



**HAL**  
open science

# Synthèse d'analogues de Lipo-chitooligosaccharides

Nathan Berthelot

► **To cite this version:**

Nathan Berthelot. Synthèse d'analogues de Lipo-chitooligosaccharides. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS184 . tel-01475855

**HAL Id: tel-01475855**

**<https://theses.hal.science/tel-01475855>**

Submitted on 24 Feb 2017

**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.

NNT : 2016SACLS184

THESE DE DOCTORAT  
de  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
préparée à  
L'INSTITUT DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES

ECOLE DOCTORALE N°571  
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystème  
Spécialité chimie

Par

**M. Nathan Berthelot**

**SYNTHESE D'ANALOGUES DE LIPO-CHITOOLOGOSACCHARIDES**

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 12 Juillet 2016 :**

**Composition du Jury :**

Professeur David Virieux	ENSCM	Président
Docteur Sébastien Fort	CNRS – CERMAV	Rapporteur
Docteur Sébastien Gouin	CNRS – CEISAM	Rapporteur
Professeur Jean-Marie Beau	Université Paris Sud	Examineur
Docteur Boris Vauzeilles	CNRS – ICMMO et ICSN	Directeur de thèse
Docteur François-Didier Boyer	INRA – IJPB et CNRS - ICSN	Co-directeur de thèse



*« La vie est une série d'opportunités uniques.  
C'est notre boulot de trouver notre bonheur en chacune. »*

Rick Remender dans *Deadly Class*



## *Remerciements*

J'aimerais commencer par vous remercier, professeur David Virieux, pour avoir présidé le jury le jour de ma soutenance... mais pas seulement. Vous avez toujours été présent et de bon conseil au cours de mon cycle ingénieur. De par votre investissement, je pense que l'ENSCM et ses étudiants ont de la chance de vous compter parmi ses enseignants. Je suis très heureux que vous ayez accepté d'être une nouvelle fois juge de mon travail et vous remercie pour tout.

Je suis très reconnaissant envers Messieurs Sébastien Fort et Sébastien Gouin pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit. J'aurais aimé avoir plus de temps pour discuter avec vous à la suite de la soutenance, ce n'est pas tous les jours que l'institut accueille et rassemble tant de chercheurs spécialistes de la chimie des "sucres". En tout cas, je vous souhaite le meilleur pour l'avenir dans vos projets respectifs et vous remercie à nouveau.

J'aimerais également vous remercier, professeur Jean-Marie Beau. Comme vous le faisiez remarquer, à juste titre, votre équipe et vous-même êtes particulièrement à l'honneur tout le long de ce manuscrit mais je ne peux m'empêcher d'en rajouter une petite couche. J'aimerais vous remercier pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour l'apport scientifique que vous avez bien sur amené au projet.

Merci à vous, Boris et François-Didier. Merci pour m'avoir offert cette opportunité, de m'avoir fait confiance il y a 3 ans, de m'avoir confié ce projet intéressant. Merci également pour avoir autorisé cette soutenance anticipée. Vis-à-vis de ma réorientation professionnelle, c'était important. Encore merci et bon courage pour le futur.

J'aimerais remercier le Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, à l'INRA de Toulouse, et plus particulièrement Jean-Jacques Bono, Virginie Gascioli et Ariane Girardin, pour m'avoir accueilli aussi chaleureusement. Cette rencontre a bien sûr permis d'effectuer les tests de reconnaissance de mes composés mais cela a également été un véritable bol d'air pour moi, qui n'est vu qu'un environnement de chimie pendant 3 ans (voire même 6 ans). J'y ai trouvé un moyen d'en apprendre plus sur mon projet tout en m'éloignant de mes manipulations habituelles. Donc merci pour votre accueil, votre gentillesse et pour m'avoir montré tant de choses intéressantes.

Merci à toi Aurélie pour ton encadrement et ta disponibilité sur ces trois années mais également pour ta gestion du laboratoire, cela peut paraître bizarre comme remerciement mais travailler dans des conditions comme celles-ci, c'est un luxe que tout le monde n'a pas. Merci à toi également Laura, pour ta gentillesse et pour avoir supporté celui qui s'est trouvé être ton collègue

doctorant et voisin de hotte. Je me souviens encore du premier jour où nous sommes arrivés à l'institut tous les deux, aujourd'hui je termine un peu avant toi mais je te souhaite bon courage pour la dernière ligne droite et, à toutes les deux, le meilleur pour le futur.

J'aimerais ensuite te remercier Dom. Dans un premier temps pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire afin que je me forme à certaines manipulations mais également pour ta gentillesse et ta disponibilité. Je pense que j'ai dû t'embêter un bon paquet de fois pour des conseils, des résultats incohérents, des produits, ou encore ces fameux tubes "salvateurs"... mais tu m'as toujours apporté ton aide. Du coup, je te considère un peu comme la maman de l'ICMMO... je crois que je me souviendrai toujours de la fois où je me suis presque fait "gronder" pour une faute de goût vestimentaire... des chaussettes blanches. Aujourd'hui, grâce à toi, toutes mes paires de chaussettes sont noires. Bref, c'est un trait d'humour (quoique vrai), mais merci pour tout.

Antoine et Jordi... Pas simple de vous avoir laissé partir les gars. Jordi, il s'en est passé des choses pendant ces deux années. Qu'est ce que l'on a pu discuter, chanter, danser... surtout quand tu faisais une colonne... tout le temps donc ! J'ai vraiment eu la sensation de partager une tranche de ta vie... tu es devenu papa, un sacré papa ! Cela va faire quelques mois maintenant que nous ne nous sommes pas vu et j'espère que nous aurons à nouveau de nombreuses occasions de rigoler. Antoinou, je me souviens de cette fameuse semaine à l'ICMMO, je crois que je n'ai jamais appris à connaître et apprécier une personne aussi rapidement que toi. Après quelques jours dans le même labo on discutait déjà comme si on se connaissait depuis des années (qu'est ce que l'on faisait bien les bruits d'animaux). Et tu as fini par revenir à l'institut, avec Jordi et moi... qu'est ce que l'on a pu rire, chanter, discuter (de choses que l'on taira), se casser la tête sur des énigmes, des contrepèteries... Merci à tous les deux pour votre grand cœur et cette touche de folie contagieuse.

Merci à toi également Sébastien ! J'ai vraiment beaucoup apprécié nos longues discussions entre passionnés, sur le cinéma, les séries, les comics. C'est revigorant de pouvoir discuter et partager sur ce que l'on aime. Et ta mémoire m'a toujours bluffée, je rêve tellement d'avoir la même. Bref, même si toi aussi tu as fini par me laisser, je sais que nos discussions continueront (par d'autres moyens) et je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

Il n'est pas simple de remercier chaque personne séparément, vous êtes pourtant tellement nombreux à avoir fait de ma thèse une belle aventure humaine.

J'aimerais remercier P-A et Filipe pour avoir été des voisins de laboratoire particulièrement délirants, je ne suis pas prêt de vous oublier vous deux ! J'espère vous revoir bientôt.

Laurent, euuuuuuuuh... MERCI ! Je me souviens bien sûr tout particulièrement de ce super weekend au ski. Les descentes à l'aise, le hors-piste moins à l'aise, le bar en fin de soirée... un peu

trop à l'aise ! J'ai une petite pensée pour Valentin bien sûr, vous avez un sacré pouvoir comique tous les deux. Il y aurait tant d'autres choses à dire Lolo, merci pour tout !

Margaux et Lucie, merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et pour toutes nos soirées (sponsorisées par Beyoncé et les jeux de société Asmodée). Il me tarde de passer ce petit weekend canoë avec vous... je m'attends à tout ! Vous êtes vraiment de belles personnes et je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.

Marc (ou devrais-je dire Babette, ou peut-être Ginette...), merci pour ton franc parler, tes nombreux sujets de discussion et tes coups de gueule. Une fois parvenu à dompter un peu tout ça, il en est ressorti de belles tranches de rire... Merci Micheline, ne change pas !

Je remercie bien évidemment l'ensemble de l'institut et toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer, qui ont pu m'aider, professionnellement ou moralement, tout au long de cette thèse. J'ai une pensée particulière pour Nadine et Catherine qui m'ont accompagné lors des enseignements que j'ai eu la chance d'effectuer, en parallèle de mes travaux. Je pense que c'est en partie grâce à vous si j'ai choisi de m'éloigner de la recherche pour devenir enseignant, merci pour tout.

Je vais terminer par les personnes qui me sont chères, qui ont beaucoup compté pendant ces dernières années, mais qui sont peut-être un peu plus éloignées de la vie du laboratoire.

J'aimerais remercier du fond du cœur Patrice, Mélodie, Jérémy et Ludivine. Vous êtes tellement géniaux ! Je passe des super moments avec vous et, même si je risque d'être pas mal occupé l'année prochaine, j'espère sincèrement que nos petites soirées vont continuer.

J'aimerais remercier également ma belle famille. C'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous, avec les enfants, merci !

Je remercie bien évidemment ma famille. Que dire si ce n'est que vous êtes tout pour moi et que je ne vous vois que trop peu... Et même si je ne le dis pas aussi souvent que je le devrais, je vous aime ! Merci infiniment pour tout !

Et je terminerais ces remerciements par toi, Roxane. Nous avons passé de merveilleux moments ensemble et ce n'est pas prêt de s'arrêter ! J'espère que nous arriverons rapidement à construire l'avenir que nous nous imaginons tous les deux. Merci du fond du cœur pour être à mes côtés chaque jour. Je t'aime !





# Table des matières

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION DU PROJET</b>	<b>15</b>
<b>I. LES SYMBIOSES PLANTES/MICROORGANISMES</b>	<b>17</b>
A. LA NODULATION OU SYMBIOSE RHIZOBIACEES-LEGUMINEUSES	18
1) Présentation	18
2) Dialogue moléculaire et processus symbiotique	18
B. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE	21
1) Présentation	21
2) Autres effets bénéfiques de la mycorhization	23
3) Les mycorhizes	24
4) Dialogue moléculaire et processus biologique de la symbiose endomycorhizienne à arbuscule.	26
C. CONCLUSION SUR LES SYMBIOSES ET LEURS INTERETS	29
<b>II. SYNTHESSES DE LIPO-CHITOLIGOSACCHARIDES ET ANALOGUES</b>	<b>31</b>
A. STRUCTURE DES FACTEURS DE NODULATION ET DE MYCORHIZATION	31
B. SYNTHESSES DE FACTEURS SYMBIOTIQUES	32
1) Premiers facteurs Nod synthétiques	32
2) Evolutions des techniques et recherche de procédés efficaces	46
C. SYNTHESSES D'ANALOGUES DE LIPO-CHITOLIGOSACCHARIDES	56
1) Synthèse d'un analogue de facteur Nod complexe	56
2) Lipo-chitooligosaccharides fluorescents	58
3) Modifications structurales de la chaîne carbonée	60
4) Déplacement de la chaîne carbonée	62
5) Modification de la structure oligosaccharidique et conclusion	63
<b>III. ETUDES DE MODELISATION ET PROJET DE THESE</b>	<b>66</b>
A. IDENTIFICATION D'UNE PROTEINE DE LIAISON DE LIPO-CHITOLIGOSACCHARIDES CHEZ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i>	66
B. MODELISATION DES INTERACTIONS D'UN FACTEUR NOD AVEC LYR3	68
C. LE MOTIF TRIAZOLE	69
1) Structures multivalentes	70
2) Marquage métabolique	71
3) Mime de glycosides	74
D. ANALOGUES ENVISAGES POUR LE PROJET DE THESE	77

<b>SYNTHESE DE DEUX BRIQUES SACCHARIDIQUES</b>	<b>79</b>
<b>I. STRATEGIE DE SYNTHÈSE DES ANALOGUES DE LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDES</b>	<b>81</b>
<b>II. SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ MONOSACCHARIDIQUE PROPARGYLIQUE</b>	<b>83</b>
A. OBTENTION DE LA GLUCOSAMINE PER-ACÉTYLÉE	83
B. CHANGEMENT DU GROUPEMENT PROTÉCTEUR EN POSITION ANOMÈRE	86
C. PROTECTION DES HYDROXYLES 3 ET 6	91
D. UTILISATION D'UNE AUTRE PROTECTION ACÉTAL POUR LES HYDROXYLES 4 ET 6	96
E. PROTECTION DE L'HYDROXYLE EN POSITION 3 ET DEPROTECTION DE L'ISOPROPYLIDÈNE	99
F. PROTECTION SÉLECTIVE DE L'HYDROXYLE EN POSITION 6	101
G. PROPARGYLATION DE L'HYDROXYLE EN POSITION 4	103
H. SCHEMA REACTIONNEL GLOBAL DE LA BRIQUE MONOSACCHARIDIQUE	106
<b>III. SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ DISACCHARIDIQUE AZOTURÉ</b>	<b>107</b>
A. ACÉTOLYSE DE LA CHITINE	107
B. DIFFÉRENCIATION DES FONCTIONS AMINES	108
C. FORMATION DE L'OXAZOLINE SUR L'UNITÉ REDUCTRICE	111
D. CHANGEMENT DE GROUPEMENT PROTÉCTEUR DE L'AMINE SUR L'UNITÉ NON REDUCTRICE	113
E. INTRODUCTION DE L'AZOTURE EN POSITION ANOMÈRE	115
F. SCHEMA REACTIONNEL GLOBAL DE LA BRIQUE DISACCHARIDIQUE	118
<b>ANALOGUES DE LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDES ET RECONNAISSANCE BIOLOGIQUE</b>	<b>119</b>
<b>I. CYCLOADDITION [3+2] CATALYSÉE AU CUIVRE</b>	<b>121</b>
A. PREMIERS ESSAIS SUR UN DÉRIVÉ AZOTURÉ COMMERCIAL	121
B. SYNTHÈSE DES PREMIERS ANALOGUES DE TÉTRASACCHARIDES PROTÉGÉS	122
<b>II. FONCTIONNALISATION ET DEPROTECTIONS DES ANALOGUES</b>	<b>125</b>
A. INTRODUCTION DE LA FONCTION SULFATE	125
1) Mise au point des conditions sur l'analogue de trisaccharide	125
2) Transposition des conditions à un analogue de tétrasaccharides	128
B. DEPROTECTIONS : OBTENTION D'ANALOGUES DE CHITOOLIGOSACCHARIDES	136
1) Cas de l'analogue de trisaccharide	136
2) Cas des analogues de tétrasaccharides	141
<b>III. SYNTHÈSES D'ANALOGUES DE LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDES</b>	<b>147</b>
A. RÉACTION D'ACYLATION : UTILISATION D'ESTERS ACTIVES	147
B. COUPLAGE DE LA CHAÎNE CARBONÉE	150
<b>IV. TEST DE RECONNAISSANCE BIOLOGIQUE : COMPÉTITION AVEC UN LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDE RADIOMARQUÉ</b>	<b>152</b>

<b>RECHERCHE DE NOUVEAUX ANALOGUES</b>	<b>157</b>
<b>I. ESSAIS DE MODIFICATIONS DU LIEN TRIAZOLE</b>	<b>159</b>
A. MODIFICATION DE LA STRUCTURE	159
B. STRATEGIE CYANO	161
C. STRATEGIE NITRO	164
<b>II. CONCLUSION</b>	<b>170</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>171</b>
<b>EXPERIMENTAL SECTION</b>	<b>179</b>
<b>I. CHEMICAL SECTION</b>	<b>183</b>
A. PROPARGYL MONOSACCHARIDE BUILDING BLOCK	183
B. AZIDO DISACCHARIDE BUILDING BLOCK	191
C. CLICK CHEMISTRY AND CHITOOLOGOSACCHARIDE ANALOGS	197
D. LIPO-CHITOOLOGOSACCHARIDE ANALOGS	218
E. NEW BUILDING BLOCKS	232
<b>II. BIOLOGICAL SECTION</b>	<b>235</b>
<b>LISTE DE STRUCTURES</b>	<b>237</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE ET RESUME</b>	<b>243</b>

# ABREVIATIONS

AA :	acide aminé
Ac :	acétyle
ACS :	acide camphorsulfonique
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADP :	adénosine diphosphate
All :	allyle
AM :	arbuscular mycorrhiza
APS :	adénosine-5'-phosphosulfate
APTS :	acide <i>para</i> -toluènesulfonique
arom. :	aromatique
Asc :	ascorbate
atm :	atmosphère
ATP :	adénosine triphosphate
bmim :	1-butyl-3-méthylimidazolium
Bn :	benzyle
Boc :	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BODIPY :	bore-dipyrométhène
BTCHP :	<i>N,N,N',N'</i> -bis(tetraméthylène)-chloroformamidium hexafluorophosphate
Bz :	benzoyle
c :	concentration de mesure du pouvoir rotatoire
CAN :	nitrate de cérium et d'ammonium
cat. :	catalytique
Cbz :	carboxybenzyle
CCaMK :	<i>calcium/calmoduline-dependent protein kinase</i>
CCM :	chromatographie sur couche mince
CD :	chitine désacétylase
CERK1 :	<i>chitin elicitor receptor kinase 1</i>
AtCERK1 :	CERK1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
CIac :	chloroacétyle
CO(s) :	chitooligosaccharide(s)
Con A-HRP :	<i>Concanavaline A</i> lectin, labeled with <i>horse radish peroxidase</i>
COSY :	spectroscopie RMN de corrélation
Cp :	cyclopentadiène
CuAAC :	cycloaddition [3+2] azoture-alcyne catalysée au cuivre
δ :	déplacement chimique
DBU :	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC :	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DMAP :	4-diméthylaminopyridine
DME :	1,2-diméthoxyéthane
DMF :	diméthylformamide
DMSO :	diméthylsulfoxyde

DP <sub>m</sub> :	degré de polymérisation moyen
EDC :	<i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbonate
éq. (eq.) :	équivalent (equivalent)
ESI :	ionisation électrospray
Et :	éthyle
Fmoc :	fluorénylméthoxycarbone
Fuc :	fucose (ou fucosyle)
Gal :	galactose (ou galactosyle)
Glc :	glucose (ou glucosyle)
GlcN :	glucosamine
GlcNAc :	<i>N</i> -acétylglucosamine
GM3 :	monosialodihexosylganglioside 3
GP :	groupement protecteur
HAPyU :	3-oxo-1-(di-1-pyrrolidinylméthylène)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium hexafluorophosphate
HBTU :	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HMBC :	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOAt :	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
2-HP :	2-hydroxypyridine
HRMS :	spectroscopie de masse à haute résolution
HSQC :	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC <sub>50</sub> :	concentration inhibitrice médiane
IR-FT :	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<i>J</i> :	Constante de couplage
Kdo :	3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic Acid
LB :	lysogeny broth
LCO(s) :	lipo-chitooligosaccharide(s)
LHK :	<i>lotus histidine kinase</i>
litt. :	littérature
LPS :	lipopolysaccharide
LysM-RLK (LYK/LYR) :	<i>lysin motif receptor-like kinase</i>
M (ou N) :	mol/L ou poids moléculaire
Mbp :	2-méthyl-5- <i>tert</i> -butylbenzène
Me :	méthyle
min :	minutes
MP :	4-méthoxyphényle
m.p. :	point de fusion (melting point)
Ms :	méthanesulfonyl
MSA :	macroporous strong base anion
MST :	thermophorèse à micro-échelle
MTBE :	méthyl <i>tert</i> -butyl éther
Myc :	de mycorhization
<i>v</i> :	nombre d'ondes
NANA :	acide <i>N</i> -acétylneuraminique
NFBS :	<i>Nod factor binding site</i>

MtNFBS2 :	<i>Nod factor binding site 2 de Medicago truncatula</i>
NFP :	<i>Nod factor perception protein</i>
NFR :	<i>Nod factor receptor</i>
NGR234 :	Espèce de <i>Rhizobium</i>
NHS :	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIS :	<i>N</i> -iodosuccinimide
Nod :	de nodulation
NodMI :	facteur Nod de <i>Mesorhizobium loti</i>
NodRt :	facteur Nod de <i>Rhizobium tropici</i>
NodSf :	facteur Nod de <i>Sinorhizobium fredii</i>
NodSm :	facteur Nod de <i>Sinorhizobium meliloti</i>
NSP :	<i>nuclear shuttle protein</i>
PAPS :	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
Ph :	phényle
Phth :	phthaloyle
Piv :	pivaloyle
PMB :	<i>para</i> -méthoxybenzyle
PPA :	appareil de pré-pénétration
ppm :	partie par million
Rdt :	rendement
Rf :	rapport frontal (retention factor)
RMN :	résonance magnétique nucléaire
S <sub>N</sub> :	substitution nucleophile
succi :	succinimide
t.a. :	température ambiante
TBAF :	fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS :	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBDPS :	<i>tert</i> -butyldiphénylsilyle
<sup>t</sup> Bu :	<i>tert</i> -butyle
TCP :	tétrachlorophthaloyle
TES :	triéthylsilyle
Tf :	trifluorométhanesulfonique
TFA :	acide trifluoroacétique
TFAA :	anhydride trifluoroacétique
THF :	tétrahydrofurane
TMS :	triméthylsilyle
ToF :	temps de vol
triaz :	triazole
Tris :	trishydroxyméthylaminométhane
UDP :	uridine diphosphate
UPLC :	Chromatographie liquide ultra performante
UV :	ultra-violet
wt :	weight
YFP :	yellow fluorescent protein

# INTRODUCTION DU PROJET





## I. LES SYMBIOSES PLANTES/MICROORGANISMES

---

Les plantes, comme tous les organismes vivants, ont besoin de se nourrir pour vivre et croître. Mais, à l'inverse de l'animal, la plante est un organisme immobile et a donc dû "apprendre" à évoluer avec son environnement proche. Au niveau des feuilles, la photosynthèse permet aux végétaux de transformer le dioxyde de carbone de l'air en glucides et dioxygène. Ainsi la présence d'air permet à la plante d'accéder à une quantité illimitée de carbone. Au niveau racinaire, la récupération des ressources est essentielle mais beaucoup plus limitée. En effet, la plante capte l'azote, le phosphate, les sels minéraux et l'eau présents dans son environnement proche racinaire, jusqu'à épuisement de ces ressources qui ne peuvent se renouveler aussi rapidement que dans l'air. De nombreuses plantes ont donc su s'adapter et évoluer afin de récupérer le matériel nécessaire à leur croissance.

Le sol terrestre est le foyer naturel d'un grand nombre de microorganismes, tel que les bactéries ou les champignons, qui ont besoin de composés organiques pour se nourrir et se développer. Des associations étroites, ou "symbioses", entre les racines de la plante et ces microorganismes se sont donc mises en place, permettant des échanges mutuellement bénéfiques entre les deux partenaires. Les bactéries et les champignons fournissent à la plante-hôte les ressources dont elle a besoin et sécrètent des substances inhibant le développement d'autres microorganismes, pathogènes pour le végétal. En retour, la plante fournit aux micro-symbiotes des sucres produits lors de la photosynthèse.

Les deux principales symbioses sont la nodulation et la mycorhization. La nodulation permet aux plantes légumineuses (moins de 10% des plantes à fleurs) de s'approvisionner en composés azotés, fournis par des bactéries capables de réduire l'azote atmosphérique. La mycorhization est plus générale car au moins 90% des plantes terrestres seraient en symbiose avec des champignons<sup>1</sup> leur apportant une partie de l'eau et des minéraux dont le végétal a besoin.<sup>2</sup>

Ces phénomènes phytobiologiques particuliers, preuves d'une adaptabilité environnementale des plantes, ont suscité un très grand intérêt dans la communauté scientifique. La compréhension de ces associations symbiotiques est un enjeu écologique et agronomique majeur. La maîtrise de ces symbioses permettrait d'éviter l'utilisation d'engrais azotés et phosphatés, sources de pollution, en favorisant ces associations naturelles entre les plantes et les microorganismes.

---

<sup>1</sup> Brundrett, M. C., *Plant Soil*, **2009**, 320, 37-77.

<sup>2</sup> Smith, S. E. ; Read, D. J., *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed., Academic Press, **2008**.

## A. La nodulation ou symbiose rhizobiacées-légumineuses

### 1) Présentation

La nodulation, première grande association symbiotique étudiée d'un point de vue moléculaire, existerait depuis 65 millions d'années.<sup>3</sup> Comme évoqué précédemment, les plantes légumineuses (la luzerne, le pois, le soja, le trèfle...), formant la famille des *Fabaceae*, peuvent entrer en symbiose avec des bactéries, appelées *Rhizobia*.

Lors de ce processus naturel, ces bactéries colonisent les racines de la plante, par l'intermédiaire des poils absorbants, jusqu'à la création de nouveaux organes racinaires, appelés nodosités (ou nodules). Ces nodosités forment une niche écologique idéale pour les *Rhizobia* dans lesquelles elles peuvent se développer grâce à l'apport de glucides, produits par la photosynthèse. En échange, les *Rhizobia*, dans le nodule, réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac qui peut être assimilé par la plante-hôte pour sa croissance.

### 2) Dialogue moléculaire et processus symbiotique

La mise en place de cette symbiose, jusqu'à la formation de la nodosité, nécessite une succession d'étapes complexes<sup>4</sup> et résulte d'un échange, ou "dialogue", moléculaire initial entre les deux partenaires. Cet échange leur permet de s'identifier et de se reconnaître mutuellement au niveau des racines de la plante.<sup>5</sup> Ces molécules sont aujourd'hui clairement identifiées<sup>6,7</sup> et leur rôle commence à être bien défini.

On sait également qu'il existe une spécificité hôte-symbiote.<sup>8</sup> En effet, les signaux moléculaires peuvent varier d'une espèce de légumineuse à une autre (tout en conservant une structure chimique commune), et ne seront reconnus spécifiquement que par certains *Rhizobia*, et inversement. Ces échanges de signaux sont explicités sur le cas du haricot *Phaseolus vulgaris* (schéma 1) qui peut être généralisé à l'ensemble des légumineuses.

---

<sup>3</sup> Herendeen, P. S. ; Magallón-Puebla, S. ; Lupia, R. ; Crane, P. R. ; Kobylinska, J., *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **1999**, 86, 407-471.

<sup>4</sup> Vincent, J. dans *Biology of Nitrogen Fixation*, A. Quispel ed., North Holland Press, Amsterdam, **1974**, 265-341.

<sup>5</sup> Cohn, J. ; Day, R. B. ; Stacey, G., *Trends Plant Sci.*, **1998**, 3, 105-110.

<sup>6</sup> Peters, N. K. ; Frost, J. W. ; Long, S. R., *Science*, **1986**, 233, 977-980.

<sup>7</sup> (a) Lerouge, P. ; Roche, P. ; Faucher, C. ; Maillet, F. ; Truchet, G. ; Promé, J.-C. ; Dénarié, J., *Nature*, **1990**, 344, 781-784 ; (b) Truchet, G. ; Roche, P. ; Vasse, J. ; Camut, S. ; de Billy, F. ; Promé, J.-C. ; Dénarié, J., *Nature*, **1991**, 351, 670-673.

<sup>8</sup> Rossen, L. ; Davis, E. O. ; Johnston, A. W. B., *Trends Biochem. Sci.*, **1987**, 12, 430-433.

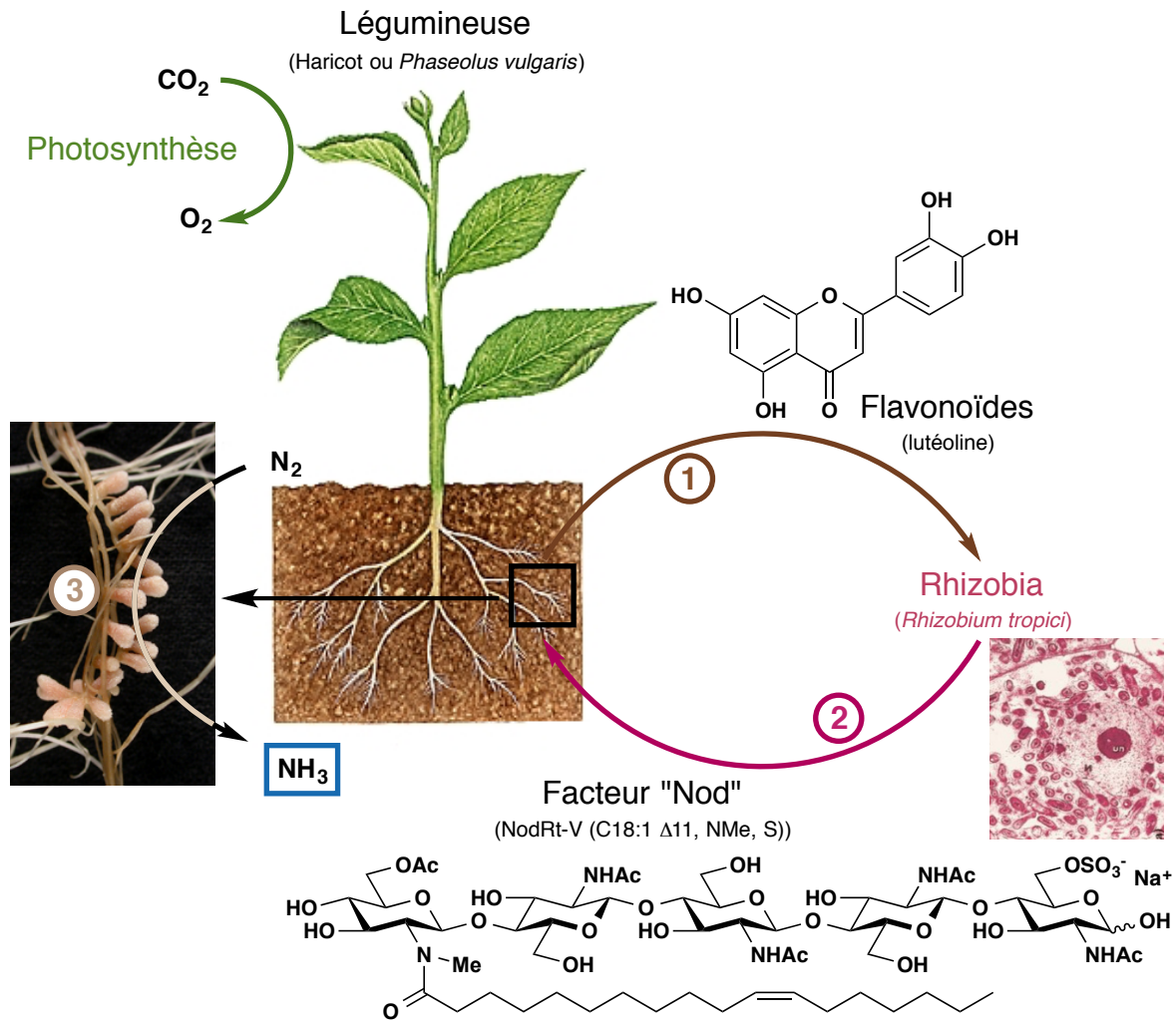


Schéma 1

Lorsque la plante légumineuse ne se nourrit pas suffisamment en dérivés azotés dans son environnement proche racinaire, elle exsude dans le sol, au niveau de la racine en croissance,<sup>9</sup> des flavonoïdes qui sont captés par les *Rhizobia*.<sup>6</sup> Ces bactéries se rapprochent alors du végétal, plus particulièrement au niveau des jeunes poils absorbants (sur la racine en croissance), et les flavonoïdes exsudés induisent l'expression des gènes rhizobiens (ou gènes *nod*).<sup>10,11</sup>

Dans un premier temps, le gène de régulation *nodD*, présent sur toutes les espèces de *Rhizobium*, est exprimé et conduit ensuite à l'expression d'autres gènes *nod*, comme l'opéron *nodABC* par exemple.<sup>12</sup> Certains de ces gènes *nod* sont communs entre les espèces bactériennes, comme *nodABC*, alors que d'autres ont des séquences qui varient d'une espèce à l'autre, comme

<sup>9</sup> Peters, N. K. ; Long, S. R., *Plant Physiol.*, **1988**, 88, 396-400.

<sup>10</sup> Kondorosi, E. ; Banfalvi, Z. ; Kondorosi, A., *Mol. Gen. Genet.*, **1984**, 193, 445-452.

<sup>11</sup> Van Rhijn, P. ; Vanderleyden, J., *Microbiol. Rev.*, **1995**, 59, 124-142.

<sup>12</sup> (a) Mulligan, J. T. ; Long, S. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 6609-6613. (b) Peters, N. K. ; Verma, D. P. S., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1990**, 3, 4-8.

*nodD*<sup>13</sup> ou *nodEF*. Ce sont ces gènes mutés qui permettent la spécificité hôte-*Rhizobium*.<sup>11</sup> Les enzymes issues de la traduction de ces gènes rhizobiens permettent notamment la biosynthèse de lipo-chitooligosaccharides (LCO), appelés facteurs de nodulation (facteurs "Nod"), qui auront donc des structures différentes selon les gènes *nod* de la bactérie.<sup>14</sup>

Ces facteurs Nod sont reconnus spécifiquement par des récepteurs<sup>15</sup> à la surface des poils absorbants, à de très faibles concentrations (de 10<sup>-12</sup> à 10<sup>-7</sup> mol/L),<sup>16</sup> et conduisent à la courbure du poil en croissance<sup>17</sup> et au piégeage des *Rhizobia*. Simultanément, des fluctuations de la teneur intracellulaire en ions calcium sont observées<sup>18</sup> et induisent une cascade de signaux dans les cellules épidermiques racinaires, jusqu'à l'expression du gène codant pour la production de cytokinines. Ces hormones végétales sont responsables de la multiplication des cellules corticales qui va ainsi permettre la formation de la nodosité.<sup>19</sup> En parallèle, les bactéries circulent dans le poil absorbant, dans lequel elles sont piégées, en formant un filament infectieux jusqu'au nodule en formation afin de le coloniser (schéma 2).<sup>20</sup>

---

<sup>13</sup> Spaink, H. P. ; Wijffelman, C. A. ; Pees, E. ; Okker, P. J. H. ; Lugtenberg, B. J. J., *Nature*, **1987**, 328, 337-340.

<sup>14</sup> Schultze, M. ; Kondorosi, A., *Annu. Rev. Genet.*, **1998**, 32, 33-57.

<sup>15</sup> Exemples de récepteurs : (a) NFR1/NFR5 *Lotus japonicus* : Radutoiu, S. ; Madsen, L. H. ; Madsen, E. B. ; Felle, H. H. ; Umehara, Y. ; Grønlund, M. ; Sato, S. ; Nakamura, Y. ; Tabata, S. ; Sandal, N. ; Stougaard, J., *Nature*, **2003**, 425, 585-592. (b) LYK3/NFP *Medicago truncatula* : Limpens, E. ; Franken, C. ; Smit, P. ; Willemse, J. ; Bisseling, T. ; Geurts, R., *Science*, **2003**, 302, 630-633.

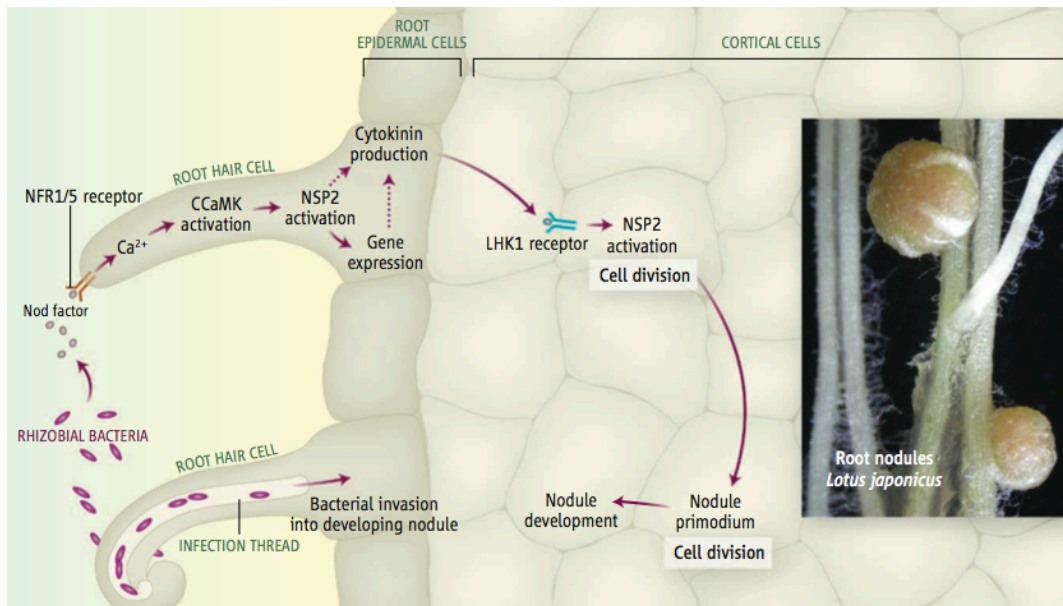
<sup>16</sup> Riely, B. K. ; Ané, J.-M. ; Penmetsa, R. V. ; Cook, D. R., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2004**, 7, 408-413.

<sup>17</sup> McCoy, E., *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1932**, 110, 514-533.

<sup>18</sup> (a) Ehrhardt, D. W. ; Wais, R. ; Long, S. R., *Cell*, **1996**, 85, 673-681. (b) 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.

<sup>19</sup> (a) Murray, J. D. ; Karas, B. J. ; Sato, S. ; Tabata, S. ; Amyot, L. ; Szczyglowski, K., *Science*, **2007**, 315, 101-104. (b) Tirichine, L. ; Sandal, N. ; Madsen, L. H. ; Radutoiu, S. ; Albrektsen, A. S. ; Sato, S. ; Asamizu, E. ; Tabata, S. ; Stougaard, J., *Science*, **2007**, 315, 104-107.

<sup>20</sup> Oldroyd, G. E. D., *Science*, **2007**, 315, 52-53.

Schéma 2<sup>20</sup>

Les facteurs de nodulation sont donc essentiels dans l'établissement de cette symbiose puisqu'ils permettent la reconnaissance du symbiote et coordonnent les réponses épidermiques et corticales initiant la création de nodosité.<sup>21,22</sup>

## B. La symbiose mycorhizienne

### 1) Présentation

La mycorhization est l'association symbiotique entre un champignon, dit mycorhizien, et les racines d'une plante.<sup>23,2</sup> La résultante de cette association constitue ce que l'on appelle une mycorhize. Le champignon mycorhizien est un microorganisme vivant dans le sol, constitué d'une spore et de fins filaments, ou hyphes, formant un réseau souvent très étendu, appelé mycellium.

Dans cette association symbiotique, la connexion du végétal au réseau d'hyphes fongiques permet les échanges nutritifs entre les deux symbiotes.<sup>24</sup> La plante-hôte fournit au champignon des composés organiques, tels que des sucres comme apport énergétique.<sup>2</sup> En contrepartie, la mycorhize permet au végétal de récupérer, par l'intermédiaire des hyphes, les ressources du sol

<sup>21</sup> (a) Hirsch, A. M., *New Phytol.*, **1992**, 122, 211-237. (b) Oldroyd, G. E. D. ; Murray, J. D. ; Poole, P. S. ; Downie, J. A., *Annu. Rev. Genet.*, **2011**, 45, 119-144.

<sup>22</sup> Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R. ; Bono, J.-J., *Trends Plant Sci.*, **2001**, 6, 24-30.

<sup>23</sup> Parniske, M., *Nat. Rev. Microbiol.*, **2008**, 6, 763-775.

<sup>24</sup> Bonfante, P. Genre, A. ; *Nat. Commun.*, **2010**, 1, 48.

nécessaires à sa croissance. Ces ressources sont principalement phosphatées,<sup>25</sup> mais peuvent également être azotées,<sup>26</sup> sulfurées, potassiques, zinciques, cuivriques (schéma 3).<sup>27</sup>

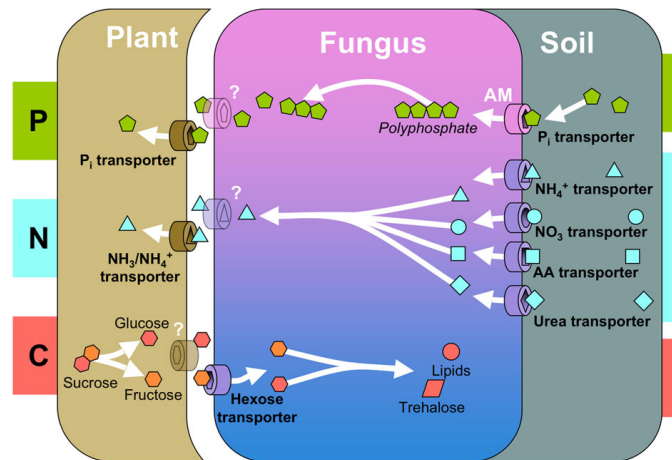


Schéma 3<sup>24</sup>

Les hyphes sont en effet essentiels à cette symbiose. Le réseau qu'ils forment démultiplie la surface de prospection couverte par les racines, bien au delà de la zone d'épuisement des ressources (mille mètres de filament mycélien pour un mètre de racine). De plus, les hyphes facilitent considérablement le transport de l'eau et des minéraux, du sol vers la racine.<sup>28,2</sup> Le champignon peut également stocker les nutriments selon les besoins de l'hôte et dégrader certaines substances organiques du sol, peu accessibles (voire inaccessibles) aux plantes, directement au niveau des racines.<sup>29</sup>

Finalement, les hyphes jouent un rôle de système racinaire secondaire très efficace permettant à de nombreuses plantes de s'adapter et croître dans des milieux pauvres et arides.<sup>30,31</sup>

<sup>25</sup> (a) Karandashov, V. ; Bucher, M., *Trends Plant Sci.*, 2005, 10, 22-29. (b) Bucher, M., *New Phytol.*, **2007**, 173, 11-26. (c) López-Arredondo, D. L. ; Leyva-González, M. A. ; González-Morales, S. I. ; López-Bucio, J. ; Herrera-Estrella, L., *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2014**, 65, 95-123.

<sup>26</sup> Hodge, A. ; Campbell, C. D. ; Fitter, A., *Nature*, **2001**, 413, 297-299.

<sup>27</sup> Marschner, H. ; Dell, B., *Plant Soil*, **1994**, 159, 89-102.

<sup>28</sup> (a) Safir, G. R. ; Boyer, J. S. ; Gerdemann, J. W., *Science*, **1971**, 172, 581-583. (b) Duddridge, J. A. ; Malibari, A. ; Read, D. J., *Nature*, **1980**, 287, 834-836.

<sup>29</sup> Bowen, G. D. ; Bevege, D. I. ; Mosse, B. dans Sanders, F. E. ; Mosse, B. ; Tinker, P. B., *Endomycorrhizas*, Academic Press, London, **1975**, 241-260.

<sup>30</sup> Aroca, R. ; Porcel, R. ; Ruiz-Lozano, J. M., *New phytol.*, **2007**, 173, 808-816.

<sup>31</sup> Augé, R. M., *Mycorrhiza*, **2001**, 11, 3-42.

## 2) Autres effets bénéfiques de la mycorhization

Si la nodulation semble surtout importante pour la nutrition azotée des légumineuses, la symbiose mycorhizienne permet, quant à elle, d'autres effets bénéfiques, en plus de son apport nutritionnel varié.

En général, cette association symbiotique permet d'augmenter la résistance de la plante au froid et au stress salin.<sup>30</sup> De plus, elle lui confère une meilleure résistance à certains polluants métalliques, absorbés et piégés par les filaments mycéliens, permettant au végétal de coloniser des sols contaminés.<sup>32</sup> Ces hyphes améliorent également la qualité du sol en retenant les agrégats argileux et en stabilisant sa structure.<sup>33</sup>

De nombreuses études ont également révélé l'effet protecteur des champignons mycorhiziens contre des agents pathogènes du sol (champignons et plantes parasites, bactéries, oomycètes, nématodes).<sup>34</sup> La résistance des plantes vis-à-vis de ces agents biologiques varie selon les espèces fongiques, la nature du pathogène et les conditions environnementales.<sup>35</sup> Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur 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 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<sup>36</sup> et l'activation de mécanismes de défense chez le végétal, suite à l'association symbiotique, permettent la protection de la plante-hôte.<sup>37</sup>

---

<sup>32</sup> Hartley, J. ; Cairney, W. G. ; Meharg, A. A., *Plant Soil*, **1997**, 189, 303-319.

<sup>33</sup> Andrade, G. ; Mihara, K. L. ; Linderman, R. G. ; Bethlenfalvay, G. J., *Plant Soil*, **1998**, 202, 89-96.

<sup>34</sup> (a) Whipps, J. M., *Can. J. Bot.*, **2004**, 82, 1198-1227. (b) 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. (c) Pozo, M. J. ; Azcón-Aguilar, C., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2007**, 10, 393-398.

<sup>35</sup> Azcón-Aguilar, C. ; Barea, J. M., *Mycorrhiza*, **1996**, 6, 457-464.

<sup>36</sup> Trofast, J. ; Wickberg, B., *Tetrahedron*, **1977**, 33, 875-879.

<sup>37</sup> Liu, J. ; Maldonado-Mendoza, I. ; Lopez-Meyer, M. ; Cheung, F. ; Town, C. D. ; Harrison, M. J., *Plant J.*, **2007**, 50, 529-544.



### 3) Les mycorhizes

Alors que le processus biologique de la formation de nodosités semble être le même pour l'ensemble des symbiotes du genre *Rhizobium*, on peut distinguer deux types de mycorhizes principaux dont l'association symbiotique des hyphes à la racine s'effectue de manière très différente.

