



HAL
open science

Synthèse de chitooligosaccharides. Utilisation de liquides ioniques supportés

Laura Gillard

► **To cite this version:**

Laura Gillard. Synthèse de chitooligosaccharides. Utilisation de liquides ioniques supportés. Chimie organique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112296 . tel-01393688

HAL Id: tel-01393688

<https://theses.hal.science/tel-01393688>

Submitted on 8 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ORSAY

N°ORDRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE 470 :

CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire : ICSN, Gif-sur-Yvette

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par **Laura Gillard**

**Synthèse de chitooligosaccharides.
Utilisation de liquides ioniques supportés.**

Le 7 novembre 2014 devant la commission d'examen :

Directeur de thèse	Docteur François-Didier Boyer	ICSN, Gif-Sur-Yvette
Rapporteur	Docteur Laurence Mulard	Institut Pasteur, Paris
Rapporteur	Professeur Denis Postel	Université de Picardie
Examineur	Professeur Yves Blériot	Université de Poitiers
Examineur	Professeur Jean-Marie Beau	Université de Paris-Sud

*« On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ;
on ne voit que ce qui reste à faire »*

Marie Curie

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, Max Malacria, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de cet institut prestigieux. J'ai pu travailler durant ces trois années dans d'excellentes conditions et ceci m'a apporté beaucoup, que ce soit humainement ou professionnellement. Je le remercie également pour ses nombreuses discussions au cours de ces trois années qui ont eu le mérite de me faire beaucoup sourire.

Je remercie également les membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail. Merci au Professeur Yves Blériot de l'Université de Poitiers qui a présidé ce jury et aux deux rapporteurs, le Professeur Denis Postel de l'Université de Picardie Jules Verne ainsi que le Docteur Laurence Mulard de l'Institut Pasteur pour leurs nombreux compliments et leurs discussions très constructives.

Un très grand merci au Professeur Jean-Marie Beau qui a accepté de me laisser travailler dans son équipe et m'a fait confiance tout au long de ces projets. Merci pour vos remarques qui ont toujours eu une influence positive sur l'avancement de mes travaux et surtout merci pour votre gentillesse qui m'a permis de me sentir bien au sein de votre équipe. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Merci à mon directeur de thèse, le Docteur François-Didier Boyer. Je te remercie pour tout ce que tu as pu m'apporter durant ces trois années passées dans le même bureau/labo que toi. Tu as toujours su être présent lorsque j'en avais besoin et surtout tu m'as laissé une autonomie dans mon travail qui m'a permis de m'épanouir totalement en tant que chimiste. Les nombreuses discussions scientifiques ou historiques que nous pouvions avoir me manqueront. Merci pour ton sens de l'humour, ta gentillesse et ton côté humain qui ont fait de mon passage à l'ICSN un agréable moment.

Merci aussi au Docteur Stéphanie Norsikian, la première à m'avoir fait confiance pour mon stage de M2. Sans toi, je n'aurais certainement pas eu la chance de faire ma thèse ici. Tu es la « maman » de l'équipe et je te remercie d'avoir toujours trouvé les mots pour me rassurer lors de mes moments de doutes et de m'avoir toujours aidé lorsque j'avais un souci. Tu es quelqu'un de formidable et un exemple pour moi. J'espère que l'on pourra se revoir et pourquoi pas se faire un petit footing ensemble.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser lors de mon passage à l'institut, merci pour vos bonjours, vos sourires et vos discussions (oui je suis une pipelette et j'en ai passé des moments à discuter avec vous tous). Je vous remercie pour tout vos échanges car ça m'a énormément aidé à me sentir comme chez moi. Merci aux personnes des services communs sans qui nous ne pourrions pas aussi bien travailler, notamment les informaticiens (Guillaume, Julien et David). Vous m'avez aidé à me familiariser avec ces

petites bêtes que sont les ordinateurs, j'ai appris beaucoup grâce à vous. Merci à Didier du magasin, on aura bien discuté de notre chère Picardie et qu'est ce qu'on a rigolé. Merci à Jean-François et Karim de la RMN pour votre disponibilité pour nos analyses. Et un très grand merci au service HPLC-Masse (Franck, Nathalie, Nicolas, Isabelle et Odile) car sans votre efficacité et votre service, je n'aurai jamais pu arriver à la fin de mes travaux. Vous m'avez souvent rendu service et je vous en remercie grandement. Je remercie aussi Géraldine Masson, Raphaël Rodriguez et Giovanni Maestri avec qui j'ai pu discuter assez régulièrement et qui ont toujours su trouver les mots pour m'encourager et me faire rire.

Qu'est-ce qu'aurait été ma thèse sans toutes mes rencontres. Je ne sais pas par qui commencer... Je remercie tout d'abord tous les membres de mon équipe, qui est la meilleure des équipes. Beau Power !!! Mon Guigui, tu as été un collègue parfait. Des moments pas faciles entre nous deux de temps en temps mais sache que tu m'as ouvert les yeux sur beaucoup de choses, tu m'as beaucoup écouté et aidé (pour la chimie ou mes choix personnels). Je ne saurais te dire assez merci et bravo pour m'avoir supporté. Mon Nono, tu m'as laissé un beau bébé et j'espère que j'ai été à la hauteur de ton travail. J'ai trouvé un ami formidable en toi et merci encore pour tous ces moments, ces fous rires et ces conseils. Amandine alias Agnès, reste comme tu es car des personnes comme toi, on n'en rencontre pas tous les jours. Je te souhaite une belle fin de thèse et j'espère que l'on se reverra vite. Alexandre C., je te remercie pour ta bonne humeur et tes goûts musicaux que je n'oublierai jamais. C'était cool, on s'est bien marré. J'ai hâte de te revoir au Canada. Un merci à Julia et Mathieu, les post-doc qui sont passés dans l'équipe lors de mon stage et ma thèse, vous avez pu me transmettre une petite partie de votre grand savoir et je vous en remercie encore. Merci aux stagiaires qui ont pu travailler avec nous et notamment Lucile, Marine et Roxane. Il y a aussi eu la belle Margaux. Tu es une fille en qui je me suis un peu retrouvé, oui nous sommes toutes les deux des droguées du shopping. Je te souhaite une très belle thèse et beaucoup de soirées sur Paris, en tout cas je suis certaine que tu vas adorer travailler avec Steph. Et la dernière stagiaire mais pas des moindres, notre chère et tendre Amélie. J'ai adoré travailler en ta compagnie car tu as toujours le sourire et tu es d'un zen attitude qui nous apaise, en tout cas moi vu que je suis une grande stressée. Je te souhaite plein de bonnes choses en Irlande et surtout reste toi même car tu es une fille en or (même si c'est moi Laura Gold).

Concernant les personnes qui ont un pied dans notre équipe et un autre dans l'équipe 07. Merci à toi Nathan. Même si je ne t'ai pas longtemps cotoyé, tu as su me donner le sourire à chaque fois que l'on s'est croisé. Bonne continuation à toi dans ton aventure sucrière. Roxane, tu es une fille fantastique et je regrette de ne pas avoir pu passer plus de temps avec toi, mais tu es la bienvenue à Montréal. Bon courage pour ces trois ans, je ne m'en fais pas pour toi, tu t'en sortiras très bien. Tuan, merci pour tous tes conseils qui m'ont beaucoup servis et pour tes petites blagues. Merci aux autres membres des équipes 07 et 75, Philippe, Boris, Aurélie, Laura, Jordi... Je vous remercie pour vos conseils qui m'ont été d'une grande aide.

Passons maintenant aux autres étudiants. Je tiens à remercier les membres du CEI même si la fin n'a pas été celle que j'aurai espéré. J'ai passé de bons moments avec vous et je n'oublierai pas ces moments. Je remercie plus particulièrement Mathieu, pour m'avoir apporté beaucoup de fois des sucreries (pourtant j'en avais déjà beaucoup dans ma chimie) et pour m'avoir souvent réconforté. Greg, merci à toi pour ta bonne humeur, on a bien rigolé quand je passais de votre labo avec tous les autres (Thibaut, Jonathan, Aude...et j'en oublie). Vive la team « Cuir Moustache ». Je tiens à remercier Paul, Maxime & Valérian car j'en ai passé des pauses à rire dans vos laboratoires. Vous êtes des sacrés loulous et j'aimerais beaucoup vous croiser par la suite. Je vous souhaite à tous les trois une belle fin de thèse. Merci aussi à Vanessa qui a supporté toutes mes histoires, mes rires, mes pleurs quand je venais dans ton labo. Tu es une fille qui m'a souvent fait rire et je te souhaite le meilleur pour la suite de ta vie.

Et enfin ceux qui m'ont fait grandir, rire, qui m'ont soutenu dans les bons et mauvais moments, ceux qui m'ont fait devenir moi. Je remercie ma Lily avec qui j'ai pu déconnecter et profiter de notre belle capitale. Tu es une personne qui restera à jamais dans mon cœur et j'espère te revoir bientôt. Anne-Laure, je n'oublierai jamais ton rire et ta gentillesse. Tu es une personne sur qui on peu compter et je tiens à te dire un grand merci pour avoir été à mes côtés pendant ces trois années, pas souvent faciles. Alexandre, mon cher Alexandre... que dire sur toi ! Beaucoup trop de choses, tu es passé du stade où je ne pouvais pas te supporter à celui où je me demande comment je vais faire sans toi. Je tiens beaucoup à toi et même si tu as un sacré caractère, tu es un mec en or et je suis très heureuse d'avoir pu passer outre cette carapace. Mon P-A, mon petit roux adoré ou la binocle, tu es un garçon exceptionnel. Toujours un mot pour rire et je suis vraiment chanceuse d'avoir pu croiser ton chemin. Je sais que je pourrais toujours compter sur toi et sache que c'est réciproque. Mon Fifi ou Filipé, merci pour m'avoir fait découvrir ton beau pays et surtout les chouriços. Je pense que tu sais tout ce que je pense de toi. N'oublie jamais que tu es un mec exceptionnel avec de nombreuses qualités et des valeurs qu'on retrouve de plus en plus rarement. Tu es dans mon cœur à jamais. Ma Cocotte, j'ai les larmes aux yeux en écrivant tellement ça me rend triste de me dire que je vais me retrouver loin de toi. J'ai trouvé en toi une amie, une sœur, une confidente, enfin ma moitié... Je t'aime énormément et je te remercie d'être là pour moi et sache que c'est réciproque.

Je tiens aussi à remercier les personnes hors institut. Tout d'abord tous mes amis de Picardie qui m'accompagnent depuis le lycée. Il y a eu des hauts et des bas mais notre amitié est tellement solide que nous sommes toujours passés outre les problèmes. J'espère vous voir au pays des Caribous et je suis fière de vous avoir près de moi. Je remercie plus particulièrement Marie & Jenny, mes amies de longues dates et merci encore d'être venues le jour J. Ça me touche énormément. Je remercie ma Lulu alias ma Bb qui a été ma première copine, celle avec qui j'ai découvert la vie et qui, après toutes ces années, est toujours là. Merci à mes amis que j'ai rencontré lors de mon passage en région parisienne. Mon Marin, tu es un sacré bout de femme que j'admire énormément et je te souhaite plein de bonnes choses dans ta nouvelle vie en tant que Madame Camiade. Ma Zaza, 1m85 de bonheur quand on est avec toi. Tu as toujours le sourire et c'est toujours agréable de passer ces moments en

ta compagnie. Merci à toi Coco pour ces bons moments qu'on a partagé et encore bravo pour Motus. Continue à nous faire rêver. Mon petit chou, mon Vincent adoré... je t'aime tellement et je veux te revoir très vite. Merci pour toutes ces histoires qui n'arrivent qu'à toi. Prends soin de toi. Je remercie également mon cobaye lorsque je testais des nouvelles recettes, mon Josselin. On en a passé des soirées à se marrer juste tous les deux et tu as intérêt à donner des news et/ou venir me voir parce-que je tiens beaucoup à toi. Merci à toutes mes rencontres de chez L'Oréal, mes petites zouzes, on été un sacré groupe. Floflo, je t'attends pour un nouveau voyage (Canada ou USA ?), ma Camille Camille, tu m'as fait rêver quand tu es partie à l'autre bout du monde et surtout tu m'as apporté énormément depuis ces années. Ne change surtout jamais. Ma fraisouille, petite Pascale, tu es une princesse fantastique et je te souhaite que du bonheur car tu le mérites. Et je remercie toute la team de Longbeach (QS160 en force), vous faites partie de la famille et continuez à prendre soin les uns des autres. Vous êtes de superbes personnes avec qui on ne s'ennuie jamais.

Enfin, j'aimerais du plus profond de mon cœur remercier ma famille car j'ai la chance d'avoir une famille aussi formidable. Je ne pourrais donner les noms de tout le monde étant donné la grandeur de celle-ci mais sachez que je suis fière de vous avoir tous prêt de moi. Je remercie mes oncles et tantes qui se sont déplacés le jour J et qui ont toujours cru en moi (Isabelle et Jean-Christophe, j'espère que vous lirez souvent ma thèse ; Martine, je suis très heureuse de t'avoir comme marraine ; Chantal, sache que je suis fière de toi et de tout ce que tu as pu endurer ces derniers temps, garde ce courage ; Antoine & Béa, vous êtes pour moi mes deuxième parents et je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi). Merci à Guillaume et Babeth d'être venus le jour J et de m'avoir soutenu. Merci à mes cousins et cousines et plus particulièrement à Nicolas & Sophie, sans oublier leurs formidables enfants Clément & Louane que j'aime très très fort. Je serai toujours là pour vous même si je vais être plus loin géographiquement. Merci de m'avoir permis de devenir marraine et prenez soin de vous quatre. Mon deuxième frère, Florian, je crois que je t'ai souvent dit ce que je pensais mais ne l'oublie jamais. La Glu est fière de t'avoir comme cousin et surtout je tiens à toi plus que tout au monde. Prends soin de ta femme car c'est une belle personne. Merci à toi Sandie la princesse et sache que je suis très heureuse d'être ta témoin de mariage. Tu m'as fait le plus cadeau en me donnant cette responsabilité. Et sans oublier votre enfant Fiasco.

Le meilleur pour la fin, merci à ma sœur Laëtitia qui a toujours cru en moi, je suis fière de toi et de tout ce que tu as pu accomplir et sache que je t'aime fort même si on ne se l'ai pas souvent dit. Merci à mon frère Seb et sa famille : Karine, Léa, Maily et Nino. Je vous aime tellement et je suis tellement triste de me dire que vous allez vivre plein de choses sans moi mais je vous attends tous avec impatience. Merci encore pour tout, vous êtes juste géniaux. Et le plus grand des mercis est pour mes parents qui sont les meilleurs parents qu'on puisse avoir. Je vous remercie de m'avoir laissé vivre ma vie comme je l'entendais même si ça n'a pas toujours été facile pour vous. Vous m'avez permis d'arriver ici et de construire ma vie. Je vous aime du plus profond de moi et je suis fière de vous. Je finirai par remercier ma grand-mère qui est pour moi la femme que j'admire le plus. Tu me manqueras et j'espère que je te reverrai vite. Merci à toi Mémé d'avoir pris soin de moi.

Abréviations	7
Introduction générale	15
Chapitre 1 : Synthèse totale d'un lipo-chitooligosaccharide	19
I. Introduction : les symbioses	19
I.A. La symbiose <i>Rhizobia</i> -légumineuse	20
I.A.1. Définition et présentation.....	20
I.A.2. Dialogue moléculaire	21
I.A.3. Application en agriculture de la symbiose à <i>Rhizobia</i>	23
I.B. La symbiose mycorhizienne	25
I.B.1. Présentation.....	25
I.B.2 Les effets bénéfiques de la mycorhization.....	26
I.B.3. Application en agriculture de la mycorhization	28
I.B.4. Les principaux types de mycorhizes	29
I.B.4.a. Les ectomycorhizes	29
I.B.4.b. Les endomycorhizes ou « mycorhizes à arbuscules » (MA)	30
I.B.5. Processus de colonisation de la plante-hôte par les endomycorhizes	31
I.B.6. L'arbuscule : le cœur de la symbiose.....	33
I.B.7. Dialogue moléculaire	33
I.C. Les différents lipo-chitooligosaccharides - signaux chimiques pour la nodulation et la mycorhization	36
I.C.1. Structure des facteurs de nodulation	36
I.C.2. Isolement guidé et structure des facteurs Myc - voie de signalisation nodulation / endomycorhization	38
II. Stratégies de synthèse	40
II.A. La glycosylation : généralités	40
II.A.1. Les fluorures de glycosyle.....	43
II.A.2. Les imidates de glycosyle	46
II.A.3. Les thioglycosides.....	47
II.A.4. Conclusion sur la glycosylation.....	52
II.B. Les différentes synthèses de LCOs : facteurs Nod	53

II.B.1. Première synthèse des facteurs [NodSm-IV (C16:2)] par le groupe de K. C. Nicolaou en 1992	54
II.B.2. Synthèse du facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] par le groupe de J.-M. Beau en 1994	58
II.B.3. Synthèse des facteurs [NodSm-IV (C16:2, S)], [NodBj-IV] et [NodBj-V] par le groupe de T. Ogawa en 1994	62
II.B.4. Synthèse du facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] par le groupe Y.-Z. Hui en 1994	67
II.B.5. Synthèse du facteur [NodRf-III (C18:1, MeFuc)] par B. Fraser-Reid en 1997	70
II.B.6. Synthèse des facteurs Nod de <i>Rhizobium</i> sp. NGR 234 par V. I. Torgov et V. N. Shibaev en 2007	74
II.B.7. Conclusion sur les synthèses par voie chimique des facteurs Nod	77
II.B.8. Synthèse de LCOs par génie biotechnologique	78
II.C. Conclusion sur les stratégies de synthèse	81
III. Synthèse totale du LCO [Myc-IV (C16:0, S)]	81
III.A. Rétrosynthèse du facteur [Myc-IV (C16:0, S)]	82
III.B. Résultats et discussion	84
III.B.1. Synthèse des monosaccharides	84
III.B.2. Synthèse des disaccharides	88
III.B.2.a. Synthèse du disaccharide précurseur de l'unité non réductrice	88
III.B.2.b. Synthèse du disaccharide précurseur de l'unité réductrice	89
III.B.3. Synthèse des tétrasaccharides par glycosylation 2 + 2	93
III.B.4. Fonctionnalisation des tétrasaccharides	95
III.C. Conclusion	101

Chapitre 2 : Utilisation de liquides ioniques supportés pour la synthèse d'oligosaccharides..... 105

I. Les liquides ioniques	105
I.A. Définition et historique	105
I.B. Synthèse des liquides ioniques	109
I.B.1. Réaction de quaternisation de l'hétéroatome	109
I.B.2. Réaction d'échange d'anions	110
I.B.2.a. Traitement par des acides de Lewis	111
I.B.2.b. Réaction de métathèse anionique	112
I.C. Propriétés physico-chimiques	113
I.C.1. Propriétés thermiques	113
I.C.1.a. Point de fusion	113
I.C.1.b. Température de décomposition	114
I.C.2. Viscosité	114

I.C.3. Densité.....	115
I.C.4. Solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques	115
I.D. Applications des liquides ioniques.....	117
II. Synthèses d'oligosaccharides supportées.....	119
II.A. Synthèse sur support solide (résine).....	119
II.A.1. Présentation	119
II.A.2. Exemples de synthèses d'oligosaccharides	120
II.A.3. Conclusion.....	127
II.B. Synthèse sur support soluble.....	127
II.B.1. Polymère soluble : polyéthylène glycol (PEG).....	127
II.B.1.a. Présentation	127
II.B.1.b. Exemples de synthèses d'oligosaccharides	128
II.B.1.c. Conclusion	136
II.B.2. Support Fluoré	136
II.B.2.a. Présentation et synthèses	136
II.B.2.b. Conclusion	141
II.B.3. Synthèse avec liquides ioniques supportés	141
II.B.3.a. Présentation.....	141
II.B.3.b. Exemples de synthèses d'oligosaccharides.....	142
II.B.3.c. Conclusion.....	149
II.C. Conclusion sur les différents supports.....	150
III. La TMG-chitotriomycin	151
III.A. Présentation	151
III.B. Synthèses.....	152
III.C. Conclusion.....	157
IV. Résultats et discussion	158
IV.A. Essais préliminaires.....	158
IV.A.1. Synthèse de monosaccharides et choix de l'espaceur	159
IV.A.1.a. Bras espaceur aliphatique	159
IV.A.1.b. Bras espaceur aromatique	160
IV.A.1.c. Conclusion.....	164
IV.A.2 Conditions de glycosylation	164
IV.A.3. Ouverture de l'acétal de benzylidène.....	166
IV.A.3.a. Ouverture réductrice de l'acétal de benzylidène.....	167
IV.A.3.b. Ouverture oxydante de l'acétal de benzylidène.....	167
IV.A.3.c. Conclusion.....	168
IV.A.4. Conditions optimales	168
IV.A.5. Conclusion.....	170

IV.B. Synthèse du chitooligosaccharide d'intérêt.....	171
IV.B.1. Rétrosynthèse	171
IV.B.2. Synthèse des disaccharides.....	172
IV.B.3. Synthèse des tétrasaccharides.....	174
IV.B.3.a. Glycosylation 2 + 2.....	174
IV.B.3.b. Fonctionnalisation et déprotections.....	175
IV.C. Conclusion et perspectives.....	181
Conclusion générale	185
Experimental Section	191
Bibliographie	261

Abréviations

Abréviations

Ac :	acétyle
AL :	acide de Lewis
All :	allyle
aq. :	aqueux(se)
Ar :	aryle
atm :	atmosphère normale
BAIL :	<i>Brønsted Acid Ionic Liquid</i>
Bn :	benzyle
br :	<i>broad</i>
BSM :	1-benzènesulfinylmorpholine
BSP :	1-benzènesulfinylpipéridine
Bz :	benzoyle
CAN :	nitrate de cérium et d'ammonium
cat. :	catalytique
CCaMK :	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
ClAc :	2-chloroacétyle
CO :	chitoooligosaccharide
COSY :	<i>COrrrelation SpectroscopY</i>
Cp :	cyclopentadiényle
CPG :	<i>Controlled Pore Glass</i>
d :	doublet
DAST :	trifluorure de diéthylaminosulfure
DBU :	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC :	dicyclohexylcarbodiimide
DDQ :	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEPT :	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DMAP :	<i>N,N</i> -diméthyl-4-aminopyridine

DMDO :	diméthyl-dioxirane
DME :	diméthoxyéthane
DMF :	<i>N,N</i> -diméthylformamide
<i>DMI</i> :	<i>Does not Make Infection</i>
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DMTST :	triflate de diméthyl(méthylthio)sulfonium
DTBMP :	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-méthylpyridine
ϵ :	constante diélectrique
EDC :	1-éthyl-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
éq. ou eq.:	équivalent
ESI :	<i>ElectroSpray Ionization</i>
Et :	éthyle
exc.:	excès
Fmoc :	9-fluorénylméthoxy-carbonyl
FT :	transformée de Fourier
Fuc :	L-fucose
GlcNAc :	<i>N</i> -acétyl-D-glucosamine
GP :	groupement partant
h :	heure
HAPyU :	1-(1-pyrrolidinyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-ylmethylene)pyrrolidinium hexafluorophosphate <i>N</i> -oxide
Hdpa :	2,2'-dipyridylamine
HMBC :	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC :	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOBT :	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HPLC :	chromatographie liquide haute performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRMS :	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSAB :	<i>Hard and Soft Acids and Bases</i>
<i>hsn</i> :	<i>host specific nodulation</i>
hv :	photons
ICROS :	<i>Ionic Catch and Release Oligosaccharide Synthesis</i>

IDCP :	perchlorate de dicollidine et d'iodonium
Im :	imidazolium
<i>i</i> -Pr :	<i>iso</i> -propyle
IR :	InfraRouge
λ :	longueur d'onde
LC :	<i>Liquid Chromatography</i>
LCO :	lipo-chitooligosaccharide
Lev :	levulinate
LI :	Liquide Ionique
LYR :	<i>LYsine Receptor</i>
m :	multiplet
M :	Métal
MA :	Mycorhizes à Arbuscules
Maj :	majoritaire
MALDI :	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
MAS :	<i>Magic Angle Spinning</i>
Mbp :	5-(<i>tert</i> -butyl)-2-méthylphényle
MBz :	<i>para</i> -méthoxybenzoyle
<i>m</i> -CPBA :	acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque
Me :	méthyle
MeCN :	acétonitrile
MES :	acide morpholino-2-éthanesulfonique
MFR :	<i>Myc Factor Receptor</i>
min :	minutes
Mol. Wt. :	<i>Molecular Weight</i>
Mp	<i>melting point</i>
MP :	<i>para</i> -méthoxyphényle
MPBT :	<i>S</i> -(4-méthoxyphényl)benzèthiosulfinate
MPCHO :	anisaldéhyde
MR :	Résine Merrifield
MS :	<i>Mass Spectrometry</i>
NBS :	<i>N</i> -bromosuccinimide
<i>n</i> -Bu :	<i>n</i> -butyle

NFP :	<i>Nod Factor Perception</i>
NFR :	<i>Nodulation Factor Receptor</i>
NIS :	<i>N-iodosuccinimide</i>
NMP :	<i>N-méthyl-2-pyrrolidone</i>
<i>nsp</i> :	<i>nodulation signaling pathway</i>
org. :	organique
<i>p</i> :	<i>para</i>
PEG :	polyéthylène glycol
Pent :	<i>n</i> -pentényle
PEO :	polyéthylène oxyde
Ph :	phényle
Phth :	phtaloyle
Piv :	pivaloyle
PMB :	<i>para</i> -méthoxybenzyle
ppm :	partie par million
PPTS :	<i>para</i> -toluènesulfonate de pyridinium
py :	pyridine
q :	quadruplet
quant. :	quantitatif
Rdt :	rendement
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
s :	singulet
S _N :	substitution nucléophile
t :	triplet
TA :	Température Ambiante
TBAB :	bromure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBAF :	fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBDPS :	<i>tert</i> -butyldiphénylesilyle
TBS ou TBDMS:	<i>tert</i> -butyldiméthylesilyle
TCA :	2,2,2-trichloroacétyle
TCP :	tétrachlorophtaloyle
TES :	triéthylesilyle
Tf :	triflate

TFA :	acide trifluoroacétique ou 2,2,2-trifluoroacétyle
THF :	tétrahydrofurane
TIPS :	triisopropylsilyle
TM :	tamis moléculaire
TMS :	triméthylsilyle
TOF :	<i>Time Of Flight mass spectrometry</i>
Tol :	tolyle
Troc :	trichloroéthoxycarbone
Ts :	tosyle
TTBP :	2,4,6-tri- <i>tert</i> -butylpyrimidine
UDP :	uridine diphosphate
UPLC :	chromatographie liquide ultra performance (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
UV :	Ultra-Violet
Z :	benzyloxycarbone
δ :	déplacement chimique
μ W :	micro-ondes

Introduction générale

Introduction générale

Le respect de l'environnement est actuellement au cœur des préoccupations de notre société. Dans de nombreux secteurs, l'objectif est de se positionner dans une politique de développement durable. La chimie organique étant présente dans un nombre varié de domaines (agriculture, agroalimentaire, pharmaceutique...), il est nécessaire que les chimistes respectent cette politique, tout en restant efficaces dans leur mise au point de nouveaux produits et technologies.

Les oligosaccharides et les glycoconjugués (oligosaccharides reliés à un peptide, une protéine ou un lipide situé sur la partie aglycone), formés par réaction de glycosylation, sont en effet impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques.¹ Ces molécules se distinguent par leurs implications dans divers domaines industriels comme l'agroalimentaire ou encore le secteur pharmaceutique.² Même si les premières études concernant la glycosylation datent de la fin du XIX^e siècle,³ cette réaction est actuellement toujours étudiée. L'engouement pour l'accès à ces structures complexes a conduit les glycochimistes à développer de nouvelles méthodes chimiques ou enzymatiques ces dernières années.⁴

Afin de développer une agriculture plus propre et plus respectueuse de l'environnement, nous pourrions favoriser les interactions biologiques naturelles présentes dans la rhizosphère. Deux interactions majeures sont connues, la symbiose à *Rhizobia* (symbiose bactérie fixatrice d'azote-légumineuse) et la mycorhization (symbiose champignon-plante). Elles permettent aux plantes de croître en leur apportant les nutriments nécessaires à leur croissance. Jusqu'à maintenant de nombreuses études ont été effectuées sur

¹ (a) *Chemical Synthesis of Glycosides and Glycomimetics, in Carbohydrates in Chemistry and Biology*, (Eds.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ), Wiley-VCH, Weinheim; **2000** ; (b) Toshima, K. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1282-1297. (c) Pellissier, H. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 2947-2993.

² Stallforth, P.; Lepenies, B.; Adibekian, A.; Seeberger, P. H. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5561-5577.

³ (a) Paulsen, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 155-173 ; (b) Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 212-235 ; (c) *Chemical Synthesis of Glycosides and Glycomimetics, in Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Vol. 1, (Eds.: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ), Wiley-VCH, Weinheim; **2000** ; (d) Nicolaou, K. C.; Mitchell, H. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1576-1624.

⁴ (a) Zhu, X.; Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2-37 ; (b) *Handbook of Chemical Glycosylation* Demchenko, A. V. Ed.; Wiley. **2008** ; (b) Hanson, S.; Best, M.; Bryan, M C.; Wong, C.-H. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 656-663 ; (d) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465-4493.

la symbiose *Rhizobia*-légumineuse, et notamment sur les molécules intervenant dans sa mise en place. Les découvertes sur le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne sont beaucoup plus récentes. Des substances intervenant dans ce processus, appelées « facteurs Myc » ou facteurs de mycorhization, ont été caractérisées en 2011.⁵ Ce sont des oligomères dérivés de la chitine (biopolymère naturel présent dans l'exosquelette des insectes, des arthropodes et également dans la paroi de certains champignons), comportant des unités *N*-acétyl-D-glucosamine reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β -1,4, liaison la plus difficile à former par glycosylation (Figure 1).

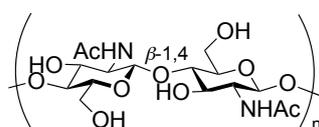


Figure 1 : oligomères dérivés de la chitine

Le premier objectif de cette thèse est d'effectuer la synthèse totale d'un des facteurs Myc identifié récemment en utilisant des nouvelles méthodes répondant aux critères demandés à la chimie moderne (moins de toxicité, moins de pollution). Nous détaillerons les différentes étapes effectuées afin d'isoler la molécule cible dans le premier chapitre de cette thèse. Dans le second chapitre, nous présenterons les résultats obtenus lors de la mise au point d'une nouvelle méthode de glycosylation supportée utilisant des liquides ioniques pour former des oligomères à liaisons glycosidiques β -1,4 de *N*-acétyl-D-glucosamine. L'objectif de cette nouvelle méthode de synthèse est de s'affranchir des purifications laborieuses par chromatographie sur gel de silice nécessaires après chaque étape de glycosylation lors des synthèses classiques d'oligosaccharides. L'utilisation de ces liquides ioniques sur les unités saccharidiques permet de changer leurs propriétés physico-chimiques et de les rendre insolubles dans des solvants peu polaires ou apolaires. Il est ainsi possible de purifier les produits par un simple lavage et de rendre la glycosylation beaucoup plus simple. Cette méthode de formation de liaison β -1,4 sera appliquée pour la synthèse totale d'autres oligomères de *N*-acétyl-D-glucosamine bioactifs comme la TMG-chitotriomycin, qui est un inhibiteur spécifique de β -*N*-acétylglucosaminidases d'insectes et de champignons.⁶

⁵ Maillet, F.; Poinot, V.; André, O.; Puech-Pagès, V.; Haouy, A.; Gueunier, M.; Cromer, L.; Giraudet, D.; Formey, D.; Niebel, A.; Martinez, E. A.; Driguez, H.; Bécard, G.; Dénarié, J. *Nature* **2011**, *469*, 58-63.

⁶ Usuki, H.; Nitoda, T.; Ichikawa, M.; Yamaji, N.; Iwashita, T.; Komura, H.; Kanzaki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4146-4152.

Chapitre 1

Chapitre 1 : Synthèse totale d'un lipo-chitooligosaccharide

I. Introduction : les symbioses

Les racines, organes souterrains des plantes, jouent des rôles primordiaux dans le développement et la vie de ces organismes. Outre le fait d'ancrer les plantes à un endroit donné, elles permettent l'absorption de l'eau et des minéraux essentiels à la croissance. Afin de comprendre l'influence des racines dans la vie de la plante, il faut également considérer son environnement immédiat. C'est Lorenz Hiltner en 1904 qui utilisa pour la première fois le terme *Rhizosphère* provenant du grec *Rhiza* signifiant « racine » et *Sphaera* signifiant « cercle d'influence ».⁷ La rhizosphère représente le champ d'influence du système racinaire, elle comprend l'ensemble des racines ainsi que la zone de sol proche influencée par ces racines (soit *via* des exsudats racinaires, soit *via* des microorganismes interagissant avec les dernières).⁸ En effet, un grand nombre de plantes terrestres vivent en étroite interaction au niveau de leurs racines avec des microorganismes tels que des bactéries ou des champignons mycorhiziens. Une symbiose entre ces deux espèces est caractérisée par l'échange d'éléments bénéfiques aux deux partenaires. Les microorganismes vont pouvoir fournir à la plante de l'eau ainsi que des sels minéraux, tout en sécrétant des substances inhibant le développement d'autres microorganismes, présents dans la rhizosphère, qui leurs sont pathogènes. En échange, les plantes-hôtes leur donnent une partie des biomolécules nutritives issues de la photosynthèse.

Dans le règne végétal, deux principaux types de symbioses sont rencontrés, la symbiose à *Rhizobia* et la mycorhization. La symbiose fixatrice d'azote moléculaire, s'effectue entre des bactéries du sol (du genre *Rhizobiaceae*) capables d'assimiler l'azote atmosphérique et les plantes de la famille des légumineuses, et permet à ces dernières de croître sans addition d'engrais azotés. La mycorhization, ou symbiose mycorhizienne, est beaucoup plus générale car au moins 90% des plantes terrestres vivent en étroite relation avec

⁷ Hartmann, A.; Rothballer, M.; Schmid, M. *Plant and Soil* **2008**, 312, 7-14.

⁸ Badri, D. V.; Weir, T. L.; van der Lelie, D.; Vivanco, J. M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, 20, 642-650.

des champignons.⁹ Cette symbiose contribue à la nutrition minérale, essentiellement en phosphate, et hydrique des plantes-hôtes.

C'est pour cela que ces phénomènes phytobiologiques ont suscité un énorme intérêt dans la communauté scientifique afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action et d'étendre leurs applications. La présentation de ces deux symbioses est effectuée ci-dessous.

I.A. La symbiose *Rhizobia*-légumineuse

I.A.1. Définition et présentation

La symbiose fixatrice d'azote moléculaire est la première grande association symbiotique étudiée d'un point de vue moléculaire, celle-ci existe depuis 65 millions d'années.¹⁰ Comme son nom l'indique cette symbiose rhizobiacée-légumineuse va mettre en jeu des bactéries du type *Rhizobia* et des plantes de la famille des *Fabaceae* aussi appelées légumineuses (pois, soja, haricot, trèfle...). L'intérêt de ces bactéries est leur capacité de fixer l'azote atmosphérique et par le biais des interactions avec les racines des plantes de transférer l'azote transformé à la plante.

Lors de ce processus, les *Rhizobia* colonisent les racines de la plante-hôte et des nodosités vont alors être formées. Ces nodosités font office d'organes d'échange métabolique entre les bactéries et les plantes. C'est dans ces nodules que l'azote atmosphérique est fixé et réduit en ammoniac, nutriment nécessaire à la croissance des plantes, pour être assimilé par la plante-hôte. Ces microorganismes ont le pouvoir de générer une bonne alimentation de la légumineuse notamment en composés azotés même si le sol en est très pauvre. En échange, les bactéries bénéficient d'un micro-habitat favorable dû à l'apport, par les Fabacées, en substrats carbonés, essentiellement des sucres, issus de la photosynthèse. Les nodosités sont aussi un milieu riche en oxygène propice au développement des *Rhizobia* par la présence de leghémoglobine, enzyme fixatrice du dioxygène de structure voisine de l'hémoglobine. La partie globine est synthétisée par la plante-hôte et l'hème est produit par les bactéries. Cette protéine permet de protéger le complexe enzymatique nitrogénase/hydrogénase des effets

⁹ Smith, S. E.; Read, D. J. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn, Academic Press Inc. ; **2008**.

¹⁰ Herendeen, P. S.; Magallón-Puebla, S.; Lupia, R.; Crane, P. R.; Kobylinska, J. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1999**, *86*, 407-471.

empoisonnants du dioxygène atmosphérique. Elle constitue également une réserve de ce comburant pour ces bactéries à activité aérobie. Pour que cette symbiose puisse se produire, un dialogue moléculaire est nécessaire.

I.A.2. Dialogue moléculaire

La mise en place de la symbiose a lieu après une identification et une reconnaissance préliminaire sous forme de signaux chimiques. Les nodosités formées sont issues de la communication entre les deux symbiotes.¹¹ Après de nombreuses études, les molécules mises en jeu lors de ce dialogue ont été clairement identifiées (Schéma 1).^{12,13}

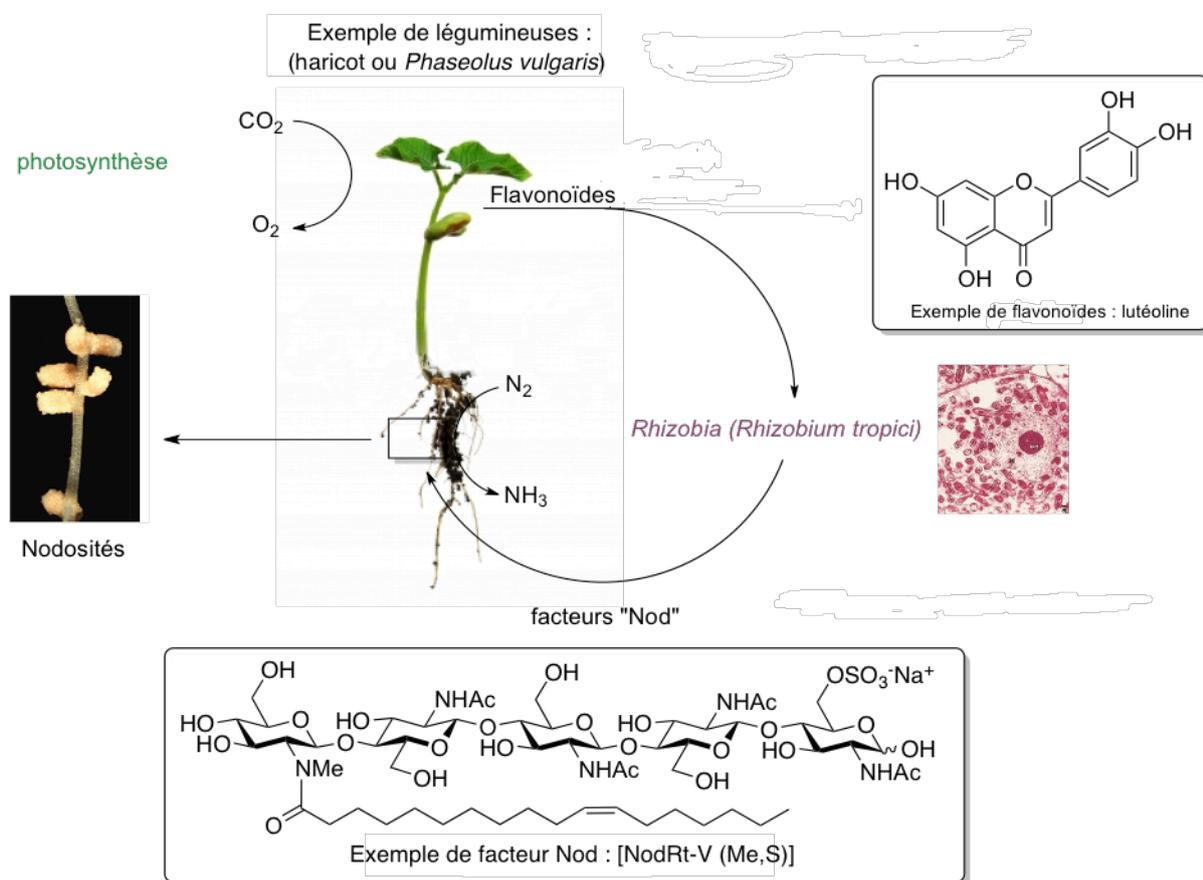


Schéma 1 : dialogue moléculaire plante / *Rhizobia*

¹¹ Cohn, J.; Day, R. B.; Stacey, G. *Trends Plant Sci.* **1998**, *3*, 105-110.

¹² Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Promé, J. C.; Dénarié, J. *Nature* **1990**, *344*, 781-784.

¹³ Dénarié, J.; Debellé, F.; Promé, J. C. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 503-535.

Prenons l'exemple de la symbiose entre le haricot et une population de *Rhizobium tropici* pour expliquer le mécanisme général valable pour les légumineuses. Les cellules pilifères des racines des Fabacées vont émettre des substances chimiques de reconnaissance de type flavonoïdes (ex : lutéoline). Ces exsudats induisent l'expression des gènes rhizobiens (les gènes *nod*) et attirent la bactérie au niveau des racines, qui, en retour synthétise et sécrète des facteurs de nodulations appelés « facteur Nod » (Schéma 1).^{14,15} Les enzymes issues de la traduction des gènes rhizobiens sont impliquées dans la biosynthèse des facteurs de nodulation actifs au niveau des racines à de très faibles concentrations (de 10^{-12} à 10^{-7} M). La reconnaissance spécifique des facteurs Nod par les récepteurs NFR1/5 conduit à une courbure du poil absorbant de la racine et au piégeage des *Rhizobia*, ce qui *in fine* permet la formation des nouveaux organes de reconnaissances, les nodules.¹⁶

Les bactéries circulent dans le poil absorbant en formant un filament infectieux qui leur permet de coloniser la racine. Elles pénètrent ensuite dans les cellules corticales où elles se différencient en bactéroïdes. Simultanément, une modification du pH et des oscillations des teneurs en ions calciums Ca^{2+} (« calcium spiking ») est observée.^{17,18} Ce signal est perçu par la protéine kinase CcMK induisant l'expression du gène *nsp2* (« nodulation signaling pathway »). Cette activation déclenche la production de cytokinines, hormones végétales responsables de la multiplication des cellules corticales. Les facteurs Nod sont donc cruciaux dans l'établissement de cette symbiose puisqu'ils coordonnent les réponses épidermiques et corticales permettant la création de la nodosité, nouvel organe racinaire de la plante (Schéma 2).^{19,20,21}

¹⁴ Van Rhijn, P.; Vanderleyden, J. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 124-142.

¹⁵ Zhang, J.; Subramanian, S.; Stacey, G.; Yu, O. *Plant J.* **2009**, *57*, 171-183.

¹⁶ Oldroyd, G. E. D. *Science* **2007**, *315*, 52-53.

¹⁷ Ehrhardt, D. W.; Wais, R.; Long, S. R. *Cell* **1996**, *85*, 673-681.

¹⁸ Gehring, C. A.; Irving, H. R.; Kabbara, A. A.; Parish, R. W.; Boukli, N. M.; Broughton, W. J. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1997**, *10*, 791-802.

¹⁹ Hirsch, A. M. *New. Phytol.* **1992**, *122*, 211-237.

²⁰ Cullimore, J. V.; Ranjeva, R.; Bono, J.-J. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 24-30.

²¹ Downie, J. A.; Walker, S. A. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **1999**, *2*, 483-489.

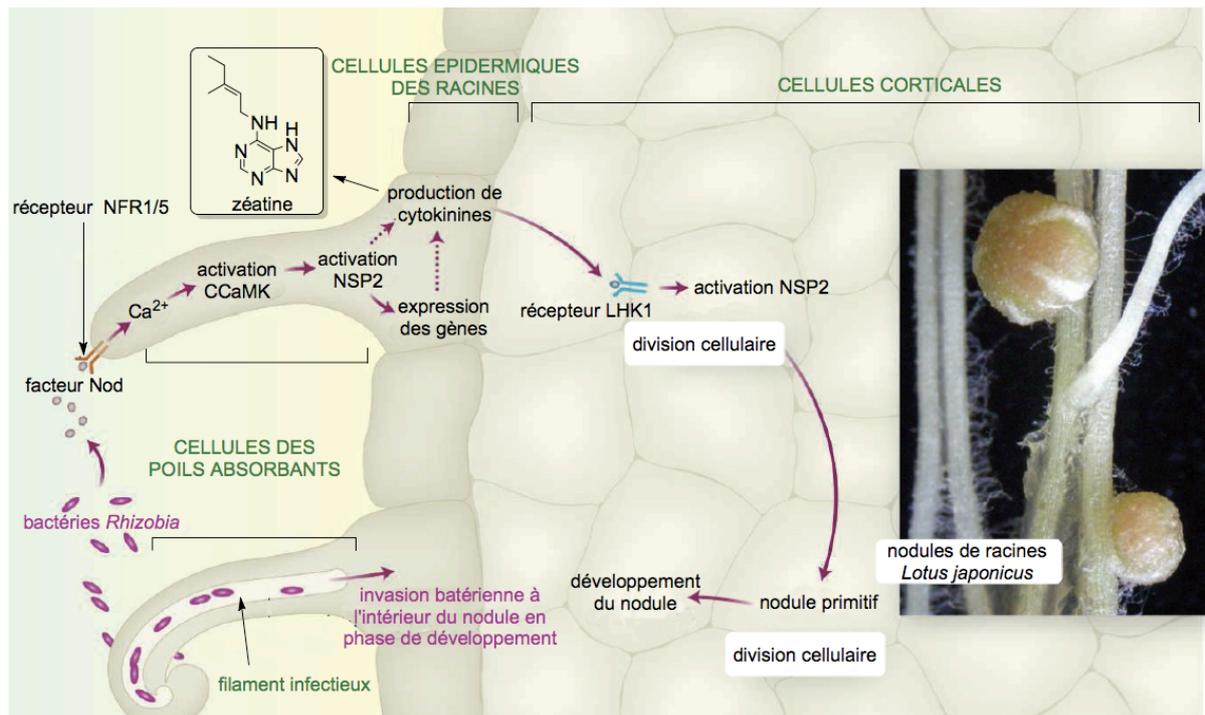


Schéma 2 :¹⁶ mécanisme pour la formation de nodule

Nous avons pu observer que cette symbiose présente de nombreux avantages pour la culture de légumineuses d'où son application en agriculture.

I.A.3. Application en agriculture de la symbiose à *Rhizobia*

L'approvisionnement en azote est un des principaux facteurs limitant de la production végétale. Pour mener à bien leur culture, les agriculteurs ont eu recours depuis de nombreuses années aux engrais enrichis en cet élément, dont la consommation mondiale ne cesse de croître. Cependant, si l'azote est présent dans l'atmosphère en quantité quasiment illimitée, sa réduction en ammoniac, puis son transport et son épandage, ont un coût énergétique très élevé, sans parler de la pollution engendrée par l'utilisation de telles substances. En effet, l'application en excès d'engrais azotés, pratiquée en agriculture intensive, génère un surplus non consommé par les végétaux qui est rejeté dans le sol. Ces nitrates sont alors drainés par les eaux de pluie, de ruissellement et d'infiltration et contaminent ainsi cours d'eau, lacs, rivières et nappes phréatiques. Les conséquences sont multiples : un risque pour la santé humaine considérable, l'asphyxie des écosystèmes aquatiques résultants de la prolifération d'algues selon un phénomène d'eutrophisation (déséquilibre d'un écosystème dû à un excès de

nutriments, qui se traduit par une croissance excessive des algues et une diminution de l'oxygène dissous).

L'exploitation et le développement des voies biologiques de la fixation de l'azote moléculaire représentent donc un enjeu considérable, tant sur le plan agronomique que sur le plan écologique. C'est pourquoi dès la fin du XIX^e siècle, les bactéries symbiotiques ont été utilisées en agriculture : elles ont été commercialisées et utilisées à grande échelle aux États-Unis sur des plantes fourragères comme la luzerne et le trèfle. Mais c'est avec le développement de la culture du soja que le marché des *Rhizobia* a réellement pris son essor. La bactérie *Bradyrhizobium japonicum* associée à cette légumineuse est originaire d'Extrême Orient et n'est pas naturellement présente sur les continents européens et américains. Son introduction dans les parcelles de soja sur ces terres non endémiques sous forme d'inocula a donc permis la mise en place du phénomène de nodulation, favorisant la nutrition du végétal en azote, et d'améliorer ainsi considérablement les cultures de soja (accélération de la croissance des plantes, hausse des rendements, diminution de l'apport en engrais azotés...).²² Le marché de cette bactérie a été estimé à 10 millions de dollars en 1993.

Les facteurs Nod seuls (en l'absence de *Rhizobia*) sont actifs sur les racines de la plante-hôte à de très faibles concentrations (du pico- au nanomolaire) et peuvent induire la plupart des réponses caractéristiques des bactéries elles-mêmes.²³ Des études réalisées par le CNRS en collaboration avec l'INRA et la société Nitragin ont montré que des inoculums de *Rhizobia* enrichis en facteurs Nod augmentaient de manière significative le taux de nodulation, la croissance des plantes et les rendements des cultures de légumineuses. Ces produits sont actuellement utilisés sur plus de 2 millions d'hectares et permettent un gain de rendement de l'ordre de 11 %, avec seulement 0,1 mg de facteurs Nod utilisés par hectare de culture. Leur commercialisation s'est principalement développée aux États-Unis, où les légumineuses sont largement utilisées. L'effet important de ces signaux chimiques sur la croissance des plantes n'est pas seulement lié à la création des nodosités, mais serait aussi la conséquence de la formation de mycorhizes et du développement du système racinaire.²⁴

²² Hume, D. J.; Blair, D. H. *Can. J. Microbiol.* **1992**, *38*, 588-593.

²³ (a) Schultze, M.; Kondorosi, A. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1996**, *6*, 631-638. ; (b) Cullimore, J. V.; Ranjeva, R.; Bono, J.-J. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 24-30.

²⁴ Oláh, B.; Brière, C.; Bécard, G.; Dénarié, J.; Gough, C. *Plant J.* **2005**, *44*, 195-207.

En comparaison à la symbiose à *Rhizobia*, une seconde symbiose entre les plantes et des champignons est connue : la symbiose mycorhizienne.

I.B. La symbiose mycorhizienne

I.B.1. Présentation

L'origine étymologique du terme "mycorhize" provient du préfixe "myco-" (du grec *mykes* : champignon) et du suffixe "-rhize" (du grec *rhiza* : racine). Il désigne l'association symbiotique entre un "champignon" et les racines d'une plante.²⁵ On appelle "champignon" un organisme vivant dans le sol constitué d'une spore et de fins filaments (les hyphes) formant un réseau souvent très étendu appelé mycélium. Ce que l'on nomme habituellement "champignon" dans le langage courant n'est en fait que la fructification temporaire et visible du mycélium : le "sporophore".

Les premières études scientifiques liées à la découverte de la symbiose mycorhizienne ont été réalisées en 1885 par Frank.²⁶ La naissance de ce phénomène biologique est très ancienne, son âge a été estimé à plus de 400 millions d'années grâce à des études moléculaires²⁷ réalisées par séquençage d'ADN et à l'analyse de données fossiles.²⁸ Il semblerait même que les champignons mycorhiziens aient contribué à la colonisation terrestre par les plantes.²⁹ Contrairement à la symbiose à *Rhizobia*, la symbiose mycorhizienne est essentiellement non-spécifique : un champignon a la capacité de coloniser plusieurs espèces de plantes, tandis qu'une plante-hôte peut interagir avec plusieurs espèces fongiques. Dans cette association symbiotique, où la plante-hôte est connectée à un réseau d'hyphes de champignons, le végétal fournit des substances organiques au symbiote fongique telles que les sucres formés lors de la photosynthèse, et ce dernier lui apporte en échange de l'eau et des sels minéraux.³⁰ L'importance de cet échange pour le bon développement de la plante-hôte est expliqué ci-après.

²⁵ Parniske, M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 763-775.

²⁶ Frank, A. B. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **1885**, *3*, 128-145.

²⁷ Simon, L.; Bousquet, J.; Lévesque, R. C.; Lalonde, M. *Nature* **1993**, *363*, 67-69.

²⁸ (a) Remy, W.; Taylor, T. N.; Hass, H.; Kerp, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11841-11843. ; (b) Redecker, D.; Kodner, R.; Graham, L. E. *Science* **2000**, *289*, 1920-1921.

²⁹ (a) Pirozynski, K. A.; Malloch, D.W. *Biosystems* **1975**, *6*, 153-164. ; (b) Redecker, D.; Morton, J. B.; Bruns, T. D. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2000**, *14*, 276-284. ; (c) Heckman, D. S.; Geiser, D. M.; Eidell, B. R.; Stauffer, R. L.; Kardos, N. L.; Hedges, S. B. *Science* **2001**, *293*, 1129-1133.

³⁰ Smith, S. E.; Read, D. J. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn, Academic Press Inc.; **2008**.

I.B.2 Les effets bénéfiques de la mycorhization

Un des principaux avantages de la mycorhization est d'améliorer la nutrition minérale de la plante-hôte. En effet, le champignon permet au végétal d'acquérir des nutriments présents dans le sol, principalement du phosphore, mais aussi de l'azote, du potassium, du zinc, du cuivre et du soufre, qui sont généralement peu ou non assimilables directement par la plante. Les hyphes peuvent s'étendre très loin de la plante-hôte (1000 m de filaments mycéliens pour 1 m de racine) ce qui permet d'explorer une surface de sol plus grande que celle couverte par les racines et de transporter les éléments minéraux vers l'intérieur de celles-ci. De plus, certaines substances organiques sont dégradées par le champignon, la plante étant incapable de décomposer des molécules naturelles trop complexes (Schéma 3).³¹

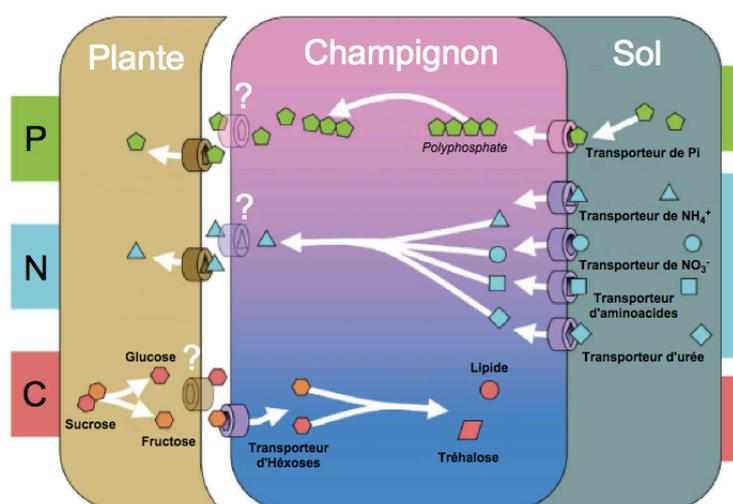


Schéma 3 :³² échange de nutriments entre les microorganismes

Outre son apport nutritionnel, la symbiose mycorhizienne améliore l'alimentation en eau de la plante-hôte, toujours grâce à ce vaste réseau d'hyphes qui augmente la surface d'absorption des racines, et favorise ainsi l'adaptation du végétal aux conditions de sécheresse.^{33,34}

³¹ (a) Hodge, A.; Campbell, C. D.; Fitter, A. H. *Nature* **2001**, *413*, 297-299. ; b) Karandashov, V.; Bucher, M. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 22-29. ; (b) Bucher, M. *New Phytol.* **2007**, *173*, 11-26.

³² Bonfante, P.; Genre, A. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 48.

³³ Aroca, R.; Porcel, R.; Ruiz-Lozano, J. M. *New Phytol.* **2007**, *173*, 808-816.

³⁴ Augé, R. M. *Mycorrhiza* **2001**, *11*, 3-42.

Cette association symbiotique augmente aussi, en général, la tolérance de la plante au froid ainsi qu'au stress salin.³³ De plus, elle lui confère une meilleure résistance à certains polluants métalliques (zinc, chrome, nickel...), lui permettant ainsi de coloniser des sols contaminés, car les filaments mycéliens absorbent et piègent ces composés.³⁵ Ces filaments permettent également d'améliorer la qualité du sol en retenant les agrégats et en stabilisant sa structure.³⁶

De nombreuses études ont révélé l'effet protecteur des champignons mycorrhiziens contre les agents pathogènes du sol (champignons et plantes parasites, bactéries, oomycètes, nématodes).^{37,38,39} La résistance des plantes vis-à-vis de ces agents biologiques varie selon les espèces fongiques, la nature du pathogène et les conditions environnementales.⁴⁰ Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'action protectrice de la symbiose. Tout d'abord, l'association entre le champignon et le végétal induit des changements morphologiques et anatomiques de la racine, comme la formation du manteau fongique, qui crée une barrière protectrice contre les attaques de microorganismes pathogènes. L'amélioration de la nutrition des plantes contribue également à l'augmentation de leur résistance. Le champignon consomme des substrats carbonés produits par le végétal qui ne sont alors plus disponibles pour les autres organismes du sol. Le développement des agents pathogènes est alors limité, d'autant plus que l'on observe une compétition pour l'accès aux sites d'infection/colonisation sur les racines. Enfin, la sécrétion par le champignon de molécules antibiotiques (mycorrhizin A **1**, chloromycorrhizin A **2**, Figure 2)⁴¹ et l'activation de mécanismes de défense chez le végétal, suite à l'association symbiotique, permettent également de protéger la plante-hôte.⁴²

³⁵ Hartley, J.; Cairney, W. G.; Meharg, A. A. *Plant Soil* **1997**, *189*, 303-319.

³⁶ Andrade, G.; Mihara, K. L.; Linderman, R. G.; Bethlenfalvay, G. J. *Plant Soil* **1998**, *202*, 89-96.

³⁷ Whipps, J. M. *Can. J. Bot.* **2004**, *82*, 1198-1227.

³⁸ Li, H.-Y.; Yang, G.-D.; Shu, H.-R.; Yang, Y.-T.; Ye, B.-X.; Nishida, I.; Zheng, C.-C. *Plant Cell Physiol.* **2006**, *47*, 154-163.

³⁹ Pozo, M. J.; Azcón-Aguilar, C. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2007**, *10*, 393-398.

⁴⁰ Azcón-Aguilar, C.; Barea, J. M. *Mycorrhiza* **1996**, *6*, 457-464.

⁴¹ Trofast, J.; Wickberg, B. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 875-879.

⁴² Liu, J.; Maldonado-Mendoza, I.; Lopez-Meyer, M.; Cheung, F.; Town, C. D.; Harrison, M. J. *Plant J.* **2007**, *50*, 529-544.

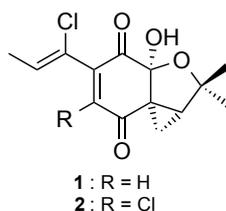


Figure 2 : molécules antibiotiques

La mycorhization représente donc un intérêt agrobiologique et écologique majeur puisqu'elle favorise la croissance du végétal dans un environnement peu fertile et pauvre en eau. Sa maîtrise permettrait à terme de développer l'agriculture sur des sols arides et serait également significative dans la lutte actuelle contre la pollution.

I.B.3. Application en agriculture de la mycorhization

Naturellement présentes dans la plupart des sols, les mycorhizes se font plus rares dans les terrains intensivement cultivés, soumis à une préparation agricole désinfectante (avec notamment l'utilisation de fongicides), ou dans les terrains n'ayant pas porté de végétation depuis longtemps. Or, nous avons vu précédemment que ces mycorhizes étaient indispensables à une bonne croissance de la plante. De plus, les végétaux puisent dans le sol les éléments minéraux nécessaires à leur développement (azote, phosphore, calcium...). Après la récolte des plantes cultivées en champ, ces éléments doivent donc être restitués au sol pour en conserver la fertilité. Dans le système d'agriculture intensive, l'apport d'éléments minéraux se fait surtout sous forme d'engrais chimiques, parfois appliqués en excès. Or, cette pratique est source de nuisances pour la santé humaine et l'environnement (pollution des nappes phréatiques, phénomène d'eutrophisation...).

Le recours à la "mycorhization contrôlée" semble être une solution efficace à tous ces problèmes. Des souches fongiques particulièrement performantes ont été sélectionnées, cultivées et introduites dans les systèmes culturels agricoles ou forestiers, sous forme de propagules (spores et mycélium). Du fait de leur caractère de symbiote obligatoire, les champignons mycorhiziens ne peuvent survivre et proliférer sans la présence d'une plante-hôte. Leurs cultures ont donc été généralement maintenues sur des racines de végétaux, dans

un substrat désinfecté ainsi que dans des systèmes de culture hors-sol.⁴³ La mycorhization contrôlée a déjà fait ses premiers pas à l'échelle commerciale en Amérique du Nord et en France. En effet, des résultats spectaculaires ont été obtenus avec le pommier, l'oranger, le citronnier et le frêne (ectomycorhization).⁴⁴

Au vu de l'intérêt majeur de l'utilisation de la mycorhization contrôlée en agriculture et de la possibilité d'en optimiser les résultats, il est indispensable de connaître les éléments et les mécanismes biologiques permettant l'établissement de la symbiose.

I.B.4. Les principaux types de mycorhizes

Il existe deux grands types de mycorhizes caractérisés par une morphologie et une anatomie propre : les ectomycorhizes et les endomycorhizes.

I.B.4.a. Les ectomycorhizes

Les ectomycorhizes sont apparues sur Terre il y a au moins 50 millions d'années.⁴⁵ Cette symbiose mycorhizienne, entre certaines espèces de champignons (les Basidiomycètes et les Ascomycètes) et environ 3 à 5 % des espèces végétales, plus particulièrement les espèces dites ligneuses, est à l'origine de la formation du sporophore. Les espèces concernées par cette symbiose sont dominantes dans les forêts humides des régions boréales, tempérées et montagneuses.^{30,46} On rencontre principalement des arbres et arbustes gymnospermes (comme les Pinacées et les Taxacées) et angiospermes (comme les Bétulacées, les Fagacées ou encore les Salicacées...). Environ 5500 espèces connues de champignons sont capables de former ce type de mycorhizes. Ainsi, plusieurs champignons comestibles tels que la truffe, le bolet, l'amanite, la chanterelle ou la russule sont la fructification de la symbiose ectomycorhizienne.⁴⁵ Cette symbiose ne présente pas de mycélium au sein des cellules des racines du végétal. Ce sont les hyphes qui vont venir entourer les racines et former ainsi une sorte de manteau fongique autour des radicelles afin de favoriser la pénétration entre les

⁴³ Jarstfer, A. G.; Sylvia, D. M. *Soil microbial ecology : applications in agricultural and environmental management*, Ed. B. Metting, Marcel Dekker, Inc.; New-York; **1992**, 349-377.

⁴⁴ Kugler, M. CRDI Explore : Les Mycorhizes, des engrais qui poussent comme des champignons **1986**, 5-6.

⁴⁵ Lepage, B.; Currah, R.; Stockey, R.; Rothwell, G. *Am. J. Bot.* **1997**, *84*, 410-410.

⁴⁶ Horton, T. R.; Bruns, T. D. *Molecular Ecology* **2001**, *10*, 1855-1871.

cellules du cortex, on parle de réseau de Hartig. C'est dans ce réseau que les échanges d'éléments nutritifs vont avoir lieu et d'où les filaments partent explorer le sol (Figure 3).

I.B.4.b. Les endomycorhizes ou « mycorhizes à arbuscules » (MA)

Les endomycorhizes, aussi connues sous le nom de mycorhizes à vésicules et arbuscules (MA), sont la forme de mycorhization la plus répandue car elles peuvent coloniser environ 80% des espèces végétales (soit plus de 400 000 espèces). Les champignons endomycorhiziens font partie de la division des Gloméromycètes et comptent plus de 200 espèces connues, ils sont alors peu spécifiques dans leurs relations de symbiose.⁴⁷ Il s'agit jusqu'à présent des plus anciens champignons mycorhiziens découverts dans des fossiles, datant de plus de 400 millions d'années.²⁹ Cela signifie que l'endomycorhize est le premier type de mycorhize apparu sur terre, ce qui expliquerait l'étendue du spectre d'hôte végétal. De plus, ces champignons ont la particularité de se reproduire asexuellement. Les hyphes pénètrent dans les cellules racinaires et forment des vésicules, organes de réserve, et des arbuscules, ramifications intracellulaires où se font les échanges entre les deux symbiotes (Figure 3).

⁴⁷ Schüßler, A.; Schwarzott, D.; Walker, C. *Mycol. Res.* **2001**, *105*, 1413-1421.

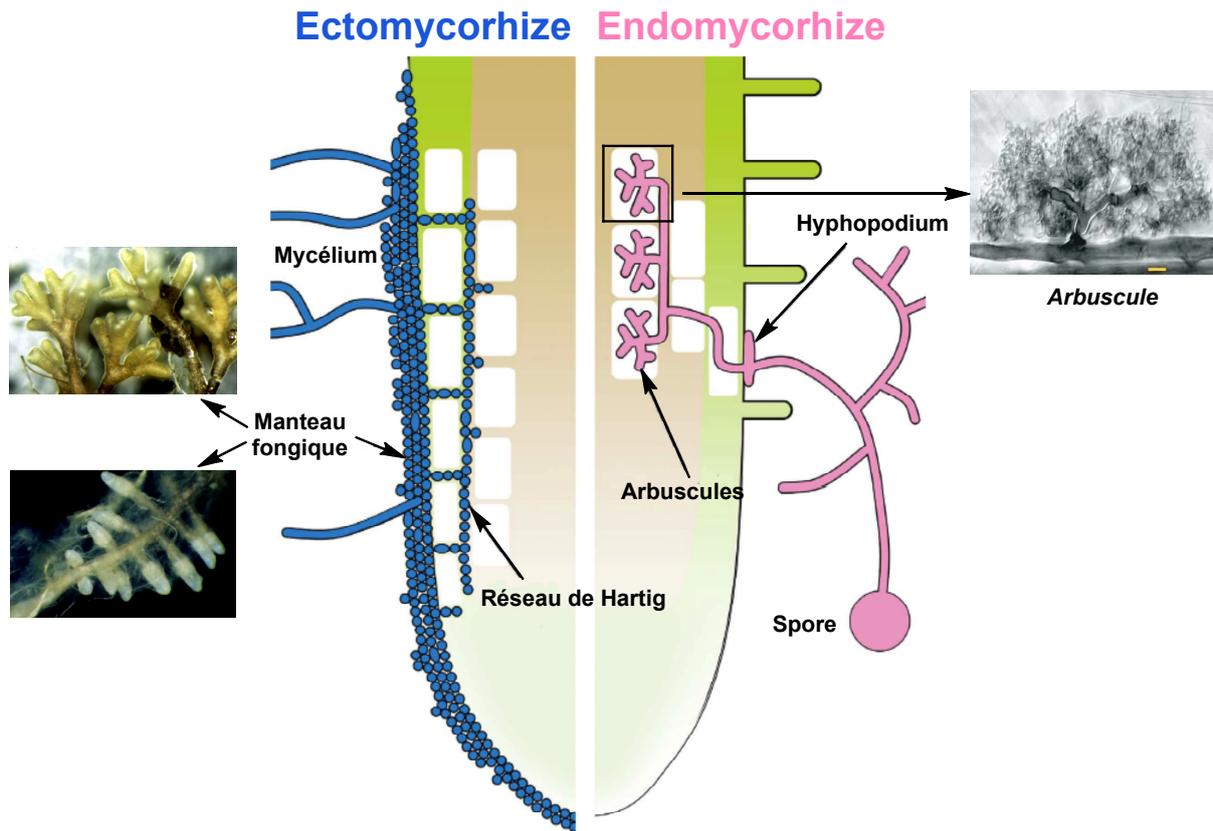


Figure 3 :³² différence entre ecto- et endomycorhize

Dans le paragraphe suivant, nous verrons comment se passe cette colonisation de la plante par les champignons.

I.B.5. Processus de colonisation de la plante-hôte par les endomycorhizes

La colonisation des racines est vitale pour les mycorhizes à arbuscules. Les hyphes explorent le sol à la recherche de la plante-hôte et la germination des spores s'effectue grâce à la dégradation des sources lipidiques stockées sur une période de quelques jours.³⁰ Si les hyphes ne trouvent pas d'hôte, ils arrêtent leur croissance et rétractent leur cytoplasme vers la spore, en attendant une nouvelle phase de germination. Cette situation est peu fréquente en raison du grand nombre de plantes hôtes susceptibles d'interagir avec ces microorganismes.³² Des exsudats sont produits par la plante, sous forme de strigolactones,^{48,49} induisant la

⁴⁸ Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H. *Nature* **2005**, *435*, 824-827.

⁴⁹ Besserer, A.; Puech-Pagès, V.; Kiefer, P.; Gomez-Roldan, V.; Jauneau, A.; Roy, S.; Portais, J. C.; Roux, C.; Bécard, G.; Séjalon-Delmas, N. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, 1239-1247.

formation de branchements au niveau des hyphes et déclenchant la production de CO₂.⁵⁰ Cette ramification du mycélium pré-symbiotique va accroître la probabilité de contact entre les deux organismes. Comme pour le phénomène de nodulation, les exsudats des champignons (facteurs Myc), perçus par la plante, déclenchent des oscillations calciques (« calcium spiking ») conduisant à l'activation de la cellule végétale (Figure 4, cellules et noyaux verts). Une invasion des cellules de l'épiderme jusqu'au cortex a alors lieu. Les hyphes intercellulaires se développent le long de l'axe de la racine lors de cette invasion. Ils pénètrent dans les cellules végétales. Les branchements hyper-ramifiés, occupant la quasi-totalité du volume de la cellule, sont appelés arbuscules du latin *arbusculum* (petit arbre). Ils constituent une zone d'échange exceptionnelle en nutriments grâce à la surface très étendue de ces structures biologiques et un nouvel organe racinaire, nous verrons dans la partie suivante son rôle primordial au cours de la symbiose (Figure 4).

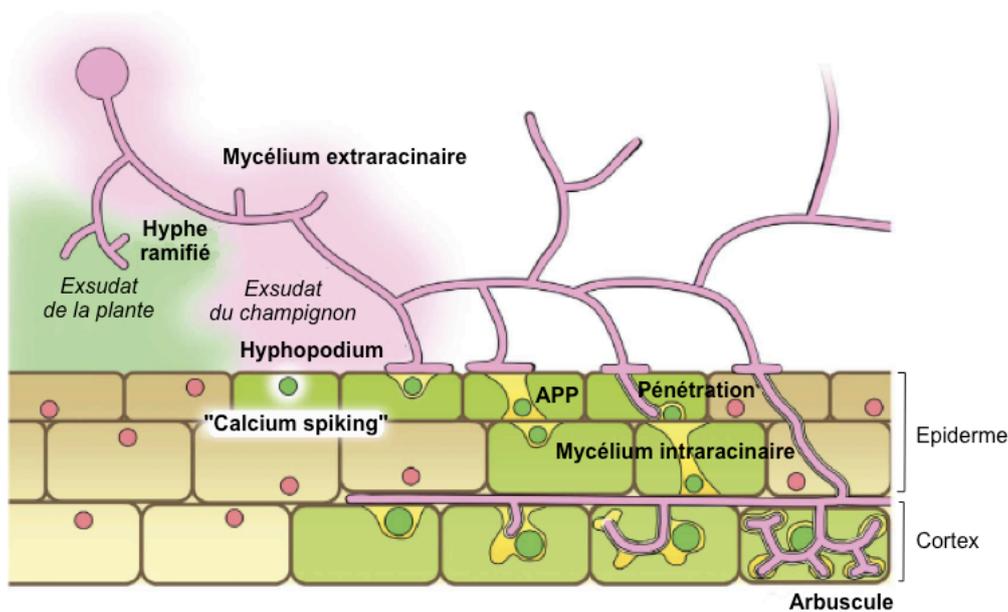


Figure 4 :³² mécanisme pour la formation de l'arbuscule

⁵⁰ Genre, A.; Chabaud, M.; Balzergue, C.; Puech-Pagès, V.; Novero, M.; Rey, T.; Fournier, J.; Rochange, S.; Bécard, G.; Bonfante, P.; Barker, D. G. *New Phytol.* **2013**, *198*, 190-202.

I.B.6. L'arbuscule : le cœur de la symbiose

Tous les champignons endomycorhiziens sont caractérisés par leurs arbuscules, d'où leur nom « mycorhizes à arbuscules ». Les arbuscules sont formés par prolifération des ramifications des hyphes intracellulaires au sein du cortex des racines et sont les principaux sites d'échanges nutritifs.⁵¹ Leur durée de vie est assez courte, elle n'excède pas plus de 5 jours. Grâce à l'étude de mutants de plantes, les gènes impliqués dans la naissance des arbuscules ont pu être identifiés mais le mécanisme contrôlant leur développement est encore inconnu à ce jour.⁵² Plusieurs arbuscules de différents âges peuvent coexister à l'intérieur de cellules voisines et des structures nouvelles comme les hyphopodia peuvent se développer sur une racine déjà en symbiose.³²

Tout comme pour la symbiose *Rhizobia*-légumineuses, nous allons expliquer comment les deux organismes vont communiquer.

I.B.7. Dialogue moléculaire

La reconnaissance de la plante-hôte par le champignon endomycorhizien se fait grâce à des molécules présentes dans les exsudats racinaires et fongiques. En effet, comme pour la symbiose à *Rhizobia*, l'association symbiotique est rendue possible grâce à un échange de signaux chimiques entre la racine de la plante-hôte et le mycélium qui est à l'origine de cette reconnaissance entre les deux symbiotes (Schéma 4).

⁵¹ Paszkowski, U. *New Phytol.* **2006**, *172*, 35-46.

⁵² Pumplin, N.; Mondo, S.J.; Topp, S.; Starker, C. G.; Gantt, J. S.; Harrison, M. J. *Plant J.* **2010**, *61*, 482-495.

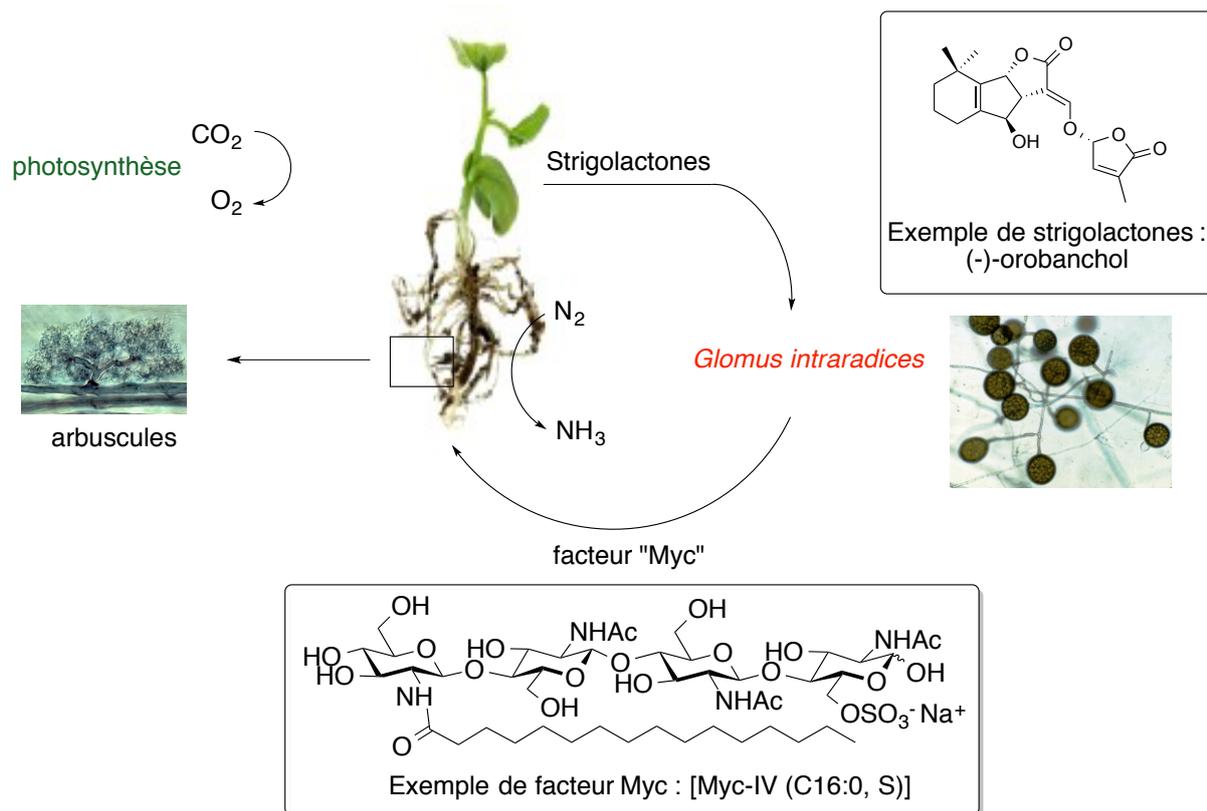


Schéma 4 : dialogue moléculaire plante / champignon

L'identification des molécules exsudées par les deux organismes a fait l'objet de nombreuses études.^{53,54} Concernant les signaux exsudés par la plante, il a été montré qu'il s'agissait de composés de faible poids moléculaire (inférieur à 500 Da) ayant la propriété d'être lipophiles. Les signaux impliqués dans une ramification intense des hyphes ont pu être isolés et totalement caractérisés. Ils se sont avérés être des apocaroténoïdes tétracycliques appelés strigolactones. Ils appartiennent au type strigol ou orobanchol en fonction de la stéréochimie du cycle C (α = strigol et β = orobanchol). Ces composés sont connus depuis longtemps comme étant des stimulants de la germination des graines de plantes parasites du genre *Striga* et *Orobanche* à de très faibles concentrations ($\approx 10^{-12}$ M).⁵⁴ A ce jour, plus de dix neuf strigolactones naturelles ont pu être caractérisées (Figure 5).⁵⁵

⁵³ Cook, C. E.; Whichard, L. P.; Turner, B.; Wall, M. E.; Egley, G. H. *Science*, **1966**, *154*, 1189-1190.

⁵⁴ Xie, X.; Yoneyama, K.; Yoneyama, K. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2010**, *48*, 93-117.

⁵⁵ de Saint Germain, A.; Bonhomme, S.; Boyer, F. D.; Rameau, C. *Curr Opin Plant Biol* **2013**, *16*, 583-589.

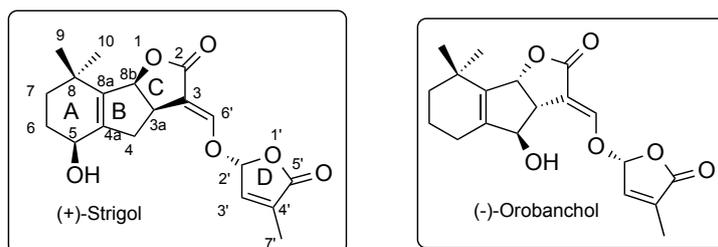


Figure 5 : exemples strigolactones

Ce sont des molécules qui ont la propriété de stimuler la ramification des hyphes des champignons⁵⁶ mais qui se dégradent rapidement du fait de la présence d'une fonction éther d'énol dans leur structure.⁵⁴ Elles vont donc être diffusées sur une courte distance et sont d'excellents messagers pour une signalisation à très grande proximité de la racine. Elles possèdent aussi d'autres propriétés découvertes plus récemment, comme par exemple le fait de pouvoir contrôler l'architecture de la plante.⁵⁷ Ce sont la 9^{ème} classe d'hormones végétales. Elles sont aussi utilisées par des mousses du genre *Physcomitrella patens* afin de réguler leur densité de population selon un phénomène de type « quorum-sensing ».⁵⁸ Pour mieux comprendre le mécanisme d'action biologique des strigolactones, de nombreux analogues ont été développés.⁵⁹ En effet, le manque de sélectivité observée au niveau de la rhizosphère ne permet pas d'envisager leur utilisation comme stimulant de l'endomycorhization. En plus de permettre la germination des graines de plantes parasites, ces molécules favorisent également la croissance de champignons pathogènes.⁶⁰

Les exsudats émis par les hyphes endomycorhiziens, appelés facteurs Myc, ont été très difficiles à identifier. En effet, la technique de surproduction de ces facteurs menée sur les cultures des souches sauvages de bactéries *Rhizobia* est inapplicable aux champignons. La génomique des champignons MA est beaucoup moins développée à cause d'un haut degré d'hétérozygotie. L'isolement des facteurs Myc est récent et a permis de prouver les

⁵⁶ Akiyama, K.; Matsuzaki, K.-i.; Hayashi, H. *Nature* **2005**, *435*, 824-827.

⁵⁷ Gomez-Roldan, V.; Fermas, S.; Brewer, P. B.; Puech-Pagès, V.; Dun, E. A.; Pillot, J. P.; Letisse, F.; Matusova, R.; Danoun, S.; Portais, J. C.; Bouwmeester, H.; Bécard, G.; Beveridge, C. A.; Rameau, C.; Rochange, S. F. *Nature* **2008**, *455*, 189-194.

⁵⁸ Proust, H.; Hoffmann, B.; Xie, X.; Yoneyama, K.; Schaefer, D. G.; Yoneyama, K.; Nogue, F.; Rameau, C. *Development* **2011**, *138*, 1531-1539.

⁵⁹ (a) Chen, V. X.; Boyer, F. D.; Rameau, C.; Retailleau, P.; Vors, J. P.; Beau, J. M. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 13941-13945. ; (b) Boyer, F. D.; de Saint Germain, A.; Pouvreau, J. B.; Clavé, G.; Pillot, J. P.; Roux, A.; Rasmussen, A.; Depuydt, S.; Laressergues, D.; Frei Dit Frey, N.; Heugebaert, T. S.; Stevens, C. V.; Geelen, D.; Goormachtig, S.; Rameau, C. *Mol. Plant* **2014**, *7*, 675-690.

⁶⁰ Dor, E.; Joel, D. M.; Kapulnik, Y.; Koltai, H.; Hershenhorn, J. *Planta* **2011**, *234*, 419-427.

hypothèses génétiques et évolutives émises par les spécialistes du domaine.⁵ L'identification et la nature des différents signaux chimiques impliqués dans les phénomènes de nodulation et mycorhization est décrite par la suite.

I.C. Les différents lipo-chitooligosaccharides - signaux chimiques pour la nodulation et la mycorhization

I.C.1. Structure des facteurs de nodulation

Les facteurs Nod ont été identifiés au début des années 1990 par le groupe de Dénarié en utilisant une technologie de surproduction des signaux chimiques sécrétés par des *Rhizobia*.^{12,61} Ces molécules appartiennent à la classe des lipo-chitooligosaccharides (LCOs). Ils sont constitués d'un squelette, de même nature que la chitine, composé d'unités de *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β -1,4. L'unité non-réductrice de l'oligomère possède un groupement acylé lipidique sur l'atome d'azote.¹³ La présence simultanée d'une chaîne hydrophobe et d'un chitooligosaccharide confère à ces substances des propriétés amphiphiles (Figure 6).

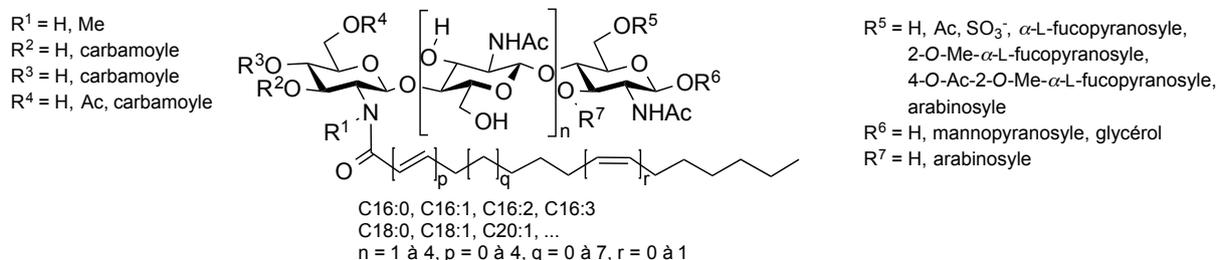


Figure 6 : exemples de facteurs de nodulation

Il est important de noter que les groupements présents sur le squelette chitinique ainsi que la longueur de la chaîne acyle et son degré d'insaturation ont une influence notable sur la spécificité du couple bactérie-végétal. Il a été montré que la présence du groupement sulfate sur l'unité réductrice ainsi que la chaîne lipidique sur l'unité non réductrice, augmente l'activité de la molécule et permet la formation de nodosités. Dans le cas des chitooligosaccharides, aucune nodosité n'est formée. Le nombre d'insaturation améliore aussi

⁶¹ Truchet, G.; Roche, P.; Lerouge, P.; Vasse, J.; Camut, S.; de Billy, F.; Promé, J. C.; Dénarié, J. *Nature* **1991**, *351*, 670-673.

l'activité.⁶² De plus, seule une certaine variété de bactéries va pouvoir infecter une plante-hôte particulière. C'est en s'intéressant à l'analyse génétique que l'on peut comprendre cette spécificité d'hôte, l'infection et la formation des nodosités.⁶³ Effectivement, un premier contrôle de la spécificité d'hôte est dû aux gènes régulateurs *nodD*. Après une stimulation par les flavonoïdes, ces gènes régulateurs *nodD*, codant pour des protéines, activent l'expression des autres gènes *nod* de la bactérie : les gènes structuraux. Ces gènes structuraux ont été divisés en deux grandes catégories : les gènes communs et les gènes spécifiques de chaque espèce de *Rhizobia*. La structure de base commune à tous les facteurs Nod est issue de l'expression des gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* codant pour des protéines respectives NodA, NodB et NodC.⁶⁴ Ces gènes *nodABC* jouent un rôle primordial dans la formation des nodosités. S'il y a mutation d'un de ces gènes, la relation symbiotique entre la bactérie et le végétal ne pourra avoir lieu. Les protéines NodC sont des enzymes *N*-acétylglucosamine β -1,4-transférase (chitine synthase) impliquées dans l'assemblage du motif chitooligosaccharide. Le groupement acétamido de l'unité non réductrice est désacétylé par l'action de l'enzyme NodB. L'amine libre est ensuite couplée avec un des acides gras, biocatalysée par NodA pour fournir un intermédiaire commun de plusieurs facteurs Nod. La spécificité d'hôte résulte de diverses fonctionnalisations chimiques des hétéroatomes présents sur la molécule grâce à la modification enzymatique des gènes structuraux sous l'influence des différents gènes *nod* spécifiques de l'hôte (*hsn*).⁶⁵ Ainsi, les facteurs Nod émis par *Sinorhizobium* de la luzerne sont sulfatés et acylés par un acide gras spécifique (C16:2 Δ 2E, 9Z) tandis que ceux d'*Azorhizobium caulinodans* de *Sesbania* (arbrisseaux et herbes des régions tropicales) sont substitués par deux sucres en position 3 ou 6 de l'unité réductrice, l'arabinose et le fucose.⁶⁶

⁶² Demont-Caulet, N.; Maillet, F.; Tailler, D.; Jacquinet, J. C.; Promé, J. C.; Nicolaou, K. C.; Truchet, G.; Beau, J. M.; Dénarié, J. *Plant Physiol.* **1999**, *120*, 83-92.

⁶³ Tian, C. F.; Zhou, Y. J.; Zhang, Y. M.; Li, Q. Q.; Zhang, Y. Z.; Li, D. F.; Wang, S.; Wang, J.; Gilbert, L. B.; Li, Y. R.; Chen, W. X. *PNAS* **2012**, 1-6.

⁶⁴ Spaink, N. P. J. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1996**, *15*, 559-582.

⁶⁵ Price, N. P. J. *Carbohyd. Res.* **1999**, *317*, 1-9.

⁶⁶ Dénarié, J. Texte de la 8^{ème} conférence de l'Université de tous les savoirs, **2000**.

I.C.2. Isolement guidé et structure des facteurs Myc - voie de signalisation nodulation / endomycorhization

Les deux symbioses connues, la symbiose à *Rhizobia* et l'endomycorhize à arbuscules, ont souvent été comparées.¹⁴ La principale similitude est l'observation d'une dépolarisation de la membrane et des oscillations calciques à l'intérieur des cellules racinaires au cours du développement des mycorhizes et de nodosités.⁶⁷ De plus, elles ont toutes les deux une action bénéfique sur le végétal et ont lieu dans le cortex. Lors des études de structure-activité des facteurs Nod sur *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* capables de rentrer en association avec les deux symbiotes, il a été observé que certains de ces LCOs étaient très actifs dans le phénomène de mycorhization sans que la formation de nodosités soit particulièrement prononcée.⁶⁸ L'étude approfondie de plantes mutantes, dépourvues de toutes associations symbiotiques, a permis d'identifier des gènes communs aux deux voies de signalisation.^{69,70} Ces gènes *DMI1*, *DMI2*, *DMI3* (« Does not Make Infections ») ainsi que ceux spécifiques de la nodulation (*NSP1* et *NSP2*) ont été ordonnés par rapport à l'observation des réponses morphologiques et cellulaires induites par la perception des facteurs Nod et Myc afin de proposer un modèle de voie de signalisation. Cette étude a aussi permis de montrer que le gène *NSP2* est un gène commun aux deux voies de signalisation (Schéma 5).^{63,5}

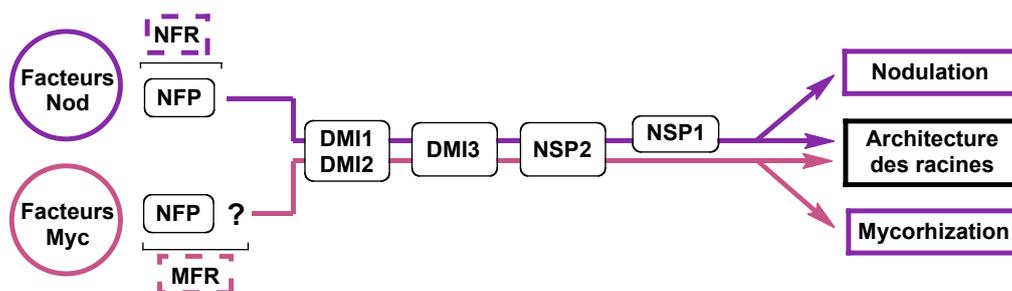


Schéma 5 :⁵ voies de signalisation nodulation / mycorhization

⁶⁷ Navazio, L.; Moscatiello, R.; Genre, A.; Novero, M.; Baldan, B.; Bonfante, P.; Mariani, P. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 673-681.

⁶⁸ Beau, J.-M.; Dénarié, J.; Greiner, A.; Grenouillat, N.; Maillet, F.; Vauzeilles, B. PCT/EP Patent Appl. No. PCT/EP2004/014909, **2004**; WO Patent Appl. No. WO2005/063784, **2005**.

⁶⁹ Catoira, R.; Galera, C.; de Billy, F.; Penmetsa, R. V.; Journet, E.-P.; Maillet, F.; Rosenberg, C.; Cook, D.; Gough, C.; Dénarié, J. *Plant Cell* **2000**, *12*, 1647-1665.

⁷⁰ (a) Gianinazzi-Pearson, V.; Dénarié, J. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 371-372. (b) Ana, J. M.; Kiss, G. B.; Riely, B. K.; Penmetsa, R. V.; Oldroyd, G. E. D.; Ajax, C.; Levy, J.; Debellé, F.; Baek, J. M.; Kalo, P.; Rosenberg, C.; Roe, B. A.; Long, S. R.; Dénarié, J.; Cook, D. R. *Science* **2004**, *303*, 1364-1367. (c) Levy, J.; Bres, C.; Geurts, R.; Chalhoub, B.; Kulikova, O.; Duc, G.; Journet, E.-P.; Ané, J.-M.; Lauber, E.; Bisseling, T.; Dénarié, J.; Rosenberg, C.; Debelle, F. *Science* **2004**, *303*, 1361-1364. (d) Parniske, M. *Curr Opin Plant Biol* **2004**, *7*, 414-421.

La nature exacte des récepteurs des facteurs Nod et Myc n'est pas exactement connue. Il a été montré que le gène NFP (« Nod Factor Perception ») sur *Medicago truncatula* appartenait à la famille des gènes codant pour des protéines kinases de la lysine (LYR3) et que LYR3 présente une haute affinité de liaison avec les LCOs et non les COs, d'où l'importance de la chaîne lipidique.^{71,72} Des études comparatives génétiques et génomiques de 26 génomes de *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium* du soja ont montré que le noyau du génome de *Bradyrhizobium* est enrichi en lipide et métabolisme secondaire contrairement au génome de *Sinorhizobium* qui est spécifique. Aucun gène présent dans le génome du soja n'est partagé entre ces deux microorganismes contrairement aux autres légumineuses. Cette analyse explique que pour obtenir une grande variété dans la symbiose *Rhizobia*-légumineuses et une adaptation environnementale, le recrutement de gènes spécifiques est nécessaire.⁶³ Plusieurs équipes ont montré qu'il existe des mécanismes communs dans la signalisation induisant les deux types de symbioses et le groupe de Dénarié a fait l'hypothèse que les bactéries avaient « copié » le système de signalisation plus ancien des champignons. En effet, les facteurs Nod contiennent de la chitine qui est un composé caractéristique des champignons et non des bactéries. Afin d'identifier ces facteurs Myc, la théorie d'un lien évolutif entre la nodulation et la mycorhization a permis aux chercheurs d'utiliser les mêmes techniques de purification que pour les facteurs Nod. Effectivement, ceux-ci supposaient que les deux signaux chimiques appartenaient à la même famille de glycoconjugués et ils ont montré que ce sont des lipo-chitooligosaccharides qui sont produits en infimes quantités et sous forme de mélange de molécules sulfatées ou non (Figure 7).^{73,5} Leur structure a été confirmée par synthèse en utilisant le processus biotechnologique développé par l'équipe de Driguez⁷⁴ (cf. partie II.B.8. Synthèse de facteurs Nod par génie biotechnologique).

