 76.1, 77.2, 78.2, 79.4, 87.6 (C-1), 96.3 (C-1'), 127.0, 127.3, 127.4, 127.5, 127.55, 127.6, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.35, 128.4, 128.5, 131.8, 133.6, 137.8, 138.0, 138.2, 138.4, 138.6, 167.5 (CO amide). IR (film, cm^{-1}) ν : 2114 (N_3), 1640 (bande amide I), 1541 (bande amide II). SM (ESI): m/Z calc. pour $\text{C}_{54}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_9$: 904.4; trouvé: 927.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Azoture de (2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-(phénylsulfonamido)- β -D-glucopyranosyle (72)



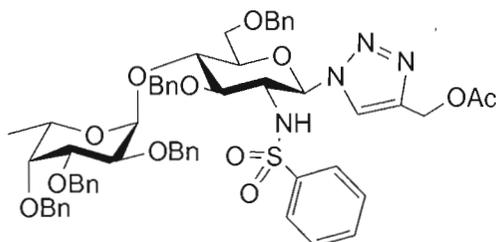
Le disaccharide **70** (109.9 mg, 0.137 mmol) a été dissous dans 7 mL de pyridine sec et le chlorure de benzènesulfonyle (89 μ L, 0.687 mmol, 5 eq.) a été ajouté. Après 1 nuit à température pièce, quelques gouttes de MeOH ont été ajoutées. Le solvant a été évaporé et une coévaporation (3x) avec du toluène a été effectuée. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (7:3, hexanes/EtOAc) et a permis de recueillir 91.0 mg (70%) du produit **72** sous forme d'huile. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -88.7$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 0.90 (d, 3H, $^3J_{6'-5'} = 6.6$ Hz, H-6'), 3.51 (m, 2H, $^3J_{2-1} = 5.5$ Hz, H-2, H-4'), 3.63-3.94 (m, 7H, H-3', H-5', H-3, H-4, H-5, 2 x H-6), 4.05 (dd, 1H, $^3J_{2'-1'} = 3.8$ Hz, $^3J_{2'-3'} = 10.0$ Hz, H-2'), 4.42 (d, 1H, $^2J = 12.4$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.44 (1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.52 (1H, $^2J = 12.4$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.62 (1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.64 (1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.67 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 5.8$ Hz, H-1), 4.76-4.84 (m, 3H, 3 x OCH_2Ph), 4.87 (1H, $^2J = 11.8$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 4.95 (1H, $^2J = 11.5$ Hz, 1 x OCH_2Ph), 5.06 (d, 1H, $^3J_{1'-2'} = 3.8$ Hz, H-1'), 5.79 (d, 1H, $^3J_{\text{NH}-2} = 9.6$ Hz, NH), 7.22-7.54, 7.76 (m, 30H, H-Ar). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 16.4 (C-6'), 55.0, 67.3, 69.1, 70.4, 72.8, 73.1, 73.2, 73.8, 74.5, 74.8, 75.9, 77.2, 78.5, 79.6, 88.7 (C-1), 94.9 (C-1'), 126.8, 127.5, 127.6, 127.65, 127.7, 127.8, 128.0, 128.2, 128.3, 128.35, 128.39, 128.4, 128.9, 132.5, 137.3, 137.8, 138.2, 138.4, 138.7, 141.2. IR (film, cm^{-1}) ν : 2116 (N_3), 1160, 1095 (sulfonamide). SM (ESI): m/z calc. pour $\text{C}_{53}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$: 940.4; trouvé: 963.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-(benzamido)-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyl acétate (**73**)