- *Les ectomycorhizes*

Les ectomycorhizes seraient apparues il y a au moins cinquante millions d'années. C'est cette symbiose ectomycorhizienne qui est à l'origine de la formation du sporophore de nombreux champignons comestibles (truffe, bolet, amanite, chanterelle...).<sup>38</sup> L'ectomycorhization concernerait environ six milles espèces de champignons (Basidiomycètes, Ascomycètes ou Zygomycètes), soit moins de 1% de la totalité des espèces terrestres.<sup>39</sup> Seulement 5% des espèces végétales sont impliquées dans cette symbiose, soit environ vingt-cinq milles espèces,<sup>1,40</sup> principalement des arbres forestiers (notamment résineux).<sup>41</sup>

Lorsqu'une ectomycorhize est formée entre un arbre et un champignon mycorhizien, les hyphes entourent la racine en croissance du végétal, formant ainsi un manteau fongique. Ils s'infiltrent également entre les cellules corticales, sans y pénétrer, afin de former un réseau où s'effectuent les échanges d'éléments nutritifs et d'où partent les filaments mycéliens afin d'aller explorer le sol (schéma 4).<sup>24</sup>

- *Les endomycorhizes*

Les premières études scientifiques liées à la découverte de la symbiose endomycorhizienne ont été réalisées en 1885 par Franck.<sup>42</sup> Ce phénomène biologique serait bien plus primitif que la nodulation ou l'ectomycorhization car il daterait de quatre cents millions d'années, un âge estimé par des études de séquençage de l'ADN<sup>43</sup> et des analyses de données fossiles.<sup>44</sup> Il semblerait même que les champignons endomycorhiziens aient contribué à la colonisation terrestre des plantes.<sup>45</sup> Ainsi, grâce à l'évolution, elles constituent la famille de symbiote la plus répandue sur terre et sont donc capables de coloniser plus de quatre cents milles espèces végétales, soit environ 80% de la

---

<sup>38</sup> LePage, B. A. ; Currah, R. S. ; Stockey, R. A. ; Rothwell, G. W., *Am. J. Bot.*, **1997**, 84, 410-412.

<sup>39</sup> Hawksworth, D. L., *Mycol. Res.*, **2001**, 105, 1422-1432.

<sup>40</sup> Tedersoo, L. ; May, T. W. ; Smith, M. E., *Mycorrhiza*, **2010**, 20, 217-263.

<sup>41</sup> Horton, T. R. ; Bruns, T. D., *Molecular Ecology*, **2001**, 10, 1855-1871.

<sup>42</sup> Franck, A. B., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **1885**, 3, 128-145.

<sup>43</sup> Simon, L. ; Bousquet, J. ; Lévesque, R. C. ; Lalonde, M., *Nature*, **1993**, 363, 67-69.

<sup>44</sup> (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.

<sup>45</sup> (a) Pirozinsky, 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.

totalité des espèces terrestres. Néanmoins, ces champignons ne comptent qu'environ deux cents espèces connues (de la famille des Gloméromycètes) et sont donc peu spécifiques envers les plantes-hôtes.<sup>46</sup>

Lorsqu'une endomycorhize est formée au niveau de la racine, les hyphes pénètrent directement dans les cellules corticales pour y former des vésicules, organes de réserve nutritionnelle, et des arbuscules intracellulaires hyper-ramifiés, permettant de nombreux échanges avec la plante (schéma 4).<sup>24,47</sup>

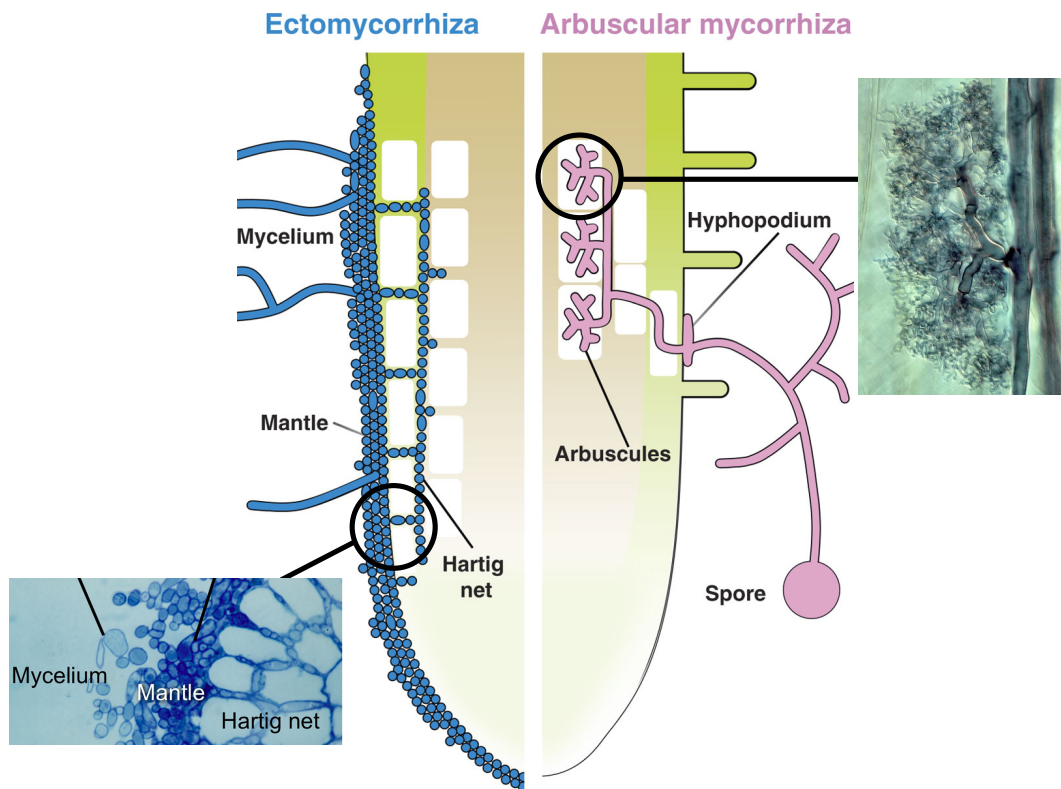


Schéma 4<sup>24</sup>

Actuellement, les mécanismes biologiques de mise en place de ces symbioses ne sont que partiellement connus.<sup>48</sup> Néanmoins, un dialogue moléculaire a été découvert dans le cadre de la symbiose endomycorhizienne, similaire à celui précédemment observé pour la nodulation.<sup>49</sup>

<sup>46</sup> Schüßler, A. ; Schwarzott, D. ; Walker, C., *Mycol. Res.*, **2001**, 105, 1413-1421.

<sup>47</sup> Harrison, M. J., *Annu. Rev. Microbiol.*, **2005**, 59, 19-42.

<sup>48</sup> Raudaskoski, M. ; Kothe, E., *Mycorrhiza*, **2015**, 25, 243-252.

<sup>49</sup> 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, 179-189.

#### 4) Dialogue moléculaire et processus biologique de la symbiose endomycorhizienne à arbuscule.

Il a longtemps été supposé que la symbiose endomycorhizienne mettait en jeu les mêmes familles de molécules que la nodulation pour effectuer ce dialogue moléculaire : des flavonoïdes, exsudés par la plante, et des lipo-chitoooligosaccharides, renvoyés par le micro-symbiote au végétal.<sup>50</sup>

Néanmoins, des études ont pu montrer que les flavonoïdes ne semblaient jouer aucun rôle dans cette symbiose.<sup>51</sup> Les molécules exsudées par la plante-hôte ont finalement pu être identifiées comme étant des strigolactones (schéma 5).<sup>52</sup> Ces apocaroténoïdes sont connus depuis longtemps comme stimulants de la germination des graines de plantes parasites (type *Striga* et *Orobanche*)<sup>53</sup>, mais il aura fallu effectuer de nombreuses études et attendre l'amélioration des techniques d'analyse pour finalement réussir à isoler ces molécules qui sont exsudées par la plante en très faible quantité et se dégradent rapidement dans le sol.<sup>24,54</sup> Il a été montré plus récemment que ces molécules étaient également une classe d'hormone végétale contrôlant l'architecture des plantes.<sup>55,56</sup>

De l'autre côté, les exsudats émis par les hyphes endomycorhiziens, appelés facteurs de mycorhization (ou facteur "Myc") n'ont été isolés que très récemment grâce à des analyses d'extraits biologiques, en chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.<sup>57</sup> La structure chimique de ces facteurs Myc s'est avérée être la même que celle des facteurs Nod : des lipo-chitoooligosaccharides (schéma 5).

<sup>50</sup> (a) Siquiera, J. O. ; Nair, M. G. ; Hammerschmidt, R. ; Safir, G.R., *Crit. Rev. Plant Sci.*, **1991**, 10, 63-121. (b) Vierheilig, H. ; Piché, Y. dans Buslig, B. S. ; Mantley, J. A., *Flavonoids in cell functions*, New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2002**, 23-39.

<sup>51</sup> Bécard, G. ; Taylor, L. P. ; Douds, D. D. ; Pfeffer, P. E. ; Doner, L. W., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1995**, 8, 252-258.

<sup>52</sup> (a) Akiyama, K. ; Matsuzaki, K.-I. ; Hayashi, H., *Nature*, **2005**, 435, 824-827. (b) 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.

<sup>53</sup> (a) Cook, C. E. ; Whichard, L. P. ; Turner, B. ; Wall, M. E. ; Egley, G. H., *Science*, **1966**, 154, 1189-1190.

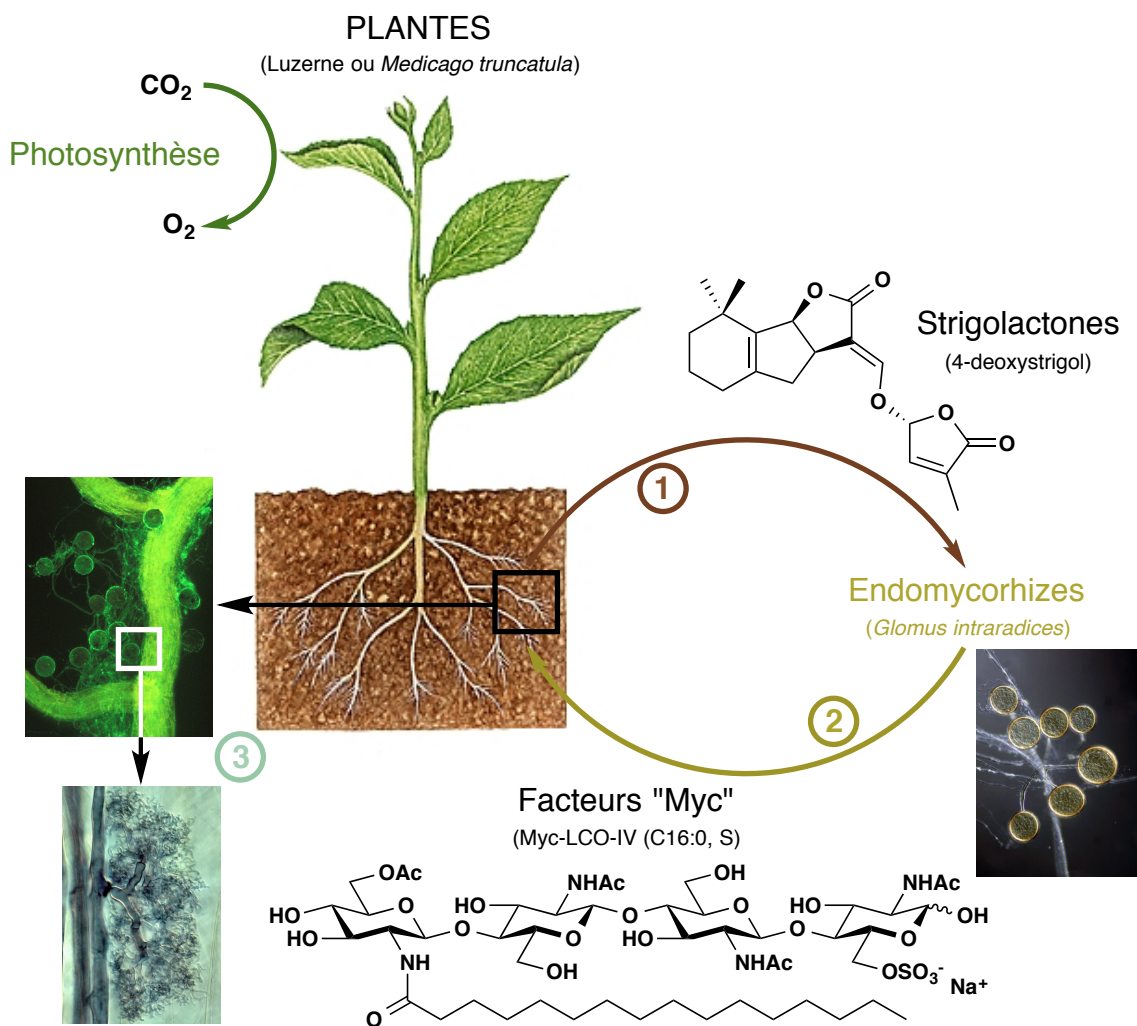
<sup>54</sup> Xie, X. ; Yoneyama, K. ; Yoneyama, K., *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2010**, 48, 93-117.

<sup>55</sup> (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. ; Lauressergues, D. ; Frei Dit Frey, N. ; Heugebaert, T. S. ; Stevens, C. V. ; Geelen, D. ; Goormachtig, S. ; Rameau, C., *Mol. Plant*, **2014**, 7, 675-690.

<sup>56</sup> (a) 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. (b) Lopez-Obando, M ; Ligerot, Y. ; Bonhomme, S. ; Boyer, F.-D. ; Rameau, C., *Development*, **2015**, 142, 3615-3619.

<sup>57</sup> 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, 58-64.

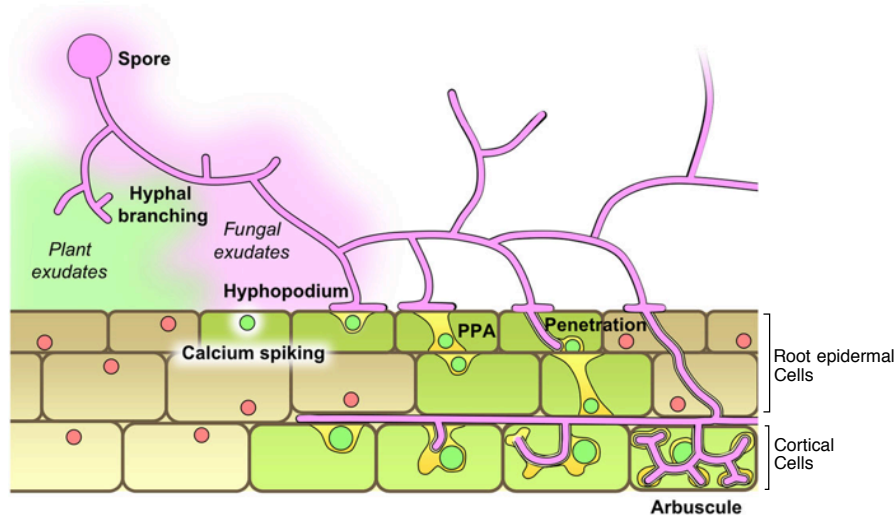
Ceci tend bien à confirmer les hypothèses évolutives évoquées par différents chercheurs.<sup>23,57,58</sup> La symbiose endomycorhizienne étant probablement la plus ancienne symbiose entre une plante et un micro-organisme, il est possible de supposer que les mécanismes de signalisation ont été mis en place lors de cette association primitive avec ces champignons endomycorhiziens ; l'évolution a finalement permis aux bactéries *Rhizobia* de s'adapter à leur milieu en "copiant" ces mécanismes et en utilisant les mêmes types de signaux pour effectuer leur propre association mutuellement bénéfique avec les végétaux. Il est même supposé que les facteurs Myc sont les "ancêtres" des facteurs Nod, ce qui peut expliquer la structure généralement plus simple des lipo-chitooligosaccharides de champignons.



<sup>58</sup> Oláh, B. ; Brière, C. ; Bécard, G. ; Dénarié, J. ; Gough, C., *Plant J.*, **2005**, 44, 195-207.

Ces échanges de molécules sont connus sur des espèces modèles, comme *Medicago truncatula* (Luzerne tronquée),<sup>57,59</sup> mais les mécanismes biologiques que ces signaux mettent en œuvre chez le champignon et chez la plante restent encore mal compris.

Lorsque la plante n'est plus capable de récupérer suffisamment de nutriments par elle-même, notamment des nutriments phosphatés, elle exsude dans le sol des strigolactones. Différents champignons endomycorhiziens peuvent capter ces signaux, au cours de la phase présymbiotique, grâce à leurs hyphes qui explorent le sol. Ces strigolactones induisent la formation de ramifications au niveau des hyphes, permettant d'accroître la probabilité de contact entre les deux symbiotes, et déclenchent la production de lipo-chitooligosaccharides (facteurs Myc).<sup>49</sup> Comme dans le cas de la nodulation, les LCOs exsudés par les hyphes mycorhiziens sont captés par la plante et induisent des oscillations calciques entraînant l'activation et la préparation des cellules épidermiques.<sup>60</sup> Cette reconnaissance des LCOs permet de ne pas déclencher de mécanismes de défense à l'approche du champignon (réponse immunitaire déclenchée par des COs). L'hyphe va alors pénétrer à travers les cellules, grâce à la formation préalable de "tunnels cytoplasmiques" (appareil de pré-pénétration : PPA). Une fois la zone corticale atteinte, l'hyphe crée dans les cellules des vésicules pour stocker les ressources et des arbuscules (hyper-ramification mycélienne) permettant une surface d'échange considérable avec la plante (schéma 6).<sup>24,61</sup>

Schéma 6<sup>24</sup>

<sup>59</sup> (a) Laressergues, D. ; André, O. ; Peng, J. ; Wen, J. ; Chen, R. ; Ratet, P. ; Tadege, M. ; Mysore, K. S. ; Rochange, S. F., *J. Exp. Bot.*, **2015**, 66, 1237-1244. (b) Liu, W. ; Kohlen, W. ; Lillo, A. ; Op den Camp, R. ; Ivanov, S. ; Hartog, M. ; Limpens, E. ; Jamil, M. ; Smaczniak, C. ; Kaufmann, K. ; Yang, W.-C. ; Hooiveld, G. J. E. J. ; Charnikhova, T. ; Bouwmeester, H. J. ; Bisseling, T. ; Geurts, R., *Plant Cell*, **2011**, 23, 3853-3865.

<sup>60</sup> Sun, J. ; Miller, J. B. ; Granqvist, E. ; Wiley-Kalil, A. ; Gobbato, E. ; Maillet, F. ; Cottaz, S. ; Samain, E. ; Venkateshwaran, M., Fort, S. ; Morris, R. J. ; Ané, J.-M. ; Dénarié, J. ; Oldroyd, G. E. D., *Plant Cell*, **2015**, 27, 823-838.

<sup>61</sup> Paszkowski, U. ; *New Phytol.*, **2006**, 172, 35-46.

Ainsi, l'arbuscule peut être considéré comme le cœur de la symbiose endomycorhizienne et l'exsudation de LCOs par le micro-symbiote semble être à nouveau un facteur essentiel dans la mise en place de cette symbiose. De nombreuses études (génomique, transcriptomique, protéomique) sont effectuées dans ce domaine afin de mieux connaître ces mécanismes.<sup>62</sup>

### C. Conclusion sur les symbioses et leurs intérêts

Ces mécanismes symbiotiques ont une importance écologique capitale pour les plantes et dénotent de la capacité que possède la nature à pouvoir s'adapter aux multiples environnements terrestres.<sup>63</sup> Il a même été montré très récemment que *Arabidopsis thaliana*, une plante qui ne réalise pas de symbiose endomycorhizienne, est capable de s'associer momentanément avec d'autres champignons, qui lui sont pathogènes en temps normal, afin de récupérer des ressources essentielles pour sa croissance. Une fois ces échanges terminés, le champignon est rejeté par *A. thaliana* et redevient pathogène pour la plante.<sup>64</sup> Il ne s'agit donc pas seulement de reconnaissance entre "bons" partenaires. Le statut "bénéfique" ou "pathogène" n'est pas préétabli et peut changer au gré des besoins nutritionnels.

De nombreuses découvertes sont encore à venir dans le domaine des symbioses plantes-microorganismes mais le rôle primordial qu'elles jouent dans la croissance des végétaux<sup>65</sup> a un intérêt particulier dans le cadre de l'agriculture.

L'approvisionnement nutritionnel azoté et phosphaté est un des principaux facteurs limitant de la production végétale agricole. Pour mener à bien leurs cultures, les agriculteurs ont eu recours depuis de nombreuses années à des engrais, d'abord d'origine naturelle puis de synthèse, dont la consommation mondiale ne cesse de croître. Cependant, si l'azote est présent dans l'atmosphère en quantité quasiment illimitée, sa réduction en ammoniacque (procédé Haber-Bosch, 1909), son transport puis son épandage ont un coût énergétique très élevé, sans parler de la pollution engendrée par l'utilisation de telles substances. En effet, l'application excessive d'engrais azotés,

<sup>62</sup> (a) Pumpllin, N. ; Mondo, S. J. ; Topp, S. ; Starker, C. G. ; Gantt, J. S. ; Harrison, M. J., *Plant J.*, **2010**, 61, 482-494. (b) Camps C. ; Jardinaud, M.-F. ; Rengel, D. ; Carrère, S. ; Hervé, C. ; Debelle, F. ; Gamas, P. ; Bensmihen, S. ; Gough, C., *New phytol.*, **2015**, 208, 224-240 (c) Gobbato, E., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2015**, 26, 1-7

<sup>63</sup> Venkateshwaran, M. ; Volkening, J. D. ; Sussman, M. R. ; Ané, J.-M., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2013**, 16, 118.

<sup>64</sup> Hiruma, K. ; Gerlach, N. ; Sacristán, S. ; Nakano, R. T. ; Hacquard, S. ; Krachner, B. ; Neumann, U. ; Ramirez, D. ; Bucher, M. ; O'Connell, R. J. ; Schulze-Lefert, P., *Cell*, **2016**, 165, 464-474.

<sup>65</sup> (a) van der Heijden, M. G. A. ; de Bruin, S. ; Luckerhoff, L. ; van Logtestijn, R. S. P. ; Schlaeppli, K., *ISME J.*, **2016**, 10, 389-399. (b) Venturi, V. ; Keel, C., *Trends Plant Sci.*, **2016**, 21, 187-198. (c) van der Heijden, M. G. A. ; Martin, F. M. ; Selosse, M.-A. ; Sanders, I. R., *New Phytol.*, **2015**, 205, 1406-1423.

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, contaminant ainsi les cours d'eau, les lacs, les rivières et les nappes phréatiques. Les conséquences sont multiples : un risque pour la santé humaine considérable, ou encore l'asphyxie des écosystèmes aquatiques résultants de la prolifération d'algues. L'utilisation d'engrais chimiques est donc de moins en moins tolérée, à juste titre, par la société actuelle. Seulement, l'augmentation de la population et la diminution des surfaces cultivables nous empêchent de revenir à une agriculture sans engrais, sous peine de ne pouvoir nourrir l'ensemble de la population terrestre. Il est donc important de pouvoir trouver des solutions pour palier à ces problèmes de pollution tout en maintenant une agriculture à hauts rendements.

L'exploitation des voies biologiques naturelles comme la symbiose fixatrice d'azote ou la mycorhization représente donc un enjeu considérable sur le plan agronomique et écologique. Différentes méthodes ont été mises au point et ont déjà prouvé leur efficacité. L'utilisation de *Rhizobia* dans de nombreuses plantations depuis une quarantaine d'année, notamment pour la culture de soja au Etats-Unis, donne de meilleurs rendements agricoles et permet une diminution importante de la quantité d'engrais utilisée.<sup>66</sup> L'utilisation des champignons mycorhiziens est plus récente mais de très bons résultats ont déjà pu être observés ces vingt dernières années sur des cultures d'Amérique du Nord grâce à la "mycorhization contrôlée". Les facteurs Nod seuls (en l'absence de *Rhizobia*) sont actifs sur les racines de la plante légumineuse à de très faibles concentrations (du pico- au nanomolaire) et peuvent induire la plupart des réponses caractéristiques des bactéries elle-mêmes,<sup>67,22</sup> notamment grâce au développement de mycorhizes et du système racinaire.<sup>58,68</sup> Néanmoins, même si les quantités de facteurs Nod actuellement utilisées pour les cultures sont faibles (0,1 mg par hectare suffit), un procédé industriel de synthèse de LCOs serait très peu rentable dû aux très faibles rendements généralement obtenus.

Une meilleure compréhension des processus symbiotiques, notamment au niveau des récepteurs racinaires des LCOs, permettrait de s'orienter vers la synthèse efficace d'analogues bioactifs de facteurs de nodulation et mycorhization.

---

<sup>66</sup> Hume, D. J. ; Blair, D. H., *Can. J. Microbiol.*, **1992**, 38, 588-593.

<sup>67</sup> Schultze, M. ; Kondorosi, A., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1996**, 6, 631-638.

<sup>68</sup> Tanaka, K. ; Cho, S.-H. ; Lee, H. ; Pham, A. Q. ; Batek, J. M. ; Cui, S. ; Qiu, J. ; Khan, S. M. ; Joshi, T. ; Zhang, Z. J. ; Xu, D. ; Stacey, G., *J. Exp. Bot.*, **2015**, 66, 5727-5738.

## II. SYNTHÈSES DE LIPO-CHITOOLIGOSACCHARIDES ET ANALOGUES

Afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu dans les symbioses plante-microorganismes, notamment au niveau des interactions LCO-récepteur, différents groupes se sont intéressés à la synthèse des facteurs Nod et Myc, mais également à la synthèse d'analogues de ces composés bioactifs.<sup>69</sup>

### A. Structure des facteurs de nodulation et de mycorhization

Comme vu précédemment, les facteurs Nod, identifiés au début des années 1990 par le groupe de Dénarié,<sup>7</sup> et les facteurs Myc, découverts plus récemment par le même groupe,<sup>57</sup> appartiennent à la classe des LCOs. Ils sont constitués d'un squelette oligomérique d'unités *N*-acétyl-D-glucosamine, reliées par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4. L'extrémité non-réductrice de l'oligomère possède un groupement acylé lipidique sur l'atome d'azote. La spécificité plante-*Rhizobium*, évoquée précédemment, implique une grande variété de structures des facteurs Nod.<sup>70,71</sup> A l'inverse, les facteurs Myc, plus "anciens", ont des structures plus simples (schéma 7).

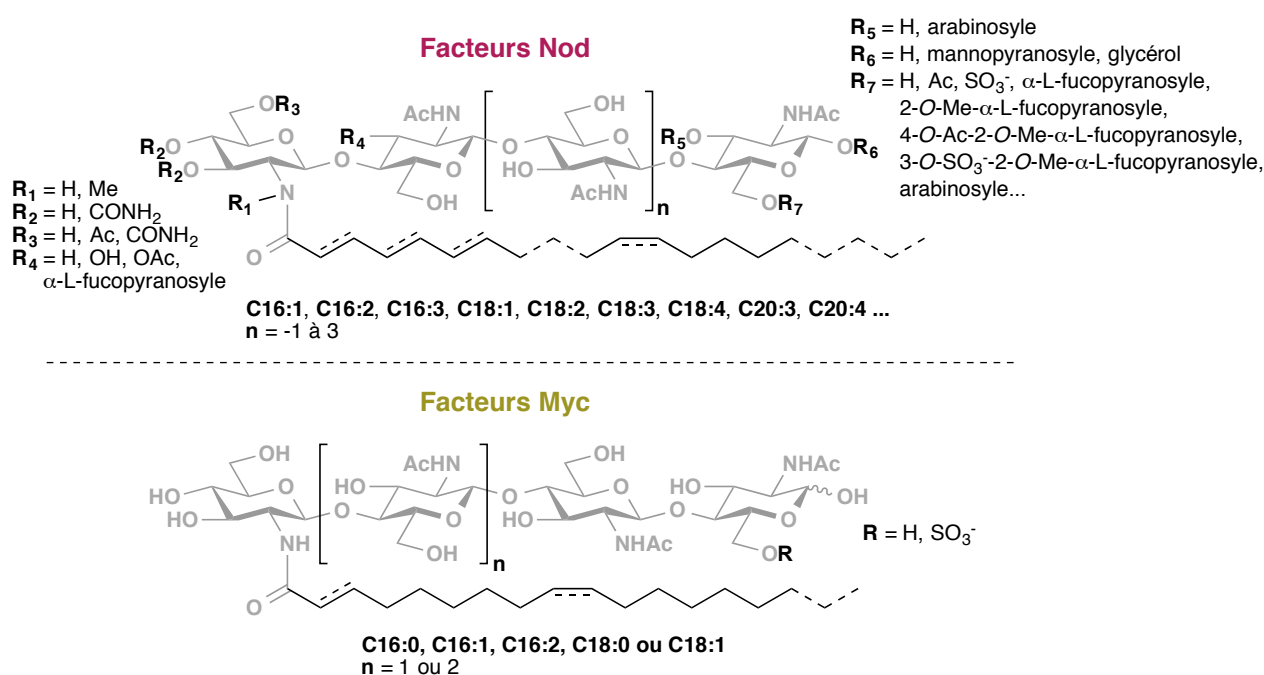


Schéma 7

<sup>69</sup> Fliegmann, J. ; Bono, J.-J., *Glycoconj. J.*, **2015**, 32, 455-464.

<sup>70</sup> Dénarié, J. ; Debelle, F. ; Promé, J.-C., *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 503-535.

<sup>71</sup> Perret, X. ; Staehelin, C. ; Broughton, W. J., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2000**, 180-201.



## B. Synthèses de facteurs symbiotiques

De nombreux chercheurs se sont intéressés à la synthèse du premier facteur Nod découvert,<sup>72</sup> NodSm-IV (C16:2  $\Delta$ 2,9, S) (**1**) (schéma 8), impliqué dans la symbiose de *Sinorhizobium meliloti* avec la luzerne. Plus tard, la synthèse d'autres cibles particulièrement intéressantes (pour le développement du soja par exemple) a été envisagée.<sup>72</sup> L'évolution des techniques et des procédés a permis par la suite des synthèses de LCOs plus rapides et efficaces.

### 1) Premiers facteurs Nod synthétiques

#### • Synthèse de Nicolaou

En 1992, le groupe de Nicolaou a décrit la synthèse de NodSm-IV (C16:2  $\Delta$ 2,9, S) (**1**), ainsi que différents dérivés naturels.<sup>73</sup> Les auteurs ont envisagé l'assemblage des unités glucosamine à partir de l'unité réductrice en utilisant le groupement fluorure comme groupement anomère activable, et l'utilisation du motif phthalimido comme groupement stéréodirecteur en position 2, pour induire la  $\beta$ -stéréosélectivité (schéma 8).

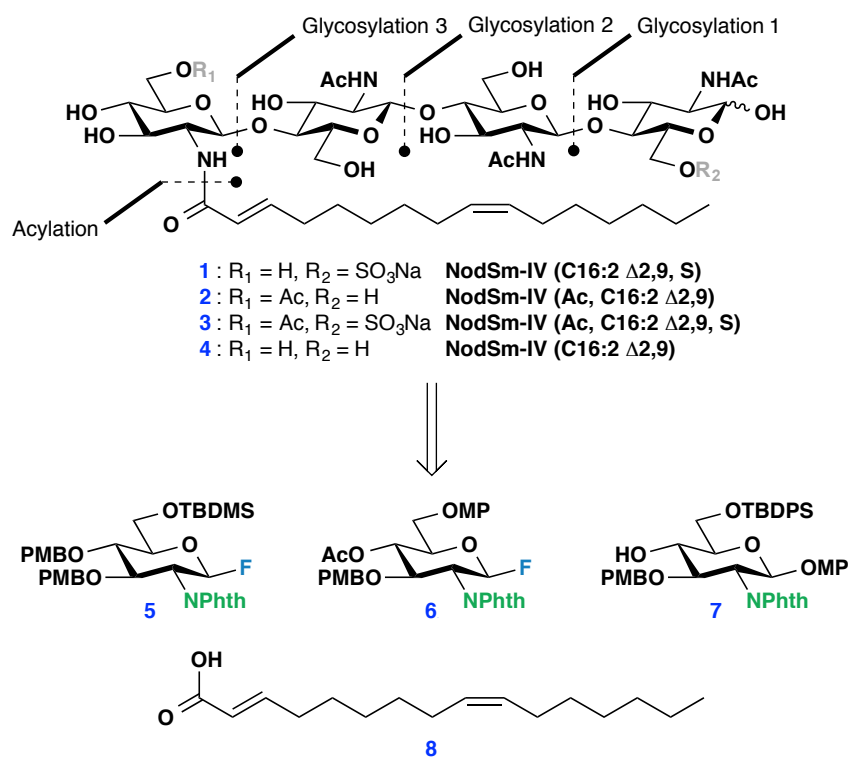
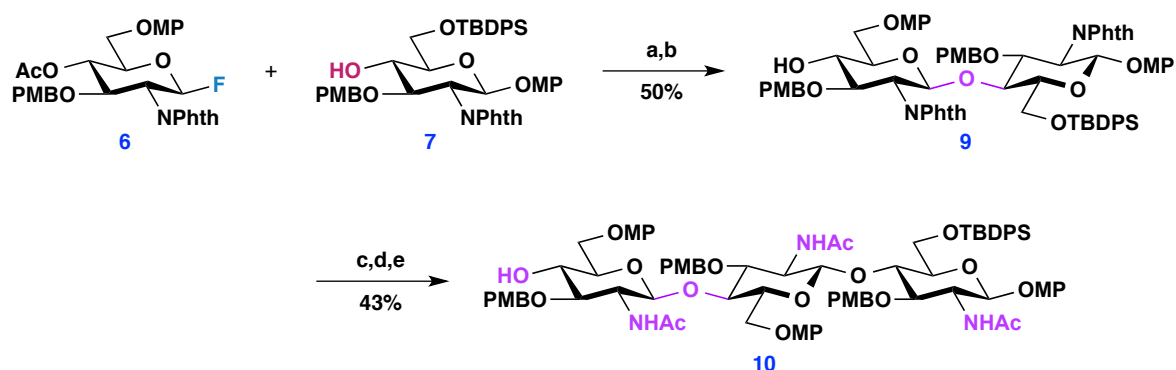


Schéma 8

<sup>72</sup> Beau, J.-M., *Chimia*, **2011**, 65, 45-48.

<sup>73</sup> Nicolaou, K. C. ; Bockovich, N. J. ; Carcanague, D. R. ; Hummel, C. W. ; Even, L. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 8701-8702.

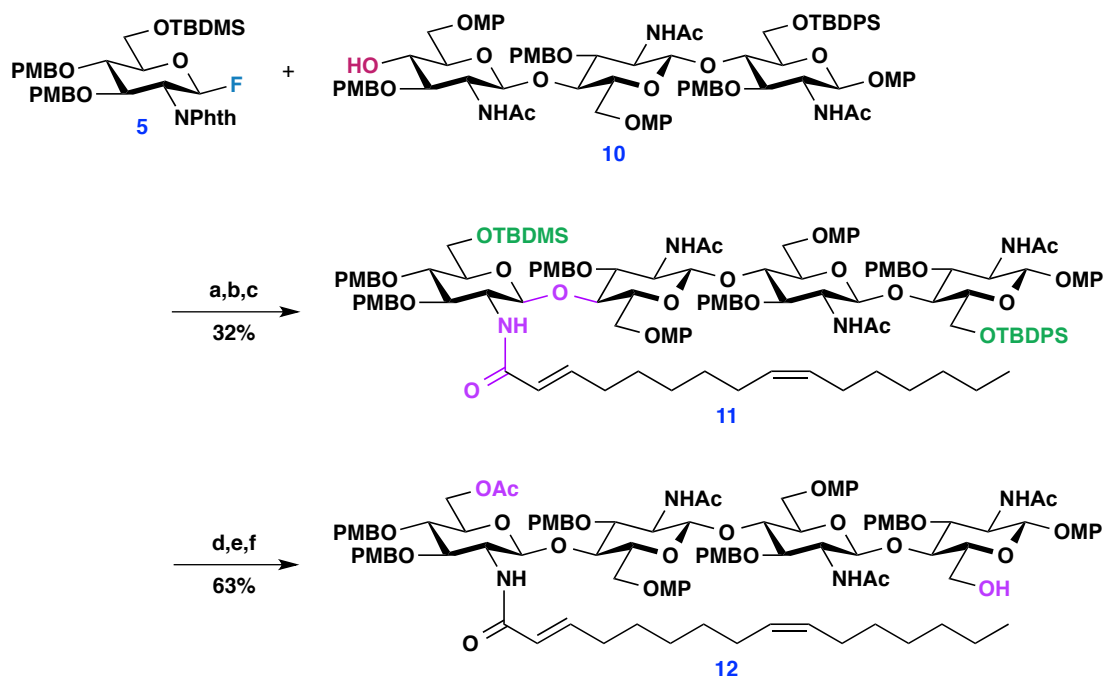
La synthèse a débuté par la réaction de l'accepteur de glycosyle (**7**), précurseur de l'unité réductrice du produit final, sur le donneur (**6**). La méthode de glycosylation employée est basée sur l'activation du fluorure anomère avec un couple de promoteurs, à base de sels d'argent et de zirconium,<sup>74</sup> utilisé en excès. La protection acétyle a ensuite pu être clivée afin d'obtenir un nouvel hydroxyle libre en position 4. Le dimère (**9**) obtenu a pu être engagé dans une nouvelle étape de glycosylation avec l'accepteur (**7**) afin d'obtenir un trisaccharide protégé. Les protections *N*-phthaloyles ainsi que l'acétyle ont été retirées sélectivement par l'hydrazine dans l'eau, à chaud. Les fonctions amines alors libérées ont pu être réacétylées sélectivement permettant l'obtention du trimère (**10**) (schéma 9).



**Schéma 9** : Réactifs et conditions : (a) (**6**) (1,8 éq.), AgOTf (5,0 éq.), ZrCp<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,0 éq.), 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylpyridine (1,0 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tamis 4Å, 0 à t.a., 16h ; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 éq.), CH<sub>3</sub>OH/THF, t.a., 2h ; (c) (**6**) (2,0 éq.), AgOTf (5,0 éq.), ZrCp<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,0 éq.), 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylpyridine (1,0 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tamis 4Å, 0°C à t.a., 16h ; (d) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (excès), EtOH/benzène, 100°C, 16h ; (e) Ac<sub>2</sub>O (excès), CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25°C, 30 min

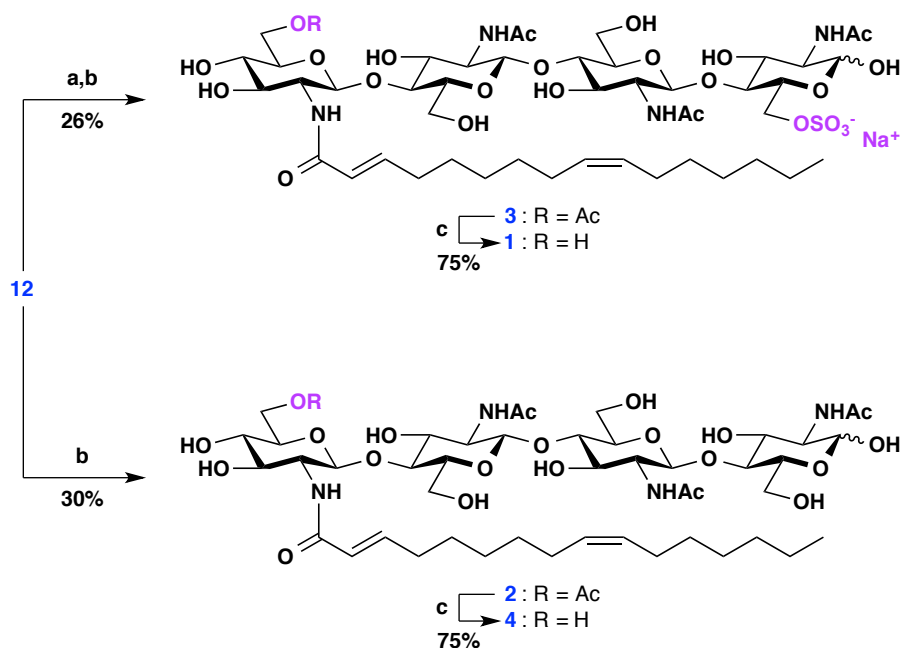
Le trimère (**10**) a été glycosylé avec le donneur (**5**) pour obtenir la structure tétrasaccharidique escomptée et la diversité moléculaire souhaitée a ensuite pu être introduite. Dans un premier temps, la protection *N*-phthaloyle a été clivée et la fonction amine ainsi libérée a pu être couplée avec la chaîne carbonée (**8**), en présence d'iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium, un agent d'activation. Le LCO (**11**) obtenu comporte deux protections silylées, un *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) et un *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS), orthogonales avec l'ensemble des autres protections. Ces deux groupements, judicieusement choisis, ont permis d'introduire les fonctions acétate et sulfate des différents LCOs naturels, car le TBDMS a pu être déprotégé sélectivement sans toucher au TBDPS. Le TBDMS a été retiré en utilisant des conditions acides douces puis l'hydroxyle libéré a été réacétylé. La seconde protection silylée TBDPS a alors été clivée par des ions fluorures, afin d'obtenir l'intermédiaire (**12**) (schéma 10).

<sup>74</sup> Suzuki, K. ; Maeta, H. ; Suzuki, T. ; Matsumoto, T., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 6879-6882



**Schéma 10** : Réactifs et conditions : **(a)** (5) (5 éq.), AgOTf (5 éq.), ZrCp<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 éq.), 2,6-di-tert-butyl-4-méthylpyridine (0,2 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tamis 4Å, t.a., 16h ; **(b)** N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (excès), EtOH, 100°C, 6h ; **(c)** (8) (3 éq.), iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium (3 éq.), NEt<sub>3</sub> (3,3 éq.), CH<sub>3</sub>CN, t.a., 2h ; **(d)** pyridinium p-toluenesulfonate (1,3 éq.), EtOH, t.a., 16h ; **(e)** Ac<sub>2</sub>O (1,5 éq.), NEt<sub>3</sub> (1,1 éq.), DMAP (cat.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 10 min ; **(f)** TBAF (3 éq.), THF, t.a., 90 min

L'équipe de Nicolaou a utilisé le LCO (**12**) comme intermédiaire commun à la synthèse de l'ensemble des quatre facteurs Nod envisagés. Dans le cas des analogues non sulfatés (**2**) et (**4**), les *para*-méthoxybenzyles ont été clivés par oxydation avec un sel de cérium, et l'hydroxyle précédemment acétylé, a pu être déprotégé, ou non, selon l'analogue souhaité. Dans le cas des analogues (**1**) et (**3**), une étape de sulfatation, grâce à un complexe de trioxyde de soufre-triméthylamine, a été effectuée sur l'hydroxyle libre de l'intermédiaire (**12**) avant d'effectuer les déprotections des benzyles et de l'acétylé (schéma 11).



**Schéma 11** : Réactifs et conditions : (a)  $\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$  (excès), pyridine, t.a., 1h ; (b) CAN (20 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 1h ; (c)  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (excès),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 3h

Les différents NodSm-IV ont ainsi pu être obtenus avec de faibles rendements, entre 0,8 % et 1,3 %, après 13 ou 14 étapes de synthèse, sans inclure la synthèse des briques monosaccharidiques de départ. Ces faibles rendements sont notamment dûs à l'efficacité moyenne des étapes de glycosylation ou de l'étape de déprotection avec le nitrate de cérium et d'ammonium (CAN). Un autre inconvénient à cette stratégie est l'introduction précoce de la chaîne carbonée. En effet, de part leur propriété amphiphile, les LCOs sont des composés difficiles à manipuler. Les dernières phases de synthèse, à partir de l'intermédiaire **(11)**, ont pu poser des problèmes, notamment au niveau des étapes de purifications.

#### • Synthèse de Hui

En 1993, le groupe de Hui a publié également une synthèse du facteur NodSm-IV (C16:2  $\Delta$ 2,9, S) **(1)**, qu'il a complété l'année suivante.<sup>75</sup> La stratégie employée était différente de celle de Nicolaou puisqu'il a effectué une synthèse par bloc, où la dernière glycosylation a été réalisée à partir de deux disaccharides **(13)** et **(14)**. L'avantage de cette stratégie était d'avoir une synthèse plus convergente et comportant moins de glycosylations difficiles à partir de dérivés oligosaccharidiques longs. Il est à noter que le précurseur **(14)** de l'unité non réductrice comporte un groupement azoture en position 2 afin de pouvoir introduire la chaîne carbonée C16:2 en fin de synthèse. Hui a également utilisé une

<sup>75</sup> (a) Wang, L.-X. ; Li, C. ; Wang, Q.-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., Perkin Trans. 1*, **1994**, 621-628.

chaîne carbonée (**20**), activée par une thiazolidinethione, qui a été introduite lors de la dernière étape de la synthèse (schéma 12).