⁷¹ Arrighi, J. F.; Barre, A.; Ben Amor, B.; Bersoult, A.; Soriano, L. C.; Mirabella, R.; de Carvalho-Niebel, F.; Journet, E. P.; Gherardi, M.; Huguet, T.; Geurts, R.; Denarie, J.; Rouge, P.; Gough, C. *Plant Physiol* **2006**, *142*, 265-279.

⁷² Fliegmann, J.; Canova, S.; Lachaud, C.; Uhlenbroich, S.; Gascioli, V.; Pichereaux, C.; Rossignol, M.; Rosenberg, C.; Cumener, M.; Pitorre, D.; Lefebvre, B.; Gough, C.; Samain, E.; Fort, S.; Driguez, H.; Vauzeilles, B.; Beau, J.-M.; Nurisso, A.; Imberty, A.; Cullimore, J.; Bono, J.-J. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 130628123739006.

⁷³ Dénarié, J. *Inra Magazine* **2011**, N°16, 6-7.

⁷⁴ Samain, E.; Drouillard, S.; Heyraud, A.; Driguez, H.; Geremia, R. A. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302*, 35-42.

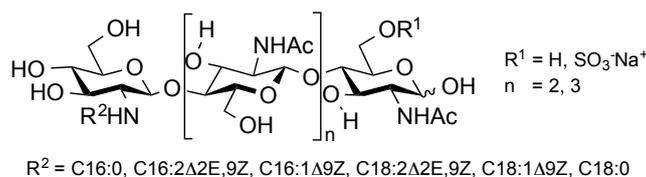


Figure 7 : facteurs de mycorhization identifiés

Notre équipe, intéressée depuis longtemps à la synthèse de LCOs, a reconsidéré un nouvel accès à ces composés dont la biodisponibilité est très faible et dont les mécanismes d'action sont encore inconnus. Un des objectifs de cette thèse a été d'effectuer la synthèse totale du lipo-chitooligosaccharide [Myc-IV (C16:0, S)], qui a été isolé comme un composé majoritaire dans les exsudats des champignons endomycorhiziens à arbuscules *Glomus intraradices*.⁵ Nous allons d'abord détailler les méthodes de synthèses utilisées pour la synthèse des facteurs de nodulation, avant d'aborder la partie sur les résultats que nous avons obtenus.

II. Stratégies de synthèse

Le rôle des facteurs Nod étant crucial, d'un point de vue agronomique et économique, de nombreuses synthèses ont donc été effectuées depuis leur découverte en 1990.¹² Les différentes stratégies de glycosylation choisies pour la synthèse des facteurs Nod décrivent l'état de l'art dans la formation de liaisons glycosidiques et la construction d'oligosaccharides. Nous présenterons dans la suite de cette thèse, les généralités concernant la glycosylation puis les différentes méthodes de synthèses utilisées pour former les facteurs Nod les plus répandus. Nous démontrerons que de nombreux critères sont importants à prendre en compte comme le choix des groupements protecteurs, leur ordre d'introduction et de déprotection, les méthodes de glycosylations et le moment d'introduction de la chaîne lipidique.

II.A. La glycosylation : généralités

La réaction de *O*-glycosylation est formellement une substitution nucléophile d'une fonction alcool sur un donneur de glycosyle possédant un groupe partant sur l'atome de

carbone de la position anomérique. On appelle « donneur de glycosyle » cet électrophile car il transfère un motif « glycosyle » à l'espèce nucléophile. Le nucléophile est appelé « accepteur de glycosyle ». La fonction alcool peut provenir de tout type de molécules et être le précurseur de la partie aglycone d'un glycoconjugué ou d'un autre sucre (Schéma 6).

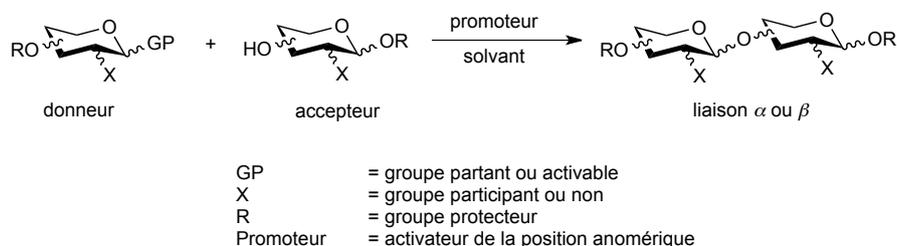


Schéma 6 : principe de la glycosylation

La position anomérique des sucres est une position importante. C'est l'endroit où la réaction aura lieu et où un transfert d'atome d'oxygène sera effectué. Il est donc primordial de bien choisir la nature du groupe partant présent sur cette position, pour l'obtention des produits avec de bons rendements. Les protocoles classiques mettent souvent en jeu des donneurs totalement protégés avec des accepteurs possédant une seule fonction hydroxy libre, afin d'assurer la formation d'une seule liaison glycosidique. Ces liaisons peuvent exister sous deux formes : α ou β (respectivement appelées 1,2-*cis* et 1,2-*trans* en série *gluco*). Pour contrôler la stéréosélectivité, différents paramètres peuvent être modifiés, tels que la température, la nature du solvant, la pression, le promoteur ou la nature des groupements protecteurs. Le mécanisme de la glycosylation n'est, à ce jour, toujours pas connu. Cependant, grâce aux nombreuses études menées depuis sa découverte, il est admis que le mécanisme est de type S_N1 avec la formation d'un intermédiaire oxacarbénium.^{75,76} Le groupement introduit sur la position 2 du donneur a un effet sur la stéréosélectivité. Si celui-ci est non participant et peu encombrant, alors le produit formé sera un mélange des deux formes anomères α et β , avec la plupart du temps, en série *gluco*, une prédominance pour la forme α (1,2-*cis*) sous la dépendance de l'hyperconjugaison $n\sigma^*$ ou encore appelé effet anomère (Schéma 7).

⁷⁵ Mydock, L. K.; Demchenko, A. V. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 497-510.

⁷⁶ Huang, M.; Retailleau, P.; Bohé, L.; Crich, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14746-14749.

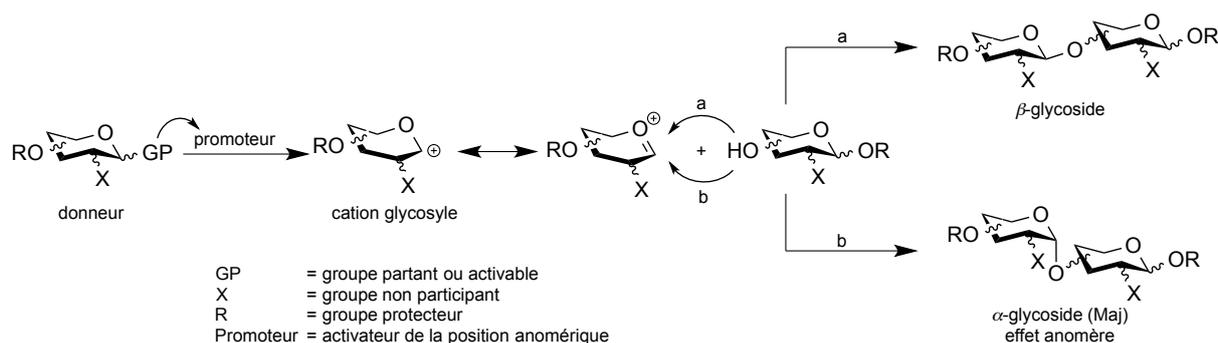


Schéma 7 : mécanisme de la glycosylation sans groupement participant

En série *gluco*, si le groupement présent en position 2 est participant, il sera impliqué dans la β -stéréosélectivité de la réaction. L'assistance anchimérique observée lors de la formation de l'espèce réactive provient de l'utilisation d'un groupement protecteur, sur cette position, possédant une fonction carbonyle. Les principaux exemples en série *gluco* sont les *O*-acétyles (OAc) et *O*-benzoyles (OBz). Comme dit précédemment, il y a la formation de l'intermédiaire oxacarbénium, puis cette espèce est piégée intramoléculairement par l'atome d'oxygène présent sur la fonction carbonyle. La stéréosélectivité serait ensuite contrôlée par l'intermédiaire acyloxonium activé, du fait de l'inaccessibilité de la face α . L'espèce majoritaire formée est donc le β -glycoside (Schéma 8).

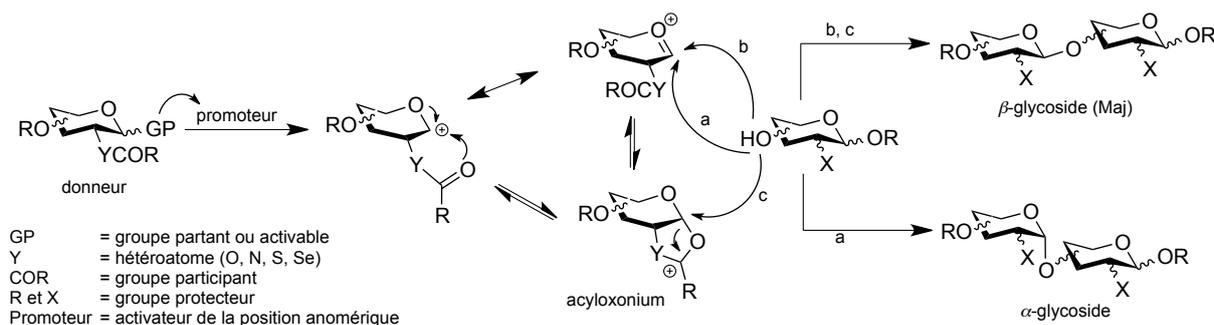


Schéma 8 : mécanisme de la glycosylation avec groupement participant

De nombreuses études ont été effectuées sur la nature des donneurs de glycosyle utilisés lors de la réaction.^{77,78} Les principaux employés actuellement sont les imidates de

⁷⁷ *Handbook of Chemical Glycosylation* Demchenko, A. V. Ed.; Wiley, **2008**.

⁷⁸ Banoub, J.; Boullanger, P.; Lafont, D. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1167-1195.

glycosyle, les thioglycosyles et les fluorures de glycosyle. A noter qu'en série glucosamine, composés auxquels nous nous intéressons ici, une protection temporaire de la fonction 2-amino⁷⁹ est souvent nécessaire. Les groupements protecteurs les plus employés sont le *N*-phtaloyle (NPhth),⁸⁰ le *N*-tétrachlorophtaloyle (NTCP),⁸¹ le *N*-trichloro et trifluoroacétyle (NHTCA et NHTFA)⁸² et le *N*-acétyl-2,3-oxazolidinone.⁸³ Les conditions de réactions sont elles aussi importantes (nature du solvant, température...). Commençons d'abord par l'étude des fluorures de glycosyle.

II.A.1. Les fluorures de glycosyle

Le premier fluorure de glycosyle acétylé fut synthétisé par Brauns en 1923.⁸⁴ Il a effectué une étude sur la stabilité des différents halogénures de glycosyle (chlorure et bromure) et leur capacité à être utilisé comme donneur de glycosyle dans la réaction de glycosylation. Il en est ressorti que les fluorures étaient les meilleurs candidats grâce à leur forte énergie de dissociation de liaison ($E_{\text{diss}} = 552 \text{ kJ.mol}^{-1}$) qui les rend plus stable. D'autres avantages ont été évoqués par la suite comme la facilité de les synthétiser, leur stabilité vis-à-vis des chromatographies sur gel de silice, la possibilité de les activer facilement par une large gamme de promoteurs, leur orthogonalité vis-à-vis d'autres donneurs comme les thioglycosides et la facilité de pouvoir contrôler la réaction par RMN ¹⁹F. C'est pour ces raisons que les fluorures de glycosyles ont été très utilisés dans les réactions de glycosylation en tant que donneurs.⁷⁷

Comme évoqué précédemment, la synthèse de ces composés peut se faire de différentes façons. Une première méthode consiste à utiliser un agent de fluoration comme le DAST (trifluorure de diéthylaminosulfure),⁸⁵ HF,⁸⁴ le tosylate de 2-fluoro-1-méthylpyridinium avec des hémiacétals...⁸⁶ De nombreux hémiacétals peuvent être transformés en fluorures de glycosyles grâce à l'emploi de ces agents de fluoration. Durant

⁷⁹ Bongat, A. F. G.; Demchenko, A. V. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 374-406.

⁸⁰ Lemieux, R. U.; Takeda, T.; Chung, B. *ACS Symp. Ser.* **1976**, 6-6.

⁸¹ Debenham, J. S.; Madsen, R.; Roberts, C.; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3302-3303.

⁸² Wolfrom, M. L.; Bhat, H. B. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 1821-1823.

⁸³ (a) Geng, Y.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *Chem. Comm.* **2008**, 597-599.; (b) Olsson, J. D. M.; Eriksson, L.; Lahmann, M.; Oscarson, S. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7181-7188.

⁸⁴ Brauns, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1923**, *45*, 833-835.

⁸⁵ a) Rosenbrook Jr, W.; Riley, D. A.; Lartey, P. A. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3-4.; b) Posner, G. H.; Haines, S. R. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5-8.

⁸⁶ Mukaiyama, T.; Hashimoto, Y.; Shoda, S.-I. *Chem. Lett.* **1983**, *12*, 935-938.

cette réaction, l'ion oxacarbénium est formé afin d'être converti en fluorure de glycosyle (Schéma 9).⁸⁵

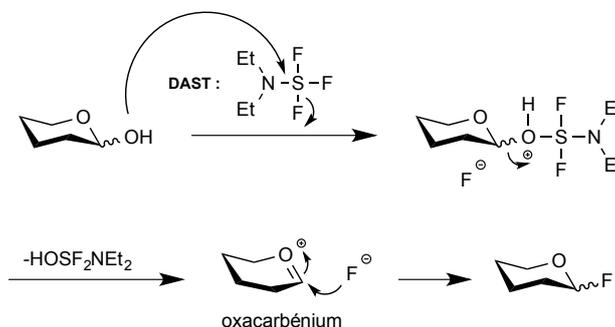


Schéma 9 : exemple de mécanisme avec le DAST

La synthèse peut aussi se faire à partir d'un halogénure de glycosyle (bromure ou chlorure), soit par une substitution nucléophile avec un sel d'argent ou par le bifluorure de potassium (Schéma 10).⁸⁷

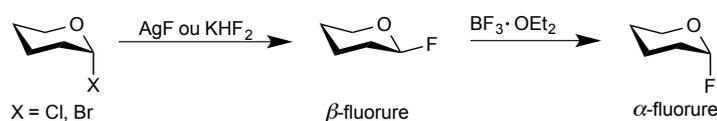


Schéma 10 : formation de fluorure de glycosyle à partir d'un chlorure de glycosyle

Ils peuvent aussi être obtenus à partir de thioglycosides réagissant avec un mélange DAST / NBS⁸⁸ ou le sélectfluor (Figure 8).⁸⁹ D'autres groupements présents en position anomériques (tétrazoles, acétates) peuvent être transformés en fluorure grâce à HF•pyridine.⁹⁰

⁸⁷ Thiem, J.; Kreuzer, M.; Fritsche-Lang, W.; Deger, H. M. Ger. Pat 3626028A1 *Chemical Abstract* **1987**, *107*, 176407e.

⁸⁸ a) Nicolaou, K. C.; Dolle, R. E.; Papahatjis, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4189-4192.; b) Horne, G.; Mackie, W. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8697-8700.

⁸⁹ Burkart, M. D.; Zhang, Z.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11743-11746.

⁹⁰ Buchanan, J. G.; Hill, D. G.; Wightman, R. H.; Boddy, I. K.; Hewitt, B. D. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6033-6050.

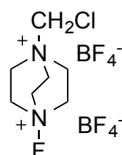


Figure 8 : selectfluor

La première utilisation des fluorures de glycosyle, en tant que donneurs dans les réactions de glycosylation, a été effectuée en 1981 par le groupe de Mukaiyama⁹¹ sur des sucres appartenant à la série *gluco*. Ils ont mis au point des conditions de réaction permettant d'obtenir, avec de bons rendements (88% à 96%), différents monosaccharides ou disaccharides. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le couple de promoteurs SnCl₂/AgClO₄ (Schéma 11).

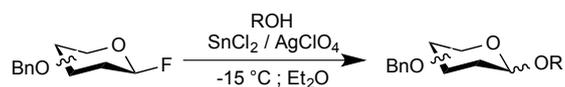


Schéma 11 : glycosylation avec SnCl₂/AgClO₄

L'activation par le couple SnCl₂/AgClO₄ se fait grâce à l'espèce divalente SnCl₂. Celui-ci réagit en tant qu'acide de Lewis où ses orbitales vacantes acceptent une des trois paires d'électrons libres de l'atome de fluor du donneur de glycosyle. La liaison C-F est alors clivée afin de donner l'intermédiaire **3** oxcarbénium qui est ensuite attaqué par l'alcool nucléophile (Schéma 12).⁷⁷

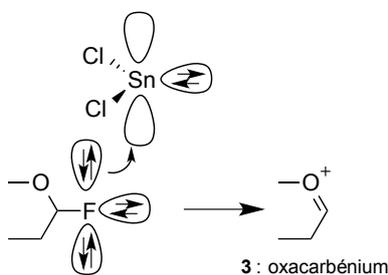


Schéma 12 : activation par SnCl₂

⁹¹ Mukaiyama, T.; Murai, Y.; Shoda, S.-i. *Chem. Lett.* **1981**, *10*, 431-432.

D'autres promoteurs sont utilisés afin d'activer la liaison C-F, par exemple le couple dichlorure (cyclopentadiényl)métal et le perchlorate d'argent ($\text{Cp}_2\text{MCl}_2\text{-AgClO}_4$ avec $\text{M} = \text{Zr}$ ou Hf) qui va favoriser la formation de l'anomère β .⁹² L'utilisation d'acide de Lewis ou de Brønsted, comme $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ ⁹³ ou TfOH ,⁹⁴ peut aussi être envisagée.

Après cette introduction sur les fluorures de glycosyle, nous pouvons aborder l'étude d'une autre classe de donneurs, les imidates de glycosyle.

II.A.2. Les imidates de glycosyle

Les trichloroacétimidates de glycosyle ont été découverts par les groupes de Sinaÿ⁹⁵ et Schmidt.⁹⁶ Ils sont maintenant utilisés comme groupe activable de la position anomérique du sucre.⁷⁷ Afin d'introduire le groupe trichloroacétimide sur le sucre, une réaction entre la fonction hydroxy de l'hémiacétal et le trichloroacétonitrile (Cl_3CCN) a lieu en milieu basique.⁹⁷ La stéréosélectivité est contrôlée par la réversibilité de la réaction ; en effet, le produit thermodynamique, c'est-à-dire l'anomère α , étant le plus stable, il est formé majoritairement lors de la réaction (Schéma 13).

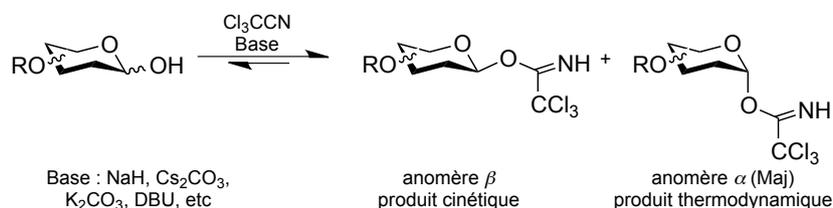


Schéma 13 : formation des trichloroacétimidates de glycosyle

L'activation de ce groupe, se fait par l'emploi d'un acide de Lewis, généralement TMSOTf ou $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ de façon catalytique. Afin d'accéder à des liaisons glycosidiques β -

⁹² Suzuki, K.; Maeta, H.; Matsumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4853-4856.

⁹³ Kunz, H.; Waldmann, H. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1985**, 638-640.

⁹⁴ Mukaiyama, T.; Jona, H.; Takeuchi, K. *Chem. Lett.* **2000**, 29, 696-697.

⁹⁵ Pougny, J.-R.; Sinaÿ, P. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 4073-4076.

⁹⁶ Schmidt, R. R.; Michel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, 19, 731-732.

⁹⁷ Schmidt, R. R.; Kinzy, W. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 21-123.

1,4, un groupement participant est utilisé sur la position 2. La formation de l'intermédiaire acyloxonium **4**, dirige l'attaque sur la face β (Schéma 14).

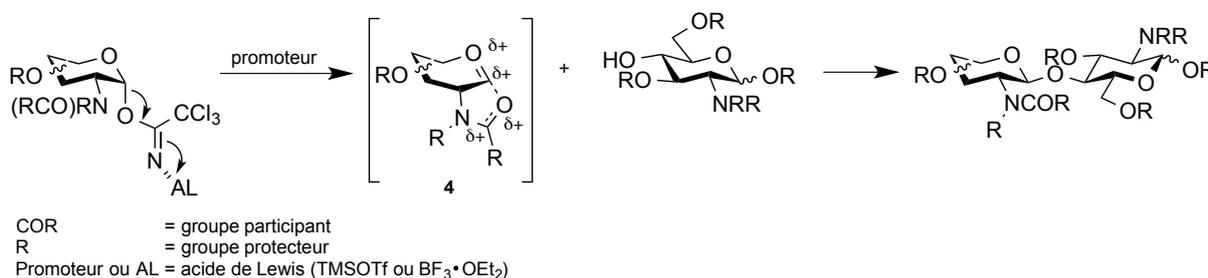


Schéma 14 : mécanisme de glycosylation avec un trichloroacétimide de glycosyle

Même si les rendements de réaction sont bons, l'utilisation des trichloroacétimides possède un désavantage. Ce sont des espèces très labiles, en milieu acide, qui ne peuvent être formées qu'avant l'étape de glycosylation. Pour éviter ce problème, une autre classe de donneur a été développée : les thioglycosides, qui sont des espèces beaucoup plus stables, faciles à synthétiser et facilement activables.

II.A.3. Les thioglycosides

Comme évoqué précédemment, ces groupes sont des groupes assez stables et peuvent donc être introduits tôt dans la synthèse des précurseurs pour les réactions de glycosylation. Leur synthèse se fait à partir de sucre per-*O*-acétylé et d'un thiol, en présence d'un excès d'acide de Lewis (Schéma 15).



Schéma 15 : formation des thioglycosides

L'inconvénient de cette méthode reste le fait de manipuler des thiols légers, très odorants et toxiques tels que le thioéthanol et le thiophénol et de récupérer des déchets tout aussi toxiques et odorants après la formation du thioglycoside. C'est un réel problème pour

l'environnement et la santé humaine, étant donné que ces composés sont utilisés en quantité stœchiométrique.⁹⁸ Afin de s'affranchir de ce problème, certains groupes ont décidé de synthétiser des thiols plus lourds en substituant le noyau aromatique, permettant de les rendre moins volatils et moins odorants. Pour éviter des étapes supplémentaires de synthèse pour ces composés, un bon compromis est l'emploi du 5-(*tert*-butyl)-2-méthylthiophénol (MbpSH) **5** qui est commercial, peu coûteux et peu odorant (Figure 9).^{99,100}

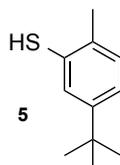


Figure 9 : 5-(*tert*-butyl)-2-méthylthiophénol (MbpSH)

L'activation de ces composés peut se faire grâce à un nombre varié de promoteurs, souvent des agents électrophiles doux qui vont générer dans le milieu des espèces de type sulfonium, plus réactives. Les premiers promoteurs utilisés étaient des composés comportant du mercure car comme l'indique l'ancien nom des thiols, *mercaptans* du latin *mercurius captans*, ce sont des espèces ayant une forte affinité avec le mercure. Ce fut l'équipe de Ferrier,¹⁰¹ qui en 1973, employa l'acétate de mercure (II), comme promoteur dans la réaction de glycosylation, pour la première fois. Etant donné la forte toxicité de ces composés, d'autres agents activateurs ont été découverts.⁹⁸ On peut diviser en deux catégories ceux qui sont régulièrement utilisés de nos jours. La première catégorie comprends les réactifs utilisant l'acide triflique ou des triflates comme les couples NIS/TfOH¹⁰² ou NIS/TMSOTf,¹⁰³ le triflate de phénylsulfényle (PhSOTf),¹⁰⁴ le triflate de diméthyl(méthylthio)sulfonium (DMTST),¹⁰⁵ le perchlorate de dicollidine et d'iodonium (IDCP)¹⁰⁶ ou le triflate de phénylsélényle (PhSeOTf).¹⁰⁷ La seconde catégorie comprend des couples mettant en jeu

⁹⁸ Lian, G.; Zhang, X.; Yu, B. *Carbohydr. Res.* **2014**; DOI: 10.1016/j.carres.2014.06.009.

⁹⁹ Weiss, H.; Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4261-4263.

¹⁰⁰ Collot, M.; Savreux, J.; Mallet, J. M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1523-1535.

¹⁰¹ Ferrier, R. J.; Hay, R. W.; Vethaviasar, N. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 55-61.

¹⁰² Veeneman, G. H.; van Leeuwen, S. H.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.

¹⁰³ Konradsson, P.; Udodong, U. E.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.

¹⁰⁴ Dasgupta, F.; Garegg, P. J. *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17.

¹⁰⁵ Fügedi, P.; Garegg, P. J. *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.

¹⁰⁶ (a) Lemieux, R. U.; Morgan, A. R. *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2214-2221.; (b) Veeneman, G. H.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 275-278.

¹⁰⁷ (a) Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1061-1064.; (b) Ito, Y.; Ogawa, T.; Numata, M.; Sugimoto, M. *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 165-175.

l'anhydride triflique et un dérivé soufré souvent oxydé. Nous pouvons citer le *N*-(phénylthio)caprolactame,¹⁰⁸ le diphenylsulfoxyde (Ph₂SO),¹⁰⁹ le *S*-(4-méthoxyphényl)benzèthiosulfinate (MPBT),¹¹⁰ la 1-benzènesulfinylpipéridine (BSP)¹¹¹ et la 1-benzènesulfinylmorpholine (BSM).¹¹²

Pour l'activation des thioglycosides par le couple NIS/TfOH, le mécanisme proposé passe par la formation du triflate d'iodonium très électrophile, dans le milieu réactionnel. L'atome de soufre réagit alors avec cet iodonium et forme le triflate de iodosulfonium activé **6**, espèce très instable. Il y a ensuite attaque de l'atome d'oxygène de l'accepteur sur la position anomérique du donneur. Cette attaque peut être contrôlée par le groupement présent en position 2 du donneur, par exemple par le groupement encombrant *N*-phtaloyle ou par des groupements participants, afin d'accéder à une β -stéréosélectivité. Lors de cette réaction, l'acide triflique est régénéré, d'où son utilisation en quantité catalytique. Pour que la réaction puisse avoir lieu, il faut que le donneur et l'accepteur soient tous les deux présents dans le milieu réactionnel avant l'ajout du couple de promoteurs. Enfin, la position anomérique de l'accepteur doit être différenciée de celle du donneur et ne devra pas être protégée par un thio afin d'éviter la formation d'un mélange complexe (Schéma 16).

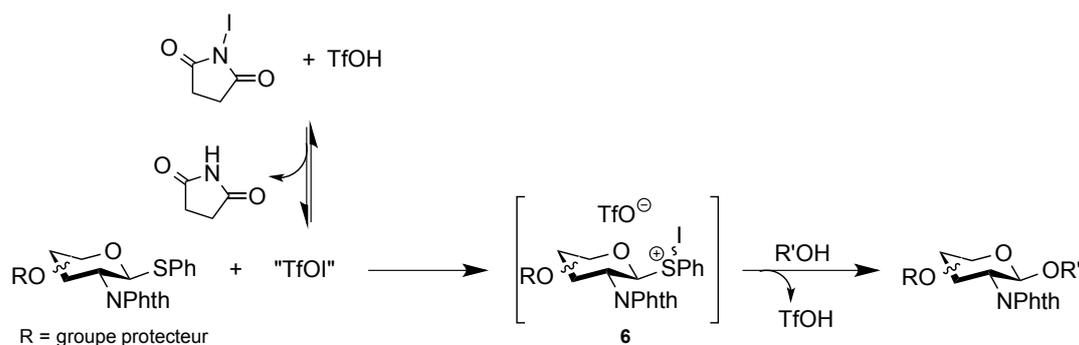


Schéma 16 : activation des thioglycosides par NIS/TfOH

¹⁰⁸ Durón, S. G.; Polat, T.; Wong, C.-H. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 839-841.

¹⁰⁹ (a) Codée, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; den Heeten, R.; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1519-1522.; (b) Codée, J. D. C.; van den Bos, L. J.; Litjens, R. E. J. N.; Overkleeft, H. S.; van Boeckel, C. A. A.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1057-1064.

¹¹⁰ Crich, D.; Smith, M. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4067-4069.

¹¹¹ Crich, D.; Smith, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9015-9020.

¹¹² Wang, C.; Wang, H.; Huang, X.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *Synlett* **2006**, *2006*, 2846-2850.

L'activation des thioglycosides par le couple BSP/Tf₂O présente un avantage par rapport à celle effectuée par NIS/TfOH. En effet, l'utilisation de ce couple de promoteurs permet la préactivation du donneur à basse température avant l'addition de l'accepteur. Cette stratégie permet de réduire le nombre d'étapes de protection, déprotection et de pouvoir utiliser un accepteur protégé par un thio en position anomérique. L'inconvénient est l'utilisation des promoteurs en quantité stœchiométrique. L'équipe de Crich a développé cette méthodologie en 2001, la 2,4,6-tri-*tert*-butylpyrimidine (TTBP), base non nucléophile, est utilisée afin de tamponner le milieu.¹¹¹ La première étape est l'activation de la BSP par l'anhydride triflique et la formation de l'intermédiaire activé triflate de sulfonium **7**. Le donneur de glycoside peut réagir avec cet intermédiaire selon deux voies (a et b) pour donner le triflate d'oxcarbénium **9** (Schéma 17).

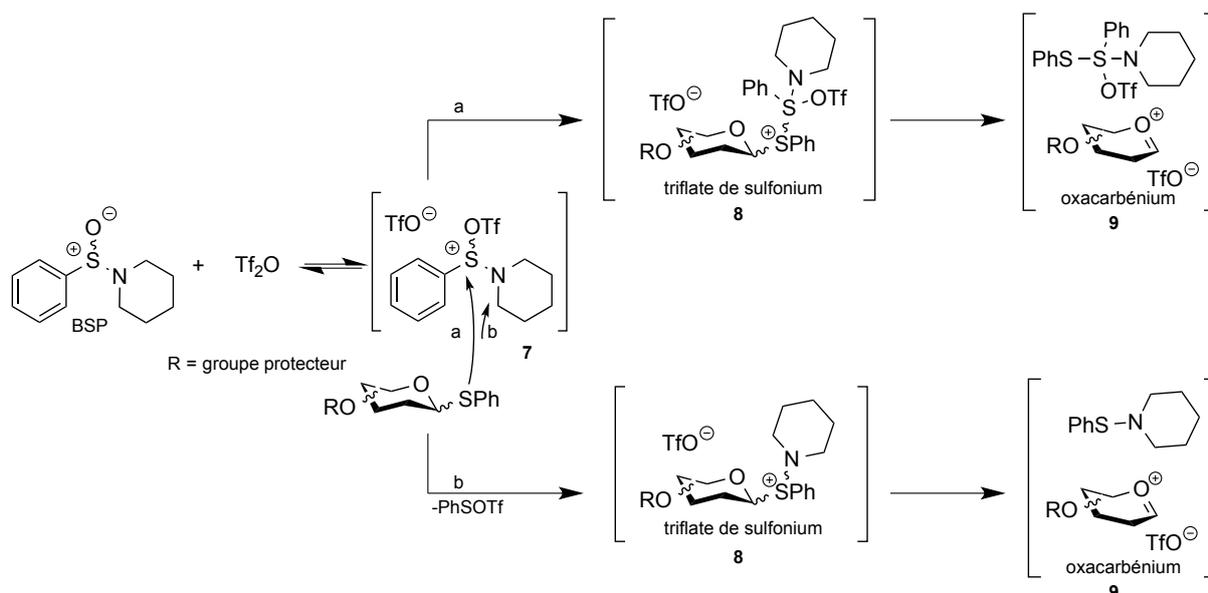


Schéma 17 : activation de la BSP par action de Tf₂O

L'intermédiaire oxcarbénium **9** peut subir l'attaque de plusieurs nucléophiles présents dans le milieu et être en équilibre avec différentes espèces activées de type triflate **11**¹¹³ ou sulfénate **13**¹¹⁴ de glycosyle. La formation de l'anion triflate a été mise en évidence par l'équipe de Crich par l'étude de l'effet isotopique du ¹³C par RMN à basse

¹¹³ Crich, D.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11217-11223.

¹¹⁴ Gildersleeve, J.; Pascal, R. A.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5961-5969.

température.^{113,115,116} En revanche, le groupe de Kahne a montré que la formation de sulfénates proviendrait de l'attaque nucléophile du donneur sulfoxyde **10** sur l'intermédiaire oxcarbénium **9**. Il a été admis que les intermédiaires formés pendant la réaction de glycosylation sont des triflates anomériques **12**¹¹⁷ en équilibre avec des espèces paires ioniques (Schéma 18).

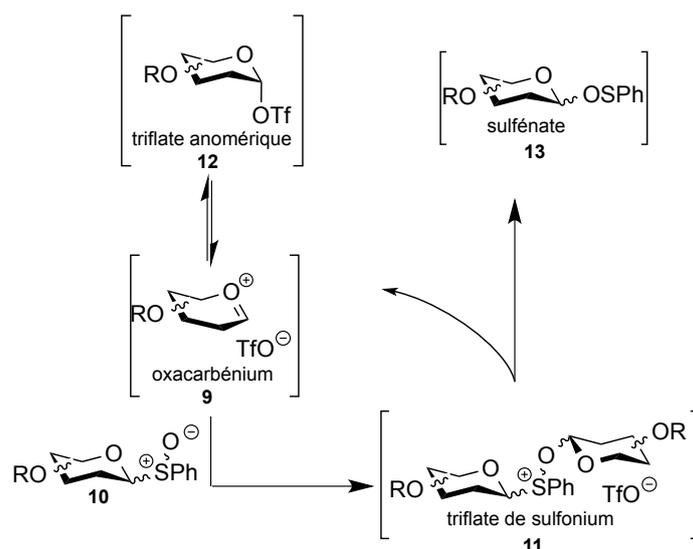


Schéma 18

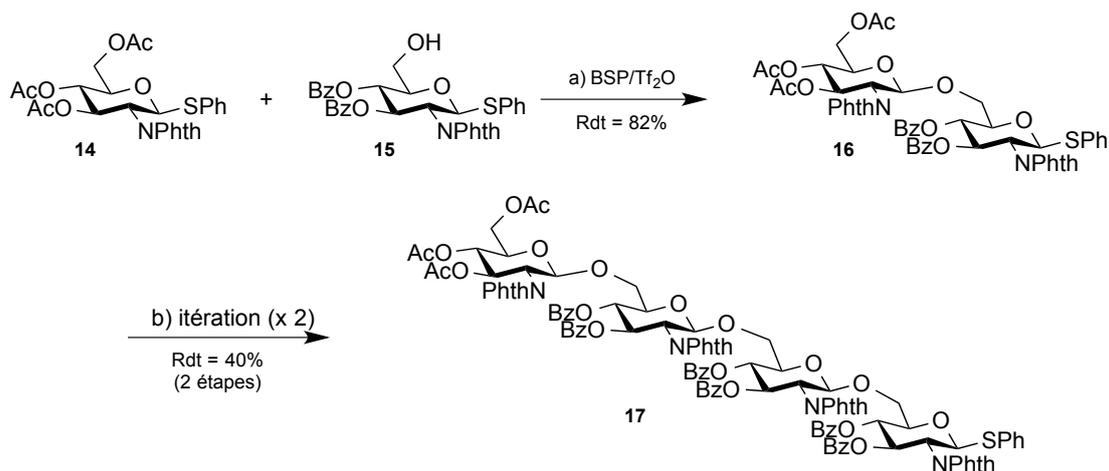
En 2004, l'équipe de Yamago a utilisé cette méthode pour synthétiser des oligomères de *N*-acétyl-D-glucosamine. La glycosylation entre le donneur **14** et l'accepteur **15** a permis d'accéder au disaccharide **16** avec un rendement de 82%. Ils ont ensuite effectué à nouveau des réactions de glycosylation avec l'accepteur **15**, dans les mêmes conditions que précédemment, afin d'accéder au tétrasaccharide **16** avec un rendement de 40% sur deux étapes de glycosylation (Schéma 19).¹¹⁸

¹¹⁵ Crich, D.; Sun, S. X. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8321-8348.

¹¹⁶ Huang, M.; Garrett, G. E.; Birlirakis, N.; Bohé, L.; Pratt, D. A.; Crich, D. *Nat Chem* **2012**, *4*, 663-667.

¹¹⁷ Crich, D. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1144-1153.

¹¹⁸ Yamago, S.; Yamada, T.; Maruyama, T.; Yoshida, J.-i. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2145-2148.



Conditions réactionnelles : a) **14** (1 éq.), **15** (1,4 éq.), BSP (1,1 éq.), Tf₂O (1,4 éq.), 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylpyridine (2 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -60 °C, 45 min, 82% ; b) itération (mêmes conditions), 1^{ère} itération : 78% et 2^{ème} : 51%.

Schéma 19

II.A.4. Conclusion sur la glycosylation

Différentes méthodes de synthèses de β-glycosides de la *N*-acétyl-D-glucosamine sont possibles et nécessitent la synthèse de précurseurs bien spécifiques. Comme nous avons pu le voir, la protection de la fonction azotée en position 2 est importante afin de former une liaison β entre les deux partenaires. Le groupe partant de la position anomérique joue lui aussi un rôle primordial ainsi que la nature du promoteur utilisé pour avoir de bons rendements lors de la réaction. Nous avons pu noter l'utilisation de trois principaux groupes, les fluorures de glycosyle, les imidates de glycosyle et les thioglycosides. L'inconvénient principal des deux premiers est la plus faible stabilité par rapport aux thioglycosides. Les imidates ainsi que les fluorures doivent être introduits juste avant l'étape de glycosylation. Les thioglycosides sont stables mais les promoteurs utilisés pour leur activation sont des réactifs plus élaborés et souvent utilisés en quantité stœchiométrique. Afin de choisir la méthode de glycosylation adéquate lors de notre synthèse totale, nous nous sommes inspirés des travaux ultérieurement effectués au sein de notre équipe et dans les autres groupes, pour la synthèse de facteurs de modulation qui sont décrits ci-dessous.

II.B. Les différentes synthèses de LCOs : facteurs Nod

De nombreuses voies de synthèse ont alors été envisagées pour l'accès à ces molécules produites dans la nature en très faible quantité (de l'ordre du picogramme par plante).¹² Il faut noter que les facteurs Nod les plus synthétisés sont les signaux symbiotiques **18** et **19**, impliqués dans la symbiose de *Sinorhizobium meliloti* avec la luzerne (l'analogue non sulfaté **20** n'étant pas actif sur la luzerne mais sur la vesce), ainsi que les hexasaccharides **21**, **22** et **23** produits par *Bradyrhizobium japonicum*, bactérie à l'origine de la formation de nodosités chez le soja (Figure 10).¹¹⁹

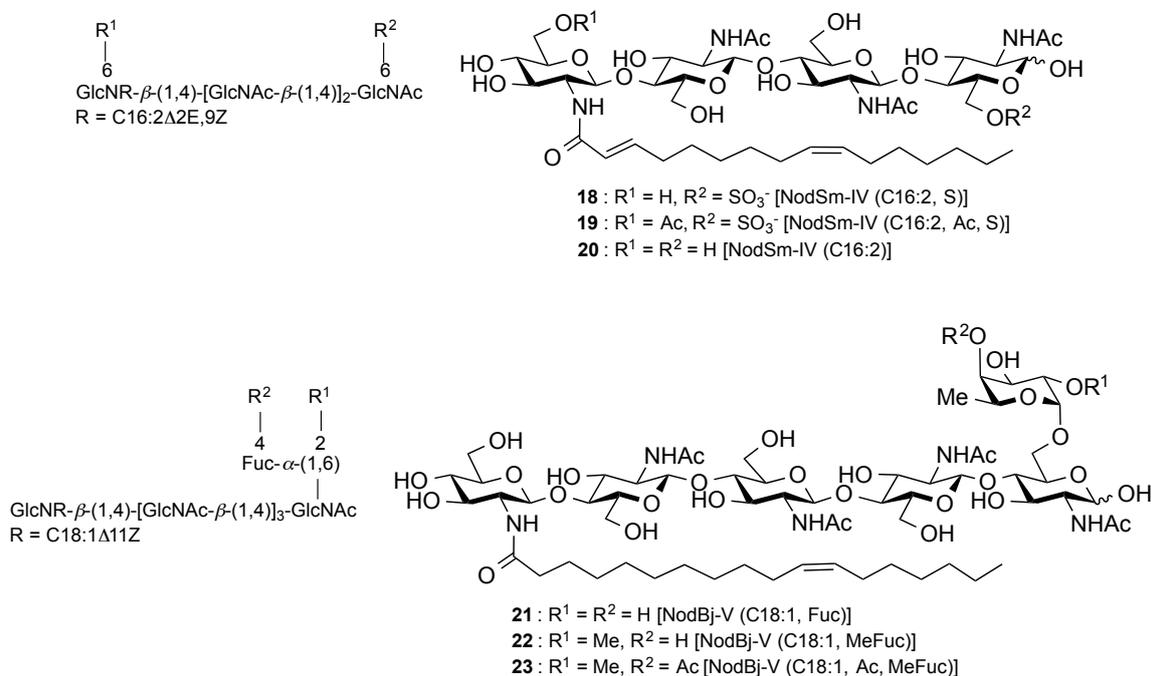


Figure 10

Il est très important de bien choisir les groupements protecteurs présents sur les monomères de la D-glucosamine ainsi que leur ordre d'introduction et de déprotection afin d'anticiper les différentes fonctionnalisations à installer sur la cible finale. En effet, il faut distinguer les différentes fonctions alcools et amines du squelette chitinique. Notamment la fonction amine de l'unité non réductrice sur laquelle une acylation devra être effectuée afin de greffer la chaîne grasse. La protection des fonctions alcools primaires doit être sélective afin

¹¹⁹ Carlson, R. W.; Sanjuan, J.; Bhat, U. R.; Glushkat, J.; Spaink, H. P.; Wijffes, A. H. M.; van Brussel, A. A. N.; Stokkermans, T. J. W.; Peters, N. K.; Stacey, G. J. *Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18372-18381.

d'introduire certains groupements tels que des sulfates, acétyles ou bien même d'autres sucres comme le L-fucose après réaction de glycosylation. La déprotection des groupements benzyles de la molécule par hydrogénolyse devra être effectuée avant l'introduction de la chaîne grasse qui pourra contenir une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone. C'est en faisant attention à tous ces facteurs et en utilisant des méthodes classiques de formation d'oligosaccharides que les premières synthèses de facteurs Nod ont pu être effectuées comme nous allons le voir dans l'étude chronologique présentée ci-après.¹²⁰

II.B.1. Première synthèse des facteurs [NodSm-IV (C16:2)] par le groupe de K. C. Nicolaou en 1992

L'équipe de Nicolaou a décidé de s'intéresser à la synthèse totale des facteurs [NodSm-IV (C16:2)] **18** à **20** et **24** sécrétés par *Sinorhizobium meliloti*.¹²¹ Ils ont adopté une synthèse conventionnelle, par ajout des unités monosaccharidiques de façon séquentielle, en partant de l'unité réductrice du sucre. Le squelette chitinique est construit après réaction de glycosylation avec des donneurs possédant un groupement fluorure activable en position anomérique. Afin d'installer une β -stéréosélectivité, l'utilisation de groupement encombrant phtalimido en position 2 a été envisagée. L'utilisation de groupements protecteurs *para*-méthoxybenzyle (PMB) et *para*-méthoxyphényle (MP), orthogonaux aux autres groupements et déprotégeables sans hydrogénolyse, permet la présence d'insaturations sur la chaîne lipidique (Schéma 20).

¹²⁰ a) Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinaÿ, P. *Carbohydrates in Chemistry and Biology* Ed. Wiley **2008**. ; b) Beau, J.-M. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2011**, 65, 45-48.

¹²¹ Nicolaou, K. C.; Bockovich, N. J.; Carcanague, D. R.; Hummel, C. W.; Even, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8701-8702.

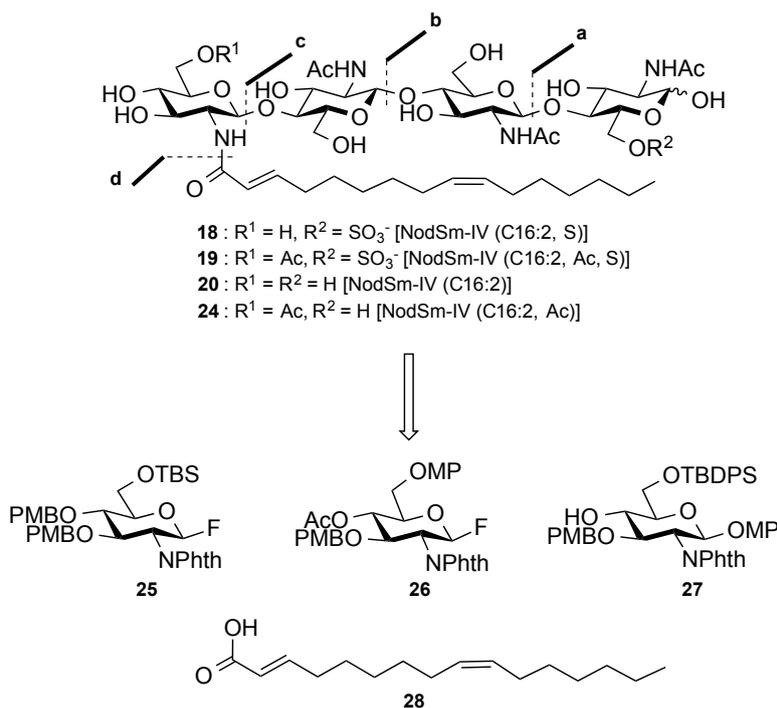
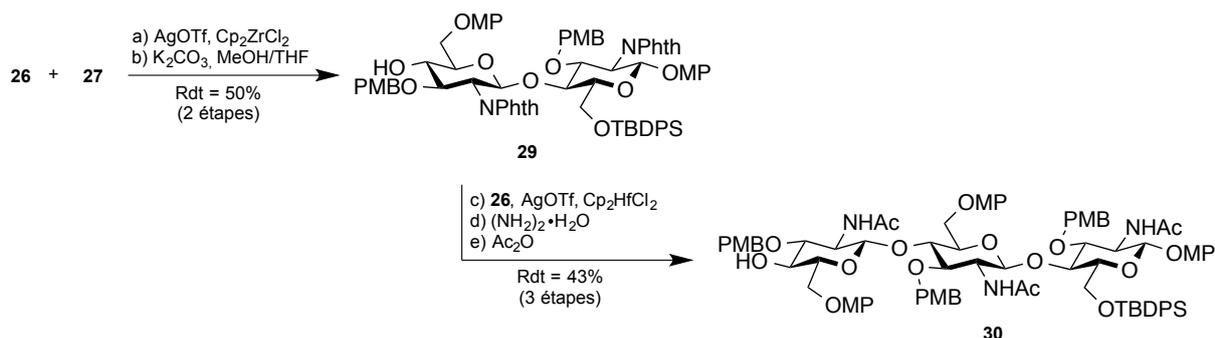


Schéma 20

La première étape de la synthèse consiste en la formation d'un disaccharide après réaction de glycosylation entre l'accepteur **27**, possédant un alcool libre en position 4, et le donneur **26** possédant un fluorure en position anomérique. Ce groupement fluorure est activé dans des conditions de Mukaiyama-Suzuki,¹²² par un couple de promoteurs à base de sels d'argents et de zirconium, utilisés en quantité sur-stœchiométrique. Il y a ensuite déprotection du groupement acétate en position 4, par saponification, afin de libérer une fonction alcool et d'obtenir un nouvel accepteur **29**. Cet accepteur est alors engagé dans une nouvelle réaction de glycosylation avec le même donneur **26** que précédemment. La déprotection des groupements *N*-phtaloyles et acétyles est effectuée par un chauffage dans l'hydrazine aqueuse puis l'acétylation des fonctions amines en présence d'anhydride acétique permet d'obtenir le trisaccharide **30** avec un groupement hydroxy libre en position 4 (Schéma 21).

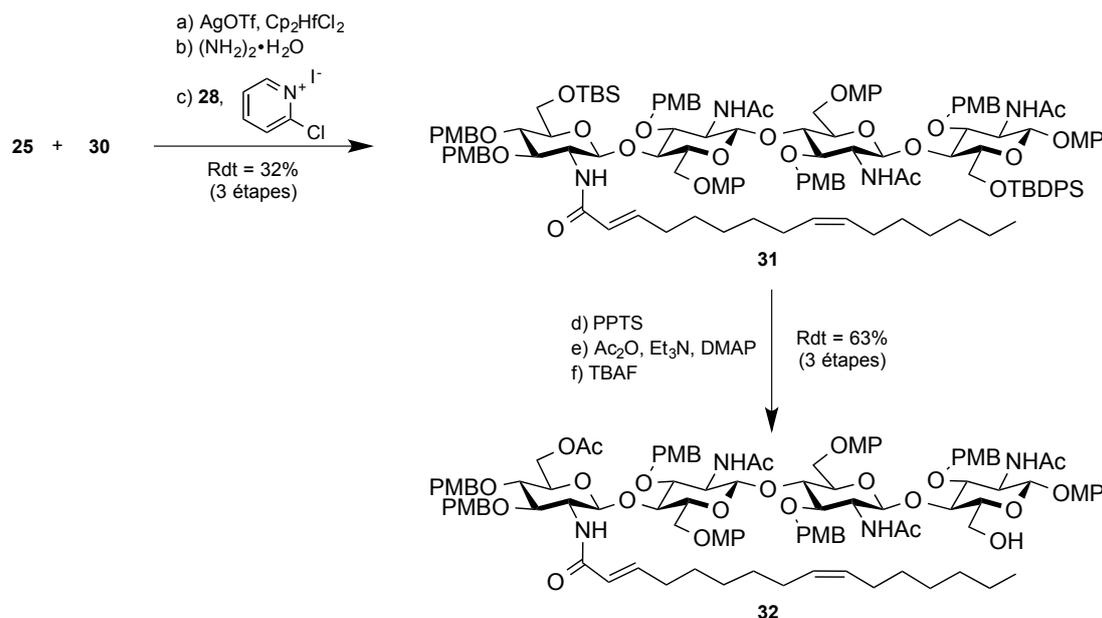
¹²² Matsumoto, T.; Maeta, H.; Suzuki, K.; Tsuchihashi, I. G.-I. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3567-3570.



Conditions réactionnelles : a) accepteur **27** (1 éq.), donneur **26** (1,75 éq.), AgOTf (5 éq.), Cp₂ZrCl₂ (5 éq.), DTBMP (1 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, 0 °C à 25 °C, 16 h, 56% ; b) K₂CO₃, MeOH/THF (1 : 1), 25 °C, 2 h, 90% ; c) donneur **26** (2 éq.), AgOTf (5 éq.), Cp₂HfCl₂ (5 éq.), DTBMP (1 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, 0 °C à 25 °C, 16 h, 60% ; d) (NH₂)₂•H₂O (excès), EtOH/benzène (20 : 1), 100 °C, 16 h ; e) Ac₂O (excès), MeOH/CH₂Cl₂ (1 : 1), 25 °C, 30 min, 72% (2 étapes).

Schéma 21

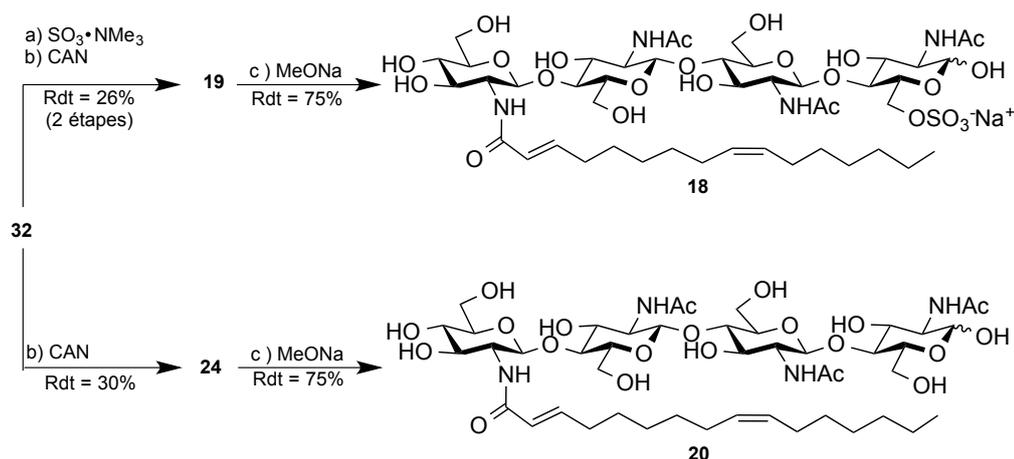
L'accepteur **30** subit à nouveau une réaction de glycosylation avec le donneur **25** possédant un groupement silylé (TBS) en position 6, orthogonal à celui de l'unité réductrice (TBDPS). Après déprotection du groupe *N*-phtaloyle, la réaction de couplage entre l'amine et l'acide gras **28** est réalisée en présence d'un agent d'activation classique. Le groupement silylé de l'unité non réductrice (TBS) de **31** a été déprotégé en utilisant des conditions acides douces par action du PPTS, puis l'alcool résultant est acétylé. Le groupement TBDPS a lui été déprotégé par l'utilisation d'une solution de TBAF dans le THF (Schéma 22).



Conditions réactionnelles : a) donneur **25** (5 éq.), AgOTf (5 éq.), Cp₂HfCl₂ (5 éq.), DTBMP (0,2 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, 25 °C, 16 h, 50% ; b) (NH₂)₂•H₂O (excès), EtOH, 100 °C, 6 h, 87% ; c) **28** (3 éq.), iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium (3 éq.), Et₃N (3,3 éq.), MeCN, 25 °C, 2 h, 73% ; d) PPTS (1,3 éq.), EtOH, 25 °C, 16 h ; e) Ac₂O (1,5 éq.), Et₃N (1,1 éq.), DMAP (cat.), CH₂Cl₂, 25 °C, 10 min, 72% (2 étapes) ; f) TBAF (3 éq.), THF, 25 °C, 1 h 30, 88%.

Schéma 22

Le tétrasaccharide **32** obtenu est un précurseur commun à la synthèse de quatre facteurs Nod. Après sulfatation et échange de contre anion (Na⁺) sur la position alcool libre de l'unité réductrice, puis déprotection des groupements aromatiques par oxydation au CAN avec de faibles rendements (26% pour l'obtention de **19** et 30% pour **24**), le facteur [NodSm-IV (C16:2, Ac, S)] **19** a été isolé avec un rendement global de 1,13% sans tenir compte de la préparation des monomères. Le facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] **18** a été obtenu après saponification de l'acétate avec un rendement global de 0,85%. Les deux autres facteurs [NodSm-IV (C16:2, Ac)] **24** et [NodSm-IV (C16:2)] **20** ont été synthétisés selon la même séquence, sans l'étape de sulfatation de la fonction alcool libre, avec des rendements globaux respectifs de 1,30% et 0,98% (Schéma 23).



Conditions réactionnelles : a) SO₃•NMe₃ (excès), pyridine, 25 °C, 1 h, 85% ; b) CAN (20 éq.), MeCN/H₂O (4 : 1), 25 °C, 1 h, 30% ; c) MeONa (excès), MeOH, 25 °C, 3 h, 75%.

Schéma 23

Quelques années plus tard, le groupe de Beau s'est intéressé à la synthèse de ces lipo-chitooligosaccharides et ils ont pu proposer une autre voie de synthèse.

II.B.2. Synthèse du facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] par le groupe de J.-M. Beau en 1994^{123,124}

Contrairement à l'équipe de Nicolaou, celle de Beau a décidé d'adopter une construction non conventionnelle en partant de l'unité non réductrice pour la construction itérative du squelette oligosaccharidique et en utilisant des donneurs possédants comme groupement activable, un groupement trichloroacétimidate. L'utilisation d'un groupement *N*-benzyloxycarbonyle (NHZ) sur l'atome d'azote de l'unité non réductrice a permis de différencier celui-ci des autres atomes d'azote. Le fait de greffer la chaîne lipophile en fin de synthèse a autorisé l'emploi de groupements protecteurs benzylés. La β -stéréosélectivité a été obtenue grâce à la participation du carbamate du donneur et à des conditions opératoires bien spécifiques. L'utilisation de l'accepteur 1,6-anhydro a permis d'exalter la nucléophilie de l'alcool et de protéger la position anomérique (Schéma 24).

¹²³ Tailler, D.; Jacquinet, J. C.; Noirot, A. M.; Beau, J. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 3163-3164.

¹²⁴ Tailler, D.; Jacquinet, J. C.; Beau, J. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1827-1828.

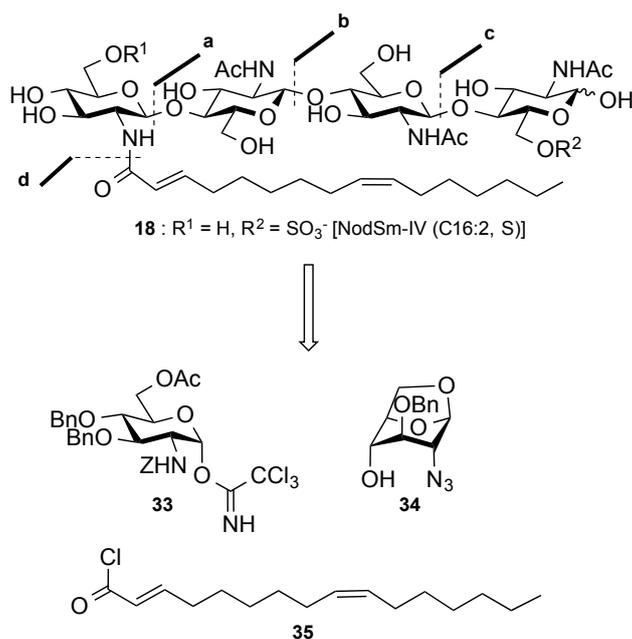
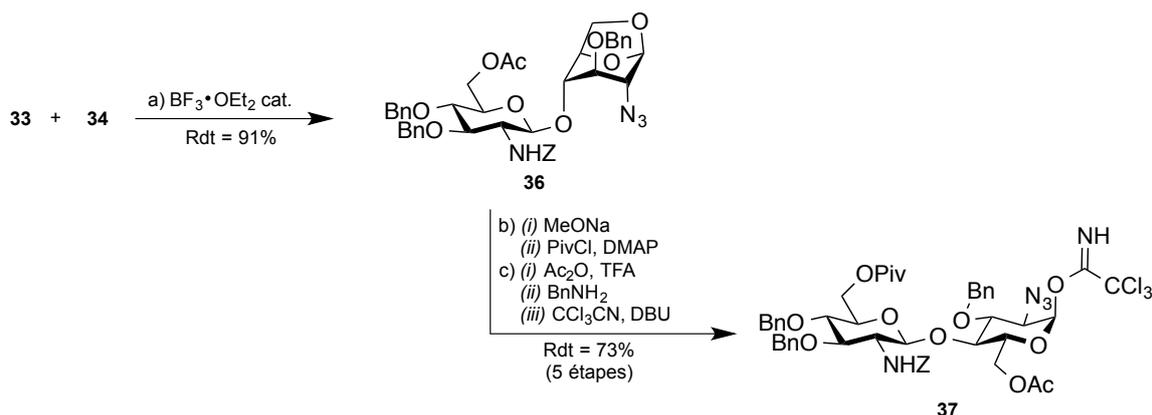


Schéma 24

Durant la première étape de la synthèse, le trichloroacétimidate de glycosyle **33** est activé par le diéthyle étherate de trifluoroborane et une réaction de glycosylation a lieu avec l'accepteur **34** afin d'obtenir le disaccharide **36**.¹²³ Le groupement *O*-Ac en position 6 est remplacé par un groupement *O*-Piv afin de pouvoir différencier les différentes fonctions alcools, puis l'ouverture du groupement 1,6-anhydro est effectuée en présence d'anhydride acétique et d'acide trifluoroacétique. La désacétylation anomérique et l'installation du groupement partant trichloroacétimidate permet d'obtenir le donneur disaccharidique **37** avec un rendement de 73% sur 5 étapes (Schéma 25).

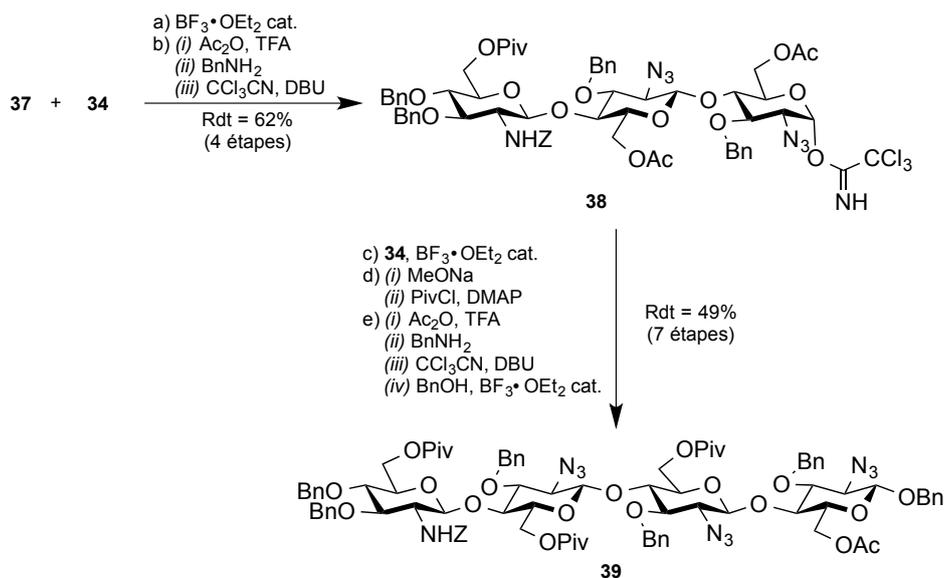


Conditions réactionnelles : a) donneur **33** (1 éq.), accepteur **34** (1,4 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,1 éq.), toluène, -78°C à -20°C , 20 min, 91% ; b) (i) MeONa, MeOH, TA ; (ii) PivCl, DMAP, pyridine, TA, quant. ; c) (i) $\text{Ac}_2\text{O/TFA}$ (9 : 1), TA ; (ii) BnNH_2 (10 éq.), Et_2O , TA ; (iii) CCl_3CN , DBU, CH_2Cl_2 , TA, 1 h, 73%.

Schéma 25

A noter l'emploi d'un groupement azido non participant en position 2 pour la suite de l'oligomérisation. Afin d'obtenir une nouvelle liaison glycosidique 1,2-*trans* sur le trisaccharide **38**, les conditions de réactions employées ont été adaptées afin que l'attaque de l'accepteur procède par un mécanisme de type $\text{S}_{\text{N}}2$ lorsque qu'on se place à basse température.

Une nouvelle réaction de glycosylation entre l'accepteur **34** et le donneur **38** en présence de diéthyle étherate de trifluoroborane a permis d'isoler le trétrasaccharide **39** souhaité avec un rendement de 49% à partir de **38** en 7 étapes. Afin de différencier les différentes fonctions alcools, celles-ci ont été protégées par des esters saponifiables orthogonalement (*O*-Ac et *O*-Piv). Le centre anomérique de l'unité réductrice a été protégé par une fonction alcool benzylique après réaction de glycosylation. Cette stratégie n'aurait pas pu être effectuée avec des groupements *N*-phthaloyles à la place des groupements azidos. Leur déprotection à l'hydrazine est incompatible avec l'emploi des groupements *O*-Ac et *O*-Piv (Schéma 26).

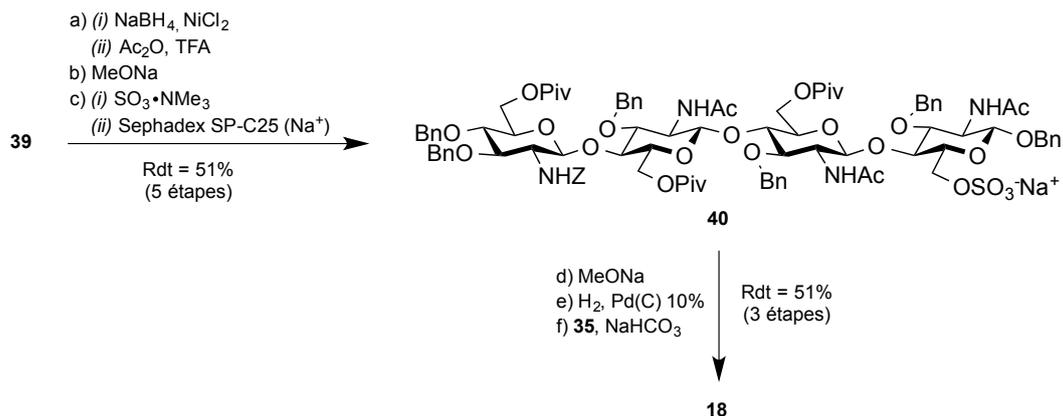


Conditions réactionnelles : a) **37** (1 éq.), **34** (2 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,1 éq.), toluène, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ à $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 85% ; b) (i) Ac_2O /TFA (9 : 1), TA ; (ii) BnNH_2 (10 éq.), Et_2O , TA ; (iii) CCl_3CN , DBU, CH_2Cl_2 , TA, 1 h, 73% ; c) **34** (2 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,1 éq.), toluène, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ à $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 85% ; d) (i) MeONa, MeOH, TA ; (ii) PivCl, DMAP, pyridine, TA, quant. ; e) (i) Ac_2O /TFA (9 : 1), TA ; (ii) BnNH_2 (10 éq.), Et_2O , TA ; (iii) CCl_3CN , DBU, CH_2Cl_2 , TA, 1 h, 73% ; (iv) BnOH, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,1 éq.), toluène, $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, 79%.

Schéma 26

Les étapes finales consistent à réduire les groupements azidos du tétrasaccharide **39** grâce à une méthode douce et efficace employant le couple $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$. Les groupements aminos résultants sont acétylés en présence d'anhydride acétique. La désacétylation sélective de l'alcool primaire en position 6 de l'unité réductrice a été effectuée en utilisant une quantité bien précise de méthanolate de sodium (2 mmol.dm^{-3}). Le sulfate est ensuite introduit sur cette position et le tétrasaccharide **40** est isolé avec un rendement de 51% sur les trois étapes. Il faut ensuite transestérifier les pivalates, déprotéger les groupements benzyles par hydrogénolyse et greffer la chaîne grasse par un couplage avec le chlorure d'acide dans des conditions de Schotten-Baumann¹²⁵ afin d'accéder à la cible, le facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] **18** (Schéma 27).

¹²⁵ (a) Schotten, C. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 2544-2547. ; (b) Baumann, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, 19, 3218-3222.



Conditions réactionnelles : a) (i) NaBH₄, NiCl₂, DME/EtOH, TA ; (ii) Ac₂O, pyridine, TA ; b) MeONa (2 mmol.dm⁻³), MeOH, TA, 52% ; c) (i) SO₃•Me₃N, DMF, 50 °C, 16 h ; (ii) Sephadex SP-C25(Na⁺), 98% ; d) MeONa, MeOH, TA, 88% ; e) H₂, Pd(C) 10%, EtOAc/MeOH/H₂O (1 : 1 : 1), TA, 16 h, 97% ; f) **35** (6 éq.), NaHCO₃, EtOAc/MeOH/ H₂O (1 : 1 : 1), TA, 48 h, 60%.

Schéma 27

Le facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] **18** a été synthétisé avec un rendement global de 6,2% sans tenir compte de la synthèse des monosaccharides de départ. Ce rendement est largement supérieur à celui obtenu par l'équipe de Nicolaou qui l'avait synthétisé avec un rendement global de 0,85%. Cette différence significative est due aux meilleurs rendements obtenus lors des étapes de glycosylations et aussi à l'introduction tardive de la chaîne grasse permettant l'hydrogénolyse des groupements protecteurs benzylés.

La même année, l'équipe d'Ogawa a effectué la synthèse de ce facteur en utilisant une nouvelle méthode. Comme nous le verrons dans la suite, ils ont aussi appliqué cette méthode pour la synthèse de facteurs produits par *Bradyrhizobium japonicum*.

II.B.3. Synthèse des facteurs [NodSm-IV (C16:2, S)], [NodBj-IV] et [NodBj-V] par le groupe de T. Ogawa en 1994¹²⁶

L'approche adoptée par l'équipe d'Ogawa reprend les deux méthodes vues précédemment. Ils ont décidé d'employer une synthèse conventionnelle en construisant le squelette à partir de l'unité réductrice comme l'a fait Nicolaou et en utilisant des groupements

¹²⁶ Ikeshita, S.; Sakamoto, A.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3123-3126.

encombrants *N*-phtaloyles sur tous les monomères afin d'induire la β -stéréosélectivité. Ils ont utilisés comme donneurs soit un fluorure de glycosyle ou des trichloroacétimidates de glycosyles. La différence avec la synthèse de Nicolaou porte sur les étapes de déprotections finales, celles-ci sont semblables à celles utilisées dans la synthèse effectuée par le groupe de Beau et elles sont compatibles avec l'utilisation de groupements benzylés. L'introduction de la chaîne grasse se fait aussi en fin de synthèse (Schéma 28).

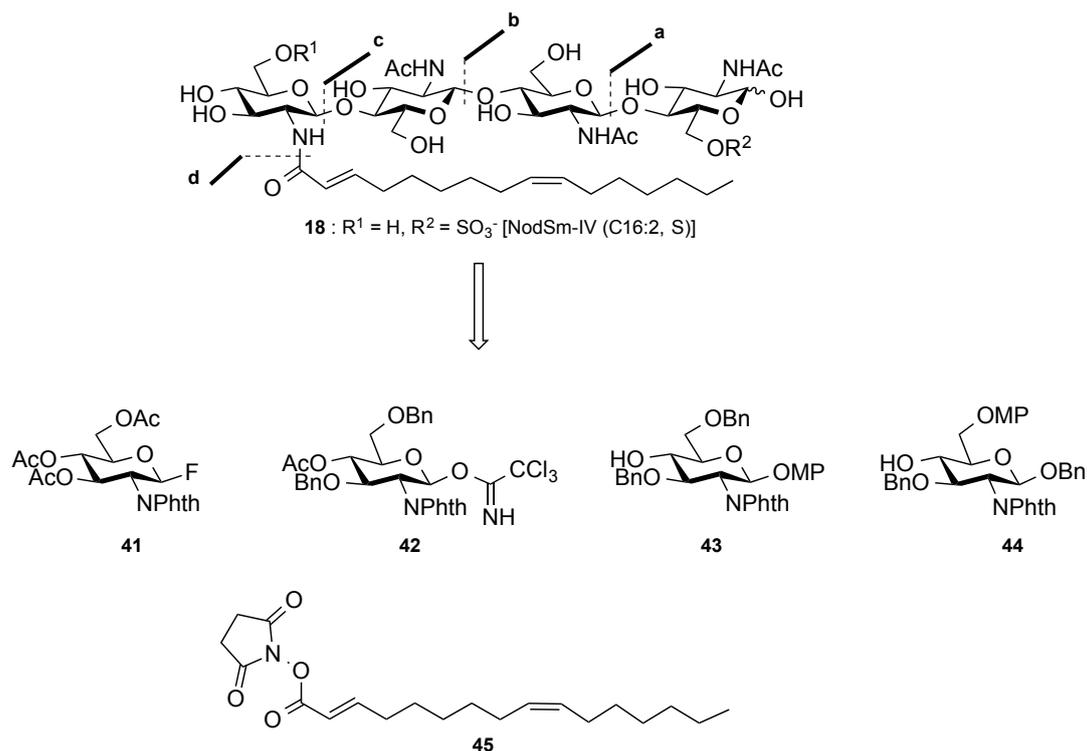
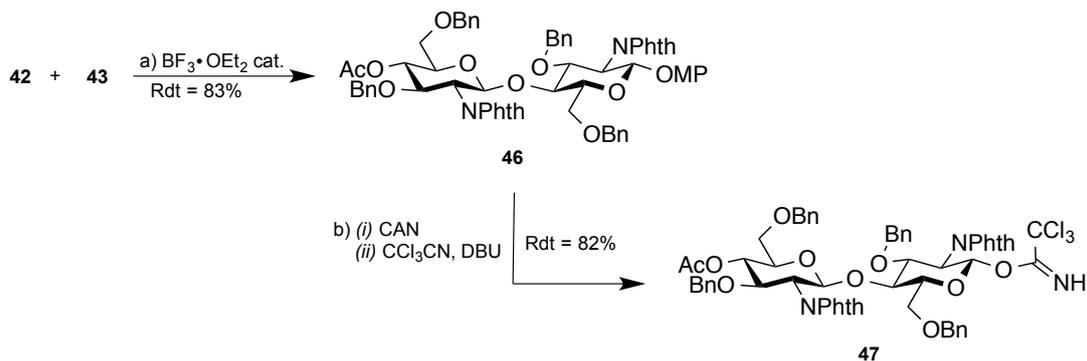


Schéma 28

La première étape consiste à synthétiser le donneur **47** d'après une procédure standard décrite par Ogawa en 1993.¹²⁷ Il y a d'abord une réaction de glycosylation entre le donneur trichloroacétimide **42** et l'accepteur **43** portant un groupe *para*-méthoxy phényle (MP) en position anomérique, en présence de BF₃•OEt₂, qui permet d'accéder au disaccharide **46** avec un parfait contrôle stéréochimique de la liaison glycosidique formée. Puis celui-ci est oxydé en présence de CAN afin de libérer la fonction hémiacétal et d'installer le groupement partant trichloroacétimide (Schéma 29).

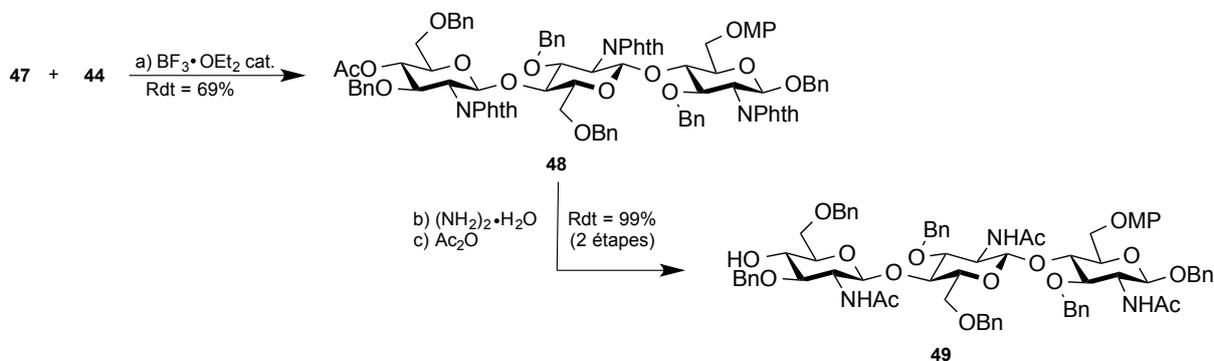
¹²⁷ Kuyama, H.; Nakahara, Y.; Nukada, T.; Ito, Y.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, C1-C7.



Conditions réactionnelles : a) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ cat., CH_2Cl_2 , -78°C , 83% ; b) (i) CAN, MeCN/ H_2O /toluène (4 : 3 : 3) ; (ii) CCl_3CN , DBU, CH_2Cl_2 , 0°C , 82%.

Schéma 29

Le trisaccharide **48** est alors obtenu après activation du groupement trichloroacétimide présent sur le donneur **47** et réaction avec l'accepteur **44**. Les groupements *N*-phtaloyle sont déprotégés par action de l'hydrazine aqueuse puis acétylation grâce à l'anhydride acétique, afin d'isoler le trisaccharide **49** avec un bon rendement de 68% sur trois étapes (Schéma 30).

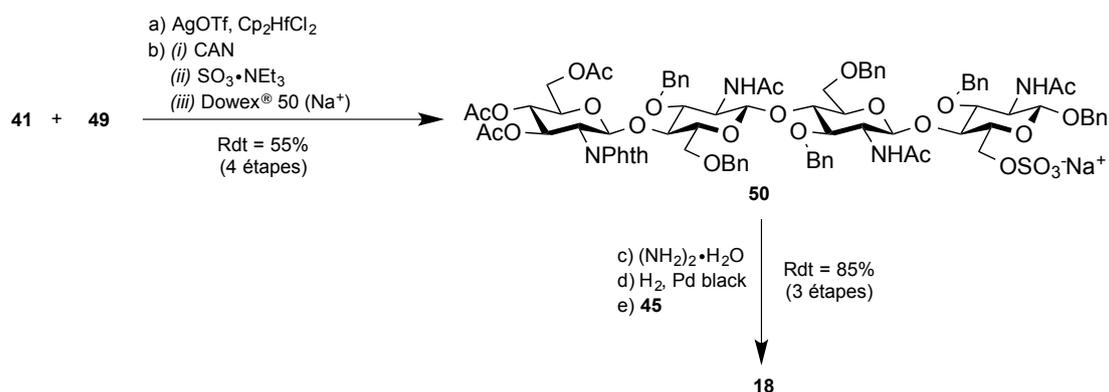


Conditions réactionnelles : a) **47** (1 éq.), **44** (1,1 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,2 éq.), CH_2Cl_2 , -78°C , 69% ; b) $(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /EtOH (1 : 11) ; c) Ac_2O /MeOH (1 : 2), 99% (2 étapes).

Schéma 30

Afin d'accéder au facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] **18** souhaité, l'unité monosaccharidique non réductrice est greffée par glycosylation entre le fluorure de glycosyle **41** et l'accepteur **49**. L'introduction du sulfate sur l'alcool en position 6 de l'unité réductrice est effectuée après déprotection sélective du groupement MP par le CAN et en présence

d'eau, permettant d'obtenir le tétrasaccharide **50**. L'hydrazinolyse du phtalimido de l'unité réductrice a permis de libérer l'amine et après hydrogénolyse des groupements benzyles de la molécule, l'amine libre a été couplée avec l'ester succinique **45**. Le facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] **18** a alors été obtenu avec un très bon rendement global de 21,6% (Schéma 31).



Conditions réactionnelles : a) **49** (1 éq.), **41** (3 éq.), AgOTf/Cp₂HfCl₂ (2 : 1), (CH₂Cl₂)₂, 79% ; b) (i) CAN, MeCN/H₂O (3 : 1) ; (ii) SO₃•NEt₃, DMF, 50 °C ; (iii) Dowex® 50 (Na⁺), MeOH/H₂O (8 : 1), 70% ; c) (NH₂)₂•H₂O, EtOH ; d) Pd black, H₂, MeOH/ H₂O (4 : 1) ; e) **45**, MeOH/ H₂O (4 : 1), 97%.

Schéma 31

L'équipe d'Ogawa a utilisé cette stratégie pour synthétiser d'autres facteurs de nodulations de la famille [NodBj-IV] et [NodBj-V] (composés **51**, **52** et **22** possédant un fucose sur l'unité réductrice) (Schéma 32).¹²⁸

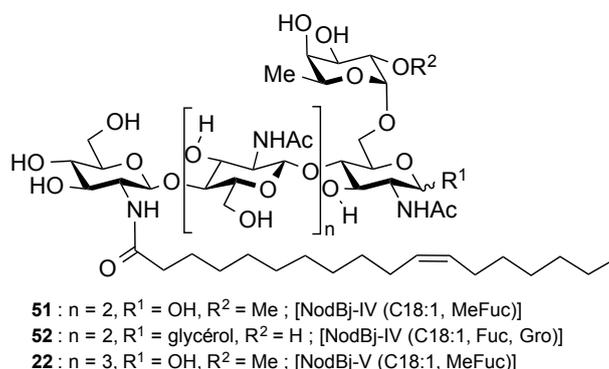


Schéma 32

¹²⁸ (a) Ikeshita, S.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 257-261. ; (b) Ikeshita, S.; Nakahara, Y.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.* **1995**, *266*, C1-C6.

Des brevets sur la synthèse en grande échelle de LCOs ont été déposés par la division développement de l'entreprise Américaine Du Pont de Nemours en 2007 et 2009.¹²⁹ Les auteurs décrivent une synthèse d'oligomères de *N*-acétyl-D-glucosamine ayant la structure représentée sur la Figure 11, sur des échelles allant de 500 mg au gramme.

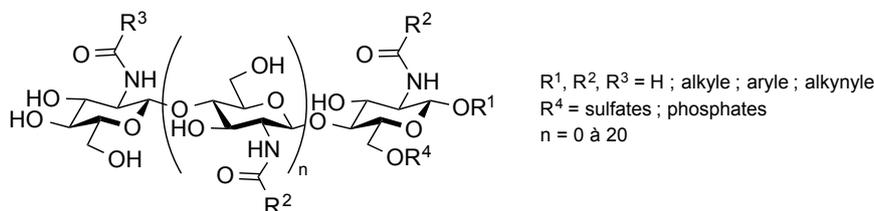
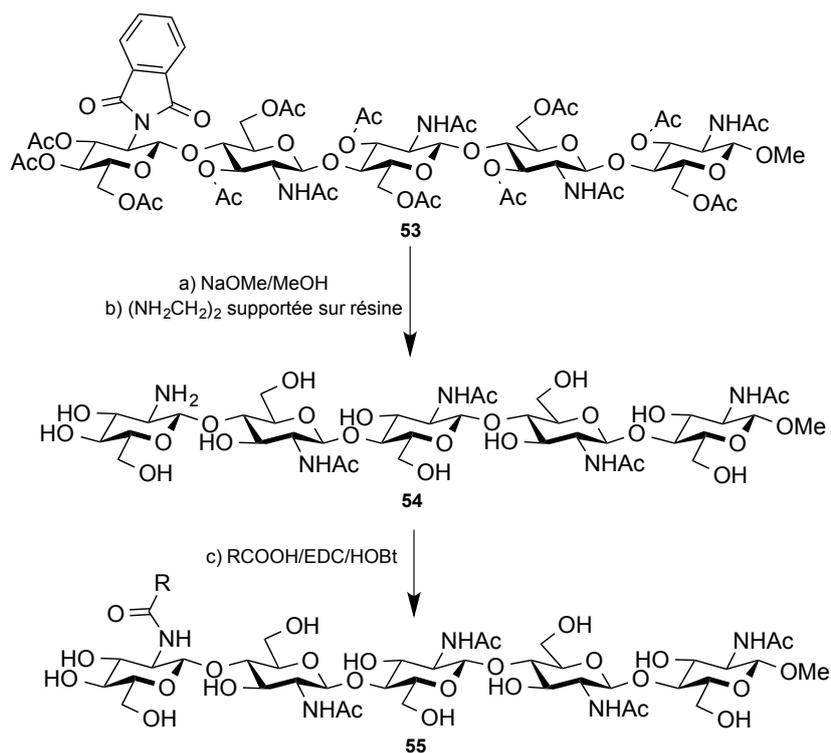


Figure 11

Dans leur procédé, les monomères sont introduits petit à petit dans des solvants aprotiques à des températures se situant entre -78 °C et 0 °C. Cette synthèse itérative utilise des donneurs de glycosyle de type thioglycosides qui sont activés par les promoteurs suivants : TfOH/NIS/TfOMe à -60 °C. La β -stéréosélectivité est induite par les groupements *N*-phtaloyles présents sur l'amine en position 2 du sucre. Les oligomères formés sont alors purifiés par des techniques simples de purifications telles que la cristallisation ou des lavages avec des solvants adéquats. Un groupement silylé (TBDMS) protège la position 4 de ces oligomères et il est déprotégé par l'action de *n*-Bu₄NF/CH₃COOH dans le THF afin d'obtenir un nouvel accepteur sur lequel un nouveau monosaccharide sera greffé. En fin de synthèse, une unité possédant un groupement *N*-phtaloyle est greffée sur l'oligomère possédant des groupements acétamidos afin d'obtenir, par exemple, le composé **53** qui permet une déprotection sélective de l'unité non réductrice. Les déprotections finales consistent à déacétyler la molécule et libérer la fonction amine de l'unité non réductrice, afin d'isoler par exemple le composé **54**. La chaîne grasse est greffée sur ce composé en présence de l'acide souhaité en excès, de 1-éthyl-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) permettant d'obtenir la molécule souhaitée **55** (Schéma 33).

¹²⁹ Sabesan, S., WO Patent Appl. No. WO2007/117500, **2007** ; US Patent Appl. No. US2009/0292115, **2009**.



Conditions réactionnelles : a) NaOMe (0,5 M), MeOH, TA, 2 jours ; b) MR-(NH₂CH₂) résine, *n*-butanol, 100 °C, 24 h ; c) **54** (1 éq.), RCOOH (excès), EDC (1 éq.), HOBt (1 éq.), H₂O, TA, 1 nuit.

Schéma 33

Toujours la même année, une nouvelle stratégie qui connue par la suite beaucoup de succès a été introduite par le groupe de Hui. Cette méthode est présentée ci-dessous.

II.B.4. Synthèse du facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] par le groupe Y.-Z. Hui en 1994¹³⁰

La stratégie employée par l'équipe de Hui pour synthétiser le facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] **18** est une stratégie dite par blocs. Contrairement aux approches décrites précédemment, cette stratégie consiste à effectuer une glycosylation finale entre deux disaccharides **56** et **57** afin d'obtenir le tétrasaccharide à fonctionnaliser. De plus, pour différencier les différents atomes d'azote, celui de l'unité non réductrice a été protégé par un groupement azido précurseur de la fonction azotée finale (Schéma 34).

¹³⁰ (a) Lai-Xi, W.; Chuan, L.; Qin-Wei, W.; Hui, Y.-Z. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7763-7766. ; (b) Wang, L. X.; Li, C.; Wang, Q. W.; Hui, Y. Z. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1* **1994**, 621-628.

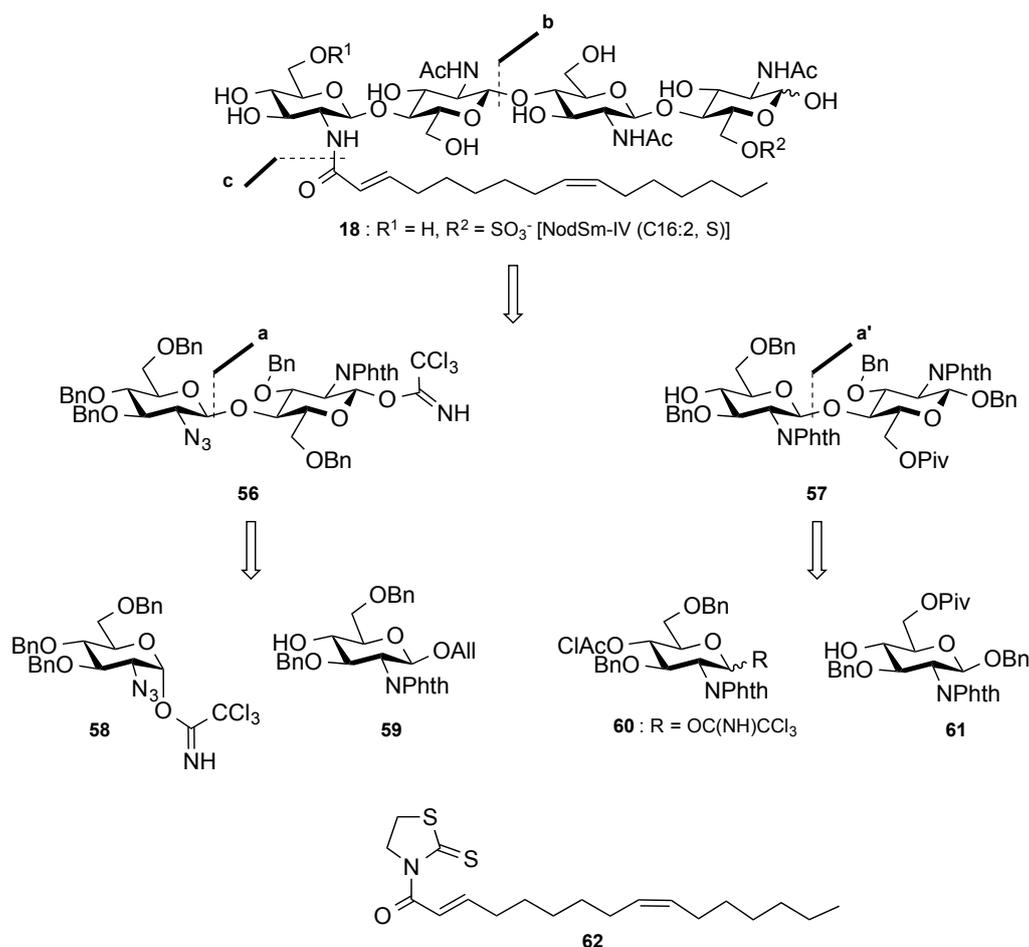
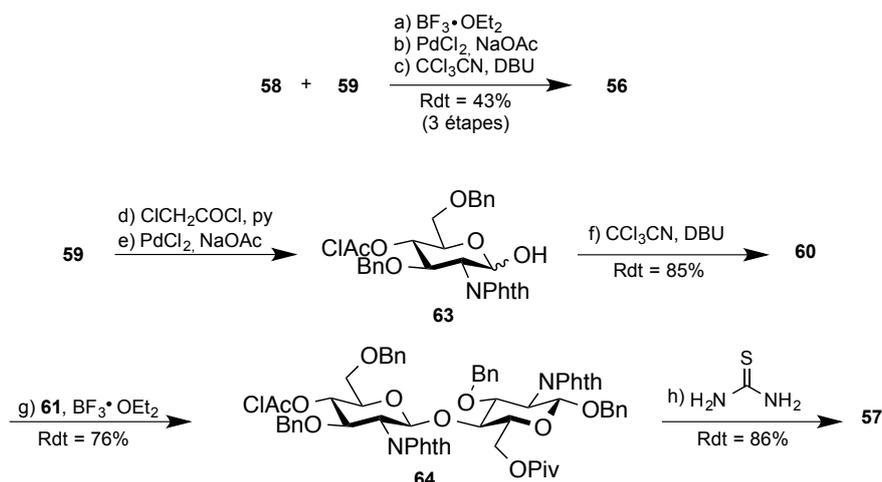


Schéma 34

La synthèse du disaccharide **56** se fait à partir du trichloroacétimide de glycosyle **58** et de l'accepteur **59**. Les conditions opératoires utilisées pour la formation de la liaison glycosidique 1,2-*trans* sont celles développées par l'équipe de Beau.¹²³ La déprotection du groupement allyle anomérique se fait par formation d'un complexe π -allylique du palladium, puis l'introduction du groupement partant trichloroacétimide permet d'accéder au premier disaccharide **56**.

Pour synthétiser le disaccharide **57**, l'hémiacétal **63** a été formé à partir du monosaccharide **59**. Celui-ci est mis en réaction avec le chlorure de chloroacétyle, afin de protéger l'alcool en position 4, puis la déprotection du groupement allylique anomérique est effectuée. Le donneur **60** est obtenu à partir de cet intermédiaire, après l'introduction d'un groupement activable trichloroacétimide, en position anomérique. Après activation par le

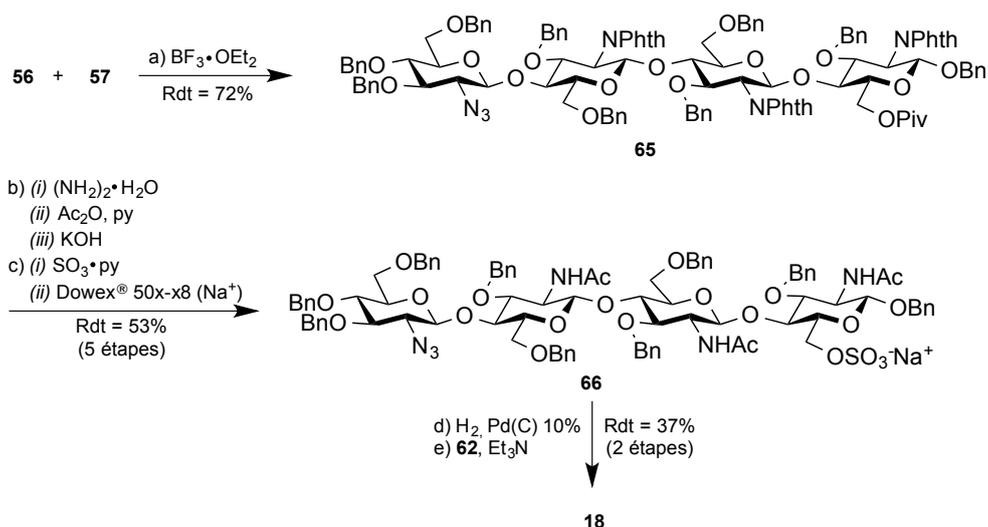
diéthyle de trifluoroborane du trichloroacétimidate de glycosyle **60** et réaction de glycosylation avec l'accepteur **61**, le disaccharide **64** est isolé avec un rendement de 76% pour l'étape de glycosylation. Le groupement chloroacétyle a été saponifié orthogonalement aux groupements phtalimidos et pivalate en présence de thiourée, afin d'accéder au deuxième disaccharide **57** (Schéma 35).