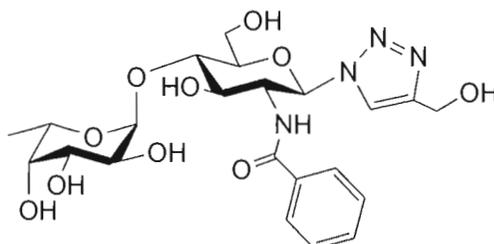
Le disaccharide **71** (41.1 mg, 0.045 mmol) a été dissous dans un mélange THF/H₂O (1:1 v/v, 2 mL/2 mL). L'acétate propargylique (7 μ L, 0.071 mmol, 1.5 éq.), le sulfate de cuivre (10.4 mg, 0.041 mmol, 0.9 éq.) et l'acide ascorbique (8.1 mg, 0.041 mmol, 0.9 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à température pièce. De l'acétate d'éthyle a été ajouté et le mélange a été lavé avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse a été extraite 3x avec EtOAc. Les phases organiques réunies ont été séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (6:4, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 32.6 mg (72%) du produit **73** sous forme d'un solide blanc. p.f.: 144-146°C; $[\alpha]_D^{23} = -42.9$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 0.81 (d, 3H, ³J_{6'-5'} = 6.3 Hz, H-6'), 2.01 (s, 3H, OAc), 3.44 (s app., 1H, H-4'), 3.73-3.91 (m, 4H, H-3', H-5, 2 x H-6), 3.98 (m, 1H, H-5'), 4.06 (m, 2H, H-2', H-4), 4.33 (t app., 1H, H-3), 4.39 (s app., 2H, 2 x OCH₂Ph), 4.56-4.73 (m, 6H, H-2, 5 x OCH₂Ph), 4.78 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.84 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.94 (d, 1H, ²J = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.15 (s, 2H, 2 x CH₂OAc), 5.18 (d, 1H, ³J_{1'-2'} = 3.6 Hz, H-1'), 6.29 (d, 1H, ³J₁₋₂ = 9.6 Hz, H-1), 6.69 (d, 1H, ³J_{NH-2} = 8.8 Hz, NH), 7.16-7.43 (m, 30H, H-Ar), 7.90 (s, 1H, H-triazole). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 16.3 (C-6'), 20.7 (COCH₃), 55.9, 57.4 (triazole-CH₂OAc), 67.0, 68.5, 72.7, 73.2, 73.7, 74.3, 74.7, 76.2, 77.2, 77.3, 78.3, 79.4, 80.4, 85.5 (C-1), 97.7 (C-1'), 123.3, 126.8, 127.4, 127.5, 127.6, 127.8, 128.1, 128.2, 128.25, 128.29, 128.3, 128.4, 128.5, 131.7, 133.4, 137.7, 137.8, 138.2, 138.5, 138.6, 142.9 (triazole-C-quaternaire), 168.0 (CO amide), 170.6 (COCH₃). SM (ESI): *m/z* calc. pour C₅₉H₆₂N₄O₁₁: 1002.4; trouvé: 1025.2 [M + Na]⁺.

1-[(2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-désoxy-2-(phénylsulfonamido)- β -D-glucopyranosyl]-1*H*-1,2,3-triazole-4-méthyl acétate (74)



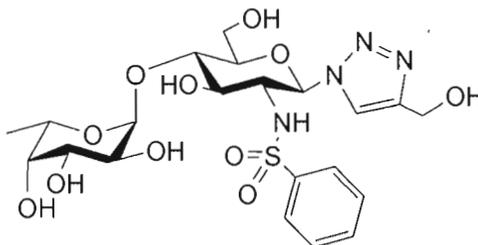
Le disaccharide **72** (91.0 mg, 0.097 mmol) a été dissous dans un mélange THF/H₂O (1:1 v/v, 4.8 mL/4.8 mL). L'acétate propargylique (14 μ L, 0.141 mmol, 1.5 éq.), le sulfate de cuivre (20.9 mg, 0.082 mmol, 0.8 éq.) et l'acide ascorbique (16.2 mg, 0.082 mmol, 0.8 éq.) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à température pièce. De l'acétate d'éthyle a été ajouté et le mélange a été lavé avec une solution saturée de chlorure d'ammonium. La phase aqueuse a été extraite 3x avec EtOAc. Les phases organiques réunies ont été séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées. Une purification par colonne chromatographique sur gel de silice (7:3 à 1:1, hexanes/EtOAc) a permis de recueillir 58.0 mg (75%, rend. corrigé) du produit désiré **74** sous forme d'huile et de récupérer 21 mg du produit de départ **72**. $[\alpha]_D^{24} = -71.4$ (*c* 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 0.80 (d, 3H, ³*J*_{6',5'} = 6.3 Hz, H-6'), 2.09 (s, 3H, OAc), 3.36 (s app., 1H, H-4'), 3.67 (m, 2H, 2 x H-6), 3.84 (m, 2H, ³*J*_{3',4'} = 2.5 Hz, H-3', H-5'), 3.94 (m, 2H, H-3, H-5), 4.06 (m, 3H, H-2', H-2, H-4), 4.37 (d, 1H, ²*J* = 12.1 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.43 (d, 1H, ²*J* = 12.1 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.56-4.83 (m, 6H, 6 x OCH₂Ph), 4.86 (d, 1H, ²*J* = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 4.92 (d, 1H, ²*J* = 11.5 Hz, 1 x OCH₂Ph), 5.08 (d, 1H, ³*J*_{1',2'} = 3.8 Hz, H-1'), 5.11 (s, 2H, 2 x CH₂OAc), 5.85 (d, 1H, ³*J*_{NH-2} = 8.8 Hz, NH), 6.32 (d, 1H, ³*J*_{1,2} = 9.6 Hz, H-1), 7.10-7.43 (m, 28H, H-Ar), 7.53 (m, 3H, 2 x H-Ar, H-triazole). **¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, δ (ppm))**: 16.2 (C-6'), 20.8 (COCH₃), 57.4 (triazole-CH₂OAc), 58.4, 67.0, 68.6, 71.9, 72.8, 73.1, 74.2, 74.3, 74.7, 76.0, 77.2, 77.8, 79.4, 81.3, 86.8 (C-1), 96.2 (C-1'), 122.7, 126.2, 127.4, 127.5, 127.6, 127.8, 128.1, 128.2, 128.3, 128.32, 128.39, 128.4, 128.7, 132.2, 137.6, 137.7, 138.2, 138.4, 138.6, 140.9, 142.9 (triazole-C-quaternaire), 170.7 (COCH₃). **SM (ESI)**: *m/z* calc. pour C₅₈H₆₂N₄O₁₀S: 1038.4; trouvé: 1039.2 [M + H]⁺.