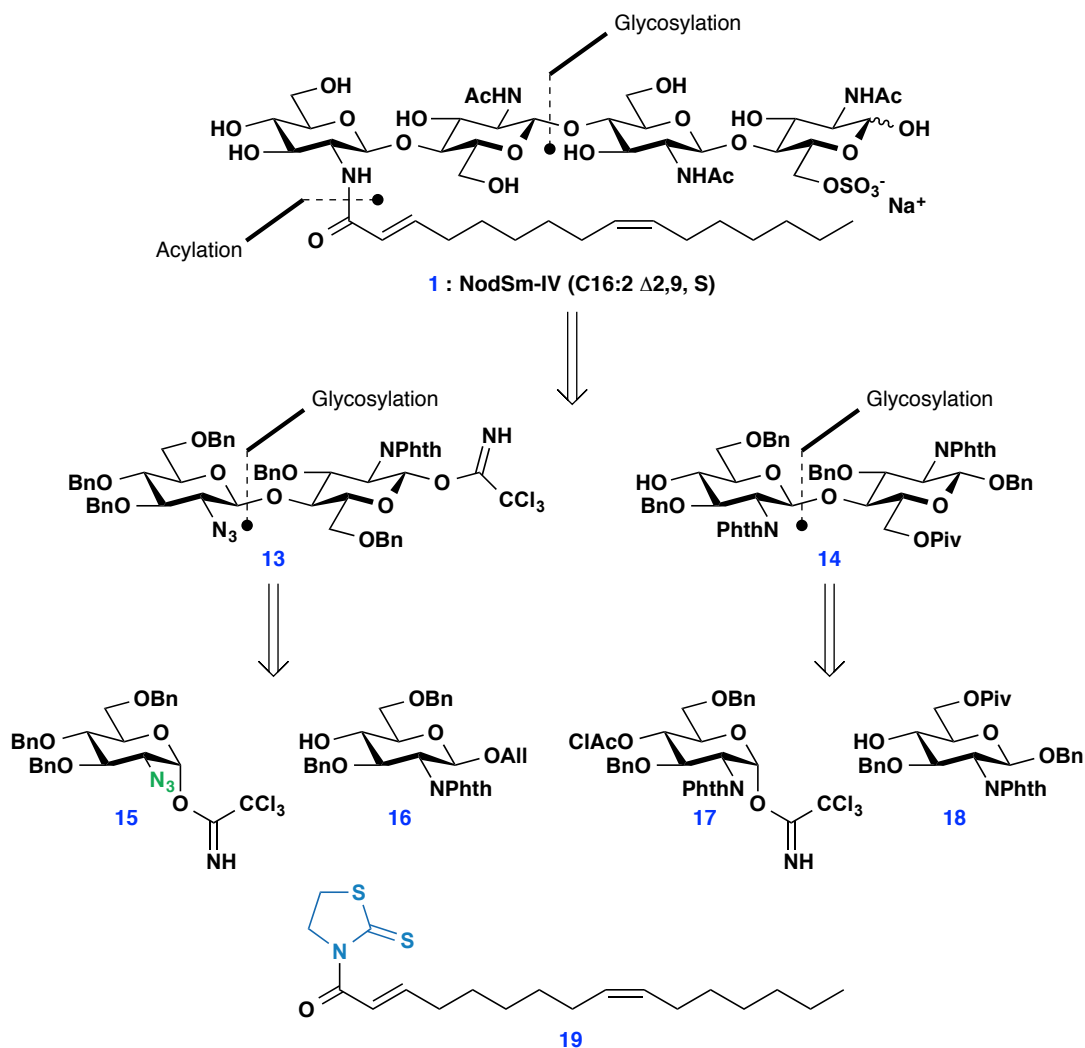
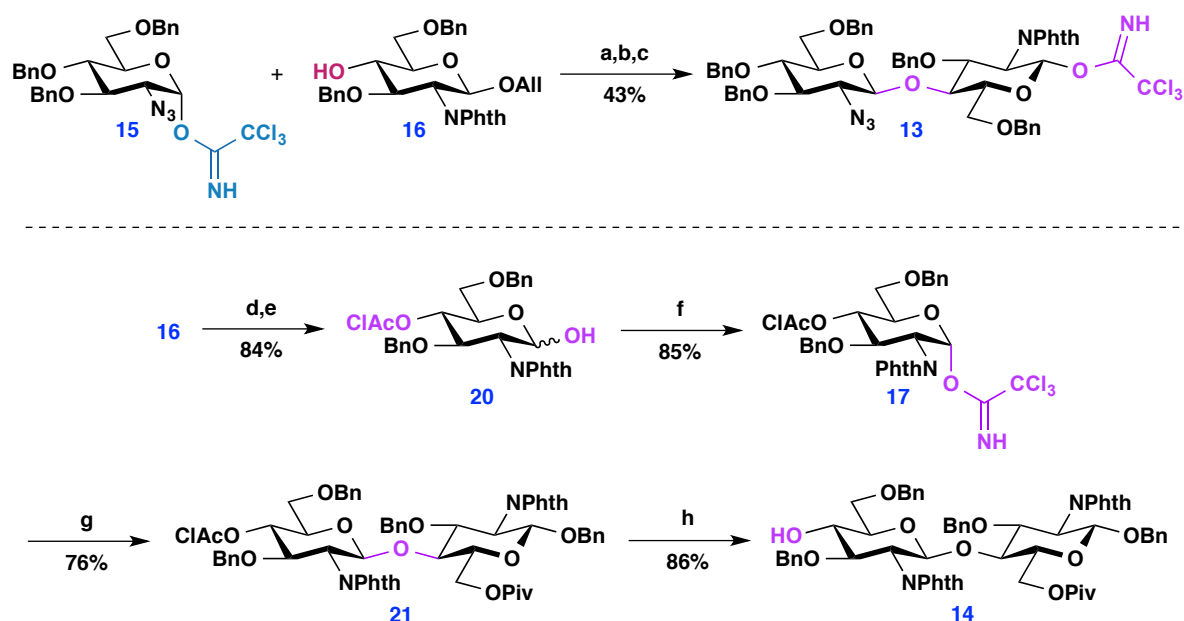


Schéma 12

Les deux unités (**15**) et (**16**) ont été assemblées en s'appuyant sur des conditions de glycosylation classiques, utilisant des donneurs trichloroacétimide, activés par le complexe d'étherate de trifluorure de bore.<sup>76</sup> Le groupement protecteur anomère a été déprotégé *via* la formation d'un complexe  $\pi$ -allylique du palladium et le donneur de glycosyle (**13**) a pu être obtenu après formation d'un nouveau groupement trichloroacétimide, en position anomère. Le monosaccharide (**20**) a été synthétisé à partir de (**16**), après protection de l'hydroxyle libre en position 4 par un chloroacétyle et clivage du groupement allylique anomère. Le donneur trichloroacétimide (**17**), obtenu à partir de cet intermédiaire (**20**), a permis d'effectuer une étape de glycosylation menant à la brique disaccharidique (**21**). La brique disaccharidique (**14**) a finalement

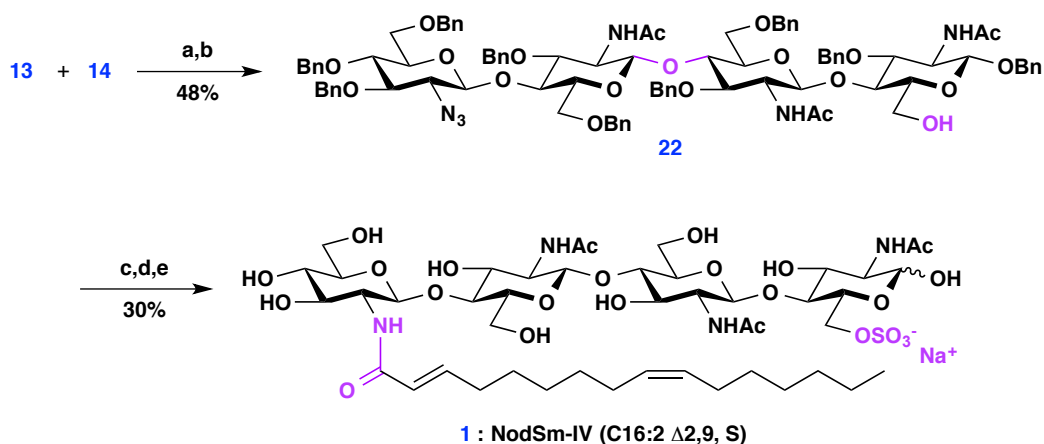
<sup>76</sup> Grundler, G. ; Schmidt, R. R., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 135, 203-218.

pu être obtenue après déprotection sélective de l'hydroxyle chloroacétylé grâce au thiocarbamide (schéma 13).



**Schéma 13 : Réactifs et conditions :** (a) (15) (1,3 éq.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,4 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tamis 4Å,  $-20^\circ\text{C}$ , 2h ; (b)  $\text{PdCl}_2$  (2,5 éq.),  $\text{AcONa}$  (10 éq.),  $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 3h ; (c)  $\text{CCl}_3\text{CN}$  (26 éq.),  $\text{DBU}$  (0,5 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 1h ; (d)  $\text{ClAcCl}$  (3 éq.),  $\text{pyridine}/(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 30 min ; (e)  $\text{PdCl}_2$  (2,5 éq.),  $\text{AcONa}$  (6,0 éq.),  $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 1h ; (f)  $\text{CCl}_3\text{CN}$  (13 éq.),  $\text{DBU}$  (0,5 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 2h ; (g) (18) (1,0 éq.), (17) (1,2 éq.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,5 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tamis 4Å,  $-15^\circ\text{C}$ , 2,5h ; (h) thiocarbamide (25 éq.),  $\text{pyridine}/\text{EtOH}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 90 min

Une fois les deux disaccharides (**13**) et (**14**) assemblés, avec une  $\beta$ -stéréosélectivité assurée par l'encombrement du groupement phthalimido, les amines phthaloylées ont été déprotégées, puis réacétylées, et l'ester de pivaloyle a été saponifié. Le tétrasaccharide (**22**) a été fonctionnalisé en commençant par une sulfatation de l'hydroxyle libre, suivie d'une hydrogénéolyse permettant la réduction de l'azoture et le clivage de l'ensemble des benzyles, pour finalement introduire la chaîne carbonée (**19**) sur l'amine libre dans une dernière étape (schéma 14).



**Schéma 14 : Réactifs et conditions :** (a) **(13)** (1,1 éq.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,4 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , tamis 4Å,  $-15^\circ\text{C}$ , 3h ; (b)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (excès),  $\text{EtOH}$ , reflux, 16h puis  $\text{Ac}_2\text{O}$  (excès), pyridine, t.a., 6h puis  $\text{KOH}$  (excès),  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{THF}$ , t.a., 5h ; (c)  $\text{SO}_3$ , pyridine (8 éq.),  $\text{DMF}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 6h puis  $\text{Dowex}^\circ \text{Na}^+$  ; (d)  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{H}_2$  atm,  $\text{EtOH/THF/H}_2\text{O}$ , t.a., 24h ; (e) **(19)** (10 éq.),  $\text{NEt}_3$  (cat.),  $\text{EtOH}$ ,  $45^\circ\text{C}$ , 3 jours

La stratégie de synthèse convergente a finalement permis à Hui d'obtenir un rendement d'environ 6% pour le NodSm-IV (**1**), sans inclure la synthèse des briques précurseurs monosaccharidiques (**15**), (**16**) et (**18**) et en considérant les rendements des briques disaccharidiques (**13**) et (**14**) identiques (environ 45%). Les rendements des trois étapes de glycosylation étaient très satisfaisants, notamment pour la formation de la structure tétrasaccharidique, et montraient une bonne efficacité de la méthode utilisant le groupement activable trichloroacétimide.

#### • Synthèse de Beau

En 1994, le groupe de Beau a publié une synthèse du facteur Nod (**1**), par une stratégie non conventionnelle, en allongeant la chaîne oligosaccharidique à partir de l'unité non réductrice.<sup>77</sup> L'assemblage linéaire des monomères a été réalisé en utilisant l'activation de trichloroacétimides de glycosyles. L'amine de l'unité non réductrice a été différenciée avec l'emploi du groupement protecteur stéréodirecteur *N*-benzyloxycarbonyle (Cbz) sur le précurseur (**23**). L'intérêt de cette stratégie est l'utilisation d'une seule et unique brique 1,6-anhydro (**25**) afin d'effectuer l'allongement de la chaîne oligosaccharidique (schéma 15).

<sup>77</sup> Tailler, D. ; Jacquinet, J. C. ; Beau, J. M., *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.*, **1994**, 1827-1828.

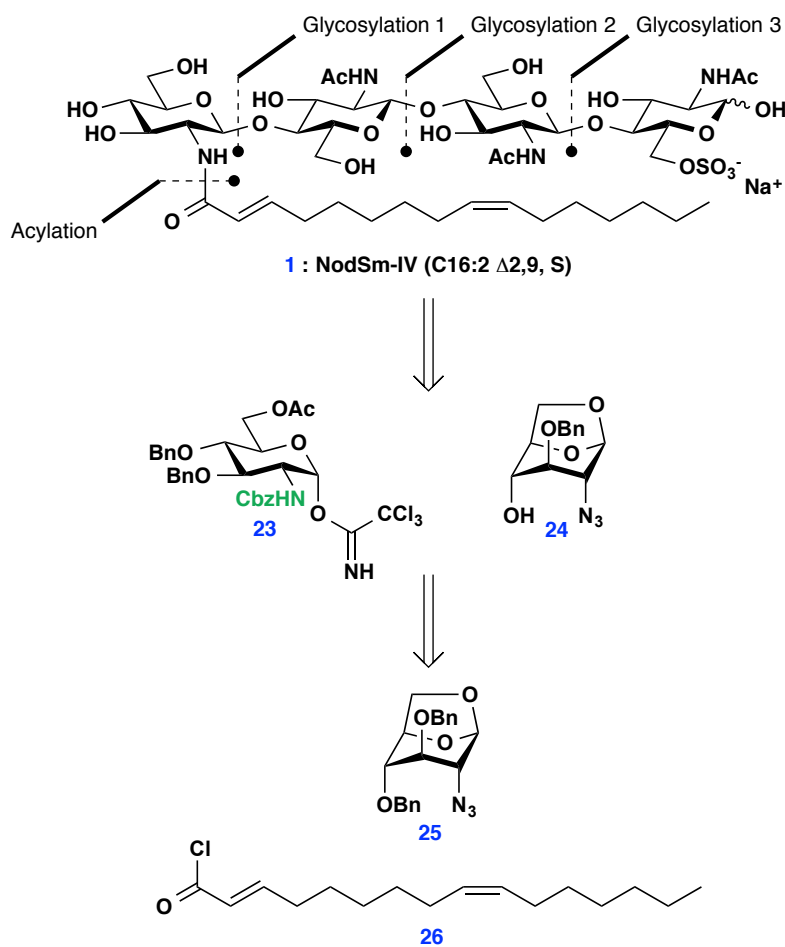


Schéma 15

Le monosaccharide 1,6-anhydro (**25**), obtenu à partir du D-glucal en quatre étapes, a permis de former rapidement et efficacement la brique (**24**), grâce à une déprotection sélective de l'hydroxyle en position 4, et le donneur (**23**), en trois étapes (schéma 16).<sup>78</sup>

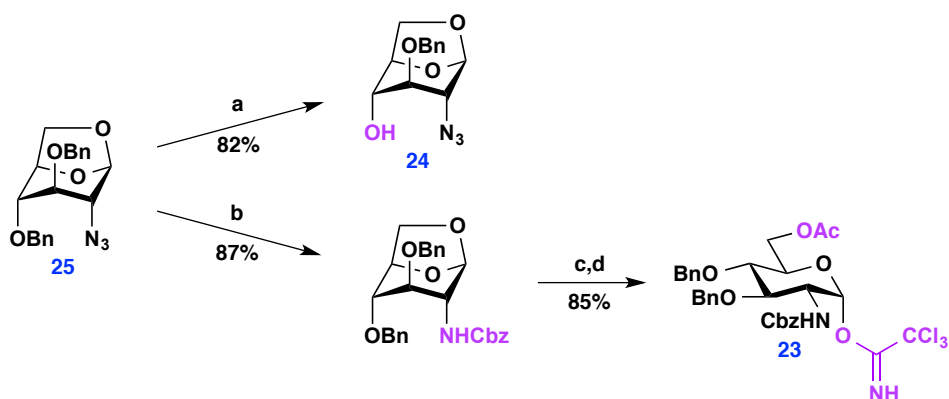
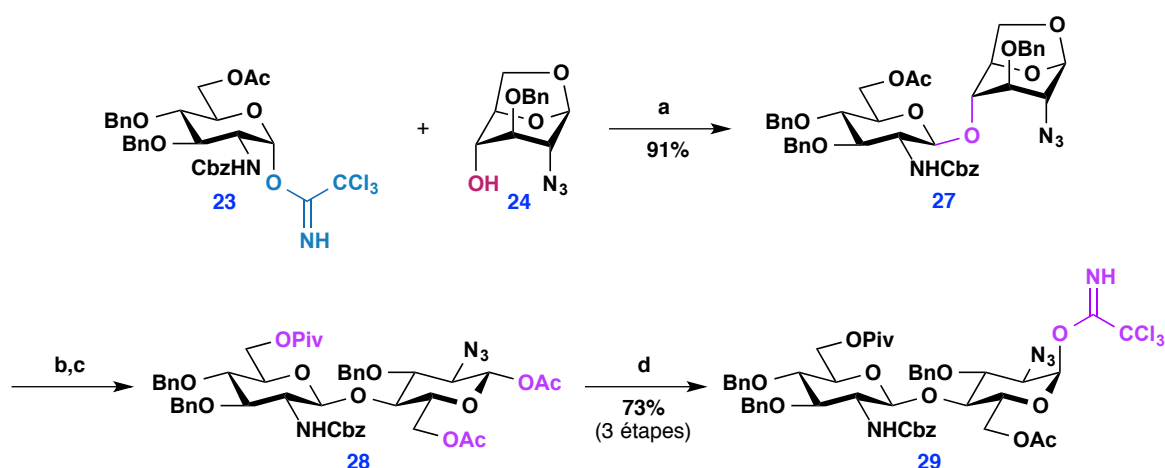


Schéma 16 : Réactifs et conditions : (a)  $\text{TiCl}_4$  (1,1 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 45 min ; (b)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{EtOH}$ , t.a. puis  $\text{CbzCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , t.a. ; (c)  $\text{Ac}_2\text{O/TFA}$  (9:1), t.a., 16h ; (d)  $\text{BnNH}_2$  (10 éq.),  $\text{Et}_2\text{O}$ , t.a. puis  $\text{CCl}_3\text{CN}$ ,  $\text{DBU}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a.

<sup>78</sup> Tailler, D. ; Jacquet, J.-C. ; Noiro, A.-M. ; Beau, J.-M., *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, **1992**, 3163-3164.

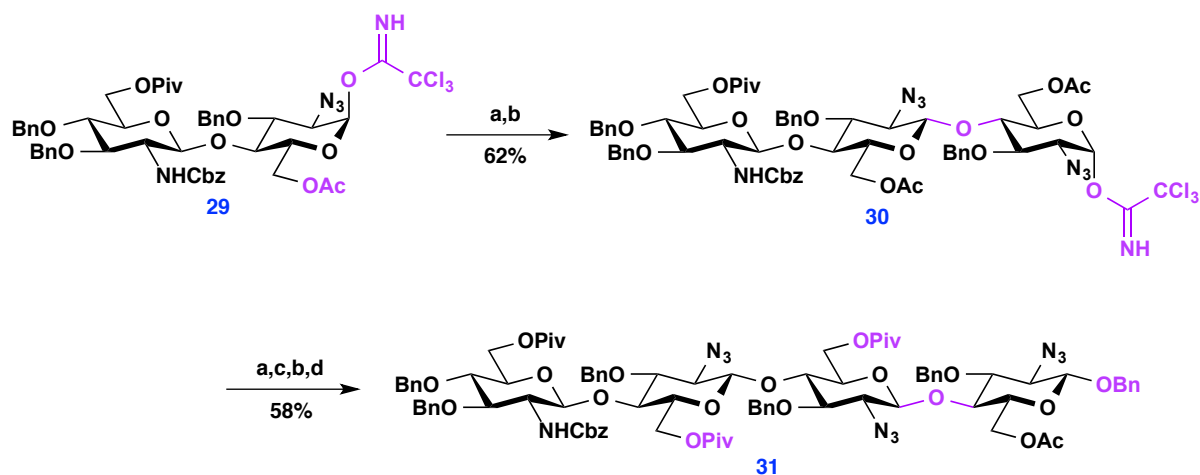


Le monosaccharide (**23**) et une première brique (**24**) ont ensuite été assemblées afin d'obtenir le disaccharide (**27**), dont la stéréosélectivité  $\beta$ -1,4 a été assurée par la participation du groupement carbamate du donneur de glycosyle (**23**). La très bonne efficacité de cette glycosylation s'explique par l'utilisation de accepteur 1,6-anhydro (**24**) permettant d'exalter la nucléophilie de l'hydroxyle en position 4. Suite à la modification du groupement acétate par un pivalate, en position 6 de l'unité non réductrice, le motif 1,6-anhydro a été ouvert par acétolyse. L'acétate anomère du disaccharide (**28**) ainsi obtenu a subi une aminolyse douce, suivie de la formation du trichloroacétimidate (**29**) (schéma 17).



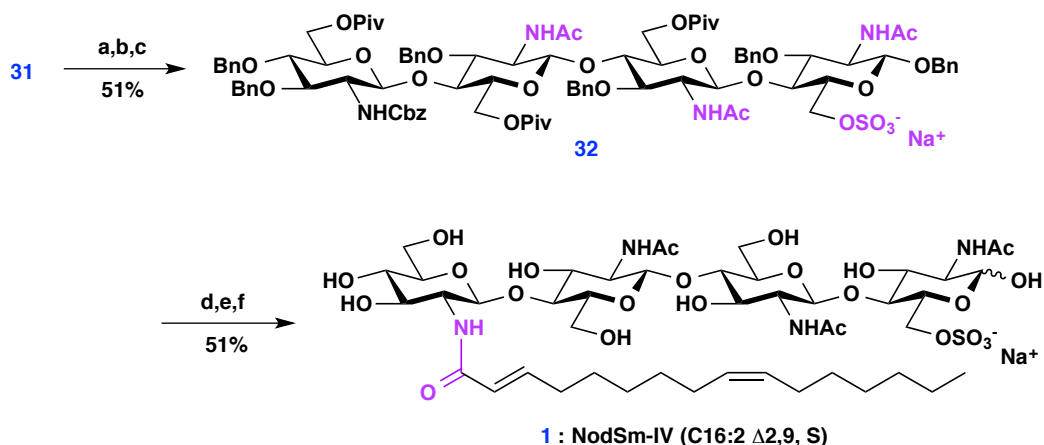
**Schéma 17** : Réactifs et conditions : (a) (**24**) (1,4 éq.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,1 éq.), toluène,  $-78^\circ\text{C}$  à  $-20^\circ\text{C}$ , 20 min ; (b)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , MeOH, t.a. puis PivCl, DMAP, pyridine, t.a. ; (c)  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{TFA}$  (9:1), t.a. ; (d)  $\text{BnNH}_2$  (10 éq.),  $\text{Et}_2\text{O}$ , t.a. puis  $\text{CCl}_3\text{CN}$ , DBU,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 1h

Une autre particularité de cette brique 1,6-anhydro (**24**) est qu'elle présente un groupement azoture en position 2, non stéréodirecteur dans les réactions de glycosylation. La stéréosélectivité  $\beta$  de la liaison glycosidique, formée à partir du donneur (**29**) et de l'accepteur (**24**), a été obtenue grâce à un choix adapté des conditions réactionnelles. En effet, à basse température, l'attaque de l'accepteur (**24**) procède *via* un mécanisme de type  $\text{S}_{\text{N}}2$  avec une inversion totale de la configuration du centre anomère, de configuration  $\alpha$  sur le substrat (**29**). Le trisaccharide alors obtenu a été soumis à la même séquence que celle appliquée sur le composé (**27**) ce qui a permis l'obtention d'un nouveau donneur de glycosyle (**30**). L'ensemble de cette séquence a été reproduite une troisième fois, en incluant le changement des acétates par des pivalates avant l'acétolyse du motif 1,6-anhydro. La glycosylation de l'alcool benzylique a permis d'obtenir le tétrasaccharide (**31**), judicieusement protégé (schéma 18).



**Schéma 18 : Réactifs et conditions :** (a) **(24)** (2,0 éq.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,1 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$  à  $-20^\circ\text{C}$ ; (b)  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{TFA}$  (9:1), t.a. puis  $\text{BnNH}_2$  (10 éq.),  $\text{Et}_2\text{O}$ , t.a. puis  $\text{CCl}_3\text{CN}$ , DBU,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 1h; (c)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , MeOH, t.a. puis PivCl, DMAP, pyridine, t.a.; (d)  $\text{BnOH}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,3 éq.), toluène,  $-78^\circ\text{C}$  à  $-20^\circ\text{C}$

La réduction sélective des azotures du tétrasaccharide (**31**), suivie de l'acétylation des amines libérées, a pu être effectuée. Les conditions de réduction mises en œuvre étaient importantes car elles permettaient de réduire les azotures sans toucher aux autres protections, également sensibles à la réduction. Le clivage de l'acétate sur l'unité réductrice, qui a été réalisé sans toucher aux pivalates grâce au méthanolate de sodium en conditions diluées, a permis d'introduire sélectivement le groupement sulfate. L'intermédiaire (**32**) ainsi obtenu a été déprotégé par méthanolyse (conditions concentrées) et hydrogénolyse. La chaîne carbonée a été couplée à l'amine libre pour obtenir le facteur NodSm-IV (**1**) (schéma 19).



**Schéma 19 : Réactifs et conditions :** (a)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NiCl}_2$ , DME/EtOH, t.a. puis  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyridine, t.a.; (b)  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (2 mM),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a.; (c)  $\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$ , DMF, 16h,  $50^\circ\text{C}$  puis Sephadex SP-C25 ( $\text{Na}^+$ ); (d)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a.; (e) Pd/C,  $\text{H}_2$  atm,  $\text{AcOEt}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 16h; (f) **(26)** (6 éq.),  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{AcOEt}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 2 jours

Le facteur NodSm-IV (C16:2, S) (**1**) a été synthétisé avec un bon rendement global de 6,2% à partir des briques monosaccharidiques (**23**) et (**24**). La réussite de cette synthèse repose sur

l'utilisation de la brique 1,6-anhydro (**24**) qui a permis d'une part des glycosylations efficaces et d'autre part la répétition de la séquence réactionnelle d'allongement de la chaîne oligosaccharidique, qui s'apparente à une stratégie de synthèse peptidique.

- *Synthèse de Fraser-Reid*

En 1997, Le groupe de Fraser-Reid s'est intéressé à la synthèse d'un autre facteur Nod (**33**), NodSf-III (C18:1, MeFuc),<sup>79</sup> découvert chez *Sinorhizobium fredii*, capable d'induire la formation de nodules sur les racines de pousses de soja.<sup>80</sup> Ce LCO naturel n'est constitué que de 3 unités *N*-acétyl-D-glucosamine mais comporte un 2-*O*-méthyl-L- $\alpha$ -fucosyle sur la position 6 de l'unité réductrice. La stratégie employée est une synthèse par blocs comme celle de Hui. Les auteurs ont utilisé une nouvelle méthode de glycosylation, développée par leur groupe, qui consiste à activer des donneurs glycosides de *n*-pentényles.<sup>81</sup> Il est à noter qu'un groupement tétrachlorophthaloyle (TCP), pouvant être clivé sélectivement sans toucher aux autres phthaloyles simples, a été utilisé afin de différencier l'amine de l'unité non réductrice (schéma 20).

---

<sup>79</sup> Debenham, J. S. ; Rodebaugh, R. ; Fraser-Reid, B., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4591-4600

<sup>80</sup> Scholla, M. H. ; Elkan, G. H., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1984**, 484-486.

<sup>81</sup> Fraser-Reid, B. ; Udogong, U. E. ; Wu, Z. ; Ottoson, H. ; Merrit, J. R. ; Srinivas Rao, C. ; Roberts, C. ; Madsen, R., *Synlett*, **1992**, 927-942.

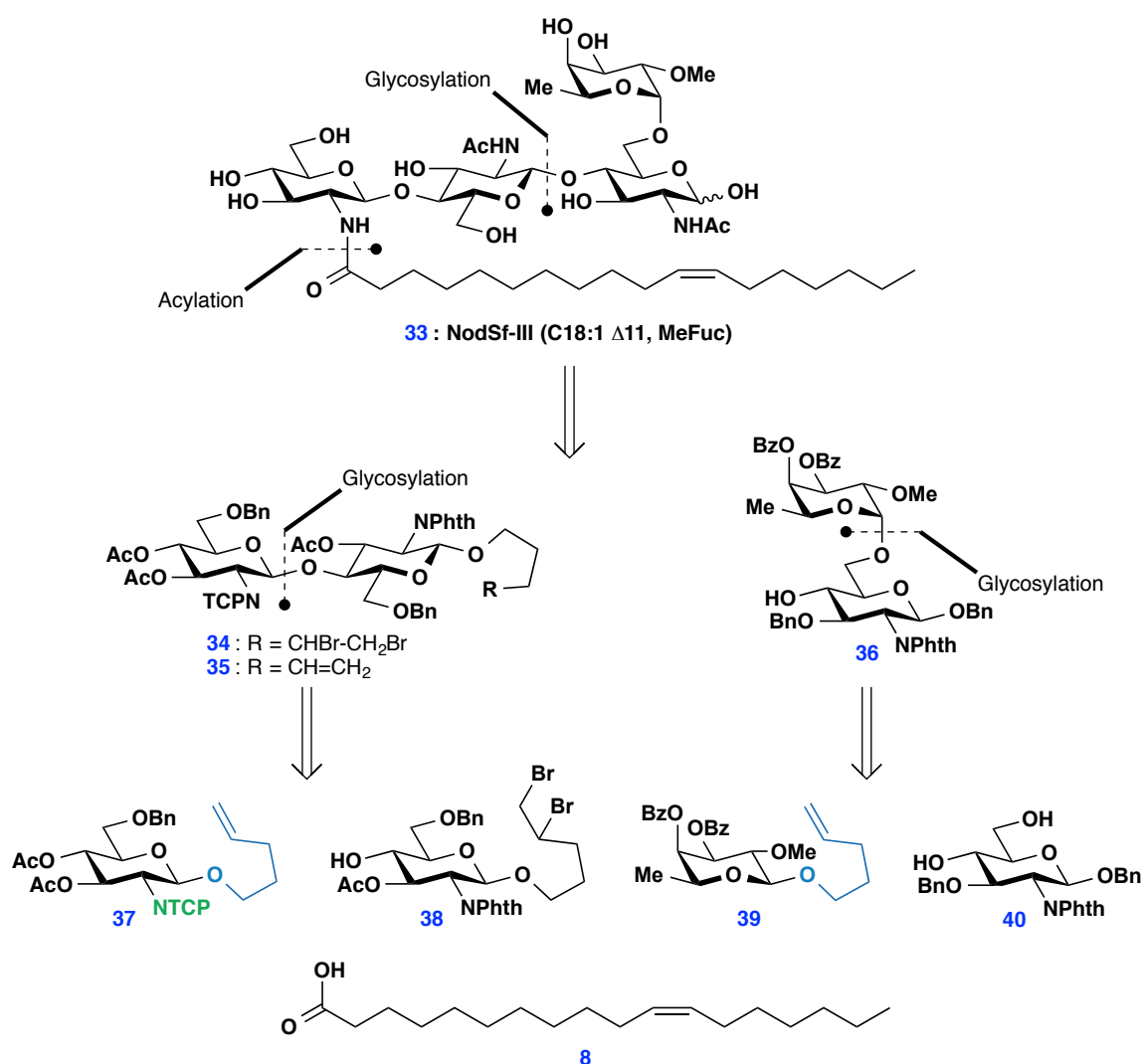
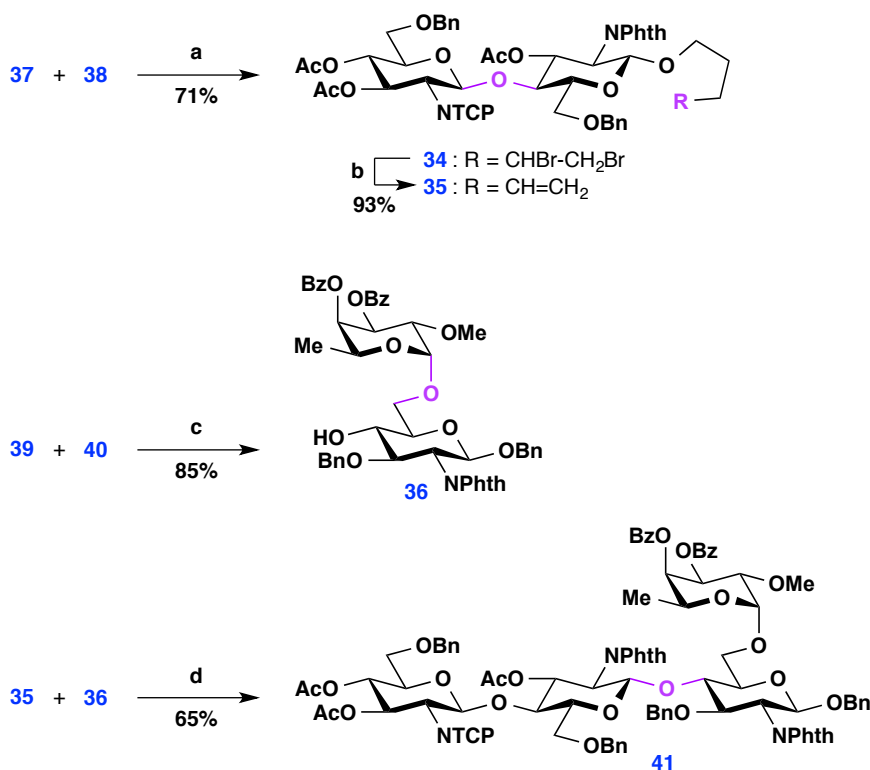


Schéma 20

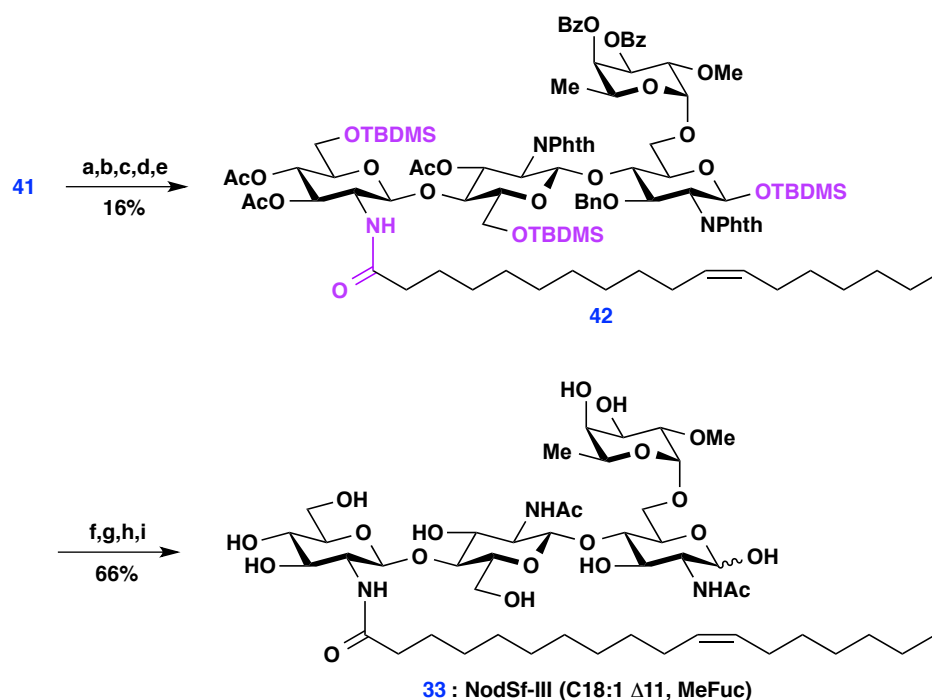
Les disaccharides (**34**) et (**36**) ont été obtenus avec de bons rendements grâce à l'activation des groupements *n*-pentényl avec un mélange de *N*-iodosuccinimide/triflate de triéthylsilyle (NIS/TESOTf). La stéréosélectivité  $\beta$ -1,4, obtenue pour le disaccharide (**34**), a été classiquement dirigée par des groupements phthalimido, mais la stéréosélectivité  $\alpha$ -1,6, dans le cas du disaccharide (**36**), proviendrait d'un effet du solvant et des groupements benzoates. La régiosélectivité observée a été possible avec l'utilisation d'une quantité stoechiométrique de donneur fucosyle (**39**). En effet, l'hydroxyle en position 6 étant meilleur accepteur de glycosyle, celui-ci a pu être glycosylé sélectivement face à l'hydroxyle en position 4. Le tétrasaccharide (**41**) a ainsi pu être obtenu par activation du *n*-pentényl (**35**), suite à la reformation de l'alcène (schéma 21).



**Schéma 21** : Réactifs et conditions : **(a)** (38) (1,3 éq.), NIS (1,8 éq.), TESOTf (0,5 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20 °C, 15 min ; **(b)** NaI (15 éq.), méthyléthylcétone, 80°C, 13h ; **(c)** NIS (1,5 éq.), TESOTf (0,3 éq.), Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 25 min ; **(d)** (35) (1,3 éq.), NIS (1,3 éq.), TESOTf (0,35 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 20 min

Les groupements benzyles, présents sur le tétrasaccharide (**41**), ont été déprotégés par le chlorure de fer(III) avant l'introduction de la chaîne carbonée. Afin d'éviter des réactions de dégradation, le centre anomère a dû être protégé par un groupement silylé, introduit en conditions non basiques. Par conséquent, les hydroxyles libérés lors de la débenzylation ont également été silylés. Le groupement TCP a été déprotégé sélectivement par un faible excès d'éthylènediamine, puis la fonction amine libre a été couplée avec l'acide gras (**8**), avec un faible rendement, dans les mêmes conditions que celles mises en œuvre par Nicolaou. Le mélange réactionnel a été per-*O*-acétylé afin de faciliter la purification du tétrasaccharide (**42**). Les esters et les phthalimido ont pu être clivés et les groupements acétamido ont été formés par une per-acétylation. Après méthanolyse des *O*-acétyles, le facteur Nod (**33**) a pu être obtenu par désilylation en présence d'une solution de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) tamponnée par de l'acide acétique, évitant toute réaction parasite du centre anomère en milieu basique (schéma 22).<sup>82</sup>

<sup>82</sup> Lobry de Bruyn, C. A. ; Alberda van Ekenstein, W., *Ber.*, **1895**, 28, 3078-3082



**Schéma 22 : Réactifs et conditions :** (a)  $\text{FeCl}_3$  (16 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 80 min ; (b) TBDMS-Cl (15 éq.), imidazole (11 éq.), DMF,  $0^\circ\text{C}$  à t.a., 12h ; (c)  $\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$  (2,1 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{THF}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 10h ; (d) (8) (5 éq.), iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium (5 éq.),  $\text{NEt}_3$  (10 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $40^\circ\text{C}$ , 2,5h ; (e)  $\text{Ac}_2\text{O}$  (25 éq.),  $\text{NEt}_3$  (3 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 12h ; (f)  $\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$  (500 éq.),  $\text{EtOH}/\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $90^\circ\text{C}$ , 34h ; (g)  $\text{Ac}_2\text{O}$  (25 éq.),  $\text{NEt}_3$  (25 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 45 min ; (h)  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (34 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 2h ; (i) TBAF (110 éq.),  $\text{AcOH}$  (excès),  $\text{THF}/\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $0^\circ\text{C}$  à t.a., 6h

Les changements de stratégie en cours de synthèse, effectués par Fraser-Reid, illustrent parfaitement l'importance de l'introduction de la chaîne carbonée lors de la dernière étape de la synthèse d'un LCO. D'une part, les groupements benzyles, classiques en glycochimie, ont dû être déprotégés avant l'introduction de la chaîne carbonée, car l'insaturation présente était sensible à leurs conditions de déprotection. De plus, l'acylation de cette chaîne a entraîné des problèmes de purification pour les étapes suivantes, d'où la réacétylation des hydroxyles, non prévue initialement, qui a dû être réalisée afin de purifier le LCO protégé (**42**). Un autre problème de cette stratégie semble donc être l'utilisation du groupement tétrachlorophthaloyle qui peut être clivé sélectivement sans toucher aux autres phthaloyles mais dont l'inverse n'est pas possible. L'introduction de la chaîne ne pouvait donc pas se faire en dernière étape, puisque le remplacement des phthalimido par des acétamido était impossible avant d'avoir remplacé le groupement TCP de l'amine terminale par la chaîne carbonée.

## 2) Evolutions des techniques et recherche de procédés efficaces

- *Synthèse par voie biotechnologique*

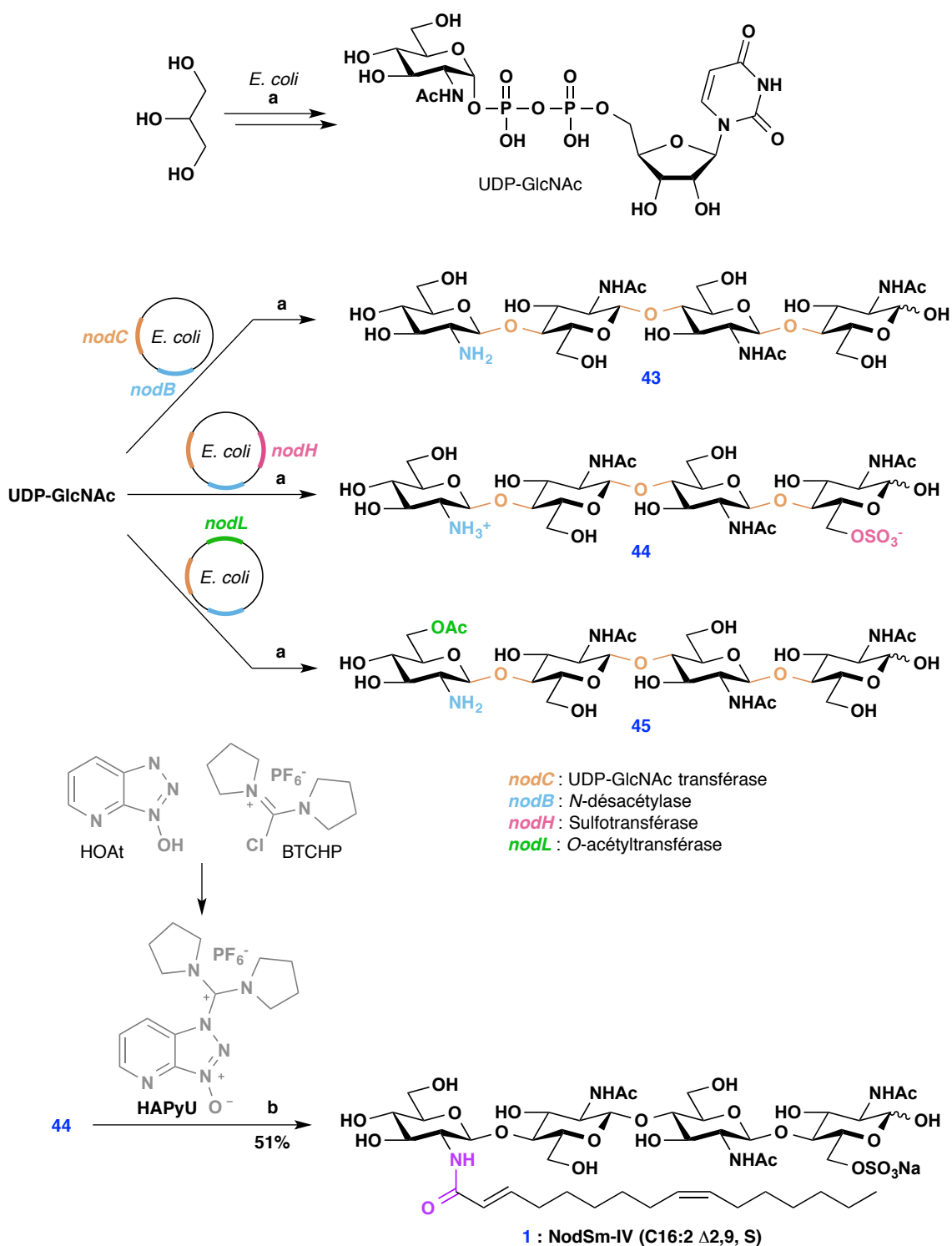
Comme vu dans les exemples précédents, la synthèse chimique des LCOs est longue car la diversité moléculaire souhaitée nécessite l'utilisation d'un nombre important de protections et les étapes sont parfois peu efficaces, avec des produits difficiles à manipuler et à purifier. Les *Rhizobia* sont pourtant capables de réaliser la synthèse de ces LCOs, de manière très efficace, grâce aux différentes enzymes qu'elles produisent, à partir de leurs gènes *nod*. Avec les nombreuses avancées dans le domaine des biotechnologies, l'intérêt s'est porté sur l'utilisation de ces gènes *nod*. En les intégrant dans un plasmide recombinant, les LCOs pourraient être produits par des cultures bactériennes à haute densité cellulaires, telle que des cultures d'*Escherichia coli*. L'équipe de Samain et Driguez a donc mis au point la construction de ce plasmide recombinant en incluant différents gènes *nod*. Celui-ci a ensuite pu être introduit au sein de souches bactériennes de *E. coli*.<sup>83</sup> L'arsenal enzymatique des souches de *E. coli* a permis dans un premier temps la synthèse d'un nucléotide-ose, l'uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), à partir de glycérol comme source carbonée. L'enzyme UDP-GlcNAc transférase (*nodC*) a pu utiliser ce substrat afin de former l'oligosaccharide, structure de base des LCOs. La fonction amine de l'unité non réductrice a ensuite été désacétylée sélectivement (*nodB*). Après extraction et purification des COs obtenus, plusieurs chaînes carbonées ont pu être couplées à l'anneau libre, afin d'obtenir différents facteurs Nod, grâce à l'utilisation du réactif de couplage peptidique HAPyU (formé in situ avec HOAt et BTCHP) (schéma 23).<sup>84</sup>

Afin d'obtenir une plus grande diversité moléculaire, d'autres plasmides ont été construits en introduisant plus de gènes *nod*. Samain et Driguez ont ainsi réussi à biosynthétiser des COs sulfatés en position 6 de l'unité réductrice (*nodH*) et/ou acétylés en position 6 de l'unité non réductrice, permettant ainsi la synthèse de LCOs naturels plus variés après couplage de la chaîne carbonée (schéma 23).<sup>85</sup> Cette stratégie a par exemple permis d'obtenir le facteur NodSm-IV (C16:2, S) (1).

<sup>83</sup> Samain, E. ; Drouillard, S. ; Heyraud, A. ; Driguez, H. ; Geremia, R. A., *Carbohydr. Res.*, **1997**, 302, 35-42.

<sup>84</sup> Rasmussen, M. O. ; Hogg, B. ; Bono, J.-J. ; Samain, E. ; Driguez, H., *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1908-1910.

<sup>85</sup> Samain, E. ; Chazalet, V. ; Geremia, R. A., *J. Biotechnol.*, **1999**, 72, 33-47.