Conditions réactionnelles : a) **58** (1,3 éq.), **59** (1 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, TM 4Å, CH_2Cl_2 , -20°C , 2 h, 61% ; b) PdCl_2 (2,5 éq.), NaOAc (10 éq.), AcOH (95% aq.), 50°C , 3 h, 84% ; c) CCl_3CN (26 éq.), DBU (0,5 éq.), CH_2Cl_2 , 20°C , 2 h, 84% ; d) ClCH_2COCl (3 éq.) ; pyridine, 0°C , 0,5 h, 88% ; e) PdCl_2 (2,5 éq.), NaOAc (6 éq.), AcOH (95% aq.), 70°C , 1 h, 96% ; f) CCl_3CN (13 éq.), DBU (0,5 éq.), CH_2Cl_2 , 20°C , 2 h, 85% ; g) **61** (1 éq.), **60** (1,2 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,5 éq.), TM 4Å, CH_2Cl_2 , -15°C , 2,5 h, 76% ; h) thiourée, pyridine/ EtOH (6 : 1), 70°C , 1,5 h, 86%.

Schéma 35

La glycosylation entre les deux disaccharides **56** et **57** a permis d'obtenir le tétrasaccharide **65** avec un rendement de 72%. Les fonctions acétamidos ont été introduites sur ce tétrasaccharide après déprotection des phtalimidos et acétylation. Le groupement sulfate a été greffé sur l'hydroxy en position 6 de l'unité réductrice après saponification du groupement pivalate et le tétrasaccharide **66** est isolé avec un rendement de 53%. Les dernières étapes permettant d'accéder au facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] **18** sont les mêmes que dans les exemples précédents, hydrogénolyse des groupements benzyles puis acylation sélective de l'amine par le dérivé thiazolidinethione **62** (Schéma 36).



Conditions réactionnelles : a) **56** (1,1 éq.), **57** (1 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,4 éq.), TM 4Å, CH_2Cl_2 , -15°C , 3 h, 72% ; b) (i) $(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1 : 10), 95°C , 16 h ; (ii) Ac_2O , pyridine, 20°C , 6 h ; (iii) KOH, MeOH/THF (1 : 1), 20°C , 5 h, 66% (3 étapes) ; c) (i) $\text{SO}_3 \cdot \text{py}$ (8 éq.), DMF, 50°C , 6 h ; (ii) Dowex[®] 50w-x8 (Na^+), MeOH ; d) H_2 , Pd(C) 10%, $\text{EtOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (1 : 1 : 0,5), 25°C , 24 h, 83% ; e) **60** (10 éq.), Et_3N (cat.), EtOH 95%, 45°C , 3 jours, 45%.

Schéma 36

Cette stratégie de synthèse a ensuite été reproduite par d'autres équipes et notamment en 1997 par l'équipe de Fraser-Reid pour la synthèse de facteurs provenant d'une autre bactérie : *Rhizobium fredii*.

II.B.5. Synthèse du facteur [NodRf-III (C18:1, MeFuc)] par B. Fraser-Reid en 1997¹³¹

Pour la synthèse du facteur [NodRf-III (C18:1, MeFuc)] **67** produit par *Rhizobium fredii* USDA257, l'équipe de Fraser-Reid a utilisé une synthèse par blocs, comme précédemment, en effectuant une réaction de glycosylation entre les disaccharides **68** et **69**. Le groupement partant activable choisi est le *n*-pentényle qui est activé par le couple de promoteurs NIS/TESOTf (méthodologie développée par leur laboratoire).¹³¹ La β -stéréosélectivité a été induite par les groupements encombrants *N*-phtaloyles présents en position 2. Une protection de l'azote de l'unité non réductrice par le tétrachlorophthalimido (TCP), orthogonal au groupement *N*-phtaloyle, a permis de différencier les différentes

¹³¹ Debenham, J. S.; Rodebaugh, R.; Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4591-4600.

fonctions azotées de la molécule. La chaîne lipidique a été introduite en fin de synthèse. L'originalité de cette synthèse réside dans le fait qu'on a ici accès à un LCO avec une glycosylation sur l'alcool de la position 6 de l'unité réductrice (Schéma 37).

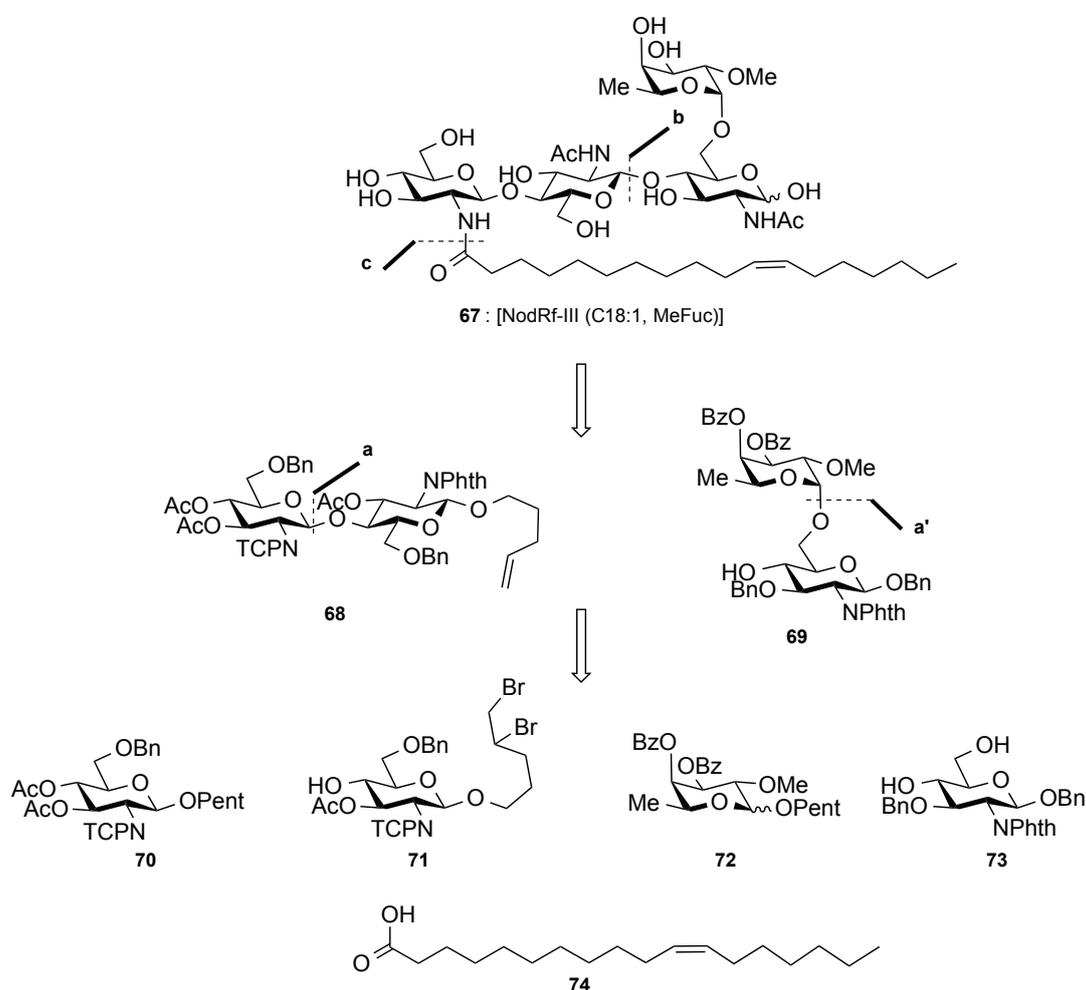
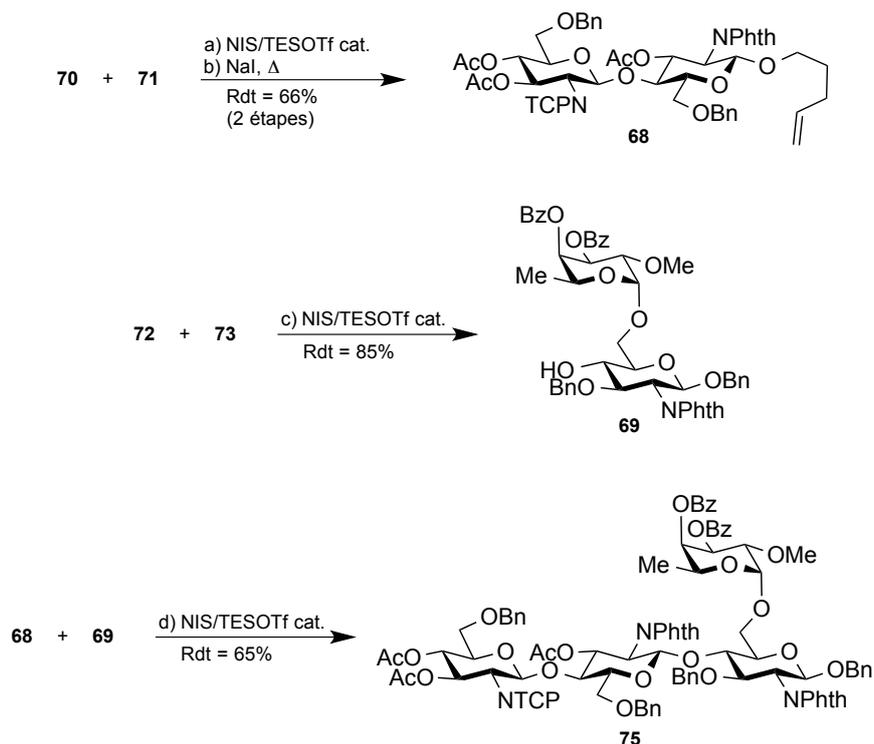


Schéma 37

Les disaccharides **68** et **69** ont été synthétisés par la méthode d'activation des *n*-pentényles des centres anomériques grâce au couple NIS/TESOTf. Dans le cas de la molécule **68**, la β -stéréosélectivité est donnée par l'encombrement stérique du groupement TCP présent en position 2 du donneur de glycosyle. Le groupement activable *n*-pentényle a été installé après une débromation de la chaîne carbonée provenant de l'accepteur **71**. Concernant la molécule **69**, la régiosélectivité est due à la plus grande réactivité de l'alcool primaire en position 6 du diol **73** et l' α -stéréosélectivité serait due à un effet de solvant et à la présence des groupements benzoates sur le fucose **72**.¹³¹ Le tétrasaccharide **75** est isolé après réaction de glycosylation entre le donneur **68** et l'accepteur **69** (Schéma 38).

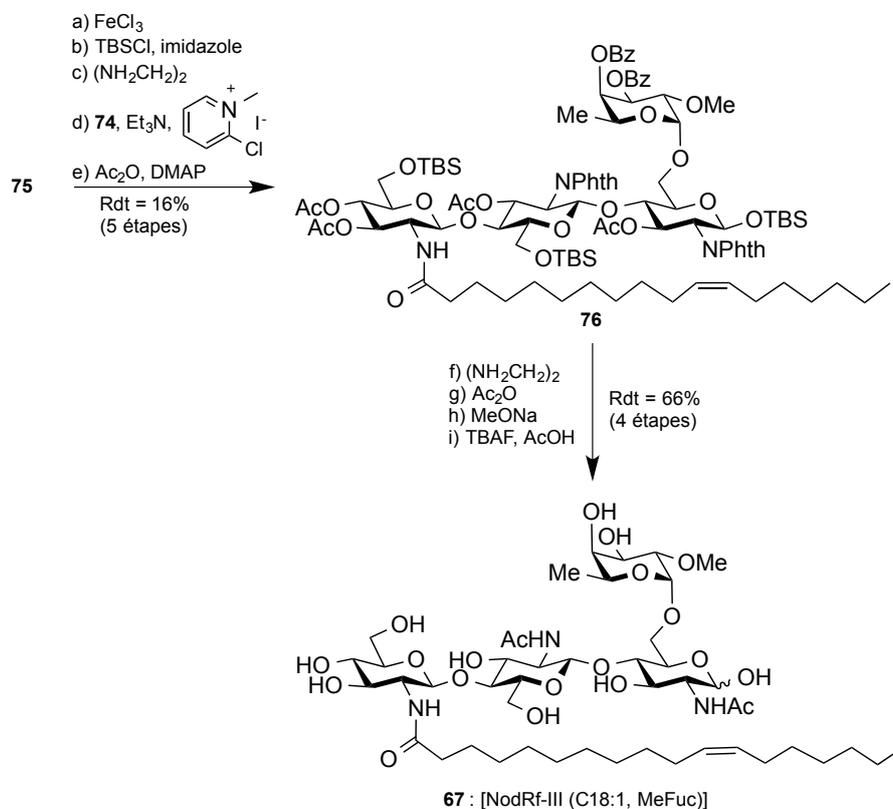


Conditions réactionnelles : a) **70** (1 éq.), **71** (1,1 éq.), NIS (1,8 éq.), TESOTf (0,5 éq.), CH₂Cl₂, -20 °C, 16 min, 71% ; b) NaI (15 éq.), 80 °C, 13 h, 93% ; c) **72** (1 éq.), **73** (1 éq.), NIS (1,5 éq.), TESOTf (0,3 éq.), Et₂O/CH₂Cl₂ (5 : 1), TA, 25 min, 85% ; d) **68** (1,3 éq.), **69** (1 éq.), NIS (1,7 éq.), TESOTf (0,4 éq.), CH₂Cl₂, 0 °C, 22 min, 65%.

Schéma 38

Les benzyles du tétrasaccharide **75** sont déprotégés par action du chlorure de fer (III) puis les alcools sont protégés par des groupements TBS. Le fait de protéger la position anomérique par un groupement silylé permet d'avoir un produit plus stable lors des étapes de déprotection. Le groupement TCP est déprotégé sélectivement par un faible excès d'éthylènediamine, puis la fonction amine libre obtenue a été mise à réagir avec l'acide gras **74** en utilisant l'iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium, agent de couplage employé lors de la synthèse des facteurs [NodSm-IV] par le groupe de Nicolaou. Il y a ensuite per-*O*-acétylation afin de faciliter la purification de la molécule **76**. Ce tétrasaccharide subit une aminolyse des groupements phthalimidos et esters grâce à un excès très important d'éthylènediamine, puis à nouveau une per-*O*-acétylation permet d'obtenir les fonctions acétamidos présentes dans les molécules naturelles. Après saponification des esters présents sur les fonctions alcools

secondaires, l'intermédiaire silylé a été mis en réaction avec une solution de TBAF (Schéma 39).



Conditions réactionnelles : a) FeCl_3 (16 éq.), CH_2Cl_2 anhy, 0 °C, 2 h 20, 81% ; b) TBSCl (14,5 éq.), imidazole (11,2 éq.), DMF, 0 °C à TA, 12 h, 80% ; c) $(\text{NH}_2\text{CH}_2)_2$ (2,1 éq.), MeCN/THF (3 : 1), 60 °C, 10 h ; d) **72** (4,5 éq.), Et_3N (9,5 éq.), iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium (4,8 éq.), MeCN, 40 °C, 2 h 30 ; e) Ac_2O (2,5 éq.), Et_3N (3 éq.), DMAP (3 éq.), CH_2Cl_2 , TA, 12 h, 25% (3 étapes) ; f) $(\text{NH}_2\text{CH}_2)_2$ (917 éq.), EtOH/MeOH (2 : 1), 90 °C, 34 h ; g) Ac_2O (25 éq.), Et_3N (25 éq.), CH_2Cl_2 , TA, 45 min ; h) MeONa (34 éq.), MeOH, TA, 2 h, 80% (3 étapes) ; i) TBAF (111 éq.), AcOH (excès), THF/MeOH (3 : 1), 0 °C à TA, 6 h, 83%.

Schéma 39

Il est à noter que la solution de TBAF est tamponnée par de l'acide acétique afin d'éviter toutes réactions parasites du centre anomérique en milieu basique comme le réarrangement de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein qui consiste en la transformation d'un aldose en cétose, passant par un intermédiaire réactionnel, énediol tautomère (Schéma 40).¹³²

¹³² Lobry de Bruyn, C. A.; Alberda van Ekenstein, W. *Ber.* **1895**, *28*, 3078-3082.

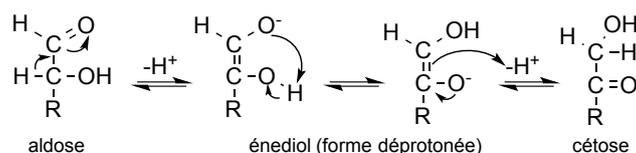


Schéma 40 : mécanisme du réarrangement de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein

Pour finir cette introduction sur les différentes stratégies de synthèses de facteurs de nodulation effectuées par voie chimique, nous allons décrire la synthèse, faite en 2007, des facteurs Nod de *Rhizobium* sp. NGR 234.

II.B.6. Synthèse des facteurs Nod de *Rhizobium* sp. NGR 234 par V. I. Torgov et V. N. Shibaev en 2007¹³³

L'équipe de Torgov et Shibaev s'est intéressée à la synthèse du facteur Nod **77** et de l'analogue **78** produits par la bactérie *Rhizobium* sp. NGR 234, entrant en symbiose avec plus d'une centaine d'espèces de légumineuses.¹³⁴ Pour cette synthèse, ils ont utilisé une stratégie par blocs comme les exemples précédemment décrits. Les liaisons glycosidiques formées proviennent d'une activation de thioglycosides et les différents groupements aminés sont différenciés grâce à l'utilisation d'un groupement azido sur l'unité non réductrice et de groupements phtalimidos sur les autres unités (Schéma 41).

¹³³ Sedinkin, S. L.; Zinin, A. I.; Malysheva, N. N.; Shashkov, A. S.; Torgov, V. I.; Shibaev, V. N. *Mendeleev Commun.* **2007**, *17*, 10-13.

¹³⁴ Perret, X.; Staehelin, C.; Broughton, W. J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 180-201.

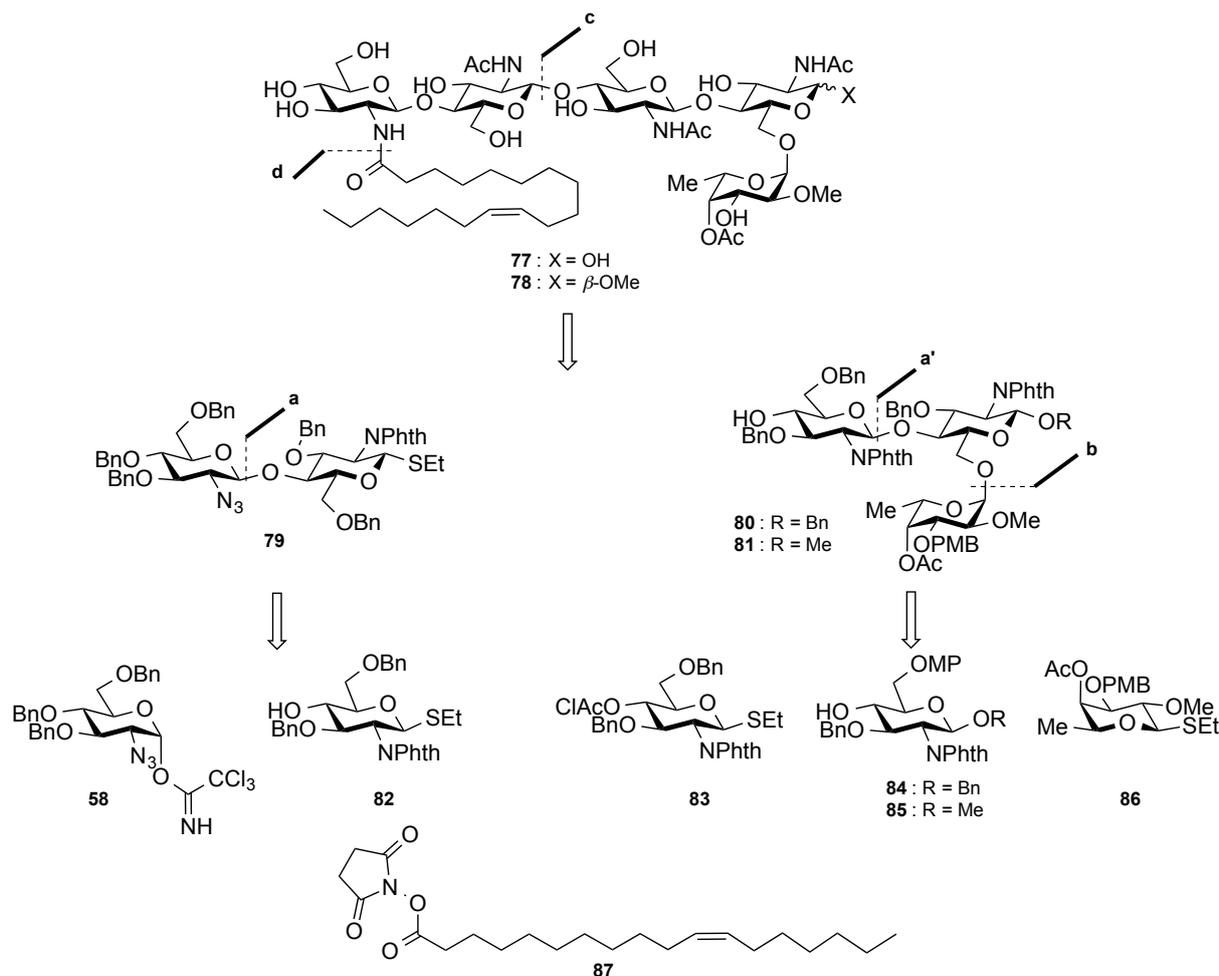
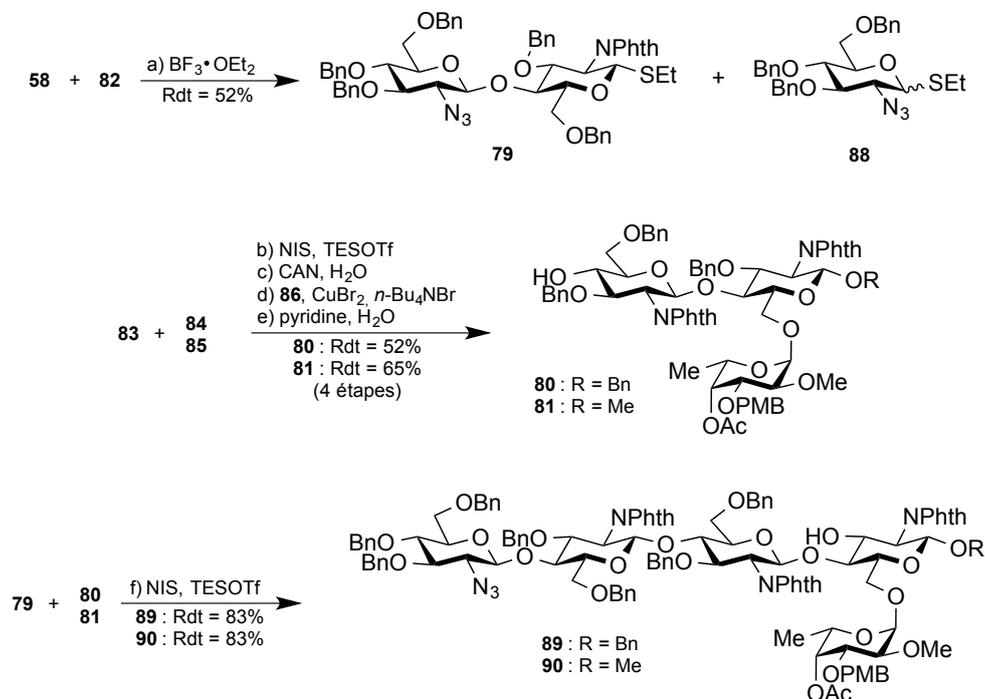


Schéma 41

Les conditions utilisées pour la synthèse du disaccharide **79** sont les mêmes que celles employées dans la synthèse de Beau, favorisant ainsi une attaque de type S_N2 de l'accepteur **82** sur le trichloroacétimidate de glycosyle **58**. Le rendement de cette étape de glycosylation reste moyen (52%) à cause du transfert du motif aglycone très nucléophile sur le donneur **58** donnant le monosaccharide **88**.¹³⁵ Une nouvelle liaison glycosidique a été obtenue après réaction de glycosylation entre le donneur thioglycoside **83** et les accepteurs **84** et **85**. La β -stéréosélectivité est engendrée par le groupement encombrant phtalimido. L'alcool primaire de l'unité réductrice est libéré par action du CAN sur le groupement protecteur MP. Les trisaccharides **80** et **81** sont formés après glycosylation entre les disaccharides formés précédemment et le groupement α -L-fucosyle **86** et déprotection du groupement chloroacétyle par chauffage dans la pyridine. Une dernière réaction de glycosylation entre ces deux blocs a

¹³⁵ Belot, F.; Jacquet, J.-C. *Carbohydr. Res.* **1996**, *290*, 79-86.

été effectuée, dans les mêmes conditions que précédemment, afin d'activer le thioglycoside et d'isoler les deux pentasaccharides **89** et **90** avec de très bons rendements de 83% (Schéma 42).

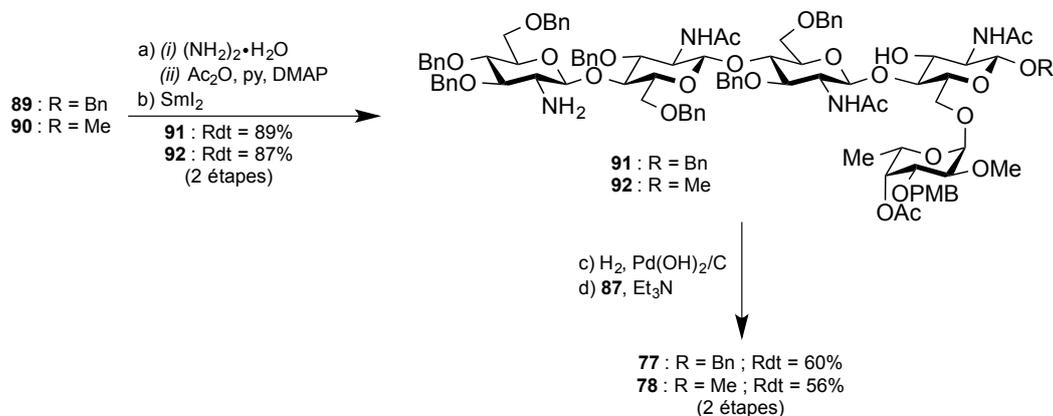


Conditions réactionnelles : a) **58** (1,5 éq.), BF₃•OEt₂ (15 mol%), TM 4Å, CH₂Cl₂, 45 °C, 5 h, 52% ; b) **83** (1,3 éq.), NIS (1,5 éq.), TESOTf (13 mol%), TM 4Å, CH₂Cl₂, -20 °C, 15 min, 86% et 95% ; c) CAN (4 éq.), MeCN/H₂O (9 : 1), 0 °C, 15 min, 87% et 93% ; d) **86** (1 éq.), accepteur (1,3 éq.), CuBr₂ (2 éq.), *n*-Bu₄NBr (2 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂/DMF (5 : 1), TA, 72 h, 71% et 77% ; e) pyridine/ H₂O (4 : 1), 80 °C, 16 h, 98% et 95% ; f) **79** (1,3 éq.), NIS (1,5 éq.), TESOTf (13 mol%), TM 4Å, CH₂Cl₂, -20 °C, 15 min, 83%.

Schéma 42

Les groupements phtalimidos des pentasaccharides **89** et **90** ont été déprotégés par l'éthylènediamine et convertis en acétamidos grâce à l'anhydride acétique. Puis la fonction azido de l'unité non réductrice a été réduite quantitativement par l'iodure de samarium (II) en présence d'eau dégazée pour former les molécules **91** et **92** avec des rendements respectifs de 89% et 87% sur deux étapes. L'hydrogénolyse en milieu acide des groupements benzyles a permis de libérer les fonctions hydroxy et la chaîne lipidique a été greffée par réaction entre la fonction amine libre et l'ester succinique **87** en milieu basique. L'avantage d'utiliser un ester succinique lors de la réaction de couplage est son utilisation en moindre quantité que les

autres composés employés dans les exemples décrits précédemment, ce qui simplifie la purification finale (Schéma 43).



Conditions réactionnelles : a) (i) $(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (excès), PrOH , $100\text{ }^\circ\text{C}$, 8 h ; (ii) Ac_2O , pyridine, DMAP (cat.), TA, 40 h, 89% et 87% ; b) SmI_2 (3,5 éq.), H_2O , THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s, quant. ; c) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, (10%), $\text{EtOH}/\text{AcOH}/\text{HCOOH}$ (20 : 2 : 1), $36\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h, 85% et 80% ; d) **87** (3 éq.), Et_3N , DMSO, TA, 40 h, 70%.

Schéma 43

II.B.7. Conclusion sur les synthèses par voie chimique des facteurs Nod

Nous avons pu voir au travers de ces exemples de synthèse d'oligosaccharides que plusieurs voies pouvaient être envisagées et que le choix des différents groupements protecteurs à utiliser est très important, ainsi que leur ordre d'introduction et de déprotection. Afin de créer le plus simplement possible des liaisons glycosidiques, le choix des groupements activables des positions anomériques est lui aussi primordial. L'utilisation de trichloroacétimidates, fluorures de glycosides et de thioglycosides est envisageable. Même si les conditions opératoires utilisées pour les glycosylations sont souvent optimisées, la formation de ces liaisons reste, dans certains cas, compliquée. En revanche, celles-ci sont formées très facilement dans un grand nombre d'organismes vivants par l'action d'enzymes, d'où l'intérêt de nombreux scientifiques envers ces systèmes biologiques, notamment grâce aux avancées en biotechnologie.¹³⁶ Nous allons donc décrire dans la suite des synthèses de chitooligosaccharides par voie enzymatique.

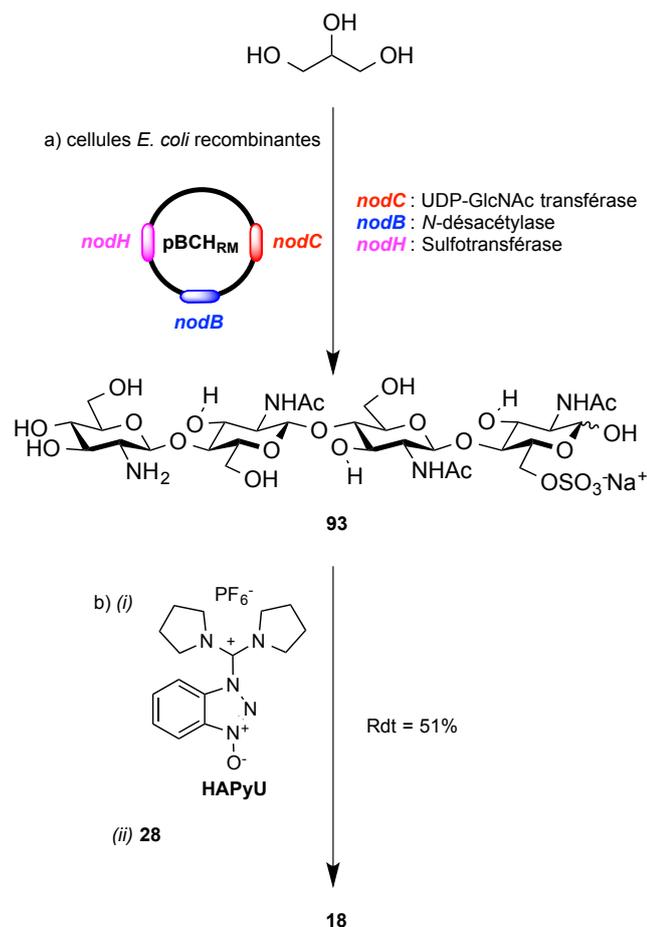
¹³⁶ Koeller, K. M.; Wong, C. H. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465-4493.

II.B.8. Synthèse de LCOs par génie biotechnologique

L'approche biotechnologique, permettant de synthétiser des chitooligosaccharides (COs), est une méthode de choix pour accéder à ces architectures moléculaires. Un premier avantage, comme a pu le montrer l'équipe de Samain et de Driguez, est l'accès en quantités plus importantes de molécules d'intérêt par rapport à la culture de souches *Rhizobia* sauvages. Cette équipe s'est intéressée à la synthèse de facteur [NodSm-IV (C16:2, S)] *via* cette stratégie. Plusieurs étapes sont nécessaires afin d'y parvenir. Les gènes *nodBC*, qui codent pour les protéines impliquées dans la synthèse des facteurs Nod, sont introduits dans les souches des bactéries recombinantes d'*Escherichia coli*.⁷⁴ Il y a ensuite formation du plasmide artificiel pBCH_{RM} par des techniques de clonage et introduction de celui-ci au sein des organismes cultivés à haute densité cellulaire.¹³⁷ La synthèse des unités GlcNAc des oligosaccharides est effectuée à partir du glycérol, utilisé comme source carboné, et le squelette chitinique est alors obtenu après assemblage de ces unités grâce à l'action du gène *nodC* présent dans ces « nano-réacteurs vivants ». La fonction amine de l'unité non réductrice du fragment de chitine biosynthétisé est désacétylée sélectivement grâce au gène *nodB*. Le groupement sulfate est introduit sur l'alcool de la position 6 de l'unité réductrice grâce au gène *nodH*. L'introduction de la chaîne lipidique a été effectuée par couplage chimique en employant l'agent activant HAPyU (Schéma 44).¹³⁸

¹³⁷ Samain, E.; Chazalet, V.; Geremia, R. A. *J. Biotechnol.* **1999**, *72*, 33-47.

¹³⁸ Rasmussen, M. O.; Hogg, B.; Bono, J. J.; Samain, E.; Driguez, H. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1908-1910.



Conditions réactionnelles : a) glycérol (9 mL.h⁻¹) O₂ (20%), milieu LB, pH = 6,8, 34 °C ; b) (i) (formation de HAPyU : HOAt (3 éq.), hexafluorophosphate de *N,N,N',N'*-bis(tetraméthylène)-chloroformamidium (2 éq.), (*i*-Pr)₂EtN (6 éq.), DMF, TA, 5 min) , (ii) **28** (2 éq.) dans DMF anh., TA, 45 min puis **93** (1 éq.), DMF anh., TA, 4,5 h à 6 h, 51%.

Schéma 44 : formation de facteur Nod par voie biotechnologique

Ce procédé a été amélioré par l'équipe de Fort, permettant de synthétiser en qualité suffisante des LCOs ou précurseurs de LCOs d'intérêt biologique (Figure 12) dans des quantités et des coûts compatibles à une exploitation à l'échelle industrielle (plusieurs dizaines de milligrammes par litre de milieu de culture de bactéries recombinantes).

différents facteurs de nodulation à l'échelle du gramme. La première étape est une procédure biotechnologique et la seconde est une procédure chimique mais n'utilisant aucun groupement protecteur. Cependant, un des grands avantages de la synthèse organique reste le fait qu'on peut accéder à divers analogues des molécules étudiées avec la possibilité de pouvoir modifier l'ensemble de la structure, ce qui permet d'effectuer des études de structure-activité complètes.

II.C. Conclusion sur les stratégies de synthèse

Nous avons pu voir que différentes voies de synthèses ont été utilisées pour isoler des chitooligosaccharides ou lipo-chitooligosaccharides. Concernant les voies chimiques, il a été prouvé que les groupements présents sur les monosaccharides ainsi que le choix de la méthode de glycosylation étaient importants. Les méthodes enzymatiques ont le grand avantage de pouvoir accéder à des quantités suffisantes de produit souhaité mais ne permettent pas de moduler le squelette chitinique, comme on pourrait le faire par voie chimique. Dans notre cas, nous nous sommes inspirés des synthèses chimiques pour effectuer la synthèse totale du LCO qui nous intéresse. Nous avons effectué un choix entre la méthode linéaire ou convergente et sur le choix des groupements protecteurs utilisés. Voici ci-dessous les résultats obtenus lors de cette synthèse.

III. Synthèse totale du LCO [Myc-IV (C16:0, S)]

Lorsque les facteurs Myc ont été isolés, plusieurs oligosaccharides ont pu être caractérisés en différentes proportions. Les structures possédant un groupement sulfate sur l'unité réductrice se sont avérées être 100 fois plus actives sur le phénomène de mycorhization mais à des concentrations plus importantes que pour le déclenchement de la nodulation.⁵ De plus, la structure naturelle la plus abondante et possédant à priori les meilleures activités biologiques, a été caractérisée comme étant le facteur [Myc-IV (16:0, S)] **97** (Figure 13). C'est la raison pour laquelle notre équipe s'est intéressée à la synthèse totale de ce composé. Commençons tout d'abord par décrire la rétrosynthèse proposée.

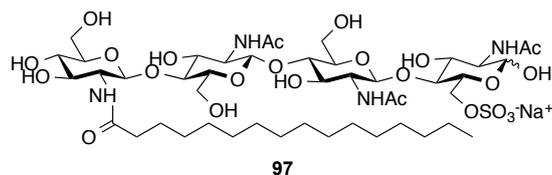


Figure 13 : facteur Myc le plus abondant et actif

III.A. Rétrosynthèse du facteur [Myc-IV (C16:0, S)]

La première stratégie envisagée, au sein du laboratoire, pour synthétiser le facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97** était d'utiliser la méthode de glycosylation catalytique au triflate de fer (III) mais celle-ci n'a pas permis d'obtenir des rendements suffisamment élevés pour la formation des glycosides possédant une liaison β -1,4.¹⁴⁰ Nous avons donc décidé d'utiliser une stratégie de synthèse par blocs, comme l'équipe de Hui.¹³⁰ Le choix des groupements protecteurs et des conditions réactionnelles a été aussi très important afin d'induire la β -stéréosélectivité et de différencier les différents groupements présents sur le squelette. Le schéma rétrosynthétique, en vue d'obtenir le produit naturel le plus rapidement possible, est représenté ci-dessous (Schéma 46).¹⁴¹

¹⁴⁰ Stévenin, A.; Boyer, F.-D.; Beau, J.-M. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 1699-1702.

¹⁴¹ Gillard, L.; Stévenin, A.; Schmitz-Afonso, I.; Vauzeilles, B.; Boyer, F.-D.; Beau, J.-M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 7382-7390.

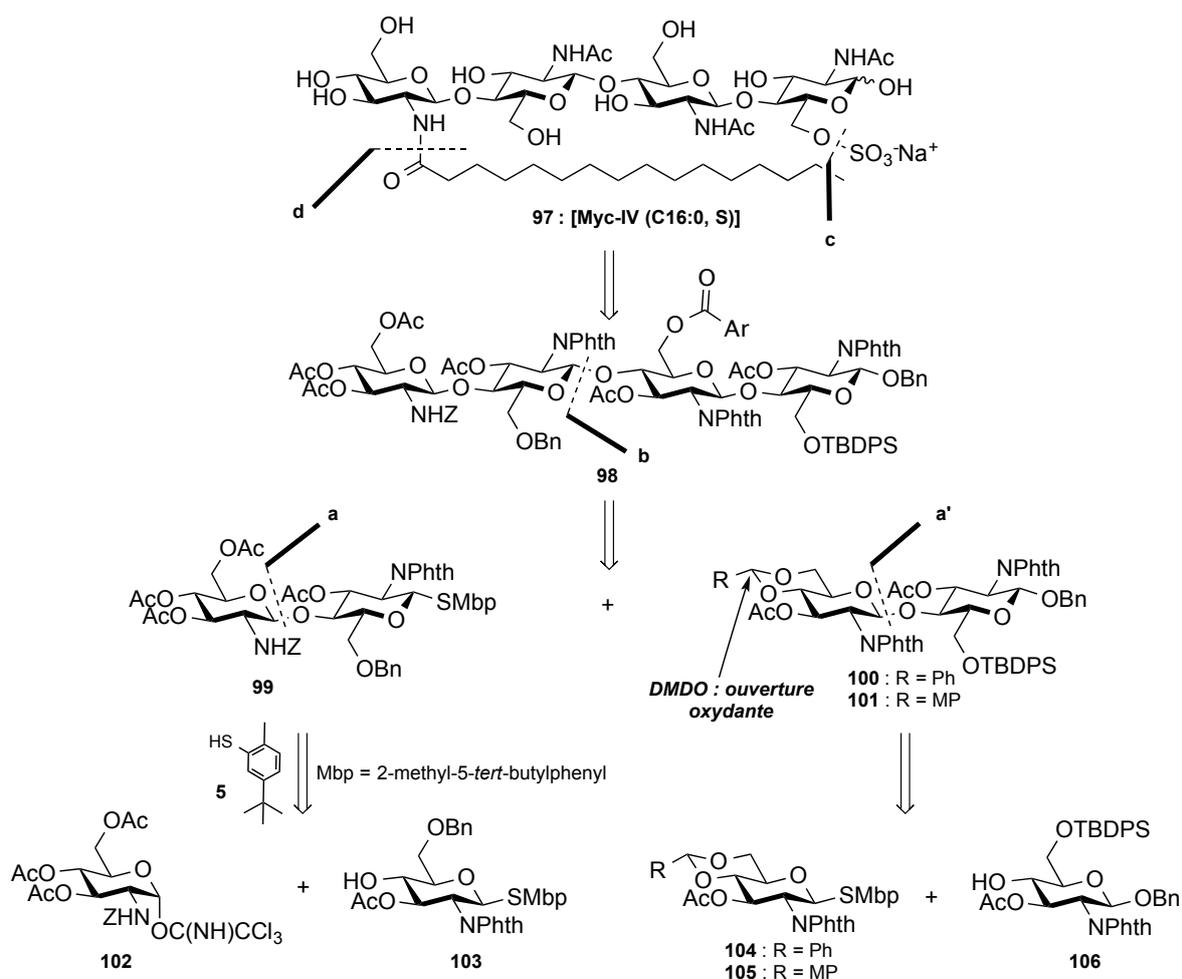


Schéma 46 : rétrosynthèse du facteur [Myc-IV (C16:0, S)]

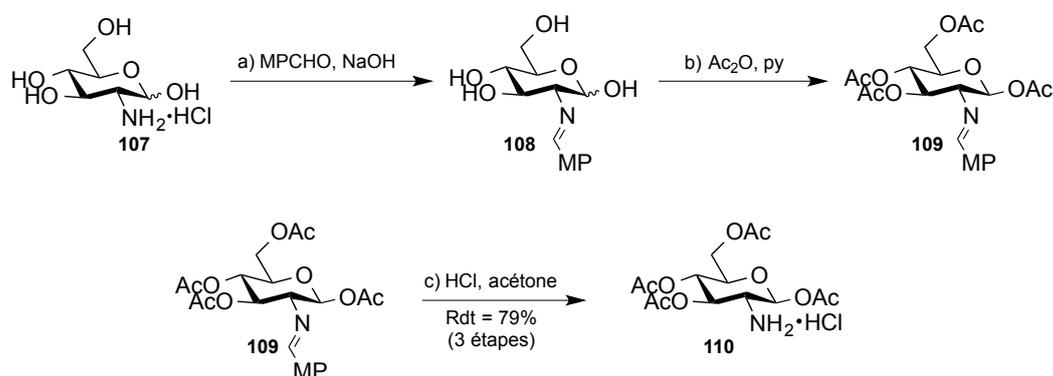
Nous avons décidé d'utiliser comme groupement activable en position anomérique, soit un trichloroacétimide pour le donneur **102**, soit les thioglycosides **103**, **104** et **105** préparés à partir du thiol non odorant et peu toxique le 5-(*tert*-butyl)-2-méthylthiophénol (MbpSH) **5**. La β -stéréosélectivité a été contrôlée grâce à la présence des groupements encombrants phtalimidos en positions 2, aux conditions réactionnelles et à la participation du carbamate lorsqu'on est en présence d'un trichloroacétimide.¹²³ L'atome d'azote de l'unité non réductrice a pu être différencié des autres grâce à l'emploi du groupement protecteur participant *N*-benzyloxycarbonyle (NHZ), orthogonal aux groupements *N*-phtaloyles (NPhth). La fonction alcool de la position 6 du monomère **106** a été différenciée grâce au groupement silylé TBDPS, sélectivement déprotégeable afin de greffer par la suite le sulfate. L'acétal de benzylidène des disaccharides **100** et **101** a subi une ouverture oxydante par le diméthyldioxirane (DMDO) et la régiosélectivité a été contrôlée grâce à l'introduction d'un

groupement adéquat en position 3 et aux conditions réactionnelles mises au point au laboratoire au préalable.¹⁴²

III.B. Résultats et discussion

III.B.1. Synthèse des monosaccharides

Tous les monosaccharides ont été préparés à partir du chlorhydrate de D-glucosamine **107** commercial. Dans un premier temps, il a été mis à réagir avec l'anisaldéhyde (MPCHO) en présence de soude pour conduire au monosaccharide **108** présentant une fonction imine. Après un séchage sous vide en présence de pentoxyde de phosphore, l'hémiacétal **108** a été mis en réaction avec l'anhydride acétique dans la pyridine afin de donner le sucre per-*O*-acétylé **109** sous la forme d'un seul anomère β . Le chlorhydrate **110** est ensuite obtenu après hydrolyse de la fonction imine en milieu acide à l'échelle de dizaines de grammes (Schéma 47).¹⁴³



Conditions réactionnelles : a) MPCHO (1,2 éq.), NaOH (1 M, 1 éq.), H₂O, 10 min à TA puis 2 h à -20 °C ; b) Ac₂O (9,2 éq.), pyridine, 1 h à 0 °C puis 12 h à TA ; c) HCl (5 M, 1,1 éq.), acétone, 50 °C, 10 min, 79% (3 étapes).

Schéma 47

La β -stéréosélectivité lors du passage de **108** à **109** s'explique par la formation d'un hémiaminal **111** en équilibre avec l'hémiacétal **108**. La face α est alors bloquée, ce qui

¹⁴² Stévenin, A.; Boyer, F.-D.; Beau, J.-M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1783-1786.

¹⁴³ Myszk, H.; Bednarczyk, D.; Najder, M.; Kaca, W. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 133-141.

implique que seule la fonction hydroxy de l'anomère **108** β est disponible pour réagir avec l'acétylpyridinium présent dans le milieu (Schéma 48).

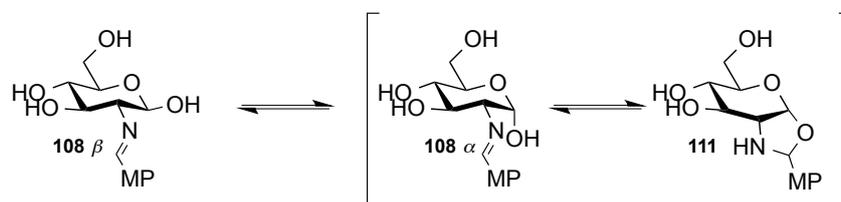
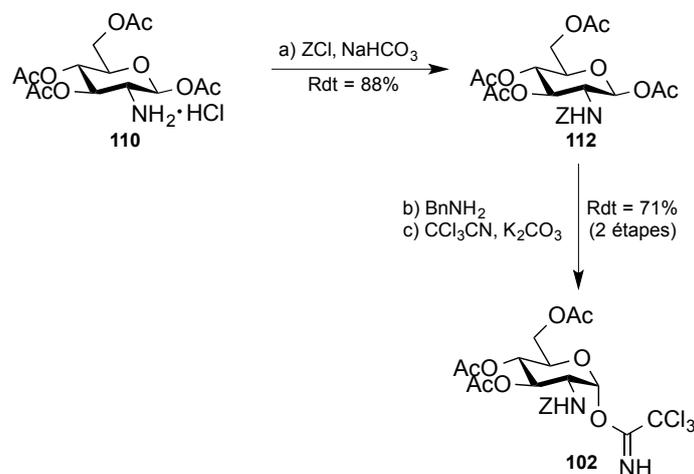


Schéma 48 : équilibre hémiacétal / hémiaminal

La protection de l'amine en position 2 a été effectuée après réaction en milieu basique du chlorhydrate **110** en présence de ZCl afin d'isoler le monosaccharide **112** avec un très bon rendement de 88%.¹⁴⁴ L'installation du groupe partant trichloroacétimide a ensuite été effectuée en deux étapes permettant d'accéder au donneur **102**, sous la forme exclusivement α , avec un bon rendement de 71% (Schéma 49).

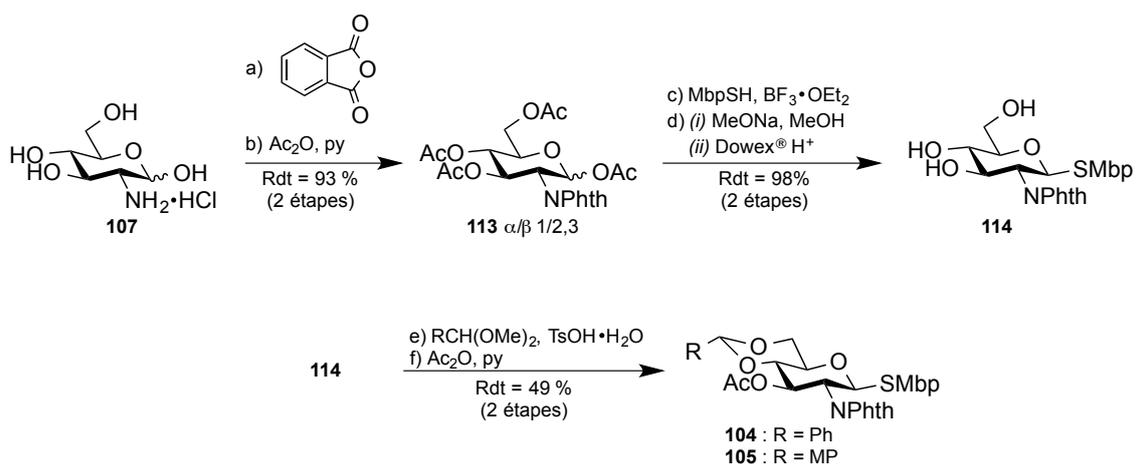


Conditions réactionnelles : a) ZCl (1,1 éq.), NaHCO₃ (2 éq.), CH₂Cl₂/H₂O (65 : 35), TA, 2 h, 88% ; b) BnNH₂ (1,45 éq.), THF, TA, 15 h ; c) CCl₃CN (10 éq.), K₂CO₃ (1,1 éq.), CH₂Cl₂, TA, 12 h puis 15 min à 30 °C, 71% (2 étapes).

Schéma 49

¹⁴⁴ Boullanger, P.; Jouineau, M.; Bouammali, B.; Lafont, D.; Descotes, G. *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 151-164.

La synthèse des deux acétals de benzyldènes monosaccharidiques **104** et **105** a aussi été effectuée à partir du chlorhydrate de D-glucosamine **107**. La première étape consiste à introduire le groupe protecteur *N*-phtaloyle sur la position 2 du sucre, qui permet par la suite de contrôler la stéréosélectivité par gêne stérique. Une per-*O*-acétylation est effectuée dans des conditions standards afin d'obtenir un mélange α/β (1 : 2,3) des deux anomères de **113**.¹⁴⁵ Le groupe thio est introduit par réaction de glycosylation avec le 5-(*tert*-butyl)-2-méthylthiophénol et en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Une désacétylation dans des conditions de Zemplén¹⁴⁶ permet ensuite de former le triol **114** avec un très bon rendement de 98%. La protection des hydroxy en position 4 et 6 par l'acétal diméthylique de benzaldéhyde ($\text{PhCH}(\text{OMe})_2$) ou l'acétal diméthylique de 4-méthoxybenzaldéhyde ($\text{MPCH}(\text{OMe})_2$) et l'acétylation en position 3 conduit à la formation des deux composés **104**¹⁰⁰ et **105**¹⁴¹ (Schéma 50).



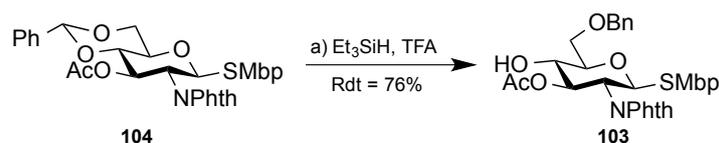
Conditions réactionnelles : a) anhydride phtalique (2 éq.), NaHCO_3 (2,95 éq.), H_2O , 40 °C, 12 h ; b) Ac_2O (13,2 éq.), pyridine, 10 h, 40 °C, 93 % (2 étapes) ; c) MbpSH (1,5 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (5 éq.), CH_2Cl_2 , 0 °C à TA, 12 h ; d) (i) MeONa (1 éq.), MeOH, TA, 2 h ; (ii) DOWEX[®] H⁺, TA, 10 min, 98 % (2 étapes) ; e) $\text{RCH}(\text{OMe})_2$ (6,1 éq.), $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,25 éq.), MeCN, TA, 8 h ; f) Ac_2O (6 éq.), pyridine, TA, 8 h, 49 % (2 étapes).

Schéma 50

L'accepteur **103** est ensuite obtenu à partir de l'acétal de benzyldène **104** par ouverture réductrice en présence de triéthylsilane et d'acide trifluoroacétique (Schéma 51).

¹⁴⁵ Macmillan, D.; Daines, A. M.; Bayrhuber, M.; Flitsch, S. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1467-1470.

¹⁴⁶ Zemplén, G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 1555-1564.



Conditions réactionnelles : a) Et₃SiH (5 éq.), TFA (5 éq.), CH₂Cl₂, 0 °C à TA, 8 h, 76%.

Schéma 51

Afin d'expliquer la régiosélectivité de l'ouverture, il est fréquemment admis qu'un acide protique va préférentiellement se coordiner sur l'oxygène de la position 4 et donc libérer par la suite cet alcool (Schéma 52).¹⁴⁷

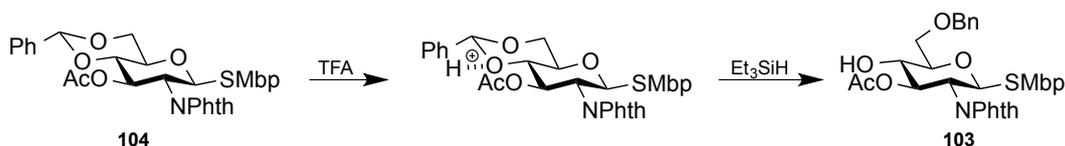
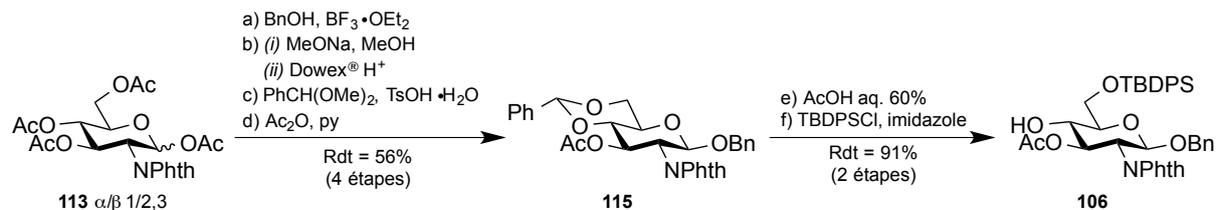


Schéma 52 : régiosélectivité de l'ouverture réductrice par Et₃SiH/TFA

Les premières étapes de la synthèse de l'accepteur **106** sont similaires à celle des acétals de benzylidènes **104** et **105**. La seule différence est la première glycosylation qui se fait avec l'alcool benzylique et non le thiol MbpSH. Le centre anomérique est alors protégé par un groupe benzyle et le composé **115** est obtenu après l'acétylation de l'hydroxy en position 3. Les dernières étapes consistent à hydrolyser l'acétal de benzylidène par un chauffage dans l'acide acétique aqueux¹⁴⁸ et à protéger sélectivement l'alcool primaire par un groupement silylé TBDPS (Schéma 53).

¹⁴⁷ Johansson, R.; Ohlin, M.; Ellervik, U. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8003-8011.

¹⁴⁸ Schwartz, D. A.; Lee, H.-H.; Carver, J. P.; Krepinsky, J. J. *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 1073-1079.



Conditions réactionnelles : a) BnOH (1,5 éq.), BF₃•OEt₂ (5 éq.), CH₂Cl₂, 0 °C à TA, 3 jours ; d) (i) MeONa (1 éq.), MeOH, TA, 2 h ; (ii) DOWEX® H⁺, TA, 10 min ; e) PhCH(OMe)₂ (6,1 éq.), TsOH•H₂O (0,25 éq.), MeCN, TA, 8 h ; f) Ac₂O (6 éq.), pyridine, TA, 8 h, 56 % (4 étapes) ; AcOH aq. 60% (excès), 100 °C, 1 h ; f) TBDPSCI (1,2 éq.), imidazole (1,3 éq.), DMF, TA, 8 h, 91% (2 étapes).

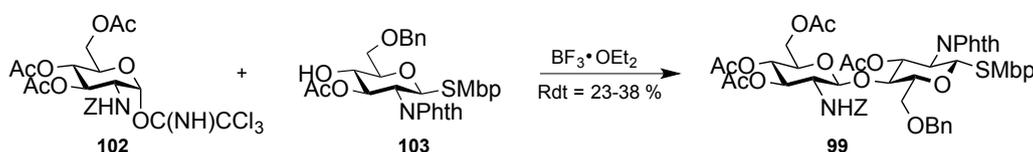
Schéma 53

Nous pouvons maintenant synthétiser les disaccharides **99**, **100** et **101** grâce aux monosaccharides obtenus.

III.B.2. Synthèse des disaccharides

III.B.2.a. Synthèse du disaccharide précurseur de l'unité non réductrice

Afin de synthétiser le disaccharide **99**, différents essais de glycosylation, entre le donneur α -imidate **102** et l'accepteur **103**, ont été effectués. Lors des premiers essais, nous avons utilisé le dichlorométhane comme solvant de réaction car c'est le solvant couramment utilisé dans les exemples de la littérature.¹⁴⁹ Malheureusement, les rendements dans ce solvant se sont avérés être assez faibles (23 à 38%) (Schéma 54).



Conditions réactionnelles : BF₃•OEt₂ (0,5 éq.), **102** (1,5 à 2 éq.), CH₂Cl₂, -30 °C à 0 °C, 2 h 30, 23 à 38%.

Schéma 54

¹⁴⁹ (a) Cook, B. N.; Bhakta, S.; Biegel, T.; Bowman, K. G.; Armstrong, J. I.; Hemmerich, S.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8612-8622. ; (b) Qian, X.; Hindsgaul, O. *Chem. Comm.* **1997**, 1059-1060.

Ce faible rendement peut s'expliquer par l'observation de produits de dégradations lors de la réaction, provenant probablement de la formation de l'intermédiaire oxazolidinone **116** due à l'assistance anchimérique du carbamate en position 2 du donneur **102** (Schéma 55).

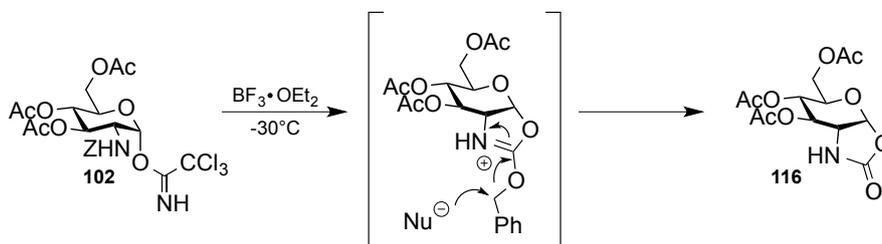
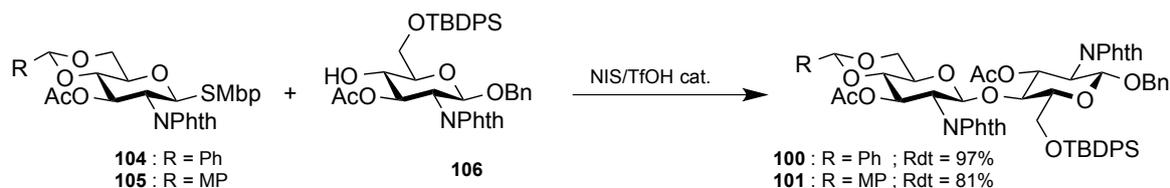


Schéma 55 : formation de l'oxazolidinone **116**

Cet intermédiaire oxazolidinone **116** n'est pas observé lorsque la réaction est effectuée dans le toluène à très basse température (-78 °C). Nous obtenons alors le disaccharide **99** souhaité avec un bon rendement de 76%. Dans ces conditions, l'attaque de l'accepteur **103** se fait *via* un mécanisme de type S_N2, ce qui minimise la formation de l'oxazolidinone **116** observée.

III.B.2.b. Synthèse du disaccharide précurseur de l'unité réductrice

Les disaccharides **100** et **101** ont été synthétisés par une méthode classique de glycosylation avec de très bons rendements (97% et 81% respectivement). Les donneurs **104** et **105** ont été activés par le couple de promoteurs NIS/TfOH, subissant ensuite l'attaque de l'accepteur **106** afin de former la liaison glycosidique β-1,4 entre les deux partenaires (Schéma 56).

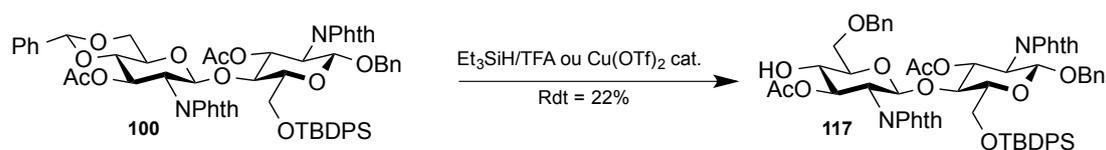


Conditions réactionnelles : (**100**) : **104** (1,5 éq.), NIS (2,5 éq.), TfOH (0,15 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 1 h 30, 97%. ; (**101**) : **105** (1,7 éq.), NIS (2,5 éq.), TfOH (0,15 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 1 h 30, 81%.

Schéma 56

Ces excellents rendements sont essentiellement dus à la grande stabilité du groupement silylé TBDPS en condition acide. En effet, des essais ont été effectués au préalable avec une protection de l'alcool primaire par un groupe TBS. Celui-ci s'est avéré être instable durant la réaction de glycosylation.

L'étape suivante a consisté en l'ouverture de l'acétal de benzylidène, qui permet de libérer une fonction alcool en position 4 et d'obtenir un nouvel accepteur de glycosyle. La méthode envisagée au départ était une ouverture réductrice. De nombreux couples d'agents réducteurs ont alors été testés (Et₃SiH/TFA ; Et₃SiH cat./Cu(OTf)₂ ; NaBH₃CN exc./TMSCl exc.), afin d'obtenir l'accepteur **117**, mais le rendement maximal obtenu était de seulement 22% (Schéma 57).

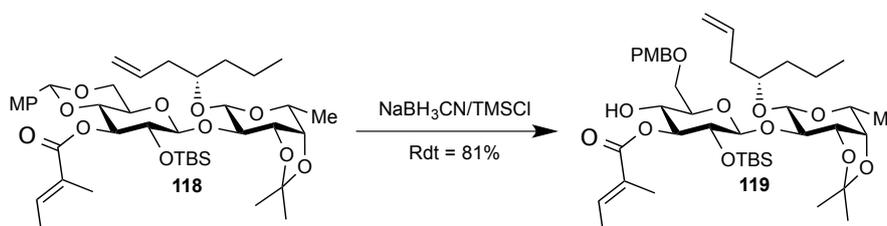


Conditions réactionnelles : Et₃SiH (2 éq.), TFA (2 éq.) ou Cu(OTf)₂ (20 mol%), CH₂Cl₂ ou CH₂Cl₂/MeCN (8:2), 0 °C à TA, 3 h, 22%.

Schéma 57

L'hypothèse émise au départ, était que le faible rendement pouvait être dû à l'excès de TFA utilisé lors de la réaction. Pour essayer de remédier à ce problème, des essais avec une

quantité catalytique de $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, comme décrit par le groupe de Hung,¹⁵⁰ ont été envisagés. Bien que les conditions soient plus douces, un rendement identique a été obtenu. Nous pouvons donc supposer que cela proviendrait d'une incompatibilité entre le groupement silylé de **100** et les agents réducteurs employés. En effet, très peu d'ouvertures réductrices d'acétals de benzylidène sur des composés possédant un groupe silylé sont connues. Un exemple a été réalisé par le groupe de Fürstner lors de la synthèse totale de produits naturels de la famille des Ipomoéassines. Ils ont testé plusieurs couples réducteur/acide et le seul ayant abouti à la formation de l'alcool secondaire est $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{TMSCl}$ utilisé en large excès (10 éq.) sur le disaccharide **118**. Le composé **119** est isolé avec un bon rendement de 81% (Schéma 58).¹⁵¹ Les auteurs ont expliqué que le problème est certainement dû à la présence d'esters, d'insaturations et du groupement silylé (TBS) sur leurs molécules.



Conditions réactionnelles : NaBH_3CN (10 éq.), TMSCl (10 éq.), $\text{TM } 4\text{\AA}$, MeCN , $0\text{ }^\circ\text{C}$ à TA, 1 h, 81%.

Schéma 58

Après ces essais d'ouverture réductrice plutôt décevants, nous avons alors testé les conditions d'ouverture oxydante par le DMDO (diméthylidioxirane) mises au point dans notre équipe. Lors des études de l'ouverture des acétals de 4,6-*O*-benzylidènes, il a été montré que le groupe en position 3 du sucre avait une influence sur la régiosélectivité de l'ouverture de l'acétal. En effet, si le groupe est électroattracteur, l'ouverture se fait en faveur du produit 4-OH ; en revanche si c'est un groupe électrodonneur, elle se fait en faveur du produit 6-OH (Schéma 59).^{142,152}

¹⁵⁰ Shie, C.-R.; Tzeng, Z.-H.; Kulkarni, S. S.; Uang, B.-J.; Hsu, C.-Y.; Hung, S.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1665-1668.

¹⁵¹ (a) Fürstner, A.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1906-1907. ; (b) Nagano, T.; Pospíšil, J.; Chollet, G.; Schulthoff, S.; Hickmann, V.; Moulin, E.; Herrmann, J.; Müller, R.; Fürstner, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9697-9706.

¹⁵² Vatele, J.-M. *Synlett* **2014**, *25*, 115-119.

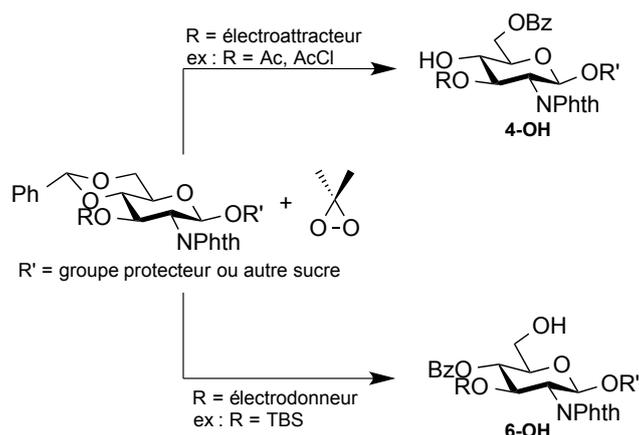
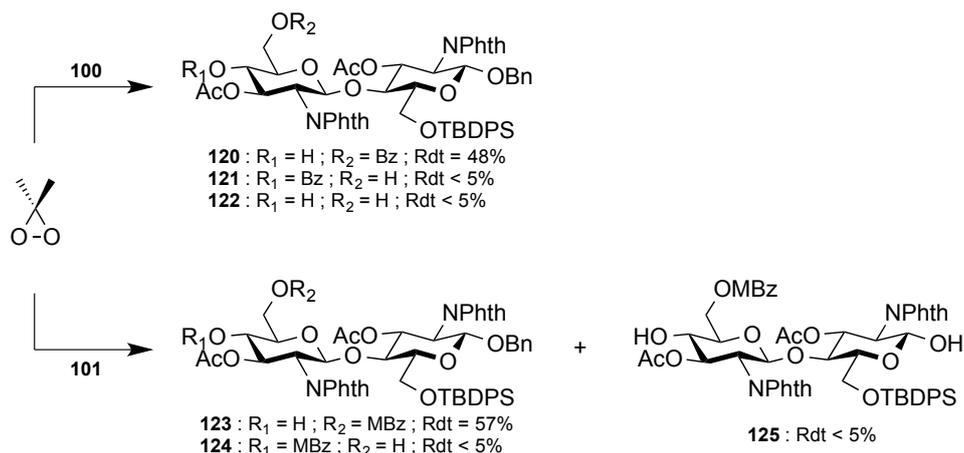


Schéma 59

Dans notre cas, les disaccharides **100** et **101** possèdent un groupe acétyle sur la position 3 de l'unité non réductrice, ce qui va contrôler l'ouverture en faveur du disaccharide 4-OH. Mais les rendements en produit isolé **120** et **123** (48% et 57% respectivement) restent moyens même si les produits **121** et **124** d'ouverture 6-OH sont formés en très faibles proportions (< 5%). Il y a tout de même une influence du groupement 4,6-*O*-*para*-méthoxybenzylidène, plus riche en électron, qui rend la liaison C-H benzylique plus réactive en présence de DMDO, d'où cette différence de rendement. Dans le cas de l'acétal de 4,6-*O*-benzylidène, nous avons aussi observé le produit d'hydrolyse de l'acétal **122**, en faible quantité également. Tandis qu'avec l'acétal de 4,6-*O*-*para*-méthoxybenzylidène, l'hydrolyse n'a pas lieu, ce qui est en accord avec le fait que l'enrichissement en électron du noyau aromatique minimise l'hydrolyse du groupe protecteur. En revanche, nous avons pu isoler, avec un très faible rendement, le produit **125** issu de la suroxydation du motif benzyle, présent en position anomérique, suivi d'hydrolyse (Schéma 60).



Conditions réactionnelles : DMDO (~ 0,1 M dans l'acétone, 5 éq.), 5 °C, 96 h.

Schéma 60

Nous avons dorénavant les deux précurseurs pour l'unité réductrice et non réductrice en main, et nous pouvons envisager un couplage 2 + 2 pour obtenir le tétrasaccharide à fonctionnaliser afin d'obtenir la molécule cible, le facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97**.

III.B.3. Synthèse des tétrasaccharides par glycosylation 2 + 2

Différentes conditions de glycosylation ont été testées pour le couplage 2 + 2 entre le donneur **99** et les accepteurs **120** et **123**. Dans un premier temps, des conditions standards d'activation, par le couple de promoteurs NIS/TfOH, ont permis d'isoler le tétrasaccharide **127** avec un rendement moyen de 36% (Tableau 1, Entrée 1). Afin d'améliorer ce rendement, nous avons fait varier différents paramètres (temps de réaction, quantité de donneur, temps d'agitation avec le tamis moléculaire...). Le fait de laisser le donneur **99** et l'accepteur **120** (ou **123**) en agitation dans le dichlorométhane avec du tamis moléculaire 4Å pendant 1 h au lieu de 10 min, avant l'ajout du promoteur, a permis d'améliorer les rendements. En effet, les tétrasaccharides **127** et **128** ont été isolés avec des rendements meilleurs, de 46% et 48% respectivement (Tableau 1, Entrées 2 et 5). Nous avons également envisagé l'utilisation du donneur sulfoxyde **126**, rapidement synthétisé par oxydation au *m*-CPBA du motif thio présent sur le centre anomérique du donneur **99**.¹⁵³ Dans ce cas, aucun produit de

¹⁵³ Kahne, D.; Walker, S.; Cheng, Y.; Van Engen, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6881-6882.

glycosylation n'a été détecté après son activation à l'anhydride triflique dans un milieu tamponné par la TTBP suivie de l'addition de l'accepteur **120** (Tableau 1, Entrée 4). Finalement, comme pour la formation du donneur **99**, nous avons utilisé comme solvant de glycosylation le toluène à la place du dichlorométhane,¹⁵⁴ ce qui nous a permis d'améliorer le rendement (61% *versus* 46%) pour l'obtention de **127** (Tableau 1, Entrée 3) et (Schéma 61).

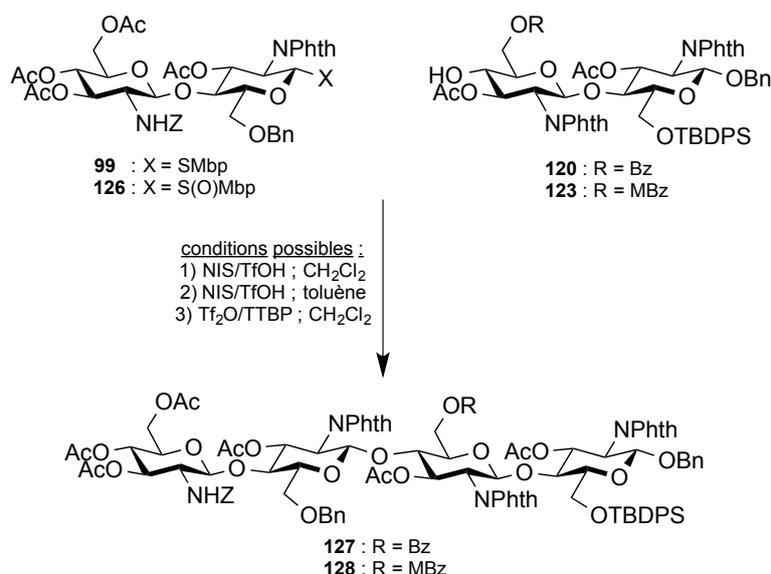


Schéma 61

Entrée	Donneur (D)	Accepteur (A)	D : A (éq.)	Conditions	Rendement
1	99	120	1,5 : 1	a	127 (36%)
2	99	120	2 : 1	b	127 (46%)
3	99	120	1 : 1,3	c	127 (61%)
4	126	120	1 : 1,1	d	-
5	99	123	2 : 1	b	128 (48%)

Conditions réactionnelles : a) TM 4Å (TA, 10 min), CH₂Cl₂ puis NIS (2,5 éq.), TfOH (0,15 éq.), -10 °C à TA, 1 h. ; b) TM 4Å (TA, ≥ 1 h), CH₂Cl₂ puis NIS (2,5 éq.), TfOH (0,15 éq.), -10 °C à TA, 1 h 30. ; c) TM 4Å (TA, ≥ 1 h), toluène puis NIS (1,2 éq.), TfOH (0,2 éq.), -30 °C, 3 h. ; d) TM 4Å (TA, ≥ 1 h), CH₂Cl₂ puis Tf₂O (1,2 éq.), TTBP (2 éq.), -78 °C à -30 °C, 1 h 30.

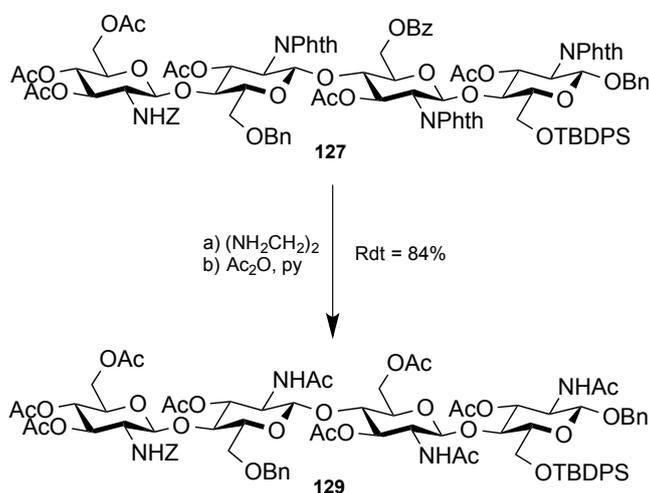
Tableau 1

¹⁵⁴ Zhang, Y.; Dong, D.; Qu, H.; Sollogoub, M.; Zhang, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 7133-7139.

La fonctionnalisation des tétrasaccharides **127** et **128** a alors été étudiée pour accéder au facteur Myc souhaité.

III.B.4. Fonctionnalisation des tétrasaccharides

Nous nous sommes inspirés des précédentes synthèses effectuées pour les facteurs de nodulation, pour choisir l'ordre des étapes de fonctionnalisations des tétrasaccharides. La première étape est l'aminolyse des groupements *N*-phthaloyles et de toutes les fonctions esters présentes sur le composé **127**, par un chauffage dans l'éthylènediamine qui permet de laisser la fonction Z intacte. La per-acétylation des fonctions alcools et amines libres a permis de conduire au composé **129** comportant les groupements acétamidos présents dans la molécule naturelle avec un rendement de 84% (Schéma 62). L'étape de per-acétylation a aussi pour but de simplifier la purification du produit qui reste tout de même assez difficile à séparer de la *N,N'*-diacétyl-éthylènediamine formée dans le milieu. La même séquence a été effectuée sur le composé **128** mais un mélange complexe de produits a été obtenu, dû à la difficulté d'aminolyse du groupement MBz. Pour cette raison, nous avons décidé de continuer la synthèse du facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97** avec le tétrasaccharide **129**.



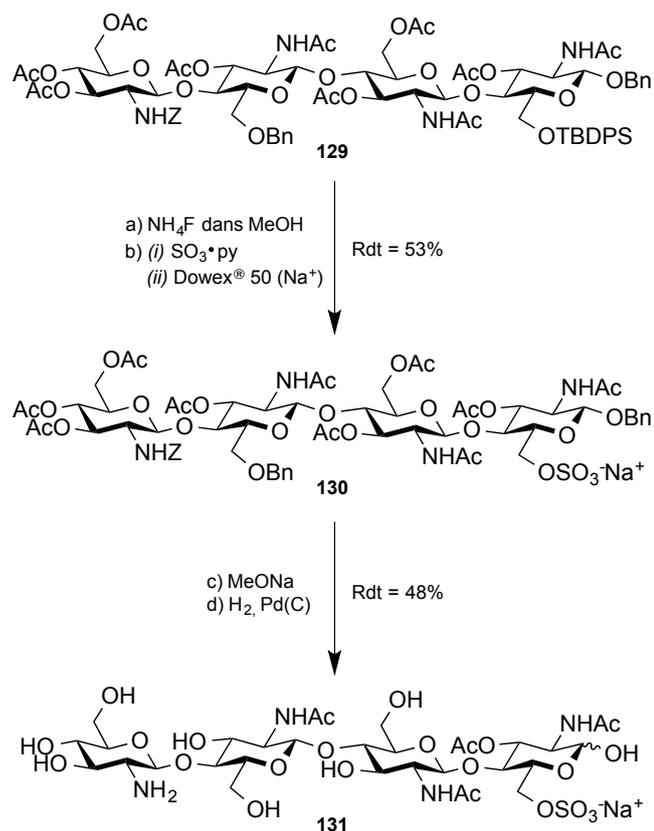
Conditions réactionnelles : a) $(\text{NH}_2\text{CH}_2)_2$ (150 éq.), EtOH, 60 °C, 12 h ; b) Ac_2O (275 éq.), pyridine, TA, 48 h, 84% (2 étapes).

Schéma 62

L'étape suivante est la déprotection du groupement silylé, par une solution de NH_4F dans le méthanol, effectuée dans un ballon rodavis au reflux du méthanol. Cette méthode de déprotection a été choisie car elle permet de simplifier la purification et l'élimination des sels de fluorures obtenus avec l'utilisation d'une solution de TBAF. Le tétrasaccharide 6-OH obtenu précédemment est ensuite sulfaté sur cette position par l'action du complexe $\text{SO}_3 \cdot \text{pyridine}$ puis un échange de contre cation (Na^+) a permis d'isoler le tétrasaccharide **130**. La méthanolyse de tous les groupements acétates est suivie par l'hydrogénolyse des groupes benzyles et carbamate. L'ordre de déprotection est important à cause de la présence du groupement sulfate sur l'unité réductrice, qui est sensible au milieu acide généré par le palladium sur charbon en présence de méthanol. Le tétrasaccharide totalement déprotégé **131**¹⁵⁵ est purifié par colonne chromatographique sur gel de silice et sa structure est vérifiée par RMN ^1H ainsi que par spectrométrie de masse tandem MS/MS, qui nous donne les fragmentations caractéristiques de l'enchaînement des monosaccharides (Schéma 63 et Figure 14).¹⁵⁶

¹⁵⁵ Wang, L. X.; Li, C.; Wang, Q. W.; Hui, Y. Z. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 621-628.

¹⁵⁶ Domon, B.; Costello, C. *Glycoconjugate J.* **1988**, 5, 397-409.



Conditions réactionnelles : a) NH_4F (0,5 M dans MeOH, 5 éq.), reflux, 12 h ; b) (i) $\text{SO}_3 \cdot \text{pyridine}$ (3 éq.), DMF, TA, 48 h ; (ii) Dowex[®] 50 (Na^+), MeOH, 53% (2 étapes) ; c) MeONa (1 M dans MeOH, 2 éq.), MeOH, TA, 16 h ; d) H_2 , Pd(C) (10%), EtOAc/ H_2O / EtOH (1 : 1 : 0,1), TA, 12 jours, 48% (2 étapes).

Schéma 63

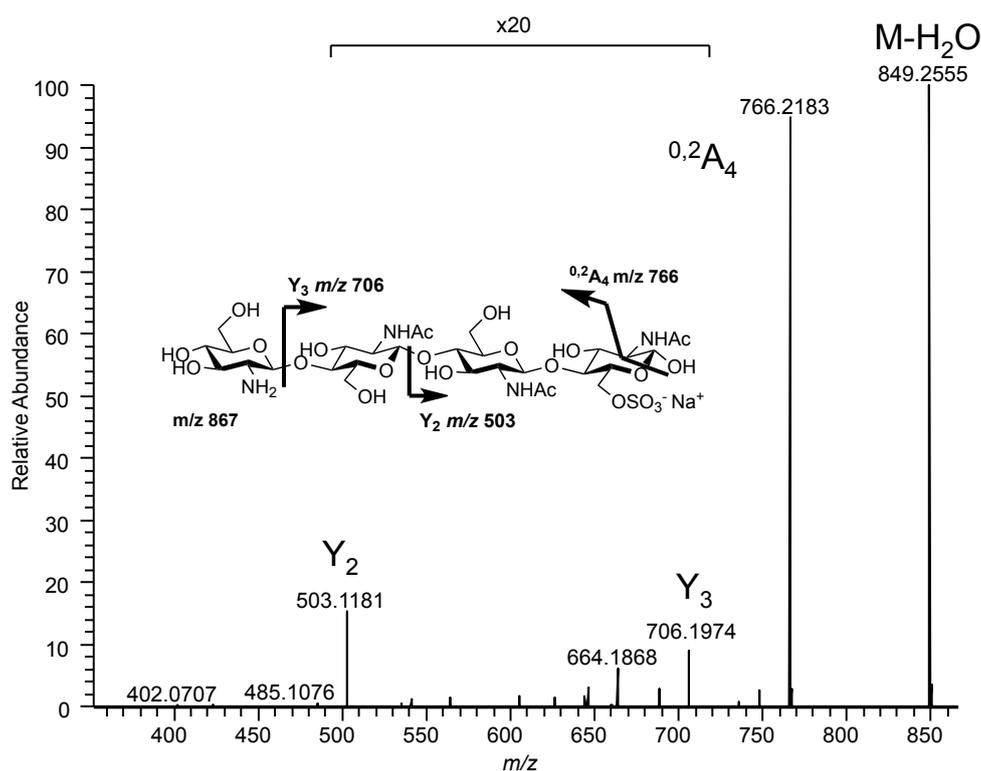
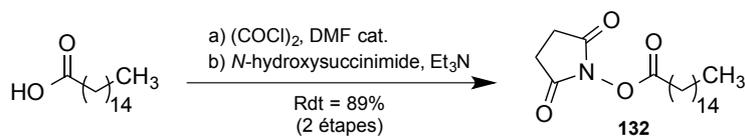


Figure 14 : spectre MS/MS de 131 en mode négatif

La dernière étape de la synthèse est l'acylation sélective sur l'amine libre de l'unité non réductrice. Les premiers essais ont été effectués avec l'ester succinique **132** synthétisé au préalable au laboratoire¹⁵⁷ (Schéma 64) en présence de triéthylamine (Schéma 65).¹⁵⁸

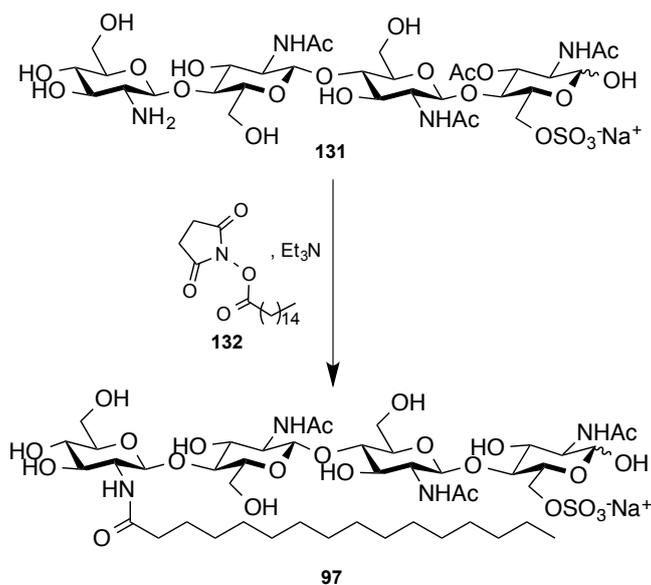


Conditions réactionnelles : a) (COCl)₂ (2 M dans CH₂Cl₂, 14 éq.), DMF cat., CH₂Cl₂, TA, 2 h, quant. ; b) *N*-hydroxysuccinimide (1,5 éq.), Et₃N, THF, TA, 1 h, 89%.

Schéma 64

¹⁵⁷ Thèse G. San Jose, Université Paris Sud, Orsay 2006-2009.

¹⁵⁸ (a) Vaughan, M. D.; Johnson, K.; DeFrees, S.; Tang, X.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6300-6301. ; (b) Swamy, N.; Ray, R. *Bioorg. Chem.* **2008**, *36*, 165-168.



Conditions réactionnelles : **132** (1,2 éq.), Et₃N (1,8 éq.), DMSO, 60 °C, 72 h.

Schéma 65

Lorsque nous avons effectué les études par spectrométrie de masse tandem MS/MS, un ion à $m/z = 849,2532$ était présent sur le spectre, ce qui correspond à la β -élimination de la chaîne lipidique (Figure 15). Cette élimination est la preuve que l'addition de la chaîne n'a pas été sélective et qu'elle s'est aussi additionnée sur des fonctions hydroxy libres. D'après la littérature, la fragmentation de l'amide ne serait pas observée et prouverait l'obtention du facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97**.⁵

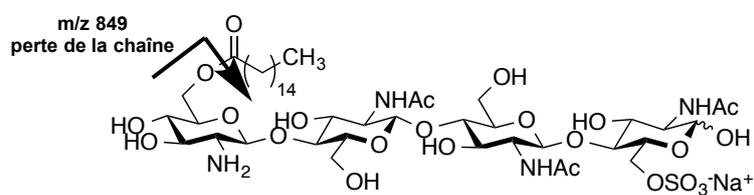
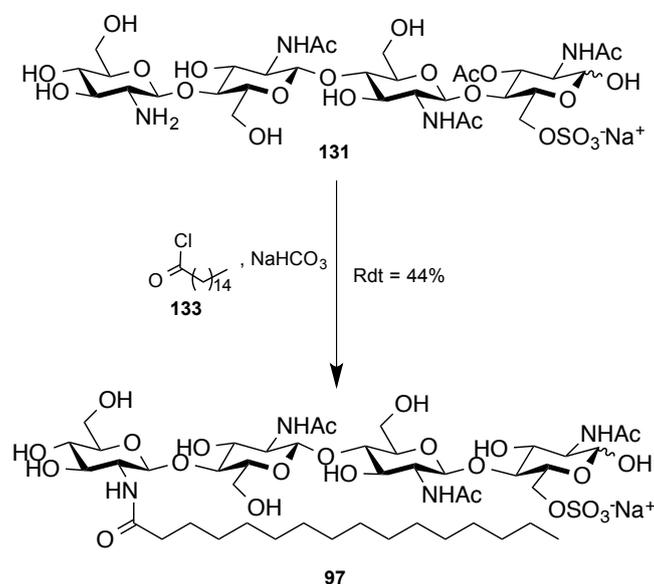


Figure 15 : ion fragment en cas de O-acylation

Nous avons donc tenté d'autres conditions et nous avons pu obtenir le composé souhaité en utilisant des conditions de type Schotten-Baumann.¹²⁵ L'acylation a été effectuée grâce au chlorure de palmitoyle **133** en excès en présence de NaHCO₃ en chauffant à 40°C.

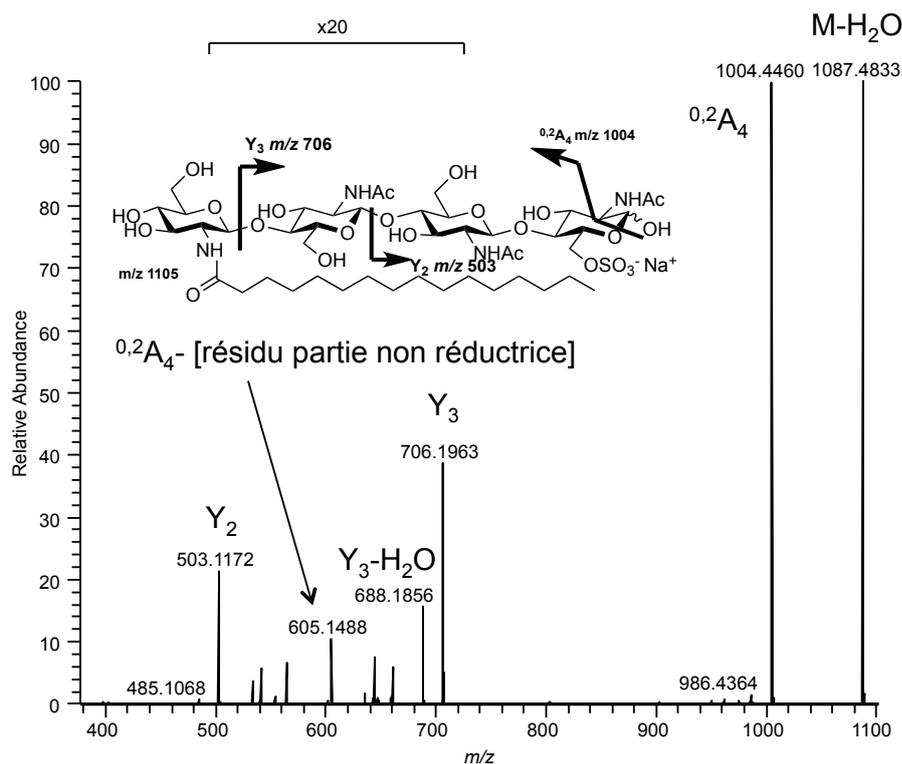
Nous avons pu isoler le facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97** après une colonne chromatographique sur silice et une colonne d'exclusion stérique Sephadex G-25 avec un rendement de 44% (Schéma 66).¹²⁴



Conditions réactionnelles : **133** (6 éq.), NaHCO₃, DMF/THF/H₂O (5 : 3 : 2), 40 °C, 48 h, 44%.

Schéma 66

Les études par spectrométrie de masse tandem MS/MS ont à nouveau été effectuées afin de confirmer la structure de la molécule. Le résultat obtenu montre que toutes les fragmentations observées correspondent bien aux résultats de la littérature du produit naturel isolé en 2011 par l'équipe de Dénarié.⁵ De plus, la sélectivité de l'acylation est prouvée par l'absence de l'ion $m/z = 849,2532$ sur le spectre MS/MS correspondant à la β -élimination de la chaîne lipidique, visible seulement dans le cas des fonctions esters (Figure 16).¹⁴¹

Figure 16 : spectre MS/MS de **97** en mode négatif

III.C. Conclusion

Nous avons effectué la synthèse totale d'un lipo-chitooligosaccharide naturel, le facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97**, en utilisant des procédures de glycosylations 1,2-*trans* développées par l'équipe de Beau lors de la synthèse de facteurs de nodulation. Les donneurs utilisés sont les trichloroacétimidates de glycosyle et les thioglycosides, donneurs très employés en glycochimie. Un des avantages de notre synthèse est la préparation de nos thioglycosides à partir d'un thiol non odorant et peu toxique, le MbpSH **5** qui possède une réactivité comparable au thiophénol généralement employé. De plus, la différenciation des fonctions amines n'a pas été effectuée avec un groupe azido mais grâce à un autre groupe protecteur, le benzyloxycarbonate (Z). Enfin, une nouvelle méthode d'ouverture oxydante d'acétal de benzylidène par le DMDO, mise au point au laboratoire, a été utilisée afin d'accéder à de nouveaux accepteurs. La synthèse d'analogues de ce type de LCOs est

aujourd'hui en cours au laboratoire,¹⁵⁹ afin de tester leur activité sur la croissance des plantes et de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules.