1-[(α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-(benzamido)-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthanol (**75**)



Le disaccharide **73** (31.0 mg, 0.031 mmol) a été désacétylé selon le protocole général décrit. Le produit résiduel a été dissous dans une solution de HCl 10^{-3} M dans le MeOH et a été soumis à une étape de débenzylation suivant le protocole général décrit. Il a été possible de récupérer 14.8 mg (94% sur 2 étapes) du produit déprotégé **75** sous forme de mousse. $[\alpha]_D^{22} = -112.6$ (*c* 1.0, MeOH). **1 H-RMN (500 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm)):** 1.18 (d, 3H, $^3J_{6-5'} = 5.9$ Hz, H-6'), 3.82-4.09 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-3, H-4, H-5, 2 x H-6), 4.40 (m, 1H, H-5'), 4.56 (t app., 1H, $^3J_{2-1} = 9.5$ Hz, H-2), 4.68 (s, 2H, 2 x CH₂OH), 5.05 (s app., 1H, H-1'), 6.03 (d, 1H, $^3J_{1-2} = 9.5$ Hz, H-1), 7.46-7.55 (m, 5H, H-Ar), 8.26 (s, 1H, H-triazole). **13 C-RMN (125 MHz, D₂O/Acetone (v/v 600:1) δ (ppm)):** 15.9 (C-6'), 55.2 (triazole-CH₂OH), 57.0, 60.3, 67.8, 68.8, 70.1, 72.6, 72.9, 77.3, 79.1, 87.0 (C-1), 100.5 (C-1'), 123.4 (triazole-CH), 127.6, 129.4, 133.0, 133.6, 147.8 (triazole-C-quaternaire), 172.0 (CO amide). **SMHR (ESI):** *m/Z* calc. pour C₂₂H₃₀N₄O₁₀: 510.1962; trouvé: 533.1847 [M + Na]⁺.

1-[(α -L-Fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-désoxy-2-(phénylesulfonamido)- β -D-glucopyranosyl]-1H-1,2,3-triazole-4-méthanol (76)



Le disaccharide **74** (57.0 mg, 0.055 mmol) a été désacétylé selon le protocole général décrit. Le produit résiduel a été dissous dans une solution de HCl 10^{-3} M dans le MeOH et a été soumis à une étape de débenzylation suivant le protocole général décrit. Il a été possible de récupérer 25.6 mg (85% sur 2 étapes) du produit déprotégé **76** sous forme de mousse. $[\alpha]_D^{22} = -94.3$ (*c* 1.0, MeOH). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{Acetone}$ (v/v 600:1) δ (ppm)): 1.16 (d, 3H, $^3J_{6',5'} = 6.6$ Hz, H-6'), 3.77-3.97 (m, 9H, H-2', H-3', H-4', H-2, H-3, H-4, H-5, 2 x H-6), 4.35 (m, 1H, H-5'), 4.48 (s, 2H, 2 x CH_2OH), 4.98 (d, 1H, $^3J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 5.76 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 9.6$ Hz, H-1), 7.42-7.61 (m, 5H, H-Ar), 8.00 (s, 1H, H-triazole). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{Acetone}$ (v/v 600:1) δ (ppm)): 15.9 (C-6'), 55.3 (triazole- CH_2OH), 60.1, 60.2, 67.6, 68.7, 70.1, 72.6, 74.1, 77.0, 78.9, 87.1 (C-1), 100.4 (C-1'), 123.7 (triazole-CH), 126.4, 129.7, 133.6, 140.7, 147.5 (triazole-C-quaternaire). SMHR (ESI): *m/z* calc. pour $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S}$: 546.1632; trouvé: 569.1525 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.