**Schéma 23** : Réactifs et conditions : (a) glycérol (9 mL/h),  $\text{O}_2$  (20%), milieu LB, pH = 6,8, 34°C ; (b) HOAt (3 équ.), BTCHP (2 équ.),  $\text{NEt}(i\text{Pr})_2$  (6 équ.), DMF, t.a., 5 min puis (8) (2 équ.), DMF, t.a., 45 min puis (44) (1 équ.), DMF, t.a., 4,5h

Cette stratégie semble donc très intéressante puisqu'elle a permis d'obtenir des LCOs naturels après une étape de bioconversion et une étape chimique. Dans le cadre de l'approche biotechnologique, il est évident que les temps de synthèse des COs sont beaucoup plus courts et les quantités obtenues sont assez importantes. De plus, la montée en échelle semble a priori plus



simple à mettre en œuvre que la synthèse chimique. Néanmoins, les COs produits par les *E. coli* recombinants peuvent être en mélange avec d'autres dérivés. Ceci pourrait être dû à la production d'oligosaccharides de degré de polymérisation variable et à une efficacité moyenne de *N*-désacétylation, induisant des purifications parfois difficiles, ainsi qu'à la difficulté de séparer les oligosaccharides des autres biomolécules.

- *Synthèse par voie chimioenzymatique*

En 2015, le groupe de Fort a mis au point une synthèse de différents LCOs naturels, notamment Myc-LCO-V (C16:0) **(46)**, par voie chimioenzymatique.<sup>86</sup> La stratégie biotechnologique, précédemment explicitée, permettait des synthèses rapides mais la purification des mélanges de COs pouvait s'avérer difficile. L'idée a donc été d'utiliser une stratégie similaire mais en partant de fragments de chitine commerciaux, comme **(47)**, et en utilisant des enzymes efficaces afin d'obtenir rapidement des COs, tout en évitant l'obtention de mélanges complexes et ainsi des purifications difficiles. L'amine libre de l'unité non réductrice a ensuite pu être acétylée pour obtenir des facteurs Nod ou Myc. Il est à noter que cette stratégie a nécessité de partir de fragments plus longs d'une unité, qui ont ensuite été raccourcis par une des enzymes utilisées (schéma 24).

Afin de pouvoir récupérer le CO-VI **(47)**, une première étape d'acétylation douce des amines a été effectuée sur un mélange commercial de fragments de chitosan, un polymère de glucosamine partiellement *N*-acétylé. Une chromatographie sur résine échangeuse d'ions a permis de récupérer les COs per-*N*-acétylés en mélange, et une chromatographie d'exclusion stérique a permis d'isoler les CO-IV, CO-V et CO-VI **(47)**.

---

<sup>86</sup> Chambon, R. ; Despras, G. ; Brossay, A. ; Vauzeilles, B. ; Urban, D. ; Beau, J.-M. ; Armand, S. ; Cottaz, S. ; Fort, S., *Green Chem.*, **2015**, 17, 3923-3930.

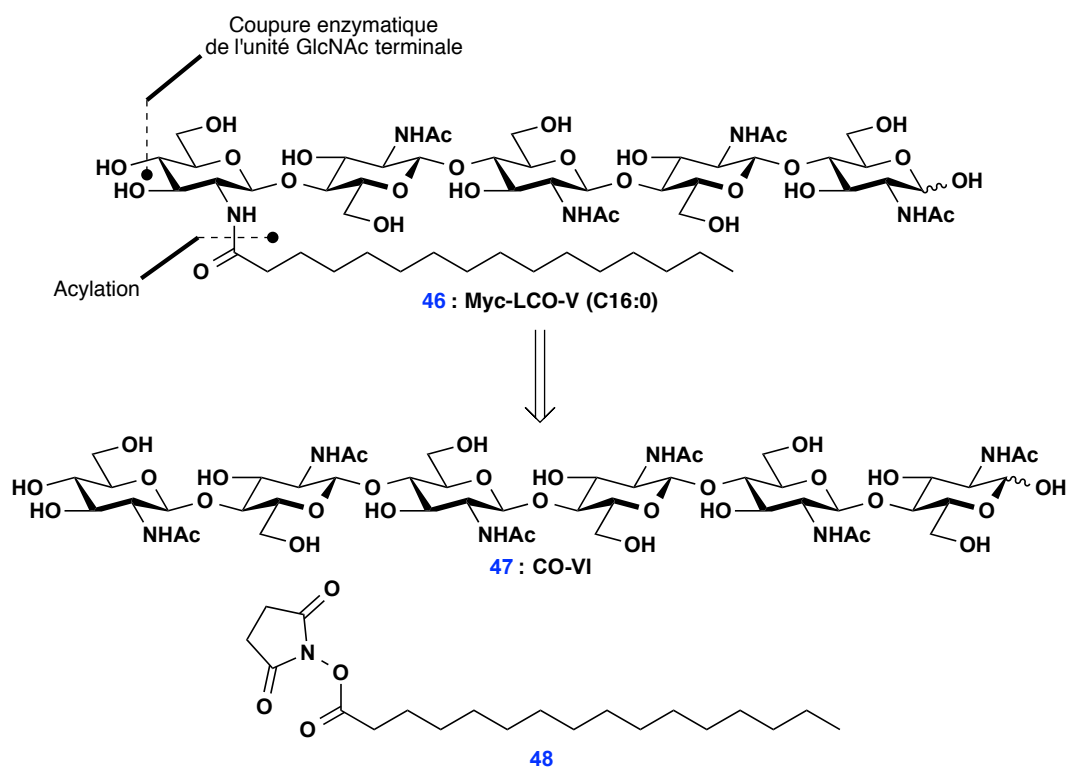
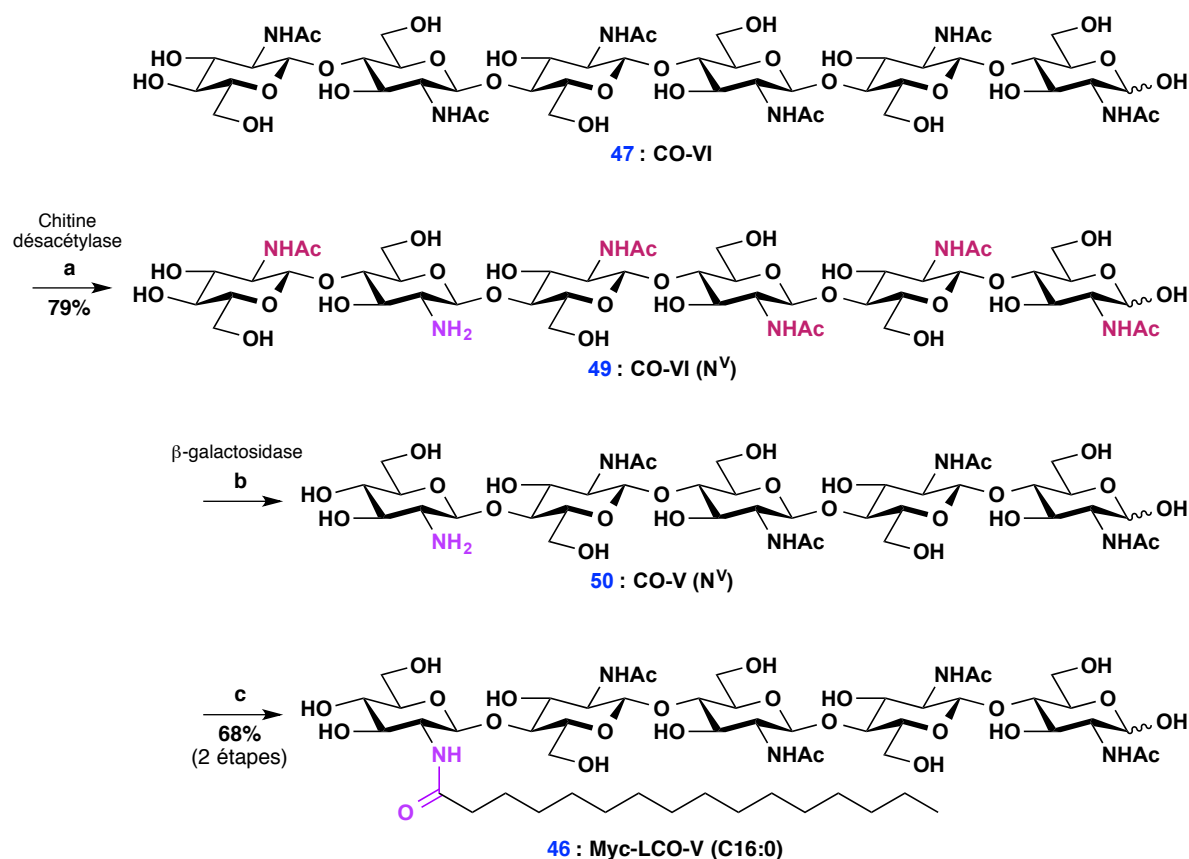


Schéma 24

En parallèle, une enzyme, la chitine désacétylase (CD) isolée chez *Vibrio cholerae*, a été surexprimée chez *Escherichia coli*, à l'aide d'un plasmide recombinant, puis extraite et purifiée. Cette enzyme agit de manière similaire à l'enzyme NodB, vue précédemment, mais désacétyle sélectivement l'avant-dernière unité GlcNAc, du côté non réducteur. Les différents fragments de chitine, notamment CO-VI (**47**) isolé précédemment, ont alors été soumis à une première étape enzymatique, catalysée par *V. cholerae* CD. Les intermédiaires monodésacétylés, comme CO-VI (N<sup>V</sup>) (**49**), ont été engagés dans un second processus enzymatique faisant intervenir la  $\beta$ -galactosidase, isolée chez *Aspergillus oryzae*, qui possède également une activité  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase. Cet exoglycosidase a permis de séparer l'unité non réductrice du reste de la chaîne saccharidique, par hydrolyse. De plus, cette enzyme ne reconnaissant pas le motif glucosamine non acétylé (GlcN), elle ne peut pas couper cette unité du reste de la chaîne. L'utilisation de cette enzyme sur les intermédiaires monodésacétylés a donc permis de libérer uniquement l'unité GlcNAc non réductrice et d'obtenir les différents dérivés comportant une amine libre sur l'unité non réductrice, notamment CO-V (N<sup>V</sup>) (**50**) à partir de (**49**). La chaîne carbonée a finalement pu être introduite efficacement en suivant les conditions du groupe de Beau, à partir d'esters activés de N-hydroxysuccinimide (**48**) (schéma 25).



**Schéma 25** : Réactifs et conditions : **(a)** *V. cholerae* CD, tampon pH 7,9, 37°C, 20h ; **(b)** *A. oryzae* β-galactosidase, water, 37°C, 20h ; **(c)** **(48)** (1,2 éq.), *NEt*<sub>3</sub> (1,6 éq.), DMSO, 60°C, 6 jours

Finalement, cette stratégie chimioenzymatique *in vitro* semble palier aux problèmes de purification de la stratégie de synthèse *in cellulo* et évite l'utilisation de nombreuses protections, nécessaires à la voie chimique classique. De plus, Le groupe de Fort a obtenu de très bons rendements, allant de 54%, pour Myc-LCO-V **(46)**, jusqu'à 91% pour d'autres facteurs symbiotiques. Des recherches plus poussées pourraient permettre d'introduire plus de diversité moléculaire (sulfate, acétyle, méthylfucose...).

#### • Synthèse chimique à partir de fragments de chitine

En 2014, le groupe de Beau a publié des travaux sur la synthèse chimique de différents LCOs naturels, facteurs de mycorhization, comme Myc-LCO-V (C16:0) **(46)** par exemple.<sup>87</sup> L'intérêt de leur stratégie a été de limiter le nombre d'étapes de glycosylation, parfois peu efficaces, en parvenant à fonctionnaliser des dimères et trimères de glucosamine, obtenus par acétolyse de la chitine (polymère de *N*-acétylglucosamine). Ils ont utilisé une oxazoline trifluorométhylée réactive afin d'effectuer de manière efficace la seule glycosylation de leur stratégie, entre le donneur **(51)** et

<sup>87</sup> Despras, G. ; Alix, A. ; Urban, D. ; Vauzeilles, B. ; Beau, J.-M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 11912-11916.

l'accepteur (**52**). L'azote de l'unité non réductrice a été différencié grâce à l'utilisation d'un groupement *tert*-butoxycarbonyle, afin d'introduire la chaîne carbonée (**48**) en dernière étape (schéma 26).

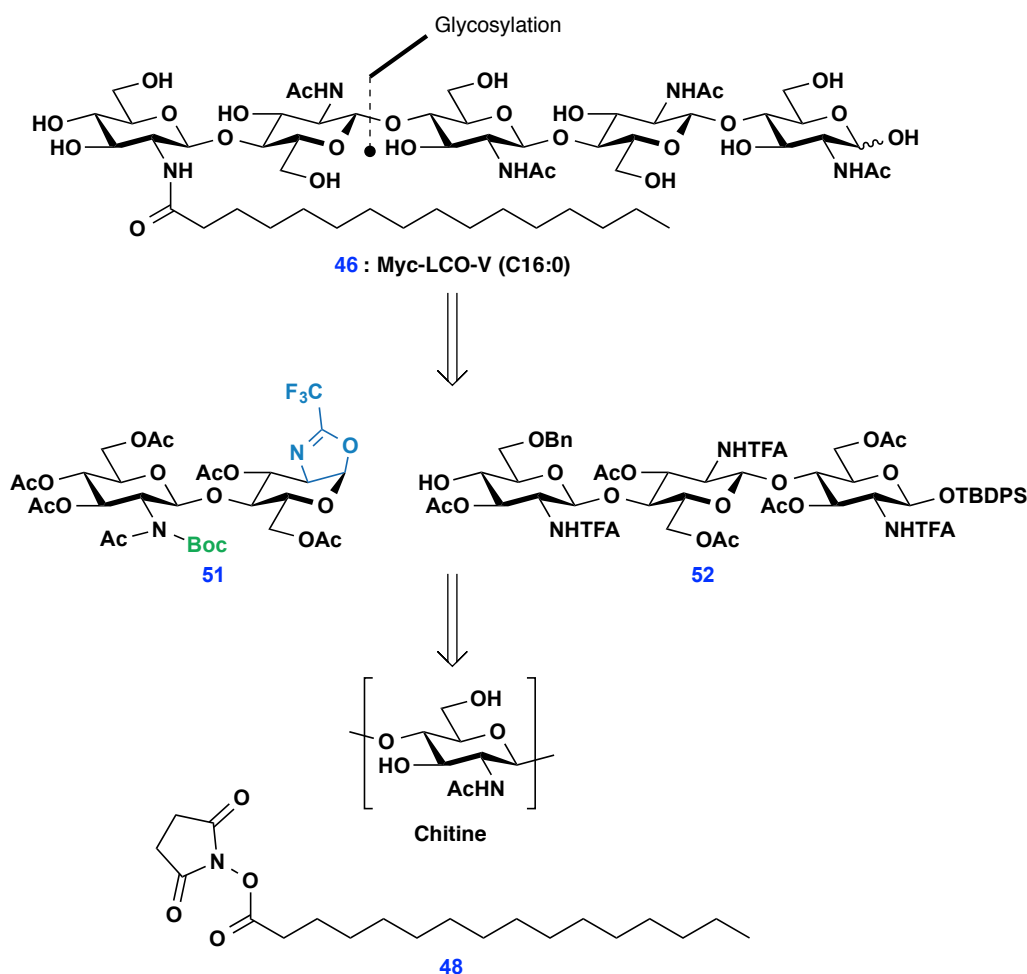
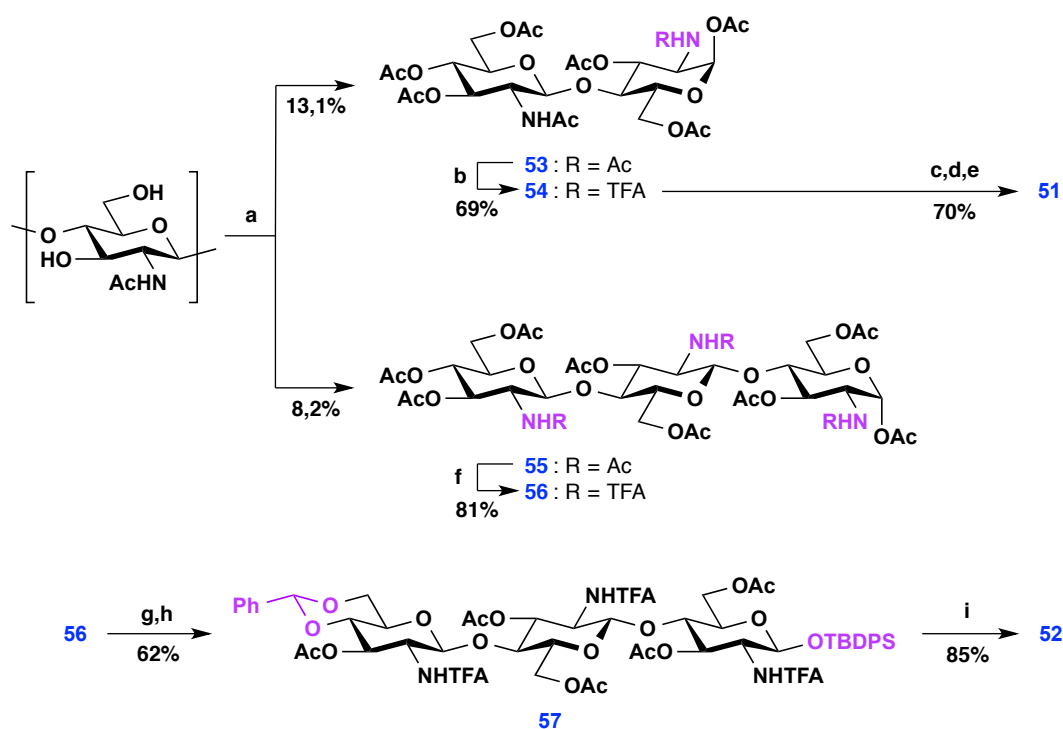


Schéma 26

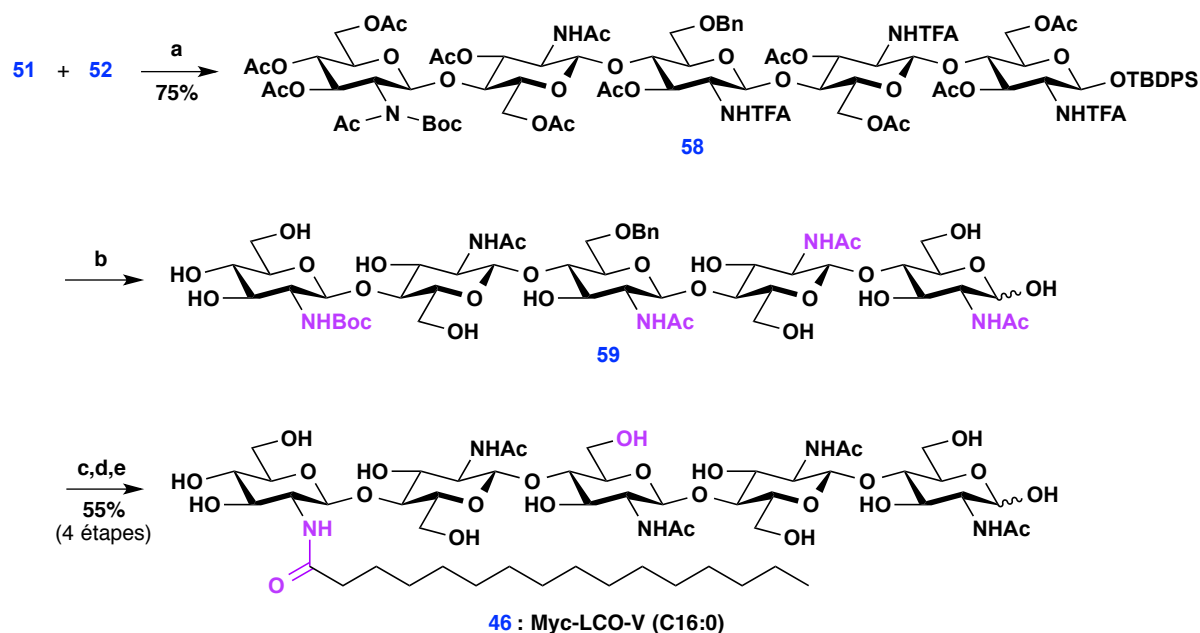
L'acétylolyse de la chitine a été effectuée dans un premier temps afin de récupérer l'octaacétate d' $\alpha$ -chitobiose (**53**) et l' $\alpha$ -chitotriose undécacétate (**55**). A partir de ces deux briques, le groupe de Beau a inséré différentes protections orthogonales à la place des acétyles afin d'obtenir le donneur oxazoline (**51**) et l'accepteur (**52**). Des conditions précises de *trans*-*N*-trifluoroacylation ont permis l'obtention du disaccharide (**54**), différencié au niveau des deux amines. Cette sélectivité sera plus explicitée dans la partie sur les résultats du projet de thèse. D'autres conditions de transacylation ont donné le trisaccharide per-*N*-trifluoroacétylé (**56**), sans différenciation. D'une part, une aminolyse douce de la brique (**55**), clivant sélectivement l'acétate anomère, suivie de la formation de l'oxazoline et l'introduction du groupement *tert*-butoxycarbonyle sur l'amine acétylée, a permis de récupérer le donneur de glycosyle (**51**). D'autre part, la brique (**56**) a également été soumise à une aminolyse douce suivie de la silylation de l'hydroxyle anomère libéré. Après

méthanolyse des acétates, un benzylidène a été introduit sélectivement afin de protéger les positions 4 et 6 de l'unité non réductrice. Les hydroxyles libres ont été réacétylés afin de former l'intermédiaire (**57**). Il est à noter que les trifluoroacétamido n'ont pas été clivés lors de la méthanolyse. L'accepteur de glycosyle (**52**) a finalement été obtenu grâce à des conditions particulières d'ouverture réductrice du benzylidène, libérant ainsi l'hydroxyle en position 4 tout en conservant la protection benzylée sur l'hydroxyle en position 6 (schéma 27).



**Schéma 27 : Réactifs et conditions :** (a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 3h à 55°C, 16h à t.a., 1h à 55°C; (b) TFAA (7 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 135°C, tube scellé, 10 min; (c)  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{AcOH}$  (1,1 éq.), DMF, 55°C, 35 min; (d)  $\text{Ms}_2\text{O}$  (3 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , t.a., 25 min puis  $\text{NEt}_3$  (20 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 90 min; (e)  $\text{Boc}_2\text{O}$  (3,0 éq.), DMAP (0,2 éq.), THF, reflux, 30 min; (f) TFAA (12 éq.), pyridine, 135°C, tube scellé, 20 min; (g)  $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{AcOH}$  (1,1 éq.), DMF, 55°C, 35 min puis  $\text{TBDPS-Cl}$  (2 éq.), imidazole (3 éq.), DMF, t.a., 40h; (h)  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (1,5 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 16h puis  $\text{PhCHO}$  (solvant),  $\text{ZnCl}_2$  (2,5 éq.), t.a., 1h puis  $\text{Ac}_2\text{O}$  (15 éq.), pyridine, t.a. 2 jours; (i)  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (10 éq.), tamis 4Å,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 30 min puis TFA (18 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 min à 0°C, 20°C à t.a.

Après glycosylation de l'accepteur (**52**) avec le donneur oxazoline (**51**), l'ensemble des protections acétyles, trifluoroacétyles et silyle du pentasaccharide (**58**) obtenu a été clivé. Une acétylation sélective a permis de réacétyler les amines libres pour donner l'intermédiaire (**59**). Le *tert*-butoxycarbonyle, permettant la différenciation de l'amine de l'unité non réductrice, a été retiré en conditions acides et le benzyle a été soumis à une hydrogénéolyse afin de terminer la déprotection des hydroxyles. L'utilisation d'un faible excès de chaîne carbonée, activée par un ester de *N*-hydroxysuccinimide, a finalement permis d'acyler quantitativement l'amine libre afin de former le facteur Myc-LCO-V (C16:0) (**46**) (schéma 28).



**Schéma 28 : Réactifs et conditions :** (a) (51) (1,3 éq.), tamis 3Å,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/[\text{bmim}][\text{OTf}]$ , t.a., 1h puis  $\text{TMSOTf}$  (0,4 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/[\text{bmim}][\text{OTf}]$ ,  $-35^\circ\text{C}$  à  $4^\circ\text{C}$ , 5h ; (b)  $\text{LiOH}$  (50 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 4h puis  $\text{Ac}_2\text{O}$  (50 éq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (pH 11-12),  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 16h ; (c)  $\text{TFA}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , sonication, 3h ; (d)  $\text{Pd/C}$  (2 éq.),  $\text{H}_2$  atm,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 15h ; (e) (48) (1,2 éq.),  $\text{NEt}_3$  (1,3 éq.),  $\text{DMSO}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 5 jours

La synthèse de LCOs naturels à partir de fragments de chitine semble donc être une stratégie intéressante. Les conditions de glycosylation et d'acylation finales de la chaîne carbonée ont été optimisées et ainsi permis la consommation totale des dérivés saccharidiques en défaut. Le facteur Myc-LCO-V (46) a ainsi été obtenu avec un rendement d'environ 19% à partir des fragments peracétylés (53) et (55) (les rendements des synthèses du donneur (51) et de l'accepteur (52) sont similaires, environ 45%). Différents facteurs Myc ont pu être obtenus par ce procédé efficace. Néanmoins, la diversité moléculaire de ces LCOs naturels est faible. La synthèse de LCOs sulfatés, par exemple, semble difficile à réaliser et demanderait un travail de fonctionnalisation plus important de l'accepteur.

- *Utilisation de liquide ioniques*

La synthèse chimique classique d'oligosaccharides inclut généralement des purifications difficiles, notamment lors des étapes de glycosylation. Le groupe de Beau a effectué la synthèse du CO (43), en utilisant des liquides ioniques afin de s'affranchir de ces purifications.<sup>88</sup> En effet, l'introduction d'une étiquette ionique a permis de modifier les propriétés de solubilité des COs. La chaîne oligosaccharidique en cours d'élongation a ainsi pu être isolée en éliminant les réactifs et substrats n'ayant pas réagi à l'aide de solvants adaptés, par simple extraction liquide/solide. Il est à

<sup>88</sup> Gillard, L. ; Tran, A.-T. ; Boyer, F.-D. ; Beau, J.-M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 1103-1109.

noter que des thioglycosides ont été utilisés comme donneur afin de former des liaisons glycosidiques. Le groupement activable 2-méthyl-5-tert-butylbenzène-thiol (SMbp) a été particulièrement intéressant car il a permis de s'affranchir de l'utilisation de thiols volatils malodorants. La  $\beta$ -stéréosélectivité a été orientée classiquement grâce à l'utilisation des groupements phthalimido (schéma 29).

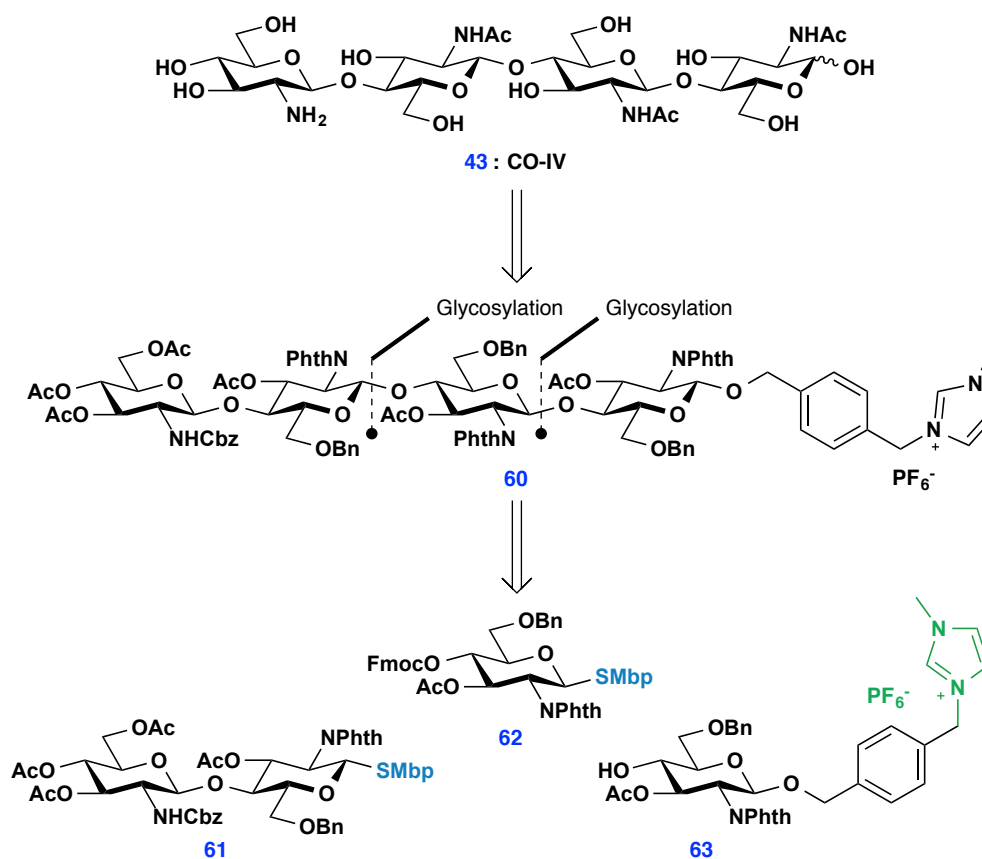
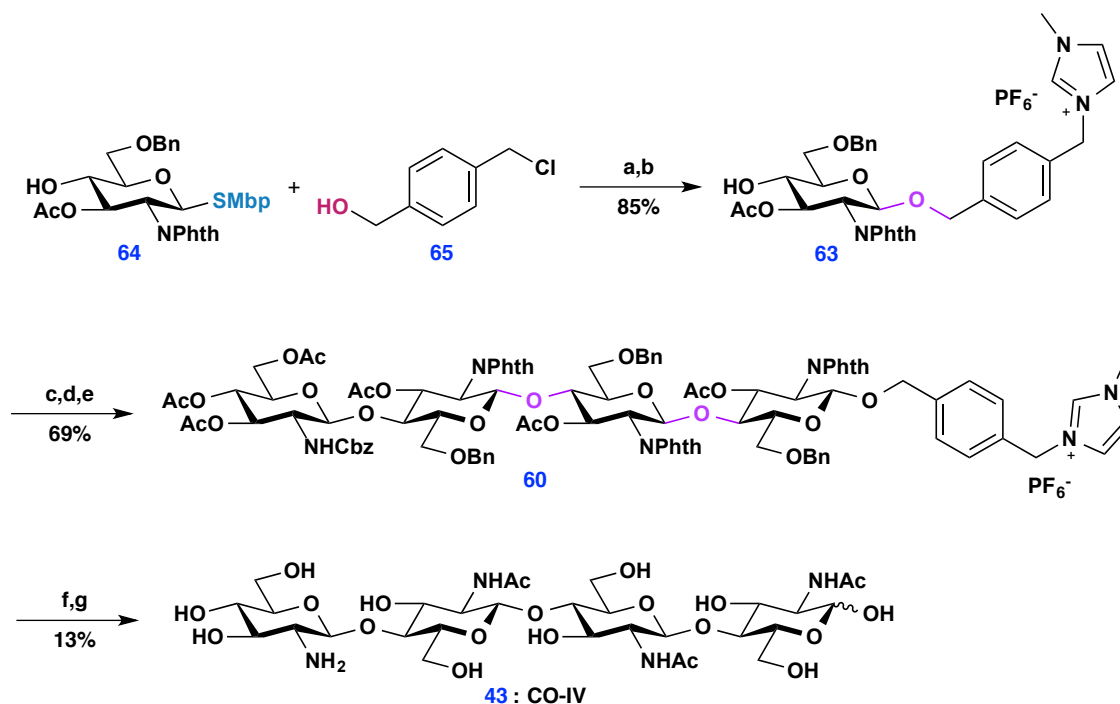


Schéma 29

La brique (63) a été obtenue dans un premier temps par glycosylation de l'alcool *para*-chlorométhylbenzylique (65) avec le thioglycoside (64), suivie d'une substitution du chlorure par le *N*-méthylimidazole. La glycosylation de l'accepteur (63) par le donneur (62), puis la déprotection du groupement fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc) et la dernière glycosylation par le donneur disaccharidique (61), ont conduit à l'obtention efficace de l'intermédiaire (60), sans purifications par chromatographie. Les groupements phthaloyles des amines ont été remplacés par des acétyles ; les benzyles, le benzyloxycarbonyle et l'étiquette ionique ont été clivés par hydrogénolyse ; et les hydroxyles acétylés ont été déprotégés par méthanolyse, afin d'obtenir le CO-IV (43) (schéma 30). L'introduction d'une chaîne carbonée n'a pas été explicitée mais elle a été effectuée dans des travaux antérieurs du laboratoire portant sur la synthèse classique de LCOs, mettant notamment en

avant l'utilisation de diméthylidioxirane afin de réaliser une ouverture oxydante d'un benzylidène pour obtenir un accepteur 4-hydroxyle disaccharidique.<sup>89</sup>



**Schéma 30 : Réactifs et conditions :** (a) (**65**) (1,3 éq.), NIS (1,2 éq.), TfOH (0,2 éq.), tamis 4Å, toluène, t.a., 3h ; (b) N-méthylimidazole (3,6 éq.), CH<sub>3</sub>CN, 85°C, 24h puis KPF<sub>6</sub> (1,1 éq.), CH<sub>3</sub>CN, 85°C, 24h ; (c) (**62**) (3,0 éq.), NIS (6,0 éq.), TfOH (0,6 éq.), tamis 4Å, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 18h ; (d) NEt<sub>3</sub> (excès), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 3h ; (e) (**61**) (3,0 éq.), NIS (6,0 éq.), TfOH (0,6 éq.), tamis 4Å, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 24h ; (f) C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (150 éq.), CH<sub>3</sub>CN/EtOH, 60°C, 12h puis Ac<sub>2</sub>O (excès), pyridine, t.a., 2 jours ; (g) Pd/C (1,5 éq.), Dowex® marathon ammonium formate, 2-propanol/H<sub>2</sub>O, 80°C, m.o., 12h puis CH<sub>3</sub>ONa (2 éq.), CH<sub>3</sub>OH, t.a., 18h

Même si la méthode nécessiterait d'optimiser la partie ionique pour faciliter sa coupure, elle a tout de même permis de réaliser l'ensemble des glycosylations sans effectuer de purification par chromatographie. De plus, un simple lavage permettant la séparation des produits et du substrat, des quantités plus importantes de donneur ont pu être utilisées afin d'obtenir de meilleurs rendements.

<sup>89</sup> Gillard, L. ; Stévenin, A. ; Schmitz-Afonso, I. ; Vauzeilles, B. ; Boyer, F.-D. ; Beau, J.-M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 7382-7390.



## C. Synthèses d'analogues de lipo-chitooligosaccharides

La recherche d'analogues bioactifs de LCOs a également suscité de l'intérêt dans le cas de facteurs symbiotiques complexes ou dans le but de mieux comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu au cours des symbioses, notamment au niveau de l'interaction des LCOs avec leurs récepteurs.

### 1) Synthèse d'un analogue de facteur Nod complexe

Depuis sa découverte, l'espèce bactérienne *Rhizobium* NGR234 a engendré un intérêt particulier car elle est capable d'entrer en symbiose avec plus de cent espèces de légumineuses (haricots, arachides, soja...).<sup>71,90</sup> Ceci s'explique par le fait qu'elle peut synthétiser de nombreux facteurs Nod (schéma 31), chacun spécifique d'une plante différente.

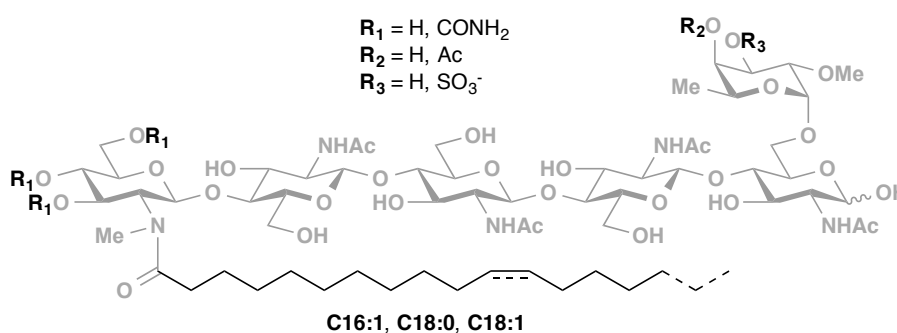


Schéma 31

Si le nombre de structures possibles pour ces facteurs Nod est important, le squelette hexasaccharidique commun reste un vrai défi en synthèse totale. L'équipe de Torgov et Shibaev s'est donc intéressée à la synthèse chimique du LCO (**68**), dérivé du facteur NodNGR234-V (C18:1, NMe, AcMeFuc),<sup>91</sup> produit par *Rhizobium* NGR234. Les auteurs ont décidé de simplifier sa structure en retirant notamment une des unités GlcNAc centrales, permettant de réduire le nombre de glycosylation. La stratégie employée est similaire à celle de Fraser-Reid, sur le facteur NodSf-III (C18:1, MeFuc) (**33**), elle s'appuie sur une synthèse par bloc. L'activation de thioglycosides a été exploitée pour la formation de trois liaisons glycosidiques, dont la stéréosélectivité  $\beta$  a été orientée par des groupements phthalimido (schéma 32).

<sup>90</sup> Price, N. P. J. ; Relić, B. ; Talmont, F. ; Lewin, A. ; Promé, D. ; Pueppke, S. G. ; Maillet, F. ; Dénarié, J. ; Promé, J.-C. ; Broughton, W. J., *Mol. Microbiol.*, **1992**, 6, 3575-3584.

<sup>91</sup> Sedinkin, S. L. ; Zinin, A. I. ; Malysheva, N. N. ; Shashkov, A. S. ; Torgov, V. I. ; Shibaev, V. N., *Mendeleev Commun.*, **2007**, 17, 10-13.

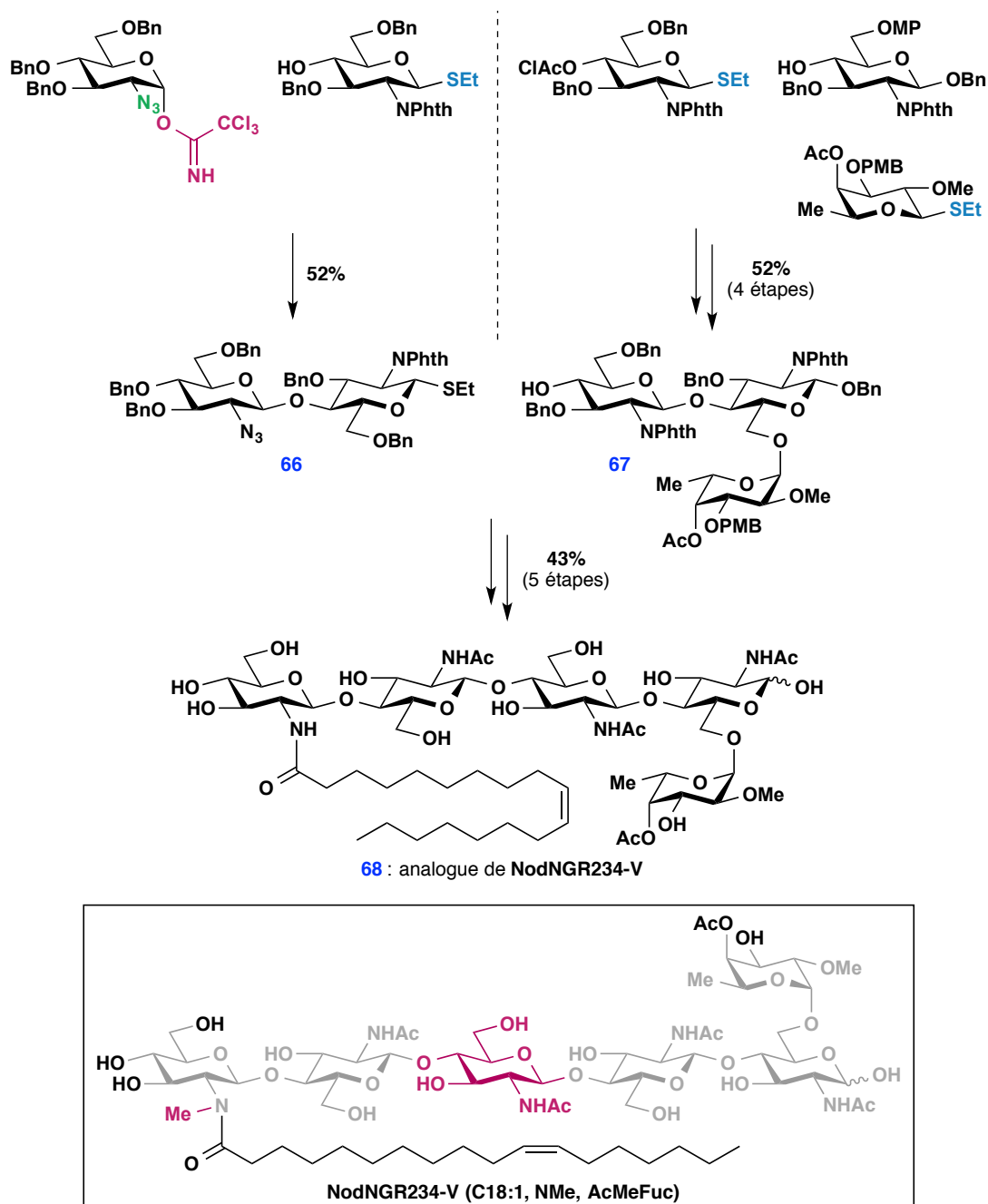


Schéma 32

L'amine de l'unité non réductrice a été différenciée par un groupement azoture, non stéréodirecteur. La liaison glycosidique du disaccharide (**66**) a donc dû être formée dans des conditions réactionnelles favorisant une approche de type  $S_N2$ . Il est à noter que l'intermédiaire (**66**) a été obtenu avec un bon rendement compte tenu du fait que la nucléophilie du soufre peut induire des réactions non désirées entre un accepteur thioglycosidique et un donneur trichloroacétimidate.<sup>92</sup> De l'autre côté, la brique (**67**) a été obtenue en quatre étapes. Les deux

<sup>92</sup> Belot, F. ; Jacquinet, J.-C., *Carbohydr. Res.*, **1996**, 290, 79-86.

briques GlcNAc ont été glycosylées dans un premier temps ; le méthoxyphényle (MP) a alors pu être retiré sélectivement pour introduire le fucosyle grâce à une seconde glycosylation. Après déprotection sélective du chloroacétyle, les deux briques **(66)** et **(67)** ont été assemblées. Différentes étapes de fonctionnalisation ont mené à l'obtention du dérivé **(68)** avec un bon rendement global de 22%, à partir des briques monosaccharidiques. Il est à noter que la réduction sélective de l'azoture, avant l'introduction de la chaîne carbonée, a pu être effectuée de manière quantitative avec l'iodure de samarium(II). Malheureusement, à la suite de cette synthèse, l'équipe de Torgov et Shibaev n'a pas testé l'activité biologique de ce LCO **(68)**, dérivé du NodNGR234-V.

## 2) Lipo-chitooligosaccharides fluorescents

Dans l'optique de localiser les sites de liaisons des facteurs Nod au niveau des racines, le groupe de Gadella et Bisseling s'est intéressé à la synthèse d'analogues fluorescents de facteurs Nod, en introduisant des motifs BODIPY en bout de chaîne carbonée. Les auteurs sont parvenus à obtenir quatre analogues en couplant sur le CO-IV (N<sup>IV</sup>) **(43)** des chaînes BODIPY commerciales, de longueurs et caractéristiques spectrales différentes (schéma 33).<sup>93</sup>

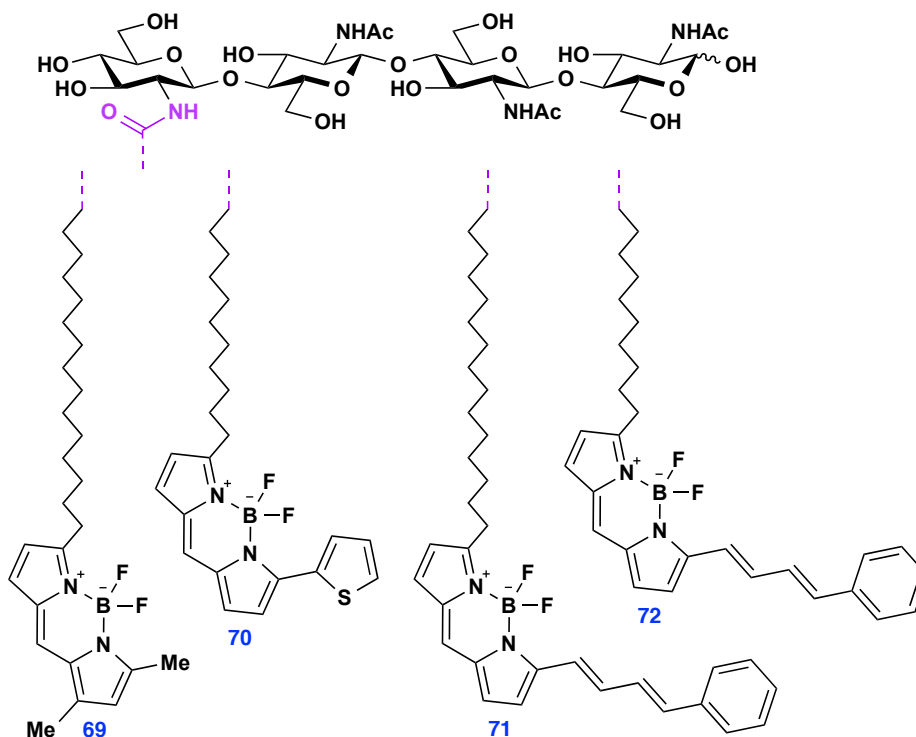


Schéma 33

<sup>93</sup> (a) Gadella, Jr., T. W. J. ; Vereb, Jr., G. ; Hadri, A.-E. ; Röhrig, H. ; Schmidt, J. ; John, M. ; Schell, J. ; Bisseling, T., *Biophys. J.* ; **1997**, 72, 1986-1996. (b) Goedhart, J. ; Röhrig, H. ; Hink, M. A. ; van Høek, A. ; Visser, A. J. W. G. ; Bisseling, T. ; Gadella, Jr., T. W. J., *Biochemistry*, **1999**, 38, 10898-10907.