¹⁵⁹ Thèse N. Berthelot, Université Paris Sud, Orsay **2013-2016**.

Chapitre 2

Chapitre 2 : Utilisation de liquides ioniques supportés pour la synthèse d'oligosaccharides

I. Les liquides ioniques

I.A. Définition et historique

L'utilisation notable de liquides ioniques, sels fondus à température ambiante, a commencé dans les années 1980 et s'est notablement accrue depuis les années 2000 (Figure 17).

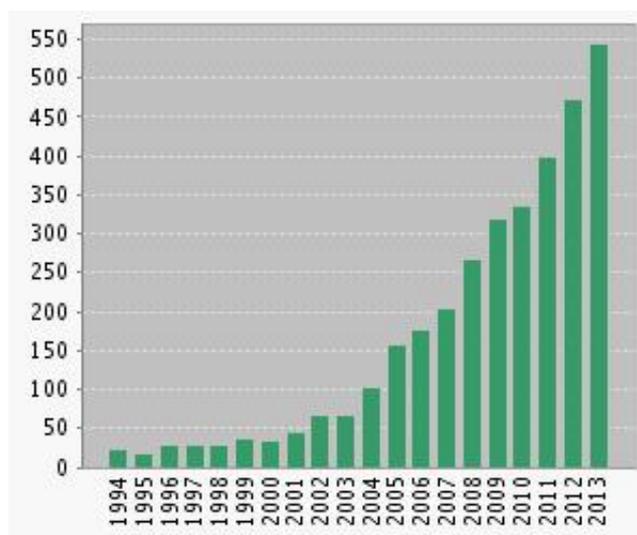


Figure 17 : nombre de publications entre 1994 et 2013 concernant le sujet « ionic liquid support » dans *Web of Science*

Cet engouement de la communauté scientifique pour ces composés est dû à leurs différentes propriétés physico-chimiques qui en ont fait des solvants de choix pour certaines réactions chimiques.

Les liquides ioniques (LIs) sont des molécules chimiques, aussi appelés sels d'oniums, composées d'espèces ioniques possédant une faible température de fusion, généralement

inférieure à 100 °C, arbitrairement fixée en référence à la température d'ébullition de l'eau.¹⁶⁰ Ces composés résultent de l'association d'un cation organique volumineux et d'un anion, organique ou non, de taille variable. Les cations essentiellement utilisés sont les ammoniums, les sulfoniums et les phosphoniums. Depuis leur développement dans les années 1980, les études se sont focalisées sur les LI à base de cations imidazolium et pyridinium. Lorsque ces cations sont associés à un anion chlorure d'aluminate ou halogénure, ils sont appelés liquides ioniques de première génération. Ils sont peu utilisés à cause de leur instabilité en présence d'air et d'eau. On peut accéder à d'autres liquides ioniques beaucoup plus stables, à partir de ces LI, par simple échange d'anions. On parle alors de liquides ioniques de seconde génération avec des anions plus élaborés comme le tétrafluoroborate (BF_4^-), l'hexafluorophosphate (PF_6^-), le thiocyanate (SCN^-), le dicyanamidure ($\text{N}(\text{CN})_2^-$), le triflate (OTf), le bis(trifluorométhylsulfonyl) amidure (NTf_2^-) ... (Figure 18).

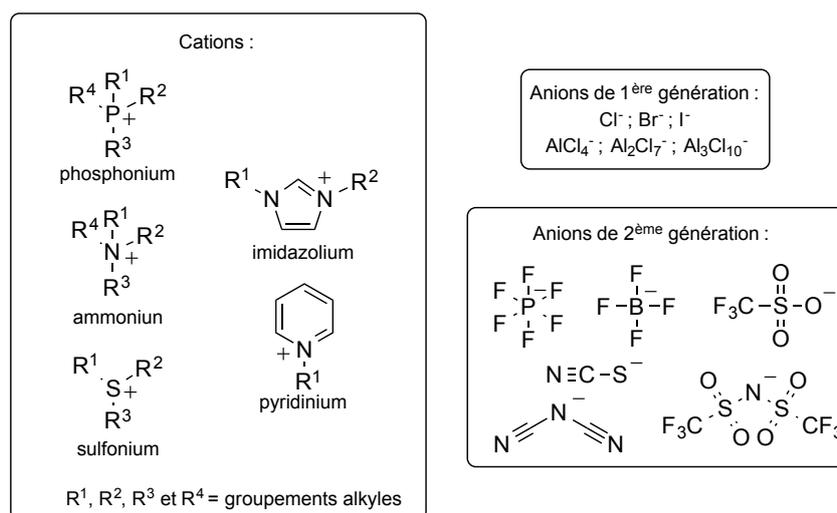


Figure 18 : association des cations et des anions formant les LI de 1^{ère} et 2^{ème} génération

Les propriétés des liquides ioniques sont facilement modulables en fonction de la nature du cation et de l'anion. Depuis les années 2000, une nouvelle gamme de liquide ionique a été synthétisée, on parle de liquides ioniques de 3^{ème} génération ou de liquides ioniques à tâches spécifiques. Dans ce cas, les cations sont fonctionnalisés par des groupements amines,¹⁶¹ alcools ou éthers,¹⁶² acides carboxyliques ou esters,¹⁶³ thiols,¹⁶⁴

¹⁶⁰ Hagiwara, R.; Ito, Y. *J. Fluorine Chem.* **2000**, *105*, 221-227.

¹⁶¹ Gutowski, K. E.; Maginn, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14690-14704.

¹⁶² Luo, H.; Dai, S.; Bonnesen, P. V.; Buchanan, A. C. *J. Alloys Compd.* **2006**, *418*, 195-199.

alcynes,¹⁶⁵ nitrile...¹⁶⁶ Des cations chiraux ont aussi été synthétisés afin d'être utilisés en catalyse asymétrique.¹⁶⁷ Un travail sur la nature de l'anion a aussi été fait, l'utilisation d'anions chiraux,¹⁶⁸ de bases de Lewis¹⁶⁹ ou de sels métalliques¹⁷⁰ peut être envisagée en fonction des propriétés recherchées.

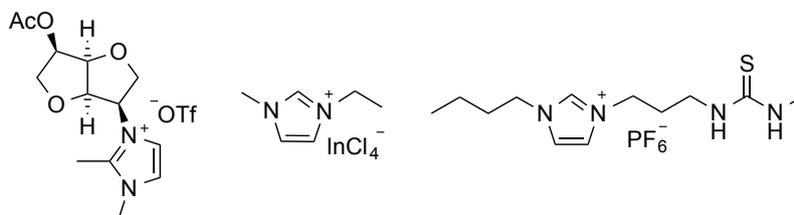


Figure 19 : exemples de liquides ioniques de 3^{ème} génération

Afin de mieux comprendre cette évolution entre les différentes générations de liquides ioniques, il faut s'intéresser aux premières synthèses de ces composés. Le premier liquide ionique recensé date du XIX^{ème} siècle, il provient d'une réaction entre le chlorométhane et le benzène catalysée par le chlorure d'aluminium AlCl_3 et son aspect est une huile rouge. Lorsque l'usage de la RMN est devenu plus courant, Atwood¹⁷¹ a identifié la structure de ce composé comme étant un sel dont le cation se trouvait être l'intermédiaire stable de la réaction de Friedel-Crafts appelé « complexe sigma ». La structure de cette huile rouge, s'est avérée être un sel d'heptachlorodialuminate (Figure 20).

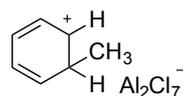


Figure 20 :complexe sigma

¹⁶³ Tseng, M. C.; Tseng, M. J.; Chu, Y. H. *Chem. Comm.* **2009**, 7503-7505.

¹⁶⁴ Itoh, H.; Naka, K.; Chujo, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3026-3027.

¹⁶⁵ Fei, Z.; Zhao, D.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. *Organometallics* **2004**, *23*, 1622-1628.

¹⁶⁶ Zhao, D.; Fei, Z.; Geldbach, T. J.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15876-15882.

¹⁶⁷ Nguyen Van Buu, O.; Aupoix, A.; Vo-Thanh, G. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2260-2265.

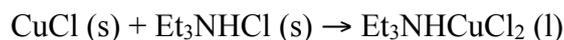
¹⁶⁸ Fukumoto, K.; Ohno, H. *Chem. Comm.* **2006**, 3081-3083.

¹⁶⁹ MacFarlane, D. R.; Pringle, J. M.; Johansson, K. M.; Forsyth, S. A.; Forsyth, M. *Chem. Comm.* **2006**, 1905-1917.

¹⁷⁰ Kim, Y. J.; Varma, R. S. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7882-7891.

¹⁷¹ Wilkes, J. S. *Green Chem.* **2002**, *4*, 73-80.

C'est ensuite en 1914 que Walden synthétisa le nitrate d'éthylammonium ($\text{EtNH}_3^+\text{NO}_3^-$) par réaction de l'éthylamine avec l'acide nitrique concentré.¹⁷² Composé d'une paire cation/anion et possédant une température de fusion de seulement 12 °C, le nitrate d'éthylammonium est considéré aujourd'hui comme le premier liquide ionique connu dans la littérature. Il a fallu attendre les années 60 pour avoir d'autres publications sur les liquides ioniques. Yoke a mis en évidence l'obtention d'un liquide à température ambiante par un mélange de cuivre (CuCl) et de chlorure de triéthylammonium (Et_3NHCl), tous les deux solides.¹⁷³



A cette époque, l'US Air Force s'intéressait beaucoup à ces nouveaux sels liquides à température ambiante et à leurs propriétés électrochimiques. En effet, l'armée Américaine souhaitait améliorer les caractéristiques de ses batteries thermiques fonctionnant avec des électrolytes à base de sels fondus haute température (375 °C – 550 °C) tels que LiCl-KCl. Pour remédier à ce problème de trop haute température, Hurley a développé des systèmes alcalins de chloroaluminates ($\text{NaCl}/\text{AlCl}_3$) dont de nombreuses propriétés physico-chimiques ont été déterminées (densité, viscosité, conductivité électrique, électrochimie, pression de vapeur...). L'utilisation des liquides ioniques a débuté à cette époque en tant qu'électrolyte de batterie avec par exemple des électrodes d'aluminium et de chlore et comme électrolyte un mélange bromure d'éthylpyridinium/ AlCl_3 (1 : 2).¹⁷⁴ En 1978, King synthétisa de nouveaux liquides ioniques avec des cations hétérocycliques et possédant un azote quaternaire et des anions chlorures.¹⁷⁵ Cependant, ces liquides ioniques dits de « première génération » sont sensibles à l'air et à l'eau et nécessitent l'utilisation d'une boîte à gants et d'une atmosphère sèche et inerte. En 1990, l'équipe de Zawortko synthétisa des nouveaux sels de tétrafluoroborate, d'hexafluorophosphate, de nitrate, de sulfate et d'acétate par réaction de métathèse de l'halogénure de dialkylimidazolium avec les sels d'argent approprié.¹⁷⁶ Ces nouveaux liquides ioniques de seconde génération, stables vis-à-vis de l'hydrolyse à température ambiante, ont connu à partir de ce moment un réel succès en chimie organique.

¹⁷² Walden, P. *Bull. Acad. Imper. Sci.* **1914**, 405-422.

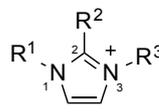
¹⁷³ Yoke, J. T.; Weiss, J. F.; Tollin, G. *Inorg. Chem.* **1963**, 2, 1210-1216.

¹⁷⁴ (a) Hurley, F. H. *US Patent 4 1948*, 446-331. ; (b) Wier, T. P. Jr.; Hurley, F. H. *US Patent 4 1948*, 446-349.

¹⁷⁵ Nardi, J. C.; Hussey, C. L.; King, L. A. *US Patent 4 1978*, 122-245.

¹⁷⁶ Wilkes, J. S.; Zawortko, M. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1992**, 965-967.

Les acronymes généralement utilisés pour les cations imidazolium ($R^1R^2R^3$ -Imidazolium) sont les suivants (Tableau 2):



Nom du cation	R ¹	R ²	R ³	Acronyme
1,3-diméthylimidazolium	CH ₃	H	CH ₃	DMIIm
1-éthyl-3-méthylimidazolium	C ₂ H ₅	H	CH ₃	EMIIm
1-butyl-3-méthylimidazolium	C ₄ H ₉	H	CH ₃	BMIIm
1-hexyl-3-méthylimidazolium	C ₆ H ₁₃	H	CH ₃	HMIIm
1-octyl-3-méthylimidazolium	C ₈ H ₁₇	H	CH ₃	OMIIm

Tableau 2 : acronyme des LIs

Après cette brève introduction sur les liquides ioniques, nous allons voir comment il faut procéder pour les synthétiser.

I.B. Synthèse des liquides ioniques

La synthèse des liquides ioniques procède en deux étapes. La première étape est la quaternisation d'un hétéroatome portant un doublet non liant (azote, phosphore, soufre) et formation de la paire d'ions. La seconde consiste en un échange d'anions afin d'accéder au liquide ionique souhaité, comme nous allons le voir ci-après.

I.B.1. Réaction de quaternisation de l'hétéroatome

L'étape de quaternisation de l'hétéroatome appelée aussi réaction de Menshutkin, consiste en une substitution nucléophile S_N2 sur un halogénure d'alcane (Schéma 67).¹⁷⁷

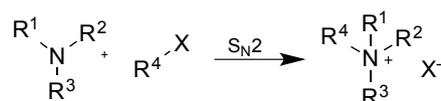


Schéma 67 : quaternisation de l'amine

¹⁷⁷ Menshutkin, N. Z. Physik. Chem. 5 **1890**, 589-600.

Les méthodes de synthèses sont les mêmes que ce soit à partir d'amines,¹⁷⁸ de phosphines¹⁷⁹ ou de sulfonyles.¹⁸⁰ Le temps et la température de réaction varient en fonction des halogénures d'alcane utilisés. Les réactions sont facilitées dans le sens classique des substitutions nucléophiles : chloroalcane < bromoalcane < iodoalcane ; et permettent d'accéder facilement aux liquides ioniques de première génération. La longueur de la chaîne alkyle et l'encombrement stérique de l'hétéroatome à substituer ont une influence sur la réactivité. Généralement, celle-ci décroît avec la longueur de la chaîne. A noter que la réaction est exothermique lorsque l'on manipule des bromoalcane et nécessite donc une grande prudence quand on effectue une synthèse en grande quantité.¹⁷⁸ De plus, l'excès de chaleur peut engendrer une coloration du produit final par dégradation des réactifs n'ayant pas réagi.

Dans de nombreux cas, aucun solvant n'est nécessaire pour effectuer la réaction de quaternisation excepté pour faciliter la séparation du faible excès d'un des réactifs de départ ou dans le cas de longues chaînes alkyles. Les solvants peu polaires et aprotiques sont alors utilisés pour favoriser la réaction de S_N2 : acétonitrile, dichlorométhane, acétone, acétate d'éthyle...etc.

Les seules impuretés généralement détectées en fin de réaction sont les réactifs n'ayant pas réagi. Plusieurs méthodes de traitement sont envisageables : la recristallisation ou le lavage en jouant sur les différences de solubilité entre le produit et les impuretés, l'utilisation de charbon actif pour adsorber les impuretés colorées et l'évaporation sous vide du réactif en excès.

I.B.2. Réaction d'échange d'anions

Afin d'accéder à une plus large gamme de liquides ioniques, à partir des liquides ioniques de première génération, il faut effectuer une réaction d'échange d'anions. Deux processus sont envisageables : le traitement direct des sels d'halogénures par des acides de Lewis ou la métathèse anionique, que nous allons expliquer.

¹⁷⁸ Burrell, A. K.; Sesto, R. E. D.; Baker, S. N.; McCleskey, T. M.; Baker, G. A. *Green Chem.* **2007**, *9*, 449-454.

¹⁷⁹ Bradaric, C. J.; Downard, A.; Kennedy, C.; Robertson, A. J.; Zhou, Y. *Green Chem.* **2003**, *5*, 143-152.

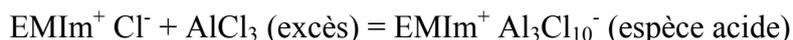
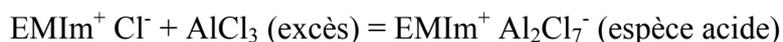
¹⁸⁰ Zhang, Q.; Liu, S.; Li, Z.; Li, J.; Chen, Z.; Wang, R.; Lu, L.; Deng, Y. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 765-778.

I.B.2.a. Traitement par des acides de Lewis

De façon générale, le traitement d'un liquide ionique Q^+X^- (sel d'halogénure quaternaire) avec un acide de Lewis du type MX_n conduit à la formation de plus d'une espèce anionique, selon la proportion relative Q^+X^- et MX_n . On peut illustrer ceci avec un exemple d'équations possibles lorsque l'on fait réagir le chlorure d'1-éthyl-3-méthylimidazolium (EMImCl) avec $AlCl_3$. Quand EMImCl est en excès molaire par rapport à $AlCl_3$, on aura l'équation chimique ci-dessous:



Quand on utilise $AlCl_3$ en excès molaire par rapport à EMImCl, il sera possible de former deux autres liquides ioniques :¹⁸¹



Même si pour effectuer cet échange il suffit de mélanger l'acide de Lewis, l'halogénure d'alcane et le composé avec l'hétéroatome à quaternariser, la réaction est exothermique et présente les inconvénients évoqués précédemment : excès de chaleur possible pouvant colorer le produit et réaction à faire à l'abri d'air et d'eau afin d'éviter l'hydrolyse. Des études sur l'utilisation de méthodes non conventionnelles de synthèse ont montré l'efficacité d'utiliser la chimie de flux dans ce contexte.¹⁸² En effet, celle-ci permet de contrôler plus facilement la température et le mélange réactionnel, ce qui a une influence directe sur le temps de réaction qui est diminué et sur la pureté du produit, aucune coloration n'est aperçue. Cette technologie est utilisée depuis 2007 en industrie et permet de produire plusieurs kilos par jour de liquides ioniques.¹⁸³ Le deuxième procédé utilisé pour effectuer cet échange est la réaction de métathèse anionique.

¹⁸¹ Wilkes, J. S.; Levisky, J. A.; Wilson, R. A.; Hussey, C. L. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 1263-1264.

¹⁸² Bubalo, M. C.; Sabotin, I.; Radoš, I.; Valentinčič, J.; Bosiljkov, T.; Brnčić, M.; Žnidaršič-Plazl, P. *Green Process. Synth.* **2013**, *2*, 579-590.

¹⁸³ Reisinger, A. *Ionics Liquids Today* **2007**, 13-14.

I.B.2.b. Réaction de métathèse anionique

La méthode la plus simple et la plus efficace pour modifier l'anion d'un liquide ionique de première génération repose sur l'échange entre celui-ci et un sel d'ion alcalin ou alcalino-terreux par réaction de métathèse anionique. Les ions vont s'associer par affinité relative selon les règles de la théorie HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*) et les propriétés de solubilité (Schéma 68).

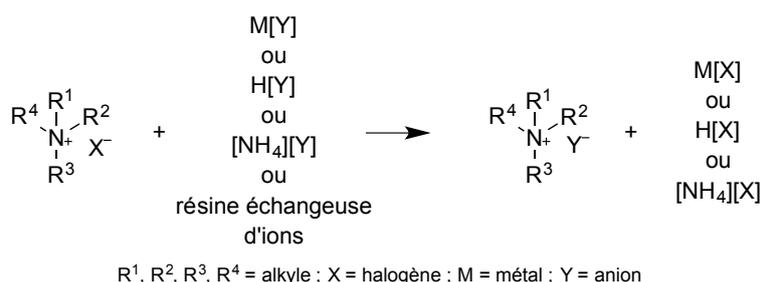


Schéma 68 : métathèse anionique

Lorsque les espèces mises en jeu ont des propriétés physico-chimiques très différentes, cette méthode est très efficace. Or, lorsque l'on a un équilibre avec des espèces structurellement similaires, il faut déplacer l'équilibre dans le sens de formation des produits, et pour cela il est nécessaire de travailler avec un excès d'un des réactifs. Dans le cas des acides, il faut que l'acide introduit soit plus fort que l'acide produit, par exemple pour déplacer un chlorure, il est possible d'utiliser l'acide triflique (pKa = -14,9) qui conduira au triflate contrairement à l'acide acétique (pKa = 4,8) qui ne conduira pas à l'acétate. Une autre méthode permettant d'obtenir de nouveaux liquides ioniques est l'emploi d'une résine échangeuse d'ions.¹⁸⁴ Malgré la grande efficacité de cette méthode, les résines restent coûteuses, elles sont donc utilisées dans des cas particuliers.

Les conditions de réactions et de purifications devront être adaptées en fonction des liquides ioniques manipulés. Si le liquide ionique final est hydrophobe, la métathèse peut se faire dans l'eau car celui-ci se séparera de la phase aqueuse au cours de la réaction. Il pourra

¹⁸⁴ Kagimoto, J.; Noguchi, K.; Murata, K.; Fukumoto, K.; Nakamura, N.; Ohno, H. *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 1026-1027.

être extrait avec le dichlorométhane afin d'optimiser le rendement.¹⁷⁶ Pour les liquides ioniques hydrophiles, la métathèse est généralement réalisée dans un solvant organique et non miscible à l'eau. Après décantation et séparation, la solution est lavée à l'eau afin d'éliminer les sels d'halogénures restants.

Maintenant que nous savons comment former un liquide ionique, il est intéressant de parler de ces propriétés physico-chimiques.

I.C. Propriétés physico-chimiques

Les liquides ioniques présentent de nombreuses propriétés physico-chimiques intéressantes qui sont détaillées ci-dessous et qui font d'eux une classe de solvants très convoitée pour de nombreuses applications. De plus, la possibilité d'ajuster leurs caractéristiques physico-chimiques par variation de la nature de l'anion ou du cation ou bien même de la chaîne alkyle est un atout majeur. La pureté du liquide ionique est un facteur très important pouvant influencer sur ses propriétés physico-chimiques. En effet, la présence de contaminants tels que l'eau et les halogénures peut avoir une influence sur le point de fusion, la viscosité, la densité et la conductivité du liquide ionique comme nous allons l'expliquer par la suite.

I.C.1. Propriétés thermiques

I.C.1.a. Point de fusion

Comme l'indique la définition d'un liquide ionique, ce sont des composés ayant une faible température de fusion, inférieure à la température d'ébullition de l'eau. La pureté et la teneur en eau ont une influence sur celle-ci, d'où les variations pouvant être rencontrées d'une publication à une autre. Le point de fusion dépend de la structure et des interactions entre les ions (symétrie des ions, liaisons H, interactions de Van der Waals...). Sans être une règle générale, la taille du cation, de l'anion et des chaînes alkyles interviennent sur le point de fusion. Plus ils sont volumineux et plus la température est basse. Une exception concerne les

composés à base polycyclique, comme les cations *N*-alkylisoquinolinium (Figure 21) pour lesquels la température de fusion augmente avec la longueur de la chaîne alkyle.¹⁸⁵

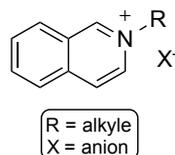


Figure 21 : exemples LIs à base polycyclique

I.C.1.b. Température de décomposition

Les liquides ioniques possèdent une faible tension de vapeur et sont donc peu sujets à l'évaporation. De ce fait, leur température maximale d'utilisation est donnée par la température de décomposition. A squelette organique identique, c'est essentiellement la nature du contre anion qui détermine cette décomposition. Les anions engendrant les plus faibles interactions intermoléculaires induisent les températures de décomposition les plus élevées, avec l'ordre : $\text{PF}_6^- > \text{Tf}_2\text{N}^- > \text{BF}_4^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$. Les cations imidazoliums ont des températures de décomposition supérieures à celle des cations ammoniums permettant leur utilisation à des températures supérieures à 250 °C et dans certains cas à 400 °C.¹⁸⁶ La présence d'impuretés peut influencer sur la reproductibilité de ces mesures, en agissant comme des catalyseurs dans les réactions de décomposition, mais en règle générale les liquides ioniques ont une grande stabilité thermique.

I.C.2. Viscosité

La viscosité des liquides ioniques est supérieure à celle des solvants organiques conventionnels. Les valeurs de viscosité des liquides ioniques de type imidazolium à température ambiante vont de 40 à 1000 mPa.s. Nous pouvons comparer ces valeurs à celles de la viscosité de l'eau, l'éthylène glycol et du glycérol à 25 °C, qui sont respectivement : 0,89 mPa.s ; 16,1 mPa.s et 934 mPa.s.¹⁸⁷ La viscosité est déterminée par la capacité à former

¹⁸⁵ Visser, A. E.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D. *Chem. Comm.* **2001**, 2484-2485.

¹⁸⁶ Ngo, H. L.; LeCompte, K.; Hargens, L.; McEwen, A. B. *Thermochim. Acta* **2000**, 357-358, 97-102.

¹⁸⁷ *Handbook of Chemistry and Physics*, 90th Ed., Lide, D. R., Ed. CRC Press, Boca Raton, **2009**.

des liaisons hydrogènes et par la force des interactions de Van der Waals. On a une augmentation de la viscosité avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle. Pour un même cation, la viscosité évolue dans le sens : $\text{Cl}^- > \text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- > \text{Tf}_2\text{N}^-$. La viscosité est liée à l'interaction électrostatique, celle-ci diminue quand les ions sont volumineux ou ont une charge délocalisée.

I.C.3. Densité

Les liquides ioniques étant composés d'ions, la plupart d'entre eux sont plus denses que l'eau, de 1,0 à 1,6 g.cm⁻³. Dans le cas des cations imidazoliums, la densité diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle augmente.¹⁸⁸ Pour un cation donné, la densité augmente avec la masse molaire de l'anion. Tous ces effets semblent liés à l'encombrement du cation et de l'anion mais aucune règle empirique n'existe à ce jour.

I.C.4. Solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques

Le caractère hydrophile ou hydrophobe d'un liquide ionique est un paramètre important et va dépendre du couple cation/anion utilisé. On peut classer l'hydrophilie des différents cations et anions utilisés pour former les liquides ioniques. En modulant le couple cation/anion, on pourra alors jouer sur ses propriétés physico-chimiques et avoir un liquide ionique plus ou moins soluble en phase aqueuse (Figure 22).

¹⁸⁸ Dzyuba, S. V.; Bartsch, R. A. *Chem. Phys. Chem.* **2002**, 3, 161-166.

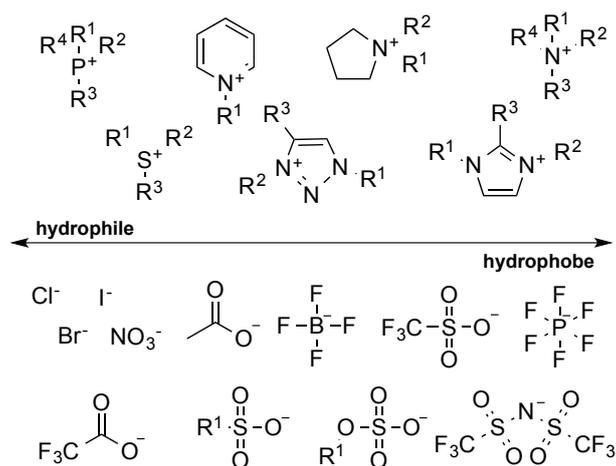


Figure 22 : hydrophilie et hydrophobie des cations / anions

De plus, la plupart des liquides ioniques sont insolubles dans des solvants apolaires. Ils sont miscibles avec tous les solvants dont la constante diélectrique ϵ est supérieure à 7 tels que le chloroforme, le dichlorométhane, l'acétonitrile, les alcools, le THF, l'acétone à l'exception des liquides ioniques halogénés non-miscibles dans l'acétone. Les LIs ne sont pas miscibles avec les alcanes, le dioxane, le toluène et l'éther. L'acétate d'éthyle ($\epsilon = 6,0$) apparaît comme le solvant « frontière ».¹⁸⁹

Les liquides ioniques ont la propriété d'être hygroscopiques, Cammarata *et al.* ont montré que les molécules d'eau absorbées dans les LIs sont à l'état « libre » en interaction par des liaisons hydrogènes.¹⁹⁰ La force des interactions hydrogènes entre l'anion du liquide ionique et l'eau augmente suivant l'ordre $\text{PF}_6^- < \text{BF}_4^- < \text{Tf}_2\text{N}^- < \text{TfO}^- < \text{NO}_3^-$.

Du fait de leur riche variabilité, les liquides ioniques peuvent être utilisés dans divers domaines d'applications.

¹⁸⁹ Bonhôte, P.; Dias, A.-P.; Papageorgiou, N.; Kalyanasundaram, K.; Grätzel, M. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1168-1178.

¹⁹⁰ Cammarata, L.; Kazarian, S. G.; Salter, P. A.; Welton, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 5192-5200.

I.D. Applications des liquides ioniques

Le fait de pouvoir adapter les propriétés physico-chimiques des liquides ioniques en fonction du couple cation/anion est un excellent avantage. On peut alors les retrouver dans des domaines variés comme l'électrochimie,¹⁹¹ la chimie analytique,¹⁹² le génie des procédés¹⁹³ ou bien même la chimie de synthèse et la catalyse¹⁹⁴ (Figure 23).

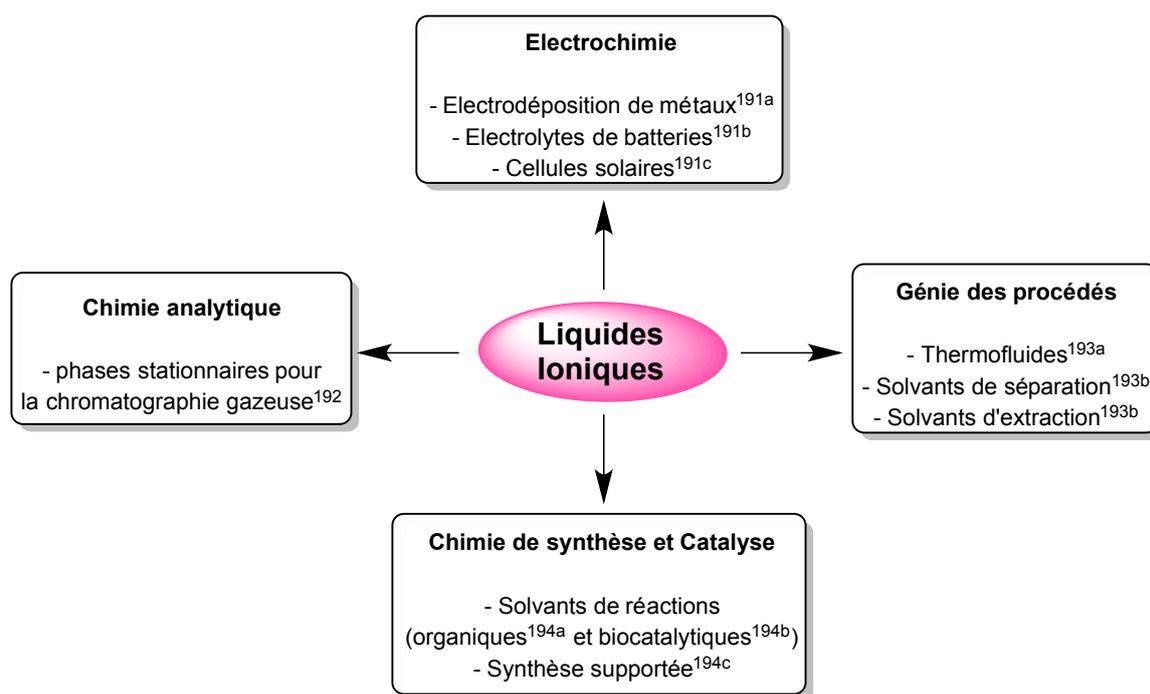


Figure 23

L'application qui nous intéresse ici est celle en glycochimie et plus particulièrement en synthèse organique supportée. Cette alternative aux autres méthodes de synthèses supportées¹⁹⁵ (support solide,¹⁹⁶ polymère soluble,¹⁹⁷ molécules fluorées)¹⁹⁸ connaît un essor

¹⁹¹ (a) Legeai, S.; Diliberto, S.; Stein, N.; Boulanger, C.; Estager, J.; Papaiconomou, N.; Draye, M. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 1661-1664. ; (b) Galiński, M.; Lewandowski, A.; Stepniak, I. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 5567-5580. ; (c) Kawano, R.; Matsui, H.; Matsuyama, C.; Sato, A.; Susan, M. A. B. H.; Tanabe, N.; Watanabe, M. *J. Photochem. Photobiol., A* **2004**, *164*, 87-92.

¹⁹² Koel, M. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2005**, *35*, 177-192.

¹⁹³ (a) Predel, T.; Schlücker, E.; Wasserscheid, P.; Gerhard, D.; Arlt, W. *Chem. Eng. Technol.* **2007**, *30*, 1475-1480. ; (b) Wasserscheid, P.; Jess, A. *Green Chem.* **2004**, *6*, 316-322.

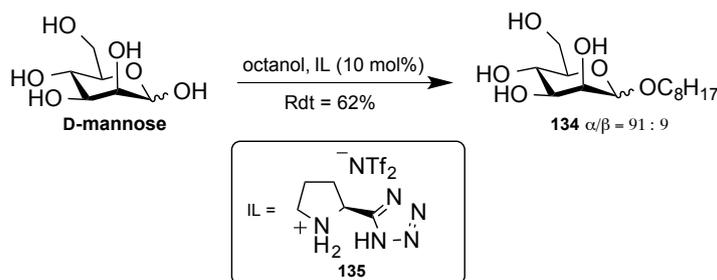
¹⁹⁴ (a) Chowdhury, S.; Mohan, R. S.; Scott, J. L. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2363-2389. ; (b) van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757-2785. ; (c) Pucheault, M.; Vaultier, M. *Topics in Current Chemistry* **2009**, *290*, 83-126

¹⁹⁵ Curran, D. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1174-1196.

¹⁹⁶ Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

depuis quelques années. Nous allons voir par la suite les avantages et inconvénients de ces méthodes dans la synthèse d'oligosaccharides.

Nous pouvons aussi citer l'utilisation des liquides ioniques pour favoriser les réactions de glycosylation.^{199,200} Nous ne nous étendrons pas sur cette application mais il faut savoir qu'une certaine classe de liquides ioniques appelée BAIL pour « *Brønsted Acid Ionic Liquid* » est utilisée comme catalyseurs pour activer les donneurs de glycosyle non protégés et ne possédant pas de groupement partant. Delacroix *et al.* se sont intéressés à l'étude de glycosylation catalysée par ce type de liquides ioniques en milieu aqueux. Ils sont généralement synthétisés à partir de tétrazoles ou d'acides aminés, par exemple le liquide ionique **135** est obtenu à partir de la L-proline qui permet de catalyser la réaction de glycosylation entre le D-mannose et l'octanol afin d'obtenir le monosaccharide **134** avec un rendement de 62% (Schéma 69).¹⁹⁹



Conditions réactionnelles : D-mannose (1 équ.), octanol (5 équ.), H₂O (2 équ.), IL (10 mol%), 80 °C, 24 h, 62%.

Schéma 69 : glycosidation de Fischer utilisant un BAIL

Abordons maintenant la partie sur les nombreuses méthodes de synthèses d'oligosaccharides supportées.

¹⁹⁷ Gravert, D. J.; Janda, K. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 489-510.

¹⁹⁸ Studer, A. S. *Science* **1997**, *275*, 823-826.

¹⁹⁹ Delacroix, S.; Bonnet, J. P.; Courty, M.; Postel, D.; Van Nhien, A. N. *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 12-18.

²⁰⁰ a) Javier Munoz, F.; Andre, S.; Gabius, H.-J.; Sinisterra, J. V.; Hernaiz, M. J.; Linhardt, R. J. *Green Chem.* **2009**, *11*, 373-379. ; b) Auge, J.; Sizun, G. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1179-1183.

II. Synthèses d'oligosaccharides supportées

La première méthode étudiée est la synthèse effectuée sur support solide, plus particulièrement sur résine Merrifield.

II.A. Synthèse sur support solide (résine)

II.A.1. Présentation

Merrifield fut le premier à développer la synthèse sur support solide en 1963.^{201,196} Cette découverte a ensuite connue un succès auprès de la communauté scientifique. Son idée a été de développer une nouvelle méthode de synthèse de peptides utilisant une résine greffée sur un acide aminé afin de pouvoir purifier simplement la chaîne peptidique formée. Un lavage permet d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi et les impuretés puis une filtration permet de récupérer le produit souhaité greffé sur le polymère solide. Etant donné le grand impact de cette méthode pour la synthèse de peptides ou d'oligonucléotides, les glycochimistes se sont intéressés à celle-ci afin de synthétiser plus simplement des oligosaccharides, en simplifiant la purification et n'ayant plus recours à des chromatographies après les étapes de glycosylation.

Afin de mener au mieux la synthèse sur support solide en glycochimie, certains choix sont primordiaux. Tout d'abord il faut choisir si le support solide sera greffé sur l'unité réductrice ou non réductrice du sucre. Le choix de la résine utilisée est lui aussi très important, soit un support constitué de verre à porosité contrôlée dit CPG (*Controlled Pore Glass*), soit un copolymère polystyrène. Les méthodes de glycosylation ainsi que les groupements protecteurs présents sur le sucre doivent être adaptés afin de contrôler la stéréosélectivité et de différencier, si c'est nécessaire, les différentes fonctions présentes. Enfin il faudra sélectionner la méthode analytique la plus adaptée afin de contrôler l'avancement de la réaction.²⁰² Voici quelques exemples de synthèses effectuées dans ce domaine.

²⁰¹ Merrifield, R. B. *Prix Nobel de Chimie 1984* pour « son développement de la méthodologie de la synthèse chimique sur matrice solide. »

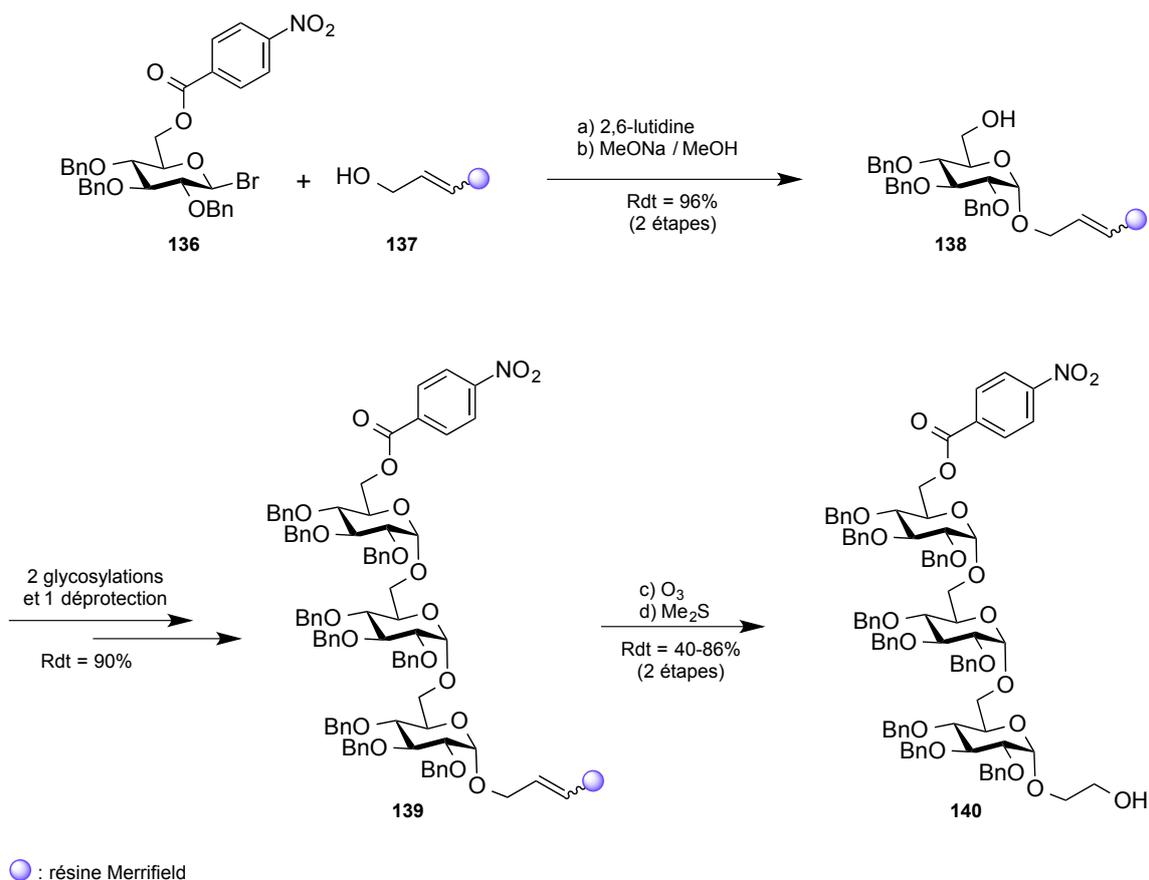
²⁰² Seeberger, P. H.; Haase, W.-C. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349-4394.

II.A.2. Exemples de synthèses d'oligosaccharides

C'est dans le début des années 70 que la première synthèse d'oligosaccharide sur support solide a été effectuée par Fréchet et Schuerch. En effet, ils ont synthétisé des disaccharides et trisaccharides en greffant la résine Merrifield sur la position anomérique de l'accepteur (Schéma 70).²⁰³

La première étape consiste à greffer le support solide **137** sur la position anomérique du monosaccharide **136**. Pour cela, différentes conditions réactionnelles ont été testées par Fréchet et Schuerch. Ils ont montré que la réaction fonctionnait mieux lorsqu'ils utilisent comme base la 2,6-lutidine qui a une meilleure capacité à faire gonfler la résine. De plus, étant une base non nucléophile, elle ne réagit pas directement avec le bromure de glycosyle contrairement à la pyridine utilisée dans d'autres essais.²⁰³ Après la déprotection du groupement 4-nitrobenzoyl, présent en position 6, par l'action de méthanolate de sodium, une autre unité de bromure de glycosyle **136** est mise en réaction dans les mêmes conditions que précédemment afin de former un disaccharide. L'étape de déprotection est répétée puis un nouveau couplage permet d'accéder au trisaccharide **139** avec de très bons rendements (90 % sur trois étapes). L'avancement de la réaction est contrôlé par IR ou par analyses gravimétriques. Tous les sucres comportant la résine sont isolés par simple filtration et les rendements sont aussi évalués par analyses gravimétriques du polymère. Les dernières étapes consistent au clivage du support solide par ozonolyse permettant d'isoler le trisaccharide souhaité **140** avec des rendements compris entre 40 et 86 % à partir de **139**. (Schéma 70).²⁰³

²⁰³ (a) Fréchet, J. M.; Schuerch, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 492-496. ; (b) Fréchet, J. M.; Schuerch, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 604-609. ; (c) Fréchet, J. M.; Schuerch, C. *Carbohydr. Res.* **1972**, *22*, 399-412.



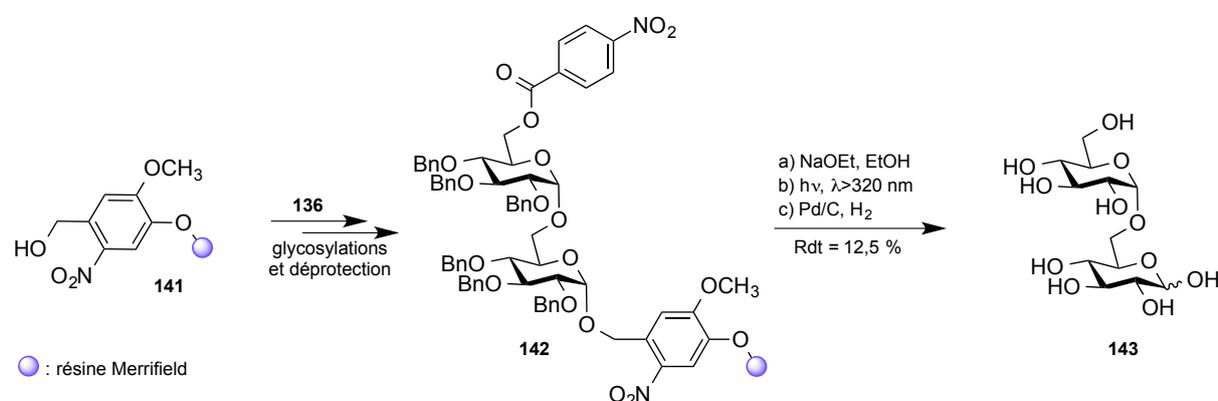
Conditions réactionnelles : a) **136** (3,5 éq.), **137** (1 éq.), 2,6-lutidine (1,5 éq.), benzène, 65 °C, 2 à 4 jours, 96%.
 b) MeONa cat., THF/MeOH (7 : 3), reflux, 90 min, quant. ; glycosylations et déprotections (cf. a) et b)) ; c)
 CH₂Cl₂, O₃, -78 °C, 2 h, 51 à 91% ; d) Me₂S, CH₂Cl₂, MeOH, -78 °C, 1 h, 79 à 95%.

Schéma 70

Diverses synthèses ont ensuite été réalisées par d'autres groupes avec des liens entre l'unité saccharidique et le support solide différents. Par exemple, en 1973 le groupe de Zehavi²⁰⁴ a utilisé un lien photolabile pour effectuer le greffage. Les premières étapes sont similaires au cas précédent, le support solide **141** est greffé sur la position anomérique du bromure de glycosyle **136** par réaction de glycosylation et après déprotection du 4-nitrobenzyle, une nouvelle réaction de glycosylation permet d'accéder au disaccharide **142** avec un rendement de 90%. La déprotection totale du disaccharide est effectuée par saponification du 4-nitrobenzyle, photolyse du groupement photolabile puis hydrogénolyse

²⁰⁴ Zehavi, U.; Patchornik, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5673-5677.

des groupements benzyles, permettant d'isoler l'isomaltose **143** avec un rendement de 12,5% sur les 3 étapes (Schéma 71).

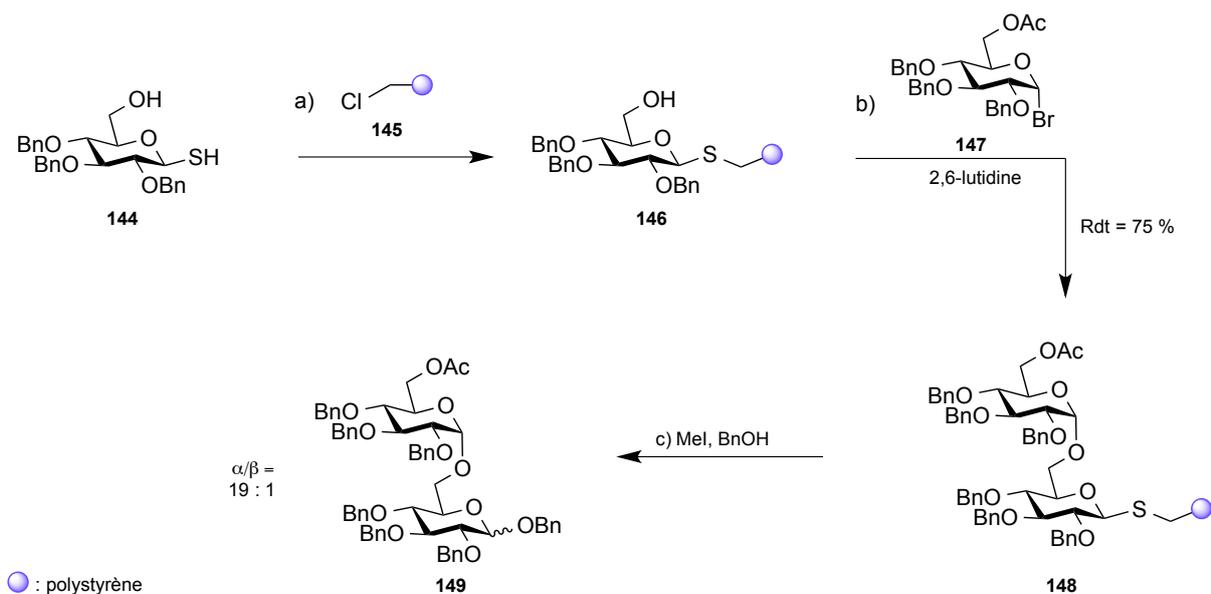


Conditions réactionnelles : glycosylations et déprotections : accepteur (1 éq.), donneur (2,5 à 5 éq.), pyridine, benzène, 80 °C, 40 h. ; NaOEt/EtOH (0,2 M ; 2 : 1), dioxane, tube scellé, 18 h. a) NaOEt/EtOH (0,2 M ; 2 : 1), dioxane, tube scellé, 18 h ; b) hv, $\lambda > 320$ nm, dioxane, 32 h. ; c) Pd/C 10%, H₂, 1 goutte d'AcOH, H₂O, TA, 18 h, 12,5% (3 étapes).

Schéma 71

L'utilisation d'un lien thioglycosidique entre la position anomérique du sucre et la résine a été décrite par Anderson en 1976.²⁰⁵ En effet, la liaison entre le monomère et la résine est obtenue après réaction de glycosylation entre un thioglycoside **144** et une résine polystyrène chlorométhylée **145**. Le disaccharide **148** est obtenu après filtration, par réaction de glycosylation entre le bromure de glycosyle **147** et l'accepteur **146**, dans des conditions mises au point par Fréchet et Schuerch.²⁰³ Le clivage de la résine est ensuite effectué en présence d'iodométhane et d'alcool benzylique au reflux du benzène, ce qui permet d'obtenir un mélange α/β du composé **149** (Schéma 72).

²⁰⁵ Shuet-Hing Lee, C.; Anderson, L. *Carbohydr. Res.* **1976**, *50*, 227-238.



Conditions réactionnelles : a) **145** (2 g ; 2,04 mmol, 1 éq.), **144** (990 mg ; 2,12 mmol, 1,04 éq.), MeONa dans MeOH (0,4 M), benzène, TA, 5 jours ; b) **147** (2,4 éq.), 2,6-lutidine (3,1 éq.), benzène, 65 °C, 3 à 5 jours, 75 % ; c) MeI, benzène, BnOH, reflux, 4 à 5 jours.

Schéma 72

Durant cette décennie, d'autres essais ont été effectués. Notamment par Excoffier *et al.* qui ont utilisé un ester comme lien entre l'accepteur **150** et le support solide polystyrène (Schéma 73).²⁰⁶ Ce lien a pu être clivé par réaction de transestérification, l'alcool résultant est alors acétylé permettant d'accéder au disaccharide **154** avec un rendement de 51% à partir de **151**.



Schéma 73

Des liens sucre-résine esters boroniques cycliques ont aussi été introduits sur des composés *cis*-1,2 et *cis*-1,3 diols par Fréchet en 1979 (Schéma 74).²⁰⁷ Le clivage de cette attache est ensuite effectué par une simple hydrolyse.

²⁰⁶ Excoffier, G.; Gagnaire, D.; Utile, J. P.; Vignon, M. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 549-553.

²⁰⁷ Fréchet, J. M.; Nuyens, L. J.; Seymour, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 432-436.

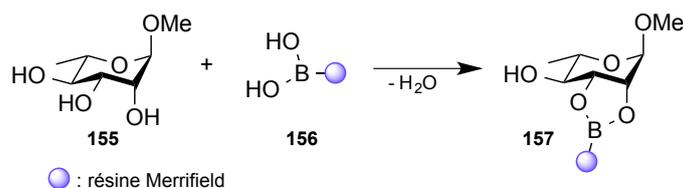


Schéma 74

Des liens assez variés sont donc envisageables pour greffer le support solide au sucre. De façon générale, cette connexion demeure très importante. Il faut que celle-ci soit compatible avec la méthode de glycosylation utilisée, orthogonale aux groupements protecteurs présents sur les différentes positions du sucre, facile d'accès et facilement clivable en fin de synthèse.

Après ce fort succès, un nouveau challenge a été envisagé par la communauté scientifique pour développer une méthode automatisée de synthèse sur support solide d'oligosaccharides, en comparaison aux synthèses en routine déjà connues d'oligonucléotides²⁰⁸ et d'oligopeptides.²⁰⁹ Cette méthode permettrait d'avoir accès facilement, sans purification par chromatographie après chaque étape de glycosylation, à des oligosaccharides dans des quantités de l'ordre du gramme. L'équipe de Seeberger s'est intéressée de près à ce projet.^{202,210} La première synthèse automatisée sur support solide d'oligosaccharide complexe fut réalisée par son équipe en 2001.²¹¹ Ils ont utilisé un appareil servant pour la synthèse peptidique afin de synthétiser l'heptamannoside **161** en 19 h avec un rendement de 42 %, nettement supérieur au 9 % obtenu par synthèse manuelle²¹² (Schéma 75).

²⁰⁸ Caruthers, M. H. *Science* **1985**, *230*, 281.

²⁰⁹ Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid-Phase Peptides Synthesis : A practical Approach*, **1989**, Oxford Univ. Press.

²¹⁰ Seeberger, P. H. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 19-28.

²¹¹ Plante, O. J.; Palmacci, E. R.; Seeberger, P. H. *Science* **2001**, *291*, 1523-1527.

²¹² Andrade, R. B.; Plante, O. J.; Melean, L. G.; Seeberger, P. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1811-1814.

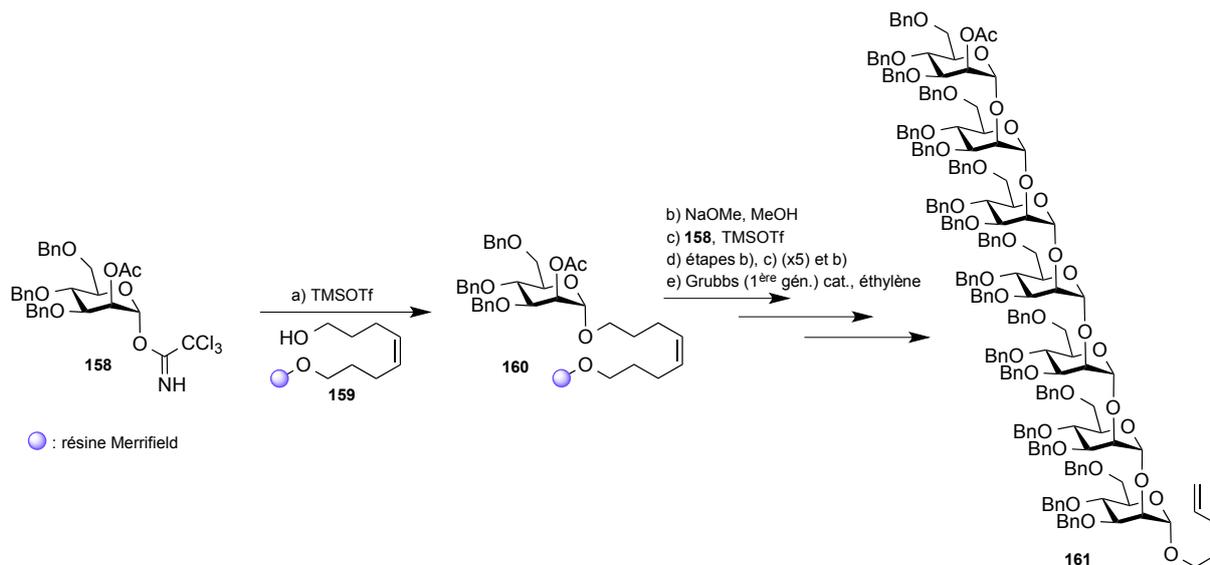


Schéma 75

Pour la synthèse automatisée, le principe est d'utiliser de multiples monosaccharides possédant différents groupes protecteurs dits permanents ou temporaires. Nous pouvons citer les groupements benzyles (Bn), pivaloyles (Piv), acétyles (Ac) comme groupes permanents et 9-fluorénylméthylloxycarbonyles (Fmoc), levulinates (Lev), benzoyles (Bz) et *tert*-butyldiméthylsilyles (TBDMS) comme groupes temporaires, permettant d'accéder à une grande gamme d'oligosaccharides complexes. Les groupes partants présents sur les positions anomériques des donneurs peuvent être des trichloroacétimidates de glycosyle ou des phosphates de glycosyle qui sont tous les deux activés par l'addition de TMSOTf dans le milieu.

L'assemblage des oligosaccharides se fait en deux temps. Dans un premier temps, l'alcool présent sur la chaîne comportant la résine est glycosylé sur la position anomérique du monosaccharide. Une fonction alcool de ce sucre va être libérée afin de l'engager dans une nouvelle réaction de couplage en présence d'un donneur et du promoteur TMSOTf. Le nombre de réaction de couplage est répété autant de fois que souhaité afin d'obtenir l'oligosaccharide attendu. La dernière étape consiste à cliver le support solide et purifier par HPLC le produit souhaité (Schéma 76).²¹¹

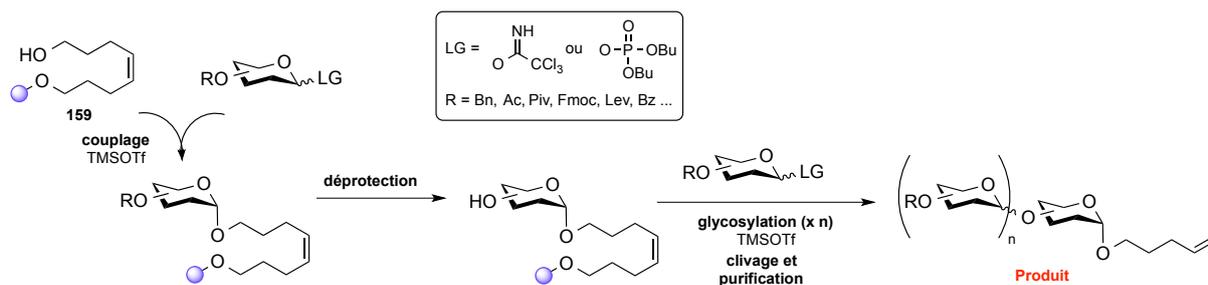


Schéma 76 : principe de la synthèse automatisée d'oligosaccharides

Toutes ces étapes sont gérées par un ordinateur qui va contrôler toutes les conditions opératoires (monosaccharides à injecter, nombre d'équivalents de TMSOTf, nombre de cycles à effectuer, température, temps, réactifs pour les étapes de déprotection...). Même si cette méthode de synthèse présente de nombreux avantages, notamment le gain de temps et les gains de rendement, il existe aussi des désavantages.

Un des premiers freins est le manque de techniques d'analyses précises et rapides lorsque la molécule est encore ancrée sur le support solide à cause de l'hétérogénéité de la réaction. On peut avoir recours à la spectrométrie de masse, notamment à la spectroscopie MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight*) qui consiste à séparer, à l'aide d'un laser, la molécule du support solide. Cette technique nécessite l'utilisation d'un bras photosensible entre la molécule et le support solide. Cette technique très sensible ne nécessite que très peu de matériel mais elle ne permet pas de récupérer l'échantillon et de quantifier les différentes molécules du milieu. Une autre méthode d'analyse est l'Infra Rouge à Transformée de Fourier (IR FT) qui permet de suivre qualitativement une réaction chimique. C'est aussi une méthode sensible qui n'exige que très peu de matériel mais qui reste qualitative. La RMN du ^{13}C permet de déterminer le degré de fonctionnalisation des résines et de suivre les synthèses supportées. La faible sensibilité de cette méthode, due au faible rapport gyromagnétique du ^{13}C et à sa faible abondance naturelle (1,11%), exige des temps d'acquisitions très longs, ce qui limite le suivi de réaction sur le support. De plus, cette méthode ne permet pas d'observer le noyau du proton, omniprésent dans les molécules organiques. Une nouvelle technique RMN non destructrice a été introduite pour l'analyse directe des composés ancrés sur phase solide. Cette méthode basée sur la rotation de l'échantillon à l'angle magique est la RMN HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*). C'est une méthode d'analyse directe et sensible nécessitant aucun traitement

particulier si ce n'est le gonflement de la résine dans un solvant deutéré approprié. La rotation à l'angle magique de l'échantillon permet l'observation directe des noyaux ^1H , ^{13}C , et récemment ^{15}N , avec une résolution proche de la RMN liquide haute résolution.

II.A.3. Conclusion

Même si, comme nous venons de le voir, il existe quelques méthodes permettant d'analyser les réactions sur support solide, cela reste le principal défaut de ces synthèses. De plus, le prix du support est souvent élevé pouvant être de plus de 8000€/kg. Pour pouvoir remédier à ces problèmes une autre méthode de synthèse supportée a été envisagée : la synthèse supportée sur polymère soluble (PEG).

II.B. Synthèse sur support soluble

II.B.1. Polymère soluble : polyéthylène glycol (PEG)

II.B.1.a. Présentation

Les supports solubles ont été choisis afin d'éviter les problèmes rencontrés lors de la synthèse sur support solide tout en gardant leurs avantages. Ce sont des supports souvent linéaires et non branchés au contraire des supports solides et sont solubles dans certains solvants. Une simple filtration du milieu ne sera plus suffisante, il faudra précipiter les supports puis filtrer la solution, ou utiliser des méthodes qui permettent de séparer les molécules en fonction de leur taille (dialyse, chromatographie d'exclusion...).²¹³

Ce type de chimie a été beaucoup développé et étudié au cours des dernières années et a fait l'objet de plusieurs revues.²¹⁴ Le support doit répondre à un cahier des charges assez conséquent, il doit :

- Etre commercial ou simple à synthétiser
- Etre soluble dans le solvant choisi afin de bien solubiliser les molécules étudiées
- Etre stable dans les conditions de synthèse envisagées

²¹³ Geckeler, K. E. *Adv. Polym. Sci.* **1995**, 121, 31

²¹⁴ (a) Gravert, D. J.; Janda, K. D. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 489-510. ; (b) Dickerson, T. J.; Reed, N. N.; Janda, K. D. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 3325-3344.

- Avoir des groupements fonctionnels adaptés pour permettre un greffage simple des molécules
- Permettre le développement d'une méthodologie de synthèse générale indépendante des propriétés physico-chimiques du produit final

Le polymère choisi pour la synthèse sur support soluble résulte d'un compromis entre la capacité de charge du polymère (c'est-à-dire le nombre de sites d'accroches par gramme de polymère) et sa capacité de solubilisation. Généralement, la capacité de solubilisation diminue si la capacité de charge augmente. Si une quantité élevée de molécules est branchée au polymère, les propriétés physico-chimiques du système polymère-molécules branchées sont plus proches de celles de la molécule supportée que de celles du support. Le support le plus utilisé est le polyéthylène glycol (PEG) et ses dérivés. Mais d'autres polymères ont également été employés pour la synthèse sur support soluble : l'alcool polyvinylique, l'oxyde de polyméthylène, la cellulose...²¹⁴

Le polyéthylène glycol est un polyéther obtenu par polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène. Selon le type d'initiateur utilisé, des PEGs avec des substituants différents peuvent être obtenus. Les PEGs les plus utilisés comme supports pour la synthèse possèdent deux hydroxyles terminaux ou un hydroxyle et un éther méthylique mais des méthodes de polymérisation différentes peuvent être étudiées afin d'obtenir d'autres types de substituants terminaux (Figure 24).

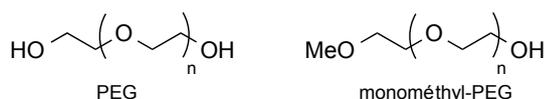


Figure 24

Ce type de support a été utilisé pour la synthèse de molécules complexes telles que des oligosaccharides comme nous allons le décrire.

II.B.1.b. Exemples de synthèses d'oligosaccharides

La première synthèse supportée sur PEG a été effectuée en 1971 par l'équipe de Bayer pour la synthèse d'un pentapeptide²¹⁵ et généralisée en 1991 à la synthèse d'oligosaccharides nécessitant un contrôle stéréochimique pendant la formation de la liaison glycosidique.^{216,217} La première synthèse d'oligosaccharide supportée sur PEG a été décrite en 1991 par Krepinsky.²¹⁶ Le support soluble PEG a été greffé grâce à un lien succinique sur la position 2 ou 3 des monosaccharides (Figure 25).

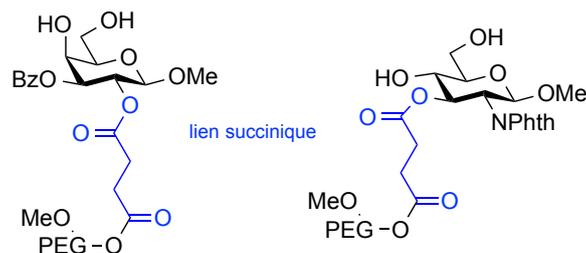


Figure 25

L'inconvénient d'utiliser ce genre de lien est son instabilité en milieu basique, sa migration en milieu acide et la diminution de la réactivité lorsqu'il est greffé en position anomérique.²¹⁸ Pour éviter ces problèmes, la même équipe a utilisé un lien α,α' -dioxyxyle diéther, stable dans des conditions de glycosylation et facilement déprotégeable (Figure 26).

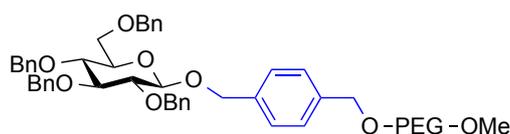


Figure 26

Des synthèses d'oligosaccharides sur support soluble ont ensuite été effectuées par l'équipe de Boons en 2003.²¹⁹ Des études sur la nature du lien utilisé et du support soluble PEG, leurs ont permis de synthétiser une première partie **162** de l'antigène Lewis^x associé aux tumeurs avec un rendement global de 35% en utilisant comme moyen de purification, la

²¹⁵ Bayer, E.; Mütter, M. *Nature* **1972**, *237*, 512-513.

²¹⁶ Douglas, S. P.; Whitfield, D. M.; Krepinsky, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5095-5097.

²¹⁷ Boons, G.-J. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1095-1121.

²¹⁸ Douglas, S. P.; Whitfield, D. M.; Krepinsky, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2116-2117.

²¹⁹ Majumdar, D.; Zhu, T.; Boons, G.-J. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3591-3594.

nanofiltration sur membrane Biomax (Schéma 77). La nanofiltration n'est possible qu'avec un support soluble branché PEG d'une certaine taille. Ici le bPEG-8 a une masse molaire d'environ 40 000 Da et permet d'utiliser cette méthode. En dessous de cette taille, par exemple avec le bPEG-4 (MW = 10 000 Da), les molécules sont purifiées par précipitation dans un solvant de choix tel que le diéthyl éther.

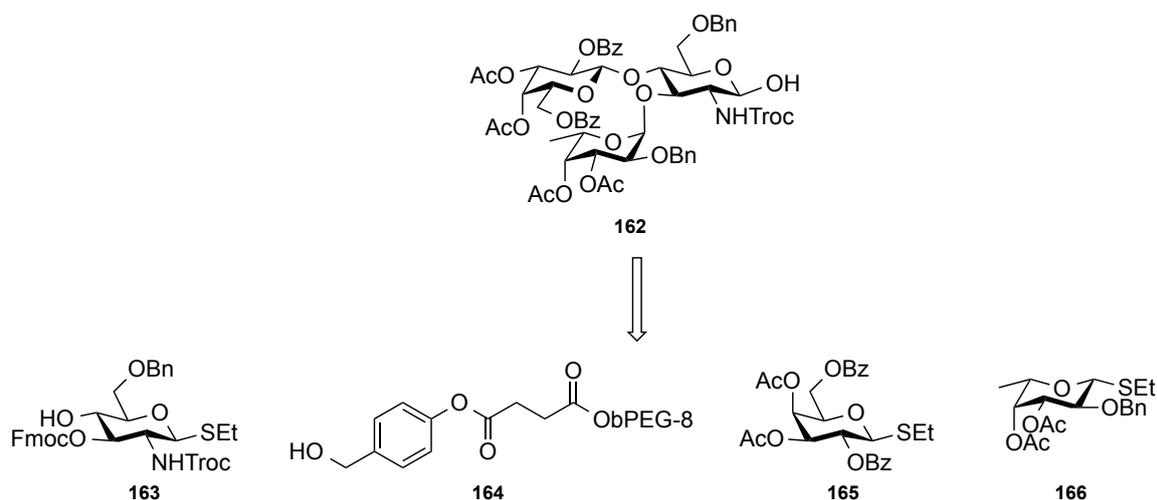
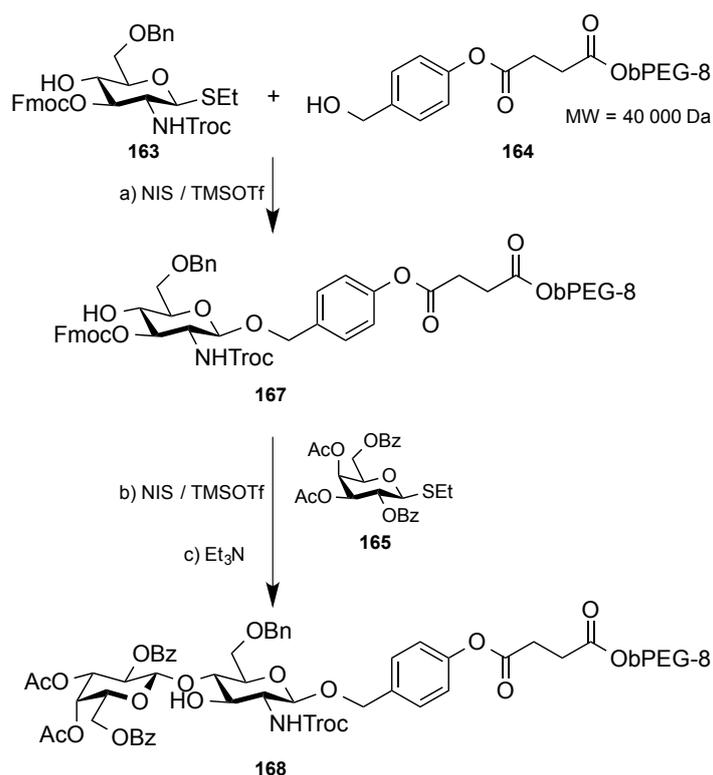


Schéma 77

La première étape consiste à greffer le polymère branché bPEG-8 **164** sur le thioglycoside **163**²²⁰ après activation de celui-ci par le couple de promoteurs NIS/TMSOTf.¹⁰² Le monosaccharide **167** supporté est directement engagé dans une réaction de glycosylation avec le thiogalactoside **165**.²²⁰ Le disaccharide **168** est ensuite isolé par nanofiltration après la déprotection du groupement protecteur Fmoc par la triéthylamine (Schéma 78).²²¹

²²⁰ Zhu, T.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10222-10223.

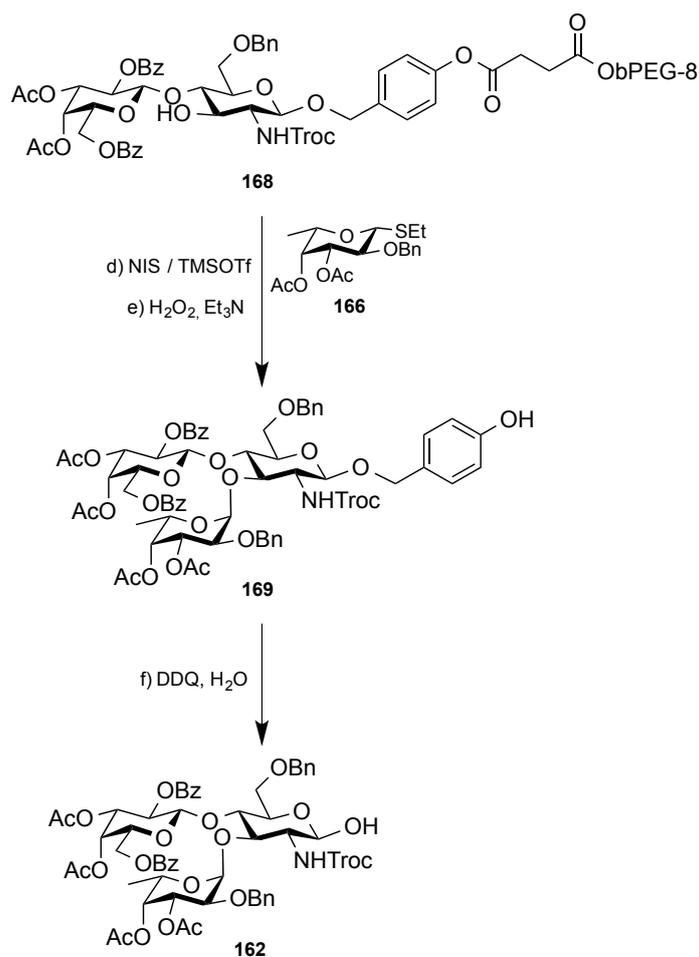
²²¹ Zhu, T.; Boons, G.-J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 199-205.



Conditions réactionnelles : a) **163** (1,5 éq.), **164** (1 éq.), NIS (1,8 éq.), TMSOTf (0,18 éq.), TM 4Å, CH_2Cl_2 ; b) **165** (1,5 éq.), NIS (1,8 éq.), TMSOTf (0,18 éq.), TM 4Å, CH_2Cl_2 , 0 °C, 30 min ; c) Et_3N , CH_2Cl_2 , TA, 18 h.

Schéma 78

Une nouvelle réaction de glycosylation entre le disaccharide **168** et le donneur thiofucoside **166**²²⁰ permet d'obtenir le trisaccharide possédant encore le support soluble. Celui-ci est clivé par hydrolyse de l'ester phénolique en présence de peroxyde d'hydrogène et de triéthylamine. On isole alors le composé **169** avec un rendement global de 35% sans chromatographie après les étapes de glycosylation. La déprotection finale du groupement éther se fait à l'aide de DDQ en présence d'eau dans le dichlorométhane et permet d'accéder à la molécule souhaitée **162** (Schéma 79).



Conditions réactionnelles : d) **166** (1,5 éq.), NIS (1,8 éq.), TMSOTf (0,18 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂ (étape à faire plusieurs fois si la réaction n'est pas totale) ; e) Et₃N, H₂O₂ (50% dans H₂O), THF, TA, 24 h, 35 % (5 étapes) f) DDQ (1,8 éq.), H₂O, CH₂Cl₂, dans le noir, 1 h.

Schéma 79

Des versions chimio-enzymatiques de synthèses d'oligosaccharides sur support soluble ont aussi été effectuées. En 2008, l'équipe de Le Narvor a utilisé le PEG-hexa allylé (Figure 27) pour la synthèse du pentasaccharide Lewis^a 3-sulfaté **170**.²²²

²²² Malleron, A.; Le Narvor, C. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 970-976.

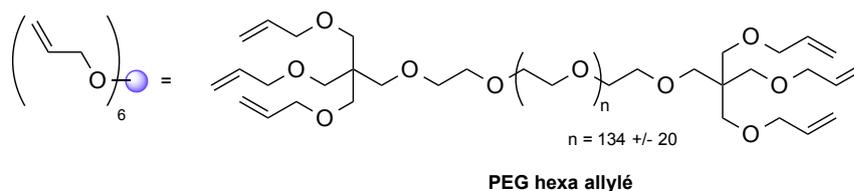


Figure 27 : PEG-hexa allylé

Le pentasaccharide Lewis^a 3-sulfaté **170** est isolé par dialyse après glycosylation enzymatique entre le tétrasaccharide **171** déprotégé et le fucose, suivie du clivage du support soluble. Afin d'obtenir le tétrasaccharide **171**, le groupe a décidé d'adopter une synthèse par bloc, comme évoqué lors du chapitre 1, c'est-à-dire en synthétisant les deux disaccharides **172** et **173** et en effectuant une glycosylation entre ces deux partenaires grâce à l'activation du trichloroacétimide de glycosyle par le $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (Schéma 80).

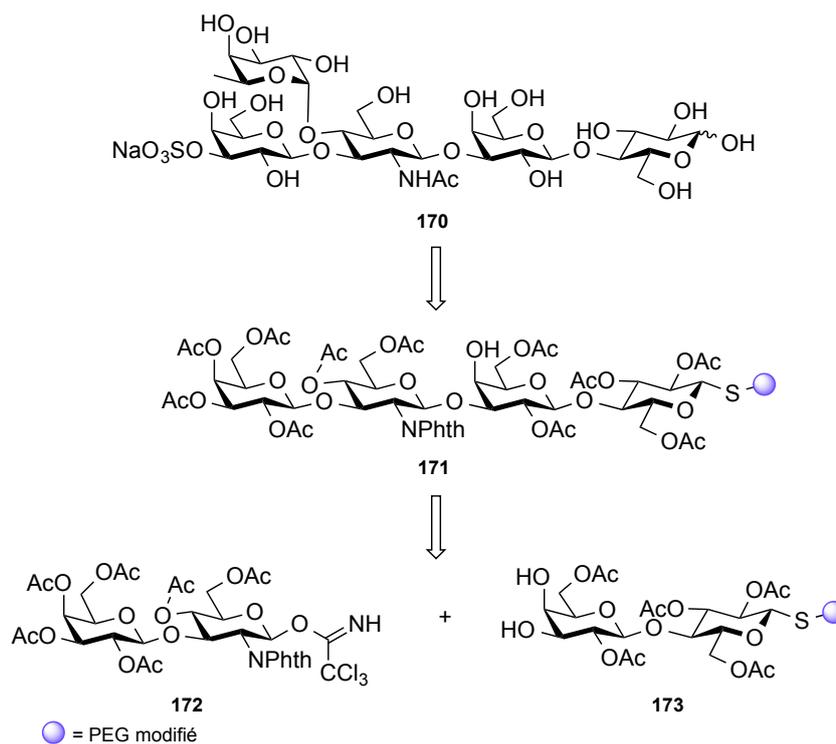
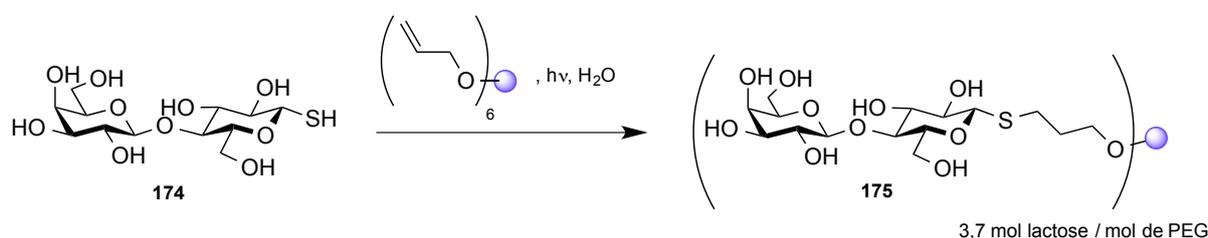


Schéma 80

Afin d'obtenir le disaccharide **173**, il faut en premier temps greffer le PEG hexa allylé sur le thiolactose **174** par couplage radicalaire sous une irradiation UV à 254 nm. La

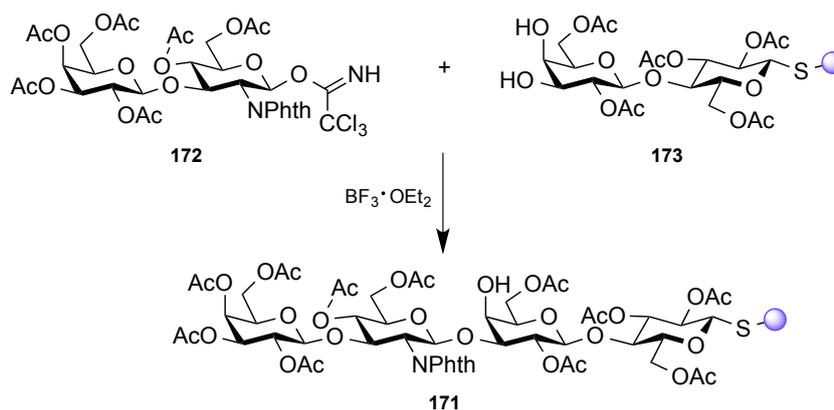
détermination des concentrations en oligosaccharide, utilisant la méthode phénol-acide sulfurique de Dubois,²²³ a montré qu'il y avait 3,7 mol de disaccharide lactose/ mol de PEG soit une concentration de 0,46 mmol/g de support **175** (Schéma 81).



Conditions réactionnelles : **174** (1,3 éq.), PEG hexa allylé (0,03 M dans H₂O), hv (254 nm), H₂O, TA, 10 h.

Schéma 81

Ce disaccharide est ensuite fonctionnalisé afin d'isoler le disaccharide **173** par précipitation avec un rendement de 96%. Il y a ensuite réaction de glycosylation entre le donneur trichloroacétimidate **172** activé par BF₃•OEt₂ et l'accepteur **173**. La β-stéréosélectivité est observée grâce à la présence du groupement encombrant *N*-phatoyle sur la position 2 du donneur. Le tétrasaccharide **171** est isolé par précipitation dans le *tert*-butyl-méthyl-éther (Schéma 82).

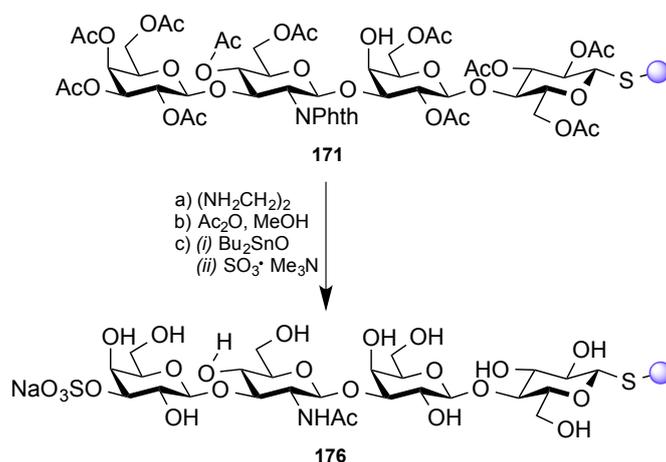


Conditions réactionnelles : **172** (2,3 éq./lactose), **173** (1 éq.), BF₃•OEt₂, CH₂Cl₂, 0 °C, 4 h.

Schéma 82

²²³ a) DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350-356. ; b) Saha, A. K.; Brewer, C. F. *Carbohydr. Res.* **1994**, *254*, 157-167.

Le groupement *N*-phtaloylé ainsi que les groupements *O*-Ac sont déprotégés grâce à l'éthylènediamine. Puis une *N*-acétylation en présence d'anhydride acétique dans le méthanol permet de former le groupement NHAc. Le groupement sulfate est introduit sélectivement sur la position 3 du galactose grâce à une sulfatation dirigée par un stannylène et le tétrasaccharide **176** est isolé par dialyse et lyophilisation (Schéma 83).²²⁴



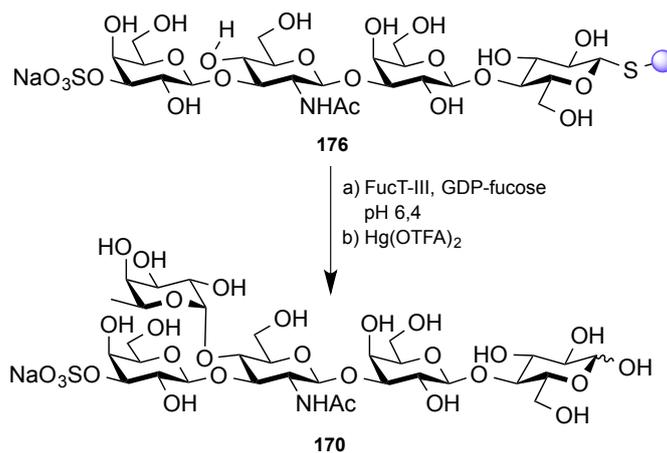
Conditions réactionnelles : a) (NH₂CH₂)₂, EtOH, reflux, 16 h ; b) Ac₂O, MeOH, TA, 3 h, c) (i) Bu₂SnO (1,1 éq.), DMF/benzène (3:5), reflux, 16 h ; (ii) SO₃•Me₃N (1,1 éq.), DMF, TA, 28 h.

Schéma 83

L'étape de glycosylation du fucose sur le tétrasaccharide **176** se fait, dans des conditions enzymatiques, par incubation avec l'enzyme FucT-III recombinante adsorbée sur Ni²⁺-agarose dans un tampon à pH 6,4.²²⁵ Le rendement de cette étape de glycosylation est estimé à 36%. La dernière étape consiste à cliver le support soluble grâce à des sels de mercure, ce qui permet d'isoler le composé **170** par une colonne d'exclusion stérique Sephadex avec un rendement global de 10% à partir de **173** (Schéma 84).

²²⁴ Lubineau, A.; Lemoine, R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8795-8796.

²²⁵ Auge, C.; Malleron, A.; Tahrat, H.; Marc, A.; Goergen, J.-L.; Cerutti, M.; Steelant, W. F. A.; Delannoy, P.; Lubineau, A. *Chem. Comm.* **2000**, 2017-2018.



Conditions réactionnelles : a) GDP-fucose, FucT-III immobilisée, MnCl₂ (20 mM), tampon MES pH 6,4 (25 mM), 37 °C, 3 jours, 36% ; b) Hg(OTFA)₂, H₂O, 55 °C, 16 h.

Schéma 84

II.B.1.c. Conclusion

En règle générale, l'introduction d'un support soluble sur les unités saccharidiques permet d'accéder à des molécules complexes sans avoir recours à des purifications par chromatographies. Le grand avantage, par rapport aux supports solides, est la capacité de pouvoir suivre par RMN, IR ou LC/MS les réactions étant donné que les milieux sont homogènes. Un inconvénient est la mise au point des purifications : le produit souhaité est quelque fois difficile à récupérer et le choix du support soluble ou de la méthode de purification demeure difficile à mettre au point. Une deuxième classe de supports solubles utilisés sont les supports fluorés.

II.B.2. Support Fluoré

II.B.2.a. Présentation et synthèses

D'autres supports solubles peuvent aussi être utilisés comme alternatives aux supports solides. Les supports fluorés ont la propriété d'être solubles dans les solvants fluorés et insolubles dans les autres. Les molécules possédant un support fluoré peuvent donc être séparées des réactifs en excès et impuretés par des lavages avec des solvants organiques

usuels. Ce sont Horváth et Rabái qui ont introduit pour la première fois en 1994, le concept des systèmes diphasiques fluorés.²²⁶ De nombreuses applications de ces systèmes ont été effectuées.²²⁷ Ils ont souvent été appliqués dans la synthèse de petites molécules car leur efficacité est meilleure quand le rapport entre la teneur en fluor du support et la taille de la molécule est élevé.²²⁸ Des équipes se sont ensuite intéressées au développement de support fluoré à haute teneur en fluor pour les utiliser lors des synthèses de molécules plus complexes et notamment d'oligosaccharides (Figure 28).²²⁹

Le support fluoré est greffé sur la position anomérique de l'accepteur après une réaction de glycosylation. Un disaccharide est obtenu dans la phase fluorée après une purification liquide-liquide. L'excès de donneur et les impuretés sont récupérés dans la phase organique. Des déprotections sélectives et une itération de la réaction de glycosylation permettent d'accéder à des oligosaccharides sans purification par chromatographie. L'étape finale est le clivage du support fluoré qui pourra être recyclé dans la phase fluorée (Figure 28).²²⁹ Le principe est similaire aux synthèses sur support solide sauf que nous verrons dans la suite que les réactions sont beaucoup plus faciles à contrôler par des techniques habituelles d'analyses et que la purification se fait par extraction liquide-liquide.

²²⁶ Horvath, I. T. R. J. *Science* **1994**, 266, 72-75.

²²⁷ (a) Curran, D. P. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1649-1653. ; (b) Luo, Z.; Williams, J.; Read, R. W.; Curran, D. P. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4261-4266. ; (c) Rocaboy, C.; Gladysz, J. A. *Org. Lett.* **2002**, 4, 1993-1996.

²²⁸ Zhang, W.; Luo, Z.; Chen, C. H.-T.; Curran, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10443-10450.

²²⁹ Miura, T.; Goto, K.; Hosaka, D.; Inazu, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2047-2051.

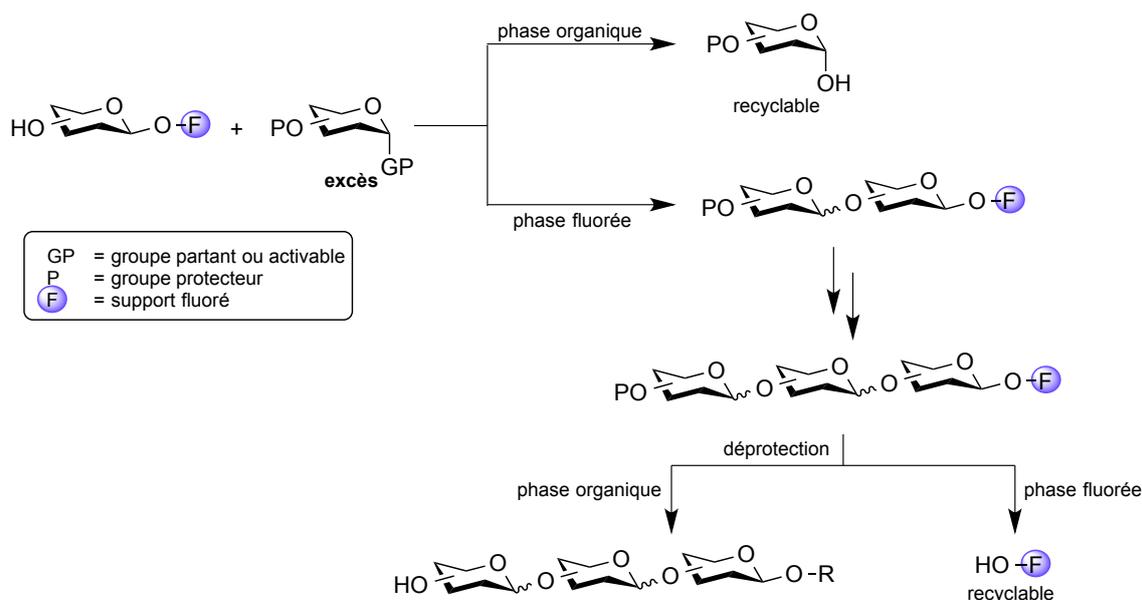


Figure 28 : principe de synthèse d'oligosaccharides sur support fluoré

L'équipe d'Inazu²²⁹ a synthétisé un support fluoré avec une haute teneur en fluor pour optimiser au mieux la purification du produit. Ils ont utilisé le support fluoré Hfb, chaîne hexakisfluorure de type butanoyle (Figure 29). L'utilisation de ce support fluoré a permis de synthétiser rapidement et simplement des oligosaccharides sans avoir recours à des purifications par chromatographie après chaque étape de glycosylation, comme par exemple le trisaccharide **182** (Schéma 85). De plus, les réactions ont pu être suivies par CCM, RMN ou LC/MS contrairement aux synthèses sur support solide.

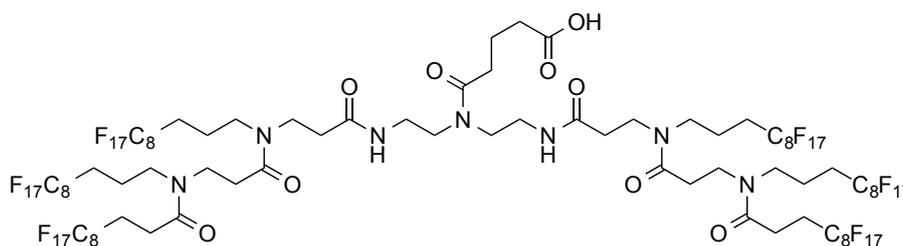
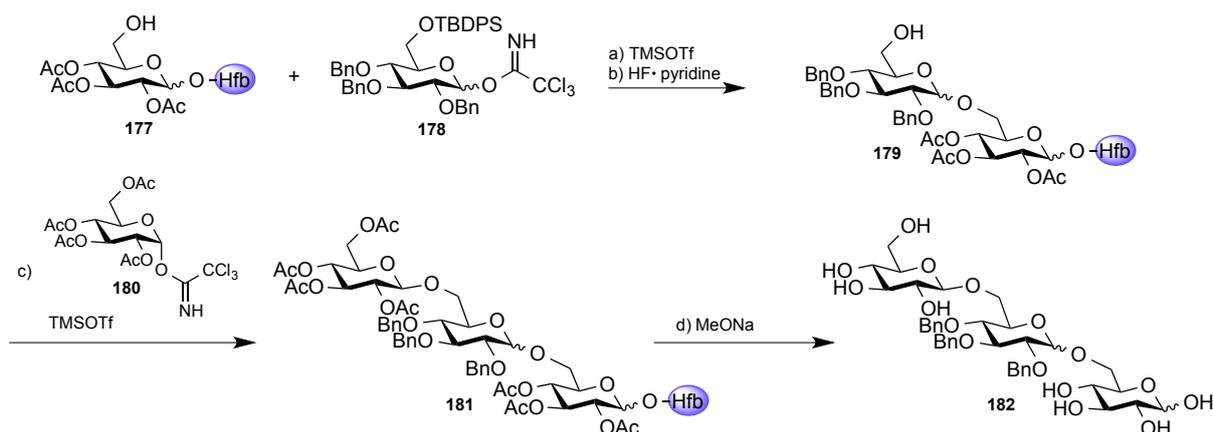


Figure 29 : Hfb-OH

Une réaction de glycosylation entre le donneur trichloroacétimidate **178** et l'accepteur **177** possédant le support fluoré a lieu en présence de TMSOTf dans un mélange biphasique Et₂O/EtOC₄F₉. Le groupement silylé est ensuite déprotégé par une solution de HF•pyridine

dans le THF et le composé **179** est isolé par extraction dans un solvant fluoré, généralement le FC-72 (isomère du perfluorohexane C₆F₁₄). Une nouvelle réaction de glycosylation avec le trichloroacétimide de glycosyle **180**, dans des conditions biphasiques, permet d'obtenir le trisaccharide **181** par extraction liquide-liquide. La désacétylation de **181** et le clivage, dans des conditions basiques, du support fluoré permettent d'isoler, après une purification sur colonne de gel de silice, le trisaccharide **182** avec un rendement global de 42% (Schéma 85).



Conditions réactionnelles : a) **178** (9 éq.), TMSOTf, TM 4Å, Et₂O/EtOC₄F₉, 0 °C, 20 min ; b) HF•pyridine, THF, TA, 22 h ; c) **180** (20 éq.), TMSOTf, TM 4Å, Et₂O/EtOC₄F₉, 0 °C, 20 min ; d) MeONa, EtOC₄F₉, MeOH, TA, 14 h, 42 % (4 étapes).

Schéma 85

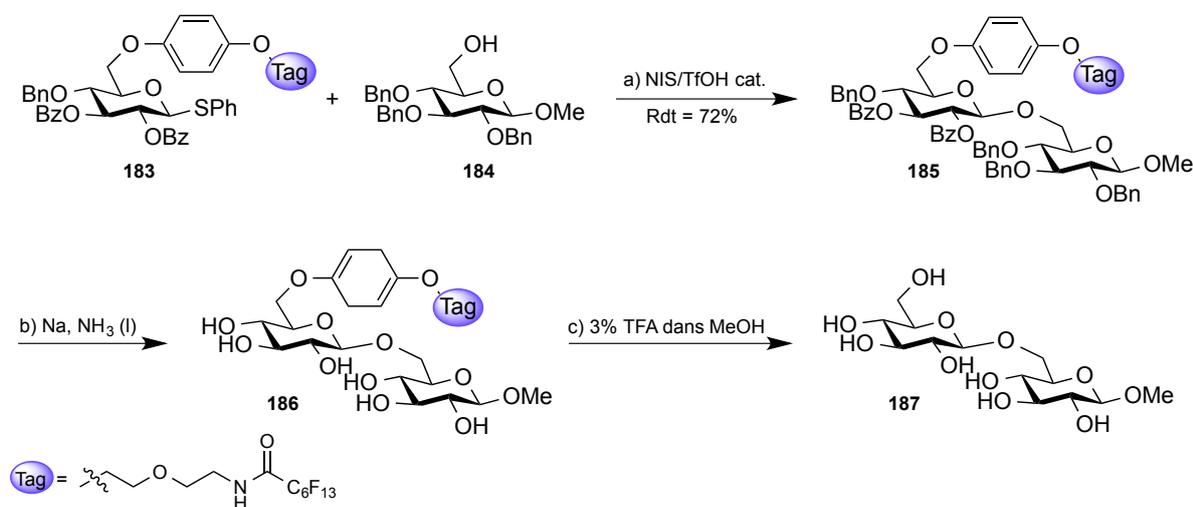
Un inconvénient de cette synthèse est la baisse de réactivité due à la taille du support fluoré. Celui-ci permet de séparer facilement les produits fluorés de ceux non fluorés par ses propriétés physico-chimiques mais il a aussi une mauvaise influence sur l'avancement de la réaction. Pour remédier à ce problème, l'équipe de Curran²³⁰ s'est intéressée à ces supports fluorés et à leur purification. Ils ont montré que la purification par extraction liquide-liquide peut être remplacé par une extraction solide-liquide sur une colonne chromatographique phase inverse de gel de silice fluoré. L'avantage de cette méthode de purification est l'utilisation des supports fluorés de plus petite taille. Des exemples de synthèses avec de petits supports fluorés ont pu être effectués.²³¹

²³⁰ a) Curran, D. P.; Luo, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9069-9072. ; b) Curran, D. P. *Synlett* **2001**, *9*, 1488-1496.

²³¹ Zhang, F.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Curran, D. P.; Liu, G. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2594-2597.

En 2011, l'équipe de Takahashi²³² a synthétisé le disaccharide **187** en utilisant cette méthode (Schéma 86). Ils ont utilisé un lien éther phénolique entre le support fluoré et le sucre car ce lien est stable dans les conditions basiques de déprotections et peut être clivé facilement dans des conditions moyennement acides après une réduction en éther vinylique.

L'activation du donneur **183** par le couple NIS/TfOH permet l'attaque de l'alcool primaire de l'accepteur **184** pour former la liaison glycosidique β du disaccharide **185** isolé par une colonne d'exclusion stérique avec un rendement de 72%. Une réduction de Birch permet de déprotéger les groupements benzoyles et benzyles et de former l'éther vinylique au niveau du bras comportant le support fluoré, ce qui le rend plus facilement clivable. Le disaccharide **186** est séparé grâce à une colonne en phase inverse fluorée, méthode permettant de retenir les composés fluorés et éliminer les autres réactifs ou impuretés. Le disaccharide **186** est traité par de l'acide trifluoroacétique dans le méthanol afin de cliver le support et d'isoler le disaccharide **187** avec un rendement de 67% sur ces deux dernières étapes (Schéma 86).



Conditions réactionnelles : a) **183** (1 éq.), **184** (1,5 éq.), NIS (1,2 éq.), TfOH (0,5 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C, 1 h, 72% ; b) Na, NH₃ (l), EtOH, THF, -50 °C puis reflux 1 h ; c) TFA, MeOH, CH₂Cl₂, TA, 10 min, 67% (2 étapes).

Schéma 86

²³² Tanaka, H.; Tanimoto, Y.; Kawai, T.; Takahashi, T. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 10011-10016.

II.B.2.b. Conclusion

La synthèse fluorée présente de nombreux avantages. L'installation du support fluoré sur la molécule se fait facilement et permet ensuite de purifier avec beaucoup plus d'aisance les différents produits synthétisés. Les réactions peuvent être contrôlées par des méthodes classiques d'analyses tels que la CCM, la RMN ou la LC/MS. En revanche, nous avons vu que la réactivité peut être altérée par la taille du support. Il faut donc en choisir un de façon judicieuse. Un autre inconvénient, bien plus important, est le coût de la réaction et des solvants utilisés pour les purifications. Les produits fluorés présentent le grand désavantage d'être très coûteux, par exemple 2000€/L pour le perfluorohexane (FC-72) souvent utilisé pour les extractions liquide-liquide. C'est dans ce contexte que les liquides ioniques ont trouvé leur place pour les synthèses supportées d'oligosaccharides.

II.B.3. Synthèse avec liquides ioniques supportés

II.B.3.a. Présentation

Cette nouvelle méthode de chimie supportée est apparue récemment et a connu un fort succès. De nombreux composés ont pu être immobilisés sur ces supports ioniques, tels que des catalyseurs, des réactifs ou des substrats.²³³ Comme nous avons pu le voir dans le début de ce deuxième chapitre, ils sont solubles dans des solvants polaires ou des liquides ioniques mais insolubles dans des solvants apolaires. Après la réaction, les espèces supportées sur le liquide ionique sont séparées par précipitation dans un solvant polaire par ajout d'un solvant moins polaire voir apolaire, ou par extraction avec des solvants organiques bien choisis. Les réactifs et catalyseurs supportés peuvent être récupérés et réutilisés avec une petite diminution d'activité. Le principe est représenté sur la Figure 30.²³⁴

²³³ Huo, C.; Chan, T. H. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2977-3006.

²³⁴ Chan, T.; He, X. *Synthesis* **2006**, *2006*, 1645-1651.

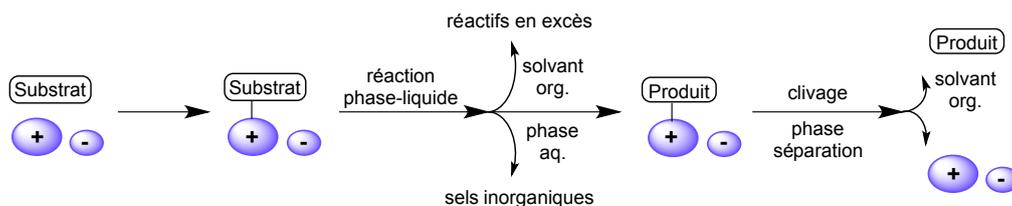
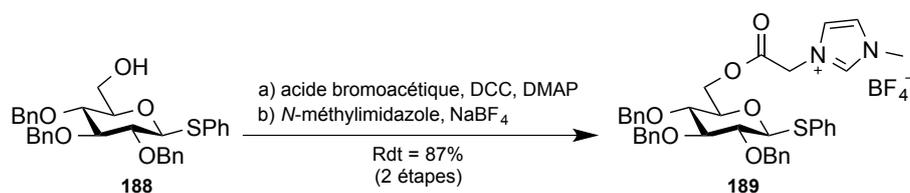


Figure 30 : synthèse utilisant un liquide ionique supporté

Cette méthode a été choisie pour la synthèse de divers biooligomères, tels que des peptides, des oligonucléotides ou des oligosaccharides.²³³

II.B.3.b. Exemples de synthèses d'oligosaccharides

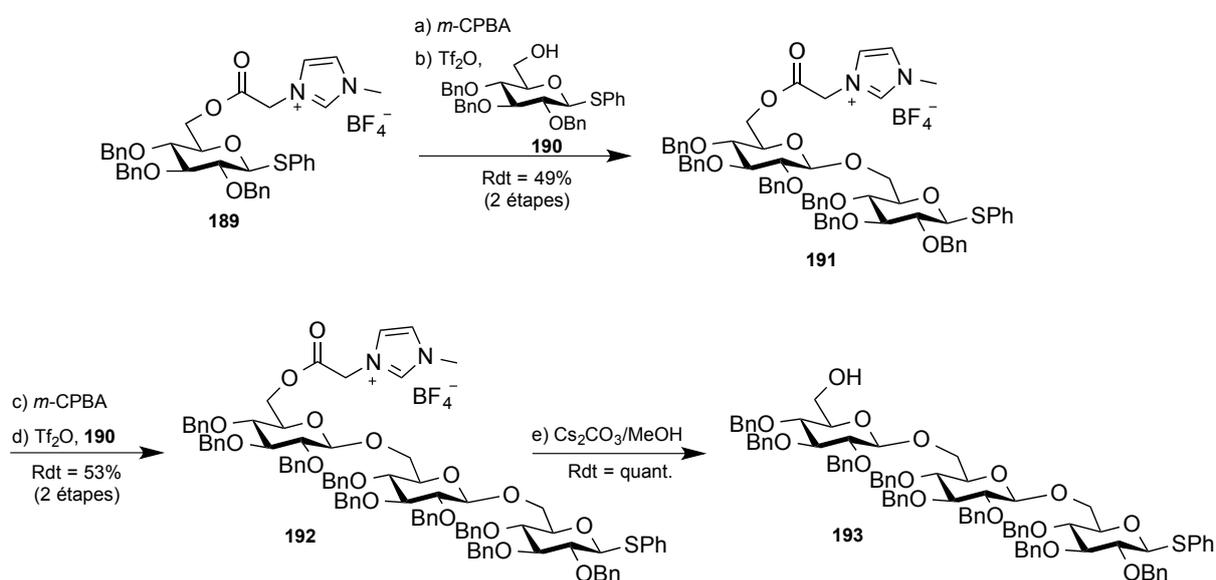
Divers exemples de synthèses d'oligosaccharides ont été effectués ces dernières années en utilisant les liquides ioniques supportés. La première synthèse a été effectuée par Chan en 2006.²³³ Son équipe a synthétisé un trisaccharide avec des liaisons glycosidiques β -1,6, sans avoir recours à des purifications sur colonne chromatographique après chaque étape de glycosylation, grâce aux propriétés du liquide ionique greffé sur la position 6 du donneur de glycosyle **188**. Celui-ci est greffé par acylation de l'acide bromoacétique sur l'alcool primaire en présence de DCC et DMAP. Puis la substitution nucléophile du brome par la *N*-méthylimidazole et l'échange d'anion permet d'accéder à un liquide ionique **189** de seconde génération beaucoup plus stable (Schéma 87).



Conditions réactionnelles : a) **188** (1 éq.), acide bromoacétique (1,2 éq.), DCC (1,0 M dans CH₂Cl₂, 1,2 éq.), DMAP (< 5% éq.), CH₂Cl₂, TA, 2 h, 89% ; b) *N*-méthylimidazole (1,0 M dans CH₂Cl₂, 1,2 éq.), NaBF₄ (1,2 éq.), acétone, TA, 72 h, 98%.

Schéma 87

Une fois le thioglycoside **189** obtenu, il est oxydé pour donner le sulfoxide correspondant qui est mis en réaction avec l'accepteur de glycosyle **190** en présence d'anhydride triflique pour former une liaison glycosidique β -1,6 et donner le disaccharide **191** avec un rendement de 49% sur deux étapes. Ce disaccharide est purifié par des lavages avec du *n*-pentane et de l'isopropyle éther. Il est récupéré après centrifugation. Une nouvelle réaction d'oxydation/glycosylation est effectuée permettant d'obtenir le trisaccharide **192** avec un rendement de 53%, purifié lui-aussi par cette méthode. La dernière étape consiste à cliver le support ionique, par transestérification, en présence de Cs₂CO₃/MeOH, donnant le trisaccharide **193** de manière quantitative (Schéma 88).

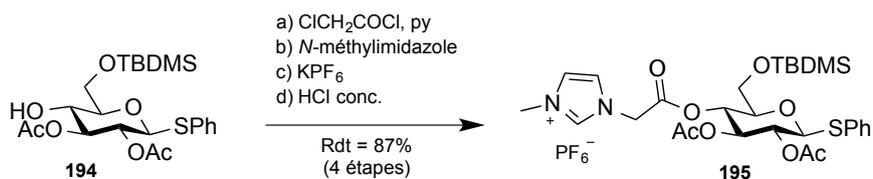


Conditions réactionnelles : a) *m*-CPBA (1 éq.), CH₂Cl₂, -78 °C, 20 min, 97% ; b) **190** (3 éq.), 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylpyridine (4,3 éq.), Tf₂O (1 éq.), CH₂Cl₂, -78 °C à 0 °C, 1 h, 50% ; c) *m*-CPBA (1 éq.), CH₂Cl₂, -78 °C, 20 min, 95% ; d) **190** (3 éq.), 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylpyridine (4,3 éq.), Tf₂O (1 éq.), CH₂Cl₂, -78 °C à 0 °C, 1 h, 56% ; e) Cs₂CO₃ (1 éq.), MeOH, TA, 12 h, quant.

Schéma 88

La même année le groupe de Wang a décrit la synthèse de divers oligosaccharides avec des liaisons glycosidiques β -1,6 ou α -1,6. Ils ont utilisé le même liquide ionique²³⁵ qui est introduit sur l'alcool libre de la position 4 par réaction avec le chlorure de chloroacétyle dans la pyridine suivie du traitement par la *N*-méthylimidazole et échange d'anion.

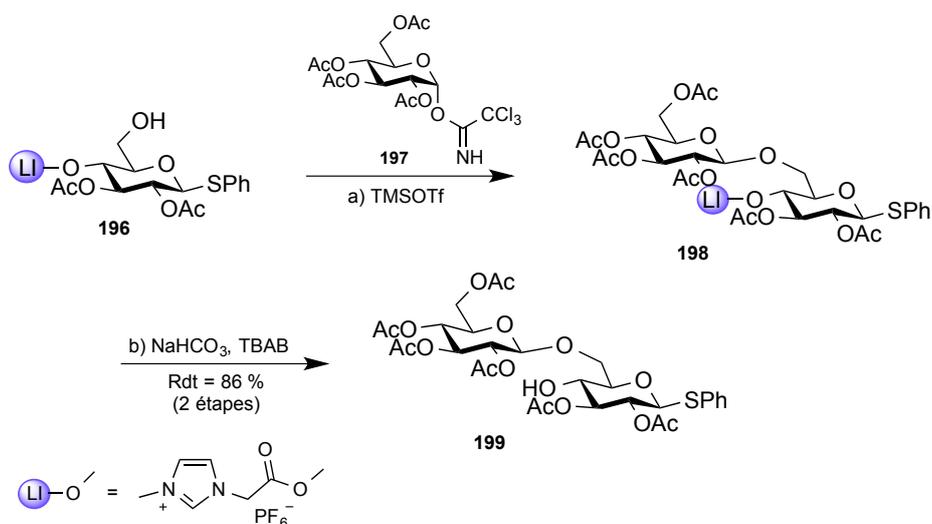
²³⁵ Huang, J. Y.; Lei, M.; Wang, Y. G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3047-3050.



Conditions réactionnelles : a) ClCH_2COCl (1,2 éq.), pyridine (1,5 éq.), CH_2Cl_2 , 0 °C, 30 min, 99% ; b) *N*-méthylimidazole (1 éq.), MeCN, 80 °C, 12 h, 92% ; c) KPF_6 (1 éq.), MeCN, TA, 24 h ; d) HCl conc., THF, 15-30 min, 96%.

Schéma 89

La glycosylation entre le donneur trichloroacétimidate **197** et l'accepteur supporté **196** en présence de TMSOTf permet d'obtenir le disaccharide **198** avec un bon rendement de 92%. Le support ionique est ensuite clivé en présence de solution aqueuse saturée de NaHCO_3 pour donner le composé **199** avec un rendement de 93%.



Conditions réactionnelles : a) **197** (3 éq.), TMSOTf (cat.), TM 4Å, CH_2Cl_2 , -40 °C à 0 °C, 2 h, 92% ; b) NaHCO_3 sat., TBAB, Et_2O , 15 min, 93%.

Schéma 90

D'autres exemples ont ensuite été effectués où les supports ioniques ont été greffés sur diverses positions de l'accepteur ou du donneur de glycosyle. Différentes fonctions ont été testées entre le sucre et le motif imidazolium (Figure 31).^{236,237,238}

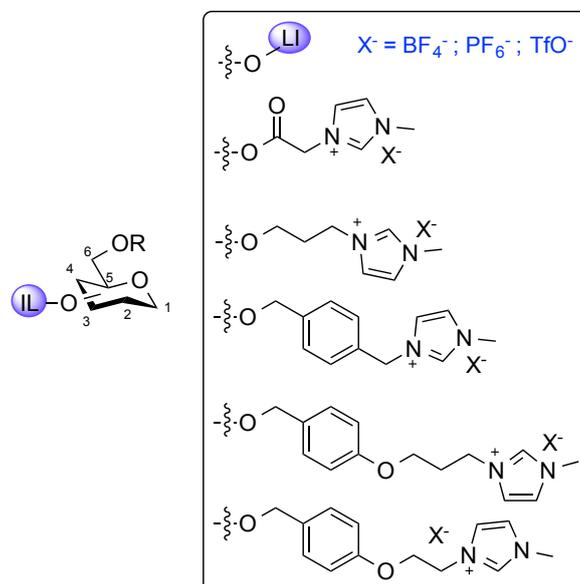


Figure 31

Le bras ne doit pas avoir d'effets sur la réaction, notamment sur la stéréosélectivité et sur la réactivité. Il doit être stable aux conditions opératoires utilisées lors des glycosylations et facilement clivable. Nous avons vu dans les méthodes de synthèses supportées évoquées précédemment, que les liens sous forme éther étaient plus stables que les liens acétyles sensibles aux conditions acides et basiques. Le lien le plus souvent utilisé est l' α,α' -dioxxylyle diéther (Figure 26) qui est très stable et qui peut être déprotégé par hydrogénolyse après les étapes de glycosylations et fonctionnalisations. Généralement, celui-ci est greffé sur la position anomérique de l'accepteur qui est la position la plus éloignée du centre réactif.²³⁹

²³⁶ Yerneni, C. K.; Pathak, V.; Pathak, A. K. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6307-6310.

²³⁷ Ma, Q.; Sun, S.; Meng, X.-B.; Li, Q.; Li, S.-C.; Li, Z.-J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5652-5660.

²³⁸ Tran, A.-T.; Burden, R.; Racys, D. T.; Galan, C. M. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 4526-4528.

²³⁹ Sittel, I.; Tran, A.-T.; Benito-Alifonso, D.; Galan, M. C. *Chem. Comm.* **2013**, *49*, 4217-4219.

Deux types de liens pour les liquides ioniques ont été envisagés ; un lien alkyle ou un lien benzyle (Figure 32).²³⁸

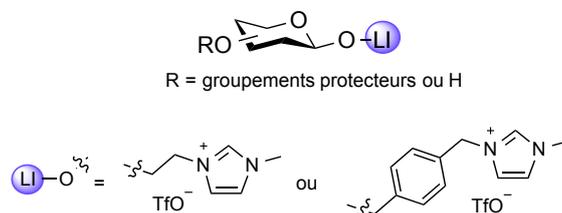
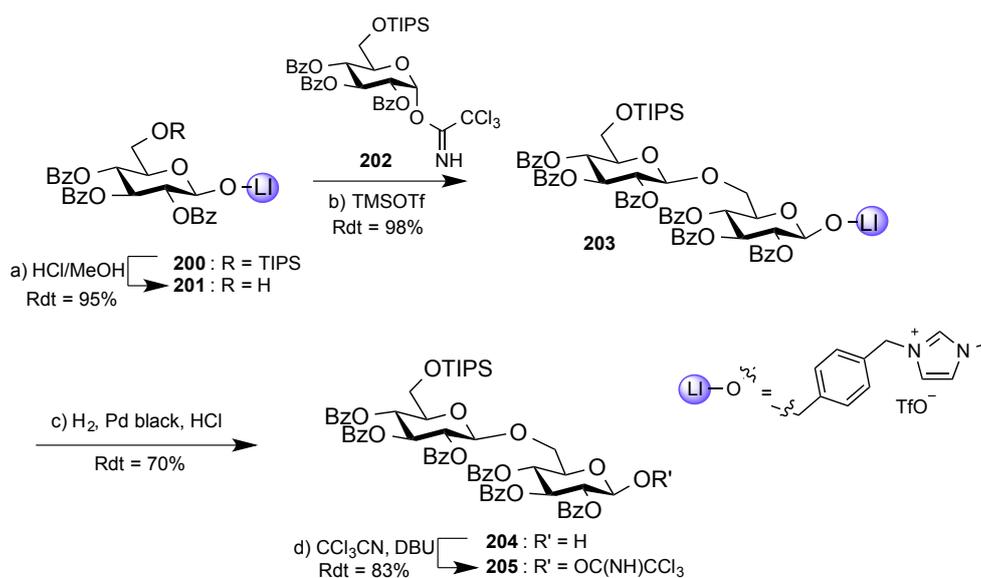


Figure 32

Le liquide ionique est introduit en début de synthèse par glycosylation de l'halogénure d'alcool correspondant puis substitution de l'halogène par la *N*-méthylimidazole. Le squelette saccharidique est construit par itération des réactions de glycosylation puis le support est clivé pour libérer le produit souhaité. Le lien alkyle est clivé par hydrolyse ou méthanolyse donnant l'hémiacétal ou le glycoside méthylé correspondant. Le lien benzyle est clivé par hydrogénolyse pour donner l'hémiacétal. La méthode habituellement choisie est celle avec le lien aromatique qui semble être plus facilement déprotégeable.

Galan *et al.*²³⁹ ont démontré que cette méthode fonctionnait bien en synthétisant des β -1,6 di-, tri- et tétrasaccharides en utilisant des donneurs trichloroacétimidates ou thioglycosides comme nous allons le voir par la suite.

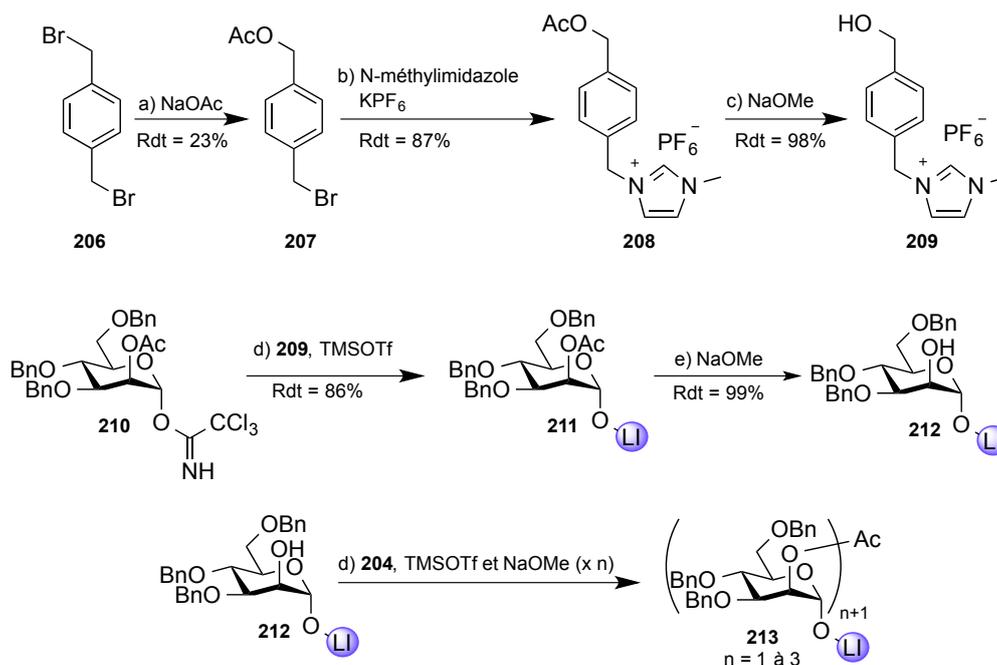
Après déprotection du groupement silylé de l'alcool en position 6 du sucre **200**, la glycosylation entre l'accepteur **201** portant le support ionique en position anomérique et le donneur trichloroacétimidate **202** est effectuée. Le disaccharide **203** supporté est isolé après des lavages avec de l'hexane et du diéthyl éther avec un très bon rendement de 98%. Le support ionique est ensuite clivé par hydrogénolyse en présence de palladium black pour donner l'hémiacétal **204** avec un rendement de 70%, qui peut être transformé en un nouveau donneur trichloroacétimidate **205** après réaction avec le trichloroacétonitrile (Schéma 91).



Conditions réactionnelles : a) HCl (1,25 M dans MeOH, 20 éq.), CH_2Cl_2 , TA, 18 h, 95% ; b) **202** (2 éq.), TM 4Å, TMSOTf (0,3 éq.), CH_2Cl_2 , 0 °C à TA, 12 h, 98% ; c) Pd black, HCOOH/EtOH (0,05 : 1), H_2 , TA, 2 jours, 70% ; d) CCl_3CN (10 éq.), DBU (1 éq.), CH_2Cl_2 , TA, 10 h, 83%.

Schéma 91

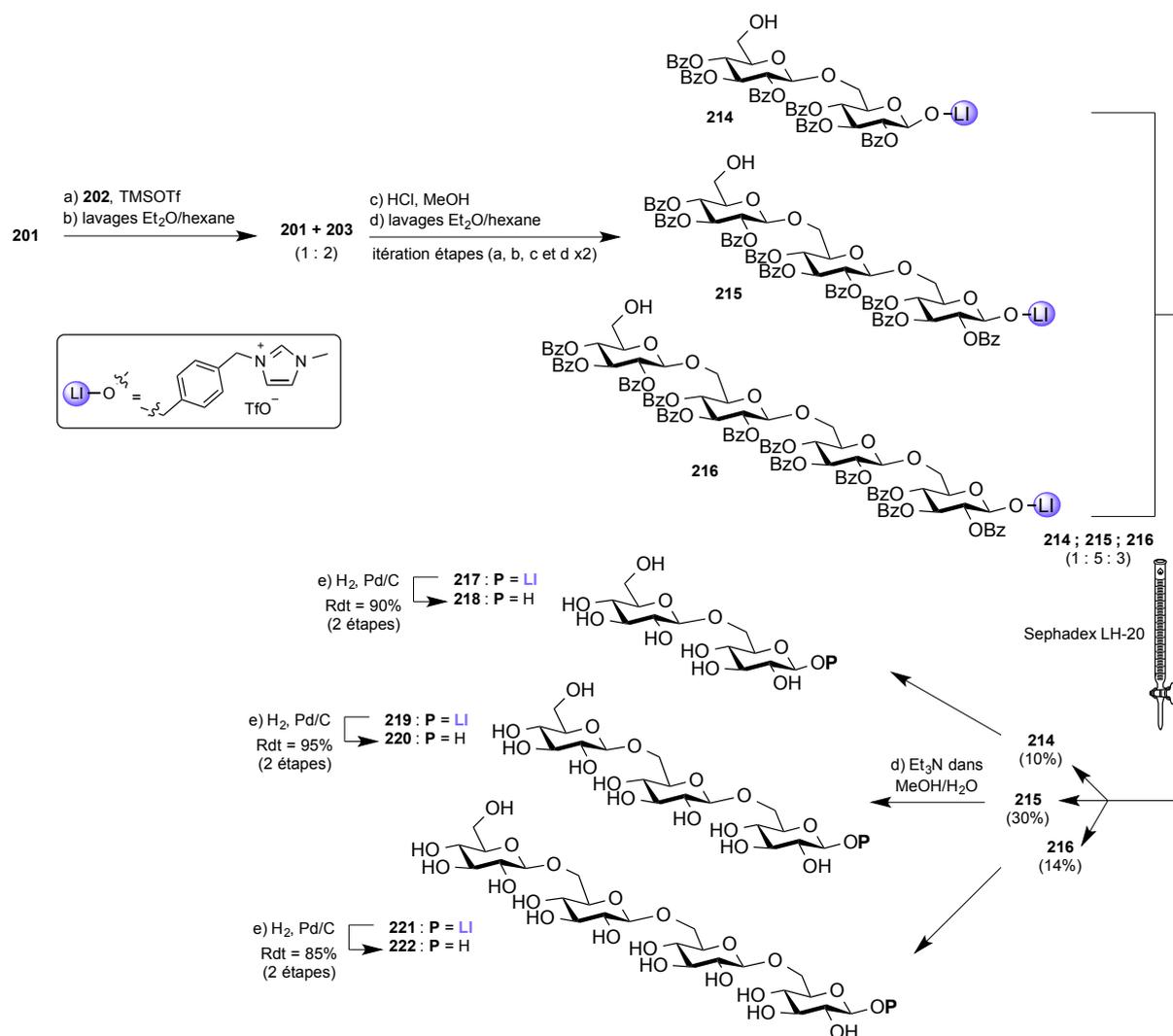
L'équipe de Li a aussi utilisé ce bras entre le sucre et le cation imidazolium pour synthétiser des α -1,2 nonamannoside.²³⁷ Contrairement à l'équipe de Galan qui a synthétisé le support ionique après avoir couplé le bras sur le sucre, ils ont d'abord synthétisé le liquide ionique **209** pour effectuer la glycosylation directe de celui-ci sur le sucre. Cette méthode leur a permis de synthétiser des monosaccharides supportés avec de bons rendements, ici 86% pour le monosaccharide **211**, qui est utilisé pour former des oligosaccharides **213** (Schéma 92).



Conditions réactionnelles : a) **206** (1 éq.), NaOAc (2 éq.), MeCN, reflux, 16 h, 23% ; b) **207** (1 éq.), N-méthylimidazole (2 éq.), KPF₆ (1 éq.), MeCN, reflux, 12 h, 87% ; c) **208** (1 éq.), NaOMe (0,1 M dans MeOH), MeOH, TA, 1 h, 98% ; d) **209** (1 éq.), **210** (2 éq.), TM 4Å, TMSOTf (0,5 éq.), CH₂Cl₂, 0 °C à TA, 30 min, 86%.

Schéma 92

En 2013, l'équipe de Galan a démontré que la stratégie de synthèse d'oligosaccharides utilisant des liquides ioniques supportés, appelée ICROS pour « *Ionic Catch and Release Oligosaccharide Synthesis* », est parfaitement adaptée pour la synthèse combinatoire d'une petite librairie d'oligosaccharides.²³⁹ Leur équipe a développé une méthode de synthèse où les oligosaccharides cibles sont formés en un seul pot, en quelques jours, et sans purification chromatographique sur gel de silice entre les différentes étapes. La préparation d'une série d'oligosaccharides β -1,6 (**217**, **219** et **221**) a permis d'exemplifier cette stratégie. Ils ont suivi les réactions grâce à un système HPLC couplé à un MALDI-TOF et une RMN et ils ont pu séparer les différents oligosaccharides (**214**, **215** et **216**), présents dans le mélange réactionnel après les étapes de glycosylations et déprotections, par colonne chromatographique d'exclusion stérique. Après la séparation de ces trois composés, les groupements benzoyles sont déprotégés en présence de triéthylamine et le liquide ionique est clivé par hydrogénolyse avec des rendements allant de 85% à 95% sur deux étapes (Schéma 93).



Conditions réactionnelles : a) **201** (1 éq.), **202** (2 éq.), TMSOTf (0,2 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, 0 °C à TA, 12 h ; b) lavages (x2) hexane puis hexane/Et₂O (1 : 1) ; c) HCl (1,25 M dans MeOH, 20 éq.), CH₂Cl₂, TA ; d) Et₃N, MeOH/H₂O ; e) Pd/C, H₂, MeOH/H₂O (1 : 1), TA, 18 h.

Schéma 93

II.B.3.c. Conclusion

Au travers de ces exemples, nous avons pu voir que les liquides ioniques sont de bons supports pour faciliter la synthèse d'oligosaccharides. Grâce à leurs propriétés physico-chimiques, les purifications par colonne chromatographique ne sont plus nécessaires après les étapes de glycosylation. De plus, ils sont faciles d'accès et peu coûteux. Ils sont donc des supports de choix pour la synthèse de molécules complexes.

II.C. Conclusion sur les différents supports

Le Tableau 3, comparatif des différentes méthodes de synthèses supportées existantes, explique pourquoi il est intéressant de travailler avec des liquides ioniques supportés.

	Solide (résine)	Polymère soluble (PEG)	Support fluoré	Liquides ioniques
Analyses	HR-MAS RMN, FT-IR	RMN, MS, IR	CCM, RMN, MS	RMN, IR, HPLC, MS
Conditions	Hétérogène (gonflement de la résine)	Homogène	Homogène ou biphasique	Homogène
Purification	Filtration, lavages	Précipitation, filtration, lavages (assez difficile à mettre au point)	Extraction, liquide-liquide, chromatographie sur phase inverse fluorée	Précipitation, filtration, lavages
Prix du support	>8000€/kg	360€/kg	>10000€/kg	80 à 360€/kg

Tableau 3 : comparaison des différents supports utilisés en synthèse supportée

Outre son prix élevé, le principal inconvénient de la synthèse supportée sur résine est la difficulté pour contrôler la réaction due à l'hétérogénéité du milieu. Pour éviter ce problème, les synthèses sur supports solubles ont eu un grand succès car elles sont faciles à analyser. Celles sur polymères solubles présentent beaucoup d'avantages mais néanmoins la mise au point des méthodes de purification reste difficile. La synthèse sur support fluorée est très attractive car le contrôle de la réaction ainsi que les purifications des produits se font assez facilement, mais le prix de ces supports est très excessif ainsi que les solvants fluorés utilisés pour les lavages. Ce sont de nombreuses raisons qui expliquent pourquoi les liquides

ioniques ont un réel succès, depuis quelques années, pour la synthèse de molécules diverses et variées. Ils sont peu coûteux, ils permettent un contrôle facile de la réaction par des techniques d'analyses habituelles et ils facilitent les purifications des produits synthétisés.

Nous avons donc décidé d'utiliser cette nouvelle méthode de synthèse afin de synthétiser des oligomères de *N*-acétyl-D-glucosamine présentant des liaisons glycosidiques β -1,4. En effet, les travaux effectués dans ce domaine ne concernent que des oligosaccharides avec des liaisons α -1,2 ; α -1,6 (en série mannose) et β -1,6, qui sont généralement les liaisons les plus simples à synthétiser. Notre objectif est d'effectuer par extension la synthèse totale d'une molécule d'intérêt biologique en utilisant cette stratégie et de limiter les étapes de purifications. Nous avons décidé de nous intéresser à la synthèse de COs précurseurs de LCOs et de la TMG-chitotriomycin.

III. La TMG-chitotriomycin

III.A. Présentation

La TMG-chitotriomycin fut découvert en 2008 par Kanzaki à partir d'une culture de *Streptomyces anulatus*.^{240, 241} C'est un inhibiteur puissant et sélectif de β -*N*-acétylglucosaminidases (GlcNAcase) d'insectes et de champignons. Il n'a aucune activité contre les enzymes des mammifères et des plantes. Il a été caractérisé comme étant un chitooligosaccharide, c'est-à-dire un oligomère composé d'unités de *N*-acétyl-D-glucosamine reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β -1,4, possédant un ammonium sur l'unité non réductrice du sucre (Figure 33).²⁴²

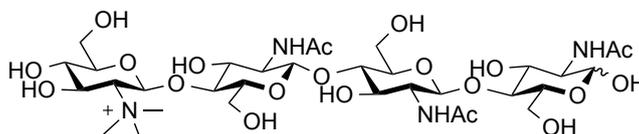


Figure 33 : TMG-chitotriomycin

²⁴⁰ Usuki, H.; Nitoda, T.; Ichikawa, M.; Yamaji, N.; Iwashita, T.; Komura, H.; Kanzaki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4146-4152.

²⁴¹ Yang, Y.; Yu, B. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1023-1046.

²⁴² Yang, Y.; Li, Y.; Yu, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12076-12077.

Au départ, la structure avait été proposée comme possédant une liaison glycosidique α au niveau de l'unité non réductrice mais celle-ci a été révisée en 2009 par Yang *et al.*²⁴² En effet, l'anomère β présente le même spectre RMN ^1H que la molécule naturelle et possède une activité contrairement à l'anomère α qui ne présente aucune activité. Le spectre d'inhibition pourrait permettre de comprendre le mécanisme moléculaire de dégradation de la chitine qui se produit dans une grande variété d'organismes et d'accéder à des nouveaux agents antifongiques et insecticides.

III.B. Synthèses

➤ Synthèse classique :

La première synthèse de ce composé naturel a été effectuée par le groupe de Yu en 2009.²⁴² La stratégie employée pour former le tétrasaccharide est une synthèse par bloc ou glycosylation (2+2). Une réaction de glycosylation catalysée à l'or entre les disaccharides **225** et **226** et une fonctionnalisation ont permis d'accéder au tétrasaccharide **224**. Celui-ci est ensuite déprotégé afin d'isoler la TMG-chitotriomycin **223** (Schéma 94).

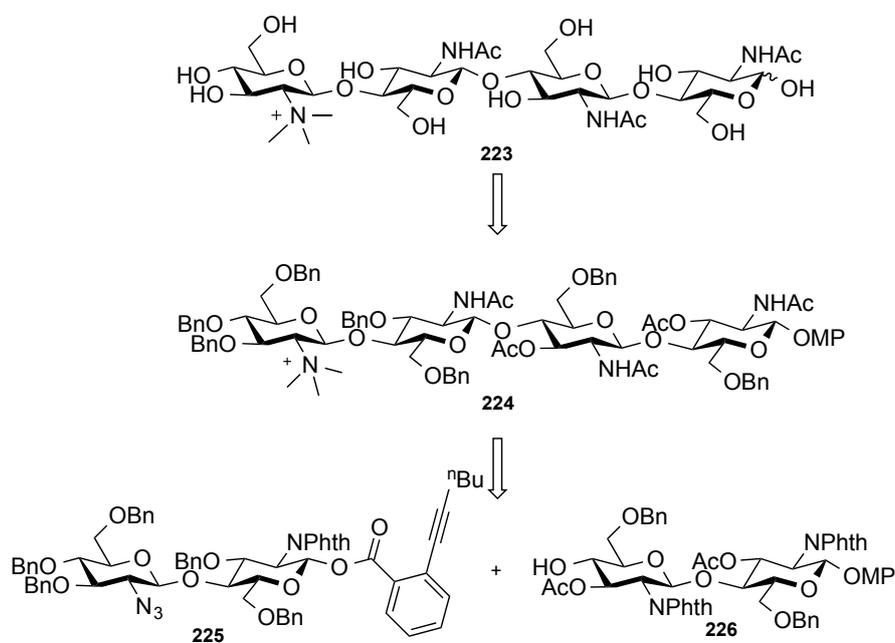
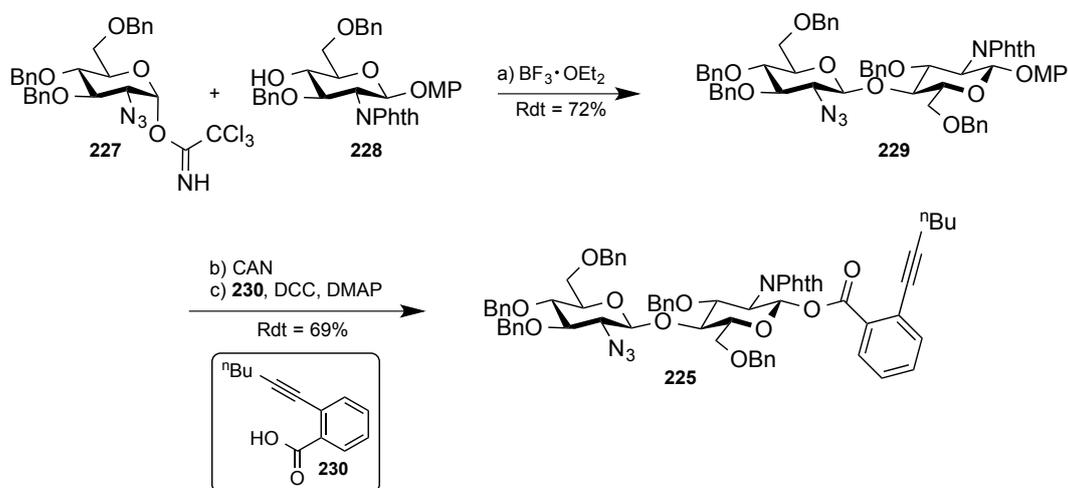


Schéma 94

Les premières étapes consistent à synthétiser les disaccharides **225** et **226**. Le disaccharide **229** est obtenu avec un bon rendement de 72%, par réaction de glycosylation entre le donneur trichloroacétimidate **227** et l'accepteur **228** en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ à -30°C . La réaction de type $\text{S}_{\text{N}}2$ permet de n'isoler que le composé β . Le groupement protecteur *O*-MP de la position anomérique est déprotégé sélectivement par action du CAN et l'ester est formé grâce à l'acide *o*-hexynylbenzoïque **230** en présence de DCC et de DMAP. Le disaccharide *o*-hexynylbenzoate **225** est isolé avec un rendement de 69% sur les deux étapes (Schéma 95).

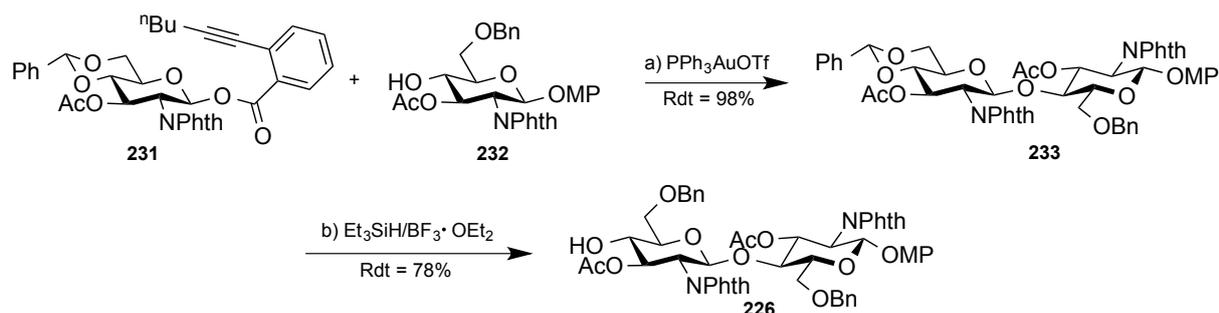


Conditions réactionnelles : a) **227** (1,4 éq.), **228** (1 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,20 M dans CH_2Cl_2), TM 4\AA , CH_2Cl_2 , -30°C à TA, 3 h, 72% ; b) **229** (1 éq.), CAN (5 éq.), toluène/MeCN/ H_2O (1 : 1,5 : 1), TA, 30 min, 75% ; c) **230** (1,2 éq.), DCC (1,5 éq.), DMAP (1,5 éq.), CH_2Cl_2 , TA, 12 h, 92%.

Schéma 95

Le disaccharide **233** provient du couplage entre le donneur benzylidène **231** et l'accepteur **232** en présence de catalyseur à l'or : PPh_3AuOTf . Ce couplage, se faisant à basse température et la présence du groupement *N*-phtaloyle sur la position 2 du donneur permet d'obtenir exclusivement l'anomère β avec un excellent rendement de 98%. Le disaccharide **233** est converti en un nouvel accepteur **226** (78%) par ouverture réductrice sélective du benzylidène en présence de $\text{Et}_3\text{SiH} / \text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (Schéma 96).²⁴³

²⁴³ a) Deninno, M. P.; Etienne, J. B.; Duplantier, K. C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 669-672. ; b) Debenham, S. D.; Toone, E. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 385-387.

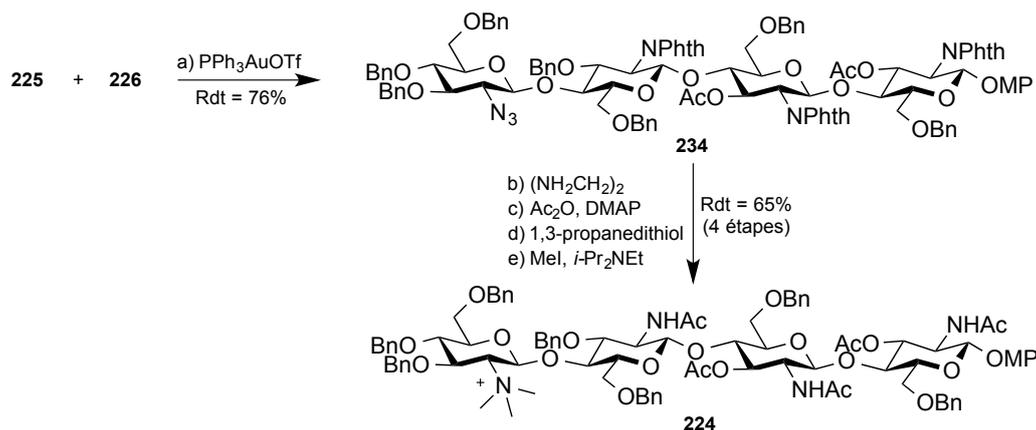


Conditions réactionnelles : a) **231** (1,3 éq.), **232** (1 éq.), PPh_3AuOTf (0,05 M dans CH_2Cl_2), TM 4Å, CH_2Cl_2 , -30 °C à TA, 5 h, 98% ; b) **233** (1 éq.), Et_3SiH (12 éq.), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (9 éq.), TM 4Å, CH_2Cl_2 , 0 °C, 5 h, 78%.

Schéma 96

Une glycosylation catalysée à l'or entre le donneur **225** et l'accepteur **226** permet d'accéder au tétrasaccharide **234** avec un bon rendement de 76%. Les groupements *N*-phtaloyles sont déprotégés en présence d'éthylènediamine puis les groupements aminos sont acétylés grâce à l'anhydride acétique. La réduction du groupement azido par l'action du 1,3-propanedithiol²⁴⁴ puis la méthylation de celui-ci permet de former l'ammonium sur l'unité non réductrice de manière sélective. Le tétrasaccharide **224** est isolé avec un rendement de 65% sur les 4 étapes (Schéma 97).

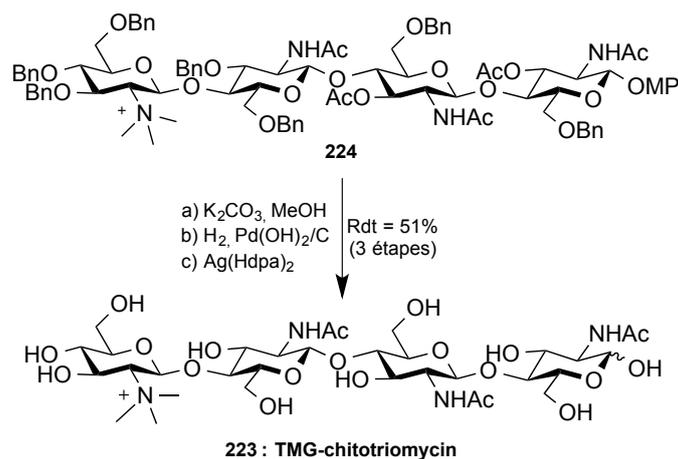
²⁴⁴ Matoba, M.; Kajimoto, T.; Nishide, K.; Node, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 141-146.



Conditions réactionnelles : a) **225** (1,5 éq.), **226** (1 éq.), PPh_3AuOTf (0,05 M dans CH_2Cl_2), TM 4Å, CH_2Cl_2 , -30 °C à TA, 3 h, 76% ; b) **234** (1 éq.), $(\text{NH}_2\text{CH}_2)_2$, EtOH, 100 °C, 14 h ; c) DMAP (2,5 éq.), Ac_2O , pyridine, TA, 12 h ; d) Et_3N , 1,3-propanedithiol, pyridine/ H_2O (4 : 1) ; e) $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, MeI, THF, TA, 40 h, 65% (4 étapes).

Schéma 97

La TMG-chitotriomycine **223** est isolée après la déprotection de tous les groupements protecteurs présents sur le tétrasaccharide **224**. Les groupements acétyles sont clivés par l'ajout de K_2CO_3 et de méthanol dans le milieu. Puis une hydrogénolyse des groupements benzyles a lieu en présence de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ et d'acide chlorhydrique. Le clivage du groupement *p*-méthoxyphényle de la position anomérique est effectué en présence de l'agent oxydant doux $\text{Ag}(\text{Hdpa})_2$ car le traitement du sucre par le CAN donne un mélange complexe de molécules. La cible souhaitée **223** est alors isolée avec un rendement de 51% sur les 3 étapes finales (Schéma 98).



Conditions réactionnelles : a) **224** (1 éq.), K_2CO_3 (1 éq.), MeOH/ CH_2Cl_2 (3 : 1,5), TA, 2 h ; b) $Pd(OH)_2/C$ (20%), HCl (37%, 2 gouttes), MeOH, H_2 , TA, 10 h, 67% (2 étapes) ; c) $Ag(Hdpa)_2$ (5,4 éq.), MeCN/ H_2O (1 : 1), TA, 4 min.

Schéma 98

La TMG-chitotriomycin a donc été synthétisée en 28 étapes avec un rendement global de 3%, à partir des monosaccharides **227**, **228**, **231** et **232**. Ce rendement étant assez faible, des études ont été effectuées afin d'accéder plus facilement à ces structures complexes par méthodes enzymatiques.

➤ Synthèses enzymatiques :

En 2011, des études sur la fragmentation spécifique ESI-MS/MS d'analogues de TMG-chitotriomycin a permis de détecter divers TMG-chitomonomycins et de les isoler à des concentrations maximales de 8 nmol.mL^{-1} .²⁴⁵

En 2013, l'équipe d'Halila²⁴⁶ a utilisé une approche chimioenzymatique pour produire rapidement des TMG-chitooligomycins. Une culture en grosse quantité de cellules souches d'*Escherichia coli*, exprimant les gènes *nodC* (COs synthase) et *nodB* (COs N-déacétylase) avec comme source carbonée le glycérol, a permis d'accéder aux chitooligosaccharides **235**, **236** et **237** à l'échelle d'une centaine de milligramme. Leur traitement par l'iodométhane en

²⁴⁵ Usuki, H.; Yamamoto, Y.; Kumagai, Y.; Nitoda, T.; Kanzaki, H.; Hatanaka, T. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2943-4951.

²⁴⁶ Halila, S.; Samain, E.; Vorgias, C. E.; Armand, S. *Carbohydr. Res.* **2013**, *368*, 52-56.

présence de soude (5 M) a permis d'isoler les chitooligomycins **238** (Rdt = 47%), **223** (Rdt = 85%) et **239** (Rdt = 78%) avec de très bons rendements et à des concentrations maximales de 4 g.L⁻¹ (Schéma 99).

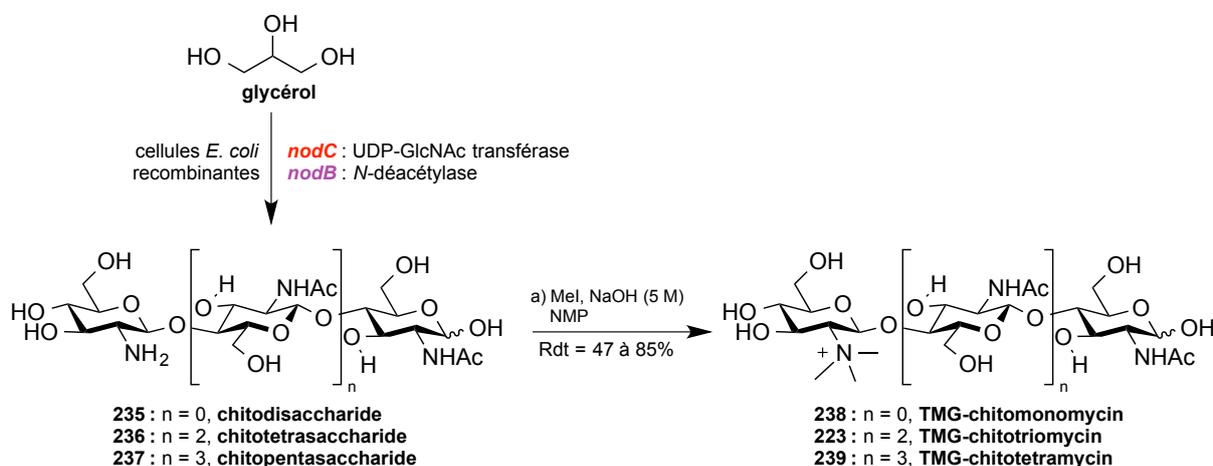


Schéma 99

Cette méthode permet d'accéder simplement à une grande variété de molécules complexes.

III.C. Conclusion

Une seule voie de synthèse chimique de la TMG-chitotriomycine est connue à ce jour. Elle est effectuée en 28 étapes avec un rendement global de 3%.²⁴² Pour améliorer ce rendement, nous avons vu que des synthèses utilisant les enzymes ont été effectuées.^{245,246} Or le squelette saccharidique ne peut pas être facilement modifié par cette méthode de synthèse. Une nouvelle méthode d'obtention de chitooligosaccharides a été publiée ces derniers jours par l'équipe de Beau.²⁴⁷ Cette stratégie de dépolymérisation de la chitine permet d'accéder aux LCOs et à la TMG-chitotriomycine avec de bons rendements mais ne permet pas de modifier le squelette saccharidique. Nous souhaitons de notre côté mettre au point une nouvelle stratégie de synthèse chimique permettant d'accéder à ce genre de molécules plus facilement. Pour cela, l'objectif est d'utiliser des liquides ioniques supportés qui permettraient de s'affranchir des purifications fastidieuses par chromatographie sur gel de silice, après les

²⁴⁷ Despras, G.; Alix, A.; Urban, D.; Vauzeilles, B.; Beau, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11912-11916.

étapes de glycosylation. Les résultats obtenus pour la mise au point des conditions de réaction pour la formation de liaisons glycosidiques β -1,4 entre des unités de *N*-acétyl-D-glucosamine et utilisant des liquides ioniques supportés et ceux obtenus pour la synthèse totale du chitooligosaccharide nous permettant d'accéder à la TMG-chitotriomycin ou à des analogues de LCOs non sulfatés, sont décrits ci-dessous.

IV. Résultats et discussion

IV.A. Essais préliminaires

Dans un premier temps, nous avons souhaité synthétiser divers monosaccharides pour effectuer la mise au point des conditions de glycosylation. L'objectif est de greffer le liquide ionique sur l'accepteur car, comme nous l'avons dit précédemment, c'est l'espèce limitante dans des conditions habituelles de glycosylation. Il peut être greffé sur différentes positions du sucre. Nous avons choisi de greffer le liquide ionique en position 6 ou 1 du sucre pour des raisons de simplicité d'introduction (Figure 34).

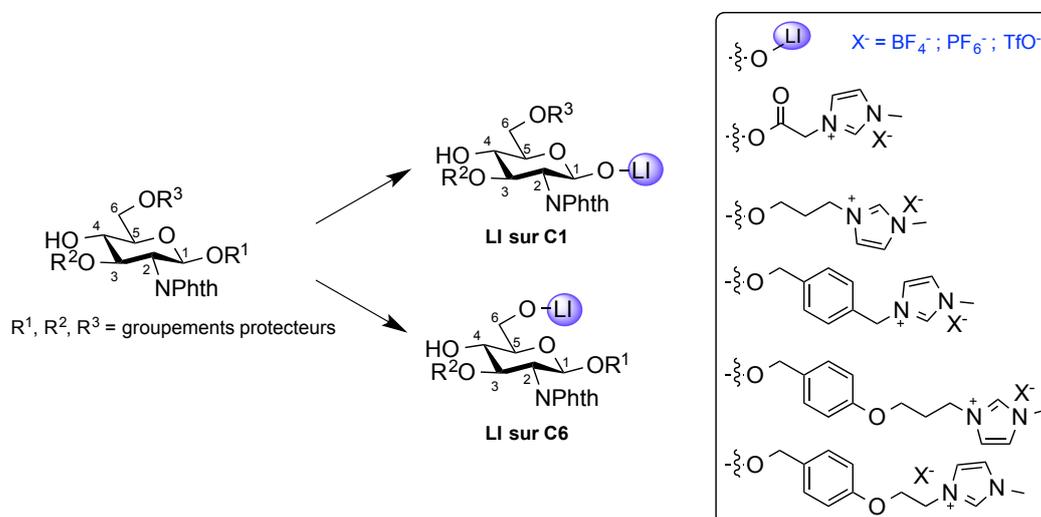


Figure 34

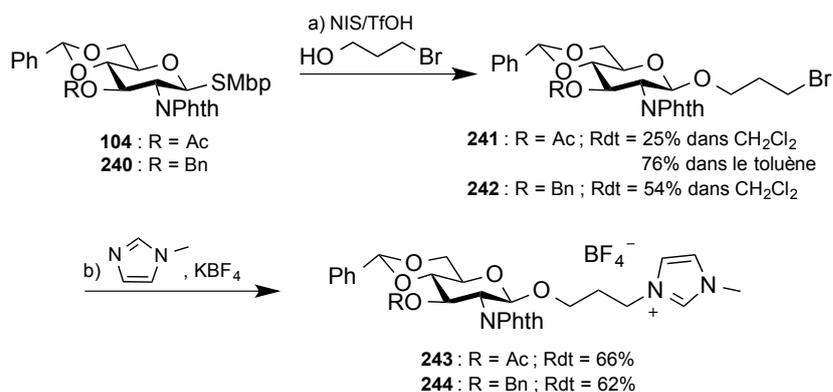
Les essais de couplage du liquide ionique, de type ester sur la position 6, n'ont pas été concluants. En effet, lors des essais d'introduction de ce lien ester, des mélanges complexes ont été récupérés. Nous avons donc décidé, comme l'équipe de Galan, de ne greffer les

liquides ioniques que sur la position anomérique, ce qui permet d'éloigner celui-ci du centre réactif.²³⁹

IV.A.1. Synthèse de monosaccharides et choix de l'espaceur

IV.A.1.a. Bras espaceur aliphatique

Les premiers essais ont été effectués avec un bras espaceur aliphatique. Les monosaccharides benzyldènes **104**¹⁰⁰ et **240**¹⁰⁰ sont mis en réaction avec le 3-bromo-1-propanol en présence d'acide triflique et de *N*-iodosuccinimide afin d'isoler les monosaccharides **241** et **242** avec un rendement de 76% et 54% respectivement. Cette différence de rendement peut s'expliquer par le changement de solvant. Les premiers essais ont été effectués dans le dichlorométhane et les monosaccharides **241** et **242** sont obtenus avec des rendements modestes de 25% et 54% respectivement. Nous avons déjà constaté cette hausse de rendement, due au solvant, lors de la glycosylation (2+2) durant la synthèse totale du LCO [Myc-IV (C16:0,S)] **97**. Il y a ensuite substitution nucléophile du brome par la *N*-méthylimidazole et échange d'anion par action du KBF₄. Les monosaccharides **243** et **244** supportés sur liquide ionique sont isolés avec un rendement de 66% et 62% respectivement par lavage avec du diéthyl éther et du toluène (Schéma 100).

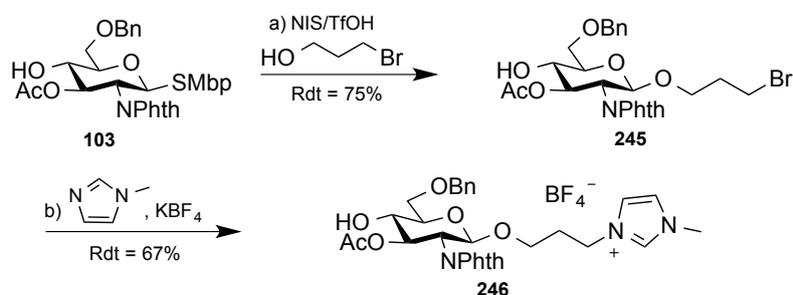


Conditions réactionnelles : a) Essai dans le CH₂Cl₂: **104** ou **240** (1 éq.), 3-bromo-1-propanol (1,5 éq.), NIS (2,5 éq.), TfOH (0,15 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 1 h, 25% et 54% respectivement. Essai dans le toluène: **104** (1 éq.), 3-bromo-1-propanol (1,3 éq.), NIS (1,2 éq.), TfOH (0,2 éq.), TM 4Å, toluène, -30 °C, 3 h, 76%. ; b) **241** ou **242** (1 éq.), *N*-méthylimidazole (3,6 éq.), KBF₄ (1,1 éq.), MeCN, 85 °C, 48 h, 66% et 62% respectivement.

Schéma 100

Un essai d'ouverture réductrice des monosaccharides **243** et **244** a été effectué en utilisant le couple $\text{Et}_3\text{SiH}/\text{Cu}(\text{OTf})_2$ mais un mélange du composé souhaité (4-OH et 6-OBn) et du produit d'hydrolyse (4-OH et 6-OH) a été formé. Les deux composés n'étant pas séparables par simple lavage, nous avons décidé d'effectuer l'ouverture de l'acétal de benzyldène avant de greffer le bras espaceur et former le liquide ionique.

La séquence est similaire en partant du monosaccharide **103**, couplage du 3-bromo-1-propanol sur la position anomérique puis substitution nucléophile et échange d'anion afin de former le liquide ionique. Le monosaccharide **246** est isolé après des lavages avec un rendement de 50% sur 2 étapes (Schéma 101).



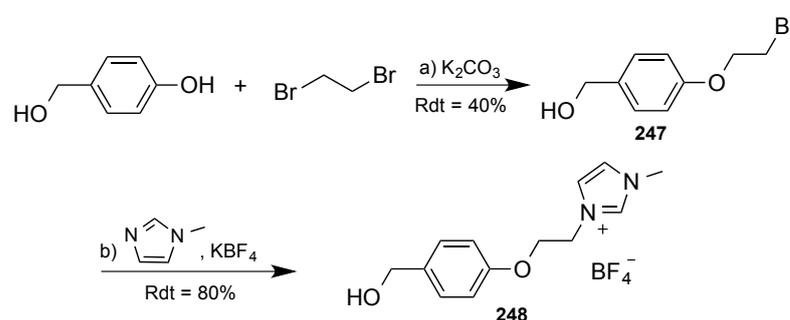
Conditions réactionnelles : a) **103** (1 éq.), 3-bromo-1-propanol (1,3 éq.), NIS (1,2 éq.), TfOH (0,2 éq.), TM 4Å, toluène, $-30\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 75% ; b) **245** (1 éq.), N-méthylimidazole (3,6 éq.), KBF_4 (1,1 éq.), MeCN, $85\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h, 67%.

Schéma 101

Les résultats obtenus lors de la synthèse de ces monosaccharides sont encourageants mais il a été dit précédemment que les groupements aromatiques permettent l'emploi d'une plus large gamme de groupements protecteurs et qu'ils sont apparemment plus simples à cliver que les groupements alkyles. Nous avons testés la synthèse de quelques monosaccharides comportant un lien aromatique entre lui-même et le motif liquide ionique.

IV.A.1.b. Bras espaceur aromatique

Différents espaceurs aromatiques ont été envisagés. Nous avons testé le greffage du liquide ionique **248**, déjà utilisé par l'équipe de Huang et Li²⁴⁸ en 2011 pour la synthèse de disaccharides α -1,6. Le liquide ionique **248** est synthétisé avant le couplage sur la position anomérique du sucre à partir de 4-(hydroxyméthyl)phénol et du 1,2-dibromoéthane en présence de K_2CO_3 comme base. Le 4-(2-bromoéthoxy)phényle)méthanol **247** est alors isolé avec un rendement moyen de 40%. Celui-ci est mis en présence de *N*-méthylimidazole et de KBF_4 afin de former le liquide ionique **248** isolé par lavage avec du diéthyl éther et de l'acétate d'éthyle avec un rendement de 80% (Schéma 102).²⁴⁸

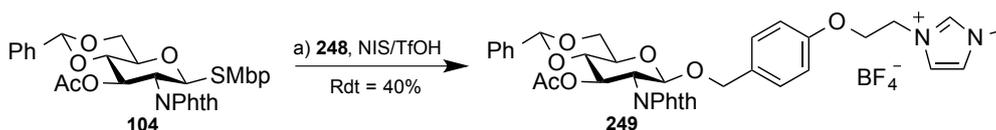


Conditions réactionnelles : a) 4-(hydroxyméthyl)phénol (1 éq.), 1,2-dibromoéthane (11,6 éq.), K_2CO_3 (3 éq.), DMF, 45 °C, 6 h, 40% ; b) **247** (1 éq.), *N*-méthylimidazole (1 éq.), KBF_4 (1 éq.), MeCN, 80 °C, 36 h, 80%.

Schéma 102

Le liquide ionique **248** est greffé sur la position anomérique du thioglycoside **104** en présence du couple de promoteurs NIS/TfOH. La conversion est totale au bout de 2 h mais une perte de produits durant la purification par lavage, ne permet d'obtenir que le monosaccharide **249** avec un rendement moyen de 40% (Schéma 103).

²⁴⁸ Huang, J.-Y.; Li, A.; Li, J.-R. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 297-302.

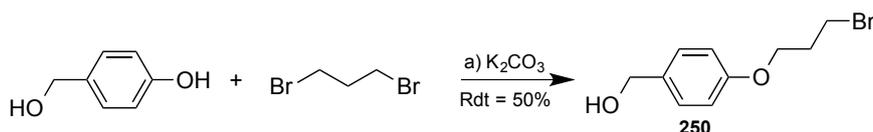


Conditions réactionnelles : a) **104** (2 éq.), **248** (1 éq.), NIS (2,5 éq.), TfOH (0,15 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 2 h, 40%.

Schéma 103

Un inconvénient de cette méthode est la difficulté de manipulation du liquide ionique **248** très visqueux. De plus, le rendement étant plutôt moyen, nous avons décidé de greffer d'abord le lien aromatique puis d'effectuer la substitution et l'échange d'anion afin de former le liquide ionique. En revanche, la réaction de glycosylation entre le donneur **104** et l'accepteur **247** n'a jamais permis d'obtenir le bon produit, certainement dû à une transformation de **247** avant glycosylation.

Afin d'éviter ce problème, nous avons envisagé d'utiliser un lien avec un atome de carbone supplémentaire. La synthèse du composé **250**²⁴⁹ a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment mais en utilisant le 1,3-dibromopropane. Celui-ci est isolé avec un rendement de 50% (Schéma 104).



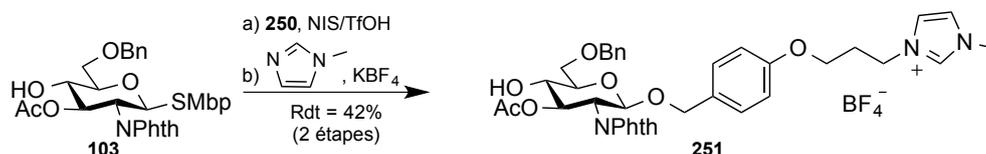
Conditions réactionnelles : a) 4-(hydroxyméthyl)phénol (1 éq.), 1,3-dibromopropane (11,6 éq.), K₂CO₃ (3 éq.), DMF, 45 °C, 6 h, 50%.

Schéma 104

La réaction de glycosylation entre le donneur **103** et l'accepteur **250** permet de greffer le lien avec un rendement de 48%. Puis la substitution du brome par la *N*-méthylimidazole et

²⁴⁹ Kitazawa, N.; Ueno, K.; Takahashi, K.; Kimura, T.; Sasaki, A.; Kawano, K.; Okabe, T.; Komatsu, M.; Matsunaga, M.; Kubota, A. US Patent Appl. No. US20020019531 A1, **2002**.

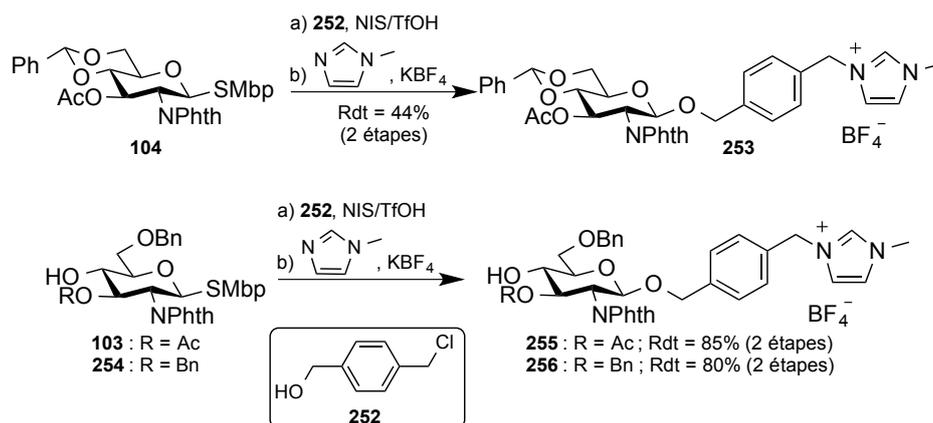
l'échange de contre anion permet d'obtenir le monosaccharide **251** avec un rendement de 88% (Schéma 105).



Conditions réactionnelles : a) **103** (1 éq.), **250** (1,3 éq.), NIS (1,2 éq.), TfOH (0,2 éq.), toluène, -30 °C, 3 h, 48% ; b) N-méthylimidazole (3,6 éq.), KBF₄ (1,1 éq.), MeCN, 85 °C, 48 h, 88%.

Schéma 105

La comparaison de la synthèse du composé **249** et celle du composé **251**, montre que les rendements restent du même ordre, que ce soit par introduction directe du liquide ionique ou introduction du bras espaceur puis formation du liquide ionique. Pour essayer d'améliorer ce rendement, nous avons envisagé d'utiliser un autre lien, notamment le lien α,α' -dioxyxyle diéther, utilisé par l'équipe de Galan.²³⁹ Un essai sur le donneur acétal de benzilydène **104**, nous a permis d'accéder au monosaccharide **253** supporté avec un rendement de 44% sur les deux étapes. De plus, l'ouverture de l'acétal de benzilydène étant une étape critique, nous avons effectuée la même séquence sur les monosaccharides **103** et **254** déjà sous forme 4-OH. Les composés **255** et **256** sont obtenus avec un excellent rendement de 85% et 80% respectivement, sur les deux étapes (Schéma 106).



Conditions réactionnelles : a) **104**, **103** ou **254** (1 éq.), **252** (1,3 éq.), NIS (1,2 éq.), TfOH (0,2 éq.), toluène, -30 °C, 3 h, 67%, 85% ou 81% (respectivement) ; b) *N*-méthylimidazole (3,6 éq.), KBF₄ (1,1 éq.), MeCN, 85 °C, 48 h, 66%, 100% ou 98% (respectivement).

Schéma 106

IV.A.1.c. Conclusion

Ces différents essais nous ont permis de pouvoir accéder à quelques monosaccharides supportés, avec des espaceurs variés, pouvant être utilisés en tant qu'accepteurs dans des réactions de glycosylation. Nous avons aussi pu comparer ces différents espaceurs et choisir le plus adapté à nos molécules. Le lien α,α' -dioxxylyle diéther semble être le meilleur candidat ; il est stable, facile d'accès et les rendements des réactions lors de l'introduction sur les monosaccharides sont plus élevés. Nous pouvons ainsi mettre au point des conditions de glycosylation nous permettant d'accéder à des oligomères de *N*-acétyl-D-glucosamines avec des liaisons glycosidiques β -1,4.

IV.A.2 Conditions de glycosylation

Les premiers essais de glycosylation ont été effectués avec le donneur **104**, déjà utilisé lors de la synthèse totale du facteur [Myc-IC (C16:0, S)] **97**.¹⁴¹ Les conditions habituellement utilisées pour réaliser une glycosylation avec un thioglycoside sont les suivantes : 1 équivalent d'accepteur, 1,5 équivalents de donneur, 2,5 équivalent de NIS, 0,15 équivalent de TfOH en présence de tamis moléculaire 4Å dans le dichlorométhane de -10 °C à température ambiante pendant environ 2 heures (Figure 35).

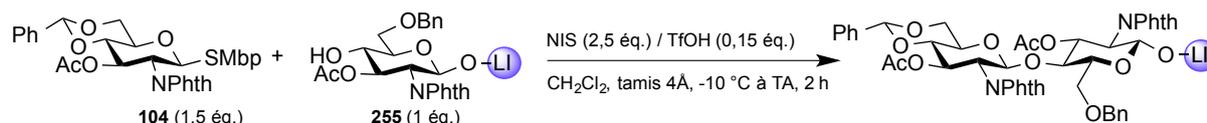


Figure 35 : conditions opératoires générales

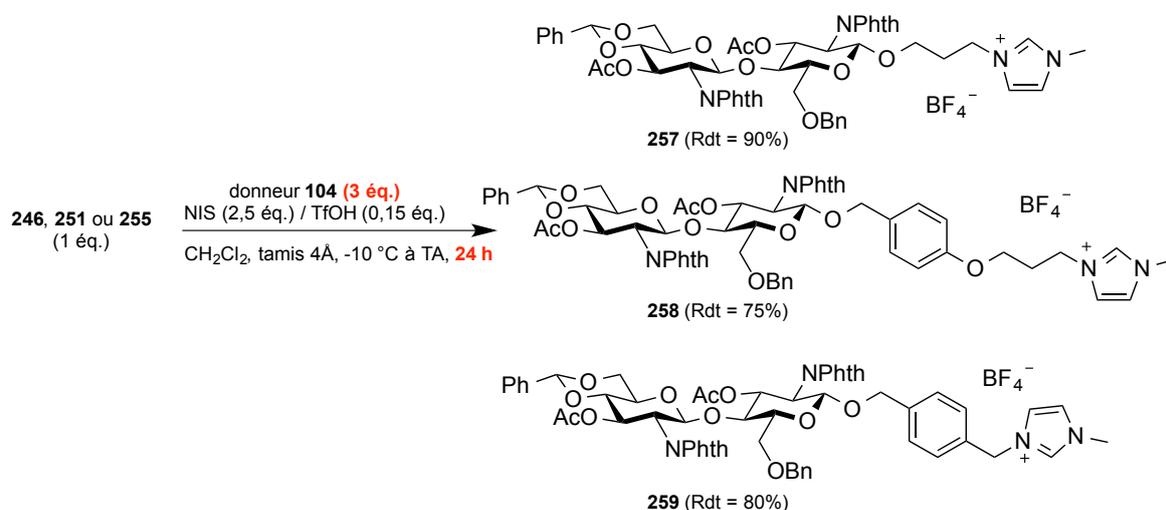
Nous avons testés ces conditions avec l'accepteur **255** synthétisé au préalable. Après 2 heures de réaction, nous avons effectué un suivi par LC/MS pour contrôler la conversion de l'accepteur. D'après le profil UV, nous pouvons estimer que la conversion est d'environ 50%. Ceci est un problème car si l'accepteur de départ n'est pas consommé totalement, nous ne pouvons pas séparer celui-ci du produit formé après glycosylation par un simple lavage. En effet, ils sont tous les deux porteurs du motif liquide ionique permettant de changer les propriétés physico-chimiques. Nous avons alors testé plusieurs conditions en gardant les quantités de NIS (2,5 éq.) et TfOH (0,15 éq.) fixes et en faisant varier les quantités de donneurs et le temps de réaction (Tableau 4).

Entrée	Donneur 104 (éq.)	Accepteur 255 (éq.)	Temps	Conversion de l'accepteur
1	1,5	1	2 h	50%
2	1,5	1	6 à 24 h	50%
3	3	1	2 h	70%
4	3	1	16 à 24 h	totale

Tableau 4 : optimisation des conditions de glycosylation

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque l'on augmente les quantités de donneur à 3 équivalents. Celui-ci doit être hydrolysé dans le milieu et ne permet plus, au bout d'un certains temps, de former la liaison glycosidique β -1,4 entre le donneur et l'accepteur. De plus, le fait d'utiliser un excès de donneur n'est pas un réel inconvénient car une partie de celui-ci peut être récupéré dans la phase de lavage (toluène/Et₂O) après la purification du disaccharide qui précipite. Nous pouvons récupérer entre 0,5 et 1 équivalent de donneur, selon les essais, après purification par chromatographie sur gel de silice (Heptane/EtOAc 8 : 2 à 1 : 1) de la phase de lavage.

Différents disaccharides ont alors été synthétisés dans ces conditions avec de très bons rendements, allant de 75% à 90%. (Schéma 107).



Conditions réactionnelles : 246, 251 ou 255 (1 équ.), 104 (3 équ.), NIS (2,5 équ.), TfOH (0,15 équ.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 24 h , 90%, 75% ou 80% respectivement.

Schéma 107

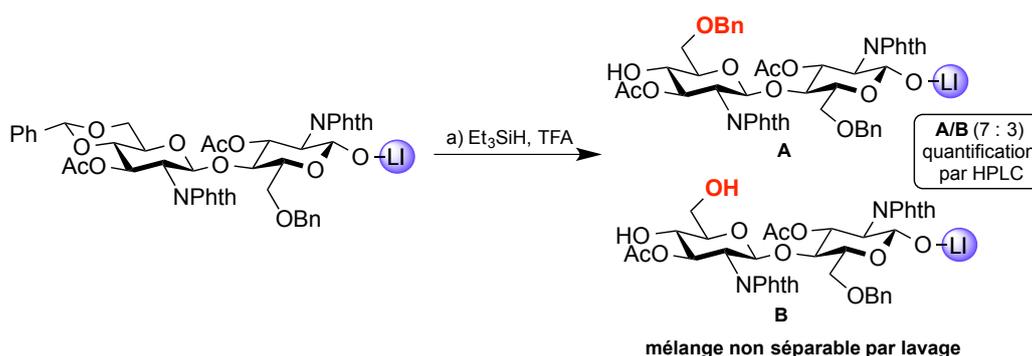
Tous ces disaccharides ont été récupérés après avoir quenché la réaction avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et des lavages avec une solution aqueuse de Na₂S₂O₃ puis de NaCl. La phase organique (dichlorométhane) est concentrée puis lavée avec du diéthyl éther et du toluène afin d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi et les impuretés. Aucune purification par chromatographie sur gel de silice n'est nécessaire pour obtenir les produits purs.

IV.A.3. Ouverture de l'acétal de benzylidène

Afin de pouvoir utiliser les disaccharides **257**, **258** et **259** dans la suite pour synthétiser un tétrasaccharide, il faut les transformer en accepteurs et donc libérer la fonction hydroxy de la position 4 de l'unité non réductrice. En s'inspirant des travaux effectués lors de la synthèse totale du facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97**¹⁴¹, des essais d'ouvertures réductrice ou oxydante ont été envisagés.

IV.A.3.a. Ouverture réductrice de l'acétal de benzylidène

L'ouverture réductrice des acétals de benzylidène des disaccharides **257**, **258** et **259** a été effectuée en utilisant le couple $\text{Et}_3\text{SiH/TFA}$. Comme pour les essais sur les monosaccharides, nous avons obtenu un mélange composé du produit attendu et du produit d'hydrolyse qui ne sont pas séparables par lavage (Schéma 108).



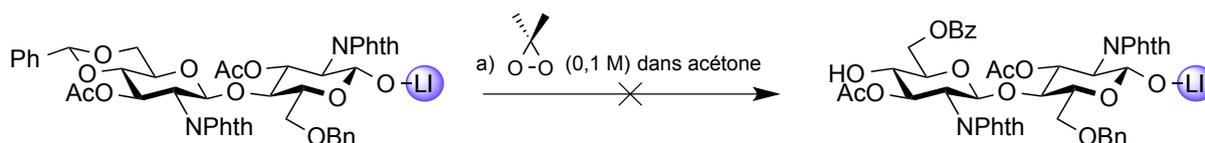
Conditions réactionnelles : a) Et_3SiH (5 éq.), TFA (5 éq.), CH_2Cl_2 , TA, 12 h.

Schéma 108

Nous avons alors envisagé d'utiliser la méthode mise au point au laboratoire, d'ouverture oxydante au DMDO.¹⁴²

IV.A.3.b. Ouverture oxydante de l'acétal de benzylidène

Comme pour l'ouverture réductrice, nous avons essayé d'ouvrir les acétals de benzylidène grâce au DMDO. Contrairement à nos attentes, aucune réaction n'a eu lieu. Nous avons récupéré le produit de départ intact (Schéma 109).



Conditions réactionnelles : a) DMDO (0,1 M dans acétone, 5 éq.), 5 °C, 6 jours.

Schéma 109

IV.A.3.c. Conclusion

Le liquide ionique semble avoir une influence sur la réactivité de la molécule, notamment lors des étapes de déprotection de l'acétal de benzylidène. Nous sommes donc contraints de revoir notre voie de synthèse et notamment changer les groupements protecteurs du donneur. Il s'agit d'utiliser des groupements orthogonaux permettant de déprotéger facilement la position 4 de l'unité non réductrice. Nous avons décidé de tester les deux donneurs **260** et **261** pour optimiser les conditions de glycosylation (Figure 36).

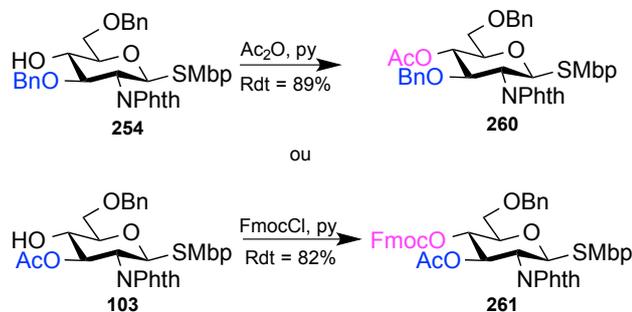


Figure 36

IV.A.4. Conditions optimales

De nouveaux essais de glycosylation ont été effectués avec les donneurs **260** et **261**. Les conditions précédentes : 1 éq. d'accepteur, 3 éq. de donneur, 2,5 éq. de NIS, 0,15 éq. de TfOH, tamis moléculaire 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 24 h, sont d'abord envisagées mais la conversion de l'accepteur dans les deux cas n'est pas totale. Il a fallu ajouter plus d'équivalents du couple NIS/TfOH pour accéder à une conversion totale.

Les résultats obtenus avec le donneur **260** sont représentés dans le Schéma 110. Lorsque l'on utilise un groupement acétate en position 4 du donneur et des groupements benzyles en position 3 du donneur et de l'accepteur, afin d'obtenir une orthogonalité des groupes protecteurs, on s'aperçoit que la conversion ne dépasse pas 50% même avec plus de NIS/TfOH et un temps de réaction plus long. Le groupement benzyle de la position 3 de l'accepteur a une influence sur la réactivité de la molécule lors des glycosylations, constat déjà effectué par G. San Jose lors de sa thèse pour la synthèse d'oligosaccharides de même type.¹⁵⁷ En effet, nous avons testé les mêmes conditions avec l'accepteur **255** possédant un groupe acétate en position 3 ; avec 5 équivalents de NIS et 0,3 équivalent de TfOH, la conversion est totale en 16 à 24 h (Schéma 110).

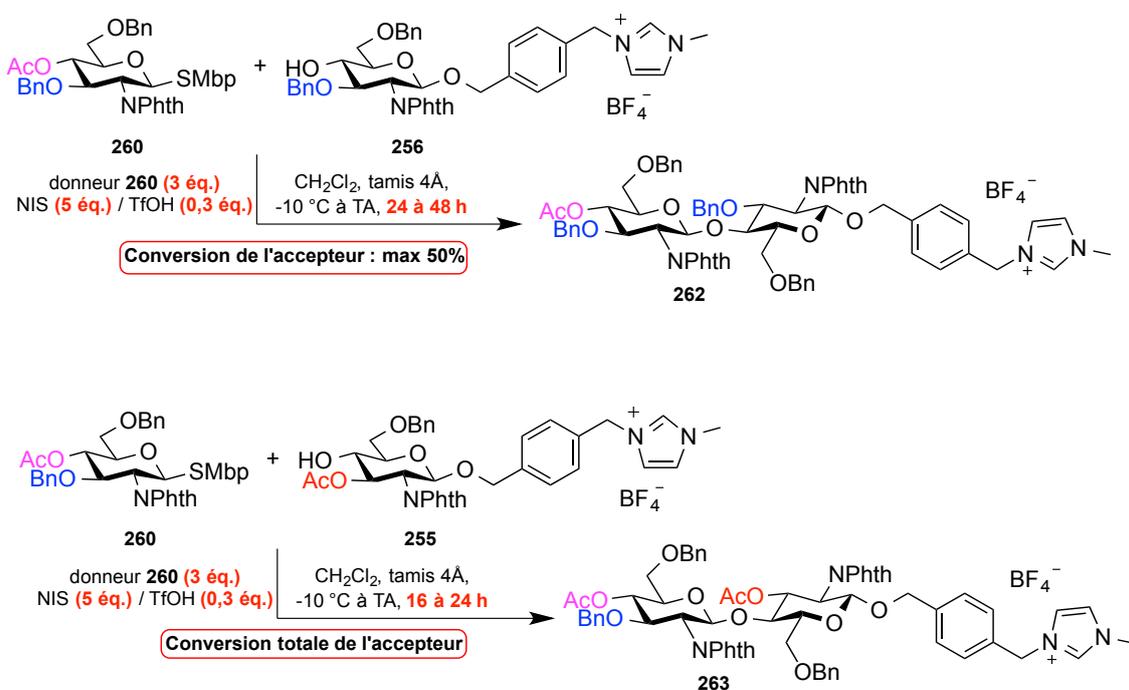


Schéma 110

Or, deux groupements acétates sont présents sur le disaccharide **263**. On ne peut donc pas les différencier au moment de la déprotection. Pour résumer, il semble important d'avoir un groupement acétate sur la position 3 de l'accepteur afin de garder une bonne réactivité et il faut des groupes orthogonaux à celui-ci sur le donneur ainsi qu'un groupe facile à déprotéger sur la position 4 pour accéder facilement à une fonction hydroxy libre et à un nouvel

accepteur de glycosyle. Notre choix s'est porté sur le groupement Fmoc qui est orthogonal à *O*Ac et *O*Bn et qui se déprotège facilement en présence de triéthylamine.²⁵⁰ Un nouvel essai de glycosylation avec le donneur **261** est testé et les conditions opératoires optimales pour une conversion totale de l'accepteur sont les suivantes : 1 éq. d'accepteur, 3 éq. de donneur, 5 éq. de NIS, 0,3 éq. de TfOH, tamis moléculaire 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 16 à 24 h. Le disaccharide **264** est isolé avec un bon rendement de 80% après de simples lavages (Schéma 111).

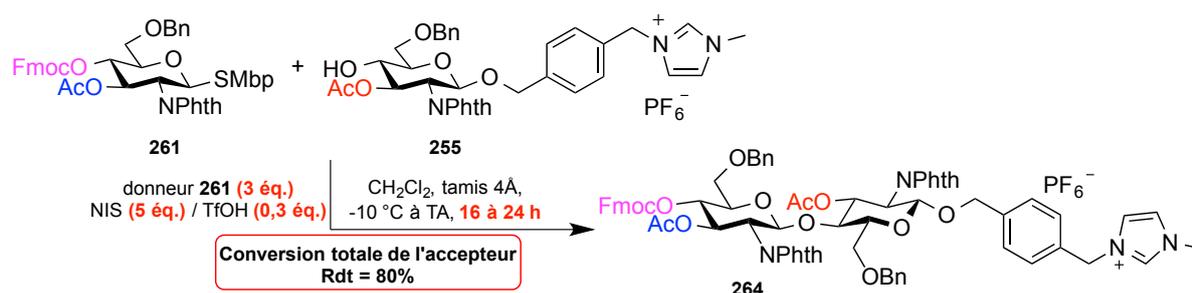


Schéma 111

Un point important à contrôler après la réaction de glycosylation est la nature du contre anion résultant. Lorsque l'on est en présence d'un contre anion BF₄⁻ ou PF₆⁻ sur le monosaccharide, un échange d'anion avec le TfOH utilisé peut avoir lieu. On se retrouve alors avec un mélange de composés BF₄⁻/TfO⁻ ou PF₆⁻/TfO⁻ au niveau du disaccharide. Ceci n'a aucune influence sur la réactivité du composé ainsi que sur ces propriétés physico-chimiques, la différence se voit sur les spectres RMN qui sont beaucoup plus difficiles à analyser. Pour éviter ce problème, deux solutions sont envisageables ; la première consiste à effectuer un échange d'anion après la réaction de glycosylation en présence de KBF₄ ou KPF₆ dans l'acétonitrile et la deuxième consiste à synthétiser le monosaccharide avec comme contre anion TfO⁻ grâce à KOTf.

IV.A.5. Conclusion

Au cours de ces essais, nous avons pu tester l'efficacité des liquides ioniques supportés sur la purification de quelques produits après les étapes de glycosylation. Nous

²⁵⁰ Markad, S. D.; Schmidt, R. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 5002-5011.

avons pu mettre au point des conditions opératoires nous permettant de synthétiser des disaccharides possédant des liaisons β -1,4 jamais synthétisés par cette voie. Grâce au travail effectué sur le choix des groupements protecteurs des donneurs et des accepteurs, nous pouvons envisager une voie de synthèse pour accéder au chitooligosaccharide nous permettant d'effectuer la synthèse totale de la TMG-chitotriomycin **223** ou d'analogues de LCOs non sulfatés (Figure 37).

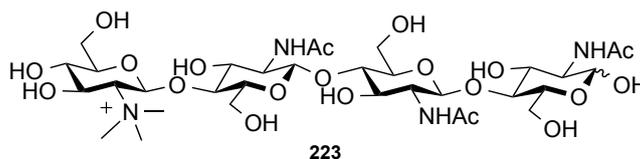


Figure 37 : TMG-chitotriomycin

IV.B. Synthèse du chitooligosaccharide d'intérêt

IV.B.1. Rétrosynthèse

En nous inspirant des travaux antérieurs du laboratoire sur la synthèse totale du facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97**,¹⁴¹ nous pouvons proposer une voie de synthèse pour l'obtention du chitooligosaccharide DP₄NH₂, plateforme de choix pour la synthèse totale pour la TMG-chitotriomycin **223** ou d'analogues de LCOs non sulfatés. La stratégie envisagée est à nouveau une stratégie par bloc. La préparation du tétrasaccharide **265** est envisagée par une glycosylation 2 + 2 entre le donneur **99**, déjà utilisé lors de la synthèse du facteur Myc, et l'accepteur provenant du disaccharide **264** après déprotection du groupement Fmoc. Les groupements protecteurs utilisés permettent d'induire la β -stéréosélectivité et ils permettent aussi de différencier les positions importantes du tétrasaccharide comme la fonction azotée de l'unité réductrice, protégée par un groupement benzyloxycarbone (Z), orthogonal aux groupements *N*-phatoyles (NPhth) (Schéma 112).