Dans un premier temps, l'analogue **(69)**, qui a induit une réponse biologique de *Vicia sativa* (test de courbure de poil), a permis de déterminer, par fluorescence, que les LCOs se lient à des récepteurs présents sur les poils absorbants et sur les cellules épidermiques. Gadella et Bisseling sont parvenus à déterminer une concentration plus importante de ces récepteurs sur la pointe des poils. Par la suite, la synthèse des trois autres analogues leur a permis d'effectuer des études de comportement des LCOs vis-à-vis de biomembranes. Ce groupe a également montré que les analogues **(70)** et **(72)**, dont la chaîne carbonée est plus courte, avaient peu d'activité biologique (voire aucune activité dans le cas de l'analogue **(72)**).

Plus récemment, le groupe de Stougaard a réussi à isoler des protéines de reconnaissance des LCOs, NFR1 et NFR5, présentes chez *Lotus japonicus*. Afin de montrer la grande affinité des LCOs pour ces récepteurs, les auteurs ont effectué des tests de liaison grâce à l'obtention d'un analogue du facteur NodMI-V (C18:1, NMe, Fuc), comportant une étiquette fluorescente Alexa<sub>546</sub>. A la différence du groupe de Gadella, cette sonde a été placée sur l'unité réductrice grâce à un lien oxime (schéma 34).<sup>94</sup> Stougaard précise que la forme ouverte et fermée de l'unité réductrice sont en équilibre. La reconnaissance dans le site actif pourrait cependant déplacer l'équilibre vers la forme fermée et ainsi conserver l'activité du LCO.

L'introduction de cette sonde fluorescente a permis au groupe de Stougaard d'effectuer des études de thermophorèse à micro-échelle (MST),<sup>95</sup> une méthode très rapide à mettre en œuvre et performante pour observer la formation de complexes protéine-ligand. Les tests ont montré que l'ajout de cette sonde fluorescente à l'extrémité réductrice n'a pas d'impact sur l'affinité pour le site actif de NFR1 ou NFR5. Il est à noter que le groupe de Stougaard a réalisé ces mêmes expériences avec un analogue fluorescent du pentasaccharide de *N*-acétylglucosamine. Une perte conséquente de l'affinité a été observée, prouvant à nouveau l'importance de la chaîne carbonée pour la reconnaissance des facteurs symbiotiques.

---

<sup>94</sup> Broghammer, A. ; Krusell, L. ; Blaise, M. ; Sauer, J. ; Sullivan, J. T. ; Maolanon, M. ; Vinther, M. ; Lorentzen, A. ; Madsen, E. B. ; Jensen, K. J. ; Roepstorff, P. ; Thirup, S. ; Ronson, C. W. ; Thygesen, M. B. ; Stougaard, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 13859-13864.

<sup>95</sup> (a) Seidel, S. A. I. ; Dijkman, P. M. ; Lea, W. A. ; van der Bogaart, G. ; Jerabek-Willemsen, M. ; Lazic, A. ; Joseph, J. S. ; Srinivasan, P. ; Baaske, P. ; Simeonov, A. ; Katritch, I. ; Melo, F. ; A. ; Ladbury, J. E. ; Schreiber, G. ; Watts, A. ; Braun, D. ; Duhr, S., *Methods*, **2013**, 59, 301-315. (b) Jerabek-Willemsen, M. ; André, T. ; Wanner, R. ; Roth, H. M. ; Duhr, S. ; Baaske, P. ; Breitsprecher, D., *J. Mol. Struct.*, **2014**, 1077, 101-113.

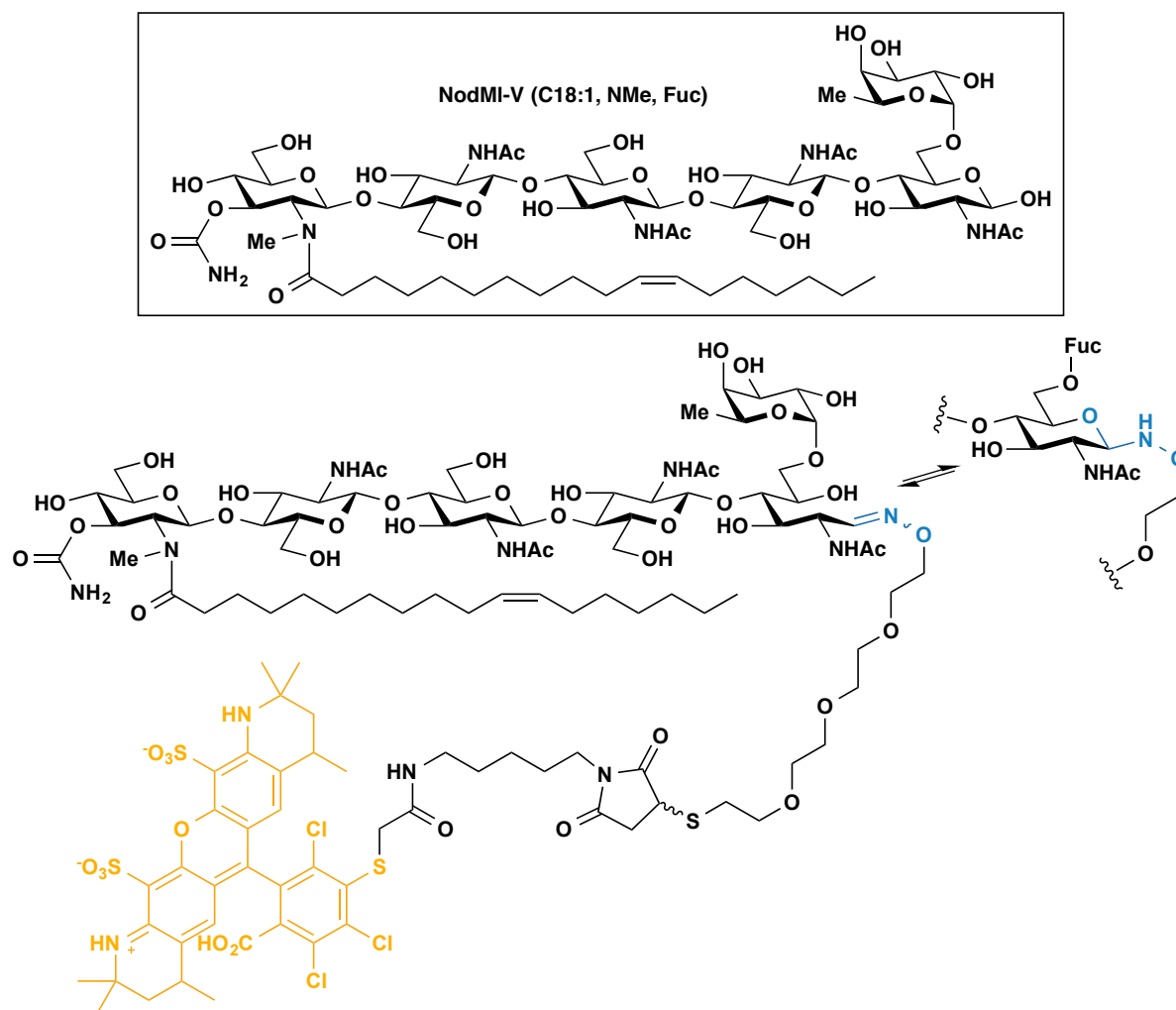


Schéma 34

### 3) Modifications structurales de la chaîne carbonée

En 1999, le groupe de Dénarié a montré que la chaîne carbonée des LCOs a une grande importance pour induire la formation de nodules racinaires.<sup>96</sup> Si l'absence de chaîne induit une perte totale d'activité biologique, la variation de la longueur et du nombre d'insaturations a également un impact non négligeable sur la reconnaissance des LCOs.

En 2004, l'équipe de Beau s'est intéressée à la synthèse d'analogues du facteur NodSm-IV (C16:2, S) dont la chaîne a été partiellement modifiée, en incluant un cycle aromatique.<sup>97</sup> Les auteurs

<sup>96</sup> 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.

<sup>97</sup> Grenouillat, N. ; Vauzeilles, B. ; Bono, J.-J. ; Samain, E. ; Beau, J.-M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 4644-4646.

ont synthétisé différentes chaînes carbonées qu'ils ont couplées à une structure commune, CO-IV (S, N<sup>IV</sup>) (**44**) (schéma 35).

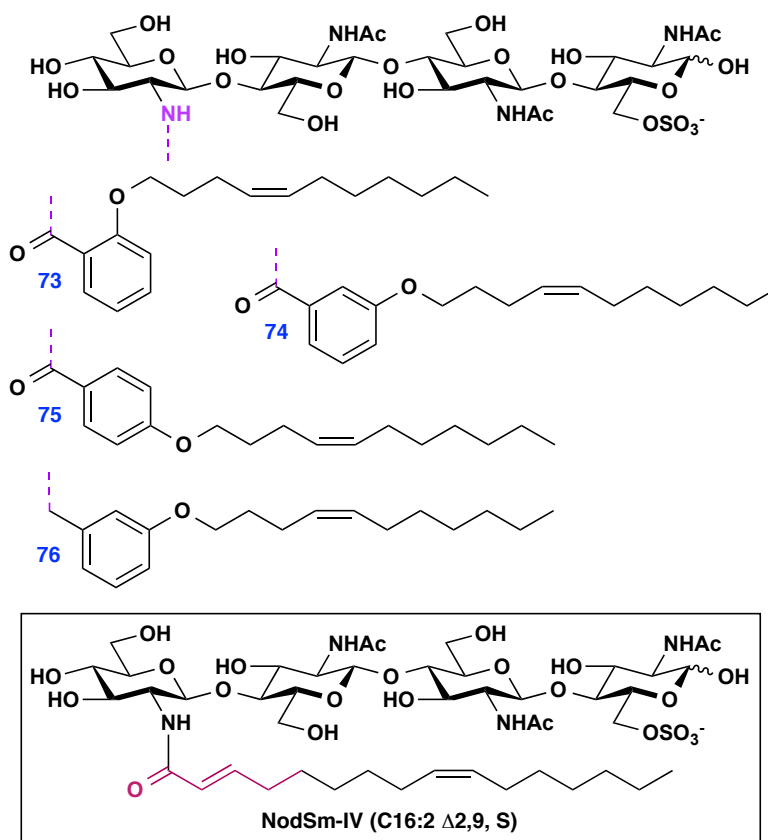


Schéma 35

La reconnaissance de ces analogues a été évaluée grâce à des tests de compétitions. Ces analogues ont tous montré des affinités, proches de celle de NodSm-IV (C16:2, S), pour le site actif d'un récepteur des LCOs. Bien que les résultats du groupe de Dénarié montrent l'importance structurale de la chaîne carbonée pour la reconnaissance des LCOs, les travaux de l'équipe de Beau ont mis en évidence que la géométrie imposée à cette chaîne peut varier sans avoir d'impact significatif sur l'activité biologique.<sup>98</sup> Seul le composé (**73**) a montré une affinité plus faible que les autres. Cela peut s'expliquer par la conformation spatiale de la chaîne, imposée par la configuration ortho du cycle aromatique, trop différente de la géométrie adoptée dans le cas de LCOs naturels. D'autres analogues comportant un cycle aromatique ont également été synthétisés par la suite et permettent de montrer que la conformation imposée par l'orientation méta (notamment (**74**) et (**76**)) est la plus proche de la géométrie naturelle.<sup>98</sup>

<sup>98</sup> Beau, J.-M. ; Dénarié, J. ; Greiner, A. ; Grenouillat, N. ; Maillet, F. ; Vauzeilles, B., *WO 2005/063784 A1*, **2005**

#### 4) Déplacement de la chaîne carbonée

En parallèle de ses travaux sur la synthèse chimioenzymatique de LCOs naturels, le groupe de Fort s'est également intéressé à la synthèse d'analogues dont la chaîne carbonée n'est plus située sur l'unité non réductrice.<sup>86</sup> En effet, la stratégie, explicitée précédemment (schéma 25),<sup>86</sup> permettait le passage par un intermédiaire dont l'amine de l'avant dernière unité était désacétylée. Une seule étape a pu être effectuée, sans optimisations nécessaires, en couplant différentes chaînes carbonées sur les CO-IV (N<sup>III</sup>) et CO-V (N<sup>IV</sup>) (**77**) afin d'obtenir plusieurs analogues de LCOs naturels, notamment l'analogue (**78**) de Myc-LCO-V (16:0) (schéma 36).

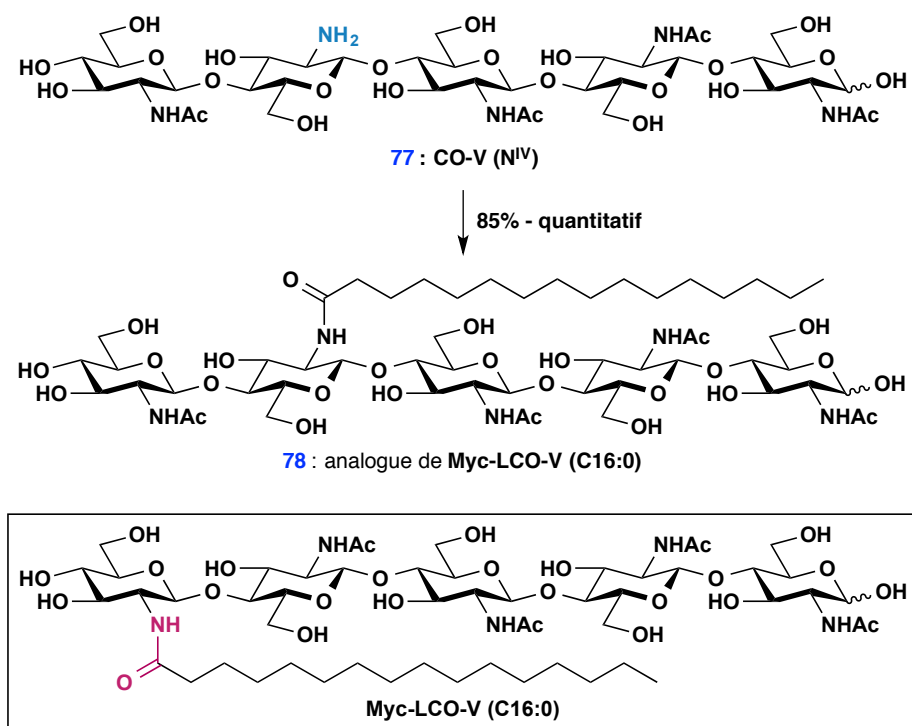


Schéma 36

Aucune information sur l'activité biologique n'a été donnée pour ces analogues. Il pourrait être intéressant de connaître leur affinité pour les récepteurs des LCOs afin de juger de l'importance de la position de cette chaîne sur la structure oligosaccharidique. A l'inverse de la partie saccharidique, la chaîne carbonée est flexible et ces analogues de LCOs, comme (**78**), pourraient être reconnus, au moins partiellement, par des récepteurs de facteurs symbiotiques.

## 5) Modification de la structure oligosaccharidique et conclusion

Finalement, assez peu de travaux ont été effectués sur la recherche d'analogues bioactifs et se sont principalement orientés vers la modification de la chaîne carbonée. Même si l'équipe de Torgov et Shibaev a effectivement diminué la longueur du squelette oligosaccharidique d'un facteur Nod,<sup>91</sup> le dérivé obtenu restait un oligomère de *N*-acétylglucosamine.

Dans l'optique de modifier la structure même de l'enchaînement d'unités GlcNAc, l'équipe de Auzanneau et Gelas s'est intéressée à la synthèse d'analogues de facteurs Nod en modifiant un des liens *O*-glycosidiques classiques par un lien soufré (schéma 37).<sup>99</sup> Le but était d'obtenir des analogues de LCOs thioglycosidiques plus stables, qui seraient plus résistants face aux enzymes de type glycosidase, capables de couper efficacement ce lien *O*-glycosidique.

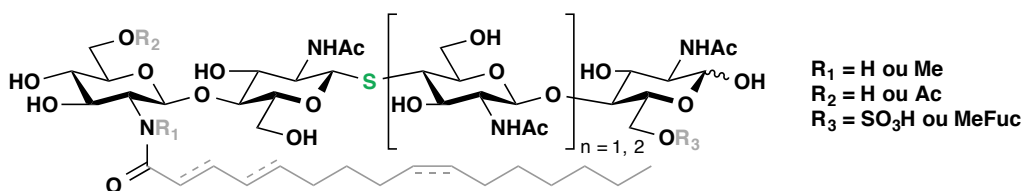


Schéma 37

Malheureusement, les différents essais effectués n'ont pas permis de terminer la synthèse d'un analogue. En effet, la stratégie de synthèse envisagée, très similaire à celle de Beau, utilisant des briques monosaccharidiques 1,6-anhydro (schéma 15),<sup>77</sup> a mené à des rendements de glycosylation parfois faibles et des mélanges d'anomères difficiles à purifier.

<sup>99</sup> Morais, L. L. ; Bennis, K. ; Ripoche, I. ; Liao, L. ; Auzanneau, F.-I. ; Gelas, J., *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 1369-1379.



Le groupe de Robina s'est également intéressé à la modification de l'enchaînement d'unité GlcNAc. Afin de juger de l'importance des groupements acétamido, la synthèse d'analogues de CO-IV, dont certaines de ces unités saccharidiques ont été remplacées par des glucoses, a été envisagée (schéma 38).<sup>100</sup>

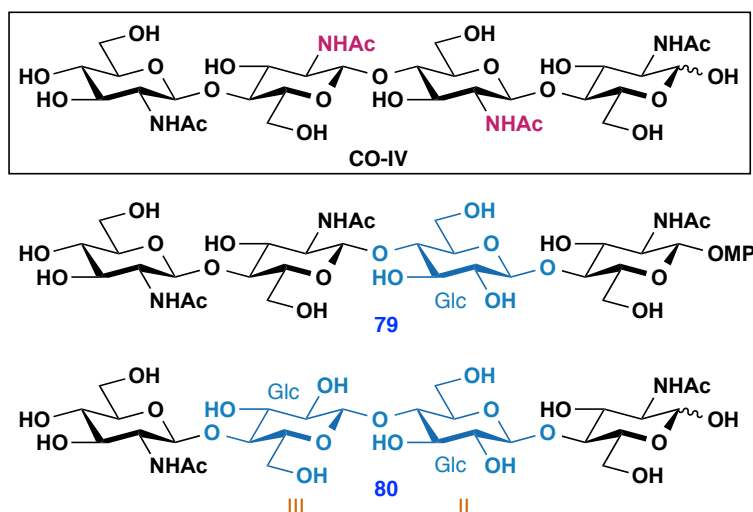


Schéma 38

Une collaboration avec l'équipe de Spaink, a permis d'effectuer des tests d'activité biologique de ces analogues (**79**) et (**80**) sur des cultures cellulaires de *Catharantus roseus*. Les cellules de cette herbacée sont en effet capable d'induire un réponse immunitaire à des concentrations très faibles de COs ( $10^{-15}$  mol).<sup>101</sup> Finalement, l'analogue (**80**) s'est avéré inactif, mais l'analogue (**79**) a conservé une très bonne activité. Il est à noter que les auteurs n'ont fourni aucune donnée précise. L'acétamido de l'unité III de CO-IV pourrait donc avoir une plus grande importance pour la reconnaissance que celui de l'unité II. L'évaluation de l'activité d'un troisième analogue de CO-IV, où seule l'unité III serait remplacée par un glucose, permettrait de confirmer cette hypothèse.

<sup>100</sup> (a) Robina, I. ; López-Barba, E. ; Fuentes, J., *Tetrahedron*, **1996**, 52, 10771-10784. (b) Robina, I. ; Gómez-Bujedo, S. ; Fernández-Bolaños, J. G. ; Fuentes J. ; Spaink, H. P., *Tetrahedron*, **2002**, 58, 521-530.

<sup>101</sup> Bakkers, J. ; Semino, C. E. ; Stroband, H. ; Kijne, J. W. ; Robbins, P. W. ; Spaink, H. P., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, 94, 7982-7986.

Finalement, les études portées sur les modifications de la chaîne carbonée ont conduit à l'obtention de différents analogues bioactifs, mais n'ont pas permis une simplification de la synthèse de LCOs. Pour cela, les connaissances autour des interactions des unités GlcNAc avec le site actif doivent être approfondies. Les résultats précédents, obtenus par le groupe de Robina, sont encourageants et montrent que la modification des unités GlcNAc, tout en conservant l'activité biologique, est possible. Dans ce projet de thèse, le laboratoire s'est ainsi intéressé à la synthèse d'analogues de facteurs symbiotiques dont le squelette oligosaccharidique a été modifié. Des études de modélisation des interactions d'un LCO dans le site actif de son récepteur<sup>102</sup> ont permis d'orienter la recherche de structure vers des analogues potentiellement bioactifs.

---

<sup>102</sup> 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**, *8*, 1900-1906.

### III. ETUDES DE MODELISATION ET PROJET DE THESE

#### A. Identification d'une protéine de liaison de lipochitooligosaccharides chez *Medicago truncatula*

Lorsque les facteurs Nod ont été découverts, la localisation de leurs récepteurs au niveau des racines a pu être étudiée. En 1995, un premier site de liaison des facteurs Nod a été découvert chez *Medicago truncatula* par le groupe de Cullimore, dans un mélange protéique appelé NFBS1 (*Nod Factor Binding Site 1*). Ce mélange a pu être identifié grâce à l'utilisation d'un facteur Nod marqué au tritium dans des études de liaison à différents extraits racinaires de *Medicago truncatula*.<sup>103</sup> Cependant, l'affinité des LCOs pour ce site est faible, comparée aux concentrations suffisantes pour que la plante induise une réponse biologique. De plus, NFBS1 est capable de lier de nombreux LCOs, sans spécificité de structures, et un site similaire a été découvert dans les racines de tomate, qui n'est pas une légumineuse. Ces caractéristiques suggèrent que ce site ne peut pas jouer un rôle exclusif dans la nodulation.

En 1997, l'utilisation d'un facteur Nod marqué au <sup>35</sup>S a permis au groupe de Cullimore d'identifier un second site, NFBS2, dans des cultures cellulaires provenant d'extraits racinaires de *Medicago varia*.<sup>104</sup> L'affinité pour ce site est plus en accord avec les concentrations de facteur Nod trouvées dans la Nature et la légère variation de structure des LCOs peut entraîner une perte conséquente d'affinité, suggérant une spécificité de *M. varia* pour certains facteurs Nod.<sup>105</sup> Néanmoins, ce site de liaison reconnaît les LCOs sulfatés ou non, sans spécificité. Un site similaire, MtNFBS2, a pu être découvert par la suite chez *M. truncatula*.<sup>106</sup>

L'étude du génome de différentes plantes modèles, comme *Lotus japonicus* ou *M. truncatula*, a permis de définir ces récepteurs comme étant des protéines transmembranaires de type LysM-RLK, comportant un domaine kinase intracellulaire et un motif lysM extracellulaire (schéma 39).<sup>15</sup>

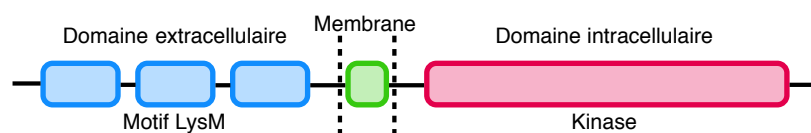


Schéma 39<sup>69</sup>

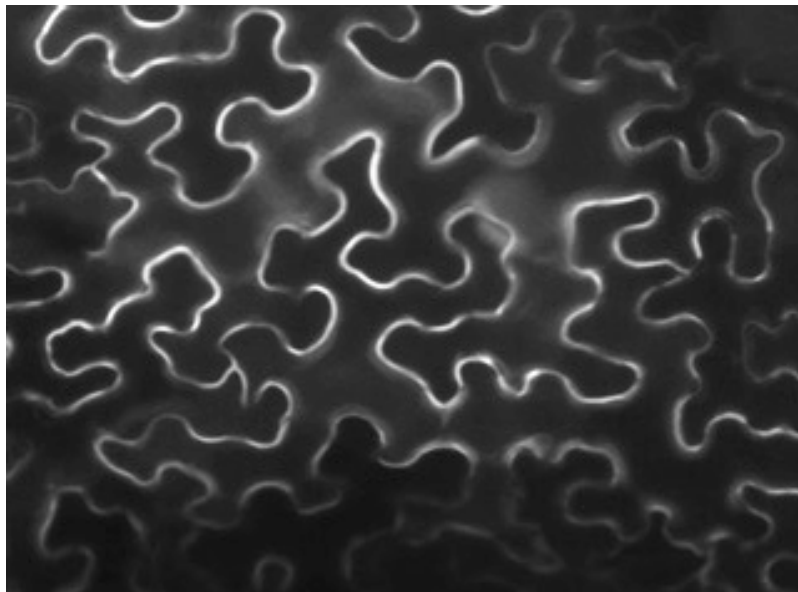
<sup>103</sup> Bono, J.-J. ; Riond, J. ; Nicolaou, K. C. ; Bockovich, N. J. ; Estevez, V. A. ; Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R., *Plant J.*, **1995**, 7, 253-260.

<sup>104</sup> Niebel, A ; Bono, J.-J. ; Ranjeva, R. ; Cullimore, J. V., *Mol. Plant Microbe Interact.*, **1997**, 10, 132-134.

<sup>105</sup> Gressent, F. ; Drouillard, S. ; Mantegazza, N. ; Samain, E. ; Geremia, R. A. ; Canut, H. ; Niebel, A. ; Driguez, H. ; Ranjeva, R. ; Cullimore, J. V. ; Bono, J.-J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 4704-4709.

<sup>106</sup> Hogg, B. V. ; Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R. ; Bono, J.-J., *Plant Physiol.*, **2006**, 140, 365-373.

En 2013, grâce à l'identification préalable des gènes responsables de la production de protéines LysM-RLK chez *M. truncatula*,<sup>107</sup> le groupe de Bono et Cullimore, en collaboration avec différentes équipes de recherche, est parvenu à identifier la protéine de liaison des LCOs, présente dans MtNFBS2.<sup>102</sup> Tout d'abord, des analyses préliminaires de transcriptomique et de protéomique ont permis d'identifier différentes protéines candidates : LYR3, LYR4 et LYK9. Dans le but d'effectuer ultérieurement des tests de liaison des LCOs, ces protéines ont été exprimées séparément dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*,<sup>108</sup> sous la forme de protéines de fusion avec la protéine fluorescente jaune (YFP). L'expression de LYK9 induisant la mort cellulaire chez *N. benthamiana*, également observée avec *Arabidopsis thaliana* CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1*),<sup>109</sup> d'autres protéines de fusion ont été construites à partir du domaine transmembranaire et du domaine kinase intracellulaire de la protéine NFP (*Nod Factor Perceptor*),<sup>107</sup> qui n'induit pas la mort cellulaire, fusionné à YFP et aux différents ectodomains extracellulaires de LYR3, LYR4 et LYK9 qui comportent le site de liaison des LCOs. L'ensemble de ces protéines a été exprimé et localisé dans la membrane plasmique comme le montre le cliché réalisé par microscopie de fluorescence (zones blanches, figure 1).<sup>102</sup>



**Figure 1** : cellules de feuille de *N. Benthamiana* comportant la protéine LYR3-NFP/YFP, surexprimée dans la membrane plasmique<sup>102</sup>

<sup>107</sup> Arrighi, J.-F. ; Barre, A. ; Ben Amor, B. ; Bersoult, A. ; Campos Soriano, L. ; Mirabella, R. ; de Carvalho-Niebel, F. ; Journet, E.-P. ; Ghérardi, M. ; Huguet, T. ; Geurts, R. ; Dénarié, J. ; Rougé, P. ; Gough, C., *Plant Physiol.*, **2006**, *142*, 265-279.

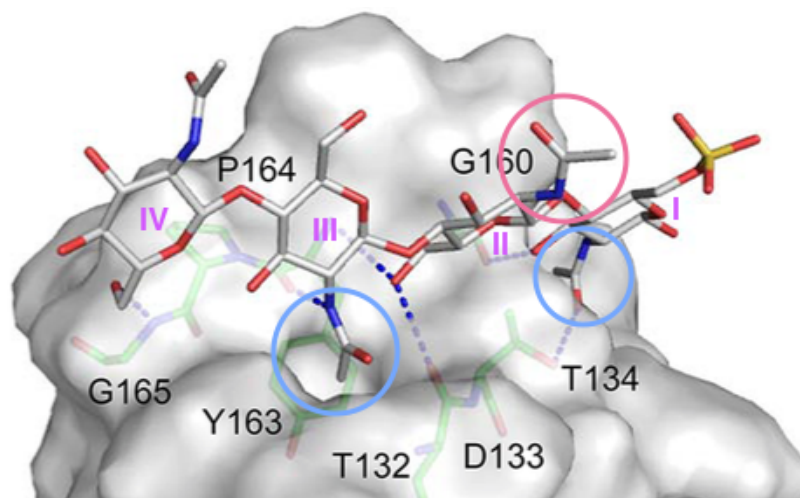
<sup>108</sup> Goodin, M. M. ; Zaitlin, D. ; Naidu, R. A. ; Lommel, S. A., *Mol. Plant Microbe Interact.*, **2008**, *21*, 1015-1026.

<sup>109</sup> Pietraszewska-Bogiel, A. ; Levevre, B. ; Koini, M. A. ; Klaus-Heisen, D. ; Takken, F. L. W. ; Geurts, R. ; Cullimore, J. V. ; Gadella, T. W. J., *PLoS One*, **2013**, *8*, e65055.

Après extraction, chaque protéine de fusion surexprimée a été obtenue dans des fractions membranaires, provenant des feuilles de différents plants de *N. benthamiana*. Finalement, des tests de liaison à l'équilibre ont montré une liaison spécifique d'un facteur de nodulation, marqué au  $^{35}\text{S}$ , seulement en présence des protéines de fusion LYR3/YFP et LYR3-NFP/YFP. Cela a permis de mettre en évidence la liaison spécifique des facteurs de nodulation à l'ectodomaine de LYR3.<sup>102</sup>

## B. Modélisation des interactions d'un facteur Nod avec LYR3

Après séquençage de la protéine LYR3, le groupe de Imberty a effectué des études de modélisation de l'interaction potentielle d'un LCO dans le site actif de ce récepteur.<sup>102</sup> L'ectodomaine de LYR3 est constitué de trois motifs LysM : LysM1, LysM2 et LysM3. La co-cristallisation de la protéine AtCERK1 (LysM-RLK chez *A. thaliana*) avec un CO-V<sup>110</sup> a permis de déterminer, par analogie de structure, que le domaine LysM2 de LYR3 était le meilleur candidat pour le site de liaison des LCOs. Les résultats de modélisation ont effectivement montré un docking possible d'un CO-IV dans LysM2 (figure 2). En revanche, aucun résultat intéressant n'a pu être obtenu dans le cas d'un facteur Nod.



**Figure 2 :** Docking du CO-IV (S) dans le motif LysM2 de l'ectodomaine d'un modèle par homologie de LYR3

En analysant cette image de modélisation, on remarque que les groupements acétamido des unités saccharidiques I et III (en bleu, figure 2) sont dirigés vers l'intérieur du site, stabilisant la liaison au site actif, notamment par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes. En revanche, l'unité II semble avoir une importance moindre dans la reconnaissance du LCO puisque

<sup>110</sup> Liu, T. ; Liu, Z. ; Song, C. ; Hu, Y. ; Han, Z. ; She, J. ; Fan, F. ; Wang, J. ; Jin, C. ; Chang, J. ; Zhou, J.-M. ; Chai, J., *Science*, **2012**, 336, 1160-1164.

son groupement acétamido (en rouge, figure 2) est dirigé vers l'extérieur du site actif. Ces résultats semblent rejoindre les travaux précédents du groupe de Robina qui semblaient montrer que l'activité biologique d'analogues de CO-IV était conservée lorsque l'unité GlcNAc II avait été remplacée par un glucose (schéma 38).<sup>100</sup> De plus, la liaison glycosidique centrale (entre unité II et III) montre une certaine tension angulaire et il pourrait donc être intéressant d'insérer plus de flexibilité au niveau de ce lien.

Partant de ces postulats, l'idée de ce projet de thèse a été de synthétiser des analogues de LCOs dont l'unité II a été remplacée par un lien susceptible de mimer le rôle de répartiteur d'une *N*-acétylglucosamine.

Très récemment, de nouveaux travaux de modélisation, effectués par le groupe de Cullimore et Bono, ont montré que le site de liaison était plus probablement situé sur le domaine LysM3 de LYR3 et non sur LysM2. C'est notamment la présence de canaux hydrophobes à la surface du LysM3, pour lier la chaîne carbonée, qui permettrait une meilleure interaction du LCO dans le site actif.<sup>111</sup>

## C. Le motif triazole

L'intérêt pour le motif 1,2,3-triazole a eu un essor considérable dans le domaine de la chimie depuis la découverte de la réaction de cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre, CuAAC.

La réaction de cycloaddition [3+2] thermique entre un dérivé azoture et un dérivé acétylénique activé fut découverte à la fin du 19<sup>e</sup> siècle et beaucoup étudiée par l'équipe de Huisgen dans les années 1960.<sup>112</sup> Mais ce n'est qu'en 2002 que l'équipe de Meldal ainsi que l'équipe de Fokin et Sharpless découvrent simultanément l'utilité du cuivre(I) pour catalyser la cycloaddition [3+2] entre un alcyne et un azoture.<sup>113</sup> L'équipe de Fokin et Sharpless utilise notamment l'ascorbate de sodium afin de réduire *in situ* des sels de cuivre(II) dans un mélange *tert*-butanol/eau. Par la suite, de nombreuses conditions de CuAAC ont été mises au point.

Cette réaction rapide et efficace, pouvant être mise en œuvre facilement, dans de nombreux solvants, et dont les sous-produits peuvent être éliminés aisément, a permis de classer cette

<sup>111</sup> Malkov, N. ; Fliegmann, J. ; Rosenberg, C. ; Gascioli, V. ; Timmers, A. C. J. ; Nurisso, A. ; Cullimore, J. V. ; Bono, J.-J., *Biochem. J.*, **2016**, 473, 1369-1378.

<sup>112</sup> Huisgen, R., *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 357-396.

<sup>113</sup> (a) Tornøe, C. W. ; Christensen, C. ; Meldal, M., *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064. (b) Rostovtsev, V. V. ; Green, L. G. ; Fokin, V. V., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.

cycloaddition parmi les réactions click,<sup>114</sup> ouvrant de nombreuses possibilités d'applications, notamment en chimie thérapeutique.<sup>115</sup> Quelques exemples non exhaustifs, en lien avec la glycochimie,<sup>116</sup> sont traités afin de mieux comprendre l'intérêt et les nombreuses possibilités qu'offre ce motif triazole.

## 1) Structures multivalentes

La capacité des bactéries à pouvoir évoluer génétiquement pour résister aux antibiotiques est un problème majeur pour la santé humaine. La recherche de nouveaux médicaments est un vrai défi pour faire face à la découverte croissante de nouvelles souches bactériennes résistantes.<sup>117</sup>

Afin de palier à cette résistance accrue, différents groupes se sont intéressés à des structures chimiques capables de se lier spécifiquement à des protéines membranaires bactériennes, responsables de l'adhésion cellulaire (adhésines).<sup>118</sup> Le but de ces structures est d'empêcher les bactéries de se lier aux cellules eucaryotes saines, et d'éviter ainsi la prolifération du pathogène. Cette stratégie est particulièrement intéressante puisqu'elle permet d'éviter la mort bactérienne, un facteur supposé non négligeable dans le développement de la résistance aux antibiotiques.

Parmi ces protéines de régulation de l'adhésion bactérienne, on trouve notamment des lectines, capables de reconnaître spécifiquement des glycosides. L'équipe de Gouin s'est intéressée à la synthèse de structures saccharidiques multivalentes (schéma 40) capables de lier spécifiquement ces lectines, grâce à leurs nombreux bras, et ainsi former des clusters bactériens biologiquement inactifs.<sup>119</sup>

---

<sup>114</sup> Kolb, H. C. ; Finn, M. G. ; Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021

<sup>115</sup> (a) Lutz, J.-F. ; Zarafshani, Z., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 958-970. (b) Hein, C. D. ; Liu, X.-M. ; Wang, D., *Pharm. Res.*, **2008**, 25, 2216-2230.

<sup>116</sup> Tiwari, V. K. ; Mishra, B. B. ; Mishra, K. B. ; Mishra, N. ; Singh, A. S. ; Chen, X., *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 3086-3240

<sup>117</sup> Nikaido, H., *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, 78, 119-46.

<sup>118</sup> Deniaud, D. ; Julienne, K. ; Gouin, S., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 966-979.

<sup>119</sup> (a) Gouin, S. G. ; Vanquelef, E. ; García Fernández, J. M. ; Ortiz Mellet, C. ; Dupradeau, F.-Y. ; Kovensky, J., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 9032-9045. (b) Almant, M. ; Mastouri, A. ; Gallego-Yerga, L. ; García Fernández, J. M. ; Ortiz Mellet, C. ; Kovensky, J. ; Morandat, S. ; El Kirat, K. ; Gouin, S. G., *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 729-738. (c) Chalopin, T. ; Brissonet, Y. ; Sivignon, A. ; Deniaud, D. ; Cremet, L. ; Barnich, N. ; Bouckaert, J. ; Gouin, S. G., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 11369-11375.

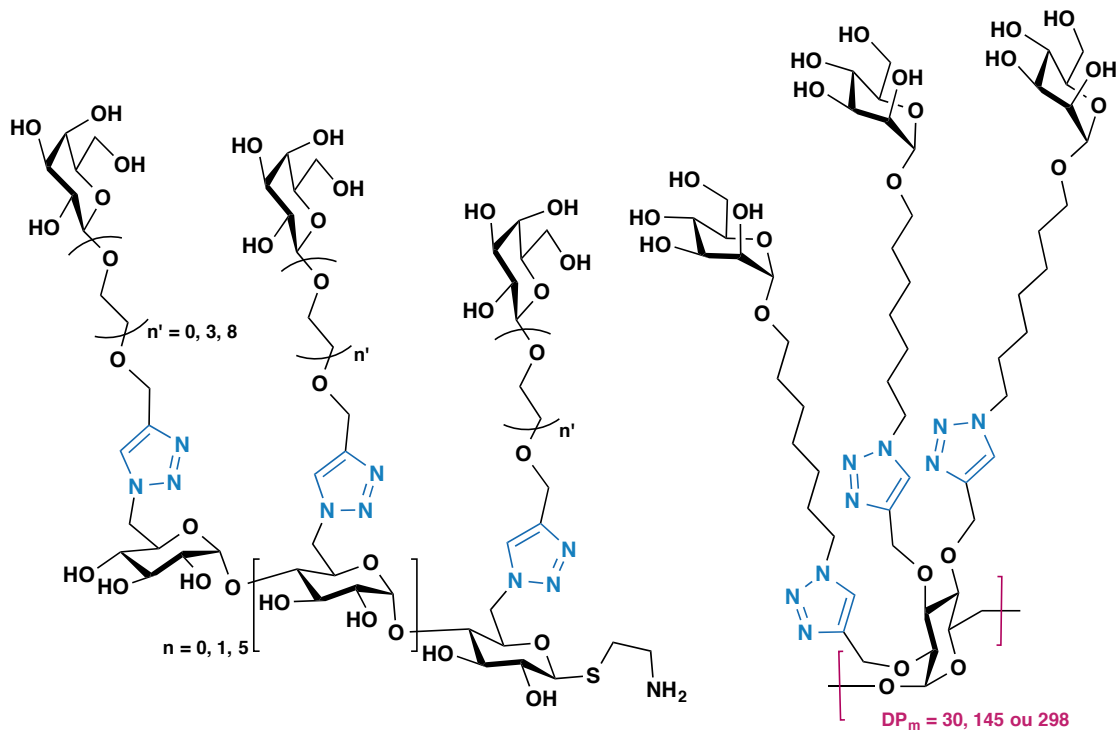


Schéma 40

Les branchements comportant des terminaisons glycosidiques permettent de lier une même structure à de nombreuses lectines, éventuellement présentes à la surface de plusieurs bactéries pathogènes. L'utilisation de ce genre de ligand, plutôt que des monosaccharides seuls, permet d'améliorer significativement l'affinité pour les sites actifs des lectines, grâce à la liaison plus forte qui est maintenue par la multivalence.

La CuAAC a un intérêt évident dans la synthèse de ce genre de dérivés multiglycosidiques, permettant d'obtenir rapidement et efficacement de nombreux branchements, à partir d'une structure oligosaccharidique (voire polysaccharidique) de départ.

## 2) Marquage métabolique

L'identification rapide de pathogènes est également un enjeu majeur dans le domaine de la santé. Le développement de nouvelles méthodes permettrait à des patients atteints de maladies très virulentes d'être traités plus rapidement et efficacement. La découverte de la CuAAC a justement permis de grandes avancées dans ce domaine.

Les bactéries à gram négatif sont recouvertes par une couche de lipopolysaccharides (LPS), intégrés dans la membrane grâce à de longues chaînes lipophiles (Lipide A). La partie glycane externe est composée d'un noyau, qui varie peu d'une souche à l'autre, et de l'antigène-O, plus



spécifique d'une même espèce (schéma 42). Certaines de ces bactéries sont effectivement responsables de graves pathologies, comme *Legionella pneumophila*.<sup>120</sup> L'équipe de Vauzeilles s'est donc intéressée à ces LPS pour effectuer du marquage métabolique de ces bactéries.<sup>121</sup> La stratégie a été d'incuber la bactérie avec un glycoside modifié, le Kdo-N<sub>3</sub>, afin qu'il soit métabolisé, grâce à la machinerie cellulaire, au sein du LPS, à la place du Kdo. Les bactéries à gram négatif ont alors pu être détectées par une réaction de click entre l'azoture, intégré au LPS, à une sonde fluorescente propargylée (schéma 41 et schéma 42).

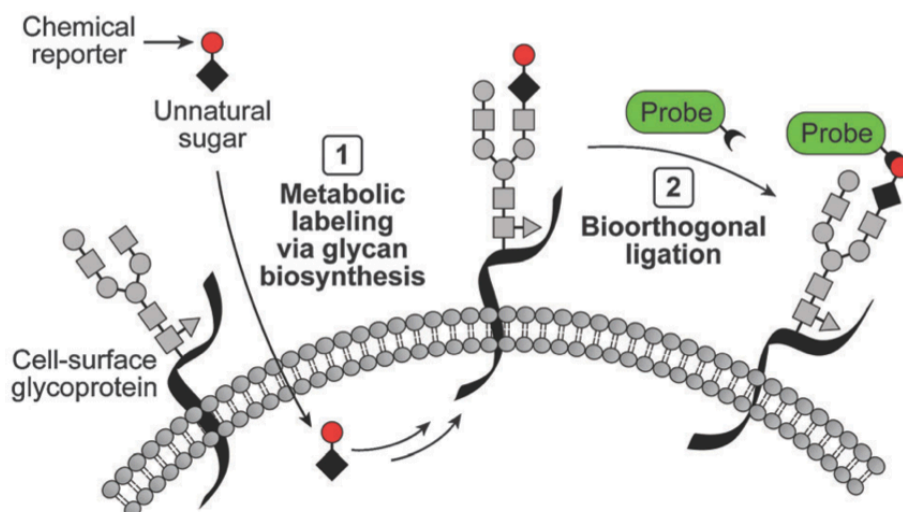
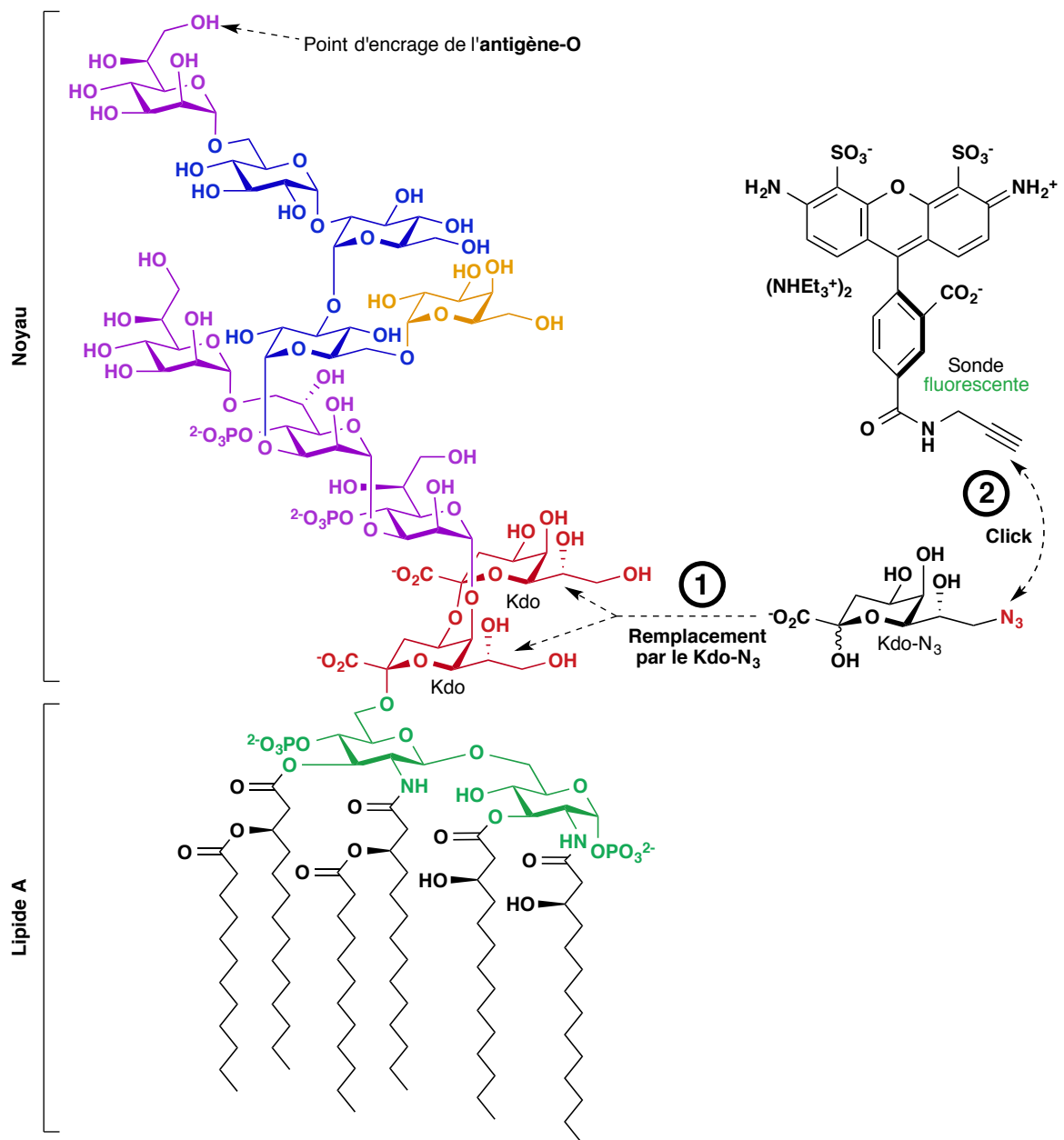


Schéma 41 : Concept du marquage métabolique de glycanes à la surface cellulaire<sup>122</sup>

<sup>120</sup> Fraser, D. W. ; Tsai, T. R. ; Orenstein, W. ; Parkin, W. E. ; Beecham, H. J. ; Sharrar, R. G. ; Harris, J. ; Mallison, G. F. ; Martin, S. M. ; McDade, J. E. ; Shepard, C. C. ; Brachman, P. S., *N. Engl. J. Med.*, **1977**, 297, 1189-1197.