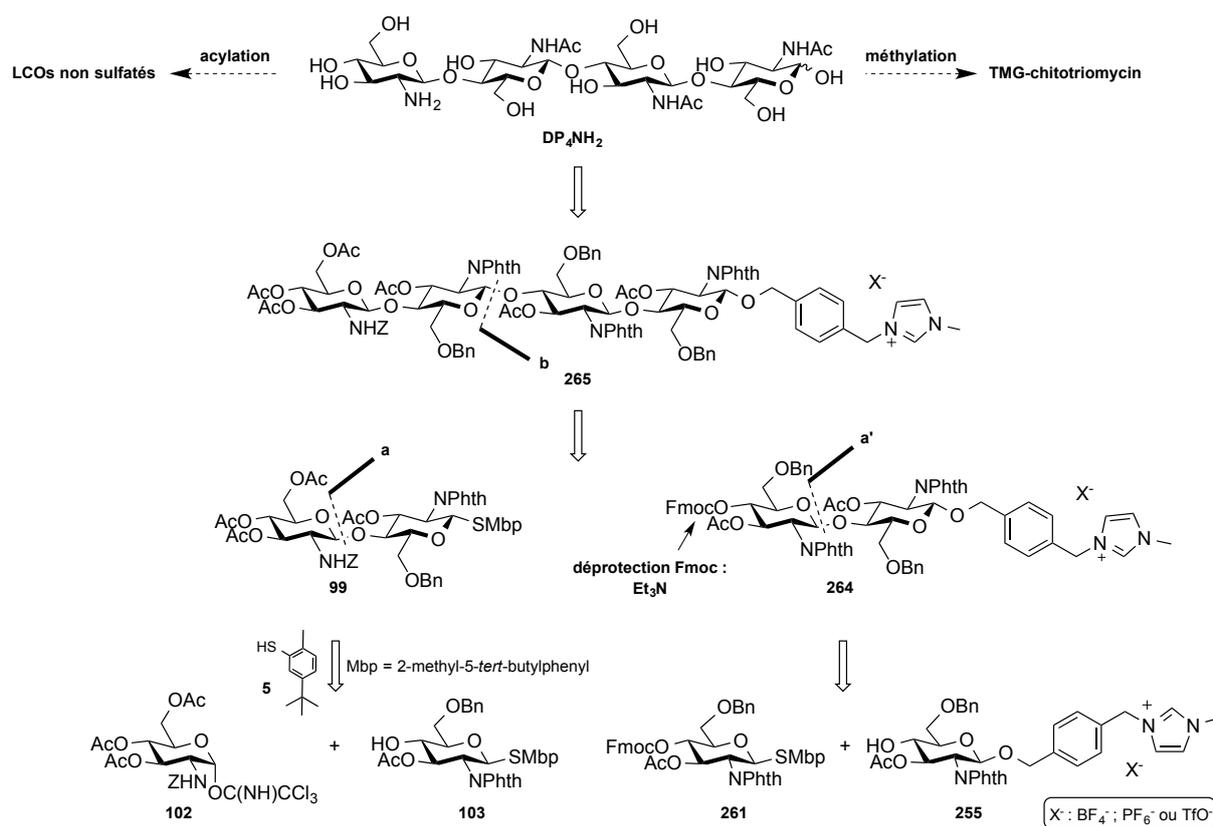
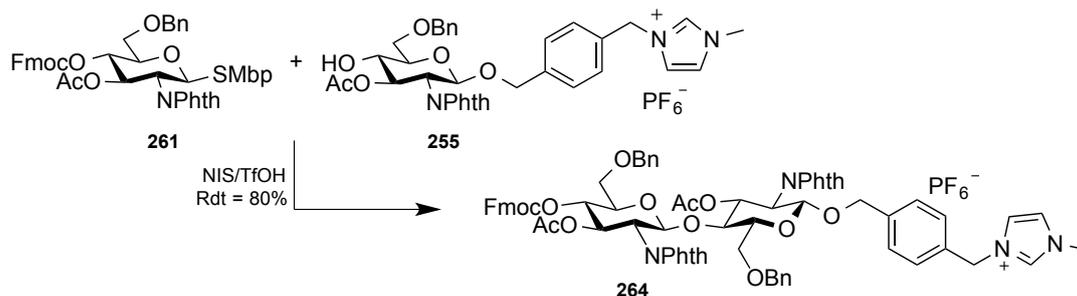


Schéma 112

La synthèse du disaccharide **99** à partir des monosaccharides **102** et **83** est expliquée dans le chapitre 1. Celle du disaccharide **264** a été abordée précédemment dans ce chapitre. Les groupes encombrants *N*-phtaloyles ont permis d'induire la β -stéréosélectivité et les groupes Fmoc est facilement déprotégeable par ajout de triéthylamine dans le milieu.²⁵⁰ La synthèse peut être envisagée avec différents contre anions (BF₄⁻, PF₆⁻ ou TfO⁻), il faut alors faire attention à l'éventuel échange qui peut avoir lieu lors de la glycosylation, comme évoqué dans la partie précédente.

IV.B.2. Synthèse des disaccharides

Les conditions utilisées pour obtenir une conversion totale de l'accepteur **255** lors de la synthèse du disaccharide **264** ont été décrites précédemment. Le disaccharide **264** est isolé après des lavages avec un excellent rendement de 80% (Schéma 113).

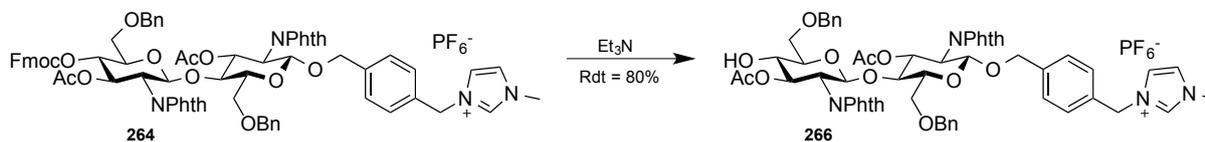


Conditions réactionnelles : a) **255** (1 éq.), **261** (3 éq.), NIS (5 éq.), TfOH (0,3 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 16 à 24 h, 80%.

Schéma 113

Dans ces conditions, un échange entre le contre anion PF₆⁻ et TfO⁻, provenant de l'acide triflique, peut avoir lieu. Cet échange n'a pas lieu sur tous les essais, la pureté ainsi que le temps de réaction sont certainement la cause de cet échange. Pour remédier à ce problème, nous avons testé les deux solutions proposées précédemment. Un nouvel échange, en présence de KPF₆, après la glycosylation et l'utilisation du monosaccharide **255** possédant comme contre anion TfO⁻. Les rendements de la réaction restent du même ordre avec n'importe quel contre anion.

Afin d'accéder à un nouvel accepteur, le groupement Fmoc présent sur la position 4 de l'unité réductrice est déprotégé sélectivement. Pour cela, le composé **264** est agité dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine pendant 3 h à température ambiante. Le disaccharide **266** est isolé par lavage avec un excellent rendement de 80% (Schéma 114).



Conditions réactionnelles : **264** (1 éq.), Et₃N (100 éq.), CH₂Cl₂, TA, 3 h, 80%.

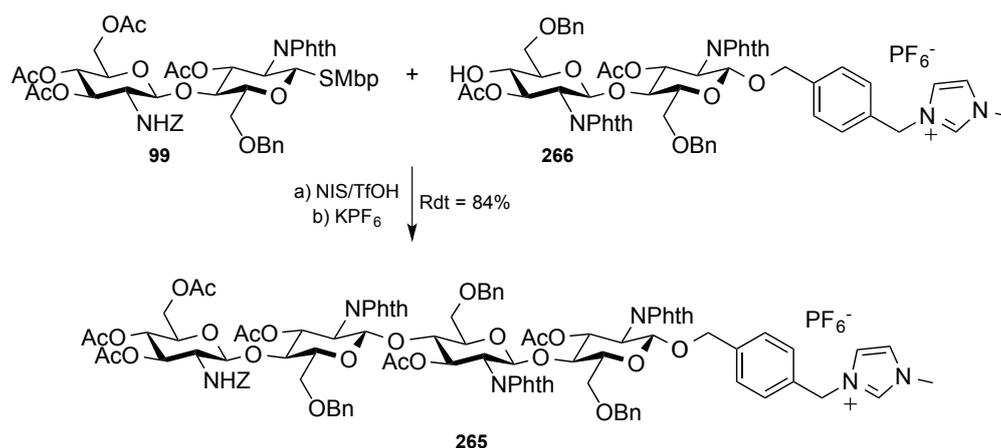
Schéma 114

Nous pouvons maintenant effectuer la synthèse du tétrasaccharide par glycosylation 2 + 2 entre ces deux disaccharides.

IV.B.3. Synthèse des tétrasaccharides

IV.B.3.a. Glycosylation 2 + 2

Une glycosylation entre l'accepteur supporté **266** et le donneur thioglycoside **99** est étudiée pour obtenir le tétrasaccharide **265** qui sera fonctionnalisé afin d'obtenir la molécule cible souhaitée. Les conditions utilisées pour la glycosylation 2 + 2 sont les mêmes que pour la synthèse du disaccharide **264**. Le tétrasaccharide est isolé de la même façon, par de simples lavages avec du diéthyl éther et du toluène, avec un très bon rendement de 84% (Schéma 115).



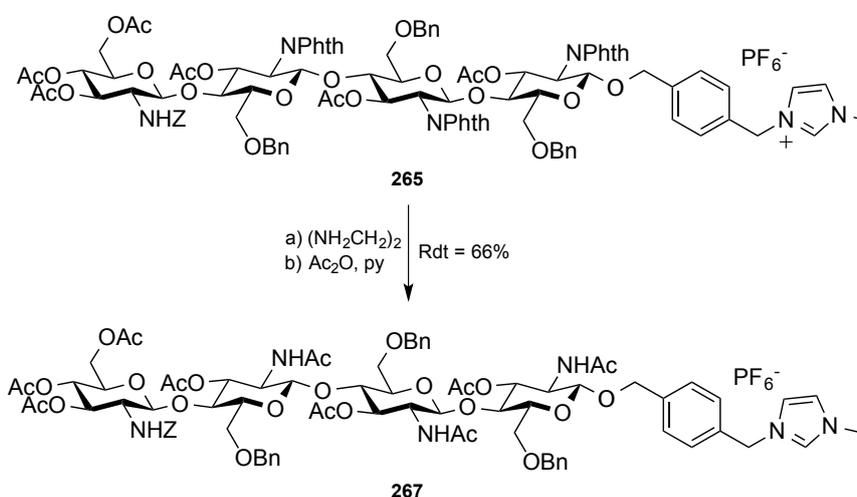
Conditions réactionnelles : a) **266** (1 éq.), **99** (3 éq.), NIS (5 éq.), TfOH (0,3 éq.), TM 4Å, CH₂Cl₂, -10 °C à TA, 16 à 24 h, 84%. ; b) KPF₆ (1,5 éq.), MeCN, 85 °C, 24 h, quant.

Schéma 115

IV.B.3.b. Fonctionnalisation et déprotections

➤ Formation des groupements NHAc :

Tout comme pour la synthèse du LCO du chapitre 1, la première étape est l'aminolyse des groupements *N*-phthaloyles et de toutes les fonctions esters présentes sur le tétrasaccharide **265**, par un chauffage dans l'éthylènediamine qui permet de laisser la fonction Z intacte. La per-acétylation des alcools et amines libres permet de conduire au composé **267** (Schéma 116).



Conditions réactionnelles : a) $(\text{NH}_2\text{CH}_2)_2$ (150 éq.), MeCN/EtOH (0.1 : 1), 60 °C, 12 h ; b) Ac_2O (275 éq.), pyridine, TA, 48 h, 66% (2 étapes).

Schéma 116

➤ Déprotection finale :

Les dernières étapes consistent à déprotéger totalement le chitooligosaccharide **267** avant de méthyler sélectivement la position amine de l'unité réductrice. Nous avons, dans un premier temps, testé la méthanolyse suivie de l'hydrogénolyse en présence de Pd/C dans un mélange EtOAc/H₂O (1 : 1) mais aucun produit souhaité n'est obtenu. Nous obtenons un mélange complexe difficilement interprétable et nous avons mis en évidence, grâce à un contrôle par analyse LC/MS, que le liquide ionique n'était pas déprotégé. De nombreuses conditions d'hydrogénolyse^{237,239, 251} ont alors été testées sur les composés **255** (monosaccharide 4-OH), **266** (disaccharide 4-OH), **265** (tétrasaccharide NPhth) et **267** (tétrasaccharide NHAc) afin de trouver les conditions qui permettraient de déprotéger les groupements benzyles, le carbamate ainsi que le liquide ionique (Tableau 5).

De nombreuses conditions opératoires ont été envisagées ; des changements de solvants afin d'avoir la meilleure solubilité possible et une bonne dispersion du palladium dans le milieu ; l'ajout d'acide ou non dans le milieu ; le changement de catalyseur ; un temps de réaction plus ou moins long ; la température de réaction ; une mise sous pression d'hydrogène (Tableau 5).

²⁵¹ Lu, D.; Hu, Y.; He, X.; Sollogoub, M.; Zhang, Y. *Carbohydr. Res.* **2014**, *383*, 89-96.

Entrée	Produit de départ	Conditions opératoires	Résultats
1	267 (tétra. NHAc)	a) Pd/C ; EtOAc/H ₂ O (1 : 1) ; 4 atm H ₂ ; 1 nuit b) Pd/C ; MeOH ; HCl (1 N, 5%) ; 4 atm H ₂ ; 1 nuit c) Pd/C ; MeOH/H ₂ O (1:1) ; HCl (1 N, 5%) ; 4 atm H ₂ ; 72 h	a et b) Présence du LI c) Disparition du LI mais mélange trop complexe à analyser
2	267 (tétra NHAc)	Pd black ; MeOH ; HCl (1 N, 5%) ; 4 atm ; 1 nuit	Mélange complexe
3	265 (tétra. NPhth)	Pd black ; MeOH ; HCl (1 N, 5%) ; 4 atm ; 2 jours	Mélange complexe
4	266 (di.)	Pd black ; MeOH ; HCl (1 N, 5%) ; 4 atm ; 1 nuit	Mélange : 266 + perte des groupements OAc
5	255 (mono.)	Pd black/Pd/C (1 : 1) ; THF/H₂O (4 : 2) ; HCl (1 N, 5%) ; 1 atm H₂ ; 72 h	Conversion totale en produit 268
6	266 (di.)	Pd black/Pd/C (1 : 1) ; THF/H ₂ O (4 : 2) ; 1 atm H ₂ ; 72 h	266
7	266 (di.)	Pd black/Pd/C (1 : 1) ; THF/H ₂ O (4 : 2) ; HCl (1 N, 5%) ; 1 atm H ₂ ; 72 h	Présence du LI ; perte des OBn partiellement
8	266 (di.)	Pd black/Pd/C (1 : 1) ; THF/H ₂ O/AcOH (4 : 2 : 1) ; 1 atm H ₂ ; 72 h	Présence du LI ; perte des OBn partiellement
9	266 (di.)	Pd black/Pd/C (1 : 1) ; THF/H ₂ O/AcOH (4 : 2 : 1) ; 1 atm H ₂ ; 40 °C ; 1 nuit	Dégradation
10	266 (di.)	a) Pd black/Pd/C (1 : 1) ; THF/H ₂ O/AcOH (4 : 2 : 1) ; 4 atm H ₂ ; 18 h b) Pd black/Pd/C (1 : 1) excès ; MeOH/H ₂ O/AcOH (3 : 1 : 0.5) ; 4 atm H ₂ ; 36 h	a) 266 b) Conversion totale en produit 269
11	265 (tétra. NPhth)	Pd black/Pd/C (1 : 1) excès ; MeOH/H ₂ O/AcOH (3 : 1 : 0.5) ; 4 atm H ₂ ; 4 jours	Déprotection partielle du LI et des groupements protecteurs mais la réaction n'évolue plus

Légende : mono. : monosaccharide ; di. : disaccharide ; tétra. : tétrasaccharide.

Gras : changement de conditions ; **Rouge :** conditions nécessaires pour une conversion totale.

Les résultats sont donnés après analyse LC/MS.

Tableau 5 : conditions d'hydrogénolyse sur mono-, di- et tétrasaccharide avec Pd à P = 1 atm ou P = 4 atm d'H₂

Dans l'entrée 5, une conversion totale du monosaccharide 255 en produit 268 a été observée en 72 h à température ambiante en utilisant un mélange de Pd black/Pd/(C) (1 : 1) dans un mélange THF/H₂O (4 : 2) dégazé en présence de 5% d'HCl (1 N). Le fait d'utiliser un mélange de catalyseur permet d'accroître la réactivité de celui-ci et d'avoir une meilleure

dispersion dans la solution. Un bon dégazage des solvants est très important pour ne pas observer d'agrégation de palladium dans le milieu. Dans les exemples des entrées 1, 2, 3 et 4, des agrégations du palladium dans le milieu ont pu être observées d'où une moins bonne réactivité. Dans les essais de 1 à 4, les réactions sont beaucoup moins propres et difficiles à contrôler par LC/MS. Le meilleur mélange de solvant s'est avéré être le THF/H₂O (Entrée 5). La présence d'acide accroît la réactivité, rien ne se passe si on n'en ajoute pas dans le milieu (Entrées 6 *versus* 7). Un changement d'acide n'a pas eu de conséquence sur la réactivité (Entrée 8). Le chauffage du milieu à 40 °C n'a pas permis d'améliorer la déprotection et a dégradé le milieu (Entrée 9). Des essais sous pression d'hydrogène (4 atm, système Parr) ont été effectués puis un changement de solvants,²⁵¹ a permis d'observer une conversion totale du disaccharide **266** en produit **269** (Entrée 10). Les mêmes conditions ont été testées sur le tétrasaccharide NPhth **265** sans succès (Entrée 11). Nous nous sommes donc aperçus, au cours de ces nombreux essais, que les conditions d'hydrogénolyse testées ne sont pas transposables lorsque l'on passe d'un monosaccharide à un disaccharide ou tétrasaccharide.

Nous avons alors envisagé de générer l'hydrogène *in situ* grâce à un ammonium formate supporté sur une résine de type DOWEX MARATHON MSA[®] et d'activer le milieu par irradiation au micro-onde.²⁵²

Entrée	Produit de départ	Conditions opératoires	Résultats
1	255 (mono.)	DOWEX MARATHON MSA[®] (ammonium formate supporté) ; Pd/C ; i-PrOH/H ₂ O (1:5) ; μW ; 80 °C ; 50 min	Conversion totale en produit 268
2	266 (di.)	a) DOWEX MARATHON MSA [®] (ammonium formate supporté) ; Pd/C ; i-PrOH/H ₂ O (1:5) ; μW ; 80 °C ; 50 min b) idem, 6 h	a) Début de conversion b) Conversion totale en produit 269
3	265 (tétra. NPhth)	DOWEX MARATHON MSA [®] (ammonium formate supporté) ; Pd/C ; i-PrOH/H ₂ O (1:5) ; μW ; 80 °C ; 6 h	Conversion totale + perte partielle OAc
4	267 (tétra. NHAc)	a) DOWEX MARATHON MSA [®] (ammonium formate supporté) ; Pd/C ; i-PrOH/H ₂ O (1:5) ; μW ; 80 °C ; 6 h b) DOWEX MARATHON MSA [®] (ammonium formate supporté) ; Pd/C ; i-PrOH/H ₂ O (1:5) ; μW ; 80 °C ; 6 h	a) Début de conversion b) Conversion totale + perte partielle OAc

Légende : mono. : monosaccharide ; di. : disaccharide ; tétra. : tétrasaccharide.

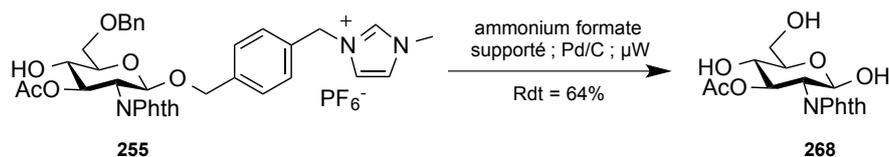
Rouge : conditions nécessaires pour une conversion totale.

Les résultats sont donnés après analyse LC/MS.

Tableau 6 : conditions d'hydrogénolyse sur mono-, di- et tétrasaccharide avec résine DOWEX MARATHON MSA[®]

Dans l'entrée 1, un essai sur le monosaccharide **255** a été concluant au bout de 50 minutes de chauffage à 80 °C, on isole **268**, après chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1), avec un rendement de 64% (Schéma 117).

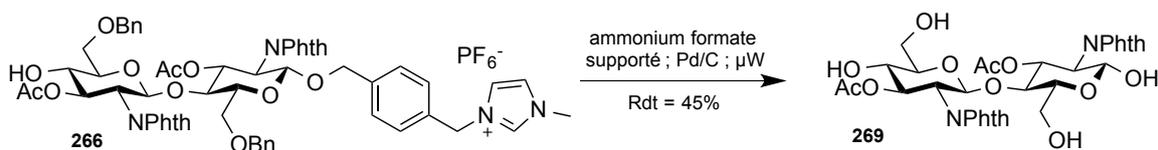
²⁵² François-Heude, M.; Méndez-Ardoy, A.; Cendret, V.; Lafite, P.; Daniellou, R.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Moreau, V.; Djedaïni-Pilard, F. *et coll. Chem. Eur. J.*, accepté



Conditions réactionnelles : a) ammonium formate supporté, Pd/C, *i*-PrOH/H₂O (1 : 5), μW , 80 °C, 50 min, 64%.

Schéma 117

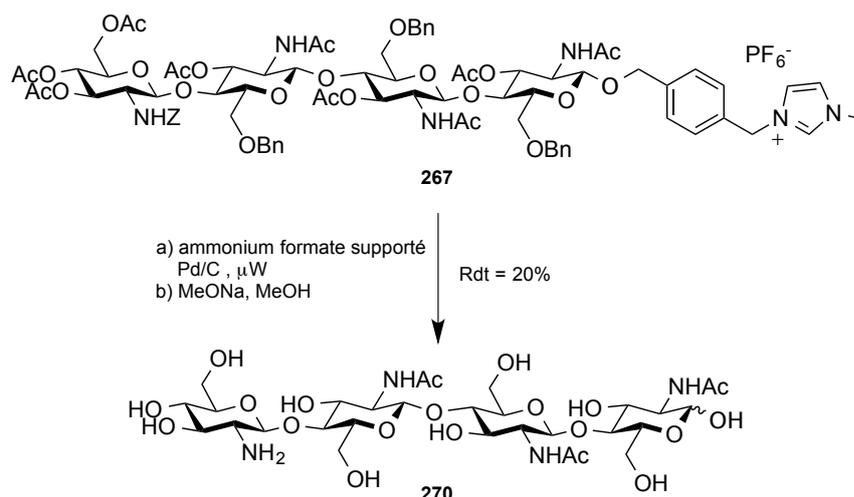
Les mêmes conditions ont été testées sur le disaccharide **266** et il a fallu augmenter le temps de réaction pour atteindre une conversion totale. Le composé **269** est ensuite isolé avec un rendement moyen de 45% après chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1) (Schéma 118).



Conditions réactionnelles : a) ammonium formate supporté, Pd/C, *i*-PrOH/H₂O (1 : 5), μW , 80 °C, 6 h, 45%.

Schéma 118

Sur le tétrasaccharide **265**, la conversion est totale au bout de 6 h de chauffage et une déprotection partielle d'acétates (1 à 3) est visible en LC/MS. Cela ne pose pas de problèmes, étant donné qu'on souhaite ensuite désacétyler totalement la molécule. Un essai a été effectué avec le tétrasaccharide **267** et nous avons observé une conversion totale au bout de 12 h de chauffage avec perte partielle d'acétates (1 à 3). D'un point de vue efficacité et sécurité, les conditions avec l'ammonium formate supporté sont les plus adaptées. Le brut réactionnel a ensuite été engagé dans une réaction de désacétylation en présence de MeONa dans le méthanol afin d'isoler après purification sur colonne chromatographique le chitooligosaccharides DP₄NH₂ **270** souhaité avec un rendement de 23% sur les deux étapes (Schéma 119).



Conditions réactionnelles : a) ammonium formate supporté, Pd/C, *i*-PrOH/H₂O (1 : 5), μ W, 80 °C, 12 h. ; b) MeONa (1 M dans MeOH, 2 éq.), MeOH, TA, 18 h, 20% (2 étapes).

Schéma 119

Il est très important d'isoler et de bien purifier ce chitooligosaccharide car il est utilisé en tant que plateforme permettant l'accès à la TMG-chitotriomycin ou à des analogues de LCOs non sulfatés.

IV.C. Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre au point une nouvelle méthode de synthèse d'oligomères de *N*-acétyl-D-glucosamine possédant des liaisons β -1,4. Cette méthode consiste à utiliser des liquides ioniques supportés afin de changer les propriétés physico-chimiques des molécules et de s'affranchir des purifications par chromatographies sur gel de silice après chaque étape de glycosylation. Des conditions opératoires adaptées ont permis de synthétiser simplement des mono-, di- et tétrasaccharides avec de bons rendements et en effectuant seulement de simples lavages avec des solvants organiques comme étape de purification.

Nous avons utilisé cette stratégie de synthèse pour effectuer une nouvelle approche de synthèse totale de la TMG-chitotriomycin **223**, inhibiteur puissant et sélectif de β -*N*-

acétylglucosaminidases (GlcNAcase) d'insectes et de champignons, ou d'analogues de LCOs non sulfatés. Nous avons employé une nouvelle méthode d'hydrogénolyse utilisant un ammonium formate supporté sur résine et, grâce à cette méthode, nous avons pu isoler le chitooligosaccharide **270** permettant l'accès aux différents LCOs et à la TMG-chitotriomycin. Le chitooligosaccharide **270** a été purifié et les étapes d'acylations et de méthylation, déjà effectuées par l'équipe d'Halila²⁴⁶ en 2013 ou Beau²⁴⁷ en 2014, peuvent être reproduites sur cette plateforme afin d'accéder à des molécules d'intérêt biologiques. (Schéma 120).

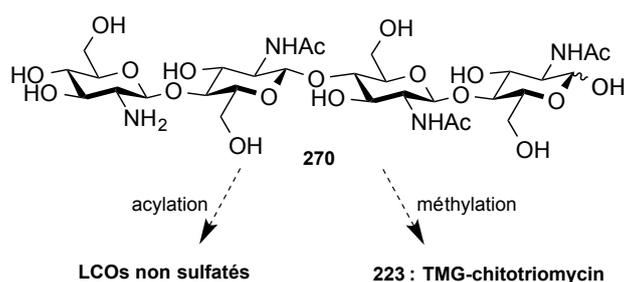


Schéma 120

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le premier chapitre, nous avons effectué la synthèse totale du facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97** isolé et identifié, en 2011 par l'équipe de Dénarié, comme étant le LCO le plus actif dans le phénomène de la mycorhization. L'assemblage convergent des blocs a été effectué en utilisant les méthodes d'activation des thioglycosides et des imidates de glycosyles et les disaccharides **99** et **100** ont été isolés avec de très bons rendements (76% et 97% respectivement). La méthodologie d'ouverture oxydante des acétals de 4,6-*O*-benzylidène utilisant le diméthylidioxirane (DMDO), mise au point au laboratoire, a pu être utilisée et a permis d'accéder à l'intermédiaire clé **120** de la synthèse. Un changement de solvant lors de la glycosylation 2 + 2 a amélioré le rendement de 46% à 61% lors de cette étape importante. La différenciation des fonctions du tétrasaccharide a permis d'effectuer la fonctionnalisation pour aboutir à la molécule cible **97**. Cela a comporté l'ajout d'un groupement sulfate sur l'unité réductrice, la transformation des *N*-phtalimidos en NHAc, la déprotection des fonctions hydroxy et de l'amine sur l'unité réductrice. L'intermédiaire **131** résultant possédant l'amine libre a été acylé sélectivement en utilisant les conditions de type Schotten-Baumann pour ne pas acyler les fonctions alcools. Le facteur [Myc-IV (C16:0, S)] **97** a été isolé après purification avec un rendement de 44% et caractérisé par RMN, LC/MS et MS/MS (Schéma 121).

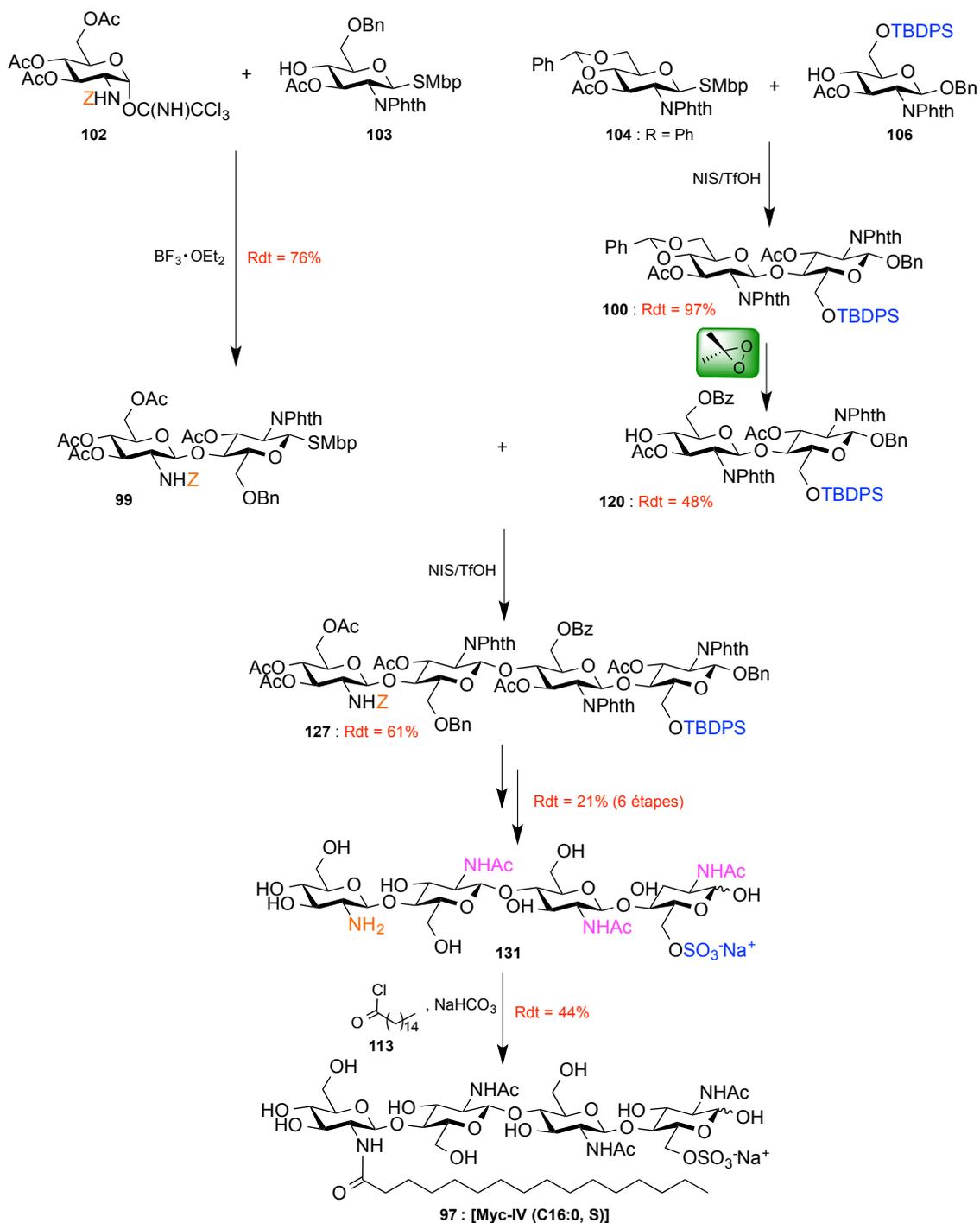


Schéma 121

Dans un second temps, une nouvelle méthode d'obtention d'oligomères de *N*-acétyl-D-glucosamine possédant des liaisons glycosidiques β -1,4 a été effectuée. L'utilisation de liquide ionique supporté a permis d'obtenir des molécules complexes sans avoir recours à des

purifications par chromatographie sur gel de silice. Le motif ionique sur la molécule influe sur les propriétés physico-chimiques de celle-ci, notamment sur sa solubilité, et permet de pouvoir purifier les composés synthétisés par des lavages avec des solvants adaptés, en l'occurrence ici des solvants apolaires ou peu polaires (diéthyl éther et toluène). Nous avons pu synthétiser grâce à cette méthode des mono- (ex : **255**), di- (ex : **264**) et tétrasaccharides (ex : **265**). Nous avons réalisé une nouvelle approche de synthèse de la TMG-chitotriomycin, inhibiteur puissant et sélectif des β -N-acétylglucosaminidases (GlcNAcase) d'insectes et de champignons. La fonctionnalisation du tétrasaccharide **265** a permis d'accéder au motif NHAc présents sur la molécule naturelle, sans purification par colonne chromatographique. Un travail sur les conditions d'hydrogénolyse a permis de mettre en évidence une méthode générant l'hydrogène *in situ* avec activation au micro-onde, beaucoup moins dangereuse et efficace afin de déprotéger le tétrasaccharide et d'isoler le chitooligosaccharide **270** après déprotection des acétates (Schéma 122).

➤ Perspectives :

Les travaux futurs consisteront à optimiser les dernières étapes de déprotections et notamment la purification, permettant l'accès à un CO précurseur d'analogues de LCOs non sulfatés et de la TMG-chitotriomycin. Ce qui permettrait d'effectuer des études de structure-activité permettant de mieux comprendre le fonctionnement des symbioses à *Rhizobia* ou avec les champignons endomycoriziens.

Compte tenu des problèmes rencontrés lors de la déprotection finale du liquide ionique, une étude sur la nature du lien entre le motif saccharidique et le motif ionique pourra être envisagée pour en faciliter son clivage, en utilisant par exemple un lien photolabile ou pouvant être clivé par oxydation.

Experimental Section

Experimental Section

GENERAL CONSIDERATIONS

All non-aqueous reactions were run under an inert atmosphere (argon), by using standard techniques for manipulating air-sensitive compounds. All glassware was stored in the oven and/or was flame-dried prior to use. All reagents and solvents were commercially available and were used without further purification.

Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on plates precoated with silica gel layers. Visualization of the developed chromatogram was followed by UV absorbance and/or by staining with Vanillin (15 g Vanillin, 500 mL EtOH, 2.5 mL H₂SO₄). Flash column chromatography was performed using 40-63 mesh silica. Eluent EIH was a solution of EtOAc/*i*-PrOH/H₂O 2:2:1.

Nuclear magnetic resonance spectra (¹H ; ¹³C) were recorded respectively at (300, 500 or 600; 75 or 125) MHz. Chemical shifts are reported in parts per million relative to an internal standard of residual chloroform ($\delta = 7.24$ ppm for ¹H NMR and 77.23 ppm for ¹³C NMR) or residual acetonitrile ($\delta = 1.94$ ppm for ¹H NMR and 118.69 ppm (CN) for ¹³C NMR). For the ¹H spectra, data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br s = broad singlet, br d = broad doublet, br t = broad triplet), coupling constant in Hz and integration.

Assignments were obtained using DEPT 135, COSY H-H, TOCSY H-H, HMQC and HMBC experiments.

IR spectra were reported in reciprocal centimeters (cm⁻¹).

Mass spectra (MS) and high-resolution mass spectra (HRMS) were determined by electrospray ionization (ESI) coupled to a time-of-flight analyser (Waters LCT Premier XE). UPLC was performed with an Acquity Waters UPLC system. Separation was achieved on a BEH C₁₈ column (1.7 μ m, 2.1 mm \times 50 mm) at a flow rate of 0.6 mL/min. Elution was conducted with a water/acetonitrile/formic acid gradient as follows: 94.95/4.95/0.1 to 0/99.9/0.1 in 5.5 min. The ionisation was carried out in positive or negative mode in the 80-

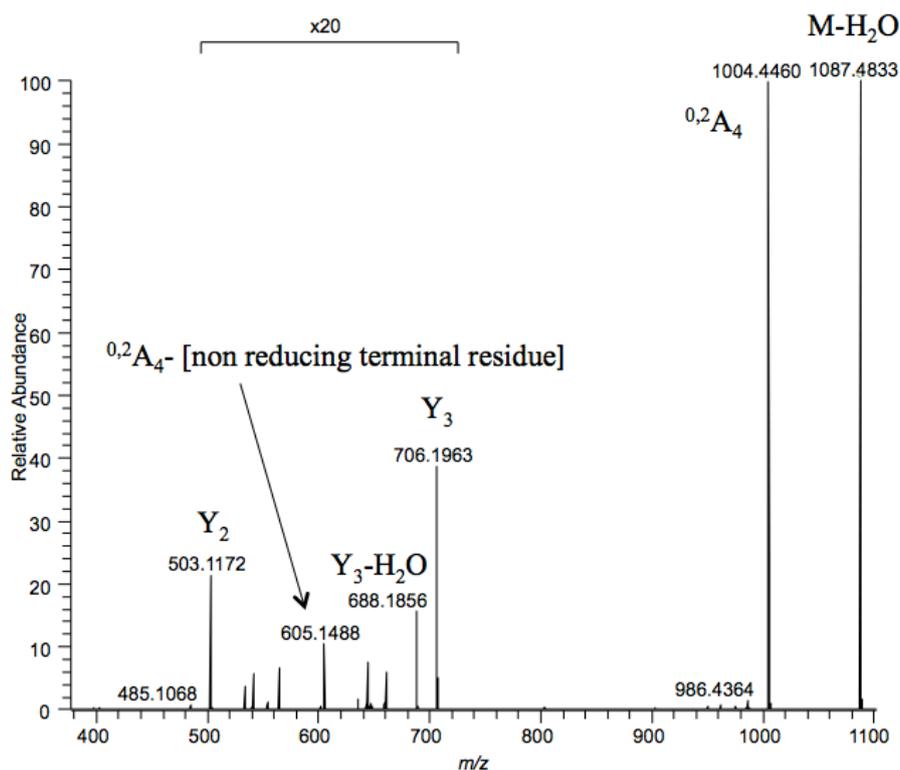
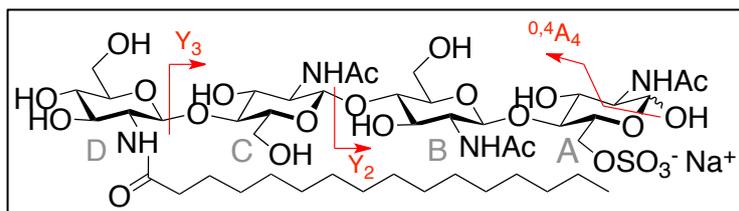
1500 m/z range. MALDI-TOF MS analyses were performed using a Voyager DE-STR mass spectrometer (AB Sciex, Les Ulis, France).

The MS/MS spectra were obtained with a hybrid linear trap/orbitrap mass spectrometer (LTQ-XL-Orbitrap[®], Thermo Scientific, Les Ulis, France) equipped with an electrospray ionisation source. The samples were prepared in a mixture methanol/water (50/50, v/v) for analysis. Mass resolution (FWHM) was 30000 for MS/MS experiments. The source parameters in the negative ion mode were as follows: spray voltage set at 3 kV, capillary voltage at -60 V and tube lens voltage at -100 V. The optimal collision energy was 30 a.u. and activation time was 30 ms. Mass measurements were obtained with a mass precision below 5 ppm using an external calibration.

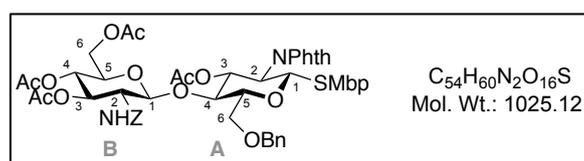
Optical rotations were determined using a cell of 1 dm-length path. Data are reported as follows: $[\alpha]_D^{\text{temp}}$, concentration (c in g/100 mL) and solvent.

Elemental analysis were performed with a CHNOS Perkin-Elmer analyser (Gif-sur-Yvette, ICSN).

MS/MS data :



(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) *O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-benzyloxy-carbonyl-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **98**.



103 (300 mg, 0.49 mmol, 1.0 eq.) and **102** (571 mg, 0.98 mmol, 2.0 eq.) were cooled in toluene (3.6 mL) at -78 °C. BF₃•OEt₂ (30 mL, 0.245 mmol, 0.5 eq.) was added dropwise to this solution. The reaction mixture was then stirred at this temperature for 2 h and warmed slowly to room temperature during a period of 5 h, then neutralized with triethylamine (200

mL). The volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 8:2 to 1:1) to give the disaccharide **98** (380 mg, 76 %) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{25}$: +5.3 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.94-7.82 (m, 4H, Ar), 7.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.45-7.32 (m, 9H, Ar), 7.29 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.25-7.18 (m, 1H, Ar), 7.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 5.62 (m, 1H, HA-3), 5.56 (d, *J*_{A-1,A-2} = 10.5 Hz, 1H, HA-1), 5.52-5.45 (m, 1H, NH), 5.19-5.02 (m, 3H, HB-3 + OCH₂Ph), 4.91 (t, *J*_{B-4,B-3} = *J*_{B-4,B-5} = 10.0 Hz, 1H, HB-4), 4.68-4.51 (m, 3H, HB-1 + CH₂Ph), 4.36-4.18 (m, 2H, HA-2 + HB-6), 4.06-3.91 (m, 2H, HA-4 + HB-6'), 3.69-3.56 (m, 3H, HA-6 + HA-6' + HB-5), 3.56-3.36 (m, 2H, HA-5 + HB-2), 2.18 (s, 3H, Me), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.92 (s, 3H, Ac), 1.86 (s, 3H, Ac), 1.26 (s, 9H, *t*-Bu).

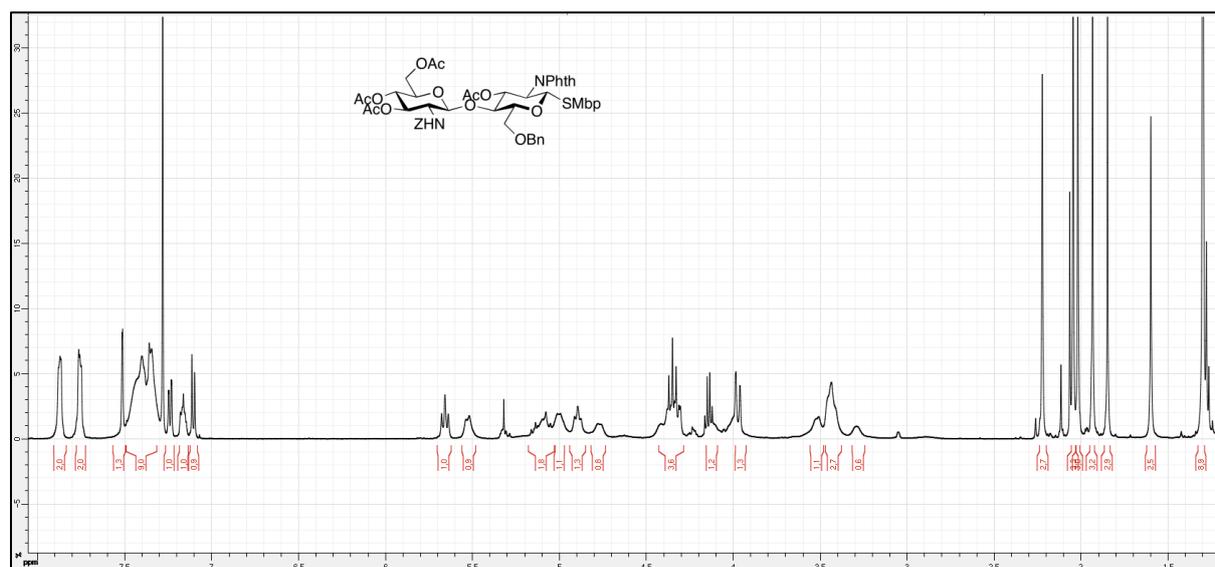
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 171.6 (2C, COMe), 171.4 (C, COMe), 170.9 (C, COMe), 163.9 (2C, N(CO)₂), 157.2 (C, NHCO), 139.9 (C, Ar), 138.5 (C, Ar), 138.4 (C, Ar), 136.3 (CH, Ar), 136.2 (CH, Ar), 132.8 (C, Ar), 132.5 (C, Ar), 131.7 (CH, Ar), 131.5 (CH, Ar), 129.9 (3CH, Ar), 129.7 (C, Ar), 129.4 (3CH, Ar), 129.1 (3CH, Ar), 127.0 (2CH, Ar), 125.0 (CH, Ar), 124.6 (CH, Ar), 122.3 (C, Ar), 101.7 (CH, CB-1), 85.4 (CH, CA-1), 79.9 (CH, CA-5), 76.3 (CH, CA-4), 74.1 (CH₂, CH₂Ph), 73.4 (CH, CA-3 or CB-3), 73.0 (CH, CA-3 or CB-3), 72.7 (CH, CB-5), 70.0 (CH, CB-4), 69.6 (CH₂, CA-6), 67.6 (CH₂, OCH₂Ph), 63.1 (CH₂, CB-6), 57.5 (CH, CB-2), 55.5 (CH, CA-2), 35.4 (C, *t*-Bu), 31.9 (3CH₃, *t*-Bu), 21.3 (3CH₃, Ac), 21.2 (CH₃, Ac), 20.8 (CH₃, Me).

IR ν (film, cm⁻¹): 3030, 2960, 2874, 2355, 1778, 1715, 1610.

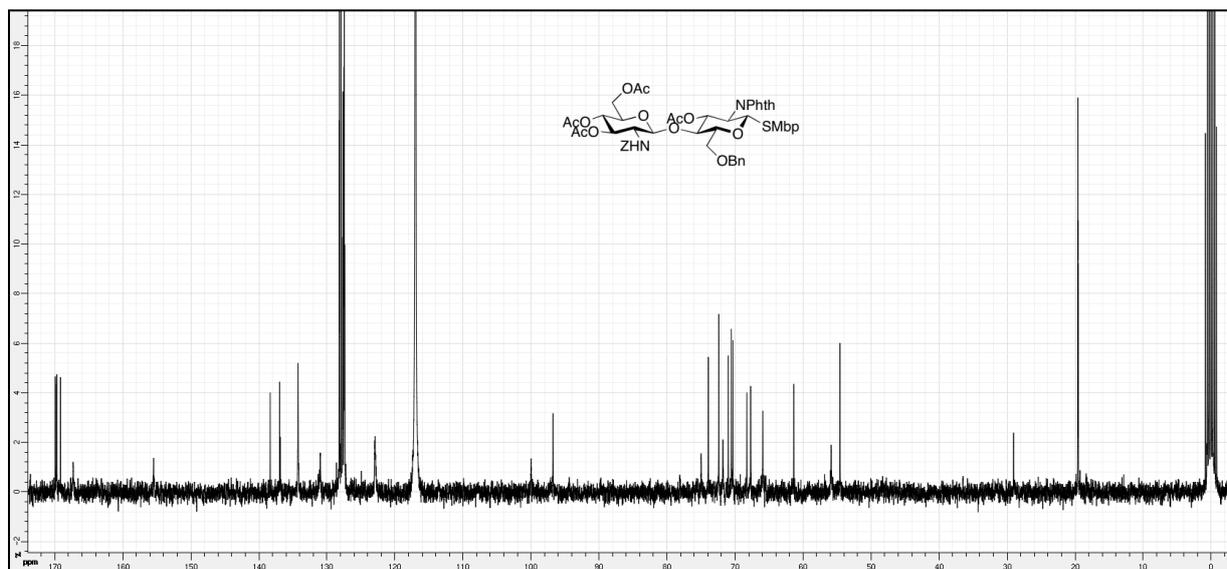
MS (ESI): *m/z* 1047 (MNa⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₅₄H₆₀N₂NaO₁₆S [M + Na]⁺: 1047.3687. Found: 1047.3645.

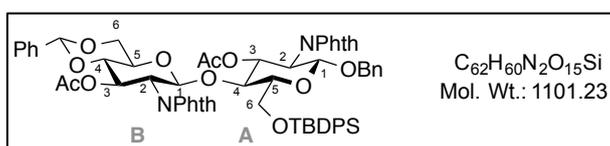
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):



^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):



(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) *O*-(3-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **100.**



106 (1.0 g, 1.47 mmol, 1.0 eq.) and **104** (1.30 g, 2.21 mmol, 1.5 eq.) in CH_2Cl_2 (5 mL) were stirred with molecular sieves 4\AA (0.8 g) at room temperature for 30 min. NIS (826 mg, 3.67 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled at $-10\text{ }^\circ\text{C}$. After addition of TfOH (19 mL, 0.22 mmol, 0.15 eq.), the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1.5 h. Molecular sieves were filtered and the filtrate was then poured into a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , extracted with CH_2Cl_2 , washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Toluene/Acetone 98:2 to 96:4) to give the disaccharide **100** (1.57 g, **97 %**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -0.5 (c 1.0, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.82-7.57 (m, 12H, Ar), 7.46-7.29 (m, 11H, Ar), 7.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, Ar), 7.04 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, Ar), 6.95 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, Ar), 5.81 (t, $J_{B-3,B-2} = J_{B-3,B-4} = 9.0$ Hz, 1H, HB-3), 5.70-5.65 (m, 1H, HA-3), 5.66 (d, $J_{B-1,B-2} = 8.0$ Hz, 1H, HB-1), 5.48 (s, 1H, CHPh), 5.22 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.0$ Hz, 1H, HA-1), 4.63 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.37 (dd, $J_{B-6,B-6'} = 10.5$ Hz, $J_{B-6,B-5} = 4.5$ Hz, 1H, HB-6), 4.28 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph),

4.20 (dd, $J_{A-2,A-3} = 10.5$ Hz, $J_{A-2,A-1} = 8.0$ Hz, 1H, **HA-2**), 4.19-4.13 (m, 2H, **HB-2** + **HA-4**), 3.79 (br d, $J_{A-6,A-6'} = 11.5$ Hz, 1H, **HA-6**), 3.75-3.65 (m, 2H, **HB-4** + **HB-6'**), 3.63 (dd, $J_{B-5,B-4} = 9.5$ Hz, $J_{B-5,B-6} = 4.5$ Hz, 1H, **HB-5**), 3.58 (dd, $J_{A-6',A-6} = 11.5$ Hz, $J_{A-6',A-5} = 4.0$ Hz, 1H, **HA-6'**), 3.41 (br dd, $J_{A-5,A-4} = 9.5$ Hz, $J_{A-5,A-6'} = 4.0$ Hz, 1H, **HA-5**), 1.94 (s, 3H, **Ac**), 1.84 (s, 3H, **Ac**), 1.06 (s, 9H, **t-Bu**).

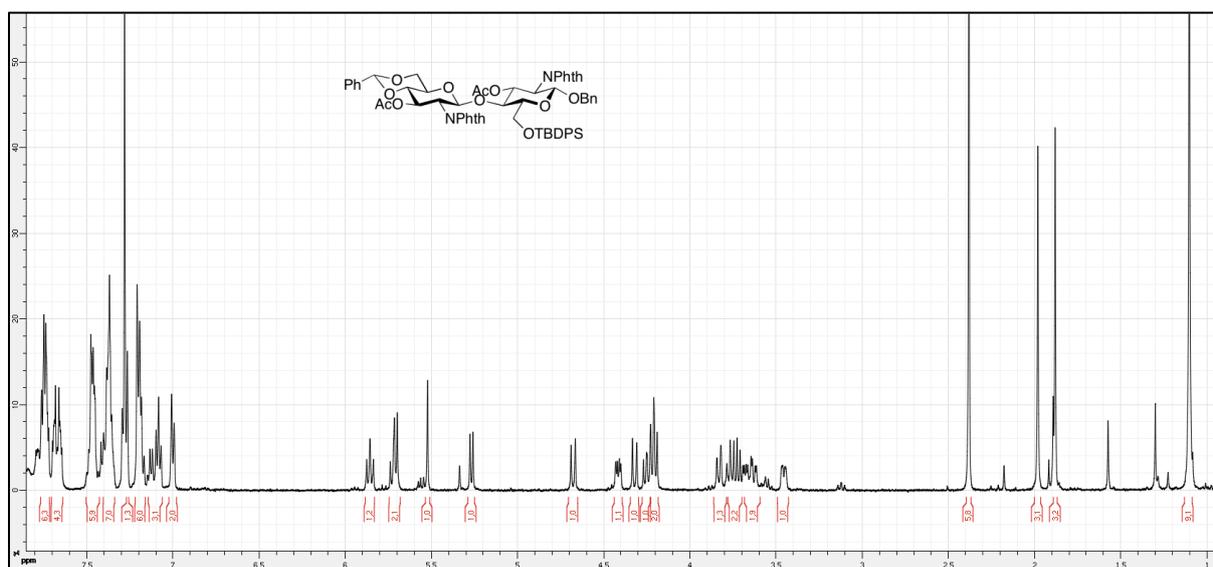
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.2 (C, COMe), 169.9 (C, COMe), 167.9 (4C, 2N(CO) $_2$), 137.2 (C, Ar), 137.0 (C, Ar), 136.3 (2CH, Ar), 136.1 (2CH, Ar), 134.4 (4CH, Ar), 133.8 (C, Ar), 133.4 (C, Ar), 131.8 (2C, Ar), 131.4 (2C, Ar), 129.9 (2CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 128.5 (2CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.8 (CH, Ar), 127.7 (2CH, Ar), 127.6 (2CH, Ar), 126.5 (2CH, Ar), 126.4 (CH, Ar), 123.8 (2CH, Ar), 123.6 (2CH, Ar), 101.9 (CH, CHPh), 97.5 (CH, **CB-1**), 96.7 (CH, **CA-1**), 79.5 (CH, **CB-4**), 75.3 (CH, **CA-5**), 74.2 (CH, **CA-4**), 71.8 (CH, **CA-3**), 70.5 (CH_2 , CH_2Ph), 69.9 (CH, **CB-3**), 68.9 (CH_2 , **CB-6**), 66.3 (CH, **CB-5**), 62.6 (CH_2 , **CA-6**), 55.9 (CH, **CB-2**), 55.3 (CH, **CA-2**), 27.1 (3CH_3 , **t-Bu**), 21.1 (CH_3 , **Ac**), 20.7 (CH_3 , **Ac**), 19.7 (C, **t-Bu**).

IR ν (film, cm^{-1}): 2955, 2911, 2852, 1779, 1747, 1720, 1387.

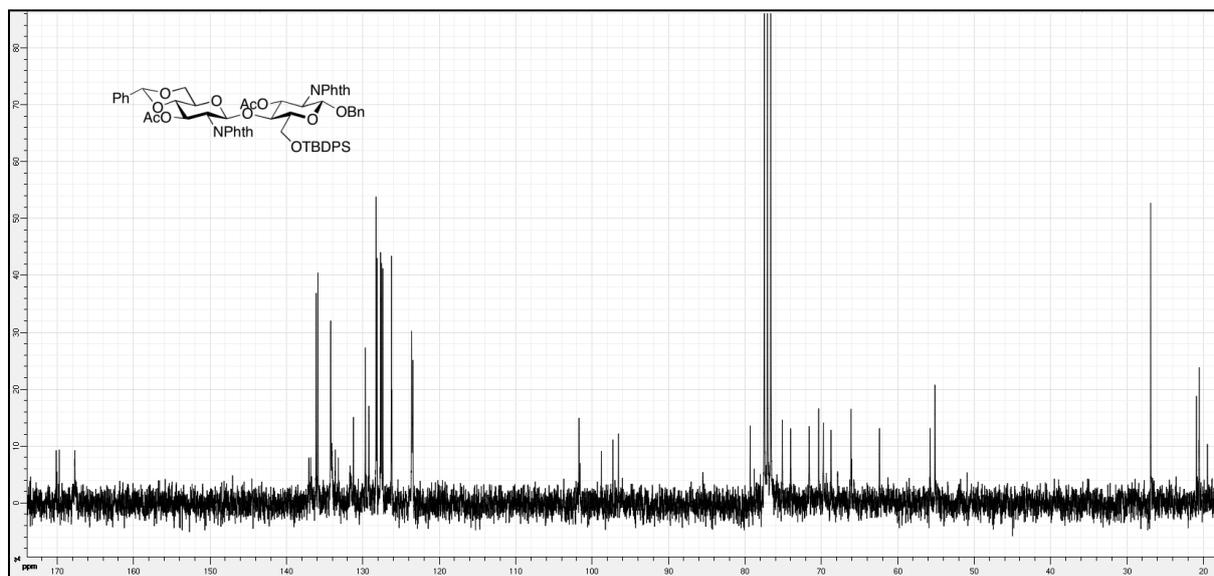
MS (ESI): m/z 1123 (MNa^+ , 35%).

HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{NaO}_{15}\text{Si}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 1123.3661. Found: 1123.3715.

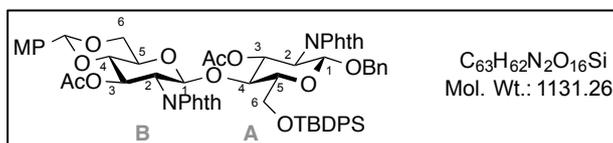
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):



^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):



Benzyl *O*-[3-*O*-acetyl-4,6-*O*-(4-methoxybenzylidene)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside **101.**



106 (1 g, 1.47 mmol, 1 eq.) and **105** (1.58 g, 2.50 mmol, 1.7 eq.) in CH_2Cl_2 (4.7 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (1.6 g) at room temperature for 1 h. NIS (826 mg, 3.67 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled at $-10\text{ }^\circ\text{C}$. After addition of TfOH (20 μL , 0.22 mmol, 0.15 eq.), the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1.5 h. Molecular sieves were filtered and the filtrate was then poured into a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , extracted with CH_2Cl_2 , washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 7:3 to 1:1) to give **101** (1.35 g, 81 %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +2.1 (c 1, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.84-7.67 (m, 8H, Ar), 7.67-7.68 (m, 4H, Ar), 7.47-7.39 (m, 3H, Ar), 7.39-7.29 (m, 5H, Ar), 7.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ar), 7.04 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar), 6.95 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, Ar), 6.85 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, Ar), 5.79 (t, $J_{B-3,B-2} = J_{B-3,B-4} = 9.0$ Hz, 1H, HB-3), 5.70-5.63 (m, 1H, HA-3), 5.66 (d, $J_{B-1,B-2} = 8.0$ Hz, 1H, HB-1), 5.44 (s, 1H,

MPhCH), 5.22 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.5$ Hz, 1H, **HA-1**), 4.63 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.35 (dd, $J_{B-6,B-6'} = 10.5$ Hz, $J_{B-6,B-5} = 4.5$ Hz, 1H, **HB-6**), 4.27 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.20 (dd, $J_{A-2,A-3} = 10.5$ Hz, $J_{A-2,A-1} = 8.5$ Hz, 1H, **HA-2**), 4.18-4.12 (m, 2H, **HA-4** + **HB-2**), 3.81-3.78 (m, 1H, **HA-6**), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.74-3.64 (m, 2H, **HB-4** + **HB6'**), 3.62 (dd, $J_{B-5,B-4} = 9.5$ Hz, $J_{B-5,B-6'} = 4.4$ Hz, 1H, **HB-5**), 3.58 (dd, $J_{A-6',A-6} = 12.0$ Hz, $J_{A-6',A-5} = 4.0$ Hz, 1H, **HA-6'**), 3.41 (dd, $J_{A-5,A-4} = 10.0$ Hz, $J_{A-5,A-6'} = 4.0$ Hz, 1H, **HA-5**), 1.93 (s, 3H, Ac), 1.83 (s, 3H, Ac), 1.06 (s, 9H, *t*-Bu).

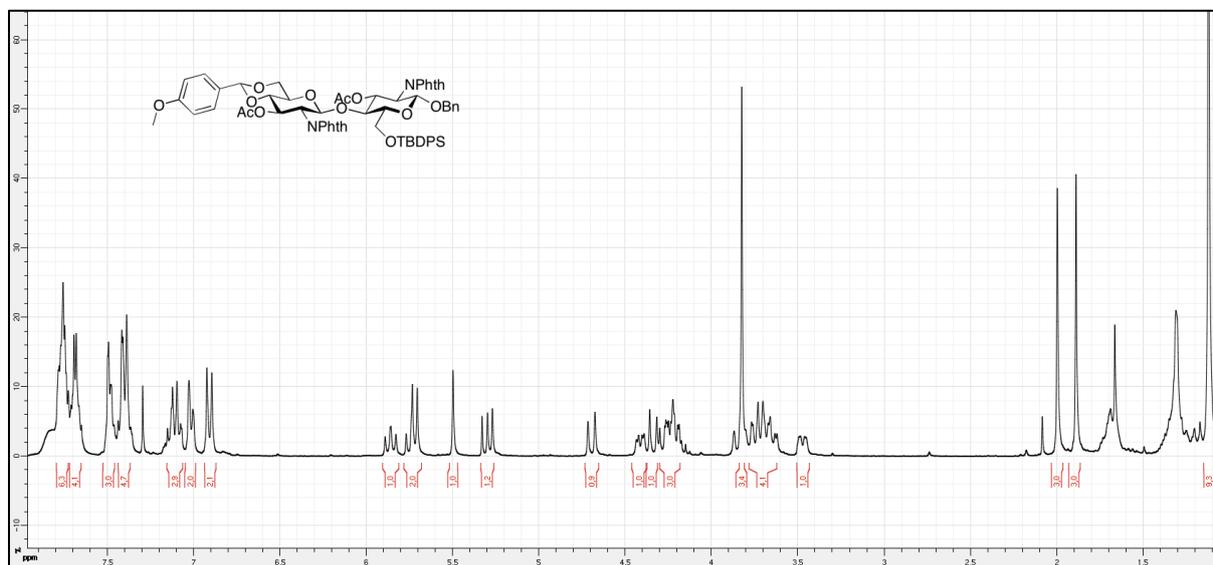
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.3 (C, COMe), 169.9 (C, COMe), 167.9 (3C, N(CO)₂ + NCO), 167.7 (C, NCO), 160.4 (C, COMe), 137.2 (C, Ar), 136.3 (2CH, Ar), 136.1 (2CH, Ar), 134.4 (2CH, Ar), 134.2 (2CH, Ar), 133.8 (C, Ar), 133.4 (C, Ar), 131.8 (C, Ar), 131.7 (C, Ar), 131.4 (2C, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.5 (C, Ar), 128.3 (2CH, Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.8 (3CH, Ar), 127.7 (3CH, Ar), 127.6 (2CH, Ar), 123.8 (2CH, Ar), 123.6 (2CH, Ar), 113.8 (2CH, Ar), 101.9 (CH, MPhCH), 97.4 (CH, **CB-1**), 96.7 (CH, **CA-1**), 79.4 (CH, **CB-4**), 75.3 (CH, **CA-5**), 74.2 (CH, **CA-4**), 71.8 (CH, **CA-3**), 70.5 (CH₂, CH₂Ph), 70.0 (CH, **CB-3**), 68.8 (CH₂, **CB-6**), 66.3 (CH, **CB-5**), 62.6 (CH₂, **CA-6**), 55.9 (CH, **CB-2**), 55.5 (CH₃, OMe), 55.3 (CH, **CA-2**), 27.1 (3CH₃, *t*-Bu), 21.1 (CH₃, Ac), 20.7 (CH₃, Ac), 19.7 (C, *t*-Bu).

IR ν (film, cm⁻¹): 2950, 2913, 1775, 1743, 1715, 1605.

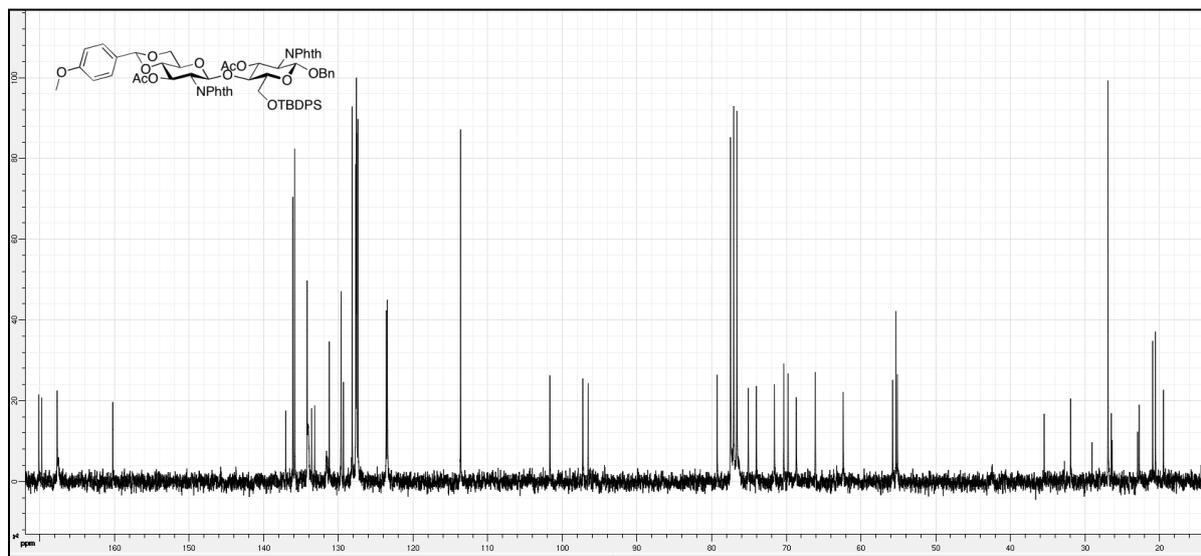
MS (ESI): m/z 1153 (MNa⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₆₃H₆₂N₂NaO₁₆Si [M + Na]⁺: 1153.3766. Found: 1153.3754.

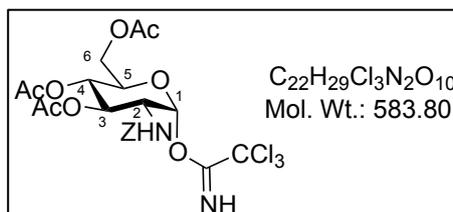
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):



^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):



3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate **102.**



112 (1.5 g, 3.11 mmol, 1.0 eq.) and BnNH_2 (494 mL, 4.52 mmol, 1.45 eq.) were stirred in THF (7 mL) for 15 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 1:1) to give 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-deoxy-D-glucopyranose (1.37 g, quant.) as a white solid. This resulting hemiacetal (1.17 g, 2.66 mmol), anhydrous K_2CO_3 (405 mg, 2.93 mmol, 1.1 eq.) and trichloroacetonitrile (2.67 mL, 26.6 mmol, 10 eq.) in CH_2Cl_2 (50 mL) were stirred at room temperature for 12 h then 15 min at 30 °C. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give donor **102** (1.1 g, **71** %) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +69.1 (c 1.5, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN) δ : 9.18 (s, 1H, NHCCl_3), 7.45-7.30 (m, 5H, Ar), 6.39 (d, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, 1H, **H-1**), 5.62 (d, $J_{\text{NH},\text{H}2} = 8.5$ Hz, 1H, NH), 5.29 (t, $J_{3,2} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, **H-3**), 5.22-5.07 (m, 3H, **H-4** + OCH_2Ph), 4.30-4.07 (m, 4H, **H-2** + **H-5** + **H-6** + **H-6'**), 2.03 (s, 6H, Ac), 1.96 (s, 3H, Ac).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ : 172.0 (C, COMe), 171.6 (C, COMe), 170.9 (C, COMe), 161.2 (C, NHCO), 157.3 (C, CNH), 138.4 (C, CCl_3), 129.9 (3CH, Ar), 129.4 (CH + C, Ar),

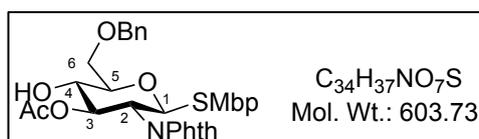
129.0 (CH, Ar), 95.9 (CH, C-1), 71.7 (2CH, C-3 + C-5), 69.3 (CH, C-4), 67.8 (CH₂, OCH₂Ph), 62.9 (CH₂, C-6), 54.7 (CH, C-2), 21.3 (2CH₃, Ac), 21.2 (CH₃, Ac).

IR ν (film, cm⁻¹): 3365, 3344, 3306, 2988, 2961, 2926, 1745, 1678.

MS (ESI): m/z 605 (MNa⁺, 20%), 422 (M-HOC(NH)CCl₃, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₂₂H₂₅Cl₃N₂NaO₁₀ [M + Na]⁺: 605.0472. Found: 605.0484.

(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **103.**



104 (1.4 g, 2.33 mmol) and trifluoroacetic acid (864 mL, 11.63 mmol, 5 eq.) in CH₂Cl₂ (23 mL) were cooled to 0 °C. Et₃SiH (1.85 mL, 11.63 mmol, 5 eq.) was added dropwise to the reaction mixture. It was then warmed to room temperature and stirred at this temperature for 8 h. The reaction mixture was poured into a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL), extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 8:2 to 6:4) to give the desired product **103** (1.07 g, 76 %) as a white solid.

[α]_D²⁵: +32.3 (*c* 1, CHCl₃).

Mp: 68.2-73.5 °C (Heptane/EtOAc).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.87-7.80 (m, 2H, NPhth), 7.75-7.69 (m, 2H, NPhth), 7.46 (d, J = 1.5 Hz, 1H, Ar), 7.36-7.27 (m, 5H, Ar), 7.16 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, Ar), 7.01 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar), 5.66 (dd, $J_{3,2}$ = 10.0 Hz, $J_{3,4}$ = 9.0 Hz, 1H, H-3), 5.62 (d, $J_{1,2}$ = 10.0 Hz, 1H, H-1), 4.58 (AB system, J = 12.0 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.34 (t, $J_{2,1}$ = $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, 1H, H-2), 3.88-3.81 (m, 2H, H-4 + H-6), 3.77 (dd, $J_{6',6}$ = 10.0 Hz, $J_{6',5}$ = 5.0 Hz, 1H, H-6'), 3.71 (dd, $J_{5,4}$ = 9.5 Hz, $J_{5,6'}$ = 5.0 Hz, 1H, H-5), 2.91 (d, $J_{OH,4}$ = 3.5 Hz, 1H, OH), 2.13 (s, 3H, Me), 1.90 (s, 3H, Ac), 1.22 (s, 9H, *t*-Bu).

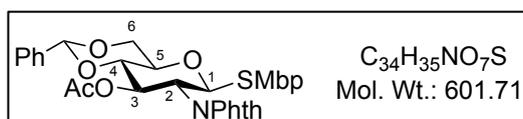
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 171.2 (C, CO), 168.0 (C, NCO), 167.5 (C, NCO), 149.7 (C, Ar), 137.7 (C, Ar), 137.4 (C, Ar), 134.6 (CH, NPhth), 134.4 (CH, NPhth), 131.9 (C, NPhth), 131.5 (C, NPhth), 131.3 (C, Ar), 130.9 (CH, Ar), 130.1 (CH, Ar), 128.7 (2CH, Ar), 128.1 (3CH, Ar), 125.6 (CH, Ar), 123.8 (2CH, NPhth), 84.4 (CH, C-1), 78.1 (CH, C-5), 74.5 (CH, C-3), 74.0 (CH₂, CH₂Ph), 71.7 (CH, C-4), 70.5 (CH₂, C-6), 54.0 (CH, C-2), 34.6 (C, *t*-Bu), 31.4 (3CH₃, *t*-Bu), 20.9 (CH₃, Ac), 20.5 (CH₃, Me).

IR ν (film, cm⁻¹): 3472, 3063, 3036, 2964, 3908, 2865, 1776, 1742, 1715, 1611.

MS (ESI): m/z 621 (MNH₄⁺, 60%).

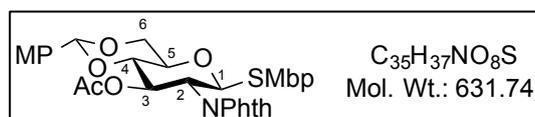
HRMS (ESI): Calcd for C₃₄H₄₁N₂O₇S [M + NH₄]⁺: 621.2634. Found: 621.2618.

(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **104.**



Acetyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside **113** (5 g, 10.47 mmol) and MbpSH **5** (2.89 mL, 15.71 mmol, 1.5 eq.) were cooled in CH₂Cl₂ (50 mL) at 0 °C. Boron trifluoride etherate (6.64 mL, 52.37 mmol, 5 eq.) was added dropwise to the solution. The reaction mixture was then warmed to room temperature and stirred at this temperature for 8 h. The reaction mixture was poured into a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (30 mL), extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give (2-methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside (5.74 g, **98 %**) as a beige solid. This compound (10.76 g, 18.0 mmol) was mixed with methanol (85 mL) and sodium methanolate (973 mg, 1 eq.) and the solution was stirred at room temperature during one hour. Dowex[®] (H⁺) was added and the suspension was stirred for 10 minutes. The mixture was filtered, well rinsed with methanol and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 3:7 to 0:1) to give (2-methyl-5-*tert*-butylphenyl) 2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **114** (8.49 g, **quant.**). To a solution of this triol **114** and TsOH monohydrate (775 mg, 4.50 mmol, 0.25 eq.) in MeCN (120 mL), was added dropwise PhCH(OMe)₂ (16.5 mL, 109.8 mmol, 6.1 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 8 h. 3 drops of triethylamine were added and the volatiles were evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 7:3) to give (2-methyl-5-*tert*-butylphenyl) 4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside (9.07 g, **90 %**). (2-methyl-5-*tert*-butylphenyl) 4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside (6.90 g, 12.33 mmol) and acetic anhydride (6.93 mL, 74.0 mmol, 6 eq.) in pyridine (100 mL) were stirred at room temperature for 8 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure by coevaporation with toluene and the crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 8:2 to 1:1) to give the desired product **104**¹⁰⁰ (7.42 g, **quant.**) as a white solid.

(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3-*O*-acetyl-4,6-*O*-(4-methoxybenzylidene)-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **105.**



To a solution of the crude triol **114** (8.45 g, 17.92 mmol, 1 eq.) and TsOH monohydrate (771 mg, 4.48 mmol, 0.25 eq.) in MeCN (150 mL), was added dropwise MPCH(OMe)₂ (18.6 mL, 109.3 mmol, 6.1 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. 3 drops of triethylamine were added and the volatiles were evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 7:3) to give (2-methyl-5-*tert*-butylphenyl) 4,6-*O*-(4-methoxybenzylidene)-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside (10 g, **95 %**). This intermediate and acetic anhydride (9.53 mL, 101.7 mmol, 6 eq.) in pyridine (140 mL) were stirred at room temperature for 8 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure by coevaporation with toluene and the crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 8:2 to 1:1) to give the desired product **105** (7.2 g, **quant.**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{25}$: +35.1 (*c* 1.5, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.88-7.82 (m, 2H, NPhth), 7.75-7.70 (m, 2H, NPhth), 7.45 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ph), 7.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ph), 7.18 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ph), 7.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ph), 6.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ph), 5.88 (t, *J*_{3,2} = *J*_{3,4} = 10.5 Hz, 1H, H-3), 5.72 (d, *J*_{1,2} = 10.5 Hz, 1H, H-1), 5.49 (s, 1H, PhCH), 4.40 (br t, *J*_{2,1} = *J*_{2,3} = 10.5 Hz, 1H, H-2), 4.36 (dd, *J*_{6,6'} = 10.5 Hz, *J*_{6,5} = 4.0 Hz, 1H, H-6), 3.83 (t, *J*_{4,3} = *J*_{4,5} = 10.5 Hz, 1H, H-4), 3.79-3.73 (m, 5H, H-5 + H-6' + OMe), 2.13 (s, 3H, Me), 1.86 (s, 3H, Ac), 1.25 (s, 9H, *t*-Bu).

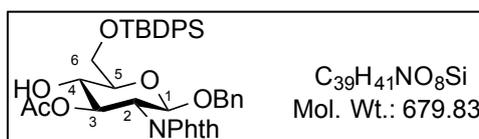
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.4 (C, COMe), 168.0 (C, NCO), 167.5 (C, NCO), 160.4 (C, Ph), 149.8 (C, Ph), 137.4 (C, Ph), 134.7 (CH, NPhth), 134.4 (CH, NPhth), 131.9 (C, Ph), 131.1 (C, Ph), 130.8 (CH, Ph), 130.2 (CH, Ph), 129.6 (C, NPhth), 127.8 (2CH, Ph), 125.8 (CH, Ph), 123.8 (2CH, NPhth), 117.1 (C, NPhth), 113.8 (2CH, Ph), 101.9 (CH, CHPh), 84.9 (CH, C-1), 79.3 (CH, C4), 70.9 (CH, C-3), 70.7 (CH, C-5), 68.8 (CH₂, C-6), 55.5 (CH₃, OMe), 54.7 (CH, C-2), 34.6 (C, *t*-Bu), 31.4 (3CH₃, *t*-Bu), 20.8 (CH₃, Ac), 20.4 (CH₃, Me).

IR ν (film, cm⁻¹): 3196, 2962, 2874, 2338, 1776, 1749, 1718, 1614.

MS (ESI): *m/z* 632 (MH⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₃₅H₃₇NO₈S [M + H]⁺: 632.2318. Found: 632.2309.

Benzyl 3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **106.**



115 (9.86 g, 18.62 mmol) and 60% aqueous AcOH (400 mL) were stirred at 100 °C for 1 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 4:6 to 0:1) to give Benzyl 3-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside²⁵³ (7.6 g, **92 %**) as an amorphous white solid. This diol (5.10 g, 11.55 mmol), imidazole (1.02 g, 15.02 mmol, 1.3 eq.) and TBDPSCl (3.61 mL, 13.86 mmol, 1.2 eq.) in DMF (7 mL) were stirred at room temperature for 8 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 9:1 to 7:3) to give the desired product **106** (7.80 g, **99 %**) as an amorphous white solid.

[α]_D²⁵: -30.0 (*c* 1, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.86-7.67 (m, 8H, **NPhth** + **Ar**), 7.47-7.35 (m, 6H, **Ar**), 7.12-7.00 (m, 5H, **Ar**), 5.65 (t, $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, 1H, **H-3**), 5.34 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.77 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.47 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.26 (dd, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 1H, **H-2**), 4.00-3.96 (m, 2H, **H-6** + **H-6'**), 3.88 (dt, $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.5$ Hz, $J_{4,OH} = 3.0$ Hz, 1H, **H-4**), 3.68-3.61 (m, 1H, **H-5**), 3.02 (d, $J_{OH,4} = 3.0$ Hz, 1H, **OH**), 1.93 (s, 3H, **Ac**), 1.08 (s, 9H, ***t*-Bu**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 171.4 (C, **COMe**), 167.9 (2C, **N(CO)₂**), 137.2 (C, **Ar**), 135.9 (2CH, **Ar**), 135.8 (2CH, **Ar**), 134.3 (2CH, **NPhth**), 133.1 (C, **Ar**), 133.0 (C, **Ar**), 131.7 (2C, **NPhth**), 130.1 (2CH, **Ar**), 128.4 (2CH, **Ar**), 128.1 (2CH, **Ar**), 128.0 (2CH, **Ar**), 127.9 (CH, **Ar**), 127.8 (2CH, **Ar**), 123.7 (2CH, **NPhth**), 97.2 (CH, **C-1**), 75.0 (CH, **C-5**), 73.9 (CH, **C-3**), 72.0 (CH, **C-4**), 71.0 (CH₂, **CH₂Ph**), 64.9 (CH₂, **C-6**), 54.9 (CH, **C-2**), 27.1 (3CH₃, ***t*-Bu**), 21.0 (CH₃, **Ac**), 19.5 (C, ***t*-Bu**).

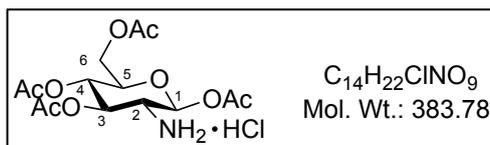
IR ν (film, cm⁻¹): 3478, 3069, 3028, 2931, 2857, 1777, 1746, 1714, 1613.

MS (ESI): *m/z* 702 (MNa⁺, 100%).

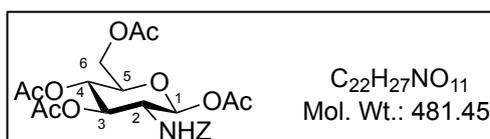
HRMS (ESI): Calcd for C₃₉H₄₁NNaO₈Si [M + Na]⁺: 702.2499. Found: 702.2531.

Elementary Analysis: Calcd for C₃₉H₄₁NO₈Si: C, 68.90; H, 6.08. Found: C, 68.80; H, 6.13.

²⁵³ Kondo, H.; Aoki, S.; Ichikawa, Y.; Halcomb, R. L.; Ritzen, H.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 864-877.

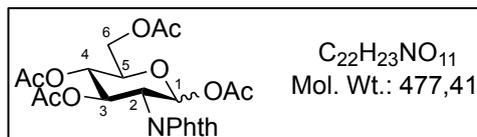
1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose hydrochloride 110.

To a solution of D-glucosamine hydrochloride **107** (25 g, 120 mmol, 1.0 eq.) in a freshly prepared aqueous solution of 1 M NaOH (120 mL) under stirring was added *p*-anisaldehyde (17 mL, 140 mmol, 1.2 eq.). After a short time crystallization began. Then the mixture was refrigerated and after 2 h the precipitated product was filtered off and washed with cold water, and followed by a mixture of EtOH/Et₂O (1:1). The solid was dried over P₂O₅ and under reduced pressure for 8 h to give 2-deoxy-2-[*p*-methoxybenzylidene(amino)]-D-glucopyranose **108** (35.7 g, **quant.**). To a solution of **108** (60.4 g, 204 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (321 mL) was added dropwise acetic anhydride (177 mL). The reaction mixture was stirred in ice-bath for 1 h and then at room temperature for 8 h. The yellow solution was poured into 1200 mL of ice-water. The precipitated white product was filtered, washed with cold water and dried over P₂O₅ to give acetyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-[*p*-methoxybenzylidene(amino)]-D-glucopyranoside **109** (95.7 g, **quant.**) as a white solid. Subsequently this compound (95.7 g, 204 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in warm acetone (840 mL), and then HCl (5 M, 46.7 mL) was added with immediate formation of a precipitate. The mixture was cooled, and after addition of Et₂O (900 mL), it was stirred for 2 h and refrigerated overnight. The precipitated product was filtered, washed with Et₂O and dried to give **110**^{143,254} (62.2 g, **79 %**) as a white solid.

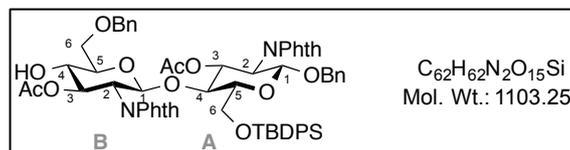
1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-deoxy-2-formamido- β -glucopyranose 112.

To a solution of **110** (10 g, 26.1 mmol, 1.0 eq.) in a 1:2 CH₂Cl₂-saturated aqueous solution of NaHCO₃ (380 mL) was added dropwise ZCl (4.1 mL, 28.6 mmol, 1.1 eq.). The reaction was stirred at room temperature for 2 h and then the organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:1 to 0:1) to give the desired product **112**¹⁴⁴ (10.5 g, **88 %**) as a white solid.

²⁵⁴ a) Kiso, M.; Anderson, L. *Carbohydr. Res.* **1985**, *136*, 309-323. b) Dasgupta, F.; Anderson, L. *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 239-255.

Acetyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-phthalimido- α,β -D-glucopyranoside 113.


To a solution of D-glucosamine hydrochloride **107** (40 g, 185.6 mmol, 1.0 eq.) in water (300 mL) were successively added phthalic anhydride (55 g, 372 mmol, 2.0 eq.) and NaHCO₃ (46 g, 548 mmol, 2.95 eq.). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 12 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure by coevaporation with toluene. The residue obtained was used without any further purification. Acetic anhydride (229 mL, 2445 mmol, 13.2 eq.) was added to a solution of crude intermediate in pyridine (350 mL) and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 10 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure by coevaporation with toluene. The residue was diluted with CH₂Cl₂ (600 mL), washed with water (3 x 120 mL), brine (100 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 7:3 to 3:7) to give the desired product **113**¹⁴⁵ (83 g, **93 %**, α/β : 1:2.3) as a yellow solid.

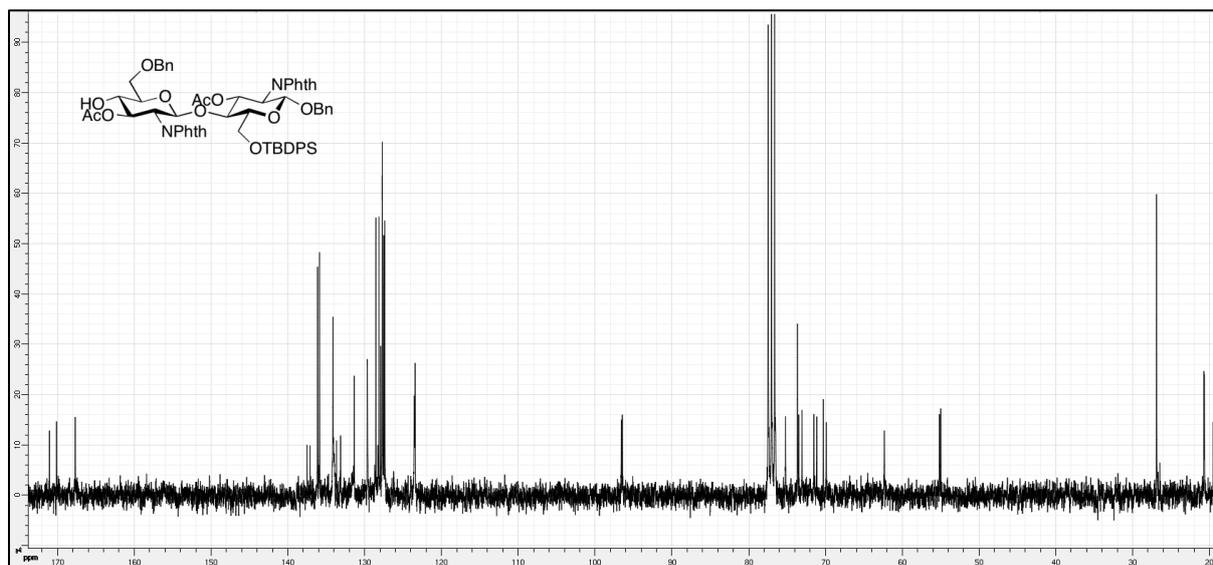
Benzyl *O*-(3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1→4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside 117.


100 (628 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) and triethylsilane (180 μ L, 1.14 mmol, 2 eq.) were cooled at 0 °C in CH₂Cl₂ (910 μ L). A solution of copper (II) triflate (24 mg, 0.114 mmol, 0.2 eq.) in acetonitrile (230 μ L) was added to the reaction mixture which was then warmed to room temperature and stirred at this temperature for 3 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure and purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 8:2 to 1:1) to give the desired product **117** (141 mg, **22 %**) as an amorphous white solid.

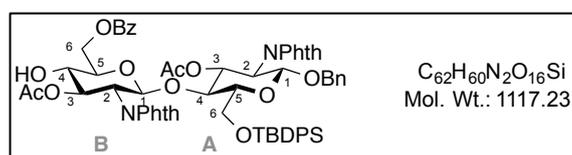
$[\alpha]_D^{27}$: -1.67 (*c* 0.54, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.82-7.71 (m, 6H, Ar), 7.71-7.65 (m, 4H, Ar), 7.65-7.60 (m, 2H, Ar), 7.45-7.40 (m, 3H, Ar), 7.38-7.28 (m, 8H, Ar), 7.11-7.06 (m, 1H, Ar), 7.04 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 6.96 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 5.65 (dd, *J*_{A-3,A-4} = 10.5 Hz, *J*_{A-3,A-2} = 9.0 Hz, 1H, HA-3), 5.60-5.55 (m, 2H, HB-1 + HB-3), 5.20 (d, *J*_{A-1,A-2} = 8.5 Hz, 1H, HA-1), 4.65 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.55 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.28 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H,

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):



Benzyl *O*-(3-*O*-acetyl-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-gluco-pyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **120.**



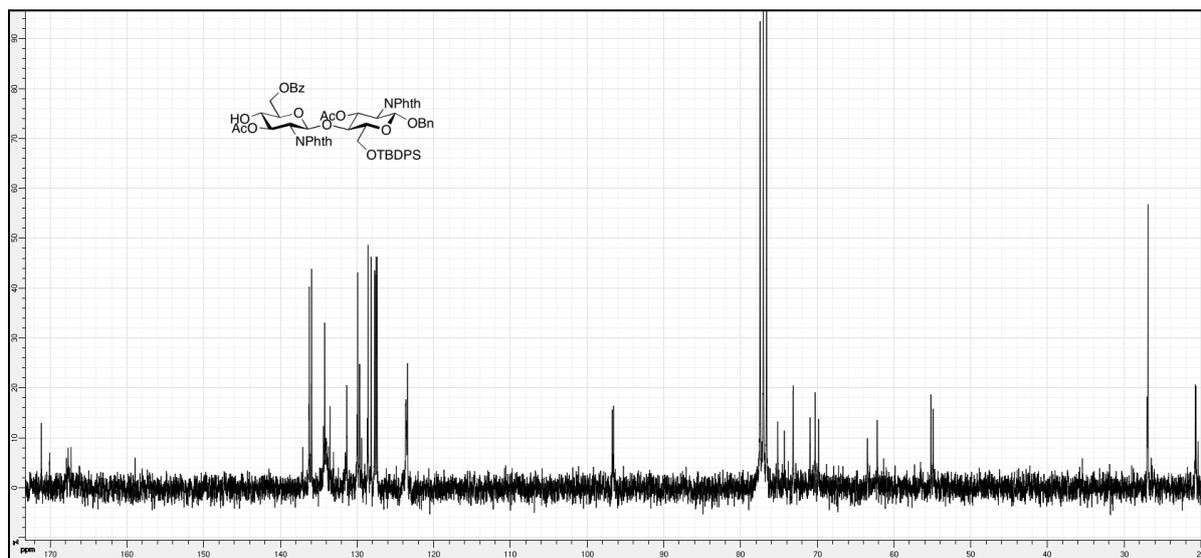
Benzylidene acetal **100** (485 mg, 0.44 mmol) in a solution of freshly distilled dimethyldioxirane²⁵⁵ in acetone (22 mL \approx 0.1 M) was stirred at 5 °C for 96 h. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 9:1 to 8:3) to give alcohol **120** (240 mg, **48 %**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +4.9 (*c* 1.0, CHCl_3).

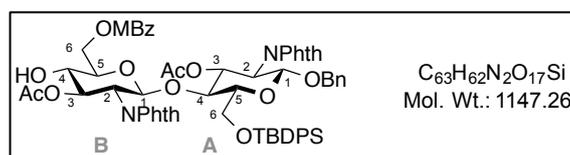
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.06 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, Ar), 7.84-7.61 (m, 13H, Ar), 7.57 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, Ar), 7.49-7.40 (m, 5H, Ar), 7.39-7.27 (m, 3H, Ar), 7.12-7.01 (m, 3H, Ar), 6.96 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, Ar), 5.71-5.62 (m, 2H, **HA-3** + **HB-3**), 5.60 (d, $J_{B-1,B-2} = 8.0$ Hz, 1H, **HB-1**), 5.20 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.5$ Hz, 1H, **HA-1**), 4.73 (dd, $J_{B-6,B-6'} = 12.0$ Hz, $J_{B-6,B-5} = 3.5$ Hz, 1H, **HB-6**), 4.67-4.57 (m, 2H, **HB-6'** + CH_2Ph), 4.32 (t, $J_{A-4,A-3} = J_{A-4,A-5} = 9.5$ Hz, 1H, **HA-4**), 4.27 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.23 (dd, $J_{A-2,A-3} = 10.5$ Hz, $J_{A-2,A-1} = 8.5$ Hz, 1H, **HA-2**), 4.13 (dd, $J_{B-2,B-3} = 11.0$ Hz, $J_{B-2,B-1} = 8.0$ Hz, 1H, **HB-2**), 3.81 (br d, $J_{A-6,A-6'} = 11.0$ Hz, 1H,

²⁵⁵ Adam, W.; Bialas, J.; Hadjiarapoglou, L. *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 2377-2377.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):



Benzyl *O*-[3-*O*-acetyl-6-*O*-(4-methoxybenzoyl)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside **123.**



The same procedure as for **120** was applied to benzylidene acetal **101** (1.16 g, 1.03 mmol, 1 eq.). The crude material was purified by chromatography on silica gel (Toluene/Acetone 98:2 to 96:4) to give **123** (668 mg, **57** %), **124** (<50 mg, <**5**%) and **125** (<50 mg, <**5**%) as amorphous white solids.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +4.86 (c 1, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, Ar), 7.83-7.61 (m, 11H, Ar), 7.48-7.41 (m, 3H, Ar), 7.39-7.28 (m, 3H, Ar), 7.18-7.12 (m, 2H, Ar), 7.08 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, Ar), 7.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar), 7.00-6.91 (m, 3H, Ar), 5.68 (dd, $J_{A-3,A-2} = 10.5$ Hz, $J_{A-3,A-4} = 9.5$ Hz, 1H, HA-3), 5.65 (dd, $J_{B-3,B-2} = 10.5$ Hz, $J_{B-3,B-4} = 8.5$ Hz, 1H, HB-3), 5.60 (d, $J_{B-1,B-2} = 8.0$ Hz, 1H, HB-1), 5.21 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.5$ Hz, 1H, HA-1), 4.72 (dd, $J_{A-6,A-6'} = 12.0$ Hz, $J_{A-6,A-5} = 3.5$ Hz, 1H, HA-6), 4.64 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.56 (dd, $J_{B-6',B-6} = 12.0$ Hz, $J_{B-6',B-5} = 1.5$ Hz, 1H, HB-6'), 4.31 (t, $J_{A-4,A-3} = J_{A-4,A-5} = 9.5$ Hz, 1H, HA-4), 4.27 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.24 (dd, $J_{A-2,A-3} = 10.5$ Hz, $J_{A-2,A-1} = 8.5$ Hz, 1H, HA-2), 4.11 (dd, $J_{B-2,B-3} = 10.5$ Hz, $J_{B-2,B-1} = 8.0$ Hz, 1H, HB-2), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.81 (br d, $J_{A-6,A-6'} = 12.0$ Hz, 1H, HA-6), 3.73-3.59 (m, 3H, HA-6' + HB-4 + HB-5), 3.37 (dd, $J_{A-5,A-6} = 12.0$ Hz, $J_{A-5,A-4} = 9.5$ Hz, 1H,

HA-5), 3.23 (d, $J_{OH,HB-4} = 4.0$ Hz, 1H, OH), 1.88 (s, 3H, Ac), 1.86 (s, 3H, Ac), 1.07 (s, 9H, *t*-Bu).