<sup>121</sup> Dumont, A. ; Malleron, A. ; Awwad, M. ; Dukan, S. ; Vauzeilles, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 3143-3146.

<sup>122</sup> Chang, P. V. ; Bertozzi, C. R., *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 8864-8879.



L'équipe de Vauzeilles est ainsi parvenue à marquer des souches vivantes de *E. coli*. Cette méthode est très rapide à mettre en œuvre, notamment grâce à la CuAAC qui est efficace dans tout milieu réactionnel, y compris au niveau de l'enveloppe cellulaire. Le Kdo étant présent à la surface de nombreuses bactéries à gram négatif, l'utilisation d'un autre dérivé azoture, précurseur de l'acide legionaminique présent uniquement dans le LPS de *L. pneumophila*, a permis un marquage spécifique de ces bactéries.<sup>123</sup>

<sup>123</sup> Mas Pons, J. ; Dumont, A. ; Saujeteau, G. ; Fugier, E. ; Baron, A. ; Dukan, S. ; Vauzeilles, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 1275-1278.

### 3) Mime de glycosides

Récemment, différents travaux de recherche ont montré que le motif triazole pouvait être un bon mime de glycoside. L'utilisation de la réaction de cycloaddition [3+2] azoture-alcyne a permis ainsi d'obtenir des inhibiteurs d'enzymes plus simples à synthétiser et plus stables en milieu physiologique.

Différents groupes se sont intéressés à des traitements contre le pathogène *Mycobacterium tuberculosis*, bactérie responsable de la tuberculose. Une approche consiste à chercher des inhibiteurs de mannosyltransferases, enzymes intervenant dans la biosynthèse de nombreux glycophospholipides, présents à la surface bactérienne. Ces glycoconjugués, notamment composés d'un enchaînement d'unités mannosides, sont biosynthétisés à partir de fragments d'oligomannoside. L'équipe de Dondoni s'est donc intéressée à la synthèse d'analogues d' $\alpha$ -1,6-oligomannosides dont une unité sur deux est remplacée par un motif triazole (schéma 43).<sup>124</sup>

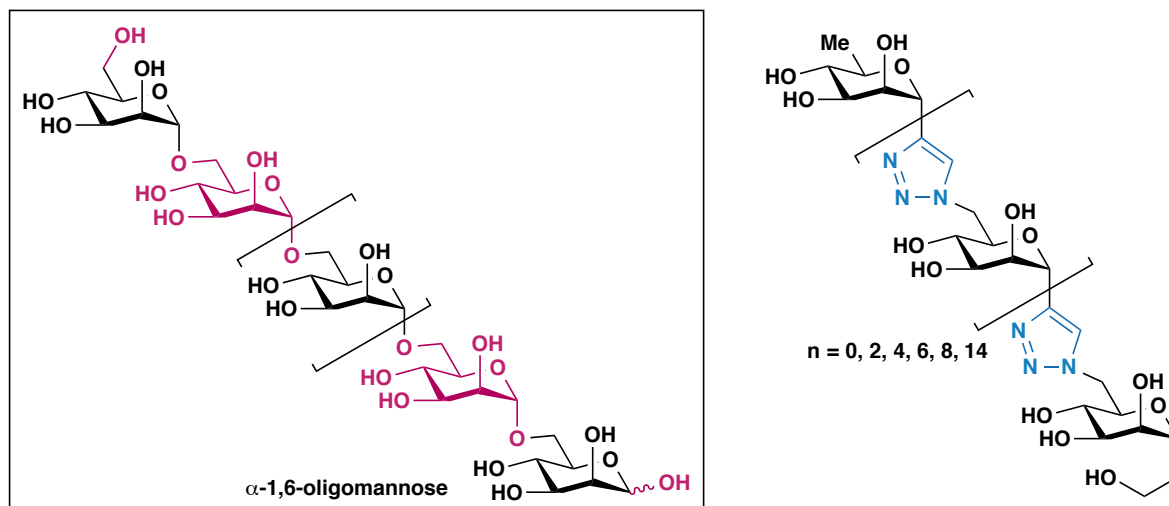


Schéma 43

Dondoni a ainsi montré que ces analogues pouvaient être des inhibiteurs de mannosyltransférases ( $IC_{50} = 0,14$  et  $0,22$  mM pour  $n = 4$  et  $6$ ). Ils sont reconnus dans le site actif, prouvant que la structure du triazole mime celle d'un mannose, mais l'enzyme ne peut pas couper la liaison glycosidique afin de transférer une unité mannoside sur le glycophospholipide en croissance.

<sup>124</sup> (a) Cheshev, P. ; Marra, A. ; Dondoni, A., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 3225-3227. (b) Lo Conte, M. ; Marra, A. ; Chambery, A. ; Gurcha, S. S. ; Besra, G. S. ; Dondoni, A., *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 6326-6336.

Le motif triazole comme mime de glycoside a également eu un intérêt dans la recherche d'un traitement pour la maladie de Chagas, provoquée par un pathogène protozoaire, *Trypanosoma cruzi*. Différents travaux ont permis de découvrir plusieurs inhibiteurs de la trans-sialidase, une enzyme jouant un rôle clé dans le processus d'infection de *T. cruzi*. Le ganglioside GM3, glycolipide présent à la surface des cellules ganglionnaires du cerveau, a notamment montré des résultats d'inhibition de la trans-sialidase (concentration 10-100  $\mu\text{M}$ ).<sup>125</sup> Le groupe de Carvalho s'est intéressé à la synthèse d'analogues du ganglioside GM3 en remplaçant l'unité galactose du trisaccharide par un motif triazole et en liant différents hydroxyles du glycoside de l'extrémité réductrice (schéma 44).<sup>126</sup>

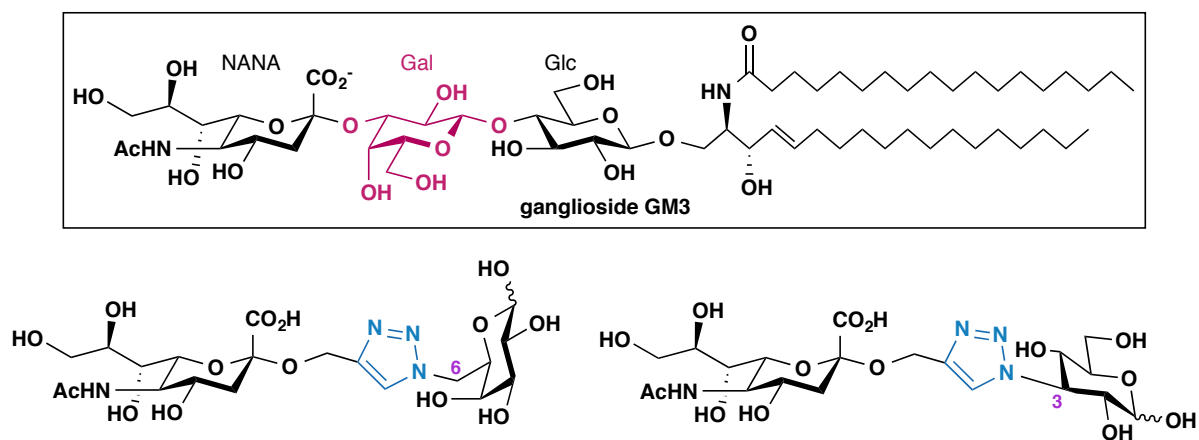


Schéma 44

Carvalho est ainsi parvenu à obtenir des inhibitions proche de celle obtenue avec le ganglioside GM3 (concentration 0,5-1,0 mM). L'acide sialique (ou acide *N*-acétylneuraminique, NANA) étant un moins bon inhibiteur de la trans-sialidase (20% d'inhibition à 1 mM), l'unité galactose semble donc bien avoir un rôle dans la liaison au site actif, nouvelle preuve que le motif triazole peut s'avérer être un bon mime de glycoside.

<sup>125</sup> Vandekerckhove, F. ; Schenkman, S. ; de Carvalho, L. P. ; Tomlinson, S. ; Kiso, M. ; Yoshida, M. ; Hasegawa, A. ; Nussenzweig, V., *Glycobiology*, **1992**, 2, 541-548.

<sup>126</sup> Campo, V. L. ; Sesti-Costa, R. ; Carneiro, Z. A. ; Silva, J. S. ; Schenkman, S. ; Carvalho, I., *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 145-156.

Les oligosaccharides haut-mannose sont des *N*-glycanes impliqués dans de nombreux processus de reconnaissance biologique, notamment pathologiques. Ils ont donc eu un intérêt particulier dans le but de concevoir des médicaments ou vaccins, seulement, ils se sont avérés être de vrai défis synthétiques du fait de leur structure complexe. L'équipe de Djedaïni-Pilard s'est intéressée à la synthèse de dérivés de ces *N*-glycanes dont certaines unités mannoses "centrales" ont été remplacées par un motif triazole, permettant de limiter le nombre de glycosylations délicates (Schéma 45).<sup>127</sup>

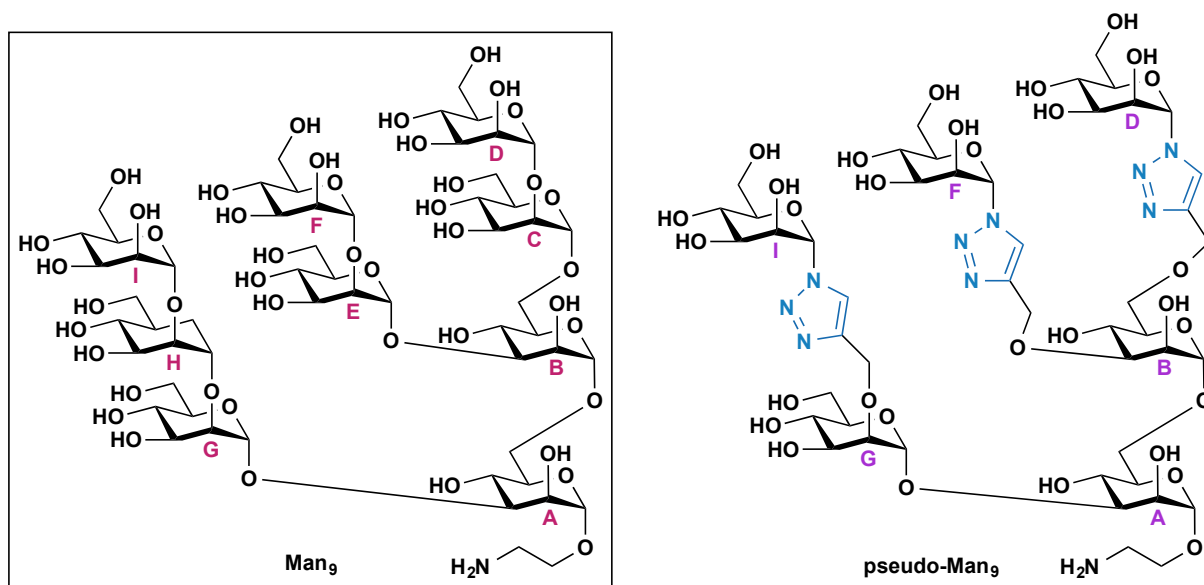


Schéma 45

Des tests de reconnaissance biologique, par des lectines liant spécifiquement des *N*-glycanes haut-mannose (comme la Concanavoline A), ont permis de montrer la très bonne affinité de certains analogues. Par exemple, l'activité du pseudo-Man<sub>9</sub> (IC<sub>50</sub> de 7,1 μM pour l'inhibition de la Con A-HRP) est très similaire à celle du dérivé naturel Man<sub>9</sub> (IC<sub>50</sub> de 3,9 μM).<sup>127</sup> Le motif triazole semble donc à nouveau jouer le rôle de mime biologique afin de remplacer des unités mannoses.

En conclusion, ces quelques exemples illustrent bien l'impact qu'a pu avoir la découverte de la réaction click de CuAAC dans le monde de la chimie. La formation rapide et efficace du lien triazole a permis de dépasser certaines limites synthétiques et ainsi apporter des solutions dans différents domaines de recherche.

<sup>127</sup> François-Heude, M. ; Méndez-Ardoy, A. ; Cendret, V. ; Lafite, P. ; Daniellou, R. ; Ortiz Mellet, C. ; García Fernández, J. M. ; Moreau, V. ; Djedaïni-Pilard, F., *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 1978-1991.

## D. Analogues envisagés pour le projet de thèse

Les travaux de modélisation de l'équipe de Imberty et la bioéquivalence du motif triazole avec différents glycosides, montrée à travers les exemples précédents, ont permis d'envisager la synthèse d'analogues de LCOs naturels simples, dont l'unité II a été remplacée par le motif triazole (schéma 46).

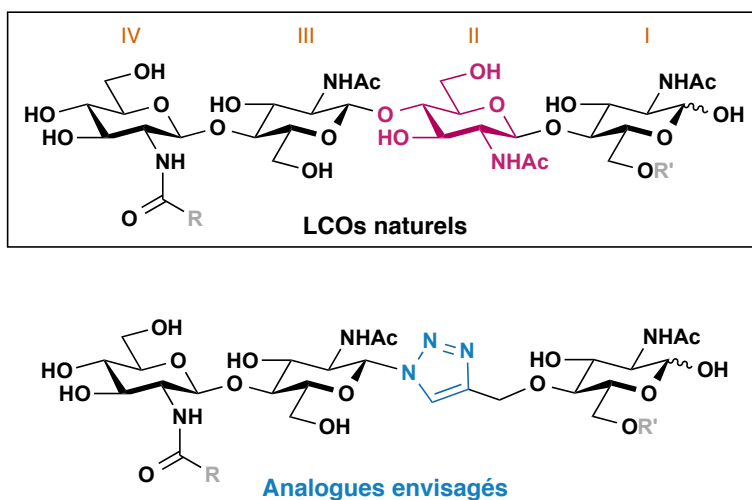


Schéma 46

Plusieurs analogues pourront être obtenus en faisant varier la chaîne carbonée et en sulfatant, ou non, l'hydroxyle en position 6 de l'unité réductrice. Des tests de compétition de liaison au récepteur LYR3 seront ensuite réalisés afin de juger de l'affinité de ces analogues de LCOs pour le site actif.



**SYNTHESE DE DEUX BRIQUES  
SACCHARIDIQUES**





## I. STRATEGIE DE SYNTHÈSE DES ANALOGUES DE LIPO-CHITOOOLIGOSACCHARIDES

La stratégie envisagée pour la synthèse des analogues de LCOs a permis d'éviter la glycosylation d'unités saccharidiques. La diversité moléculaire a été introduite à la fin de la synthèse grâce à l'utilisation de protections orthogonales judicieuses (schéma 47).

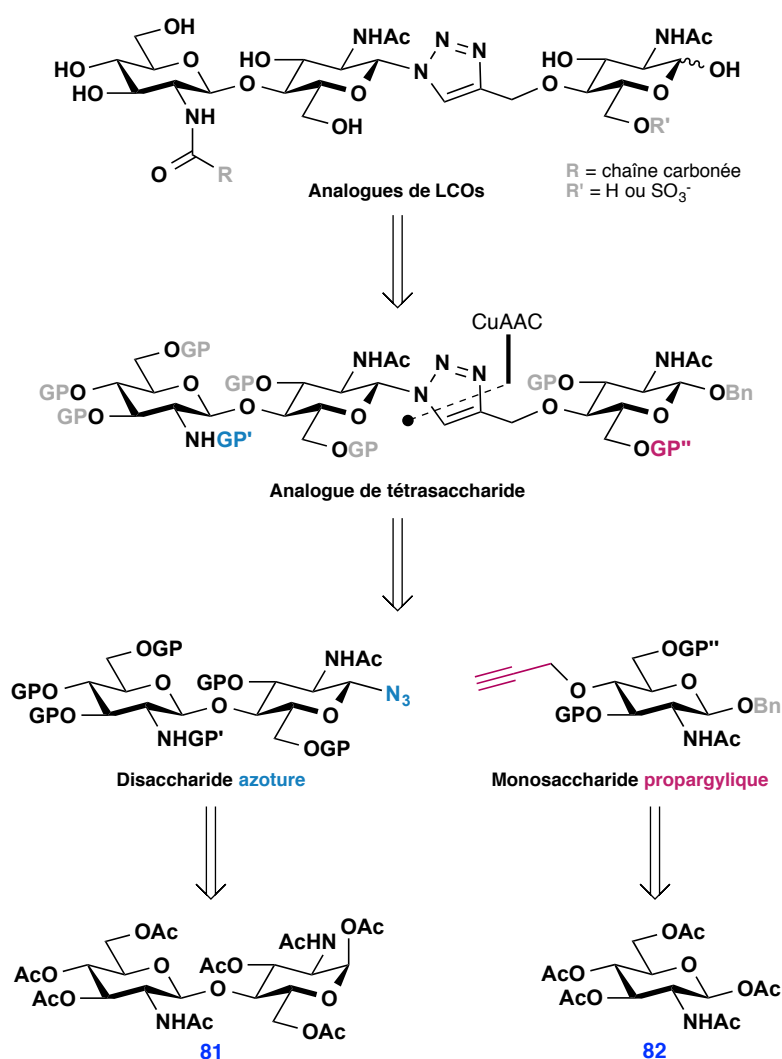


Schéma 47

Les analogues de LCOs finaux ont été obtenus suite à la fonctionnalisation et déprotection d'un analogue de tétrasaccharides. Afin de pouvoir introduire la chaîne carbonée et le sulfate, des protections orthogonales ont été choisies sur l'amine de l'unité non réductrice et sur l'hydroxyle en position 6 à l'autre extrémité. Il est à noter que l'acylation de la chaîne carbonée a été réalisée lors de la dernière étape, afin d'éviter des intermédiaires amphiphiles, difficiles à purifier. En revanche,

l'introduction du sulfate a été effectuée avant de retirer les autres groupements protecteurs pour éviter la sulfatation de l'ensemble des hydroxyles.

L'analogue de tétrasaccharides protégé ont été obtenu par une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre entre un dérivé disaccharidique, comportant un groupement  $\beta$ -azoture, et un dérivé monosaccharidique, propargylé sélectivement sur l'hydroxyle en position 4.

Ces deux briques ont été synthétisées grâce à la fonctionnalisation de dérivés saccharidiques per-acétylés simples, **(81)** et **(82)**. Le disaccharide **(81)** a été obtenu à partir de la chitine, par le procédé d'acétolyse. L'obtention du dérivé azoture s'est appuyée sur les travaux récents de l'équipe de Beau sur la synthèse de LCOs, décrits précédemment.<sup>87</sup> Le dérivé monosaccharidique propargylique **(82)** a été obtenu à partir de la  $\beta$ -D-glucosamine per-acétylée, en fixant la stéréochimie  $\beta$  de la position anomère, grâce à un benzyle, pour éviter la purification complexe de mélanges d'anomères au cours de la synthèse.

## II. SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ MONOSACCHARIDIQUE PROPARGYLIQUE

### A. Obtention de la glucosamine per-acétylée

Les premières étapes de la synthèse du synthon monosaccharidique propargylique ont conduit à la formation de la  $\beta$ -D-glucosamine per-acétylée (**82**). Le but a été d'obtenir un dérivé N-acétylglucosamine  $\beta$  pur, en partant du chlorhydrate de D-glucosamine commercial, en mélange  $\alpha/\beta$ . En effet, il a été montré qu'un dérivé  $\beta$ -acétyle est meilleur donneur de glycosyle que son anomère  $\alpha$  dans le cadre de réactions de glycosylation.<sup>128</sup> La per-acétylation directe du chlorhydrate de D-glucosamine n'est donc pas envisageable car un mélange  $\alpha/\beta$  serait alors obtenu (schéma 48).<sup>129</sup>

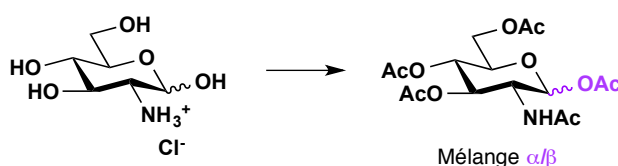


Schéma 48 : Réactifs et conditions : anhydride acétique, pyridine, 0°C à t.a.

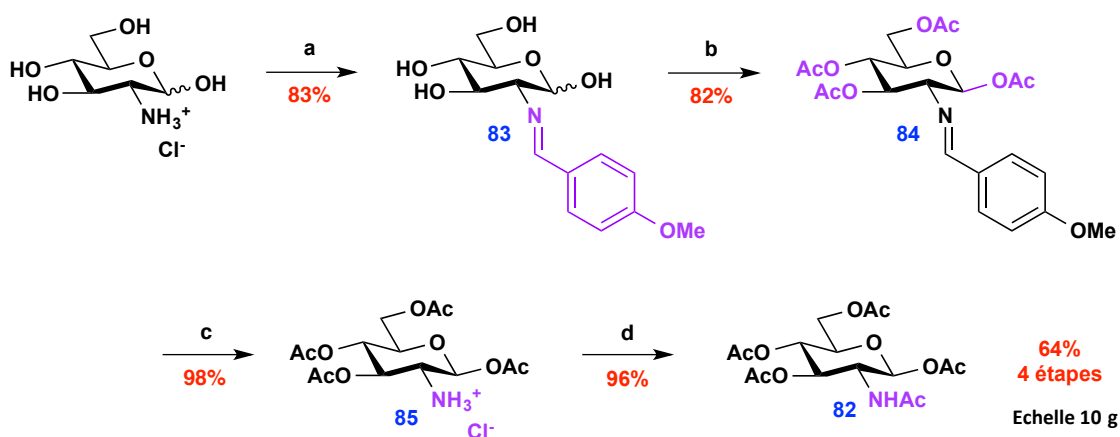
Il a donc été nécessaire de passer par différents intermédiaires afin de favoriser la formation de l'anomère  $\beta$ . Le composé (**82**) a ainsi été synthétisé grâce à une méthode classique, mise au point par l'équipe de Myszka, qui passe par la condensation d'une fonction amine sur un aldéhyde.<sup>130</sup> L'imine formée a permis d'acétylez seulement le stéréoisomère  $\beta$  (schéma 50). L'imine a ensuite été hydrolysée et l'amine a pu être acétylée.

<sup>128</sup> (a) Salo, W. L ; Fletcher, Jr., H. G., *J. Org. Chem.*, **1968**, 33, 3585-3588. (b) Stévenin, A ; Boyer, F.-D.; Beau, J.-M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 1699-1702. (c) Aguilera, B. ; Fernández-Mayoralas, A. ; Jaramillo, C., *Tetrahedron*, **1997**, 53, 5863-5876.

<sup>129</sup> Wakamiya, T. ; Yamanoi, K. ; Kanou, K. ; Shiba, T., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 5887-5888.

<sup>130</sup> Myszka, H. ; Bednarczyk, D. ; Najder, M. ; Wieslaw, K., *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 133-141.

En suivant ce procédé, la  $\beta$ -D-glucosamine per-acétylée (**82**) a été obtenue stéréochimiquement pure, en 4 étapes, à partir du chlorhydrate de D-glucosamine, avec un rendement global de 64%, à l'échelle de plusieurs grammes (schéma 49).



**Schéma 49 :** Réactifs et conditions : (a) *p*-anisaldéhyde, NaOH 1N, t.a. ; (b) anhydride acétique, pyridine, 0°C à t.a. ; (c) HCl 6N, acétone, Et<sub>2</sub>O, t.a. ; (d) anhydride acétique, pyridine, 0°C à t.a.

La première étape a donc consisté en la condensation du chlorhydrate de D-glucosamine sur l'anisaldéhyde. La réaction a été effectuée en milieu basique aqueux (NaOH 1N) en présence d'un léger excès d'anisaldéhyde. Le produit de condensation a précipité dans l'eau. L'imine (**83**) a ainsi été obtenue avec un rendement de 83% (schéma 49).

L'acétylation des 4 fonctions hydroxyles du composé (**83**) a ensuite été effectuée, permettant de former exclusivement le produit  $\beta$  car le substrat sous sa forme  $\alpha$  ne peut pas réagir. En effet, la proximité de l'hydroxyle en  $\alpha$  et de l'imine permet de former un intermédiaire réversible oxazolidine. Seule la forme  $\beta$  est alors réactive et acétylée. L'équilibre (**83 $\alpha$** )/(**83 $\beta$** ) a ainsi été déplacé vers la formation du produit (**84**)  $\beta$ -pur (schéma 50).

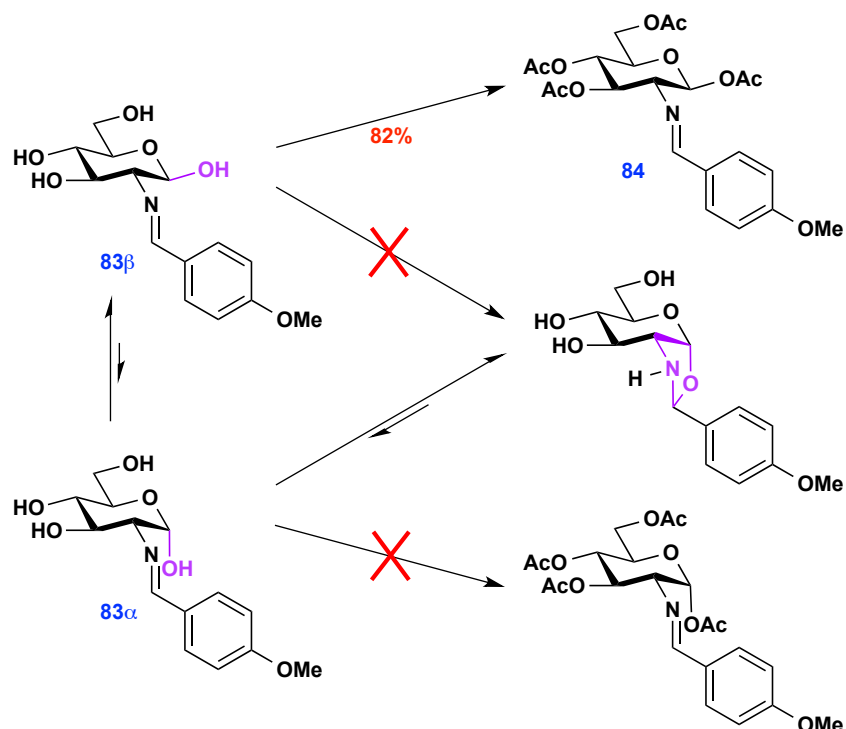


Schéma 50 : Réactifs et conditions : anhydride acétique, pyridine, 0°C à t.a., 18h

L'imine (**83**) a été mise en solution dans la pyridine, qui a servi de solvant et de base, en présence d'un excès d'anhydride acétique. Après précipitation à froid, le produit (**84**) exclusivement  $\beta$  a été obtenu avec un rendement de 82%. Cette stéréosélectivité exclusive en faveur de la forme  $\beta$  a pu être confirmée par la RMN  $^1\text{H}$  qui montrait une grande constante de couplage entre les protons  $\text{H}_1$  et  $\text{H}_2$  ( $J = 8,2 \text{ Hz}$ ).

L'imine a alors pu être hydrolysée, en présence d'un équivalent d'acide chlorhydrique, formant ainsi le composé chargé (**85**). Il est à noter que l'agitation devait être importante et l'éther diéthylique rapidement ajouté à l'apparition du précipité afin d'éviter la prise en masse quasi-immédiate. Après 2 heures, le composé chargé (**85**) a pu être obtenu par filtration avec un rendement de 98% (schéma 49).

Afin de terminer la synthèse de la  $\beta$ -D-glucosamine per-acétylée (**82**), l'amine a été acétylée dans des conditions similaires à celles décrites précédemment (schéma 50). Le produit (**82**) a ainsi été récupéré, suite à des lavages aqueux, avec un rendement de 96% (schéma 49).

## B. Changement du groupement protecteur en position anomère

Afin de pouvoir modifier les groupements acétyles en position 3, 4 et 6, sans déprotéger la position anomère, il a été nécessaire de changer cette protection, par exemple par un groupement benzyle, plus stable et orthogonal aux autres groupes protecteurs. La glycosylation de l'alcool benzylique par la glucosamine per-acétylée  $\beta$  pure (**82**) a donc été envisagée (schéma 51).

L'enjeu supplémentaire pour cette étape a été de conserver un produit  $\beta$  pur pour la suite de la synthèse. L'obtention d'un mélange d'anomères aurait compliqué les étapes de purification et l'analyse des composés, lors des étapes suivantes.

En 1967, l'équipe de Fletcher a mis en évidence l'intérêt d'utiliser un acide de Lewis tel que le chlorure de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) dans cette réaction de glycosylation, à partir de ce même substrat (**82**) (schéma 51).<sup>128</sup>

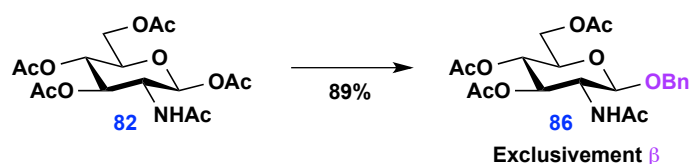


Schéma 51 : Réactifs et conditions : alcool benzylique (112 éq.),  $\text{ZnCl}_2$  (6 éq.), acétate de butyle, 125°C, 1h15

Fletcher a mis en évidence la formation de l'intermédiaire oxazolinium,<sup>131</sup> dérivant de l'oxacarbénium, que peut ouvrir l'alcool benzylique pour ainsi ne former que le dérivé  $\beta$  (schéma 52).

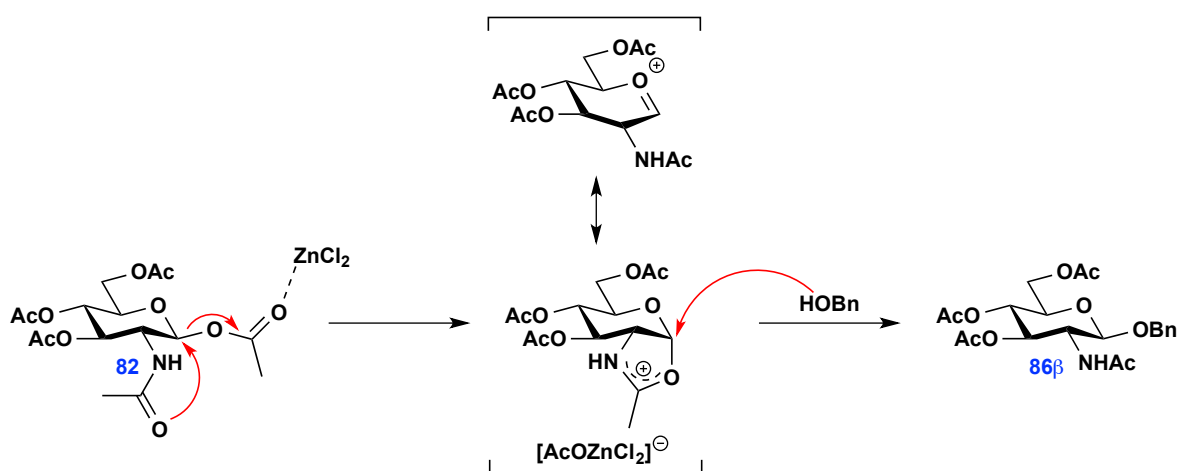


Schéma 52

<sup>131</sup> Pravdić, N. ; Inch, T. D. ; Fletcher, Jr., H. G., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 1815-1818.

L'inconvénient de sa méthode est l'utilisation de conditions dures, avec de grands excès de réactifs et une température élevée. D'autres acides de Lewis ont donc été testés comme l'étherate de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) donnant des résultats plutôt modérés.<sup>132</sup> Des acides de Brønsted ont donnés de bons résultats, comme l'acide camphorsulfonique mis en avant par l'équipe de Johnson.<sup>133</sup> Plus récemment, des essais utilisant des triflates de terres rares ont donné de bons rendements de glycosylation, par exemple avec le triflate de scandium ( $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ) en quantité catalytique (15 %mol).<sup>134</sup>

Malgré leur utilisation en quantité catalytique, ces triflates de terres rares restent relativement chers. L'équipe de Beau a mis en évidence l'efficacité du triflate de fer(III) ( $\text{Fe}(\text{OTf})_3$ ) dans ces réactions de glycosylation,<sup>128b</sup> un acide de Lewis peu cher et moins toxique pour l'environnement. Les meilleurs résultats ont alors été obtenus, sous activation micro-onde, avec 2 équivalents de donneur de glycosyle (**82**) pour 1 équivalent d'alcool benzylique et une quantité catalytique (15 %mol) de triflate de fer complexé au DMSO ( $\text{Fe}(\text{OTf})_3 \cdot 6,2\text{DMSO}$ ).<sup>135</sup>

En s'inspirant de ces résultats, quelques essais d'obtention du glycoside de benzyle (**86 $\beta$** ) ont ainsi été réalisés sous micro-ondes. Différentes conditions, jouant sur le rapport donneur/accepteur, ont été testées afin d'optimiser la conversion du composé (**82**) tout en empêchant la formation de l'anomère (**86 $\alpha$** ) (tableau 1). Afin d'éviter une étape de synthèse du catalyseur  $\text{Fe}(\text{OTf})_3 \cdot 6,2\text{DMSO}$ , le catalyseur commercial, non complexé au DMSO, a été utilisé pour ces essais. En effet, les travaux du laboratoire ont montré que l'utilisation de ce catalyseur commercial donnait des rendements similaires. En revanche, le ratio  $\alpha/\beta$  pouvait être moins favorable envers l'anomère  $\beta$  dans ces conditions.<sup>135</sup>

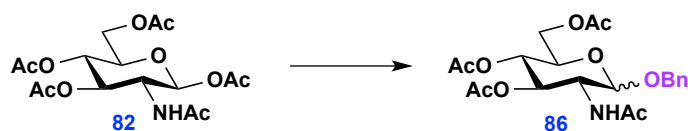
<sup>132</sup> Kelly, N. M. ; Jensen, K. J., *J. Carb. Chem.*, **2001**, 20, 537-548.

<sup>133</sup> Sowell, C. G. ; Livesay, M. T. ; Johnson, D. A., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 609-610.

<sup>134</sup> Christensen, H. ; Christiansen, M. S. ; Petersen, J. ; Jensen, H. H., *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 3276-3283.

<sup>135</sup> Xolin, A. ; Stévenin, A. ; Pucheault, M. ; Norsikian, S. ; Boyer, F.-D. ; Beau, J.-M., *Org. Chem. Front.*, **2014**, 1, 992-1000.





Entrée	Donneur ( <b>82</b> )	Accepteur (BnOH)	Fe(OTf) <sub>3</sub>	Rdt ( <b>86α</b> )	Rdt ( <b>86β</b> )
1	2.0 éq. (1.05 g)	1.0 éq.	15 %mol	/	77% (442 mg)
2	1.0 éq. (1.00 g)	2.0 éq.	15 %mol	31% (RMN)*	18% (RMN)*
3	1.0 éq. (1.00 g)	1.0 éq.	15 %mol	Rapport RMN 3:7**	

Tableau 1 : conditions : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, micro-ondes, 110°C, 45 min

Un premier essai (entrée 1) a été effectué avec 2 équivalents de donneur (**82**) et 1 équivalent d'alcool benzylique, les conditions optimales mises au point par le laboratoire. La formation du composé (**86α**) n'a pas été observée et un bon rendement a été obtenu, mais la conversion du donneur (**82**) était faible car en excès. Sa récupération lors de la purification pouvait s'avérer nécessaire si l'on voulait éviter une trop grande perte de glucosamine per-acétylée (**82**).

Un autre essai (entrée 2) a donc été effectué afin d'améliorer cette conversion avec 1 équivalent de donneur (**82**) et 2 équivalents d'alcool benzylique. Une faible conversion a été observée et l'analyse par RMN du milieu réactionnel a montré la formation majoritaire de l'anomère (**86α**).

Un dernier essai (entrée 3) dans des conditions équimolaires de donneur (**82**) et d'alcool benzylique a été réalisé. Une analyse RMN du mélange réactionnel a montré que l'anomère (**86β**) a bien été formé en majorité mais la quantité d'anomère (**86α**) obtenue n'était pas négligeable.

Ces essais de glycosylation effectués sous micro-ondes ne semblaient donc satisfaire ni les conditions de stéréospécificité ni de conversion de la glucosamine per-acétylée (**82**).

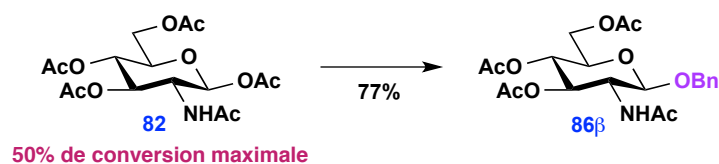


Schéma 53 : Réactifs et conditions : (**82**) (2 éq.), alcool benzylique (1 éq.), Fe(OTf)<sub>3</sub> (15 %mol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, micro-ondes, 110°C, 45 min

\* Estimation des rendements par RMN <sup>1</sup>H, après purification du mélange réactionnel.

\*\* Mélange réactionnel non purifié.

Suite aux résultats obtenus sous micro-ondes, le laboratoire a souhaité transposer ces conditions afin de réaliser cette glycosylation en chimie de flux. En effet, l'équipe de Kappe explique dans différentes publications que les effets cinétiques, induits par des conditions de flux, sont les mêmes que ceux induits par les micro-ondes.<sup>136</sup> Il est ainsi possible de transférer des conditions micro-ondes vers la synthèse en flux afin de s'affranchir des limites de quantité de produit formé tout en conservant des rendements similaires.<sup>137</sup> Les travaux du laboratoire ont ainsi permis de mettre au point la synthèse sur grande quantité de cette brique monosaccharidique (**86β**), mais également d'autres briques saccharidiques.<sup>135</sup>

Des essais de glycosylation en flux, s'inspirant de ces travaux, ont donc été effectués (tableau 2). A nouveau le catalyseur commercial non complexé au DMSO a été utilisé. Des résultats similaires à ceux vus précédemment sous activation micro-ondes ont pu être observés (tableau 1).

Entrée	Donneur ( <b>82</b> )	Accepteur (BnOH)	Fe(OTf) <sub>3</sub>	Rdt ( <b>86α</b> )	Rdt ( <b>86β</b> )
1	2.0 éq. (123 mg)	1.0 éq.	17 %mol	/	67% (45 mg)
2	1.0 éq. (71 mg)	1.0 éq.	13 %mol	21% (RMN)*	64% (RMN)*

Tableau 2 : conditions : CHCl<sub>3</sub>, flux, 110°C, temps de résidence : 70 min

Dans les cas où le donneur (**82**) était en excès (entrée 1), on a pu remarquer la formation exclusive de l'anomère β avec un rendement du même ordre de grandeur que sous micro-ondes. De même, l'essai effectué en conditions équimolaires de (**82**) et d'alcool benzylique (entrée 2) a induit la formation non négligeable de l'anomère (**86α**). L'utilisation du catalyseur complexé au DMSO aurait pu résoudre ce problème puisque les travaux du laboratoire n'ont montré aucune formation de (**86α**) en chimie de flux dans le cas où le donneur (**82**) est en excès par rapport à l'alcool benzylique.<sup>135</sup> Ces essais n'ont pas été effectués car d'autres solutions ont été trouvées.

Parallèlement à ces tentatives en flux ou sous micro-ondes, une conversion quasi-totale du donneur (**82**) et la formation exclusive de l'anomère β ont été observées, après 5 jours dans des conditions équimolaires de donneur et d'accepteur, à une température de 4°C, sans agitation. Pour rappel, ces quantités équimolaires de substrats, sous micro-ondes ou en flux, induisaient la formation non négligeable de l'anomère (**86α**) (tableau 1 et tableau 2). Pour des questions de simplicité de mise en œuvre, la réaction de glycosylation a été testée en voie classique (tableau 3).

<sup>136</sup> Kappe, C. O. ; Pieber, B. ; Dallinger, D., *Angew. Essays*, **2013**, 52, 1088-1094.

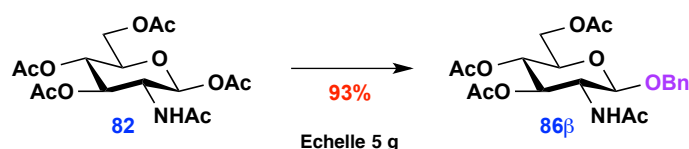
<sup>137</sup> Glasnov, T. N. ; Kappe, C. O., *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 11956-11968.

\* Estimation des rendements par RMN <sup>1</sup>H, après purification du mélange.

Entrée	Donneur ( <b>82</b> )	Accepteur (BnOH)	Fe(OTf) <sub>3</sub>	Conditions	Rdt ( <b>86α</b> )	Rdt ( <b>86β</b> )
1	1.0 éq. (1.01 g)	1.0 éq.	15 %mol	4°C, 5 jours	/	67% (0,73 g)
2	1.0 éq. (1.00 g)	1.1 éq.	15 %mol	t.a., 2 jours	/	84% (0,92 g)
3	1.0 éq. (1.00 g)	1.3 éq.	15 %mol	t.a., 2 jours	/	93% (1.01 g)

Tableau 3

Un premier essai a été effectué avec un léger excès d'alcool benzylique (1,1 éq.), à température ambiante dans le dichlorométhane (entrée 2). Le produit (**86β**) a été formé exclusivement, après 2 jours de réaction, avec une très bonne conversion du substrat (**82**) et un très bon rendement après purification. Dans une volonté d'optimisation, la réaction a été testée dans les mêmes conditions avec 1,3 équivalent d'alcool benzylique (entrée 3). Ces conditions ont donné un meilleur rendement de 93% en gardant la formation exclusive du glycoside de benzyle (**86β**). Elles ont pu être reproduites sur des quantités plus importantes de substrat de départ (**82**) (schéma 54).

Schéma 54 : Réactifs et conditions : (**82**) (1,0 éq.), alcool benzylique (1,3 éq.), Fe(OTf)<sub>3</sub> (15 %mol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 2 jours

La glycosylation de l'alcool benzylique, par voie classique, nous a donc permis d'obtenir exclusivement le composé (**86β**) avec un très bon rendement et une meilleure conversion du substrat (**82**).

### C. Protection des hydroxyles 3 et 6

La stéréochimie  $\beta$  de la position anomère étant fixée par le groupement benzyle, l'étape suivante a consisté à déprotéger les hydroxyles 3, 4 et 6. L'équipe de Zemplén a décrit en 1923 la déprotection du glucose per-acétylé en utilisant une solution de méthanolate de sodium ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ ) dans le méthanol.<sup>138</sup> Ce n'est que quelques années plus tard qu'il a amélioré sa méthode en n'utilisant qu'une quantité catalytique de méthanolate pour déprotéger l'octaacétate de cellobiose (schéma 55).<sup>139</sup> Des conditions aujourd'hui très couramment utilisées afin de désacétyler des dérivés saccharidiques.

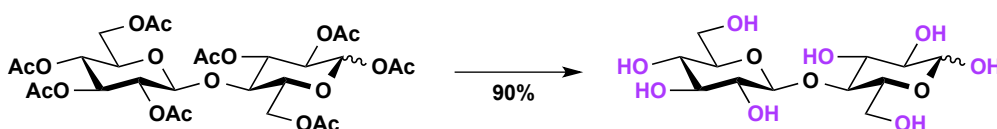


Schéma 55 : Réactifs et conditions :  $\text{CH}_3\text{ONa}$  0,1 M (7 %mol),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 3h

La désacétylation du composé (**86 $\beta$** ) s'est donc inspirée des conditions de Zemplén (schéma 56).

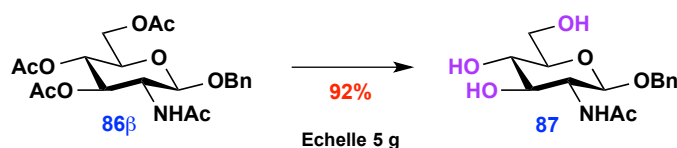


Schéma 56 : Réactifs et conditions :  $\text{CH}_3\text{ONa}$  0,5 M (25 %mol),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 30 min

Après 30 minutes à température ambiante et neutralisation avec une résine Dowex®  $\text{H}^+$ , le triol (**87**) a été obtenu avec un rendement de 92% sans purification. La libération de ces trois fonctions hydroxyles a alors diminué fortement la solubilité du composé (**87**) dans les solvants organiques usuels (acétate d'éthyle, dichlorométhane, méthanol, acétonitrile, acétone). Il restait néanmoins soluble dans l'eau, le diméthylformamide ou le diméthylsulfoxyde.

La suite de la synthèse a consisté en la protection sélective des fonctions hydroxyles 3 et 6 afin d'effectuer l'introduction du groupement propargyle sur la position 4. La fonction hydroxyle en position 6 est primaire ; le choix d'un groupe protecteur encombré permettrait de la protéger en une seule étape, de manière sélective. Cette protection doit également être orthogonale aux autres afin d'introduire la diversité moléculaire souhaitée en fin de synthèse. En revanche, les hydroxyles 3

<sup>138</sup> Zemplén, G. ; Kunz, A., *Chem. Ber.*, **1923**, 56, 1705-1710.

<sup>139</sup> Zemplén, G. ; Gerecs, A. ; Hadácsy, I., *Chem. Ber.*, **1936**, 69, 1827-1829.

et 4 ont des réactivités comparables vis-à-vis de protections courantes, il est donc difficile d'effectuer la protection unique de l'hydroxyle 3 en une seule étape (schéma 57).

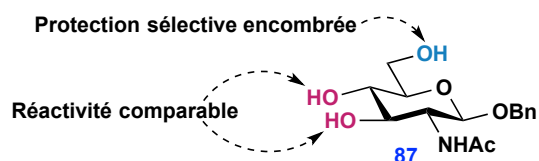


Schéma 57

L'équipe de Jeanloz a travaillé sur les mêmes composés et a réalisé cette protection de la fonction hydroxyle en position 3 grâce à l'utilisation préalable d'une protection de type acétal, sélective des hydroxyles 4 et 6, grâce à la formation thermodynamiquement favorisée d'un cycle à 6 chaînons (schéma 58).<sup>140</sup>

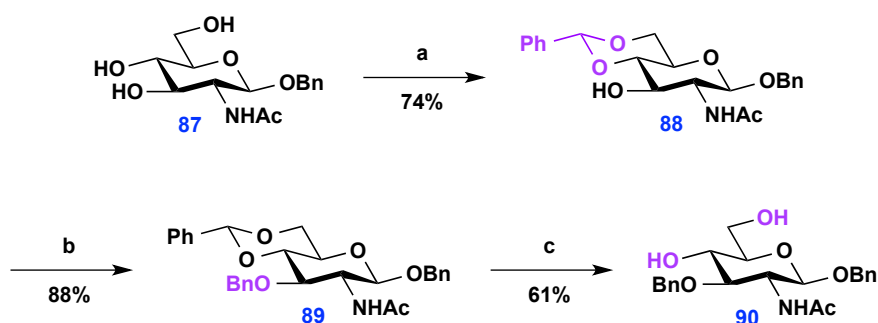
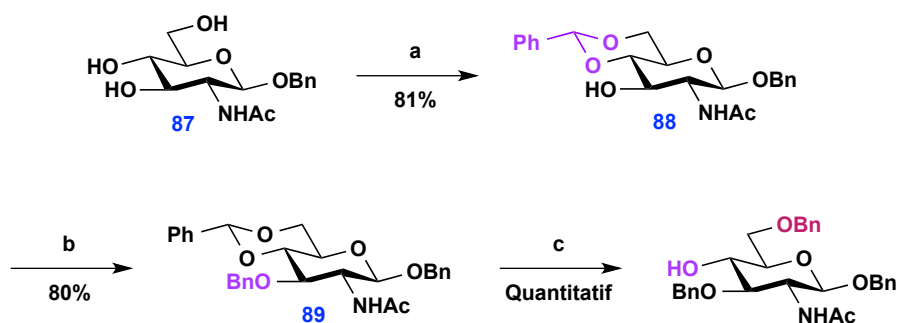


Schéma 58 : *Réactifs et conditions* : (a) benzaldéhyde,  $ZnCl_2$ ,  $Et_2O$ , t.a., 18h ; (b) bromure de benzyle,  $BaO$ ,  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ , DMF, t.a., 3h ; (c) acide acétique 60%, 100°C, 2h

Plus récemment, L'équipe de Linhardt a effectué également les mêmes travaux afin de protéger cet hydroxyle en position 3.<sup>141</sup> La différence est que le benzylidène n'a pas été déprotégé par la suite mais a subi une ouverture réductrice afin de libérer uniquement la position 4 et garder un groupement benzyle en position 6 (schéma 59). Cette séquence n'a pas pu être envisagée ici car elle ne permettait pas d'obtenir un groupement protecteur orthogonal en position 6.

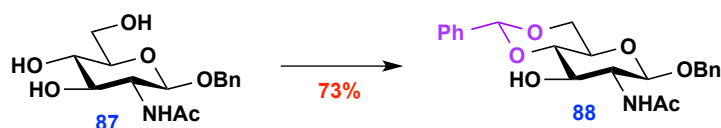
<sup>140</sup> (a) Gross, P. H. ; Jeanloz, R. W., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 2759-2763. (b) Shaban, M. A. E. ; Jeanloz, R. W., *Carbohydr. Res.*, **1976**, 52, 115-127.

<sup>141</sup> Bera, S. ; Linhardt, R. J., *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 3181-3193.



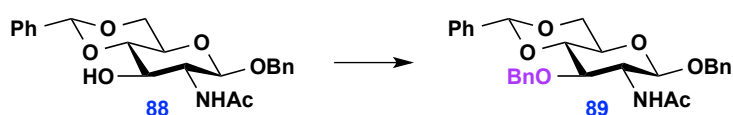
**Schéma 59** : Réactifs et conditions : (a) benzaldéhyde diméthylacétal, APTS, DMF, t.a., 12h ; (b) bromure de benzyle, BaO, Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, DMF, 0°C à t.a., 18h ; (c) triéthylsilane, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 1h

Le début de la séquence de l'équipe de Linhardt a été repris afin d'obtenir le composé **(88)**.<sup>141</sup> Le meilleur résultat a été obtenu avec 3 équivalents de benzaldéhyde diméthylacétal et une quantité catalytique d'acide *p*-toluènesulfonique (APTS) dans un mélange acétonitrile/diméthylformamide. La précipitation du produit **(88)** a alors été observée au fur et à mesure de sa formation. Le benzylidène semblait donc induire une perte de solubilité supplémentaire. Du diméthylsulfoxyde ou un mélange de solvants en grandes quantités, tel que dichlorométhane/méthanol, a alors été nécessaire pour solubiliser le produit obtenu. L'acétal **(88)** propre a tout de même été récupéré avec un rendement de 73% après purification sur colonne chromatographique (schéma 60).



**Schéma 60** : Réactifs et conditions : benzaldéhyde diméthylacétal (3 éq.), APTS·H<sub>2</sub>O (0,5 éq.), CH<sub>3</sub>CN/DMF, t.a., 16h

L'étape suivante a permis de protéger l'hydroxyle en position 3 sous la forme d'un éther de benzyle. La méthode classique est de réaliser l'addition nucléophile, en milieu basique, de l'alcool sur du bromure de benzyle (BnBr). Les hydrures sont couramment utilisées pour leur grande basicité, permettant des benzylations très efficaces. Les sels de baryum, plus souvent mis en oeuvre en glycochimie, peuvent également donner de bons résultats.<sup>140,141</sup> Des essais ont donc été réalisés en faisant varier ces conditions basiques (tableau 4). Le substrat **(88)** a été mis en suspension dans le diméthylformamide dans chaque cas.



Entrée	BnBr	Base	Conditions (conversion*)	Rdt ( <b>89</b> )
1	1,6 éq.	BaO (3,0 éq.) Ba(OH) <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O (0,5 éq.)	t.a., 21h (totale)	Indéterminé (Produit impur)
2	3,0 éq.	NaH (3,0 éq.)	t.a., 3h (totale)	Indéterminé (Produit impur)

Tableau 4

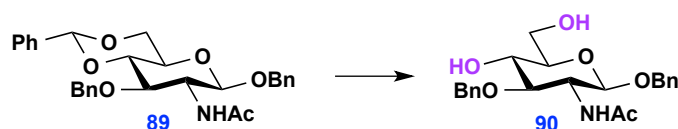
Des résultats similaires en terme de conversion ont été obtenus, ce qui semblait montrer que la base choisie avait peu d'importance. Cependant, le produit (**89**) était encore moins soluble que le benzylidène (**88**). En effet, il n'était que faiblement soluble dans le diméthylsulfoxyde. Aucun traitement classique ni purification n'ont pu être envisagé afin de récupérer le composé (**89**), sans la présence de sels et d'impuretés. Aucun rendement n'a donc été calculé pour cette étape. Il a tout de même été possible de réaliser une analyse RMN, sur un lot comportant moins d'impuretés, afin de le caractériser de manière assez précise pour confirmer sa structure et ainsi continuer la synthèse avec cet intermédiaire (**89**) non purifié.


 Schéma 61 : Réactifs et conditions : bromure de benzyle (1,6 éq.), BaO (3,0 éq.), Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (0,5 éq.), DMF, t.a., 21h

Un benzylidène est généralement déprotégé en milieu acide. L'équipe de Jeanloz a effectué, par exemple, cette déprotection dans l'acide acétique (AcOH) à 60% dans l'eau, à chaud.<sup>140b</sup> Une autre méthode permettant de retirer le benzylidène est l'hydrogénolyse, catalysée au palladium.<sup>142</sup> Cette dernière méthode n'a pas pu être envisagée car elle déprotègerait également l'ensemble des éthers benzyliques présent sur le composé (**89**). Différents essais d'hydrolyse acide ont ainsi été réalisés en modifiant l'acide utilisé (tableau 5).

\* Conversion de (**88**) détectée par CCM.

<sup>142</sup> Wood, Jr., H. B. ; Fletcher, Jr., H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 2849-2851.



Entrée	Acide/solvant	Conditions (conversion*)	Rdt ( <b>90</b> )
1	AcOH 60% dans H <sub>2</sub> O	reflux, 90 min (totale)	64%
2	TFA ( <b>16 éq.</b> ) dans CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (8:1)	t.a. à 60°C, 2 jours (quasi-totale)	45%

Tableau 5

Le premier essai (entrée 1) a été effectué en utilisant l'acide acétique dans l'eau, selon les conditions de Jeanloz.<sup>140b</sup> Cependant, en partant d'un substrat (**89**) impur, un brut réactionnel complexe a été obtenu. Une purification partielle a pu être effectuée, mais différents essais dans les mêmes conditions ont montré un rendement et une pureté en diol (**90**) non reproductibles. Un rendement de 64% en produit (**90**) a tout de même pu être estimé sur un lot, après purification (schéma 62).

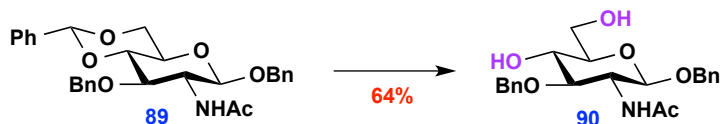


Schéma 62 : Réactifs et conditions : acide acétique 60%, reflux, 90 min

L'utilisation de l'acide trifluoroacétique (TFA) est également courante pour déprotéger les benzylidènes.<sup>143</sup> Dans ce cas, elle devait permettre d'avoir des conditions de réaction thermiquement plus douces que précédemment. L'essai réalisé (entrée 2) a bien montré la formation du composé (**90**) mais 16 équivalents d'acide et une augmentation de la température du milieu réactionnel ont été nécessaires pour observer cette conversion. Cela pourrait s'expliquer par l'utilisation d'un lot d'acide trifluoroacétique de mauvaise qualité. Aucun nouvel essai n'a été réalisé avec un lot neuf.

Finalement, ces étapes de protection de l'hydroxyle en position 3 ont montré une certaine efficacité puisque de très bonnes conversions ont été obtenues mais des problèmes de solubilité et de pureté des produits sont apparus. Des solutions ont donc dû être trouvées afin d'obtenir le monosaccharide propargylique souhaité. La recherche d'intermédiaires plus solubles a été envisagée.

\* Conversion de (**89**) détectée par CCM.

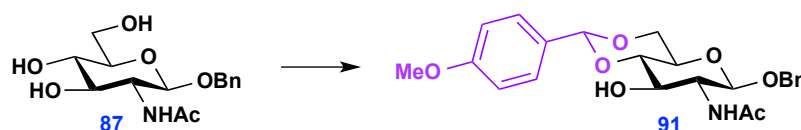
<sup>143</sup> Paulsen, H. ; Lorentzen, J. P., Kutschker, W., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 136, 153-176.



## D. Utilisation d'une autre protection acétal pour les hydroxyles 4 et 6

Le motif acétamido induit souvent une faible solubilité des dérivés saccharidiques  $\beta$ . Mais le benzylidène, introduit précédemment, semblait avoir eu un impact plus important sur la perte de solubilité des intermédiaires **(88)** et **(89)**. Il pourrait donc être intéressant d'essayer d'autres protections de type acétal afin d'obtenir des intermédiaires plus solubles.

L'introduction d'un groupement méthoxy sur le phényle pourrait apporter une meilleure solubilité dans les solvants polaires. La formation d'un *p*-méthoxybenzylidène a donc été envisagée à la place du benzylidène. Le *p*-méthoxybenzaldéhyde diméthylacétal est couramment utilisé pour réaliser cette protection.<sup>144,145</sup> Plusieurs essais ont été réalisés afin d'optimiser la formation de l'acétal **(91)** (tableau 6).



Entrée		Acide	Solvant	Conditions	Rdt <b>(91)</b>
1	3 éq.	<b>APTS.H<sub>2</sub>O</b> (0,5 éq)	CH <sub>3</sub> CN/DMF	t.a., 30h	<b>28 %</b>
2	2 éq.	<b>APTS.H<sub>2</sub>O</b> (0,8 éq)	DMF	t.a., 24h	<b>17%</b>
3	2 éq.	<b>ACS</b> (0,5 éq.)	DMF	t.a., 3 jours	<b>19%</b>
4	2 éq.	<b>APTS<sub>anh</sub></b> (1,0 éq)	DMF	t.a., 2 jours	/
5	2 éq.	<b>APTS.H<sub>2</sub>O</b> (0,5 éq)	DMF	<b>Tamis 4Å</b> , t.a., 18h	<b>37% (RMN)</b>

Tableau 6

Un premier essai (entrée 1) a été réalisé en suivant les mêmes conditions que précédemment (schéma 60). Une conversion moyenne en produit **(91)** a été observée mais le mélange réactionnel était homogène, contrairement au milieu obtenu avec le benzylidène **(88)**. Un rendement de 28% en acétal **(91)** a pu être obtenu après purification (schéma 63).

<sup>144</sup> Lubineau, A. ; Augé, C. ; Bouxom, B. ; Gautheron, C., *J. Carb. Chem.*, **1992**, 11, 59-70.

<sup>145</sup> Thomas, R. L. ; Abbas, S. A. ; Matta, K. L., *Carbohydr. Res.*, **1988**, 183, 163-173.

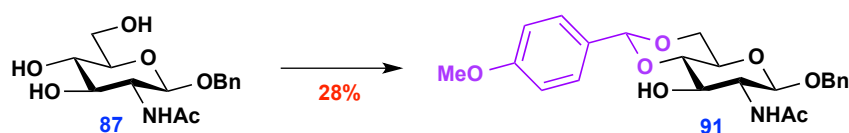


Schéma 63 : *Réactifs et conditions* : *p*-méthoxybenzaldéhyde diméthylacétal (3,0 éq.), APTS.H<sub>2</sub>O (0,5 éq.), CH<sub>3</sub>CN/DMF, t.a., 30h

Le produit semblait effectivement gagner légèrement en solubilité et sa purification sur colonne chromatographique a été plus simple que pour le dérivé benzylidène (**88**). Ce groupement méthoxy a donc visiblement eu un effet positif sur la solubilité du produit. En revanche, l'efficacité de la réaction était moyenne et une optimisation a été envisagée.

L'équipe de Lubineau a décrit sur ce même substrat (**87**) une protection rapide et efficace des fonctions hydroxyles 4 et 6 dans des conditions similaires.<sup>144</sup> Les conditions ont donc été reproduites (entrée 2), mais la conversion observée après 24h était très faible, malgré l'ajout important de catalyseur acide. Un faible rendement de 17% en produit (**91**) a ainsi été obtenu après purification.

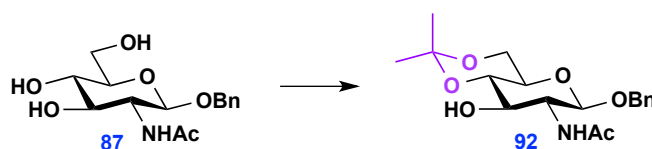
Les acétals sont des fonctions très sensibles à la présence d'eau. Partant de l'hypothèse que l'équivalent d'eau introduit avec l'acide *p*-toluènesulfonique a induit une forte chute du rendement, la réaction a été testée avec l'acide camphorsulfonique (ACS) (entrée 3),<sup>146</sup> qui n'est pas hydraté. La conversion après trois jours était très faible et le produit (**91**) a été obtenu avec un rendement de 19% après purification. Un autre essai a été réalisé avec de l'acide *p*-toluènesulfonique sec (entrée 4) mais aucune conversion n'a pu être observée après 2 jours. Les conditions anhydres ne semblaient donc pas améliorer le rendement de cette acétalisation.

Le méthanol formé lors de la réaction pouvait aussi avoir une influence sur la conversion et déplacer l'équilibre dans le sens de reformation du substrat de départ (**87**). Afin d'évaluer cet impact, la réaction a été réalisée en utilisant du tamis moléculaire 4 Å (entrée 5) afin de piéger l'eau présente dans le milieu et le méthanol formé lors de la réaction, permettant ainsi de déplacer l'équilibre vers la formation du composé (**91**). Après 3 jours à température ambiante, une conversion de 37% en produit (**91**) a été estimée par RMN. Piéger le méthanol a donc amélioré légèrement la conversion mais le rendement restait faible.

L'optimisation des conditions de synthèse du *p*-méthoxybenzylidène a donc apporté peu de résultats concluants. Le rendement en produit (**91**) finalement obtenu restait faible et ne compensait pas le léger gain de solubilité par rapport au composé (**88**).

<sup>146</sup> Ferro, V. ; Mocerino, M. ; Stick, R. V. ; Tilbrook, M. G., *Aust. J. Chem.*, **1988**, 41, 813-815.

L'équipe d'Anderson a décrit la protection des hydroxyles 4 et 6 du substrat (**87**) par un isopropylidène.<sup>147</sup> Une protection également couramment utilisée en glycochimie.<sup>148,149</sup> Des tests d'introduction de cette nouvelle protection ont donc été réalisés en utilisant classiquement le 2,2-diméthoxypropane (tableau 7).




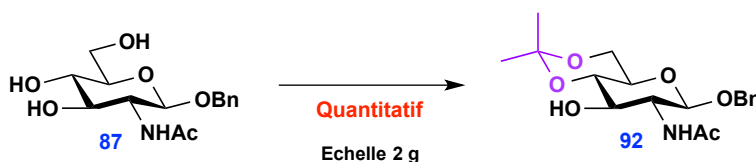
Entrée		Acide	Solvant	Conditions	Rdt ( <b>92</b> )
1	25 éq.	APTS (10 %mol)	Acétone	reflux, 3h	52%
2	15 éq.	APTS (10 %mol)	DMF	40°C, 250 mbar, 1h	Quantitatif

Tableau 7

Le premier essai réalisé (entrée 1), reproduisant les conditions de l'équipe d'Anderson, a permis d'obtenir de bons résultats pour cette protection. Une excellente conversion a rapidement été observée et le produit (**92**) a été isolé avec un rendement de 52% après purification. Mais le constat le plus intéressant de cet essai a été que l'isopropylidène (**92**) ne montrait plus de problèmes de solubilité. Il était parfaitement soluble dans les solvants organiques usuels, tel que le dichlorométhane.

L'expérience a montré que l'utilisation de l'évaporateur rotatif pouvait être très pratique pour réaliser des protections de diol sous forme d'acétal.<sup>150</sup> En effet, il permet l'agitation et la chauffe du milieu réactionnel mais aussi l'évaporation des sous-produits formés, déplaçant ainsi l'équilibre dans le sens de formation du diol protégé. Un second essai a donc été réalisé à l'évaporateur rotatif et, après 1h à 40°C sous une pression de 250 mbar, le produit (**92**) a été obtenu de manière quantitative sans purification.

Schéma 64 : Réactifs et conditions : 2,2-diméthoxypropane (15 éq.), APTS.H<sub>2</sub>O (10 %mol), DMF, 40°C, 250 mbar, 1h

<sup>147</sup> Dasgupta, F. ; Anderson, L., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 202, 239-255.

<sup>148</sup> Roche, D. ; Greiner, J. ; Aubertin, A.-M. ; Vierling, P., *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 1568-1581.

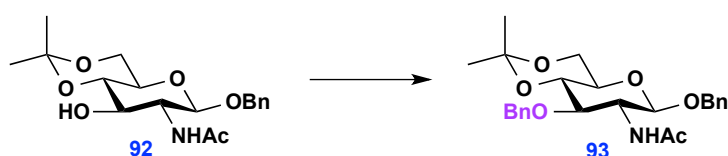
<sup>149</sup> Kasun, Z. A. ; Geary, L. M. ; Krische, M. J., *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 7545-7547.

<sup>150</sup> Bredenkamp, A. ; Zhu, Z.-B. ; Kirsch, S. F., *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 252-254.

Cette protection par un isopropylidène pourrait donc résoudre les problèmes de purification observés sur les composés comportant un benzylidène. En effet, le composé **(92)** ne montrant plus de problèmes de solubilité, les intermédiaires suivants pourraient également être plus solubles ce qui faciliterait leur synthèse et leur purification.

## E. Protection de l'hydroxyle en position 3 et déprotection de l'isopropylidène

Partant de l'acétal **(92)**, l'hydroxyle libre en position 3 a pu être protégé par un benzyle. Cette étape avait déjà été réalisée sur le benzylidène **(88)** (schéma 61). Des tentatives de benzylation ont donc été effectuées (tableau 8) dans les mêmes conditions que précédemment (tableau 4). Dans tous les cas, le solvant utilisé était le diméthylformamide.

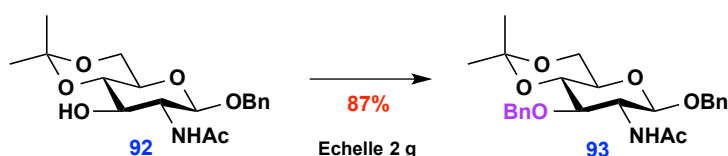


Entrée	BnBr	Base	Conditions	Rdt ( <b>93</b> )
1	2,0 éq.	NaH (1,5 éq.)	t.a., 15 min	46%
2	1,5 éq.	BaO (3,0 éq.) Ba(OH) <sub>2</sub> .8H <sub>2</sub> O (0,5 éq)	t.a., 19h	87%

Tableau 8

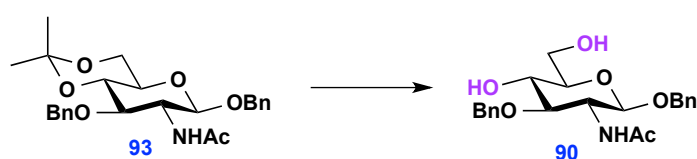
Un premier essai (entrée 1) a été réalisé en utilisant l'hydrure de sodium afin d'avoir une conversion rapide. Après seulement 15 minutes à température ambiante, la conversion totale du substrat **(92)** a effectivement été observée mais la formation d'impuretés non identifiées a induit un rendement de 46% en produit **(93)** après purification.

Un autre essai (entrée 2) a été réalisé en utilisant les sels de baryum. Une conversion totale a également été obtenue, mais plus lente qu'avec les hydrures. Un brut réactionnel plus propre que le premier essai a été observé et le produit **(93)** a pu être obtenu avec un rendement de 87% après filtration des sels insolubles sur Célite® et purification sur gel de silice (schéma 65). En effet, à l'inverse du composé **(89)**, la solubilité du produit **(93)** était très bonne dans les solvants organiques usuels. Les sels de baryum pouvaient être facilement filtrés sur Célite®, après dilution dans du dichlorométhane.



**Schéma 65** : Réactifs et conditions : bromure de benzyle (1,5 éq.), BaO (3,0 éq.), Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (0,5 éq.), DMF, t.a., 19h

Comme précédemment (schéma 62), l'hydroxyle en position 3 étant maintenant protégé, l'isopropylidène a pu être retiré afin de fonctionnaliser les hydroxyles en position 4 et 6. Différentes conditions acides ont été mises en œuvre afin de réaliser cette étape (tableau 9).

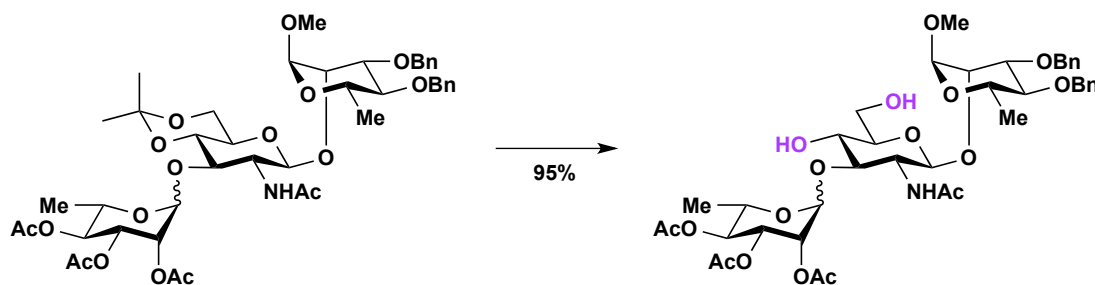


Entrée	Acide	Solvant	Conditions	Rdt ( <b>90</b> )
1	AcOH 60%	H <sub>2</sub> O	60°C, 40 min	51%
2	TFA 50% dans H <sub>2</sub> O (10 éq.)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0°C puis t.a., 1h	88%

Tableau 9

Précédemment, un essai de déprotection du composé (**89**) comportant le benzylidène avait été réalisé avec de l'acide acétique, à chaud. Ces conditions ont été reproduites (entrée 1). La conversion du substrat (**93**) était totale mais les conditions relativement dures ont entraîné la formation d'impuretés et donc induit, après purification, un rendement de 51% pour le diol (**90**).

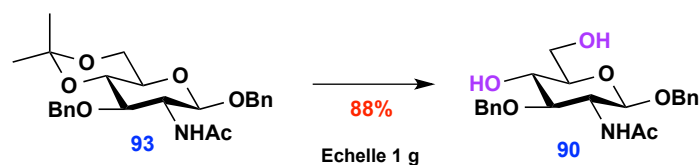
L'équipe de Mulard a réalisé cette déprotection sur différents dérivés oligosaccharidiques, comportant une unité glucosamine, en utilisant de l'acide trifluoroacétique aqueux, à froid (schéma 66).<sup>151</sup>



**Schéma 66** : Réactifs et conditions : acide trifluoroacétique 50% dans H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 1h15

<sup>151</sup> Segat-Dioury, F. ; Mulard, L. A., *Tetrahedron : Asymmetry*, **2002**, 13, 2211-2222.

Un autre essai (entrée 2) a donc été réalisé en suivant leurs conditions. Le substrat **(93)** a été mis en solution dans du dichlorométhane puis l'ajout de l'acide trifluoroacétique à 50% a été réalisé à froid. La conversion était totale après 1 heure à température ambiante et le produit **(90)** a pu être obtenu après purification avec un rendement de 88% (schéma 67).

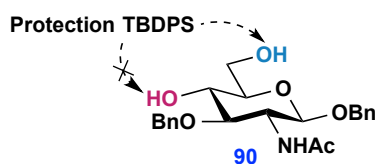


**Schéma 67** : Réactifs et conditions : acide trifluoroacétique 50% dans H<sub>2</sub>O (10 éq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 1h

Le changement du benzylidène par un isopropylidène a donc permis d'obtenir de meilleurs rendements et des intermédiaires plus solubles. Les purifications étaient ainsi plus simples et la montée en échelle de l'intermédiaire **(90)** a pu être effectuée.

## F. Protection sélective de l'hydroxyle en position 6

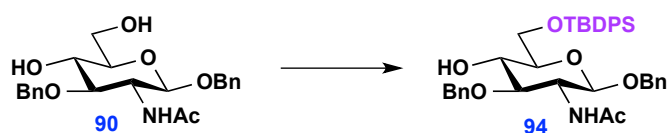
Afin de pouvoir introduire sélectivement la fonction propargyle sur l'hydroxyle en position 4, il a été nécessaire de protéger sélectivement l'hydroxyle en position 6. L'utilisation d'un groupement protecteur encombré, sélectif des hydroxyles primaires, a été envisagée. De plus, l'insertion finale d'un groupement sulfate sur cette position implique l'utilisation d'un groupe protecteur orthogonal aux autres protections présentes, permettant ainsi de déprotéger cet hydroxyle et d'insérer le sulfate des analogues finaux de manière régiocontrôlée. Un groupement *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) a donc été envisagé (schéma 68).<sup>152</sup>



**Schéma 68**

Une manière classique d'introduire un groupement silylé sur un alcool est d'utiliser un chlorosilane et une base nucléophile, servant à la fois pour l'activation du silyle et de piégeage de l'acide chlorhydrique formé. Plusieurs essais ont ainsi été réalisés avec le *tert*-butyldiphénylchlorosilane (TBDPS-Cl) en faisant varier la base azotée et le solvant (tableau 10).

<sup>152</sup> Hanessian, S. ; Lavallée, P., *Can. J. Chem.*, **1975**, 53, 2975-2977.



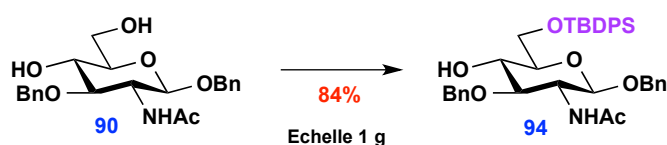
Entrée	TBDPS-Cl	Base/solvant	Conditions	Rdt ( <b>94</b> )
1	3,0 éq.	Imidazole (2,5 éq.), DMF (0,5 M)	t.a., 2h	48%
2	4,5 éq.	Pyridine (0,5 M)	t.a., 24h	79%
3	2,0 éq.	Pyridine/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:2, 0,5 M)	t.a., 3h	84%

Tableau 10

Un premier test (entrée 1) a été effectué en utilisant l'imidazole.<sup>153</sup> Une bonne conversion a rapidement été observée mais le substrat (**90**) n'était pas totalement consommé. Le produit (**94**) a donc été obtenu avec un rendement moyen de 48 % après purification.

L'équipe de Clinch et Robertson a utilisé une autre base azotée pour silyler la position 6 d'un dérivé de la glucosamine. Les auteurs ont choisi la pyridine qui sert à la fois de base et de solvant.<sup>154</sup> Leur conditions ont été reproduites (entrée 2) mais jusqu'à 4,5 équivalents de *tert*-butyldiphénylchlorosilane ont été nécessaires afin d'avoir une conversion totale. La réaction restait très lente et un précipité se formait au fur et à mesure de l'avancement. La purification a permis d'obtenir le produit (**94**) avec un rendement de 79%.

Afin d'améliorer la vitesse de réaction, l'ajout d'un solvant permettant la solubilisation du précipité a été envisagée (entrée 3). La réaction a été effectuée dans un mélange pyridine/dichlorométhane (1:2)<sup>155</sup> et la conversion était totale après 3 heures avec seulement 2 équivalents de *tert*-butyldiphénylchlorosilane. Le composé (**94**) a pu être obtenu après purification avec un rendement de 84% (schéma 69).


 Schéma 69 : Réactifs et conditions : *tert*-butyldiphénylchlorosilane (2 éq.), pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 3h

L'ajout de dichlorométhane semblait donc améliorer l'efficacité de la réaction, en terme de durée, tout en conservant un bon rendement.

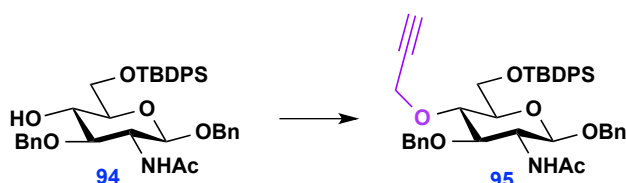
<sup>153</sup> (a) Corey, E. J. ; Venketeswarlu, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6190-6191. (b) Corey, E. J. ; Varma, R. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 7319-7320.

<sup>154</sup> Clinch, K. ; Evans, G. B. ; Furneaux, R. H. ; Rendle, P. M. ; Rhodes, P. L. ; Robertson, A. M. ; Rosendale, D. I. ; Tyler, P. C. ; Wright, D. P., *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337, 1095-1111.

<sup>155</sup> Ireland, R. E. ; Norbeck, D. W. ; Mandel, G. S. ; Mandel, N. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3285-3294.

## G. Propargylation de l'hydroxyle en position 4

Afin de terminer la synthèse de la première brique monosaccharidique, la propargylation de l'hydroxyle libre en position 4 a été envisagée. La même méthode que celle employée précédemment (schéma 65) pour introduire le benzyle en position 3 a pu être exploitée. La présence de bromure de propargyle et d'une base suffisamment forte, pour activer l'alcool en alcoolate et induire la substitution du bromure, a été nécessaire. Différents essais en utilisant plusieurs bases ont été réalisés. Dans tous les cas, le solvant utilisé est le DMF (tableau 11).



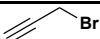
Entrée		Base	Conditions	Rdt (95)	Rdt (96)
1	2,0 éq.	BaO (3,0 éq.) Ba(OH) <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O (1,3 éq.)	t.a., 24h	25%	35%
2	1,5 éq.	DBU (1,5 éq.)	t.a., 24h	/	/
3	1,5 éq.	NaH (1,2 éq.)	t.a., 30 min	30%	Formé*
4	3,0 éq.	NaH (2,5 éq.)	t.a., (4h)	/	Formé <b>exclusivement*</b>
5	1,0 éq.	NaH (1,0 éq.)	t.a., 10 min	43 %	Formé*
6	1,3 éq.	NaH (1,1 éq.)	t.a., 20 min	66 %	Formé*

Tableau 11

L'équipe de Linhardt a réalisé cette propargylation en utilisant des sels de baryum comme base ( $pK_a = 12$ ) sur un composé très similaire à (**94**), comportant un groupe benzyle à la place du groupement silylé.<sup>141</sup> Un premier essai a donc été réalisé selon ces conditions (entrée 1). Après plusieurs heures, la formation du produit attendu (**95**) et l'apparition d'un autre composé (**96**), 4,6-dipropargylé, ont été observées. Après purification, des rendements de 25% pour le propargyle (**95**) et de 35% pour le sous-produit (**96**) ont été obtenus (schéma 70). Ces conditions basiques semblaient donc déprotéger rapidement le TBDPS et propargyler l'hydroxyle primaire libéré en position 6. La protection silylée, sensée être robuste car très encombrée, n'a visiblement pas résisté aux conditions basiques des sels de baryum. Cela va à l'encontre des travaux du groupe de Davies

\* Formation du sous-produit (**96**) détectée par CCM.



qui a démontré la stabilité de l'éther de *tert*-butyldiphénylsilyle en condition basique (NaOH 5% dans CH<sub>3</sub>OH).<sup>156</sup>

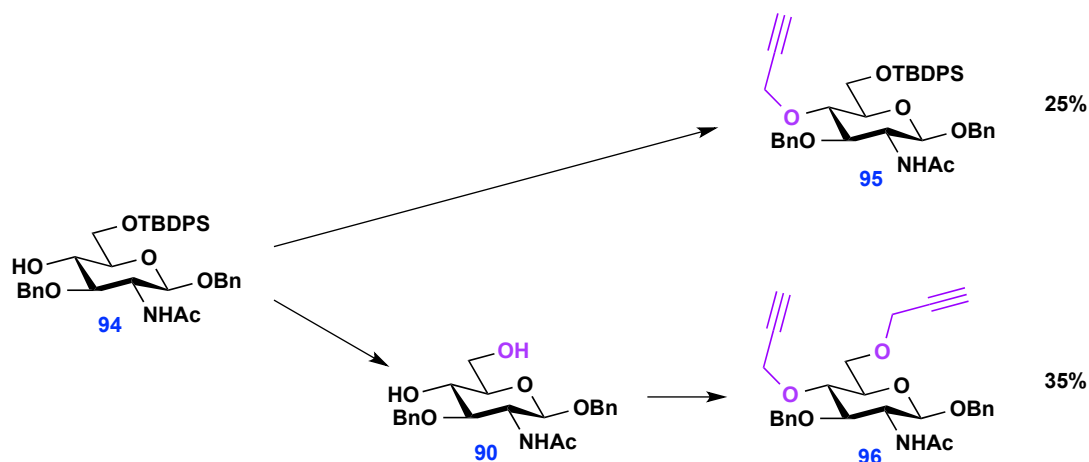


Schéma 70 : Réactifs et conditions : bromure de propargyle (2,0 éq.), BaO (3,0 éq.), Ba(OH)<sub>2</sub> (1,3 éq.), DMF, t.a., 24h

Un essai de propargylation utilisant le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) a été envisagé (entrée 2), une base de même force (pKa = 12) mais plus encombrée. Après plusieurs heures à température ambiante, aucune conversion du substrat (**94**) n'a été observée. Une hypothèse serait que l'encombrement du TBDPS empêcherait l'approche du DBU vers l'hydroxyle.

A l'inverse, plutôt que de chercher à éviter la déprotection du TBDPS, on peut chercher à utiliser une base plus forte, telle que des hydrures (pKa = 35). La réaction sur l'hydroxyle libre serait très efficace et le clivage de l'éther silylé pourrait être limité. Le risque supplémentaire, lié à l'utilisation d'une base très forte, est alors de propargyler également l'azote du groupement acétamido. L'équipe de Brimble a réalisé la per-propargylation de dérivés 2-acétamido-2-déoxyglucopyranose avec des hydrures de sodium.<sup>157</sup> Dans ses conditions, les auteurs n'ont montré aucune propargylation de l'azote, malgré l'utilisation d'hydrures (schéma 71).

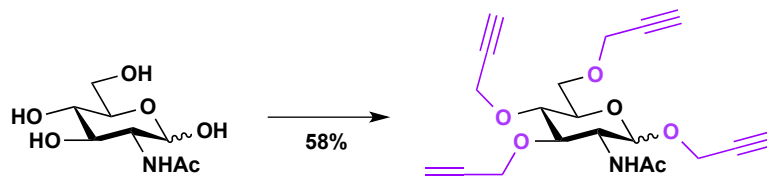
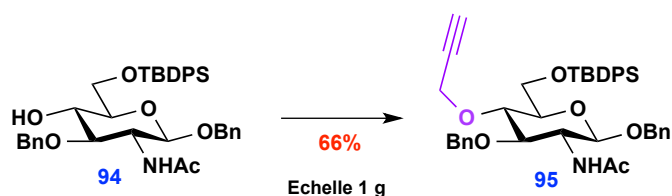


Schéma 71 : Réactifs et conditions : NaH, DMF, t.a. 2h puis bromure de propargyle, 0°C, 10 min

<sup>156</sup> Davies, J. S. ; Higginbotham, C. L. ; Tremeer, E. J. ; Brown, C. ; Treadgold, R. C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1992**, 3043-3048.

<sup>157</sup> Jun Lee, D. ; Yang, S.-H. ; Williams, G. ; Brimble, M. A., *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 7564-7571.

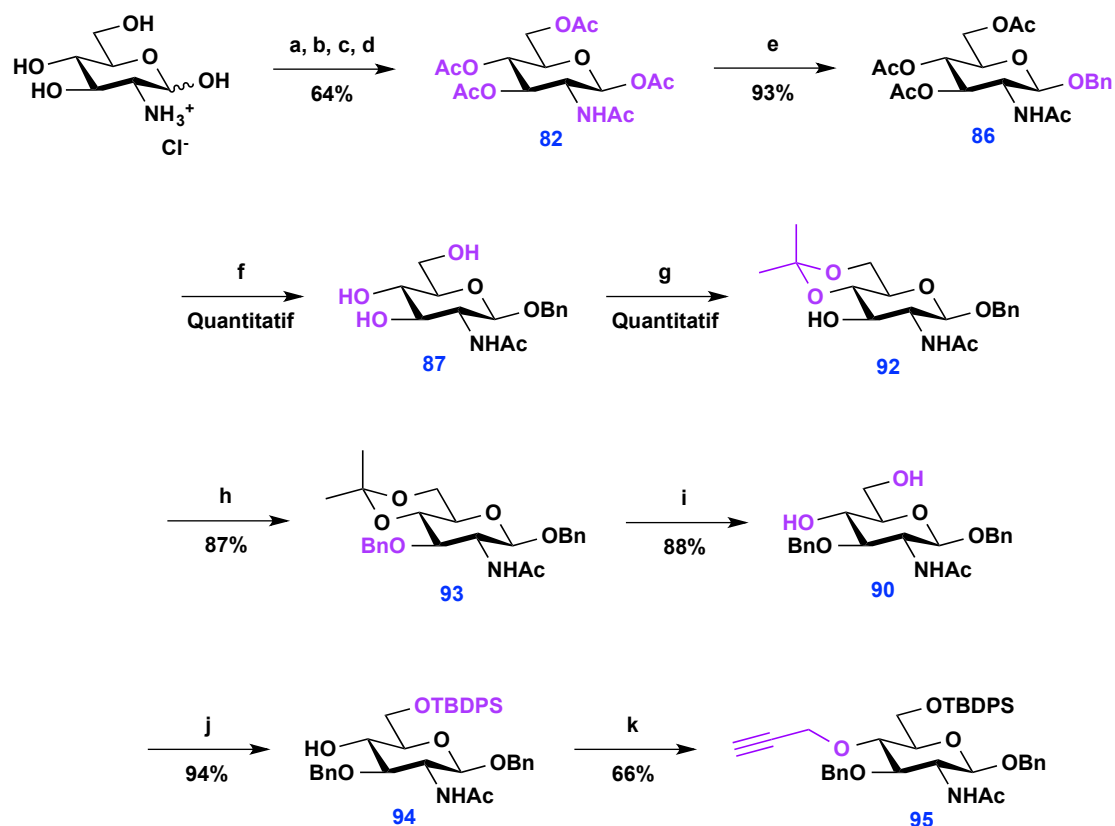
Plusieurs essais (entrée 3 à 6, tableau 11) en modifiant la quantité de NaH et de bromure de propargyle ont été réalisés afin d'obtenir le meilleur ratio monopropargylé (**95**)/dipropargylé (**96**). Dans tous les cas, le composé (**96**) a été obtenu. Le meilleur compromis a été l'ajout de 1,1 équivalent de NaH sur un mélange contenant le substrat (**94**) et 1,3 équivalents de bromure de propargyle, à température ambiante. Un rendement de 66% a alors été obtenu en produit (**95**) après purification (schéma 72).



**Schéma 72** : Réactifs et conditions : bromure de propargyle (1,3 éq.), NaH (1.1 éq.), DMF, t.a., 20 min

## H. Schéma réactionnel global de la brique monosaccharidique

La première brique monosaccharidique propargylique a donc été synthétisée avec un rendement global de 28% en 11 étapes (schéma 73).



**Schéma 73** Réactifs et conditions : (a) *p*-anisaldéhyde, NaOH 1N, t.a. ; (b) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, 0°C à t.a. ; (c) HCl 6N, acétone, Et<sub>2</sub>O, t.a. ; (d) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, 0°C à t.a. ; (e) BnOH, Fe(OTf)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a. ; (f) CH<sub>3</sub>ONa, CH<sub>3</sub>OH, t.a. ; (g) 2,2-diméthoxypropane, APTS, DMF, 40°C, 250 mbar ; (h) BnBr, BaO, Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, DMF, t.a. ; (i) TFA 50% dans H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a. ; (j) TBDPS-Cl, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a. ; (k) bromure de propargyle, NaH, DMF, t.a.

### III. SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ DISACCHARIDIQUE AZOTURE

#### A. Acétylyse de la chitine

Les travaux de l'équipe de Beau à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO), ont permis l'obtention d'oligosaccharides ( $\beta$ -1,4) de glucosamine (di, tri et tétra), per-acétylés, par acétylyse de la chitine (schéma 74),<sup>87</sup> un polymère de glucosamine extrêmement abondant naturellement.<sup>158</sup>

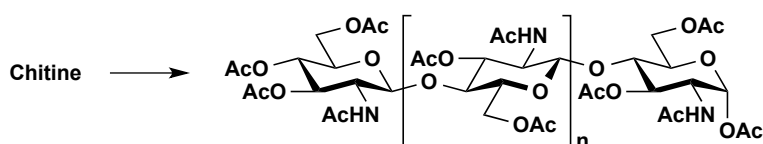


Schéma 74 :  $n=0$  (13,1%), 1 (8,2%) et 2 (6,5%)

Les rendements en oligosaccharides sont faibles mais ceux-ci sont obtenus purs en une seule étape. L'acétylyse de la chitine est une méthode connue depuis très longtemps dans le but d'obtenir principalement l' $\alpha$ -glucosamine ou l' $\alpha$ -chitobiose, per-acétylés.<sup>159</sup> L'avantage de cette méthode optimisée est qu'elle permet d'isoler également des oligomères plus longs avec des rendements acceptables.

Cette méthode a alors été mise en œuvre pour débiter la synthèse de la brique disaccharidique comportant le groupement azoture. Le disaccharide (**53**) a été obtenu après purification avec un rendement de 5,6% (schéma 75).

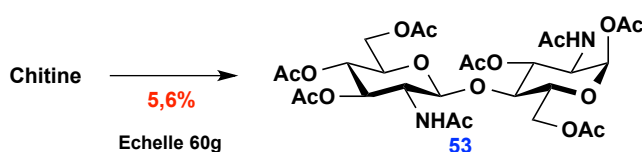


Schéma 75 : Réactifs et conditions : anhydride acétique,  $H_2SO_4$ , 3 h à 55°C, 16 h à t.a., 1 h à 55°C

L' $\alpha$ -glucosamine et l' $\alpha$ -chitotriose per-acétylés ont également été isolés avec des rendements respectifs de 2,5% et 4,6%.

Les rendements pour chacun des oligosaccharides obtenus ont été calculés en considérant la chitine de départ non pas comme une masse de chaînes polysaccharidiques de longueur variable

<sup>158</sup> (a) Muzzarelli, R. ; Jeuniaux, C. ; Gooday, G. W., *Chitin in Nature and Technology*, Plenum, New York, NY, **1986**. (b) Rinaudo, M., *Prog. Polym. Sci.*, **2006**, 31, 603-632.