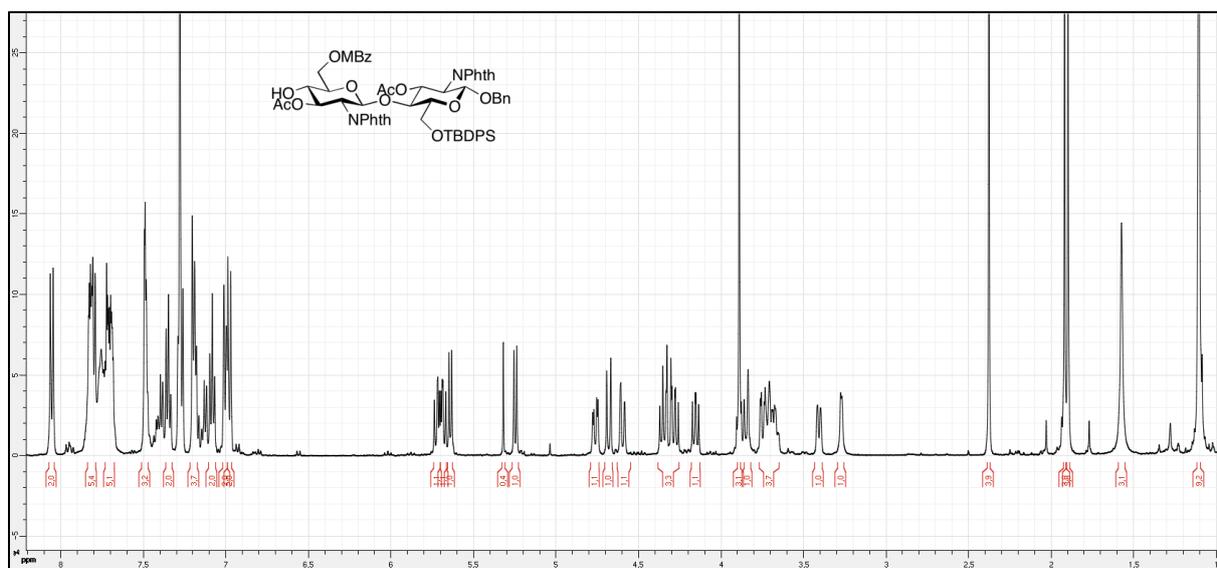
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 171.3 (C, COMe), 170.3 (C, COMe), 167.8 (2C, $\text{N}(\text{CO})_2$), 167.7 (2C, $\text{N}(\text{CO})_2$), 167.3 (C, COMPh), 164.1 (C, COMe(Ar)), 137.3 (C, Ar), 136.4 (2CH, Ar), 136.1 (2CH, Ar), 134.4 (CH, Ar), 133.9 (C, Ar), 133.3 (C, Ar), 132.3 (2CH, Ar), 131.5 (2C, Ar), 129.9 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 128.4 (CH, Ar), 128.3 (3CH, Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.7 (3CH, Ar), 127.6 (2CH, Ar), 125.5 (C, Ar), 123.8 (2CH, Ar), 123.6 (2CH, Ar), 121.8 (2C, Ar), 114.0 (2CH, Ar), 97.0 (CH, CB-1), 96.7 (CH, CA-1), 75.4 (CH, CA-5), 74.6 (CH, CB-5), 73.4 (CH, CA-4), 73.2 (CH, CB-3), 71.2 (CH, CA-3), 70.5 (CH_2 , CH_2Ph), 69.9 (CH, CB-4), 63.4 (CH_2 , CB-6), 62.4 (CH_2 , CA-6), 55.7 (CH_3 , OMe), 55.4 (CH, CA-2), 55.1 (CH, CB-2), 27.1 (3 CH_3 , *t*-Bu), 21.0 (CH_3 , Ac), 20.8 (CH_3 , Ac), 19.7 (C, *t*-Bu).

IR ν (film, cm^{-1}): 2931, 1777, 1746, 1715, 1605, 1384, 1255, 1227, 1040, 720, 698.

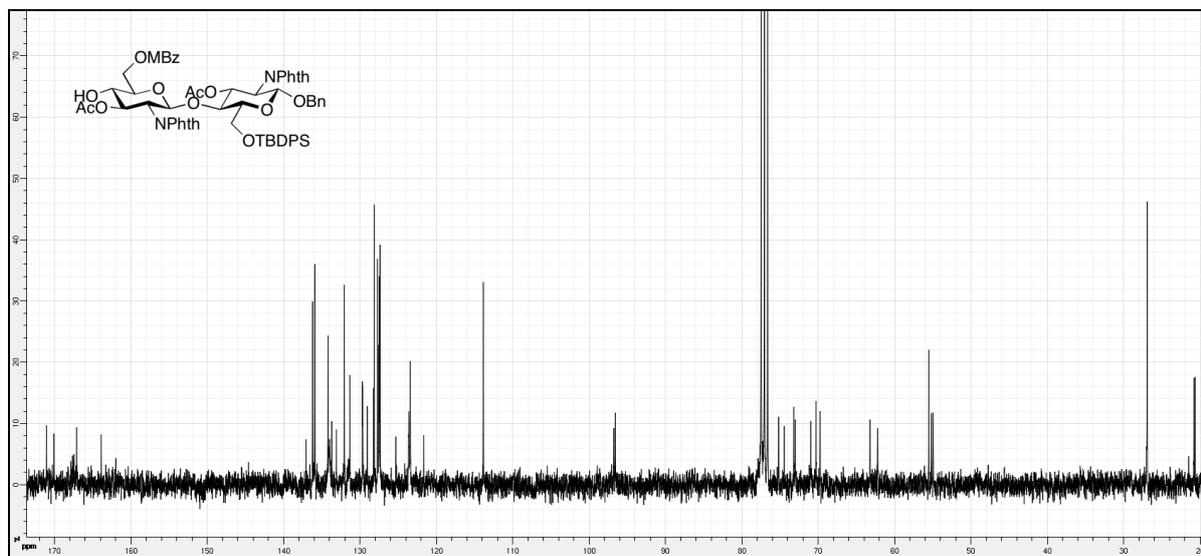
MS (ESI): m/z 1164 (MNH_4^+ , 100%).

HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{NaO}_{17}\text{Si}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 1169.3715. Found: 1169.3739.

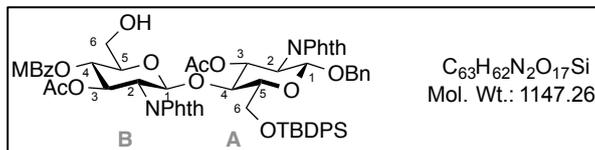
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):



^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):



Benzyl *O*-[3-*O*-acetyl-4-*O*-(4-methoxybenzoyl)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside 124.



$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +1.20 (c 1, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, Ar), 7.87-7.67 (m, 11H, Ar), 7.53-7.47 (m, 3H, Ar), 7.45-7.38 (m, 3H, Ar), 7.22-7.20 (m, 3H, Ar), 7.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ar), 7.05-7.00 (m, 2H, Ar), 6.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, Ar), 6.03 (dd, $J_{A-3,A-2} = 10.5$ Hz, $J_{A-3,A-4} = 9.0$ Hz, 1H, HA-3), 5.76 (dd, $J_{B-3,B-2} = 10.5$ Hz, $J_{B-3,B-4} = 9.0$ Hz, 1H, HB-3), 5.72 (d, $J_{B-1,B-2} = 8.0$ Hz, 1H, HB-1), 5.30-5.21 (dd, $J_{B-4,B-3} = 9.0$ Hz, $J_{B-4,B-5} = 9.5$ Hz, 1H, HB-4), 5.28 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.5$ Hz, 1H, HA-1), 4.71 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 4.38-4.28 (m, 4H, CH_2Ph + HA-2 + HA-4 + HB-2), 3.89 (s, 3H, OMe), 3.77-3.65 (m, 5H, HA-6 + HA-6' + HB-5 + HB-6 + HB-6'), 3.55-3.48 (m, 1H, HA-5), 2.84 (br s, 1H, OH), 2.06 (s, 3H, Ac), 1.78 (s, 3H, Ac), 1.13 (s, 9H, *t*-Bu).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.6 (C, COMe), 170.1 (C, COMe), 167.7 (2C, $\text{N}(\text{CO})_2$), 167.6 (2C, $\text{N}(\text{CO})_2$), 165.9 (C, COMPh), 164.1 (C, COMe(Ar)), 137.0 (C, Ar), 136.1 (2CH, Ar), 135.9 (2CH, Ar), 134.4 (CH, Ar), 134.3 (C, Ar), 133.9 (C, Ar), 132.1 (2CH, Ar), 131.2 (2C, Ar), 129.7 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 129.0 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 128.1 (3CH, Ar), 127.7 (2CH, Ar), 127.6 (3CH, Ar), 127.4 (2CH, Ar), 125.3 (C, Ar), 123.7 (2CH, Ar), 123.5 (2CH, Ar), 120.8 (2C, Ar), 113.9 (2CH, Ar), 96.8 (CH, CA-1), 96.4 (CH, CB-1), 75.2

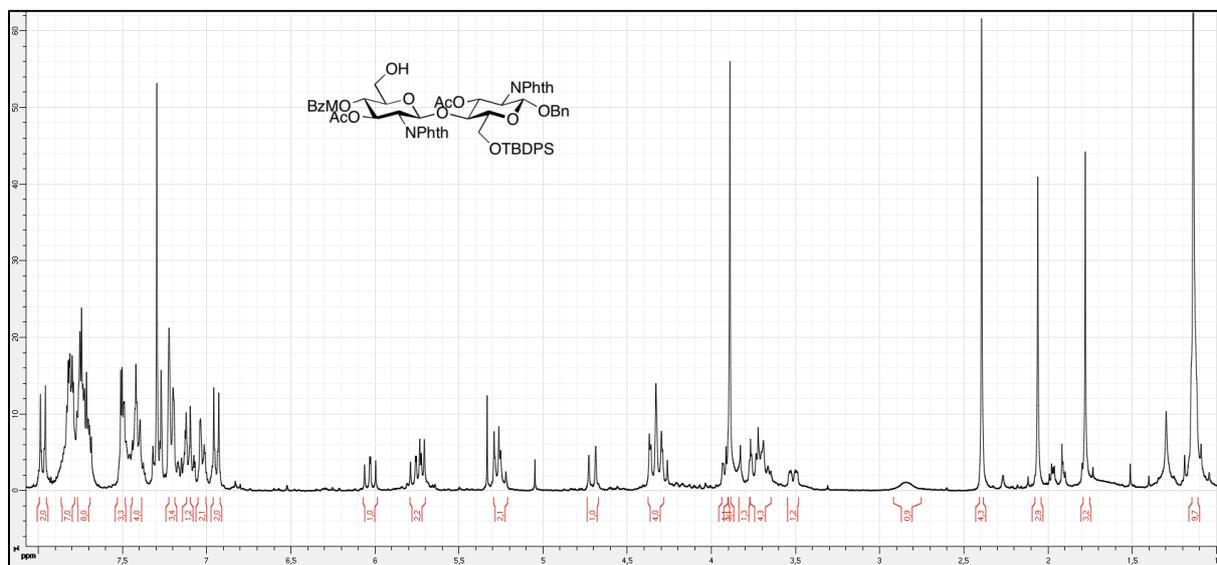
(CH, CA-5), 74.6 (CH, CB-5), 73.3 (CH, CA-4), 71.4 (CH, CB-3), 70.3 (CH, CA-3), 70.2 (CH₂, CH₂Ph), 69.4 (CH, CB-4), 62.4 (CH₂, CB-6), 61.2 (CH₂, CA-6), 55.6 (CH₃, OMe), 55.0 (CH, CA-2), 54.8 (CH, CB-2), 26.9 (3CH₃, *t*-Bu), 20.7 (CH₃, Ac), 20.3 (CH₃, Ac), 19.5 (C, *t*-Bu).

IR ν (film, cm⁻¹): 2932, 1777, 1745, 1714, 1605, 1384, 1256, 1223, 1072, 1027, 719, 700.

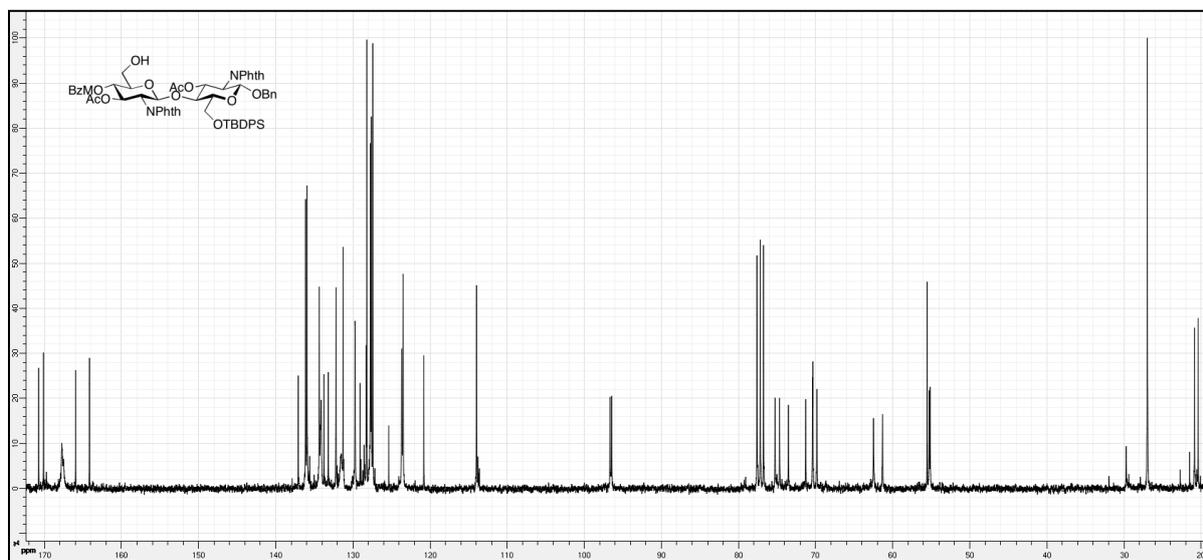
MS (ESI): m/z 1164 (MNH₄⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₆₃H₆₂N₂NaO₁₇Si [M + Na]⁺: 1169.3715. Found: 1169.3737.

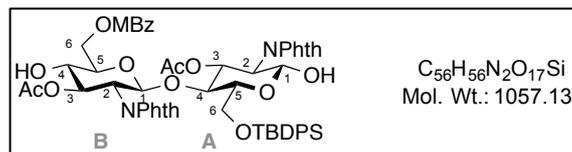
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):



¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):



***O*-[3-*O*-acetyl-6-*O*-(4-methoxybenzoyl)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranose 125.**



$[\alpha]_D^{25}$: -291,96 (*c* 0,51, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar), 7.87-7.71 (m, 11H, Ar), 7.51-7.46 (m, 3H, Ar), 7.45-7.41 (m, 2H, Ar), 7.23-7.19 (m, 2H, Ar), 7.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar), 5.76 (dd, *J*_{A-3,A-2} = 10.5 Hz, *J*_{A-3,A-4} = 9.0 Hz, 1H, HA-3), 5.70 (dd, *J*_{B-3,B-2} = 11.0 Hz, *J*_{B-3,B-4} = 8.5 Hz, 1H, HB-3), 5.63 (d, *J*_{B-1,B-2} = 8.5 Hz, 1H, HB-1), 5.33 (s, 1H, HA-1), 4.76 (dd, *J*_{B-6,B-6'} = 12.0 Hz, *J*_{B-6,B-5} = 3.5 Hz, 1H, HB-6), 4.64 (dd, *J*_{B-6',B-6} = 12.0 Hz, *J*_{B-6',B-5} = 1.5 Hz, 1H, HB-6'), 4.25 (t, *J*_{A-4,A-3} = *J*_{A-4,A-5} = 7.5 Hz, 1H, HA-4), 4.19 (dd, *J*_{B-2,B-3} = 10.5 Hz, *J*_{B-2,B-1} = 8.5 Hz, 1H, HB-2), 4.04 (dd, *J*_{A-2,A-3} = 10.5 Hz, *J*_{A-2,A-1} = 8.5 Hz, 1H, HA-2), 3.91 (s, 3H, OMe), 3.81 (br d, *J*_{A-6,A-6'} = 12.0 Hz, 1H, HA-6), 3.75-3.67 (m, 3H, HA-6' + HB-4 + HB-5), 3.47-3.41 (m, 1H, HA-5), 3.31 (br s, 1H, OH), 1.93 (s, 3H, Ac), 1.90 (s, 3H, Ac), 1.09 (s, 9H, *t*-Bu).

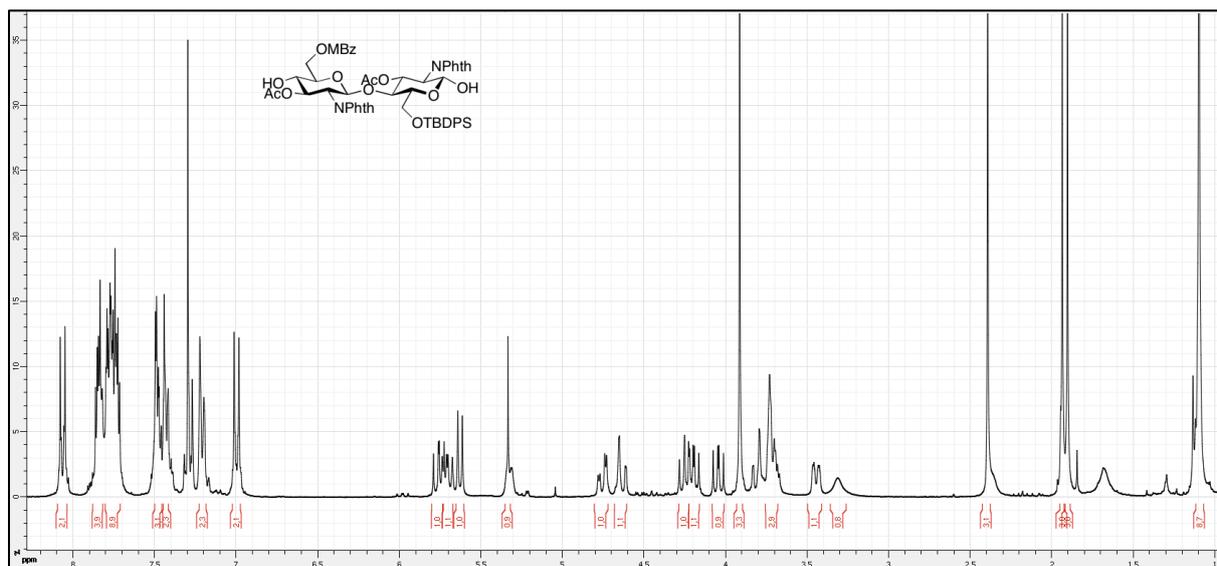
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 171.1 (C, COMe), 170.0 (C, COMe), 167.9 (2C, N(CO)₂), 167.4 (2C, N(CO)₂), 163.9 (C, COMe), 136.3 (2CH, Ar), 135.9 (2CH, Ar), 134.3 (CH, Ar), 134.1 (CH, Ar), 133.9 (C, Ar), 133.4 (C, Ar), 132.0 (2CH, Ar), 131.5 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 129.6 (CH, Ar), 129.1 (2CH, Ar), 129.0 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 127.6 (CH, Ar), 127.4 (CH, Ar), 125.3 (CH, Ar), 123.6 (2CH, Ar), 123.5 (2CH, Ar), 121.7 (2C, Ar), 113.8 (2CH, Ar), 96.9 (CH, CB-1), 92.0 (CH, CA-1), 75.4 (CH, CA-5), 74.3 (CH, CB-5), 73.6 (CH, CA-4), 73.0 (CH, CB-3), 70.5 (CH, CA-3), 69.6 (CH, CB-4), 63.1 (CH₂, CB-6), 62.5 (CH₂, CA-6), 56.9 (CH, CA-2), 55.5 (CH₃, OMe), 54.8 (CH, CB-2), 27.0 (3CH₃, *t*-Bu), 20.7 (CH₃, Ac), 20.6 (CH₃, Ac), 19.4 (C, *t*-Bu).

IR ν (film, cm⁻¹): 2937, 1778, 1743, 1713, 1605, 1512, 1427, 1383, 1225, 1168, 1030, 971, 719, 701.

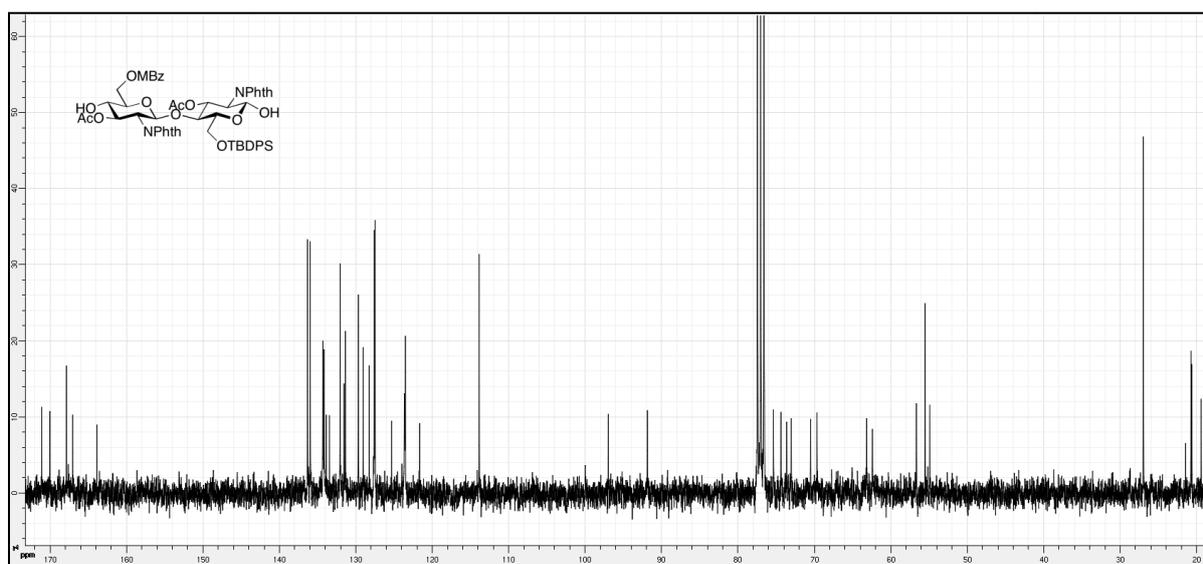
MS (ESI) : *m/z* 1079 (MNa⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₅₆H₅₆NaN₂O₁₇Si [M + Na]⁺: 1079.3246. Found: 1079.3214.

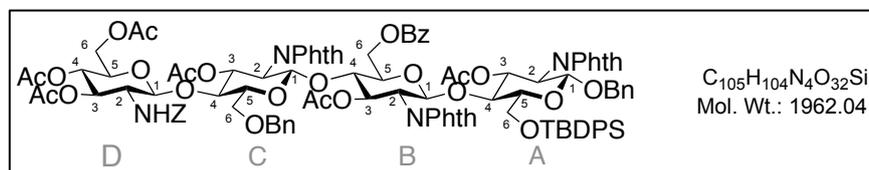
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):



^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):



Benzyl *O*-[[(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)]-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-acetyl-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-3-*O*-acetyl-6-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside **127.**



120 (120 mg, 0.107 mmol, 1.3 eq.) and **99** (84 mg, 0.082 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous toluene (1.6 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (80 mg) at room temperature for 1 h. NIS (23 mg, 0.102 mmol, 1.2 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled at -30 °C. After addition of TfOH (1.5 mL, 0.016 mmol, 0.2 eq.), the reaction mixture was stirred at -30 °C for 3 h. Et₃N was added and molecular sieves were filtered. The mixture was washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃, dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Toluene/Acetone 95:5 to 88:12) to give the tetrasaccharide **127** (98 mg, **61** %) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{25}$: +3.67 (*c* 0.30, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ : 7.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.88-7.63 (m, 16H, Ar), 7.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.53-7.18 (m, 20H, Ar), 7.09 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 6.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 5.65 (t, *J*_{B-3,B-2} = *J*_{B-3,B-4} = 10.5 Hz, 1H, **HB-3**), 5.58 (t, *J*_{A-3,A-2} = *J*_{A-3,A-4} = 10.0 Hz, 1H, **HA-3**), 5.51 (br t, *J*_{C-3,C-2} = *J*_{C-3,C-4} = 10.0 Hz, 1H, **HC-3**), 5.47-5.42 (m, 2H, **HB-1** + **NH**), 5.33 (d, *J*_{C-1,C-2} = 8.0 Hz, 1H, **HC-1**), 5.13-4.98 (m, 4H, **HD-3** + **HA-1** + **OCH₂Ph**), 4.85 (t, *J*_{D-4,D-3} = 9.5 Hz, 1H, **HD-4**), 4.62-4.49 (m, 5H, **HD-1** + **HB-6** + **CH₂Ph** + **CH₂Ph**), 4.28 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.24 (dd, *J*_{D-6,D-6'} = 12.5 Hz, *J*_{D-6,D-5} = 4.5 Hz, 1H, **HD-6**), 4.19 (t, *J*_{A-4,A-3} = *J*_{A-4,A-5} = 10.0 Hz, 1H, **HA-4**), 4.11-3.87 (m, 7H, **HA-2** + **HB-2** + **HB-4** + **HB-6'** + **HC-2** + **HC-4** + **HD-6'**), 3.74-3.59 (m, 5H, **HA-6** + **HA-6'** + **HB-5** + **HC-6** + **HC-6'**), 3.56-3.45 (m, 2H, **HC-5** + **HD-5**), 3.39-3.31 (m, 2H, **HA-5** + **HD-2**), 1.95 (s, 3H, Ac), 1.93 (s, 3H, Ac), 1.86 (s, 3H, Ac), 1.83 (s, 3H, Ac), 1.80 (s, 3H, Ac), 1.63 (s, 3H, Ac), 0.91 (s, 9H, *t*-Bu).

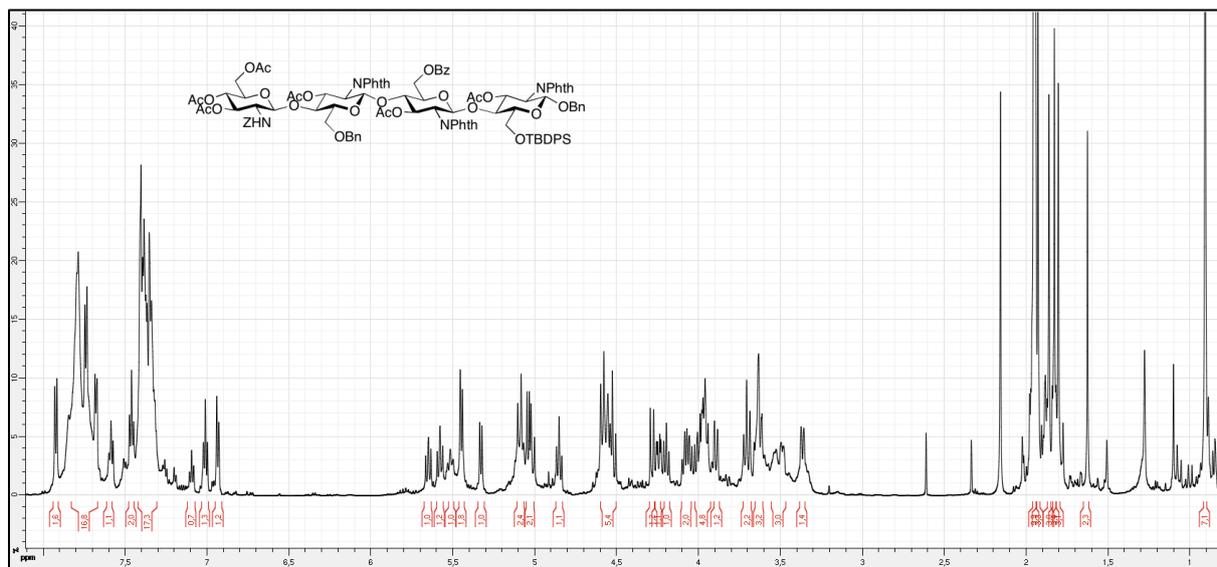
¹³C NMR (75 MHz, CD₃CN) δ : 171.6 (C, COMe), 171.5 (3C, COMe), 171.4 (C, COMe), 171.3 (C, COMe), 170.9 (C, CPh), 169.1 (C, NCO), 168.9 (2C, N(CO)₂), 168.8 (C, NCO), 166.7 (2C, N(CO)₂), 157.2 (C, NHCO), 139.8-124.5 (42CH + 12C, Ar), 101.4 (CH, **CD-1**), 98.7 (CH, **CC-1**), 98.0 (2CH, **CA-1** + **CB-1**), 76.9 (CH, **CB-4**), 76.3 (CH, **CC-4**), 76.0 (CH, **CA-5**), 75.7 (CH, **CC-5**), 74.6 (CH, **CA-4**), 74.1 (CH, **CB-5**), 73.9 (CH₂, **CH₂Ph**), 73.5 (CH, **CD-3**), 72.7 (CH, **CD-5**), 72.0 (CH, **CC-3**), 71.8 (CH, **CB-3**), 71.7 (CH₂, **CH₂Ph**), 71.5 (CH, **CA-3**), 69.9 (CH, **CD-4**), 69.3 (CH₂, **CC-6**), 67.6 (CH₂, **OCH₂Ph**), 64.2 (CH₂, **CB-6**), 63.5 (CH₂, **CA-6**), 63.0 (CH₂, **CD-6**), 57.6 (CH, **CD-2**), 56.5 (CH, **CC-2**), 56.3 (2CH, **CA-2** + **CB-2**), 27.6 (3CH₃, *t*-Bu), 21.4 (CH₃, Ac), 21.3 (3CH₃, Ac), 21.2 (2CH₃, Ac), 20.4 (C, *t*-Bu).

IR ν (film, cm^{-1}): 2947, 1777, 1744, 1713, 1384, 1223, 1025, 720, 698.

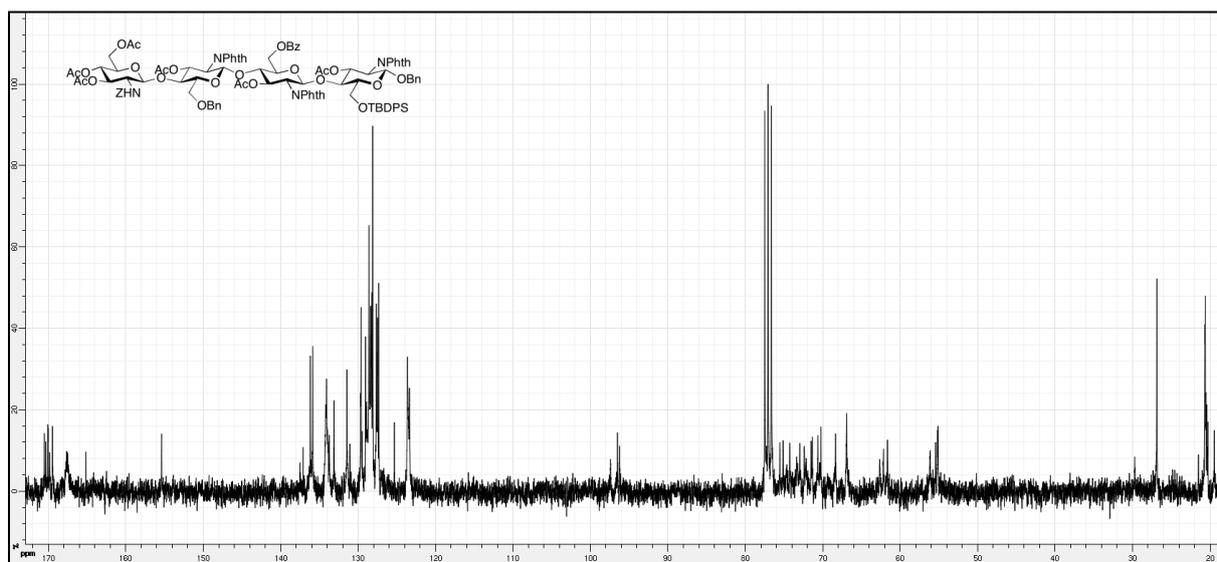
MS (ESI): m/z 1983 (MNa^+ , 70%).

HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{105}\text{H}_{104}\text{N}_4\text{NaO}_{32}\text{Si}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 1983.6301. Found: 1983.6265.

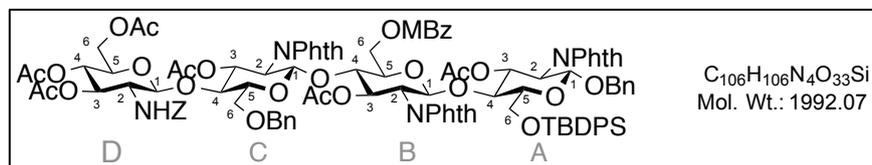
^1H NMR (500 MHz, CD_3CN):



^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN):



Benzyl O-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)]-(1 \rightarrow 4)-(3-O-acetyl-6-O-(4-methoxybenzoyl)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-3-O-acetyl-6-O-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside
128.



Acceptor **123** (102 mg, 0.089 mmol, 1 eq.) and donor **99** (187 mg, 0.180 mmol, 2 eq.) in anhydrous CH_2Cl_2 (300 μL) were stirred with molecular sieves 4 \AA (300 mg) at room temperature for 1 h. NIS (50 mg, 0.225 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled at $-10\text{ }^\circ\text{C}$. After addition of TfOH (1.18 μL , 0.013 mmol, 0.15 eq.), the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1.5 h. Molecular sieves were filtered and the filtrate was then poured into a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , extracted with CH_2Cl_2 , washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Toluene/Acetone 95:5 to 90:10) to give the tetrasaccharide **128** (85 mg, **48 %**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +5.3 (*c* 1.6, CHCl_3).

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN) δ : 7.94-7.68 (m, 17H, Ar), 7.51-7.27 (m, 19H, Ar), 7.13 (dt, $J = 7.5\text{ Hz}$, $J = 1.5\text{ Hz}$, 1H, Ar), 7.08-6.94 (m, 4H, Ar), 5.74-5.52 (m, 3H, HA-3 + HB-3 + HC-3), 5.49 (d, $J_{B-1, B-2} = 8.5\text{ Hz}$, 1H, HB-1), 5.38 (d, $J_{C-1, C-2} = 8.5\text{ Hz}$, 1H, HC-1), 5.21-4.98 (m, 5H, HA-1 + HD-3 + NH + OCH_2Ph), 4.90 (t, $J_{D-4, D-3} = J_{D-4, D-5} = 10.0\text{ Hz}$, 1H, HD-4), 4.70-4.50 (m, 5H, HB-6 + HD-1 + CH_2Ph + CH_2Ph), 4.37-4.19 (m, 3H, HA-4 + HD-6 + CH_2Ph), 4.16-3.89 (m, 7H, HA-2 + HB-2 + HB-4 + HB-6' + HC-2 + HC-4 + HD-6'), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.81-3.63 (m, 5H, HA-6 + HA-6' + HB-5 + HC-6 + HC-6'), 3.63-3.49 (m, 2H, HC-5 + HD-5), 3.48-3.33 (m, 2H, HA-5 + HD-2), 1.99 (s, 3H, Ac), 1.97 (s, 3H, Ac), 1.90 (s, 3H, Ac), 1.87 (s, 3H, Ac), 1.85 (s, 3H, Ac), 1.68 (s, 3H, Ac), 0.95 (s, 9H, *t*-Bu).

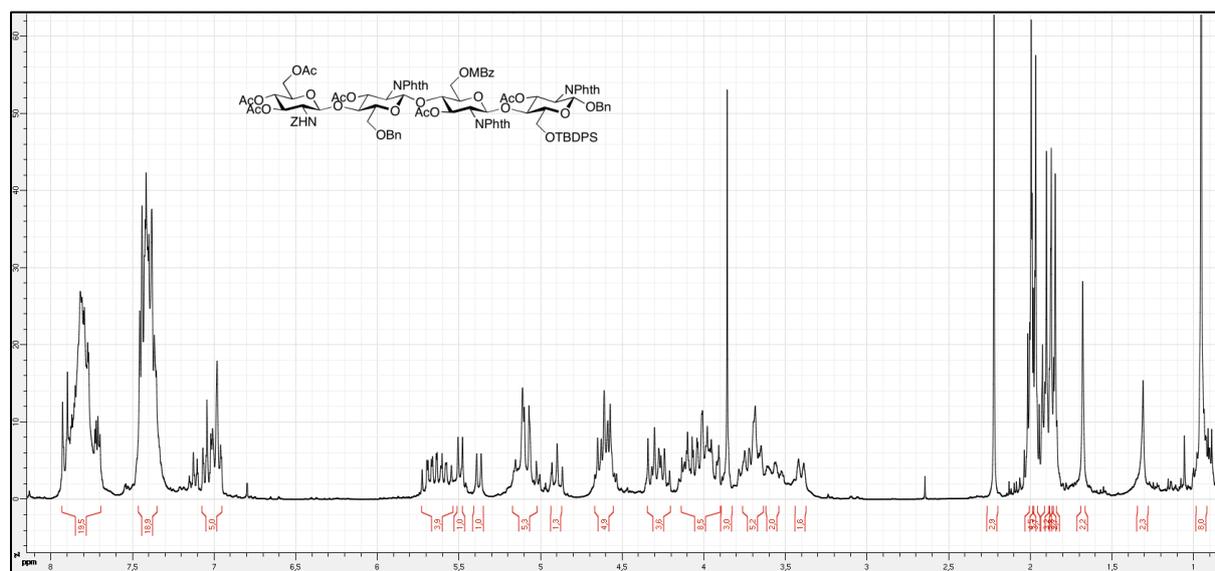
^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ : 171.6 (C, COMe), 171.5 (2C, COMe), 171.4 (C, COMe), 171.3 (C, COMe), 170.8 (C, COMe), 169.1 (C, NCO), 169.0 (4C, $\text{N}(\text{CO})_2 + \text{N}(\text{CO})_2$), 168.9 (C, $\text{N}(\text{CO})_2$), 166.3 (C, PhCO), 165.1 (C, COMe (Ar)), 157.1 (C, NHCO), 139.8-115.2 (41CH + 12C, Ar), 101.3 (CH, CD-1), 98.6 (CH, CC-1), 97.9 (2CH, CA-1 + CB-1), 76.9 (CH, CB-4), 76.3 (CH, CC-4), 75.9 (CH, CA-5), 75.7 (CH, CC-3), 74.6 (CH, CA-4), 74.1 (CH, CB-5), 73.9 (CH_2 , CH_2Ph), 73.4 (CH, CD-3), 72.7 (CH, CD-5), 71.9 (CH, CC-3), 71.8 (CH, CB-3), 71.6 (CH_2 , CH_2Ph), 71.4 (CH, CA-3), 69.9 (CH, CD-4), 69.3 (CH_2 , CC-6), 67.6 (CH_2 , OCH_2Ph), 63.7 (CH_2 , CB-6), 63.5 (CH_2 , CA-6), 63.0 (CH_2 , CD-6), 57.6 (CH, CD-2), 56.7 (CH_3 , OMe), 56.5 (CH, CC-2), 56.3 (2CH + CA-2 + CB-2), 27.6 (3 CH_3 , *t*-Bu), 21.4 (CH_3 , Ac), 21.3 (4 CH_3 , Ac), 21.2 (CH_3 , Ac), 20.4 (C, *t*-Bu).

IR ν (film, cm^{-1}): 2939, 1746, 1716, 1606, 1384, 1224, 1040, 721, 699.

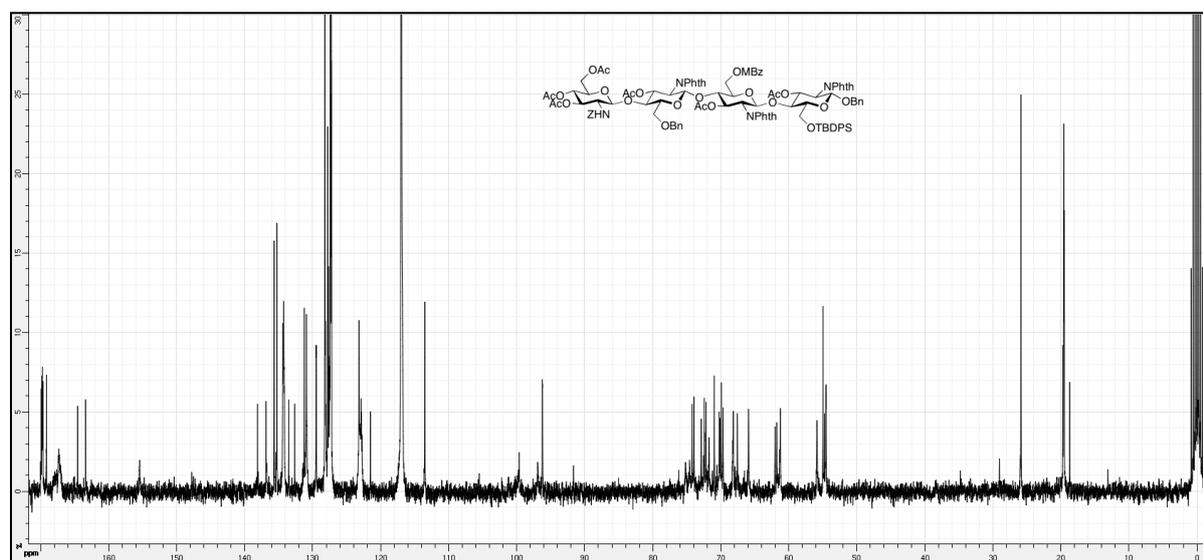
MS (MALDI): m/z 2014 (MNa^+ , 100%).

HRMS (MALDI): Calcd for $\text{C}_{106}\text{H}_{106}\text{N}_4\text{NaO}_{33}\text{Si}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 2013.6407. Found: 2013.6401.

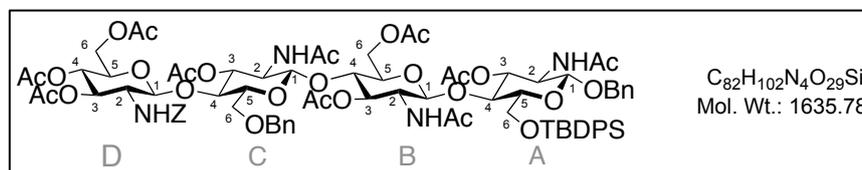
^1H NMR (500 MHz, CD_3CN):



^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN):



Benzyl O-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)]-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-3-O-acetyl-6-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside **129.**



Tetrasaccharide **127** (448 mg, 0.228 mmol, 1.0 eq.) and ethylenediamine (2.29 mL, 34 mmol, 150 eq.) in ethanol (39 mL) were stirred at 60 °C for 12 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude product was engaged in the next step without purification. The residue and acetic anhydride (5.9 mL, 63 mmol, 275 eq.) in pyridine (71 mL) were stirred at room temperature for 2 days. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 1:0 to 96:4) to give **129** (330 mg, **84 %**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{25}$: -33.8 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ : 7.84-7.74 (m, 4H, Ar), 7.52-7.26 (m, 21H, Ar), 6.41-6.33 (m, 2H, NH + NH), 5.92 (d, $J_{NH,A-2 \text{ or } B-2} = 9.5$ Hz, 1H, NH), 5.13-4.94 (m, 6H, HA-3 + HB-3 + HC-3 + NH + OCH₂Ph), 4.88 (t, $J_{D-4,D-3} = J_{D-4,D-5} = 10.0$ Hz, 1H, HD-4), 4.77 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.67 (d, $J_{A-1,A-2 \text{ or } B-1,B-2} = 8.0$ Hz, 1H, HA-1 or HB-1), 4.62-4.43 (m, 7H, HB-1 + HC-1 + HD-1 + HD-3 or HA-1 + CH₂Ph + CH₂Ph), 4.35-4.25 (m, 2H, HB-6 + HD-6), 4.17 (dd, $J_{B-6',B-6} = 12.0$ Hz, $J_{B-6,B-5} = 5.5$ Hz, 1H, HB-6'), 4.04-3.93 (m, 3H, HA-4 + HA-6 + HD-6'), 3.92-3.81 (m, 3H, HA-6' + HC-2 + HC-4), 3.73 (t, $J_{B-4,B-3} = J_{B-4,B-5} = 9.0$ Hz, 1H, HB-4), 3.69-3.55 (m, 4H, HA-2 + HB-2 + HC-6 + HC-6'), 3.55-3.41 (m, 5H, HA-5 + HB-5 + HC-5 + HD-2 + HD-5), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 6H, Ac), 1.98 (s, 6H, Ac), 1.89 (s, 6H, Ac), 1.84 (s, 3H, Ac), 1.82 (s, 3H, Ac), 1.65 (s, 3H, Ac), 1.11 (s, 9H, *t*-Bu).

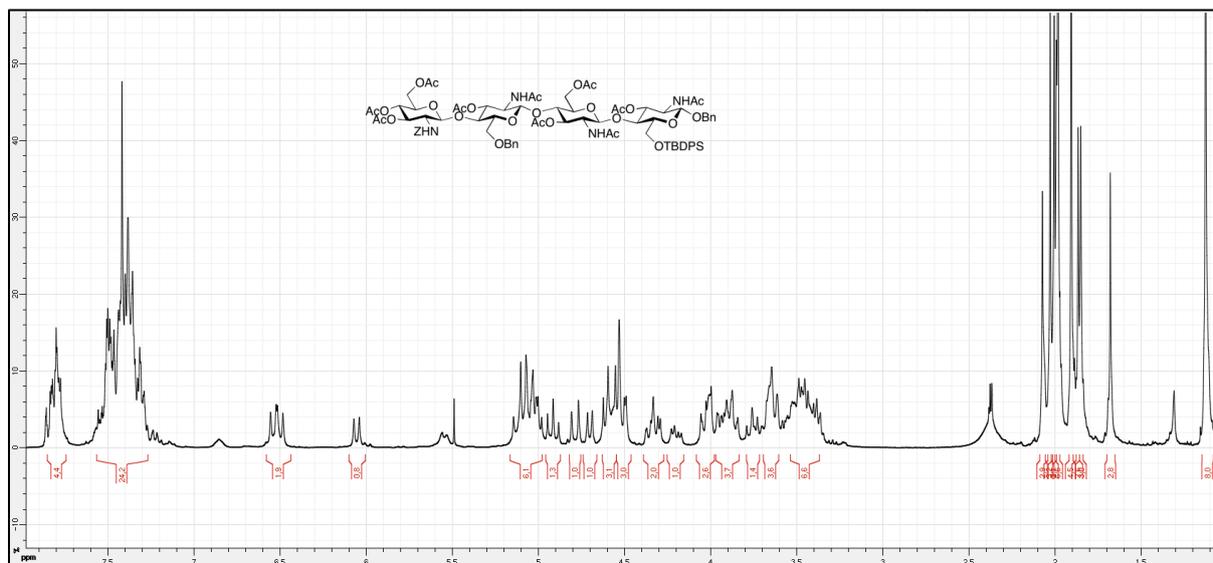
¹³C NMR (75 MHz, CD₃CN) δ : 172.0 (C, COMe), 171.6 (3C, COMe), 171.5 (C, COMe), 171.4 (C, COMe), 171.2 (2C, COMe), 171.1 (C, COMe), 170.9 (C, COMe), 157.2 (C, NHCO), 139.8 (C, Ar), 139.2 (C, Ar), 138.5 (C, Ar), 137.2 (CH, Ar), 137.0 (CH, Ar), 135.2 (C, Ar), 134.4 (C, Ar), 132.6 (CH, Ar), 131.4 (CH, Ar), 131.3 (CH, Ar), 129.9 (3CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.7 (2CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 129.3 (2CH, Ar), 129.1 (7CH, Ar), 129.0 (CH, Ar), 128.9 (2CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 102.1 (CH, CD-1), 101.5 (CH, CC-1), 101.2 (2CH, CA-1 + CB-1), 77.3 (CH, CB-4), 76.6 (CH, CA-5), 76.0 (CH, CC-4), 75.3 (2CH, CA-4 + CB-5 or CC-5), 74.3, 74.1, 74.0, 73.9 (4CH, CA-3 + CB-3 + CC-3 + CB-5 or CC-5), 73.8 (CH₂, CH₂Ph), 73.6 (CH, CD-3), 72.6 (CH, CB-5), 71.5 (CH₂, CH₂Ph), 69.9 (CH, CD-4), 69.4 (CH₂, CC-6), 67.5 (CH₂, OCH₂Ph), 63.9 (CH₂, CA-6), 63.7 (CH₂, CB-6), 63.0 (CH₂, CD-6), 57.5 (CH, CD-2), 55.7 (2CH, CA-2 + CB-2), 54.9 (CH, CC-2), 27.7 (3CH₃, *t*-Bu), 23.6 (2CH₃, Ac), 23.5 (CH₃, Ac), 21.6 (3CH₃, Ac), 21.5 (CH₃, Ac), 21.3 (2CH₃, Ac), 21.2 (CH₃, Ac), 20.4 (C, *t*-Bu).

IR ν (film, cm^{-1}): 3292, 2939, 1743, 1655, 1534, 1428, 1368, 1225, 1030, 740, 698.

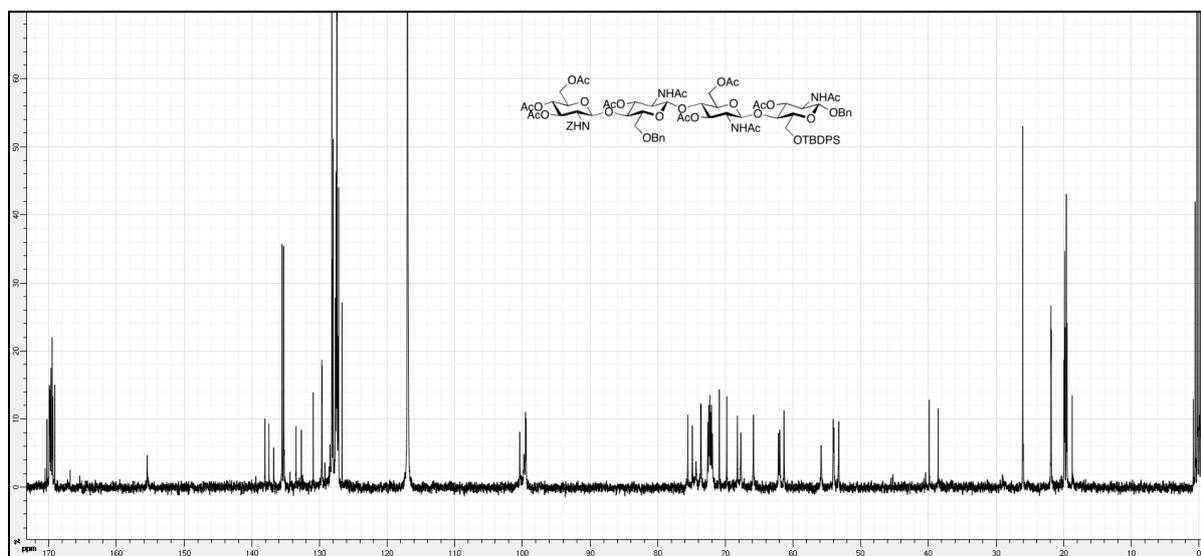
MS (MALDI): m/z 1657 (MNa^+ , 100%).

HRMS (MALDI): Calcd for $\text{C}_{82}\text{H}_{102}\text{N}_4\text{NaO}_{29}\text{Si}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$: 1657.6297. Found: 1657.6324.

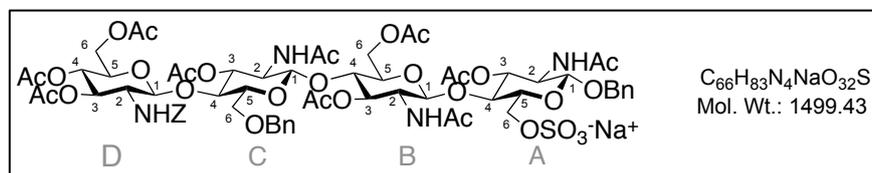
^1H NMR (500 MHz, CD_3CN):



^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN):



Benzyl *O*-[{(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)}-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-3-*O*-acetyl-2-deoxy-6-*O*-sodium sulfonato- β -D-glucopyranoside **130.**



129 (310 mg, 0.189 mmol, 1.0 eq.) and NH₄F (1.89 mL, 0.948 mmol, 0.5 M in MeOH, 5.0 eq) were stirred at 70 °C for 12 h. The volatiles were removed under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 1:0 to 96:4) to give benzyl *O*-[{(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)}-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-3-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (191 mg, **72 %**) as an amorphous white solid.

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ : 7.45-7.29 (m, 15H), 6.52 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.38-6.31 (m, 2H), 5.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.13-4.94 (m, 6H), 4.88 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.84 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.64-4.44 (m, 7H), 4.33 (dd, $J = 12.0$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.16 (dd, $J = 12.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H), 3.96 (dd, $J = 12.5$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.88-3.55 (m, 11H), 3.54-3.48 (m, 1H), 3.45-3.32 (m, 3H), 2.97 (br t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 6H), 1.89 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.82 (s, 3H).

MS (ESI): m/z 1419 (MNa⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₆₆H₈₄N₄NaO₂₉ [M + Na]⁺: 1419.5119. Found: 1419.5115.

This alcohol and SO₃•pyridine (65 mg, 0.408 mmol, 3.0 eq.) in DMF (10 mL) were stirred at room temperature for 2 days. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The pyridinium salt was exchanged and the sodium salt eluted on ion exchange Dowex[®] (Na⁺ form) and the volatiles were removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (EtOAc/*i*-PrOH/H₂O/Et₃N 8.8:0.8:0.4:0.1 to 7.6:1.6:0.8:0.1) to give **130** (150 mg, **74 %**) as a white amorphous solid.

[α]_D²⁵: -28.38 (*c* 0.35, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ : 7.40-7.32 (m, 15H), 6.61-6.51 (m, 2H), 6.45 (dd, $J = 11.0$ Hz, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.37 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 6.5$ Hz, 1H), 5.08-4.99 (m, 5H), 4.87-4.79 (m, 3H), 4.61-4.54 (m, 5H), 4.32-4.26 (m, 3H), 4.10-4.07 (m, 2H), 3.97-3.92 (m, 2H), 3.85-3.76

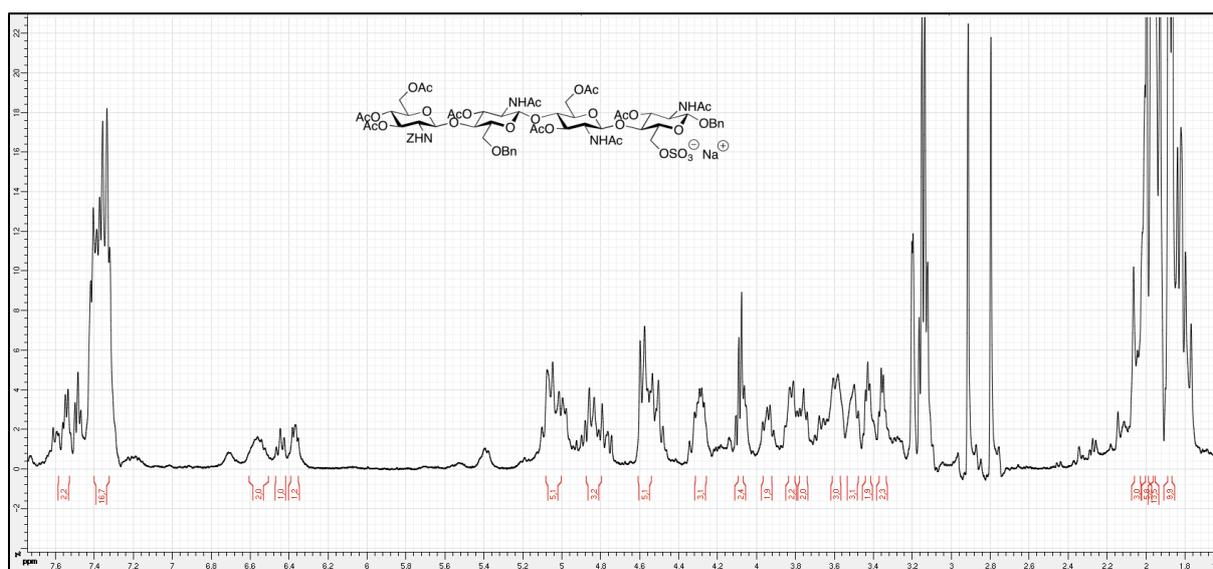
(m, 4H), 3.61-3.57 (m, 3H), 3.53-3.48 (m, 3H), 3.46-3.42 (m, 2H), 3.38-3.34 (m, 2H), 2.06-1.85 (10s, 30H).

IR ν (film, cm^{-1}): 3303, 2926, 1741, 1651, 1539, 1428, 1369, 1226, 1032, 741, 699.

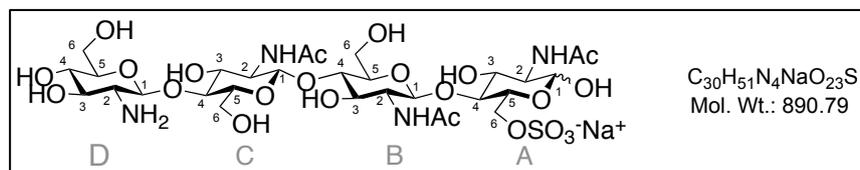
MS (ESI): m/z 1475 ($[\text{M}-\text{Na}^+]$, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{66}\text{H}_{83}\text{N}_4\text{O}_{32}\text{S}$ $[\text{M}-\text{Na}^+]$: 1475.4711. Found: 1475.4711.

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN):



(2-Amino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-6-O-sodium sulfonato-2-deoxy-D-glucopyranose **131.**



130 (75 mg, 0.050 mmol, 1.0 eq.) and NaOMe (100 μL , 1 M in MeOH, 2.0 eq.) in MeOH (1.4 mL) were stirred at room temperature for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in a mixture of EtOAc/ H_2O /EtOH (1:1:0.1) and 10% Pd(C) (75 mg). The reaction mixture was stirred for 12 days under H_2 . The catalyst was then removed by filtration and rinsed with EtOAc, H_2O and MeOH. The solvents were removed under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on silica gel ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_{3\text{aq}}$ 7:3:0.1 to 7:3.5:0.1) to give the chito-oligosaccharide **131**¹⁵⁵ (20 mg, **48 %**) as a white amorphous solid.

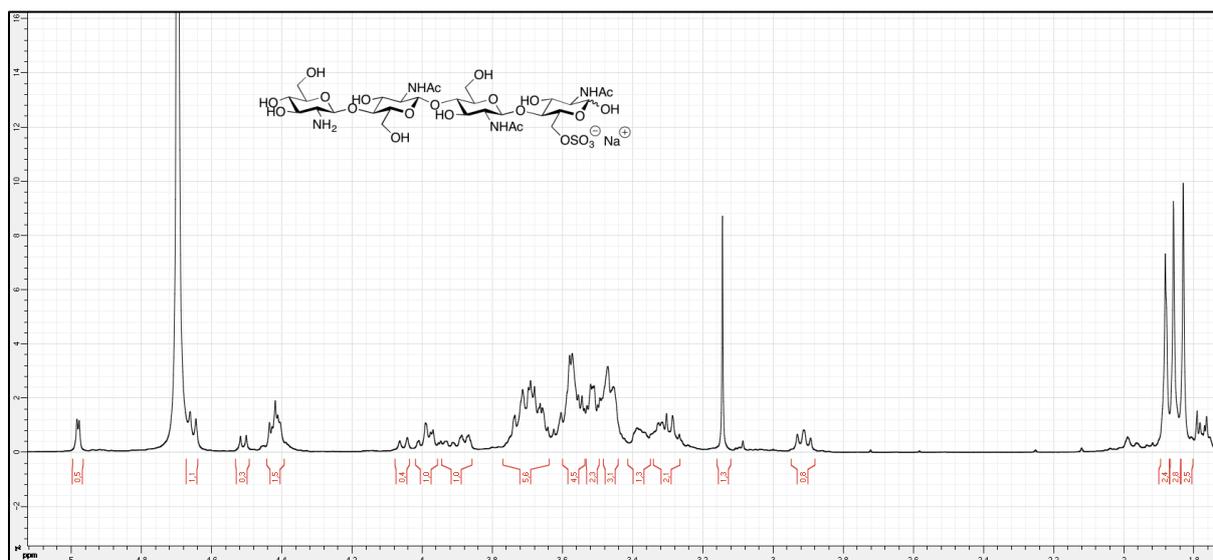
$[\alpha]_D^{25}$: +182 (*c* 1.8, H₂O) (litt.¹⁵⁵ +3.8 (*c* 0.1, H₂O)).

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ : 4.97 (d, *J* = 3.0 Hz, 0.5H, **HA-1 α**), 4.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, **H-1 β**), 4.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 0.5H, **HA-1 β**), 4.44-4.37 (m, 2H, **H-1 β**), 4.08-3.85 (m, 3H), 3.54-3.28 (m, 20H), 2.90 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, **HD-2**), 1.87 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.82 (s, 3H).

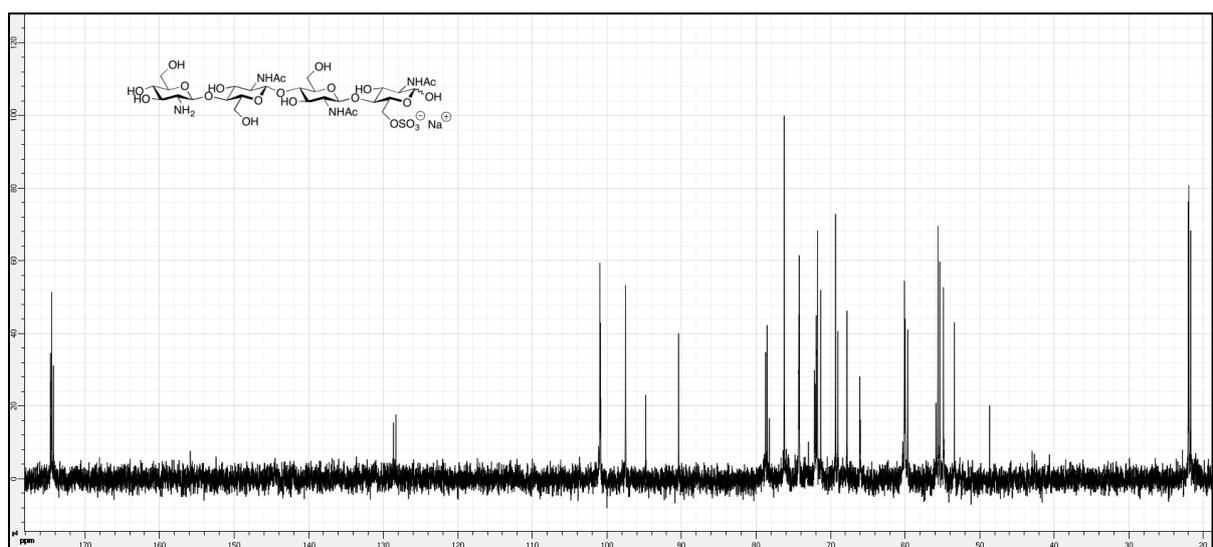
MS (ESI): *m/z* 867 ([M-Na⁺]⁻, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₃₀H₅₁N₄O₂₃S [M-Na⁺]⁻: 867.2683. Found: 867.2665.

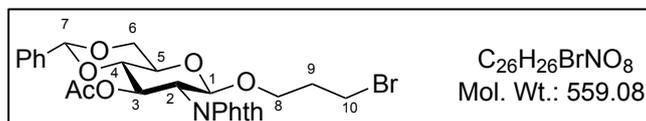
¹H NMR (500 MHz, D₂O):



¹³C NMR (75 MHz, D₂O):



CHAPTER 2:

(3-Bromopropyl) 3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside 241.

Donor **104** (100 mg, 0.166 mmol, 1.0 eq.) and 3-bromopropanol (19.6 μ L, 0.216 mmol, 1.3 eq.) in toluene (3.4 mL) were stirred with molecular sieves 4 \AA at room temperature for 1 h. NIS (45 mg, 0.199 mmol, 1.2 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -30 $^{\circ}$ C. After addition of TfOH (2.9 μ L, 0.033 mmol, 0.2 eq.), the reaction was stirred for 3 h and neutralized with triethylamine (3 drops). The mixture was diluted in EtOAc (10 mL) and molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 8:2) to give **241** (77 mg ; **82%**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -201.3 (*c* 1.0, CHCl_3).

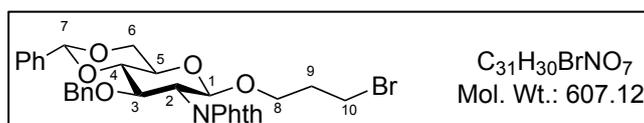
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.84-7.76 (m, 2H, **NPhth**), 7.71-7.63 (m, 2H, **NPhth**), 7.43-7.35 (m, 2H, **Ar**), 7.31-7.26 (m, 3H, **Ar**), 5.83 (dd, $J_{3,2} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, 1H, **H-3**), 5.48 (s, 1H, **H-7**), 5.37 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.35-4.29 (m, 1H, **H-5**), 4.22 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 1H, **H-2**), 3.92-3.84 (m, 1H, **H-10**), 3.82-3.65 (m, 4H, **H-4 + H-6 + H-6' + H-8**), 3.60-3.44 (m, 2H, **H-8' + H-10'**), 3.25-3.10 (m, 2H, **H-9**), 1.94 (s, 3H, **Ac**).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.0 (2C, 2CO), 136.8 (C, **Ar**), 134.2 (2CH, **NPhth**), 129.2 (CH, **Ar**), 128.3 (2CH, **Ar**), 126.2 (2CH, **Ar**), 123.6 (2CH, **NPhth**), 101.7 (CH, **C-7**), 98.9 (CH, **C-1**), 79.3 (CH, **C-4**), 69.7 (CH, **C-3**), 68.7 (CH, **C-5**), 67.5 (2CH₂, **C-8 + C-10**), 66.3 (CH₂, **C-6**), 55.4 (CH, **C-2**), 29.8 (CH₂, **C-9**), 20.6 (CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm^{-1}) : 2941, 1780, 1737, 1719, 1383, 1224, 1102, 1080, 1038, 985, 966, 924, 766, 721, 704.

MS (ESI) : *m/z* 577 (MNH_4^+ , 30%).

HRMS (ESI) : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{BrNaNO}_8$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 582.0764. Found: 582.0755.

(3-Bromopropyl) 3-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside 242.

Donor **240** (200 mg, 0.308 mmol, 1.0 eq.) and 3-bromopropanol (42 μ L, 0.462 mmol, 1.5 eq.) in dichloromethane (1 mL) were stirred with molecular sieves 4Å at room temperature for 1 h. NIS (173 mg, 0.770 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -10 °C. After addition of TfOH (4.6 μ L, 0.046 mmol, 0.15 eq.), the reaction was stirred for 1 h at room temperature. The mixture was diluted in EtOAc (10 mL) and molecular sieves were filtered and the filtrate was then poured into a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL), extracted with CH₂Cl₂, washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 8:2) to give **242** (101 mg ; **54%**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{20}$: +112.3 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.68- 7.59 (m, 3H, Ar), 7.49-7.42 (m, 2H, NPhth), 7.37-7.27 (m, 4H, NPhth + Ar), 6.96-6.89 (m, 2H, Ar), 6.87-6.76 (m, 3H, Ar), 5.56 (s, 1H, H-7), 5.13 (d, $J_{1,2}$ = 8.5 Hz, 1H, H-1), 4.73 (AB system, J = 12.5 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.43 (AB system, J = 12.5 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.39-4.29 (m, 2H, H-3 + H-6), 4.18-4.00 (m, 2H, H-2 + H-8), 3.87-3.64 (m, 4H, H-4 + H-6' + H-8' + H-10), 3.58 (td, $J_{5,4}$ = 10.0 Hz, $J_{5,6}$ = 5.0 Hz, 1H, H-5), 3.53-3.43 (m, 1H, H-10'), 3.41-3.33 (m, 2H, H-9).

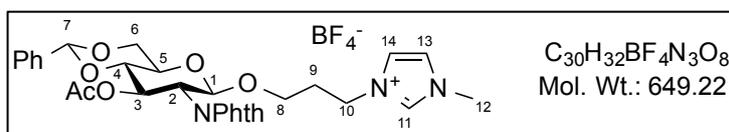
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.5 (2C, 2CO), 137.9 (C, Ar), 137.3 (C, Ar), 133.9 (3 CH, Ar), 131.6 (C, NPhth), 129.2 (C, NPhth), 128.3 (4CH, Ar et NPhth), 127.9 (5CH, Ar), 126.1 (2CH, NPhth), 101.3 (CH, C-7), 99.1 (CH, C-1), 83.0 (CH, C-4), 74.7 (CH, C-3), 74.2 (CH₂, CH₂Ph), 68.8 (CH₂, C-6), 67.2 (CH₂, C-10), 66.1 (CH, C-5), 62.3 (CH₂, C-8), 56.1 (CH, C-2), 32.0 (CH₂, C-9).

IR ν (film, cm⁻¹) : 2875, 1774, 1710, 1386, 1069, 996, 720, 696.

MS (ESI) : *m/z* 625 (MNH₄⁺, 30%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₃₁H₃₁BrNO₇ [M+H]⁺ : 608.1284. Found: 608.1275.

(3-Methylimidazolium-1-propyl) 3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate 243.



N-Methylimidazole (38 μ L, 0.483 mmol, 3.6 eq.) was added to the solution of product **241** (75 mg, 0.134 mmol, 1 eq.) in CH₃CN (1.7 mL). The reaction was stirred and heated to 85 °C for 24 h. Then KBF₄ was added (17 mg, 0.148 mmol, 1.1 eq.) and the reaction was stirred at 85 °C for further 24 h. KBF₄ was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) and washed with H₂O (2 \times 15 mL) and then with brine (2 \times 15 mL). The organic layer was concentrated under reduced pressure. The residue was then washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **243** (56 mg ; **66%**) as a white powder.

$[\alpha]_D^{20}$: -11.8 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.91 (s, 1H, **H-11**), 7.84-7.75 (m, 2H, **NPhth**), 7.73-7.67 (m, 2H, **NPhth**), 7.41-7.34 (m, 2H, **Ar**), 7.32-7.25 (m, 3H, **Ar**), 7.17-7.11 (m, 2H, **H-13** + **H-14**), 5.77 (dd, $J_{3,2}$ = 10.0 Hz, $J_{3,4}$ = 9.0 Hz, 1H, **H-3**), 5.50 (s, 1H, **H-7**), 5.33 (d, $J_{1,2}$ = 8.5 Hz, 1H, **H-1**), 4.34 (dd, J = 10.5 Hz, J = 5.0 Hz, 1H, **H-8**), 4.21 (td, J = 6.5 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, **H-10**), 4.09 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 8.5 Hz, 2H, **H-2**), 3.98 (s, 3H, **H-12**), 3.86-3.64 (m, 4H, **H-4** + **H-5** + **H-6** + **H-10'**), 3.57-3.48 (m, 1H, **H-6'**), 2.13-1.98 (m, 2H, **H-9**), 1.82 (s, 3H, **Ac**).

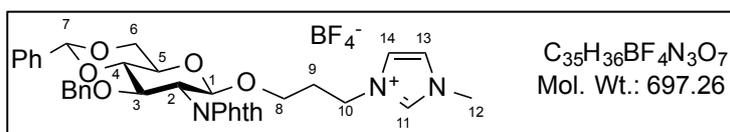
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.1 (2C, 2CO), 137.9 (CH, **C-11**), 136.6 (C, **Ar**), 134.6 (2CH, **NPhth**), 129.2 (CH, **Ar**), 128.3 (2CH, **Ar**), 126.2 (2CH, **Ar**), 123.9 (2CH, **NPhth**), 122.8 and 122.4 (2CH, **C-13** + **C-14**), 101.7 (CH, **C-7**), 98.5 (CH, **C-1**), 79.1 (CH, **C-4**), 69.7 (CH, **C-3**), 68.5 (CH₂, **C-8**), 66.4 (CH, **C-5**), 66.0 (CH₂, **C-6**), 55.3 (CH, **C-2**), 47.4 (CH₂, **C-10**), 36.7 (CH₃, **C-12**), 30.1 (CH₂, **C-9**), 20.6 (CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹) : 3412, 2882, 1775, 1738, 1711 1385, 1225, 1167, 1077, 995, 968, 872, 722, 701.

MS (ESI) : *m/z* 562 ([M-BF₄]⁻, 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₃₀H₃₂N₃O₈ [M-BF₄]⁻ : 562.2079. Found: 562.2101.

(3-Methylimidazolium-1-propyl) 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate 244.



N-Methylimidazole (23 μ L, 0.285 mmol, 3.6 eq.) was added to the solution of product **240** (48 mg, 0.079 mmol, 1.0 eq.) in CH₃CN (1 mL). The reaction was stirred and heated to 85 °C for 36 h. Then KBF₄ was added (11 mg, 0.087 mmol, 1.1 eq.) and the reaction was stirred at 85 °C for 24 h. KBF₄ was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) and washed with H₂O (2 \times 15 mL) and then with brine (2 \times 15 mL). The organic layer was concentrated under reduce pressure. The residue was then washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **244** (30 mg ; **62%**) as a brown viscous oil.

$[\alpha]_D^{20}$: +158.6 (*c* 0.5, CHCl₃).

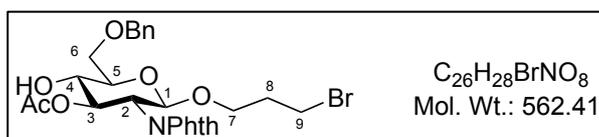
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.53 (s, 1H, **H-11**), 7.71-7.62 (m, 3H, **Ar**), 7.48-7.42 (m, 2H, **NPhth**), 7.38-7.26 (m, 4H, **NPhth** + **Ar**), 7.22-7.18 (m, 1H, **H-13** ou **H-13'**), 7.15-7.12 (m, 1H, **H-13** ou **H-14**), 6.93-6.75 (m, 5H, **Ar**), 5.57 (s, 1H, **H-7**), 5.06 (d, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, 1H, **H-1**), 4.70 (AB system, *J* = 12.5 Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.41 (AB system, *J* = 12.5 Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.37-4.33 (m, 1H, **H-3**), 4.32-4.28 (m, 1H, **H-6**), 4.19-4.10 (m, 2H, **H-8**), 3.97 (dd, *J*_{2,3} = 10.0 Hz, *J*_{2,1} = 8.5 Hz, 2H, **H-2**), 3.92 (s, 3H, **H-12**), 3.85-3.60 (m, 3H, **H-4** + **H-6'** + **H-10**), 3.55 (td, *J*_{5,4} = 10.0 Hz, *J*_{5,6} = 5.0 Hz, 1H, **H-5**), 3.45-3.39 (m, 1H, **H-10'**), 1.20-1.16 (m, 2H, **H-9**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 167.8 (2C, 2CO), 137.7 (C, **Ar**), 137.3 (CH, **C-11**), 137.2 (C, **Ar**), 134.2 (CH, **Ar**), 131.3 (2C, **NPhth**), 129.0 (CH, **Ar**), 128.3 (3CH, **Ar**), 128.0 (3CH, **Ar**), 127.5 (2CH, **NPhth**), 126.0 (2CH, **NPhth**), 123.4 (CH, **C-13** or **C-14**), 123.0 (2CH, **Ar**), 122.5 (CH, **C-13** or **C-14**), 101.3 (CH, **C-7**), 98.7 (CH, **C-1**), 82.9 (CH, **C-4**), 74.3 (CH, **C-3**), 74.1 (CH₂, **CH₂Ph**), 68.5 (CH₂, **C-6**), 66.1 (CH, **C-5**), 65.9 (CH₂, **C-10**), 55.8 (CH, **C-2**), 47.3 (CH₂, **C-8**), 36.5 (CH₃, **C-12**), 30.1 (CH₂, **C-9**).

IR ν (film, cm⁻¹) : 2970, 1773, 1741, 1711, 1385, 1067, 722, 698.

MS (ESI) : *m/z* 610 ([M-BF₄⁻], 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₃₅H₃₆N₃O₇ [M-BF₄⁻] : 610.2553. Found: 610.2579.

(3-Bromopropyl) 3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside 245.

103 (100 mg, 0.166 mmol, 1.0 eq.) and 3-bromopropanol (19.6 μ L, 0.216 mmol, 1.3 eq.) in toluene (3.4 mL) were stirred with molecular sieves 4 \AA at room temperature for 1 h. NIS (45 mg, 0.199 mmol, 1.2 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -30 $^{\circ}$ C. After addition of TfOH (2.9 μ L, 0.033 mmol, 0.2 eq.), the reaction was stirred for 3 h and neutralized with triethylamine (3 drops). The mixture was diluted in EtOAc (15 mL) and molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give **245** (80 mg ; **86%**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -12.2 (*c* 0.5, CHCl_3).

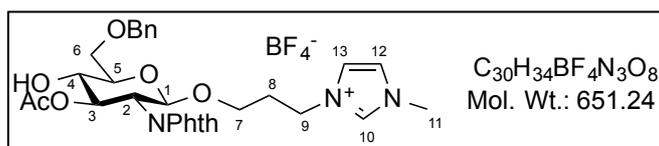
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.80-7.75 (m, 2H, **NPhth**), 7.68-7.63 (m, 2H, **NPhth**), 7.33-7.23 (m, 5H, **Ar**), 5.59 (dd, $J_{3,2} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, 1H, **H-3**), 5.28 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.53 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 2H, **CH₂Ph**), 4.16 (dd, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 1H, **H-2**), 3.91-3.63 (m, 5H, **H-4 + H-5 + H-6 + H-7**), 3.58-3.48 (m, 1H, **H-7'**), 3.23-3.11 (m, 2H, **H-9**), 2.06-1.88 (m, 2H, **H-8**), 1.86 (s, 3H, **Ac**).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 171.2 (2C, 2CO), 134.3 (2CH, **NPhth**), 128.5 (2CH, **Ar**), 127.9 (CH, **Ar**), 127.8 (2CH, **Ar**), 123.6 (2CH, **NPhth**), 98.2 (CH, **C-1**), 74.1 (CH, **C-4**), 73.8 (CH₂, **CH₂Ph**), 73.5 (CH, **C-3**), 71.6 (CH, **C-5**), 70.2 (CH₂, **C-6**), 67.2 (CH₂, **C-7**), 54.6 (CH, **C-2**), 32.2 (CH₂, **C-8**), 29.9 (CH₂, **C-9**), 20.7 (CH₃, **Ac**).

$\text{IR } \nu$ (film, cm^{-1}) : 3471, 2927, 1776, 1745, 1710, 1385, 1226, 1107, 1040, 971, 873, 720, 698.

MS (ESI) : m/z 579 (MNH_4^+ , 30%).

HRMS (ESI) : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{BrNO}_8$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 579.1356. Found: 579.1342.

(3-Methylimidazolium-1-propyl) 3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside 246.

N-Methylimidazole (23 μ L, 0.285 mmol, 3.6 eq.) was added to the solution of product **245** (80 mg, 0.142 mmol, 1.0 eq.) in CH_3CN (1 mL). The reaction was stirred and heated to 85 $^{\circ}$ C

for 36 h. Then KBF_4 was added (11 mg, 0.087 mmol, 1.1 eq.) and the reaction was stirred at 85 °C for 24 h. KBF_4 was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (15 mL) and washed with H_2O (2×15 mL) and then with brine (2×15 mL). The organic layer was concentrated under reduced pressure. The residue was then washed with Et_2O (3×5 mL) and toluene (3×5 mL) to give **246** (62 mg ; 67%) as a beige powder.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -4.1 (c 0.5, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.15 (s, 1H, **H-10**), 7.76-7.70 (m, 2H, **NPhth**), 7.66-7.62 (m, 2H, **NPhth**), 7.27-7.18 (m, 6H, **Ar** + **H-12** or **H-13**), 6.80 (s, 1H, **H-12** or **H-13**), 5.52 (dd, $J_{3,2} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 8.5$ Hz, 1H, **H-3**), 5.23 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.50 (AB system, $J = 11.5$ Hz, 2H, CH_2Ph), 4.12 (t, $J_{7,8} = 6.0$ Hz, 1H, **H-7**), 3.95 (dd, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 1H, **H-2**), 3.83 (d, $J_{6,6'} = 6.0$ Hz, 1H, **H-6**), 3.76 (d, $J_{6',6} = 6.0$ Hz, 1H, **H-6'**), 3.72 (s, 3H, **H-11**), 3.68-3.65 (m, 2H, **H-4** + **H-5**), 3.52-3.57 (m, 1H, **H-9**), 3.40-3.35 (m, 1H, **H-9'**), 1.98-1.89 (m, 2H, **H-8**), 1.80 (s, 3H, **Ac**).

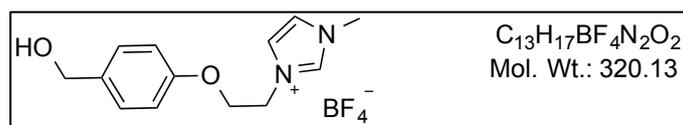
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 171.2 (2C, 2CO), 137.8 (C, **Ar**), 137.3 (CH, **C-10**), 134.5 (2CH, **NPhth**), 131.3 (C, **Ar**), 128.6 (2CH, **Ar**), 128.4 (CH, **Ar**), 128.0 (2CH, **Ar**), 123.6 (2CH, **NPhth**), 123.0 (CH, **C-12** or **C-13**), 122.9 (CH, **C-12** or **C-13**), 97.9 (CH, **C-1**), 74.8 (CH, **C-4**), 73.6 (CH_2 , CH_2Ph), 73.5 (CH, **C-3**), 70.3 (CH, **C-5**), 69.9 (CH_2 , **C-6**), 65.7 (CH_2 , **C-7**), 54.6 (CH, **C-2**), 47.0 (CH_2 , **C-9**), 36.1 (CH_3 , **C-11**), 30.0 (CH_2 , **C-8**), 20.7 (CH_3 , **Ac**).

IR v (film, cm^{-1}) : 2252, 1776, 1744, 1714, 1387, 1255, 1226, 1162, 1030, 906, 726.

MS (ESI) : m/z 564 ($[\text{M}-\text{BF}_4]^-$, 100%).

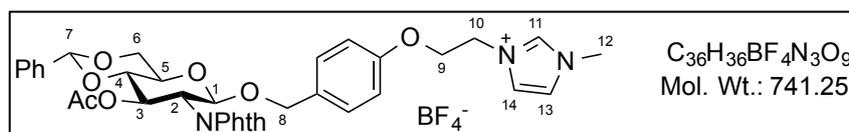
HRMS (ESI) : Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{BF}_4\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M}-\text{BF}_4]^-$: 564.2346. Found: 564.2354.

(4-(1-Ethoxy-3-methylimidazolium)phenyl)methanol tetrafluoroborate **248**.



(4-(Hydroxymethyl)phenyl)phenol (1.24 g, 10 mmol, 1.0 eq.) and K_2CO_3 (4.14 g, 30 mmol, 3.0 eq.) in 1,2-dibromoethane (10 mL) and DMF (5 mL) were stirred in 45 °C for 6 h. After the reaction mixture was filtered, the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in H_2O (10 mL), extracted by EtOAc (3×10 mL), the organic layer was washed with brine, dried under Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/ EtOAc 1:0 to 6:4) to give **247**²⁴⁸ (930 mg ; 40%) as an amorphous white solid. This product (900 mg, 3.9 mmol, 1 eq.) and *N*-methylimidazole (311 μL , 3.9 mmol, 1.0 eq.) in dried MeCN (5.8 mL) were stirred at 80 °C for 12 h. KBF_4 (487 mg, 3.9 mmol, 1.0 eq.) was added and the mixture was stirred for 24 h. The reaction mixture was then filtered and evaporated under reduced pressure, the residue was washed with Et_2O (3×3 mL) and EtOAc (3×3 mL) to give the ionic liquid **248**²⁴⁸ (1.0 g ; 80%) as a brown viscous oil.

4-(1-Ethoxy-3-methylimidazolium)-benzyl 3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate **249.**



Donor **104** (100 mg, 0.166 mmol, 2.0 eq.) and acceptor **248**²⁴⁸ (26 mg, 0.083 mmol, 1.0 eq.) in dichloromethane (500 μ L) were stirred with molecular sieves 4 \AA (25 mg) at room temperature for 1 h. NIS (47 mg, 0.208 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -10 $^{\circ}$ C. After addition of TfOH (1.1 μ L, 0.012 mmol, 0.15 eq.), the reaction was stirred for 2 h at room temperature. The mixture was diluted in dichloromethane (10 mL) and neutralized with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (10 mL). The reaction mixture was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL) and H₂O (2 \times 10 mL) and brine (2 \times 10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) and the desired product precipitated as a yellow powder **249** (20 mg ; **40%**).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +98.0 (*c* 1.5, CHCl₃).

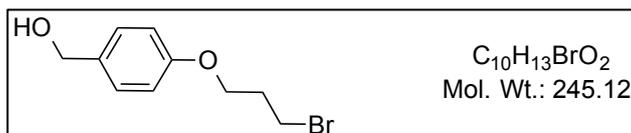
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.93 (s, 1H, **H-11**), 7.77-7.69 (m, 4H, **NPhth**), 7.39-7.35 (m, 2H, **Ar**) 7.30-7.22 (m, 5H, **Ar**), 6.94-6.87 (m, 2H, **Ar**), 6.56-6.39 (m, 2H, **H-13** + **H-14**), 5.78 (t, $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, 1H, **H-3**), 5.47 (s, 1H, **H-7**), 5.29 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.76-4.63 (m, 2H, **H-8** + **H-9**), 4.43-4.33 (m, 2H, **H-5** + **H-8'**), 4.24-4.17 (m, 2H, **H-2** + **H-9'**), 3.93 (s, 3H, **H-12**), 3.84-3.57 (m, 5H, **H-4** + **H-6** + **H-6'** + **H-10** + **H-10'**), 1.81 (**Ac**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.3 (2C, 2CO), 136.9 (CH, **C-11**), 133.8 (2CH, **NPhth**), 130.0 (CH, **Ar**), 129.8 (2CH, **Ar**), 129.1 (CH, **Ar**), 128.3 (2CH, **Ar**), 126.3 (CH, **Ar**), 126.2 (2CH, **Ar**), 123.5 (2CH, **NPhth**), 114.3 (2CH, **C-13** + **C-14**), 101.6 (CH, **C-7**), 96.5 (CH, **C-1**), 79.3 (CH, **C-4**), 70.8 (CH, **C-3**), 70.7 (CH₂, **C-8**), 69.2 (CH₂, **C-9**), 68.7 (CH, **C-5**), 66.3 (CH₂, **C-6**), 55.3 (CH, **C-2**), 49.2 (CH₂, **C-10**), 36.5 (CH₃, **C-12**), 20.6 (CH₃, **Ac**).

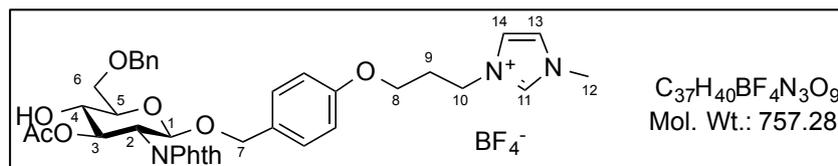
IR ν (film, cm⁻¹) : 3065, 1775, 1741, 1714, 1448, 1382, 1226, 1075, 845, 696, 666.

MS (ESI) : *m/z* 654 ([M-BF₄⁻], 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₃₆H₃₆N₃O₉ [M-BF₄⁻]: 654.2452. Found: 654.2449.

(4-(3-Bromopropoxy)phenyl)methanol 250.

(4-(Hydroxymethyl)phenyl)phenol (1.24 g, 10 mmol, 1.0 eq.) and K₂CO₃ (4.14 g, 30 mmol, 3.0 eq.) in 1,2-dibromopropane (11.7 mL) and DMF (5 mL) were stirred in 45 °C for 6 h. After the reaction mixture was filtered, the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was dissolved in H₂O (10 mL), extracted by EtOAc (3 × 10 mL), the organic layer was washed with brine, dried under Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give **250**²⁴⁹ (1.17 g ; **49%**) as an amorphous white solid.

4-(3-Methylimidazolium-1-propyloxy)-benzyl 3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranoside tetrafluoroborate 251.

Donor **103** (100 mg, 0.166 mmol, 1.0 eq.) and acceptor **250** (52 mg, 0.216 mmol, 1.3 eq.) in toluene (3.4 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (50 mg) at room temperature for 1 h. NIS (45 mg, 0.199 mmol, 1.2 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -30 °C. After addition of TfOH (2.9 μL, 0.033 mmol, 0.2 eq.), the reaction was stirred for 3 h and neutralized with triethylamine (3 drops). The mixture was diluted in EtOAc (15 mL) and molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give 4-(3-bromopropoxy)-benzyl 3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranoside (53 mg ; **48%**) as a yellow powder.

[α]_D²⁰ : -10.4 (*c* 0.4, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.84-7.71 (m, 4H, **NPhth**), 7.43-7.33 (m, 5H, **Ar**), 7.02 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, **Ar**), 6.59 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, **Ar**), 5.67 (dd, *J*_{3,2} = 10.5 Hz, *J*_{3,4} = 8.5 Hz, 1H, **H-3**), 5.37 (d, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, 1H, **H-1**), 4.74 (dd, *J* = 18.0 Hz, *J* = 12.0 Hz, 2H, **H-7**), 4.70 (dd, *J* = 91.0 Hz, *J* = 12.0 Hz, 2H, **CH₂Ph**), 4.29 (dd, *J*_{2,3} = 10.5 Hz, *J*_{2,1} = 8.5 Hz, 2H, **H-2**), 3.99 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, **H-8**), 3.90-3.71 (m, 4H, **H-4 + H-5 + H-6 + H-6'**), 3.60 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, **H-10**), 2.76 (s, 1H, **OH**), 2.29 (q, 2H, *J* = 6.0 Hz, **H-9**), 1.94 (**Ac**).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 171.2 (2C, 2CO), 167.7 (C, OCOMe), 158.3 (C, Ar), 137.7 (C, Ar), 134.1 (CH, NPhth), 131.5 (C, Ar), 129.4 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 123.5 (CH, NPhth), 114.2 (CH, Ar), 97.1 (CH, C-1), 74.2 (CH, C-4), 73.8 (CH₂, CH₂Ph), 73.5 (CH, C-3), 71.5 (CH, C-5), 70.9 (CH₂, C-7), 70.2 (CH₂, C-6), 65.1 (CH₂, C-8), 54.6 (CH, C-2), 32.3 (CH₂, C-9), 30.0 (CH₂, C-10), 20.7 (CH, Ac).

IR ν (film, cm^{-1}) : 3425, 2932, 1776, 1745, 1713, 1611, 1512, 1384, 1229, 1039, 971, 721.

MS (ESI) : m/z 685 (MNH_4^+ , 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{BrNO}_9$ [$\text{M}+\text{NH}_4$]⁺ : 685.1761. Found: 685.1779.

N-Methylimidazole (23 μL , 0.286 mmol, 3.6 eq.) was added to the solution of 4-(3-bromopropoxy)-benzyl 3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside (53 mg, 0.079 mmol, 1.0 eq.) in CH_3CN (1.0 mL). The reaction was stirred and heated to 85 $^\circ\text{C}$ for 24 h. Then KBF_4 was added (11 mg, 0.087 mmol, 1.1 eq.) and the reaction was stirred at 85 $^\circ\text{C}$ for further 24 h. KBF_4 was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) washed with H_2O (2×15 mL) and brine (2×15 mL) and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The residue was then washed with Et_2O (3×5 mL) and toluene (3×5 mL) to give **251** (53 mg ; **88%**) as a white powder.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -10.8 (c 1.0, CHCl_3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.09 (s, 1H, H-11), 7.77-7.69 (br s, 4H, NPhth), 7.48-7.40 (br s, 2H, Ar), 7.37-7.29 (m, 5H, Ar), 7.28-7.27 (m, 2H, Ar), 6.94 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-13 or H-14), 6.54 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-13 or H-14), 5.62 (t, $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, 1H, H-3), 5.24 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1), 4.71 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.64 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 2H, H-7), 4.46 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.38 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-8), 4.20 (dd, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, 2H, H-2), 3.90-3.84 (m, 7H, H-5 + H-6 + H-9 + H-10), 3.78 (t, 1H, $J_{4,3} = 9.5$ Hz, H-4), 3.67 (s, 3H, H-12), 1.85 (s, 3H, Ac).

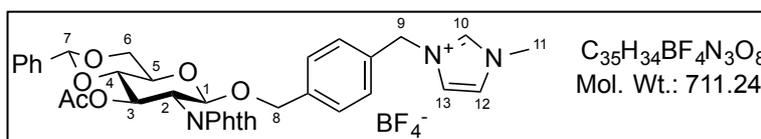
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.3 and 169.3 (2C, 2CO), 137.2 (CH, C-11), 134.3 (CH, NPhth), 129.8 (CH, C-13 or C-14), 129.4 (CH, Ar), 128.5 (3CH, Ar), 128.1 (2CH, Ar), 128.0 (2CH, Ar), 127.9 (CH, Ar), 127.8 (2CH, Ar), 123.5 (2CH, NPhth), 123.2 (2CH, Ar), 114.3 (2CH, C-13 or C-14), 96.4 (CH, C-1), 73.8 (CH₂, C-7), 73.4 (CH, C-3), 71.4 (CH, C-4), 70.5 (CH₂, CH₂Ph), 70.0 (CH₂, C-6), 68.6 (CH, C-5), 63.9 (CH₂, C-9 or C-10), 61.9 (CH₂, C-9 or C-10), 54.7 (CH, C-2), 47.8 (CH₂, C-8), 36.4 (CH₃, C-12), 20.5 (CH₃, Ac).

IR ν (film, cm^{-1}) : 3354, 3158, 2944, 1775, 1745, 1712, 1539, 1513, 1385, 1229, 1022, 722.

MS (ESI) : m/z 670 ($[\text{M}-\text{BF}_4^-]$, 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_9$ [$\text{M}-\text{BF}_4^-$] : 670.2765. Found: 670.2799.

4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl 3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate 253.



Donor **104** (200 mg, 0.333 mmol, 1.0 eq.) and 4-(chloromethyl)benzyl alcohol (68 mg, 0.433 mmol, 1.3 eq.) in toluene (6.8 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (80 mg) at room temperature for 1 h. NIS (90 mg, 0.399 mmol, 1.2 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -30 °C. After addition of TfOH (5.9 μ L, 0.066 mmol, 0.2 eq.), the reaction was stirred for 3 h and neutralized with triethylamine (3 drops). The mixture was diluted in EtOAc (20 mL) and molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (40 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give 4-(chloromethyl)-benzyl 3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside (129 mg ; **67%**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -34.0 (*c* 1.5, CHCl_3).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.79-7.61 (m, 4H, **NPhth**), 7.42-7.35 (m, 2H, **Ar**), 7.31-7.25 (m, 3H, **Ar**), 7.00 (s, 4H, **Ar**), 5.80 (dd, $J_{3,2} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, 1H, **H-3**), 5.48 (s, 1H, **H-7**), 5.38 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.77 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **H-8**), 4.45 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **H-8'**), 4.40-4.34 (m, 3H, **H-6 + H-6' + H-9**), 4.27 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 1H, **H-2**), 3.85-3.62 (m, 3H, **H-4 + H-5 + H-6'**), 1.82 (**Ac**).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.2 (2C, 2CO), 137.1 (C, **Ar**), 137.0 (C, **Ar**), 136.9 (C, **Ar**), 134.2 (2CH, **NPhth**), 129.2 (CH, **Ar**), 128.5 (CH, **Ar**), 128.3 (CH, **Ar**), 128.0 (CH, **Ar**), 126.3 (CH, **Ar**), 123.6 (2CH, **NPhth**), 101.7 (C-7), 97.9 (CH, C-1), 79.2 (CH, C-4), 71.1 (CH, C-8), 69.7 (CH, C-3), 68.7 (CH_2 , C-6), 66.2 (CH, C-5), 55.4 (CH, C-2), 45.7 (CH_2 , C-9), 20.6 (CH_3 , **Ac**).

IR ν (film, cm^{-1}) : 2861, 1778, 1735, 1707, 1379, 1228, 1095, 985, 871, 765, 717.

MS (ESI) : m/z 595 (MNH_4^+ , 30%), 1177 (2MNa^+ , 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{ClNO}_8$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 595.1847. Found: 595.1820.

N-Methylimidazole (38 μ L, 0.483 mmol, 3.6 eq.) was added to the solution of product 4-(chloromethyl)-benzyl 3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside (75 mg, 0.134 mmol, 1.0 eq.) in CH_3CN (1.7 mL). The reaction was stirred and heated to 85 °C for 24 h. Then KBF_4 was added (17 mg, 0.148 mmol, 1.1 eq.) and the reaction was stirred at 85 °C for further 24 h. KBF_4 was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) and washed with H_2O (2×15 mL) and brine (2×15 mL). The organic layer was concentrated

under reduced pressure. The residue was washed with Et₂O (3 × 5 mL) and toluene (3 × 5 mL) to give **253** (56 mg ; **66%**) as a white powder.

$[\alpha]_D^{20}$: -17.8 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 10.25 (s, 1H, **H-10**), 7.88-7.67 (m, 4H, **NPhth**), 7.48-7.35 (m, 5H, **Ar**), 7.22-7.13 (m, 4H, **Ar**), 7.12-7.08 (m, 1H, **H-12** or **H-13**), 6.95-6.90 (m, 1H, **H-12** or **H-13**), 5.86 (t, $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, 1H, **H-3**), 5.56 (s, 1H, **H-7**), 5.42 (br s, 2H, **H-9**), 5.39 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.83 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **H-8**), 4.55 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **H-8'**), 4.46 (dd, $J_{6,5} = 10.0$ Hz, $J_{6,6'} = 5.0$ Hz, 1H, **H-6**), 4.35 (dd, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 1H, **H-2**), 4.03 (s, 3H, **H-11**), 3.88 (t, 1H, $J_{5,4} = J_{5,6} = 10.0$ Hz, **H-5**), 3.60 (dd, 1H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, $J_{4,3} = 9.5$ Hz, **H-4**), 3.75-3.74 (m, 1H, **H-6'**), 1.91 (s, 1H, **Ac**).

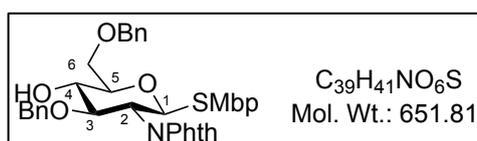
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.2 (2C, 2CO), 138.0 (1C, N(CO)), 137.3 (CH, **C-10**), 136.8 (N(CO)), 134.7 (2C, **Ar**), 129.2 (C, **Ar**), 129.1 (2C, **Ar**), 128.8 (2C, **Ar**), 128.3 (2C, **Ar**), 126.2 (2C, **Ar**), 123.6 (2C, **Ar**), 123.5 (2C, **C-12** + **C-13**), 101.6 (CH, **C-7**), 97.4 (CH, **C-1**), 79.2 (CH, **C-4**), 70.5 (CH₂, **C-8**), 69.5 (CH, **C-3**), 68.6 (CH₂, **C-6**), 66.3 (CH, **C-5**), 55.2 (CH, **C-2**), 52.9 (CH₂, **C-9**), 36.5 (CH₃, **C-11**), 20.6 (CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹) : 3387, 3149, 2927, 1778, 1738, 1712, 1384, 1225, 1101, 1075, 1031, 995, 872, **722**.

MS (ESI) : *m/z* 624 ([M-BF₄⁻], 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₃₅H₃₄N₃O₈ [M-BF₄⁻] : 624.2346. Found: 624.2350.

(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio-β-D-glucopyranoside 254.



To a suspension of (2-methyl-5-*tert*-butylphenyl) 4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio-β-D-glucopyranoside¹⁰⁰ (4.09 g, 7.31 mmol, 1.0 eq.) and NaH 60 % dispersion in mineral oil (366 mg, 9.14 mmol, 1.25 eq.) in DMF (40 mL), was added dropwise BnBr (1.31 mL, 10.96 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. MeOH (6 mL) and water (100 mL) were successively added and the reaction mixture was extracted with EtOAc (3 x 50 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 7:3) to give (2-methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio-β-D-glucopyranoside¹⁰⁰ (3 g, **63** %) as an amorphous white solid. This compound (1.5 g, 2.31 mmol) and NaBH₃CN (1.99 g, 31.63 mmol, 13.7 eq.) in CH₂Cl₂ (23 mL) were cooled to 0 °C. A solution of HCl in Et₂O (2 M, 23 mL) was added dropwise to the reaction mixture. It was then warmed to room temperature and stirred for 8 h. The reaction mixture was poured into a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (50 mL), extracted with

CH₂Cl₂ (3 x 70 mL), washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (40 mL), an aqueous solution of HCl (1M, 40 mL), brine (20 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 8:2 to 6:4) to give the desired product **254** (1.24 g, **82 %**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{25}$: +81.2 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.82 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, **NPhth**), 7.73-7.61 (m, 3H, **NPhth**), 7.41 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, **Ar**), 7.36-7.27 (m, 5H, **Ar**), 7.12 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, **Ar**), 7.05-7.01 (m, 2H, **Ar**), 6.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **Ar**), 6.96-6.90 (m, 3H, **Ar**), 5.44 (d, *J*_{1,2} = 10.0 Hz, 1H, **H-1**), 4.76 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.62 (AB system, *J* = 12 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.57 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.32-4.22 (m, 2H, **H-2 + H-3**), 3.88-3.79 (m, 2H, **H-4 + H-6**), 3.75 (dd, *J*_{6,6} = 10.0 Hz, *J*_{6,5} = 5.5 Hz, 1H, **H-6'**), 3.67-3.60 (m, 1H, **H-5**), 2.88 (d, *J*_{OH,4} = 2.1 Hz, 1H, OH), 2.09 (s, 3H, **Me**), 1.20 (s, 9H, ***t*-Bu**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 168.2 (C, NCO), 167.5 (C, NCO), 149.6 (2C, **NPhth**), 138.3 (C, **Ar**), 137.7 (C, **Ar**), 137.1 (C, **Ar**), 134.2 (CH, **NPhth**), 134.0 (CH, **NPhth**), 131.9 (2C, **Ar**), 130.4 (CH, **Ar**), 130.0 (CH, **Ar**), 128.7 (2CH, **Ar**), 128.4 (2CH, **Ar**), 128.2 (3CH, **Ar**), 128.1 (2CH, **Ar**), 127.7 (CH, **Ar**), 125.3 (CH, **Ar**), 123.7 (CH, **NPhth**), 123.4 (CH, **NPhth**), 84.7 (CH, **C-1**), 79.8 (CH, **C-3**), 77.7 (CH, **C-5**), 74.6 (CH + CH₂, **C-4 + CH₂Ph**), 74.0 (CH₂, CH₂Ph), 71.0 (CH₂, **C-6**), 54.8 (CH, **C-2**), 34.6 (C, ***t*-Bu**), 31.4 (3CH₃, ***t*-Bu**), 20.4 (CH₃, **Me**).

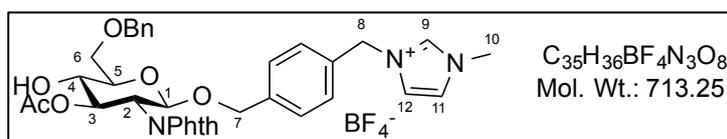
IR ν (film, cm⁻¹): 3476, 3059, 3028, 2956, 2909, 2865, 1774, 1713, 1611.

MS (ESI): *m/z* = 674 (MNa⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₃₉H₄₁NO₆NaS [M + Na]⁺: 674.2553. Found: 674.2576.

Elementary Analysis: Calcd for C₃₉H₄₁NO₆S: C, 71.86; H, 6.34; N, 2.15; S, 4.92. Found: C, 71.45; H, 6.49; N, 2.22; S, 4.87.

4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl 3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate **255**.



Donor **103** (100 mg, 0.166 mmol, 1.0 eq.) and 4-(chloromethyl)benzyl alcohol (33.5 mg, 0.216 mmol, 1.3 eq.) in toluene (3.4 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (50 mg) at room temperature for 1 h. NIS (45 mg, 0.199 mmol, 1.2 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -30 °C. After addition of TfOH (2.9 μ L, 0.033 mmol, 0.2 eq.), the reaction was stirred for 3 h and neutralized with triethylamine (3 drops). The mixture was diluted in EtOAc (15 mL) and molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on

silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give 4-(chloromethyl)-benzyl 3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside (82.2 mg ; **85%**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{20}$: -29.7 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.70-7.64 (m, 2H, **NPhth**), 7.62-7.57 (m, 2H, **NPhth**), 7.27-7.20 (m, 5H, **Ar**), 6.99-6.93 (m, 4H, **Ar**), 5.52 (dd, $J_{3,2} = 11.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, 1H, **H-3**), 5.25 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.71 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.54 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, **H-7**), 4.48 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, **H-7**), 4.40 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.32 (s, 2H, **H-8**), 4.17 (dd, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 2H, **H-2**), 3.75-3.67 (m, 3H, **H-4 + H-6 + H-6'**), 3.64-3.57 (m, 1H, **H-5**), 2.83 (d, $J_{OH,4} = 3.5$ Hz, 1H, **OH**), 1.81 (s, 3H, **Ac**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 171.2 (2C, 2CO), 167.7 (C, CO), 137.6 (2C, **Ar**), 137.4 (2C, **Ar**), 136.8 (C, **Ar**), 134.1 (2CH, **NPhth**), 128.5 (3CH, **Ar**), 128.4 (3CH, **Ar**), 127.9 (3CH, **Ar**), 127.8 (2CH, **Ar**), 123.6 (2CH, **NPhth**), 97.4 (CH, **C-1**), 74.1 (CH, **C-5**), 73.8 (CH₂, **C-7**), 73.5 (CH, **C-3**), 71.6 (CH, **C-4**), 70.7 (CH₂, **CH₂Ph**), 70.2 (CH₂, **C-6**), 54.6 (CH, **C-2**), 45.8 (CH₂, **C-8**), 20.7 (CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹) : 3471, 2870, 1776, 1745, 1711, 1384, 1227, 1041, 970, 874, 720.

MS (ESI) : *m/z* 1181 (2MNa⁺, 30%), 597 (MNH₄⁺, 60%), 625 ([M+C₂H₇N+H]⁺, 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₃₁H₃₄ClN₂O₈ [M+NH₄]⁺ : 597.2004. Found: 597.2001.

N-Methylimidazole (25 μ L, 0.311 mmol, 3.6 eq.) was added to the solution of product 4-(chloromethyl)-benzyl 3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside (50 mg, 0.086 mmol, 1.0 eq.) in CH₃CN (1.7 mL). The reaction was stirred and heated to 85 °C for 24 h. Then KBF₄ was added (12 mg, 0.095 mmol, 1.1 eq.) and the mixture was stirred at 85 °C for further 24 h. KBF₄ was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) and washed with H₂O (2 \times 15 mL) and brine (2 \times 15 mL) and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The residue was washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **255** (61 mg ; **100%**) as a white powder.

$[\alpha]_D^{20}$: -10.8 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.68 (s, 1H, **H-9**), 7.71-7.63 (m, 4H, **NPhth**), 7.28-7.24 (m, 4H, **Ar**), 7.18-7.07 (m, 2H, **H-11 + H-12**), 7.06-6.97 (m, 5H, **Ar**), 5.54 (dd, $J_{3,2} = 11.0$ Hz, $J_{3,4} = 8.5$ Hz, 1H, **H-3**), 5.21 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 5.09 (s, 2H, **H-8**), 4.69 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.55 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, **H-7**), 4.50 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, **H-7**), 4.43 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.14 (dd, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, 1H, **H-2**), 3.81-3.75 (m, 2H, **H-6 + H-6'**), 3.74 (s, 3H, **H-10**), 3.72-3.63 (m, 2H, **H-4 + H-5**), 1.79 (s, 1H, **Ac**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 171.1 (2C, 2CO), 167.9 (C, CO), 167.8 (C, CO), 138.4 (C, N(CO)), 137.9 (C, N(CO)), 136.4 (CH, **C-9**), 134.6 (CH, **Ar**), 132.3 (CH, **Ar**), 129.1 (2CH, **Ar**), 129.0 (5CH, **Ar**), 128.5 (3CH, **Ar**), 127.8 (CH, **Ar**), 127.7 (2CH, **Ar**), 123.5 (C, **C-11** or **C-12**), 122.0 (C, **C-11** or **C-12**), 96.8 (CH, **C-1**), 74.8 (CH, **C-4**), 73.6 (CH₂, **CH₂Ph**), 73.4

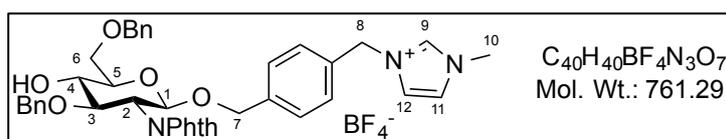
(CH, C-3), 70.6 (CH, C-5), 70.1 (CH₂, C-6), 69.9 (CH₂, C-7), 54.7 (CH, C-2), 52.9 (CH₂, C-8), 36.3 (CH₃, C-10), 20.7 (CH₃, Ac).

IR ν (film, cm⁻¹): 3155, 2873, 1775, 1711, 1734, 1712, 1386, 1231, 1043, 972, 722.

MS (ESI): m/z 626 ([M-BF₄], 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₃₅H₃₆N₃O₈ [M-BF₄]: 626.2497. Found: 626.2504.

4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl 3-O-benzyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate 256.



Donor **103** (50 mg, 0.077 mmol, 1 eq.) and 4-(chloromethyl)benzyl alcohol (15.5 mg, 0.099 mmol, 1.3 eq.) in toluene (1.6 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (25 mg) at room temperature for 1 h. NIS (20 mg, 0.092 mmol, 1.2 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -30 °C. After addition of TfOH (1.4 μ L, 0.015 mmol, 0.2 eq.), the reaction was stirred for 3 h and neutralized with triethylamine (3 drops). The mixture was diluted in dichloromethane (15 mL) and molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 1:0 to 6:4) to give 4-(chloromethyl)-benzyl 3,6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside (39 mg; **81%**) as an amorphous white solid. *N*-methylimidazole (17.7 μ L, 0.223 mmol, 3.6 eq.) was added to the solution of this product (39 mg, 0.062 mmol, 1.0 eq.) in CH₃CN (0.8 mL). The reaction was stirred and heated to 85 °C for 36 h. Then KBF₄ was added (8.5 mg, 0.068 mmol, 1.1 eq.) and the reaction was stirred at 85 °C for 24 h. KBF₄ was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) washed with H₂O (2 \times 10 mL) and brine (2 \times 10 mL) and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The residue was then washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **256** (46 mg; **98%**) as a brown viscous oil.

$[\alpha]_D^{20}$: +5.3 (c 1.2, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.00 (s, 1H, H-9), 7.72-7.64 (m, 3H, Ar), 7.37-7.34 (m, 2H, NPhth), 7.30-7.26 (m, 4H, NPhth + Ar), 7.15-7.12 (m, 1H, H-11 or H-12), 7.08-7.00 (m, 1H, H-11 or H-12), 6.99-6.96 (m, 4H, Ar), 6.85-6.81 (m, 4H, Ar), 5.15 (s, 2H, H-8), 5.04 (d, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.67 (AB system, J = 12.5 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.54 (AB system, J = 12.0 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.42 (AB system, J = 12.0 Hz, 2H, CH₂Ph), 4.15-4.04 (m, 2H, H-2 + H-3), 3.80 (s, 3H, H-10), 3.79-3.69 (m, 3H, H-5 + H-6 + H-6'), 3.59-3.53 (m, 1H, H-4).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.2 (2C, NCO), 138.8 (C, Ar), 138.1 (C, Ar), 137.9 (CH, NPhth), 136.8 (C, C-9), 134.4 (2CH, Ar), 131.7 (C, NPhth), 131.3 (C, NPhth), 129.5 (CH,

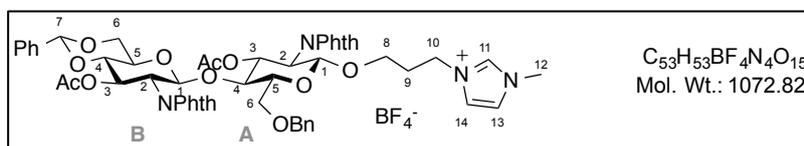
Ar), 129.1 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 128.6 (2CH, NPhth), 128.2 (2CH, NPhth + Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.8 (2CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 123.5 (CH, Ar), 123.3 (CH, C-11 or C-12), 121.9 (CH, C-11 or C-12), 120.1 (CH, Ar), 97.1 (CH, C-1), 78.5 (CH, C-3), 74.3 (CH₂, CH₂Ph), 74.2 (CH, C-4), 73.8 (CH₂, CH₂Ph), 73.7 (CH₂, C-5), 70.4 (CH, C-6), 69.9 (CH₂, CH₂Ph), 55.5 (CH, C-2), 52.0 (CH₂, C-8), 36.6 (CH₃, C-10).

IR ν (film, cm⁻¹): 3112, 2876, 1773, 1709, 1387, 1059, 723, 663.

MS (ESI): m/z 674 ([M-BF₄], 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₄₀H₄₀N₃O₇ [M-BF₄]: 674.2866. Found: 674.2887.

(3-Methylimidazolium-1-propyl) O (3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate 257.



Donor **104** (55 mg, 0.092 mmol, 3.0 eq.) and acceptor **246** (20 mg, 0.030 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous dichloromethane (200 μ L) were stirred with molecular sieves 4Å (20 mg) at room temperature for 1 h. NIS (17 mg, 0.077 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -10 °C. After addition of TfOH (0.5 μ L, 0.005 mmol, 0.15 eq.), the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was dissolved in dichloromethane (15 mL) and neutralized with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL). Molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **257** (33 mg ; **90%**) as a yellow powder.

$[\alpha]_D^{20}$: +14.8 (c 0.6, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.49 (s, 1H, H-11), 7.81-7.75 (m, 4H, NPhth), 7.70-7.63 (m, 4H, NPhth), 7.40-7.35 (m, 3H, Ar), 7.30-7.25 (m, 7H, Ar), 7.16-7.09 (m, 2H, H-13 + H-14), 5.84 (t, $J_{B-3,B-2} = J_{B-3,B-4} = 9.0$ Hz, 1H, HB-3), 5.68 (d, $J_{B-1,B-2} = 11.0$ Hz, 1H, HB-1), 5.52 (dd, $J_{A-3,A-2} = 11.0$ Hz, $J_{A-3,A-4} = 8.5$ Hz, 1H, HA-3), 5.47 (s, 1H, H-7), 5.24 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.5$ Hz, 1H, HA-1), 4.53 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 2H, CH₂Ph), 4.38-4.29 (m, 2H, HA-5 + HB-2), 4.24-4.15 (m, 2H, H-8), 3.99 (dd, $J_{A-2,A-3} = 11.0$ Hz, $J_{A-2,A-1} = 8.5$ Hz, HA-2), 3.83-3.77 (m, 4H, HB-6 + H-12), 3.76-3.62 (m, 7H, HA-4 + HA-6 + HB-4 + HB-5 + HB-6' + H-10), 3.58-3.50 (m, 1H, HA-6'), 2.04-1.94 (m, 2H, H-9), 1.85 (s, 3H, Ac), 1.81 (s, 3H, Ac).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.3 (C, CO), 171.0 (C, CO), 137.9 (CH, C-11), 134.5 (CH, NPhth), 134.4 (CH, NPhth), 130.6 (CH, Ar), 130.0 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 128.6 (2CH, Ar), 128.2 (2CH, Ar), 128.0 (2CH, Ar), 126.1 (2CH, Ar + C-13 or C-14), 125.6 (CH, C-13 or C-14), 123.6 (2CH, NPhth), 101.6 (CH, C-7), 98.0 (CH, CA-1), 84.7 (CH, CB-1),

79.1 (CH, CA-4 or CB-4), 74.5 (CH, CA-4 or CB-4), 73.7 (CH₂, CH₂Ph), 73.5 (CH, CA-3), 70.7 (CH, CB-3), 70.6 (CH, CA-5 or CB-5), 70.4 (CH, CA-5 or CB-5), 70.0 (CH₂, CA-6 or CB-6), 69.8 (CH₂, CA-6 or CB-6), 68.6 (CH₂, C-8 or C-10), 65.8 (CH₂, C-8 or C-10), 54.5 (2CH, CA-2 + CB-2), 47.0 (CH₂, C-9), 36.6 (CH₃, C-12), 20.7 (CH₃, Ac), 20.5 (CH₃, Ac).

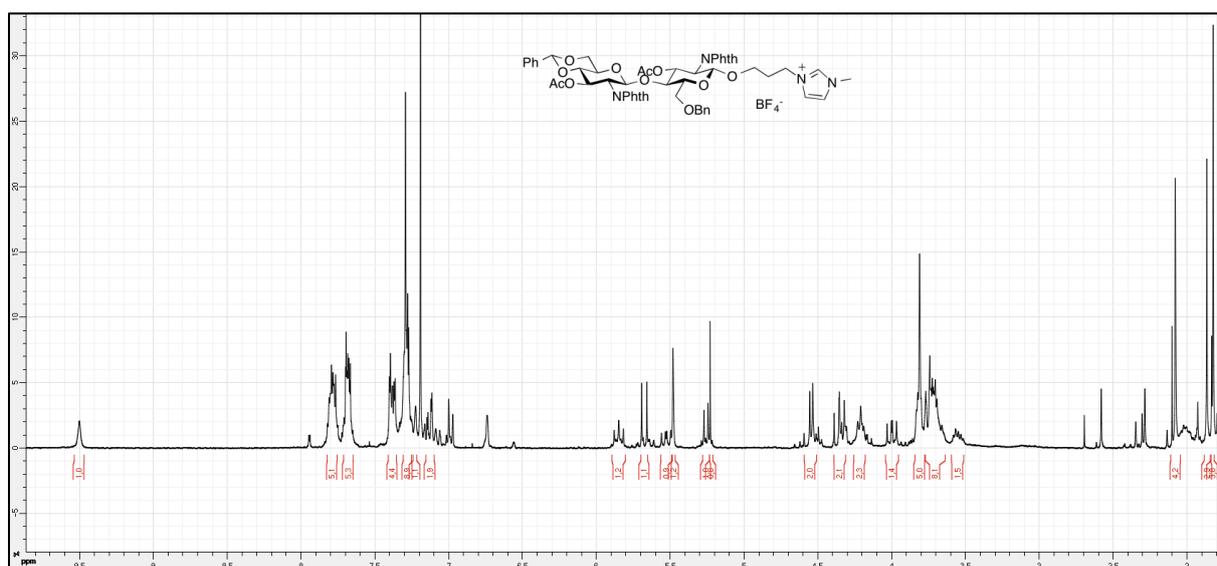
δ NCO were missing

IR ν (film, cm⁻¹): 2961, 2870, 1776, 1742, 1714, 1384, 1221, 1093, 1078, 1029, 965, 734, 720, 699.

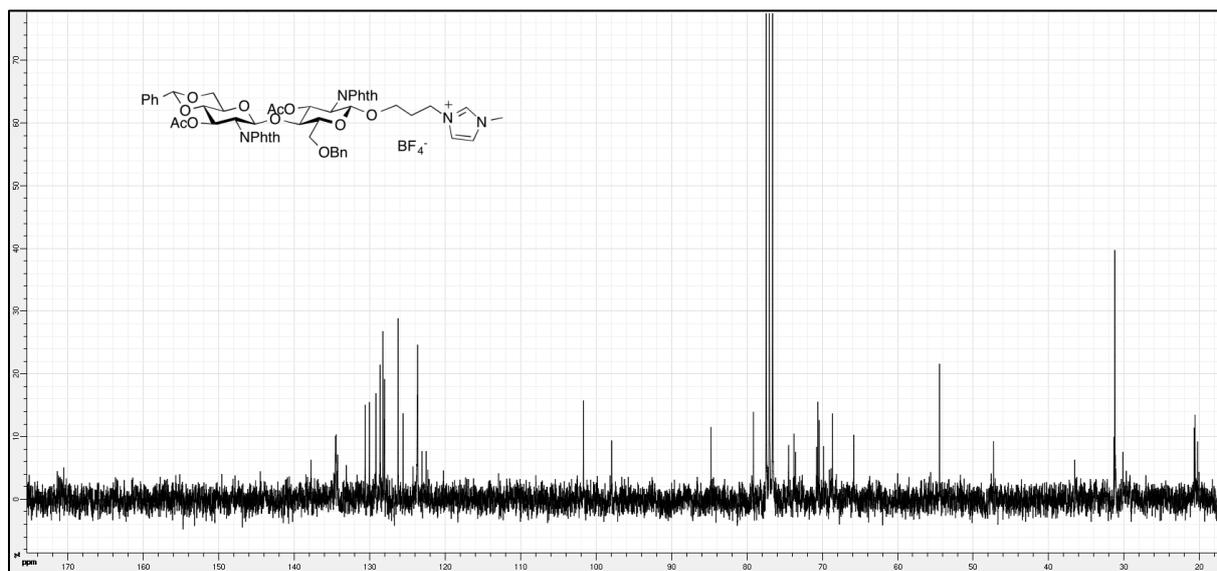
MS (ESI): *m/z* 985 ([M-BF₄]⁻, 30%).

HRMS (ESI): Calcd for C₅₈H₅₅N₄O₁₅ [M-BF₄]⁻: 985.3507. Found: 985.3521.

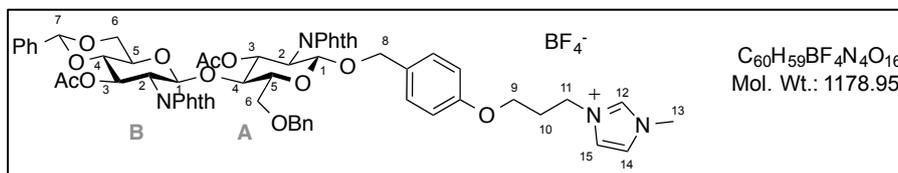
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):



¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):



4-(3-Methylimidazolium-1-propyloxy)-benzyl *O* (3-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate **258.**



Donor **104** (178 mg, 0.297 mmol, 3.0 eq.) and acceptor **251** (75 mg, 0.099 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous dichloromethane (500 μ L) were stirred with molecular sieves 4 \AA (70 mg) at room temperature for 1 h. NIS (56 mg, 0.247 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -10 $^{\circ}$ C. After addition of TfOH (1.3 μ L, 0.015 mmol, 0.15 eq.), the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was dissolved in dichloromethane (15 mL) and neutralized with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL). Molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **258** (88 mg ; **75%**) as a yellow powder.

$[\alpha]_D^{20}$: -2.8 (*c* 0.5, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.43 (s, 1H, **H-12**), 7.91-7.84 (m, 3H, **NPhth**), 7.78-7.70 (m, 5H, **NPhth**), 7.51-7.40 (m, 3H, **Ar**), 7.39-7.36 (m, 4H, **Ar**), 7.31-7.25 (m, 4H, **Ar** + **H-14** ou **H-15**), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H-14** ou **H-15**), 6.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, **Ar**), 6.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, **Ar**), 5.88 (t, *J*_{B-3,B-2} = *J*_{B-3,B-4} = 9.0 Hz, 1H, **HB-3**), 5.69 (d, *J*_{B-1,B-2} = 10.0 Hz, 1H, **HB-1**), 5.61 (dd, *J*_{A-3,A-2} = 9.5 Hz, *J*_{A-3,A-4} = 8.5 Hz, 1H, **HA-3**), 5.50 (s, 1H, **H-7**), 5.26 (d, *J*_{A-1,A-2} = 8.0 Hz, 1H, **HA-1**), 4.90 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, **HB-2**), 4.71 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.63 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 2H, **H-8**), 4.47 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂Ph), 4.44-4.38 (m, 2H, **HA-9**), 4.28-4.18 (m, 2H, **HA-2** + **HA-5**), 3.88 (s, 3H, **H-13**), 3.87-3.82 (m, 3H, **HB-6** + **HB-6'** + **HB-4**), 3.81-3.73 (m, 5H, **HA-4** + **HA-6** + **HB-5** + **H-11**), 3.72-3.68 (m, 1H, **HA-6'**), 2.36-2.27 (m, 2H, **H-10**), 1.89 (s, 3H, **Ac**), 1.91 (s, 3H, **Ac**).

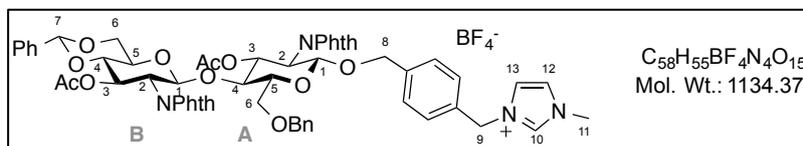
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 137.6 (CH, **C-12**), 134.4 (2CH, **NPhth**), 129.8 (CH, **Ar**), 129.2 (CH, **Ar**), 128.3 (CH, **Ar**), 127.5 (2CH, **Ar**), 127.3 (2CH, **Ar**), 126.2 (2CH, **Ar**), 123.6 (2CH, **Ar** + **C-14** or **C-15**), 123.4 (CH, **C-14** or **C-15**), 123.1 (2CH, **NPhth**), 122.7 (2CH, **NPhth**), 101.6 (CH, **C-7**), 98.2 (CH, **CA-1**), 96.0 (CH, **CB-1**), 79.0 (CH, **CA-4** or **CB-4**), 75.5 (CH, **CA-4** or **CB-4**), 74.4 (CH, **CA-3**), 72.8 (CH₂, CH₂Ph), 71.7 (CH, **CB-3**), 70.1 (CH₂, **C-8**), 69.6 (2CH, **CA-5** + **CB-5**), 68.6 (CH₂, **CA-6** or **CB-6**), 66.0 (CH₂, **CA-6** or **CB-6**), 63.9 (CH₂, **C-9** or **C-11**), 63.6 (CH₂, **C-9** or **C-11**), 55.7 (CH, **CA-2**), 54.8 (CH, **CB-2**), 47.3 (CH₂, **C-10**), 36.6 (CH₃, **C-13**), 20.8 (CH₃, **Ac**), 20.7 (CH₃, **Ac**).

δ NCO were missing

IR ν (film, cm⁻¹) : 2928, 1776, 1741, 1715, 1386, 1226, 1077, 1030, 906, 727.

MS (ESI) : *m/z* 1092 ([M-BF₄]⁻, 100%).

4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl O (3-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside tetrafluoroborate **259.**



Donor **104** (354 mg, 0.589 mmol, 3.0 eq.) and acceptor **255** (140 mg, 0.196 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous dichloromethane (900 μ L) were stirred with molecular sieves 4 \AA (100 mg) at room temperature for 1 h. NIS (110 mg, 0.490 mmol, 2.5 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -10 $^{\circ}$ C. After addition of TfOH (2.6 μ L, 0.029 mmol, 0.15 eq.), the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was diluted in dichloromethane (15 mL) and neutralized with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL). Molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **259** (180 mg ; **80%**) as a yellow powder.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +11.3 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 9.49 (s, 1H, **H-10**), 7.89-7.77 (m, 8H, **NPhth**), 7.50-7.45 (m, 3H, **Ar**), 7.33-7.30 (m, 2H, **Ar**), 7.23-7.19 (m, 2H, **Ar**), 7.15-7.11 (m, 4H, **Ar**), 7.10-7.05 (m, 2H, **H-12** + **H-13**), 5.93 (t, $J_{\text{B-3,B-2}} = J_{\text{B-3,B-4}} = 10.0$ Hz, 1H, **HB-3**), 5.76 (d, $J_{\text{B-1,B-2}} = 10.5$ Hz, 1H, **HB-1**), 5.62 (t, $J_{\text{A-3,A-2}} = J_{\text{A-3,A-4}} = 10.5$ Hz, 1H, **HA-3**), 5.57 (s, 1H, **H-7**), 5.39 (s, 2H, **H-9**), 5.28 (d, $J_{\text{A-1,A-2}} = 8.0$ Hz, 1H, **HA-1**), 4.80 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, **H-8**), 4.67-4.59 (m, 2H, **HA-5** + **HB-2**), 4.50 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, **H-8'**), 4.29-4.24 (m, 2H, **HA-2** + **HB-5**), 3.95 (s, 3H, **H-11**), 3.89-3.80 (m, 6H, **HA-4** + **HA-6** + **HA-6'** + **HB-4** + **HB-6** + **HB-6'**), 1.93 (s, 3H, **Ac**), 1.91 (s, 3H, **Ac**).

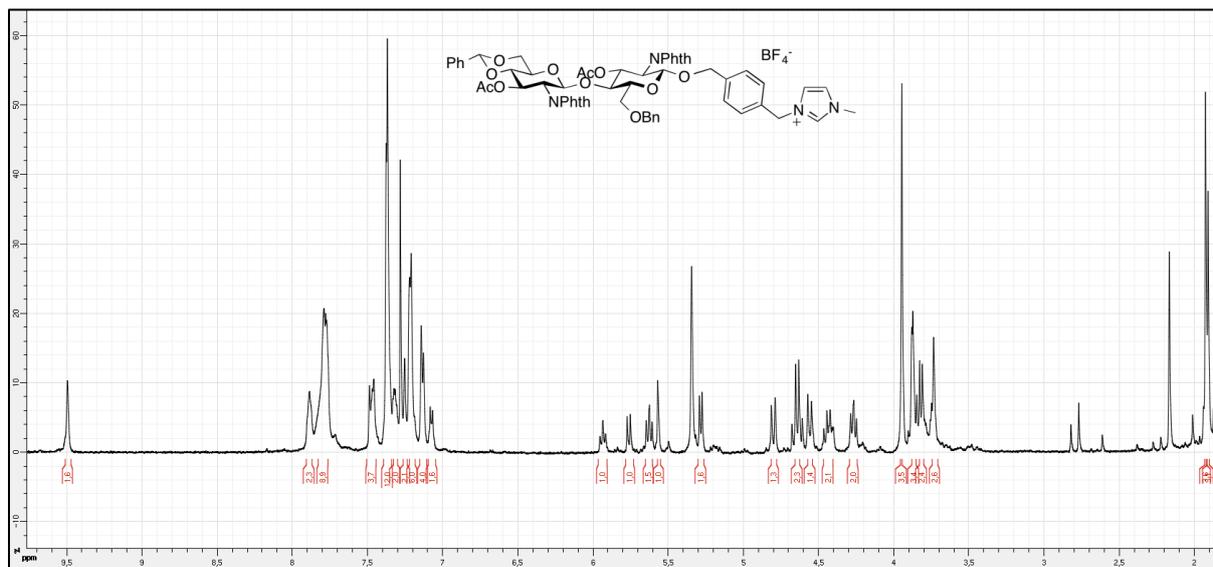
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 148.5 (2C, **NPhth**), 136.6 (CH, **C-10**), 134.4 (CH, **NPhth**), 134.3 (CH, **NPhth**), 130.6 (CH, **Ar**), 130.1 (CH, **Ar**), 129.2 (CH, **Ar**), 128.9 (CH, **Ar**), 128.5 (CH, **Ar**), 128.3 (CH, **Ar**), 127.8 (CH, **Ar**), 127.7 (CH, **Ar**), 126.2 (CH, **Ar**), 125.6 (CH, **C-12** or **C-13**), 123.6 (CH, **NPhth**), 123.5 (CH, **NPhth**), 122.6 (CH, **C-12** or **C-13**), 101.7 (CH, **C-7**), 96.7 (CH, **CA-1**), 84.7 (CH, **CB-1**), 79.1 (CH, **CA-4** or **CB-4**), 74.7 (CH, **CA-4** or **CB-4**), 73.7 (CH, **C-8**), 73.4 (CH, **CA-3**), 70.7 (CH, **CA-5** or **CB-5**), 70.6 (CH, **CA-5** or **CB-5**), 70.4 (CH, **CB-3**), 70.0 (CH₂, **CH₂Ph**), 69.9 (CH₂, **CA-6** or **CB-6**), 68.6 (CH₂, **CA-6** or **CB-6**), 54.6 (CH, **CA-2**), 54.4 (CH, **CB-2**), 53.3 (CH₂, **C-9**), 36.7 (CH₃, **C-11**), 20.5 (CH₃, **Ac**), 20.2 (CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹) : 2869, 1775, 1713, 1743, 1384, 1224, 1043, 967, 721.

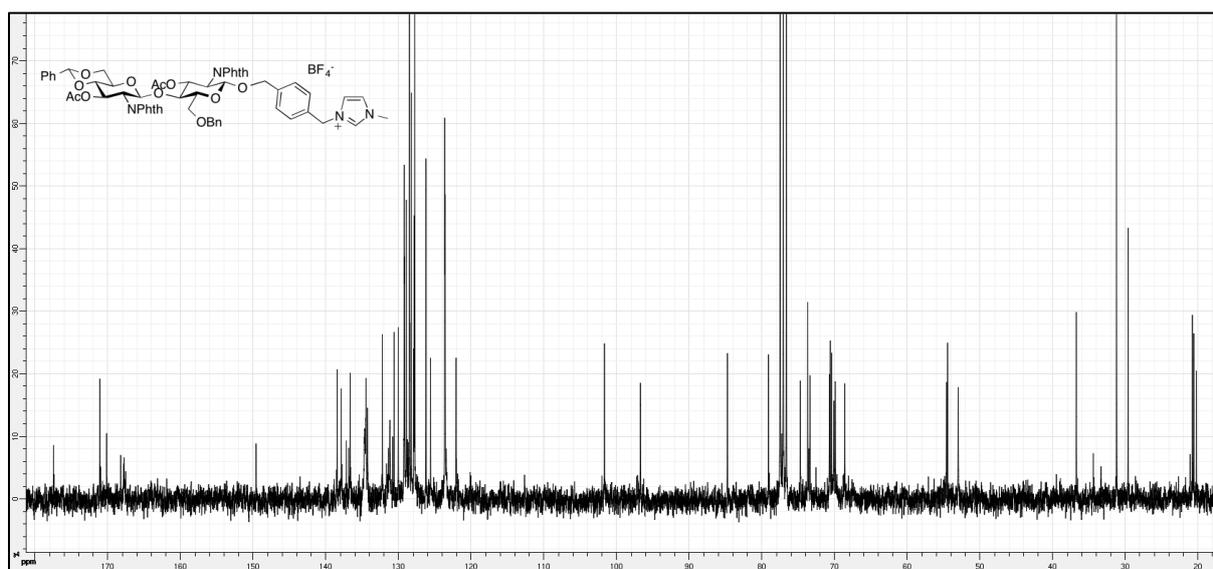
MS (ESI) : *m/z* 1047 ([M-BF₄]⁻, 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₅₈H₅₅N₄O₁₅ [M-BF₄]⁻ : 1047.3664. Found: 1047.3674.

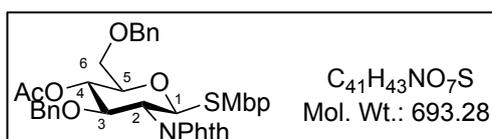
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) :



^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) :



(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 4-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside 260.



(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **254** (1.0 g, 1.54 mmol, 1.0 eq.) and anhydride acetic (870 μL , 9.22 mmol,

6.0 eq.) in pyridine (14.7 mL) were stirred at room temperature for 12 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure by coevaporation with toluene ($\times 3$). The crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 9:1 to 6:4) to give the desired product **260** (953 mg, **89 %**) as a white powder.

$[\alpha]_D^{25}$: +112.4 (*c* 1.0, CHCl₃).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.79-7.72 (m, 1H, NPhth), 7.67-7.56 (m, 3H, NPhth), 7.37 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 7.28-7.20 (m, 5H, Ar), 7.07 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 6.96-6.90 (m, 3H, Ar), 6.89-6.79 (m, 3H, Ar), 5.39 (d, $J_{1,2} = 10.0$ Hz, 1H, H-1), 5.10 (dd, $J_{3,2} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3), 4.45-4.29 (m, 4H, H-2 + H-5 + CH₂Ph), 4.49 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.25 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 3.72-3.64 (m, 1H, H-4), 3.54-3.52 (m, 2H, H-6 + H-6'), 2.04 (s, 3H, Me), 1.85 (s, 3H, Ac), 1.15 (s, 9H, *t*-Bu).

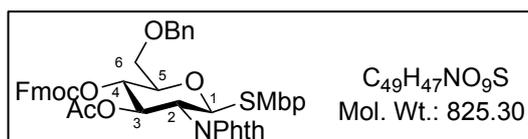
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl₃) δ : 169.6 (C, NCO), 149.5 (2C, NPhth), 137.7 (C, Ar), 137.5 (C, Ar), 136.9 (C, Ar), 134.1 (CH, NPhth), 133.8 (CH, NPhth), 131.6 (2C, Ar), 130.1 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 128.3 (2CH, Ar), 128.1 (2CH, Ar), 128.0 (2CH, Ar), 127.9 (2CH, Ar), 127.7 (CH, Ar), 127.5 (CH, Ar), 125.1 (CH, Ar), 123.7 (CH, NPhth), 123.2 (CH, NPhth), 84.6 (CH, C-1), 78.0 (CH, C-5), 77.6 (CH, C-4), 74.0 (CH₂, CH₂Ph), 73.6 (CH₂, CH₂Ph), 72.3 (CH, C-3), 69.8 (CH₂, C-6), 54.7 (CH, C-2), 34.3 (C, *t*-Bu), 31.2 (3CH₃, *t*-Bu), 20.9 (CH₃, Ac), 20.2 (CH₃, Me).

IR ν (film, cm⁻¹): 2960, 1745, 1711, 1384, 1223, 1054, 718, 697.

MS (ESI): m/z 716 (MNa⁺, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₄₁H₄₃NO₇NaS [M+Na]⁺: 716.2648. Found: 716.2676.

(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-4-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-2-phthalimido-1-thio- β -D-glucopyranoside **261.**



103 (710 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq.) and FmocCl (609 mg, 2.36 mmol, 2.0 eq.) in pyridine (6.1 mL) were stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was filtered and the volatiles were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc 9:1 to 5:5) to give the desired product **261** (802 mg, **82 %**) as a white powder.

$[\alpha]_D^{20}$: -47.3 (*c* 1.0, CHCl₃).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.92-7.87 (m, 2H, Ar), 7.80-7.74 (m, 4H, NPhth), 7.60-7.52 (m, 3H, Ar), 7.45-7.37 (m, 3H, Ar), 7.36-7.29 (m, 5H, Ar), 7.27-7.20 (m, 2H, Ar), 7.10-7.05 (m, 1H, Ar), 5.95 (dd, $J_{3,2} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, 1H, H-3), 5.72 (d, $J_{1,2} = 10.5$ Hz, 1H, H-1), 5.02 (dd, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, $J_{4,3} = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 4.59 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.53 (AB system, $J = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ph), 4.46 (t, $J_{2,1} = 10.5$ Hz, 1H, H-2), 4.40-

4.22 (m, 2H, **H-6** + **H-6'**), 4.21-4.13 (m, 1H, **CH** (OFmoc)), 3.95 (td, $J_{5,4} = 10.0$ Hz, $J_{5,6} = 4.5$ Hz, 1H, **H-5**), 3.73 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H, **OCH₂** (OFmoc)), 2.20 (s, 3H, **Me**), 1.81 (s, 3H, **Ac**), 1.27 (s, 9H, ***t*-Bu**).

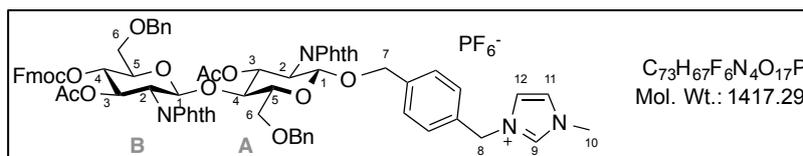
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.1 (NCO, CO), 154.1 (2C, **NPhth**), 149.5 (2C, **NPhth**), 134.4 (2CH, **NPhth**), 134.2 (2CH, **NPhth**), 130.9 (CH, **Ar**), 129.9 (CH, **Ar**), 128.3 (2CH, **Ar**), 127.9 (2CH, **Ar**), 127.7 (2CH, **Ar**), 127.6 (CH, **Ar**), 127.2 (2CH, **Ar**), 125.6 (CH, **Ar**), 125.1 (2CH, **Ar**), 123.6 (CH, **Ar**), 120.0 (2CH, **Ar**), 84.2 (CH, **C-1**), 77.0 (CH, **C-5**), 73.7 (CH, **C-4**), 73.6 (CH₂, **CH₂Ph**), 71.6 (CH, **C-3**), 70.3 (CH₂, **C-6**), 69.0 (CH₂, **OCH₂** (OFmoc)), 54.0 (CH, **C-2**), 46.5 (CH, **CH** (OFmoc)), 31.2 (3CH₃, ***t*-Bu**), 20.4 (CH₃, **Me**), 20.3 (CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹) : 2960, 1780, 1753, 1717, 1450, 1383, 1254, 1218, 1065, 1037, 718.

MS (ESI): m/z 848 (MNa⁺, 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₄₉H₄₇NO₉SNa [M+Na]⁺ : 848.2869. Found: 848.2861.

4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl O-(3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-4-O-fluorenylmethoxycarbonyl-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside hexafluorophosphate **264.**

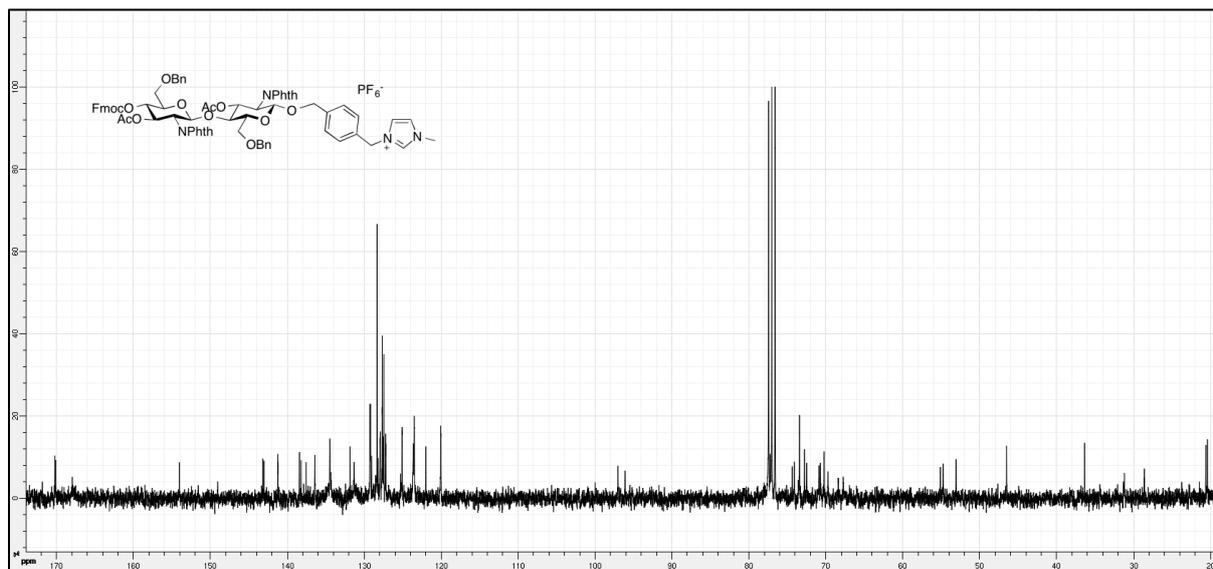


Donor **261** (128 mg, 0.156 mmol, 3.0 eq.) and acceptor **255** (40 mg, 0.052 mmol, 1.0 eq.) in dichloromethane (1.6 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (40 mg) at room temperature for 1 h. NIS (58 mg, 0.259 mmol, 5.0 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to -10 °C. After addition of TfOH (2.7 μ L, 0.031 mmol, 0.6 eq.), the reaction was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was diluted in dichloromethane (15 mL) and neutralized with saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL). Molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **264** (180 mg; **80%**) as a yellow powder.

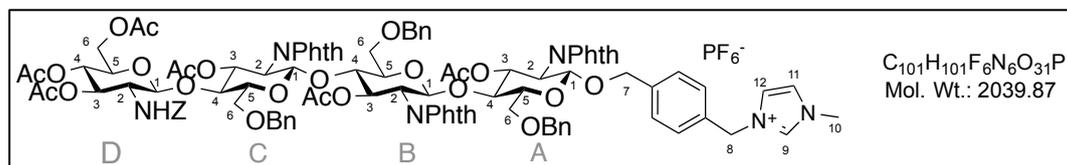
$[\alpha]_D^{20}$: +6.3 (c 1.8, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.73 (s, 1H, **H-9**), 7.85-7.70 (m, 8H, **NPhth**), 7.52 (2H, **Ar**), 7.42-7.27 (m, 14H, **Ar**), 7.18-7.01 (m, 8H, **Ar** + **H-11** + **H-12**), 5.83 (dd, $J_{B-3,B-2} = 10.5$ Hz, $J_{B-3,B-4} = 9.0$ Hz, 1H, **HB-3**), 5.59 (dd, $J_{A-3,A-4} = 11.0$ Hz, $J_{A-3,A-2} = 9.0$ Hz, 1H, **HA-3**), 5.48 (d, $J_{B-1,B-2} = 8.5$ Hz, 1H, **HB-1**), 5.16 (s, 2H, **H-8**), 5.07 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.7$ Hz, 1H, **HA-1**), 4.69 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.53-4.41 (m, 3H, **CH₂Ph**), 4.39-4.29 (m, 2H, **H-7**), 4.27-4.10 (m, 5H, **CH** (OFmoc), **HA-2** + **HA-4** + **HB-2** + **HB-4**), 3.83 (s, 3H, **H-10**), 3.63-3.55 (m,

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) :



4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl *O*-[{ 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)}-(1 \rightarrow 4)-(3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside hexafluorophosphate **265.**



Donor **99** (178 mg, 0.173 mmol, 3.0 eq.) and acceptor **266** (69 mg, 0.058 mmol, 1.0 eq.) in dichloromethane (2.0 mL) were stirred with molecular sieves 4Å (70 mg) at room temperature for 1 h. NIS (64.9 mg, 0.288 mmol, 5.0 eq.) was then added to this solution and the suspension was cooled to $-10\text{ }^\circ\text{C}$. After addition of TfOH (3.0 μL , 0.035 mmol, 0.6 eq.), the reaction was stirred for 24 h at room temperature and neutralized with saturated aqueous solution of NaHCO_3 (15 mL). Molecular sieves were filtered and the filtrate was then washed with a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (15 mL), brine (15 mL) and dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was washed with Et_2O (3×5 mL) and toluene (3×5 mL) to give a yellow powder. The powder and KPF_6 (15.9 mg, 0.087 mmol, 1.5 eq.) were stirred in CH_3CN (0.825 mL) at $85\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in dichloromethane (10 mL) and washed with H_2O (2×10 mL) and brine (2×10 mL). The organic layer was concentrated under reduced pressure and washed with Et_2O (3×5 mL) and toluene (3×5 mL) to give **265** (98 mg ; **84%**) as a yellow powder.

$[\alpha]_D^{20}$: -19.3 (*c* 0.2, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ : 8.38 (s, 1H, **H-9**), 7.97-7.80 (m, 12H, **NPhth**), 7.41-7.36 (m, 9H, **Ar**), 7.34-7.30 (m, 6H, **Ar**), 7.28-7.22 (m, 4H, **Ar** + **H-11** or **H-12**), 7.15-7.08 (m, 4H, **Ar**), 7.07-7.04 (m, 2H, **Ar** + **H-11** or **H-12**), 6.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, **Ar**), 5.57-5.46 (m, 4H, **HA-3** + **HB-3** + **HC-3** + **NH**), 5.26 (d, 1H, *J*_{B-1,B-2} = 8.5 Hz, **HB-1**), 5.21 (d, *J*_{C-1,C-2} = 8.0 Hz, 1H, **HC-1**), 5.15-5.07 (m, 4H, **HA-1** + **CH₂Ph** + **CH₂Ph**), 5.01 (AB system, *J* = 12.5 Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.84 (t, *J*_{D-3,D-2} = *J*_{D-3,D-2} = 9.5 Hz, 1H, **HD-3**), 4.68 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.59-4.54 (m, 1H, **HD-1**), 4.47 (s, 2H, **H-8**), 4.43 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 2H, **H-7**), 4.34 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1H, **H-7'**), 4.23 (dd, *J*_{B-6,B-5} = 12.0 Hz, *J*_{B-6,B-6'} = 2.2 Hz, 1H, **HB-6**), 4.02-3.96 (m, 3H, **HA-2** + **HA-4** + **HB-4**), 3.94-3.85 (m, 4H, **HB-2** + **HB-6'** + **HC-2** + **HC-4**), 3.78 (s, 3H, **H-10**), 3.67-3.61 (m, 1H, **HC-6**), 3.55-3.45 (m, 4H, **HB-5** + **HD-4** + **HD-6** + **HD-6'**), 3.44-3.41 (m, 1H, **HC-6'**), 3.40-3.35 (m, 1H, **HA-6**), 3.35-3.25 (m, 4H, **HA-6'** + **HC-5** + **HD-2** + **HD-5**), 3.20-3.15 (m, 1H, **HA-5**), 1.96 (s, 3H, **Ac**), 1.92 (s, 3H, **Ac**), 1.85 (s, 3H, **Ac**), 1.80 (s, 3H, **Ac**), 1.78 (s, 3H, **Ac**), 1.69 (s, 3H, **Ac**).

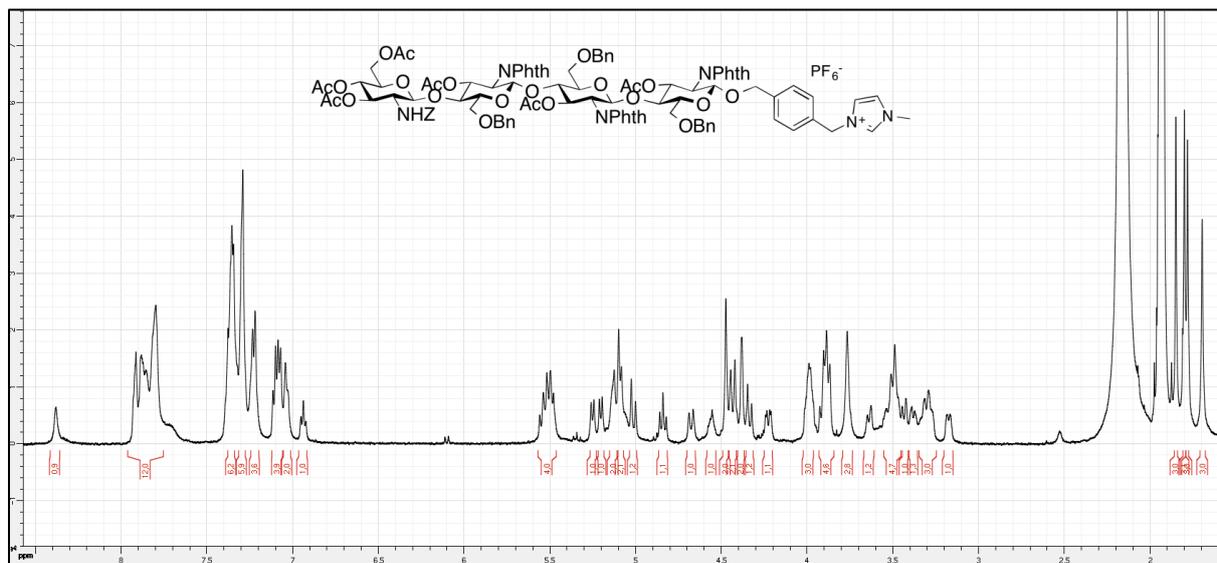
¹³C NMR (75 MHz, CD₃CN) δ : 171.0 (C, CO), 170.9 (C, CO), 170.8 (C, CO), 170.7 (C, CO), 156.9 (CH, **C-9**), 139.2 (C, **Ar**), 139.1 (C, **Ar**), 139.0 (C, **Ar**), 136.7 (CH, **Ar**), 135.4 (2CH, **NPhth**), 135.3 (2CH, **NPhth**), 132.4 (CH, **Ar**), 132.0 (3CH, **Ar**), 129.3 (2CH, **Ar**), 129.2 (5CH, **Ar**), 129.0 (2CH, **Ar**), 128.8 (2CH, **Ar**), 128.7 (CH, **Ar**), 128.5 (2CH, **Ar**), 128.3 (3CH, **Ar**), 128.1 (CH, **C-11** or **C-12**), 128.0 (3CH, **Ar**), 124.7 (CH, **Ar**), 124.5 (2CH, **NPhth**), 124.3 (CH, **Ar**), 124.1 (CH, **NPhth**), 124.0 (CH, **NPhth**), 123.9 (CH, **C-11** or **C-12**), 123.8 (CH, **NPhth**), 123.7 (CH, **NPhth**), 100.6 (CH, **CD-1**), 97.8 (CH, **CA-1**), 97.2 (2CH, **CB-1** + **CC-1**), 74.7 (CH, **CC-4**), 74.6 (2CH, **CC-5** + **CD-5**), 74.4 (CH, **CA-5**), 74.5 (CH, **CB-5**), 74.4 (2CH, **CA-4** + **CB-4**), 73.0 (CH₂, **C-8**), 72.9 (CH₂, **C-7**), 71.9 (CH, **CD-4**), 71.0 (CH₂, **CH₂Ph**), 70.8 (2CH, **CB-3** + **CC-3**), 70.7 (CH, **CA-3**), 69.1 (CH, **CD-3**), 68.5 (2CH₂, **CC-6** + **CD-6**), 68.3 (CH₂, **CA-6**), 67.0 (CH₂, **CH₂Ph**), 62.4 (CH₂, **CB-6**), 56.8 (CH, **CD-2**), 55.7 (2CH, **CB-2** + **CC-2**), 55.3 (CH, **CA-2**), 53.0 (CH₂, **CH₂Ph**), 42.7 (CH₃, **C-10**), 20.7 (2CH₃, **Ac**), 20.6 (2CH₃, **Ac**), 20.5 (2CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹): 2940, 1776, 1745, 1715, 1595, 1386, 1226, 1045, 723.

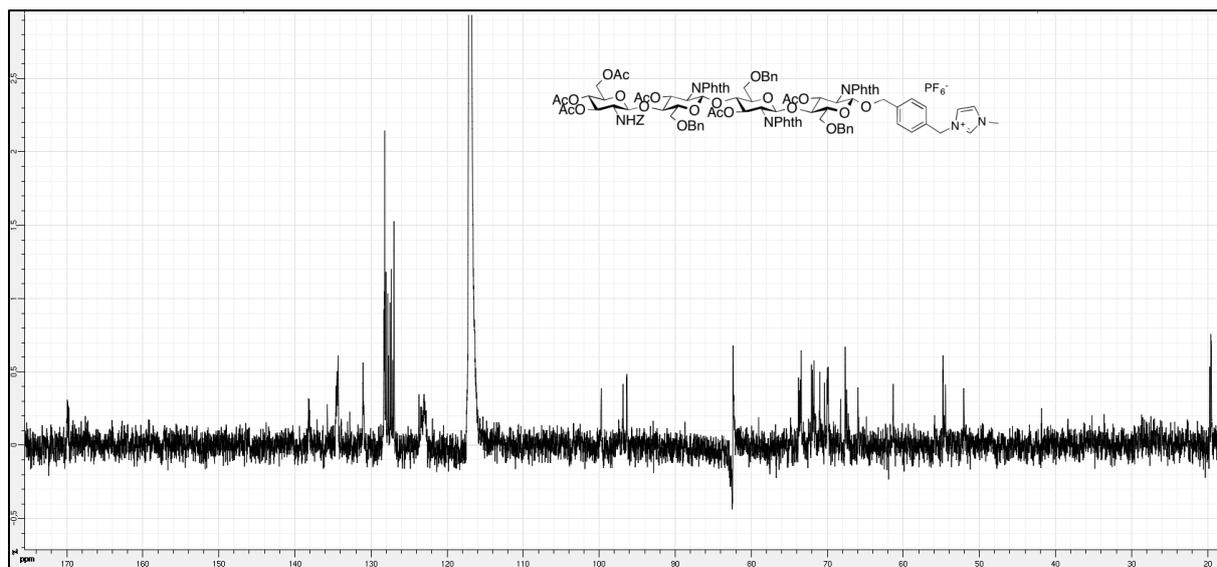
MS (ESI): *m/z* 1893 ([M-PF₆], 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₁₀₁H₁₀₁N₆O₃₁ [M-PF₆]: 1893.6511. Found: 1893.6445.

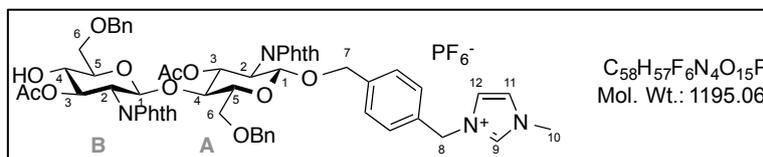
^1H NMR (500 MHz, CD_3CN) :



^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) :



4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl *O*-(3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside hexafluorophosphate **266.**



Fmoc-disaccharide **264** (135 mg, 0.095 mmol, 1.0 eq.) and Et₃N (1.26 mL, 9.53 mmol, 100 eq.) were stirred in dichloromethane (9.9 mL) at room temperature for 3 h. The mixture was washed with H₂O (2 \times 25 mL), brine (2 \times 25 mL) and dried over Na₂SO₄. The organic layer was concentrated under reduced pressure and the residue was washed with Et₂O (3 \times 5 mL) and toluene (3 \times 5 mL) to give **266** (91.1 mg ; **80%**) as a yellow powder.

$[\alpha]_D^{20}$: -6.7 (*c* 0.5, CHCl₃).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.65 (s, 1H, **H-9**), 7.80-7.57 (m, 8H, **NPhth**), 7.28-7.20 (m, 10H, **Ar**), 7.10-6.95 (m, 6H, **Ar** + **H-11** + **H-12**), 5.56-5.45 (m, 2H, **HA-3** + **HB-3**), 5.37 (d, $J_{B-1,B-2}$ = 8.5 Hz, 1H, **HB-1**), 5.09 (s, 2H, **H-8**), 5.00 (d, $J_{A-1,A-2}$ = 8.5 Hz, 1H, **HA-1**), 4.62 (AB system, J = 12.5 Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.45 (AB system, J = 12.0 Hz, 2H, **CH₂Ph**), 4.38 (AB system, J = 12.5 Hz, 1H, **CH₂Ph**), 4.31 (dd, J = 18.0 Hz, J = 12.0 Hz, 2H, **H-7**), 4.13 (dd, $J_{A-2,A-3}$ = 10.5 Hz, $J_{A-2,A-1}$ = 8.5 Hz, 1H, **HA-2**), 4.06-3.98 (m, 2H, **HA-4** + **HB-2**), 3.78 (s, 3H, **H-10**), 3.74-3.60 (m, 3H, **HB-4** + **HB-6** + **HB-6'**), 3.46-3.33 (m, 4H, **HA-5** + **HA-6** + **HA-6'** + **HB-5**), 1.81 (s, 3H, **Ac**), 1.75 (s, 3H, **Ac**).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 170.9 (C, CO), 170.0 (C, CO), 167.7 (C, CO), 138.4 (C, **Ar**), 138.1 (C, **Ar**), 137.4 (C, **Ar**), 136.4 (C, **Ar**), 136.4 (CH, **C-9**), 134.3 (2CH, **Ar**), 129.2 (CH, **Ar**), 129.0 (CH, **Ar**), 128.7 (2CH, **Ar**), 128.6 (2CH, **Ar**), 128.5 (3CH, **Ar**), 128.3 (2CH, **Ar**), 127.9 (CH, **Ar**), 127.6 (2CH, **Ar**), 127.5 (CH, **Ar**), 127.4 (2CH, **Ar**), 123.5 (CH, **C-11** or **C-12**), 122.0 (CH, **C-11** or **C-12**), 97.2 (CH, **CB-1**), 96.2 (CH, **CA-1**), 74.4 (C, **CA-4**), 74.3 (CH, **CB-5**), 73.7 (CH, **CA-5**), 73.6 (CH₂, **C-7**), 73.3 (CH, **CB-3**), 72.8 (CH₂, **CH₂Ph**), 71.2 (CH, **CA-3**), 71.0 (CH, **CB-4**), 69.8 (CH₂, **CA-6**), 67.8 (2CH, **CB-6**), 55.0 (CH, **CA-2** or **CB-2**), 54.9 (CH, **CA-2** or **CB-2**), 53.0 (CH₂, **C-8**), 45.9 (CH₂Ph), 36.3 (CH₃, **C-10**), 20.6 (CH₃, **Ac**), 20.5 (CH₃, **Ac**).

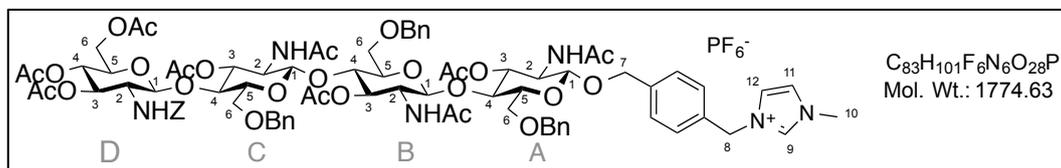
δ NCO were missing

IR ν (film, cm⁻¹) : 2869, 1776, 1746, 1713, 1385, 1226, 1045, 973, 841, 720.

MS (ESI) : *m/z* 1049 ([M-PF₆⁻] 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₅₈H₅₇N₄O₁₅ [M-PF₆⁻] : 1049.3820. Found: 1049.3862.

4-(1-Methyl-3-methylimidazolium)-benzyl O-[{3,4,6-tri-O-acetyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)}-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside hexafluorophosphate **267.**



Tetrasaccharide **265** (58 mg, 0.028 mmol, 1.0 eq.) and ethylenediamine (285 μ L, 4.26 mmol, 150 eq.) in MeCN/EtOH (0.56 mL:4.5 mL) were stirred at 60 $^{\circ}$ C for 12 h. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the crude product was engaged in the next step without purification. The residue and acetic anhydride (791 μ L, 8.38 mmol, 275 eq.) in pyridine (8.5 mL) were stirred at room temperature for 2 days. The volatiles were evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in dichloromethane (15 mL) and washed with H₂O (2 \times 15 mL) and brine (2 \times 15 mL). The organic layer was concentrated under reduced pressure and washed with Et₂O (3 \times 10 mL) and toluene (3 \times 10 mL) to give **267** (33.5 mg, **66 %**) as an amorphous white solid.

$[\alpha]_D^{20}$: -33.0 (*c* 0.45, CHCl₃).

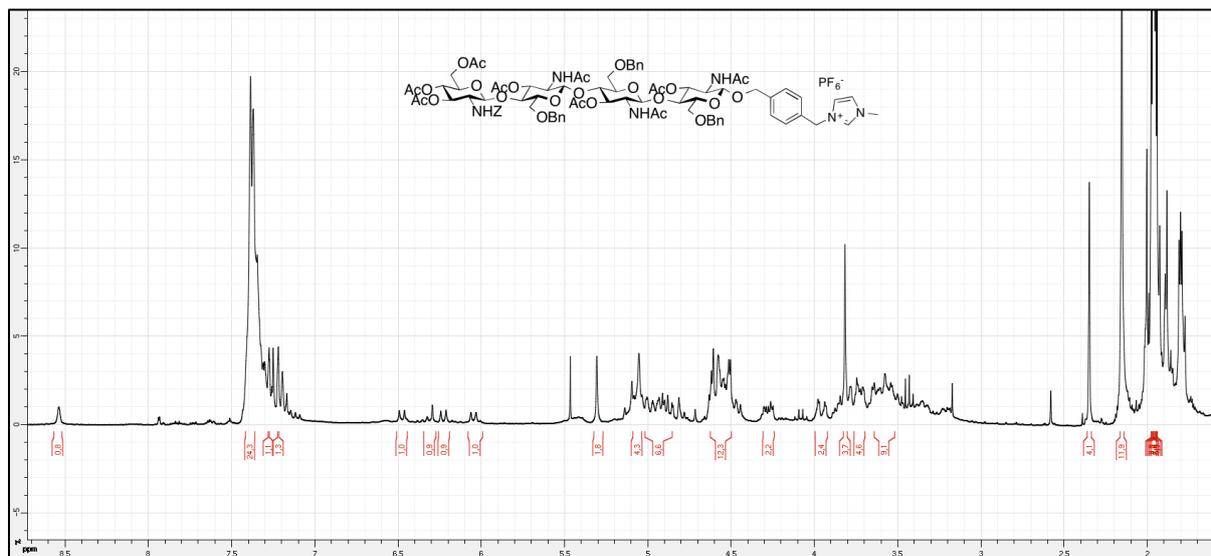
¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ : 8.54 (s, 1H, **H-9**), 7.42-7.35 (m, 24H, **Ar**), 7.28-7.27 (m, 1H, **H-11** or **H-12**), 7.22-7.21 (m, 1H, **H-11** or **H-12**), 6.47 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, **NH**), 6.35-6.27 (m, 1H, **NH**), 6.23 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, **NH**), 6.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, **NH**), 5.30 (s, 2H, **H-8**), 5.10-4.84 (m, 10H), 4.62-4.50 (m, 12H), 4.31-4.24 (m, 2H), 3.99-3.92 (m, 2H), 3.81 (s, 3H, **H-10**), 3.76-3.69 (m, 4H), 3.66-3.50 (m, 8H), 3.48-3.42 (m, 2H), 1.98-1.94 (m, 27H, **9Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹): 3338, 2956, 1743, 1659, 1534, 1370, 1227, 1028, 740, 699.

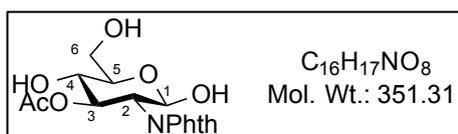
MS (ESI): *m/z* 1629 ([M-PF₆]⁻, 100%).

HRMS (ESI): Calcd for C₈₃H₁₀₁N₆O₂₈ [M-PF₆]⁻: 1629.6664. Found: 1629.6688.

^1H NMR (300 MHz, CD_3CN) :



3-*O*-Acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-D-glucopyranose **268**.



Supported ammonium formate was made from Dowex marathon MSA resin which is a quaternary ammonium resin. Resin was treated with formic acid (99 %) for 30 min, washed with water twice and methanol twice. The resin was dried at 30 °C under vacuum 4h.

To a solution of **255** (20 mg, 0.026 mmol, 1 eq.) in a isopropanol / H_2O mixture (1:5 (v / v), 4.4 mL) was added palladium on charcoal (10 %, 25 mg) and resin with ammonium formate (880 mg). The reaction mixture was placed under micro-waves irradiation at 80 °C for 50 min, filtered over celite and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) to afford compound **268** as a white solid (5.8 mg, **64** %).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +6.6 (*c* 0.37, MeOH).

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 7.92-7.87 (m, 2H, NPhth), 7.85-7.82 (m, 2H, NPhth), 5.39 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, **H-1**), 4.27 (dd, $J_{3,2} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 8.5$ Hz, 1H, **H-3**), 3.98-3.91 (m, 2H, **H-2** + **H-6**), 3.75 (dd, $J = 11.5$ Hz, $J = 5.5$ Hz, **H-6'**), 3.46-3.40 (m, 2H, **H-4** + **H-5**), 1.91 (s, 3H, Ac).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 124.5 (2CH, NPhth), 94.0 (CH, C-1), 78.4 (CH, C-5), 72.7 (CH, C-4), 72.6 (CH, C-3), 62.9 (CH_2 , C-6), 60.0 (CH, C-2), 24.2 (CH_3 , Ac).

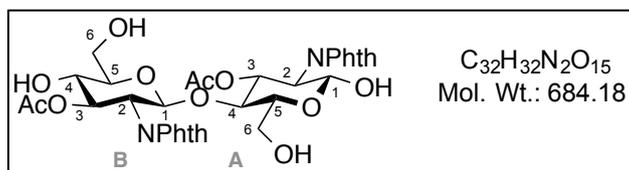
δ NCO and 2CH NPhth were missing.

IR ν (film, cm^{-1}) : 3256, 2922, 2852, 1774, 1710, 1560, 1392, 1075, 1022, 721.

MS (ESI) : m/z 374 (MNa^+ , 30%).

HRMS (ESI) : Calcd for $C_{16}H_{17}NO_8Na$ [$M+Na$] $^+$: 374.0852. Found: 374.0861.

(3-*O*-Acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-D-glucopyranose **269.**



Supported ammonium formate was made from Dowex marathon MSA resin which is a quaternary ammonium resin. Resin was treated with formic acid (99 %) for 30 min, washed with water twice and methanol twice. The resin was dried at 30 °C under vacuum 4h.

To a solution of **266** (15 mg, 0.013 mmol, 1 eq.) in a isopropanol / H_2O mixture (1:5 (v / v), 2.2 mL) was added palladium on charcoal (10 %, 12 mg) and resin with ammonium formate (440 mg). The reaction mixture was placed under micro-waves irradiation at 80 °C for 50 min, filtered over celite and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1) to afford compound **269** as a white solid (5.0 mg, **59 %**).

$[\alpha]_D^{20}$: -7.2 (c 0.8, MeOH).

1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 7.91-7.83 (m, 8H, NPhth), 5.70 (dd, $J_{A-3,A-2}$ = 10.5 Hz, $J_{A-3,A-4}$ = 8.5 Hz, **HA-3**), 5.56 (dd, $J_{B-3,B-2}$ = 10.5 Hz, $J_{B-3,B-4}$ = 8.5 Hz, **HB-3**), 5.48 (d, $J_{B-1,B-2}$ = 8.0 Hz, **HB-1**), 5.34 (d, $J_{A-1,A-2}$ = 8.5 Hz, **HA-1**), 4.06-3.98 (m, 3H, **HA-2** + **HA-4** + **HB-2**), 3.90 (dd, $J_{A-6,A-6'}$ = 12.0 Hz, $J_{A-6,A-5}$ = 2.5 Hz, 1H, **HA-6**), 3.79 (dd, $J_{A-6',A-6}$ = 12.0 Hz, $J_{A-6',A-5}$ = 4.5 Hz, 1H, **HA-6'**), 3.68 (dd, $J_{B-4,B-5}$ = 10.0 Hz, $J_{B-4,B-3}$ = 8.5 Hz, 1H, **HB-4**), 3.62 (dd, $J_{B-6,B-6'}$ = 12.0 Hz, $J_{B-6,B-5}$ = 2.5 Hz, 1H, **HB-6**), 3.54-3.47 (m, 2H, **HA-5** + **HB-6'**), 3.43 (dd, $J_{B-5,B-4}$ = 10.0 Hz, $J_{B-5,B-6'}$ = 4.5 Hz, 1H, **HB-5**), 1.93 (s, 3H, Ac), 1.86 (s, 3H, Ac).

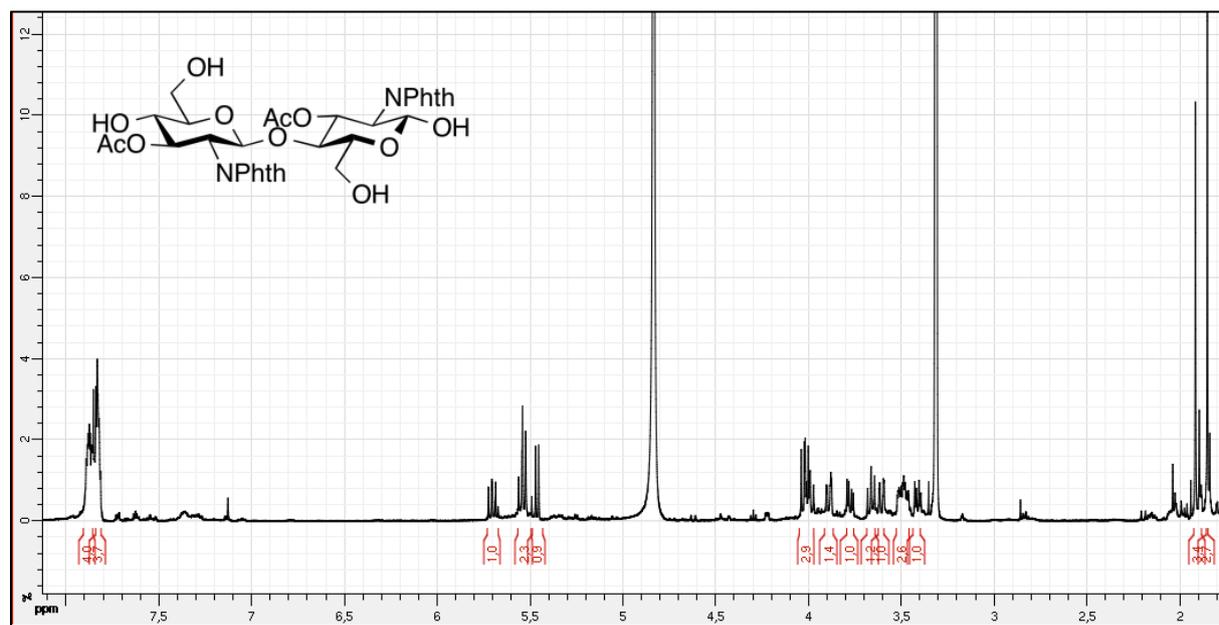
^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 172.1 (2C, NCO), 135.4 (4CH, NPhth), 124.4 (4CH, NPhth), 98.8 (CH, **CA-1**), 93.4 (CH, **CB-1**), 78.3 (CH, **CB-5**), 76.8 (CH, **CA-5**), 76.1 (CH, **CB-4**), 73.0 (CH, **CA-4**), 72.4 (CH, **CA-3** or **CB-3**), 72.3 (CH, **CA-3** or **CB-3**), 62.5 (CH_2 , **CA-6**), 61.7 (CH_2 , **CB-6**), 58.9 (CH, **CA-2**), 58.0 (CH, **CB-2**), 21.0 (2 CH_3 , Ac).

IR ν (film, cm^{-1}) : 3371, 2921, 1774, 1707, 1643, 1579, 1387, 1232, 1071, 1025, 874, 722.

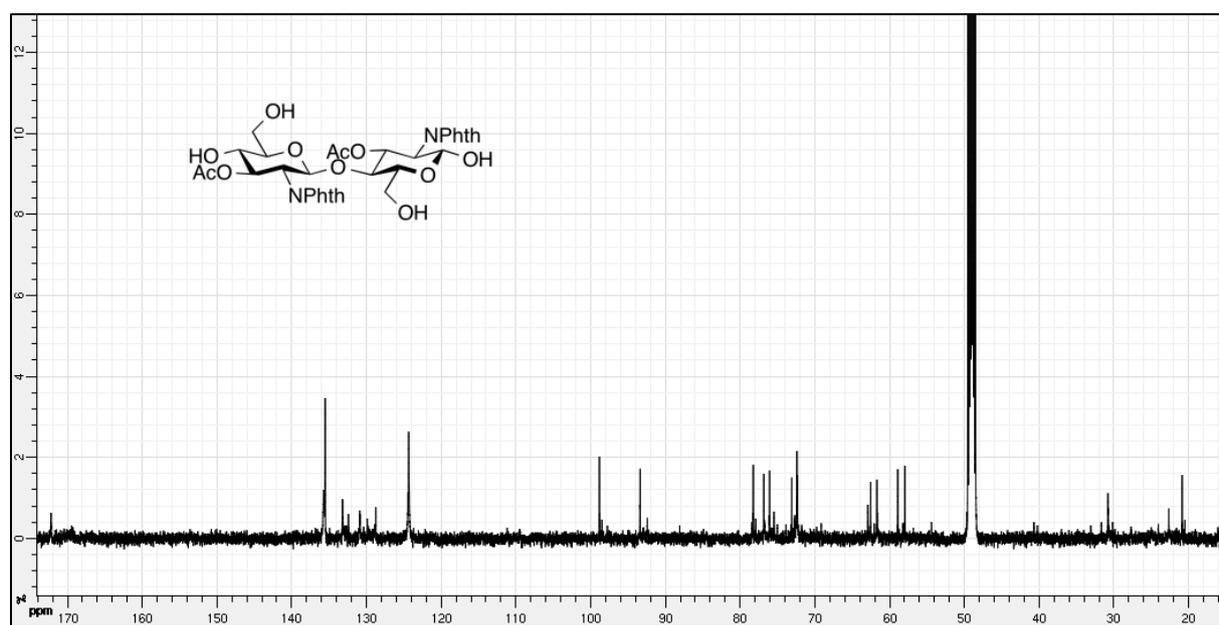
MS (ESI) : m/z 707 (MNa^+ , 30%).

HRMS (ESI) : Calcd for $C_{32}H_{32}N_2O_{15}Na$ [$M+Na$] $^+$: 707.1700. Found: 707.1717.

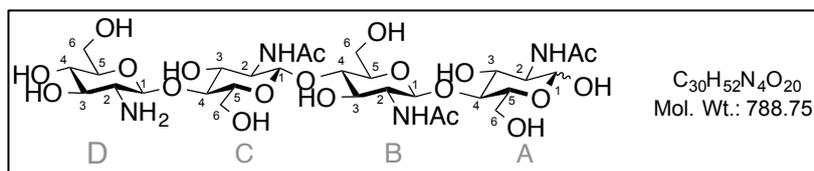
^1H NMR (500 MHz, D_2O) :



^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) :



(2-Amino-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose **270**.



Supported ammonium formate was made from Dowex marathon MSA resin which is a quaternary ammonium resin. Resin was treated with formic acid (99 %) for 30 min, washed with water twice and methanol twice. The resin was dried at 30 °C under vacuum 4h. To a solution of **267** (60 mg, 0.034 mmol, 1 eq.) in a isopropanol / H₂O mixture (1:5 (v / v), 5.9 mL) was added palladium on charcoal (10 %, 50 mg) and resin with ammonium formate (1.2 g). The reaction mixture was placed under micro-waves irradiation at 80 °C for 12 h, filtered over celite and concentrated under reduced pressure. The crude product was treated by MeONa (1M, 58 μ L) in MeOH (800 μ L) during 2 days at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and then purified by chromatography on silica gel (MeCN/H₂O/NH_{3aq} 7:3:0.1) to afford compound **270** as a white solid (5 mg, **20 %**).

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ : 5.20 (d, $J_{A-1,A-2} = 2.0$ Hz, 0.3H, **HA-1 α**), 4.69 (d, $J_{A-1,A-2} = 8.5$ Hz, 0.4H, **HA-1 β**), 4.66-4.61 (m, 2H, **HB-1 β** + **HC-1 β**), 4.52 (d, $J_{D-1,D-2} = 8.5$ Hz, 1H, **HD-1 β**), 3.97-3.41 (m, 23H), 2.72 (t, $J=9.0$ Hz, 1H, **HC-2**), 2.11 (s, 6H, **Ac**), 2.09 (s, 3H, **Ac**).

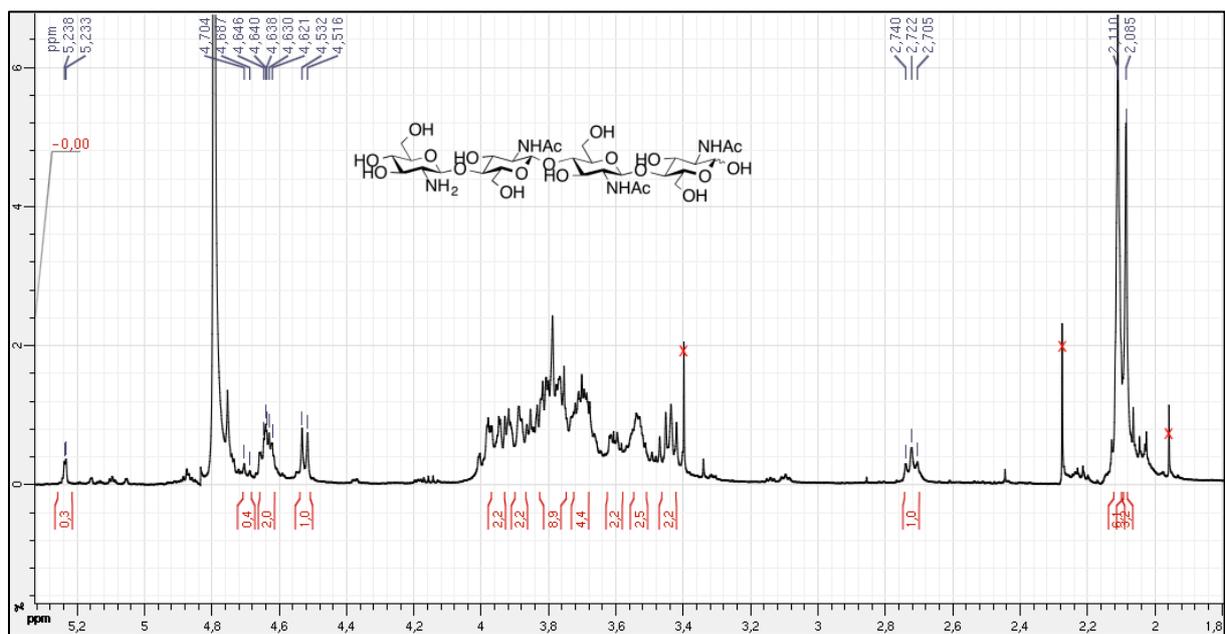
¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ : 174.6 (CO), 102.8 (CH, **CD-1**), 101.5 (CH, **CB-1** or **CC-1**), 101.3 (CH, **CB-1** or **CC-1**), 94.8 (CH, **CA-1 β**), 90.5 (CH, **CA-1 α**), 79.2, 79.0, 78.0, 76.2, 75.6, 74.7, 73.4, 72.1, 69.6, 69.3, 60.7, 59.9, 56.7, 55.3, 55.0, 53.7 (CH, **CD-2**), 22.3 (CH₃, **Ac**), 22.1 (CH₃, **Ac**), 21.9 (CH₃, **Ac**).

IR ν (film, cm⁻¹) : 3276, 2925, 1635, 1563, 1377, 1313, 1155, 1066, 1025, 946.

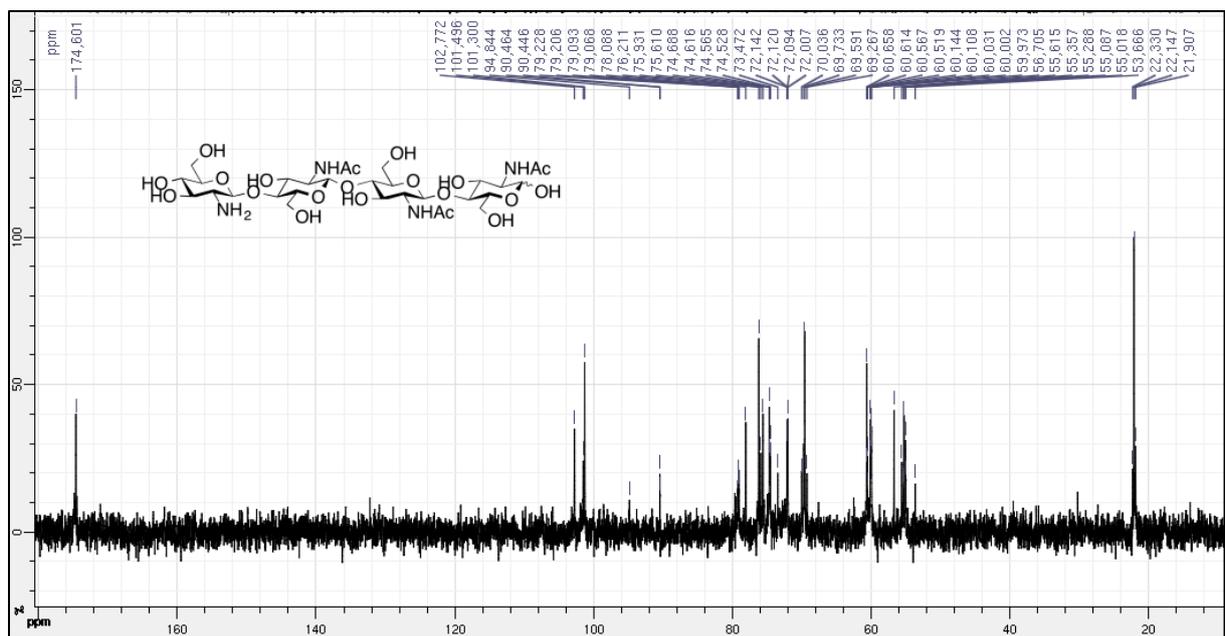
MS (ESI) : m/z 789 (MH⁺, 100%).

HRMS (ESI) : Calcd for C₃₀H₅₃N₄O₂₀ [M+H]⁺ : 789.3253. Found: 789.3220.

^1H NMR (500 MHz, D_2O) :



^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) :



Bibliographie

Bibliographie