<sup>159</sup> Barker, S. A. ; Foster, A. B. ; Stacey, M. ; Webber, J. M., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 2218-2227.

mais comme une seule grande chaîne, dont l'unité monomérique dépend du produit attendu. Dans le cas du disaccharide (**53**) obtenu, on considère le substrat de départ comme étant une longue chaîne du monomère chitobiose oxazoline (la forme « déshydratée » du chitobiose) (schéma 76).

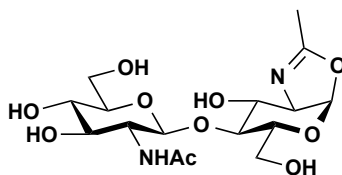


Schéma 76

L'unité monomérique considérée est différente selon l'oligosaccharide obtenu dont on souhaite calculer le rendement (schéma 77).

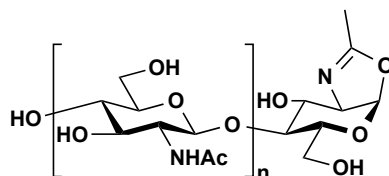


Schéma 77 :  $n = 0, 1$  ou  $2$

## B. Différenciation des fonctions amines

A la suite de l'acétylolyse, le projet de l'équipe de Beau était de pouvoir introduire des groupements trifluoroacétamido à la place des acétamido,<sup>87</sup> dans le but de pouvoir obtenir une oxazoline trifluorométhylée par la suite. Pour cela, ils ont cherché à mettre au point une étape de transacylation (schéma 78).

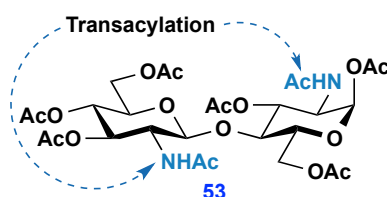


Schéma 78

Le groupe de Rota a mis en évidence des conditions de transacylation d'amides secondaires, notamment sur des glycosides ne comportant qu'un seul groupement acétamido (schéma 79).<sup>160</sup>

<sup>160</sup> Rota, P. ; Allevi, P. ; Colombo, R. ; Costa, M. L. ; Anastasia, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1850-1853.

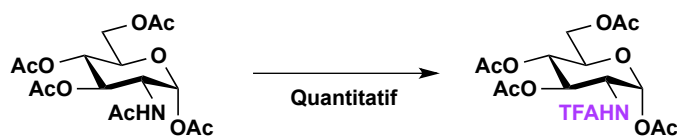


Schéma 79 : Réactifs et conditions : anhydride trifluoroacétique (5 éq.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $135^\circ\text{C}$ , 5 min puis  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 40 min

Les auteurs ont réalisé cette réaction en tube scellé, sous pression et atmosphère inerte, en agitant pendant 5 minutes à  $135^\circ\text{C}$  un mélange de substrat et d'anhydride trifluoroacétique dans l'acétonitrile. Ils expliquent qu'un premier intermédiaire imide mixte acétyle/trifluoroacétyle est formé rapidement, de manière réversible, et que les conditions sous pression permettent de cliver l'acétyle afin d'obtenir le groupement trifluoroacétamido (schéma 80).

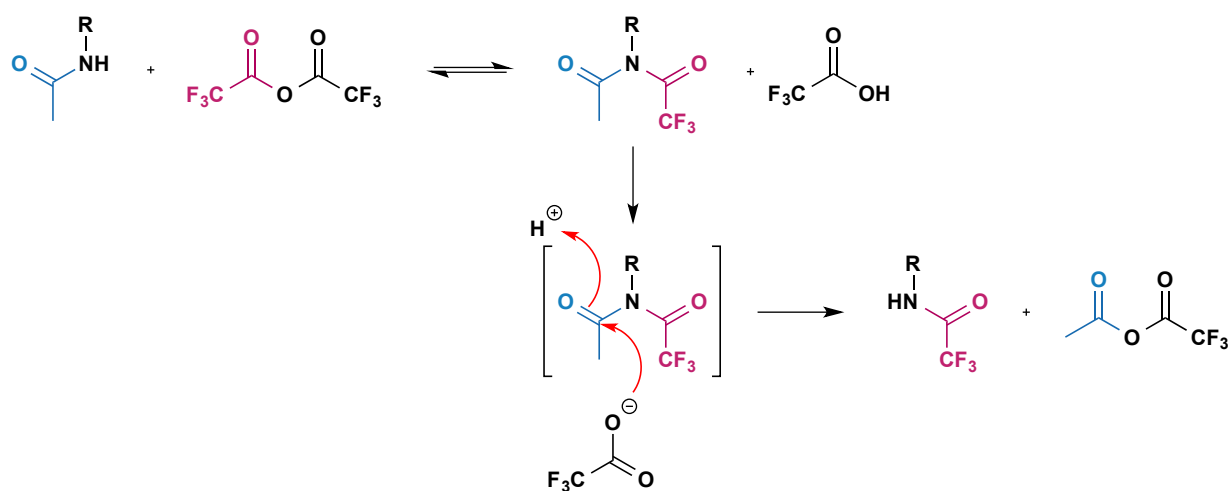


Schéma 80

L'équipe de Beau s'est appuyée sur ces conditions et a remarqué que la transacylation est plus rapide sur l'acétamido de l'unité réductrice du composé (**53**). Elle a alors mis en évidence que la réaction est plus lente sur des unités  $\beta$ -glycosidiques que sur des unités  $\alpha$ -glycosidiques. En effet, la gêne stérique semble plus importante sur une unité  $\alpha$ -glycosidique, dont l'acétyle anomère est axial, ce qui peut expliquer une décomposition plus rapide de l'imide mixte (schéma 81).

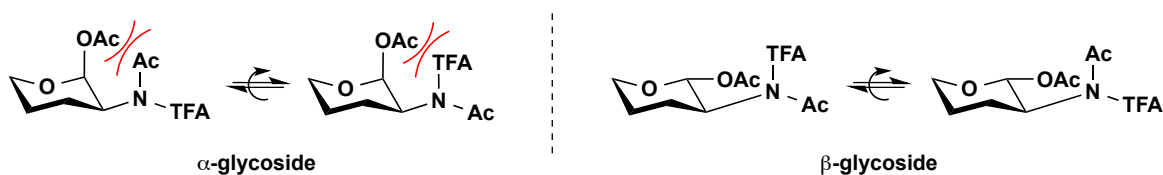


Schéma 81

Ce résultat est donc très intéressant car il permet d'introduire un trifluoroacétamido sur l'unité réductrice, important pour la suite de la synthèse, mais également d'obtenir un disaccharide N-différencié<sup>161</sup> (schéma 82). Dans le cadre de la synthèse de la brique disaccharidique azoture, cette différenciation est importante pour pouvoir introduire, en fin de synthèse, la chaîne carbonée propre aux lipo-chitooligosaccharides.

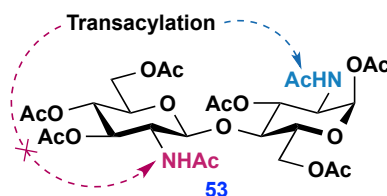


Schéma 82

En jouant sur la vitesse de réaction et le nombre d'équivalents d'anhydride trifluoroacétique, l'équipe de l'ICMMO est parvenue à obtenir des rendements de transacylation sélective allant jusqu'à 69%.<sup>87</sup> Ces conditions ont alors été reproduites. Le composé (**53**) a été placé en mélange, sous argon dans un tube scellé, avec 7 équivalents d'anhydride trifluoroacétique dans l'acétonitrile. Le mélange réactionnel a été agité à 135°C pendant 8 minutes. Après refroidissement à température ambiante, le milieu réactionnel a été dilué avec du méthanol et agité à nouveau pendant 40 minutes. Cette étape de méthanolyse est très importante car elle permet de décomposer l'imide mixte également formé sur l'unité  $\beta$ -glycosidique non réductrice afin de reformer le groupement acétamido (schéma 83).

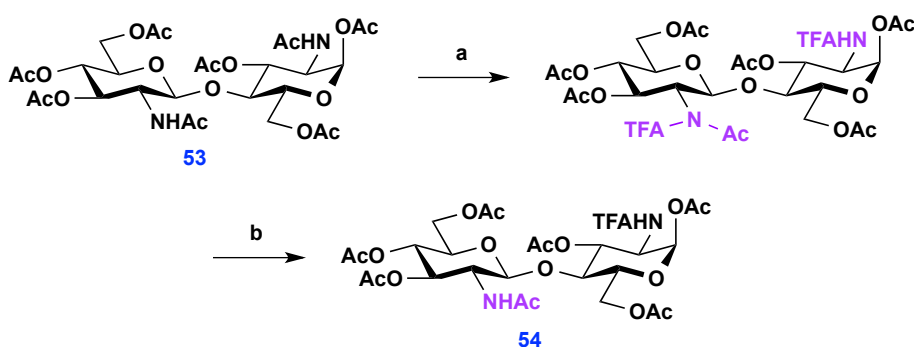
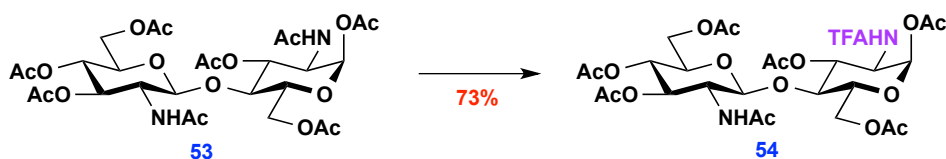


Schéma 83 : Réactifs et conditions : (a) anhydride trifluoroacétique (7 éq.), CH<sub>3</sub>CN, 135°C, 8 min ; (b) CH<sub>3</sub>OH, t.a., 40 min

Un suivi CCM a révélé la formation de plusieurs impuretés non identifiées et non observées par l'équipe de Beau, de polarité similaire au produit (**54**). La purification par chromatographie du produit (**54**) était alors très difficile et a donné des rendements très faibles lors de la montée en échelle.

<sup>161</sup> Tai, V. W.-F. ; Imperiali, B., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 6217-6228.

Un changement de tube scellé, prêté par l'équipe de l'ICMMO, a finalement permis d'éviter la formation de ces impuretés et de réaliser la montée en échelle. Le produit (**54**) a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 73% après purification (schéma 84).



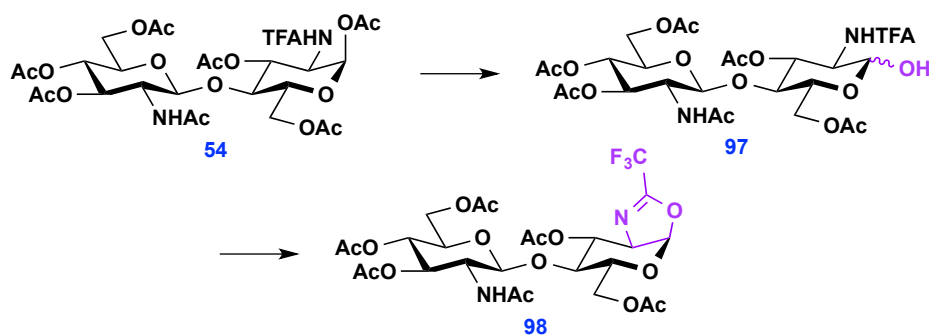
**Schéma 84** : *Réactifs et conditions* : anhydride trifluoroacétique (7 éq.), CH<sub>3</sub>CN, 135°C, argon, tube scellé, 7 min puis CH<sub>3</sub>OH, t.a., 1h

Il semble donc que les conditions de pression imposées à la réaction sont très importantes. La mise en oeuvre de cette transacylation avec les tubes scellés du laboratoire a visiblement induit des conditions de pression différentes, pouvant expliquer la formation des sous-produits non désirés lors des premiers essais.

### C. Formation de l'oxazoline sur l'unité réductrice

L'équipe de Beau à l'ICMMO a utilisé la réactivité des oxazolines anomères trifluorométhylées, déjà mise en évidence par l'équipe de Martin,<sup>162</sup> afin d'effectuer des réactions de glycosylation efficaces et exclusivement  $\beta$ -sélectives. Comme évoqué précédemment, l'étape de transacylation était donc importante afin d'avoir une oxazoline trifluorométhylée, plus réactive que l'oxazoline méthylée.

Afin d'introduire le groupement  $\beta$ -azoture en position anomère, la formation de cet oxazoline (**98**) a donc été envisagée, suite à l'introduction précédente du groupe trifluoroacétamido (schéma 85).<sup>87</sup>



**Schéma 85**

<sup>162</sup> Busca, P. ; Martin, O. R., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 8101-8104.



Dans un premier temps, l'hydroxyle en position anomère a dû être déprotégé sélectivement. Le groupement acétyle en position anomère étant le plus labile, une déprotection douce permettrait de le retirer sans toucher aux autres acétyles. En 1967, le groupe de Rowell a mis en évidence une réaction d'aminolyse sélective, en utilisant la pipéridine pour déprotéger l'hydroxyle anomère de différents disaccharides per-acétylés (schéma 86).<sup>163</sup>

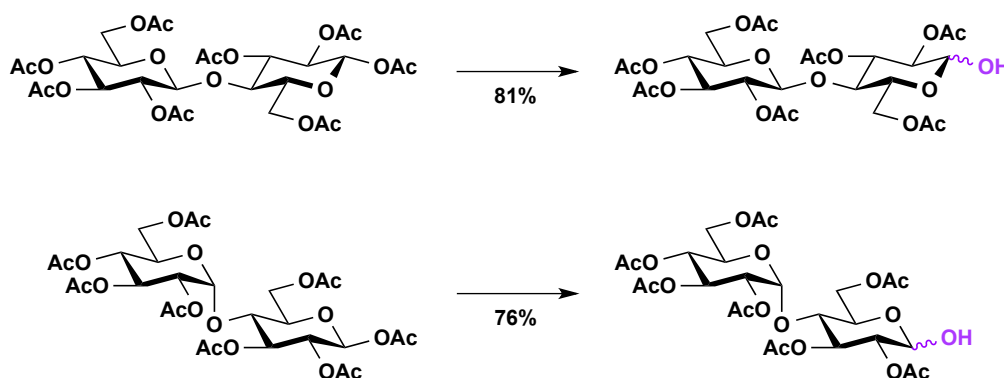


Schéma 86 : Réactifs et conditions : pipéridine (6,5 éq.), THF, t.a., 2h

Le sel d'acétate d'hydrazinium<sup>164</sup> ou la benzylamine<sup>165</sup> ont été plus couramment utilisés par la suite pour réaliser cette aminolyse. Les équipes de Cho et Park ont effectué la même déprotection sélective en utilisant de l'acide acétique et de l'éthylènediamine, qui est moins toxique que l'hydrazine.<sup>166</sup> Ces conditions ont été reproduites afin d'obtenir l'alcool (**97**). Le sel d'acétate d'éthylènediaminium a été formé dans un premier temps puis le substrat (**54**) a été ajouté au mélange. Après une nuit, la conversion était totale et le produit (**97**) a été obtenu après purification avec un rendement de 72%, sous la forme d'un mélange des deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  (10:1) (schéma 87).



Schéma 87 : Réactifs et conditions : éthylènediamine (1,2 éq.), acide acétique (1,2 éq.), THF, t.a., 18h

L'équipe de l'ICMMO a effectué cette déprotection en utilisant plus classiquement le sel d'acétate d'hydrazinium et a obtenu l'alcool (**97**) quantitativement, sans purification, avant de former l'oxazoline (**98**) en 2 étapes successives. Dans un premier temps, un bon groupe partant a été

<sup>163</sup> Rowell, R. M. ; Feather, M. S., *Carbohydr. Res.*, **1967**, 4, 486-491.

<sup>164</sup> Excoffier, G. ; Gagnaire, G. ; Utile, J.-P., *Carbohydr. Res.*, **1975**, 39, 368-373.

<sup>165</sup> Trumtel, M. ; Tavecchia, P. ; Veyrières, A. ; Sinaÿ, P., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 191, 29-52.

<sup>166</sup> Lee, H. Y. ; Kwon, J.-T. ; Koh, M. ; Cho, M.-H. ; Park, S. B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 6335-6339.

formé sur la position anomère du composé **(97)**. L'ajout de triéthylamine a ensuite permis la substitution intramoléculaire de ce bon groupe partant par le trifluoroacétamido, formant ainsi l'oxazoline **(98)** (schéma 88).<sup>87</sup>

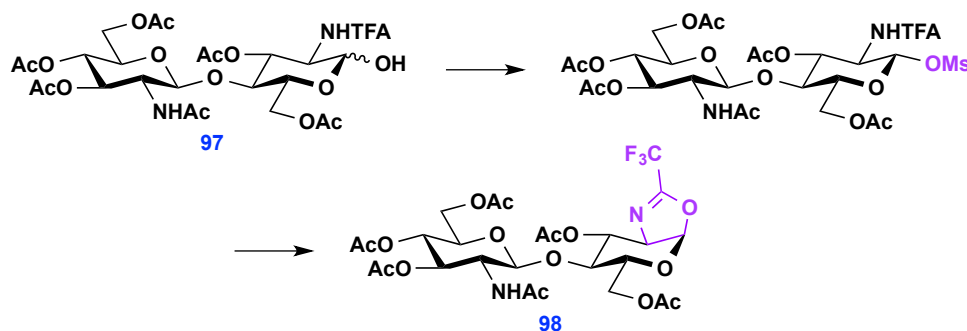


Schéma 88

Leurs conditions ont été reproduites, une conversion totale a été observée et l'oxazoline **(98)** a pu être obtenue de manière quantitative, sans purification (schéma 89).

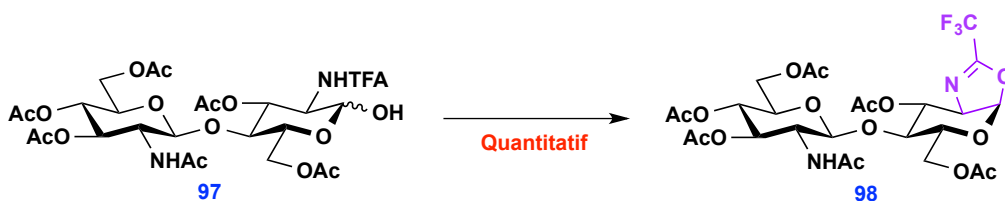


Schéma 89 : Réactifs et conditions : anhydride méthanesulfonique (3 éq.), CH<sub>3</sub>CN, t.a., 30 min puis triéthylamine (20 éq.), t.a., 2h

## D. Changement de groupement protecteur de l'amine sur l'unité non réductrice

Avant d'introduire l'azoture en position anomère, il a été nécessaire de modifier le groupement protecteur de l'amine sur l'unité non réductrice. En effet, la transacylation sélective précédente (schéma 84) a permis de différencier les azotes car le trifluoroacétamido peut être hydrolysé seul de manière douce.<sup>167</sup> L'acétamido, quant à lui, nécessite des conditions d'hydrolyse plus dures<sup>168</sup> et ne peut donc pas être clivé sans toucher au trifluoroacétamido. Un groupement orthogonal à toutes les autres protections a donc dû être trouvé pour remplacer l'acétyle et pouvoir introduire la chaîne carbonée en fin de synthèse (schéma 90).

<sup>167</sup> Zhou, W. ; Hsieh, P.-H. ; Xu, Y. ; O'Leary, T. R. ; Huang, X. ; Liu, J., *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 11019-11021.

<sup>168</sup> (a) Fujinaga, M. ; Matsushima, Y., *Bull. Chem. Soc. J.*, **1963**, 37, 468-470. (b) Henderson, A. S. ; Medina, S. ; Bower, J. F. ; Galan, M. C., *Org. Lett.*, **2015**, 17, 4846-4849.

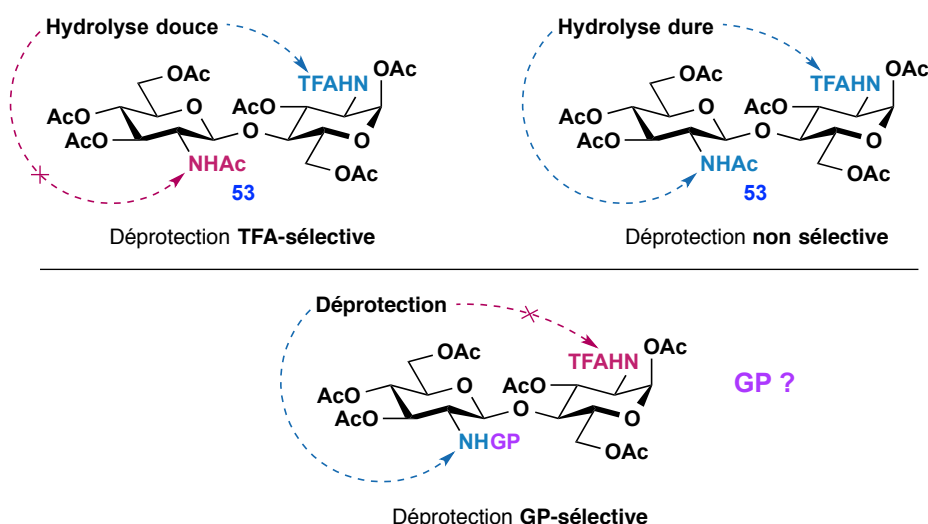


Schéma 90

Une stratégie possible a été de commencer par la formation d'un imide mixte avec l'ajout d'une protection supplémentaire sur l'amine (schéma 91) puis de réaliser l'hydrolyse de l'acétyle dans des conditions qui ne cliveraient pas ce nouveau groupement protecteur. Il est à noter que seul un imide mixte sur l'acétamido sera formé puisque le groupement trifluoroacétamido est déjà impliqué dans l'oxazoline précédemment obtenue (schéma 89).

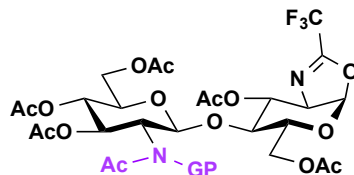


Schéma 91

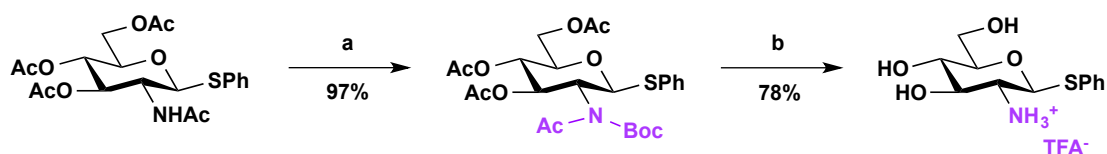
Des travaux antérieurs ont montré que l'introduction d'un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) sur une fonction acétamido permettait alors de retirer l'acétyle dans des conditions plus douces que l'hydrolyse directe.<sup>169</sup> Plus généralement, elle permet l'hydrolyse basique de nombreux amides secondaires et l'ouverture de lactames.<sup>170</sup>

En 2001, L'équipe de Kerns a réalisé la première formation de cet imide mixte *N,N*-Boc/Ac sur un dérivé de la glucosamine dans le but d'obtenir, en 3 étapes, une amine libre à partir d'une amine acétylée. Les auteurs ont obtenu de très bons résultats en utilisant le dicarbonate de di-*tert*-

<sup>169</sup> Grehn, L. ; Gunnarsson, K ; Ragnarsson, U., *Chem. Commun.*, **1985**, 1317-1318.

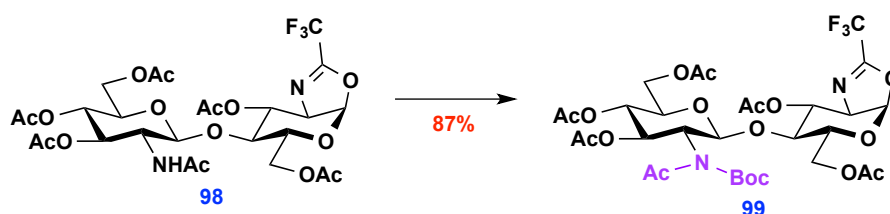
<sup>170</sup> Flynn, D. L. ; Zelle, R. E. ; Grieco, P. A., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2424-2426.

butyle (Boc<sub>2</sub>O) avec une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) dans le tétrahydrofurane (schéma 92).<sup>171</sup>



**Schéma 92 :** Réactifs et conditions : (a) dicarbonate de di-tert-butyle (5 éq.), 4-diméthylaminopyridine (10 %mol), THF, 60°C, 3h (b) CH<sub>3</sub>ONa, CH<sub>3</sub>OH, t.a., 1h puis acide trifluoroacétique, CH<sub>3</sub>OH, t.a., 24h

Le groupe de Beau s'est inspiré des mêmes conditions afin de former l'imide mixte *N,N*-Boc/Ac sur le composé (**98**).<sup>87</sup> Ces conditions ont donc été reproduites dans le cadre du projet et le produit (**99**) est alors obtenu après purification avec un rendement de 87% (schéma 93).

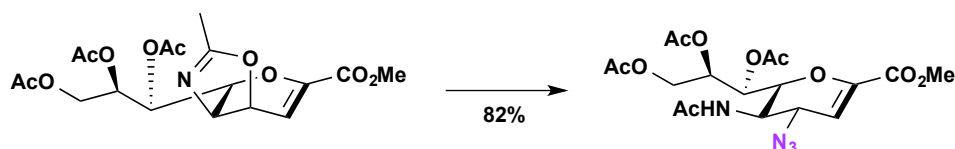


**Schéma 93 :** Réactifs et conditions : dicarbonate de di-tert-butyle (5 éq.), 4-diméthylaminopyridine (20 %mol), THF, reflux, 30 min

## E. Introduction de l'azoture en position anomère

Après avoir introduit cette orthogonalité des groupements protecteurs des amines, l'ouverture de l'oxazoline pour introduire le groupement β-azoture a été envisagée.

En 1993, le groupe de von Itzstein a réalisé les premiers travaux portant sur l'ouverture d'oxazolines par un groupement azoture sur un dérivé de l'acide sialique 5-acétamido (schéma 94).<sup>172</sup> De bons résultats d'insertion d'azoture en position 4 ont alors été obtenus en utilisant l'azoture de triméthylsilyle (TMS-N<sub>3</sub>).



**Schéma 94 :** Réactifs et conditions : azoture de triméthylsilyle (4 éq.), <sup>t</sup>BuOH, 80°C, 4h

<sup>171</sup> Benakli, K. ; Zha, C. ; Kerns, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 9461-9462.

<sup>172</sup> von Itzstein, M. ; Jin, B. ; Wu, W.-Y. ; Chandler, M., *Carbohydr. Res.*, **1993**, 244, 181-185.

Quelques années plus tard, l'équipe de Wittmann a également réalisé l'ouverture d'oxazolines méthylées sur un dérivé glucosamine pour introduire notamment un azoture en position anomère (schéma 95).<sup>173</sup> Les auteurs ont alors mis en avant les propriétés d'acide de Lewis du chlorure de cuivre(II) afin d'activer l'oxazoline.

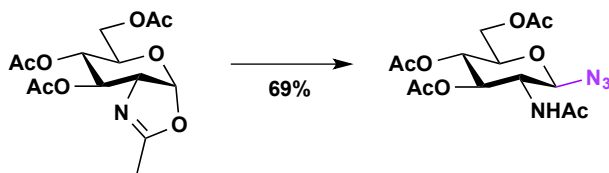
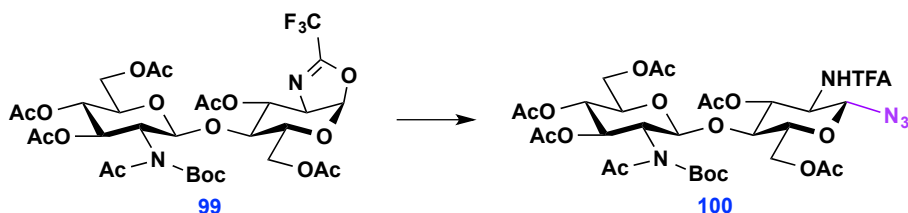


Schéma 95 : Réactifs et conditions : Azoture de triméthylsilyle (13 éq.), CuCl<sub>2</sub> (1 éq.), CHCl<sub>3</sub>, t.a., 3,5h

En se référant à leurs résultats, différents essais d'introduction de l'azoture ont été réalisés, en changeant principalement le moyen d'activation (tableau 12).



Entrée	TMS-N <sub>3</sub>	Promoteur	Conditions	Durée, conversion*	Rdt (100)
1	13,0 éq.	CuCl <sub>2</sub> (1,5 éq.)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (0,5 M), reflux	18h, moyenne	29%
2	13,0 éq.	CuBr <sub>2</sub> (1,5 éq.)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (0,5 M), reflux	18h, moyenne	38%
3	1,4 éq.	TBAF (1,4 éq.)	THF (0,1 M), reflux	15h, totale	82%

Tableau 12

Un premier essai a été réalisé en s'inspirant des conditions de Wittmann (entrée 1). Le produit (**100**) a pu être obtenu après purification avec un faible rendement de 29%, dû à une conversion non totale. Il est à noter que l'oxazoline (**99**) et le promoteur ont préalablement été séchés par co-évaporation au toluène.

Afin d'améliorer le rendement, un essai (entrée 2) a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment en remplaçant le chlorure de cuivre(II) par du bromure de cuivre(II). Un rendement légèrement amélioré de 38% en composé (**100**) a alors été obtenu après purification.

Une autre approche a alors été envisagée afin d'améliorer la réaction. L'équipe de DeShong a montré qu'il est possible d'introduire ce groupement azoture grâce à l'utilisation de fluorure de

<sup>173</sup> Wittmann, V. ; Lennartz, D., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 1363-1367.

\* Conversion de (**99**) détectée par CCM.

tétrabutylammonium (TBAF), permettant d'activer l'azoture de triméthylsilyle afin qu'il réagisse plus rapidement sur l'oxazoline.<sup>174</sup> Un dernier essai (entrée 3) a donc été réalisé selon ces conditions. La conversion était totale après une nuit et le produit **(100)** a pu être récupéré avec un rendement de 82% après purification.

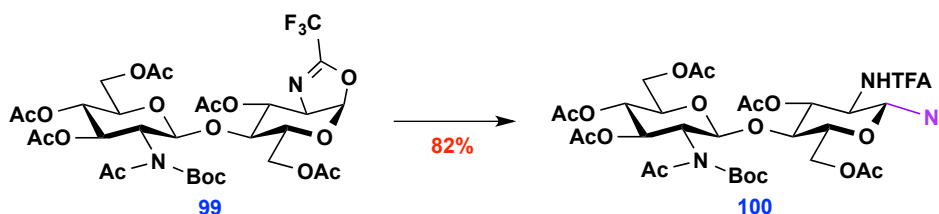


Schéma 96 : *Réactifs et conditions* : azoture de triméthylsilyle (1,4 éq.), TBAF (1,4 éq.), THF, reflux, 15h

Afin de réduire le nombre d'étapes de synthèse sur le futur analogue de tétrasaccharide, l'hydrolyse de l'acétyle présent sur le motif *N,N*-Boc/Ac a été réalisée avant la cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre. Cette hydrolyse a également permis de remplacer le trifluoroacétamido par un acétamido, présent sur les analogues de LCOs finaux. Dans un premier temps, l'hydrolyse de l'ensemble des groupements acétyles du composé **(100)** a donné l'intermédiaire **(101)** qui a ensuite été per-acétylé afin d'obtenir le composé **(102)** (schéma 97).<sup>87</sup>

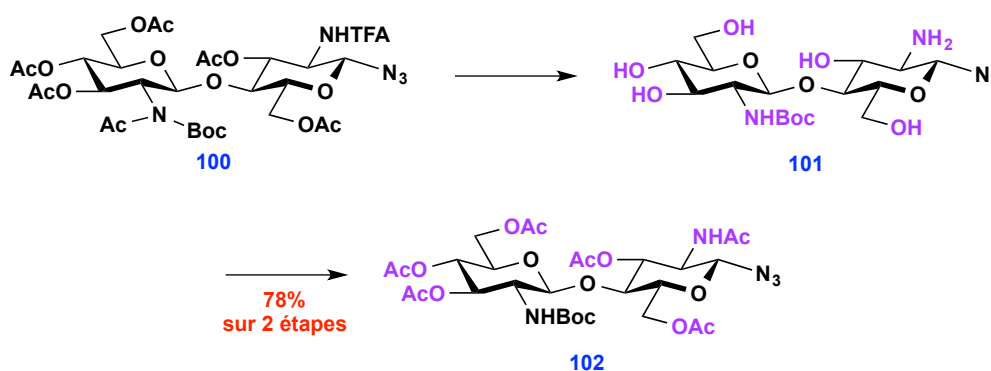


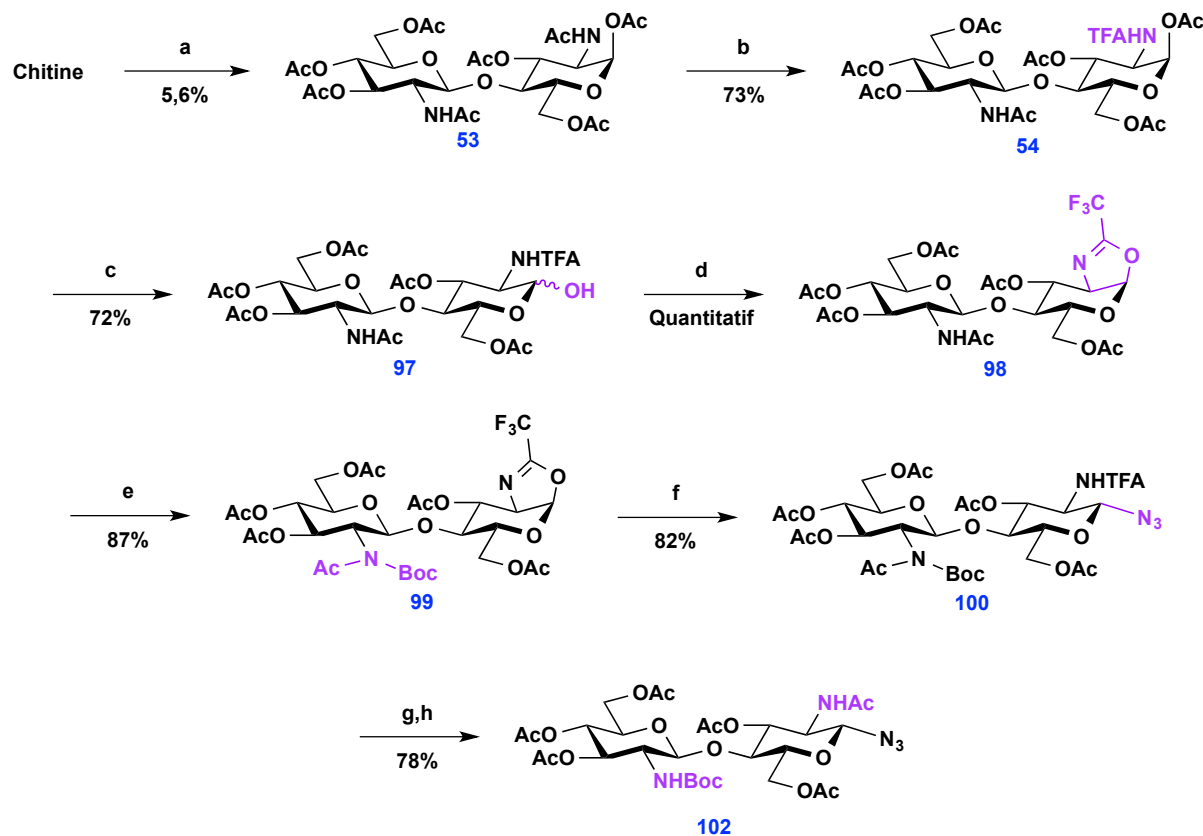
Schéma 97 : *Réactifs et conditions* : LiOH (2M), H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH, t.a., 18h puis anhydride acétique, pyridine, t.a., 24h

L'imide **(100)** a été mis en réaction avec LiOH dans un mélange eau/méthanol. La conversion en intermédiaire **(101)** était totale après 18 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel a été concentré et le résidu ainsi obtenu a été mis en réaction dans un mélange d'anhydride acétique et de pyridine. La conversion était totale après une journée à température ambiante. Le composé **(102)** a pu être obtenu après purification avec un rendement de 78% sur deux étapes.

<sup>174</sup> Soli, E. D. ; Manoso, A. S. ; Patterson, M. C. ; DeShong, P. ; Favor, D. A. ; Hirschmann, R. ; Smith, A. B., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3171-3177.

## F. Schéma réactionnel global de la brique disaccharidique

La seconde brique disaccharidique azoture a donc été synthétisée avec un rendement global de 29% en 7 étapes à partir de l'octaacétate d' $\alpha$ -chitobiose (**53**) (1,6% en incluant la première étape d'acétylolyse de la chitine) (schéma 98).



**Schéma 98 : Réactifs et conditions :** (a) Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 55°C, t.a. puis 55°C ; (b) TFAA, CH<sub>3</sub>CN, 135°C, puis CH<sub>3</sub>OH, t.a. ; (c) C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, AcOH, THF, t.a. ; (d) Ms<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, t.a. puis NEt<sub>3</sub>, t.a. ; (e) Boc<sub>2</sub>O, 4-DMAP, THF, reflux ; (f) TMS-N<sub>3</sub>, TBAF, THF, reflux ; (g) LiOH, H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH, t.a. ; (h) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, t.a.

ANALOGUES DE LIPO-  
CHITOLIGOSACCHARIDES ET  
RECONNAISSANCE BIOLOGIQUE





## I. CYCLOADDITION [3+2] CATALYSEE AU CUIVRE

### A. Premiers essais sur un dérivé azoture commercial

Les deux briques saccharidiques (**102**) et (**95**) ayant été synthétisées, la cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre a pu être envisagée.

Afin de tester la réactivité du dérivé monosaccharidique (**95**) dans cette réaction de CuAAC, les premiers essais ont été réalisés sur une glucosamine per-acétylée commerciale, comportant un azoture en position anomère (schéma 99).

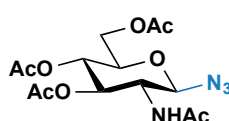


Schéma 99

Les conditions de Fokin et Sharpless<sup>113b</sup> ont été reproduites en modifiant le solvant. En effet, l'utilisation d'un solvant tel que le dichlorométhane plutôt que le *tert*-butanol a permis de récupérer le produit par extraction puisque l'ascorbate de sodium, ces sous-produits et les sels de cuivre(II) sont solubles en phase aqueuse. De plus, le dichlorométhane semble améliorer la vitesse de réaction.<sup>175</sup> Un mélange équimolaire d'alcyne (**95**) et de dérivé azoture commercial a été mis en réaction en présence de quantités catalytique de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et d'ascorbate de sodium (Asc-Na) dans un mélange dichlorométhane/eau. La conversion des deux substrats était totale et le produit (**103**) a été obtenu pur avec un rendement de 97% après extractions (schéma 100). Il est à noter qu'aucune purification supplémentaire n'a été nécessaire.

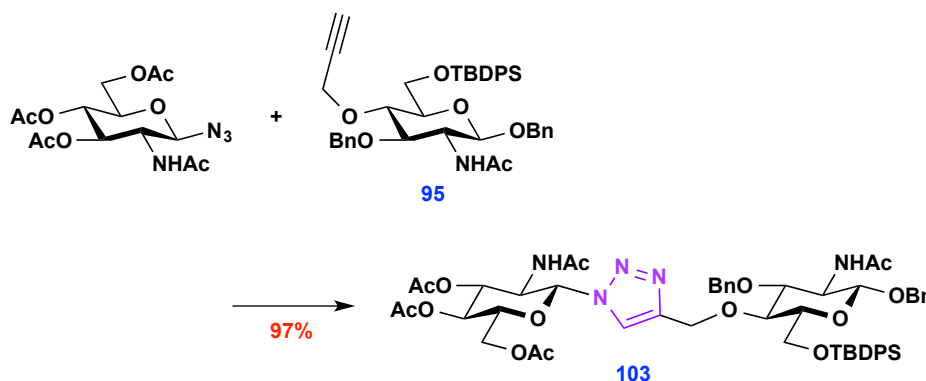


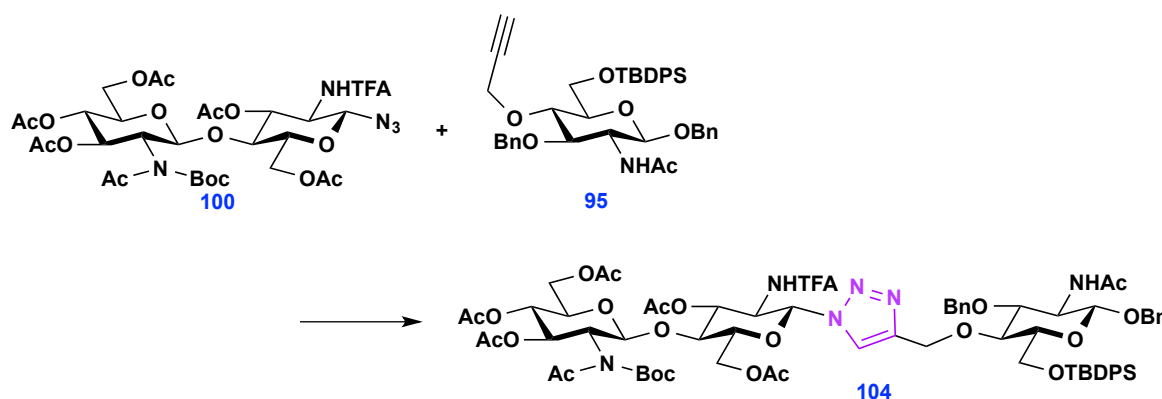
Schéma 100 : Réactifs et conditions :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (5 %mol), Asc-Na (10 %mol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (0,25M), t.a., 17h

<sup>175</sup> Lee, B.-Y. ; Park, S. R. ; Jeon, H. B. ; Kim, K. S., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 5105-5109.

Ce triazole (**103**) a donc été obtenu de manière très efficace et a donné de bons espoirs pour la cycloaddition avec le disaccharide azoture (**102**). Ce composé (**103**) a permis de réaliser par la suite des tests de déprotection du TBDPS ou des benzyles avant de les effectuer sur l'analogue de tétrasaccharide d'intérêt.

## B. Synthèse des premiers analogues de tétrasaccharides protégés

La cycloaddition entre le disaccharide azoture (**100**) et le monosaccharide propargylique (**95**) a été envisagée dans un premier temps. Une optimisation des conditions de réaction a été effectuée sur différents essais (tableau 13). La concentration en substrats (**95**) et (**100**) (mélange équimolaire) et la quantité de catalyseurs ont notamment été modifiées.



Entrée	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$\text{Asc-Na}$	Conditions	Durée, conversion*	Rdt ( <b>104</b> )
1	5 %mol	10 %mol	DCM/ $\text{H}_2\text{O}$ ( <b>0,05M</b> ), t.a.	2 jours, faible	8%
2	5 %mol	10 %mol	DCM/ $\text{H}_2\text{O}$ ( <b>0,16M</b> ), t.a.	3 jours, faible	8%
3	<b>15 %mol</b>	<b>30 %mol</b>	DCM/ $\text{H}_2\text{O}$ (0,10M), t.a.	3 jours, moyenne	<b>36%</b>
4	<b>30 %mol</b>	<b>60 %mol</b>	DCM/ $\text{H}_2\text{O}$ (0,08M), t.a.	18h, totale	<b>99%</b>

Tableau 13

Un premier essai (entrée 1) a été mis en œuvre dans les mêmes conditions que précédemment (schéma 100) mais plus diluées. Une faible conversion a alors été observée après trois jours et le produit (**104**) a été obtenu avec un rendement de 8% après purification.

Un second essai (entrée 2) a donc été réalisé, plus concentré, mais aucune amélioration n'a été observée.

\* Conversion de (**100**) détectée par CCM.

La concentration ne semblant pas avoir d'influence sur l'efficacité de la réaction, les quantités de sels de cuivre(II) et d'ascorbate de sodium ont été augmentées. Dans un premier temps, un essai (entrée 3) a été réalisé avec 0,15 équivalent de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et 0,30 équivalent d'ascorbate de sodium. Après trois jours, la conversion était meilleure mais un rendement de 36% en produit (**104**) a été obtenu après purification. Un dernier essai (entrée 4) avec 0,30 équivalent de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  et 0,60 équivalent d'ascorbate de sodium a été effectué. Dans ces conditions, la conversion était totale après une nuit et le composé (**104**) a été récupéré avec un rendement de 99% après extraction (schéma 101). A nouveau, aucune purification supplémentaire n'a été nécessaire.

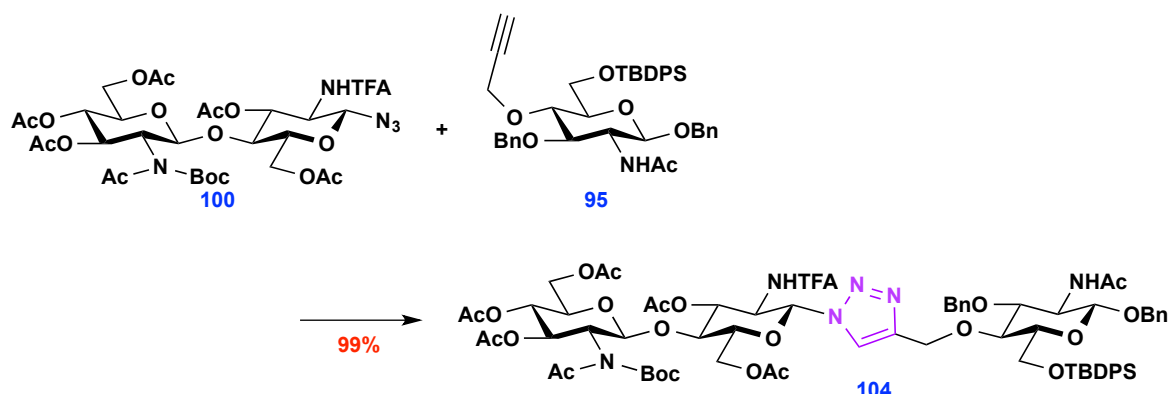
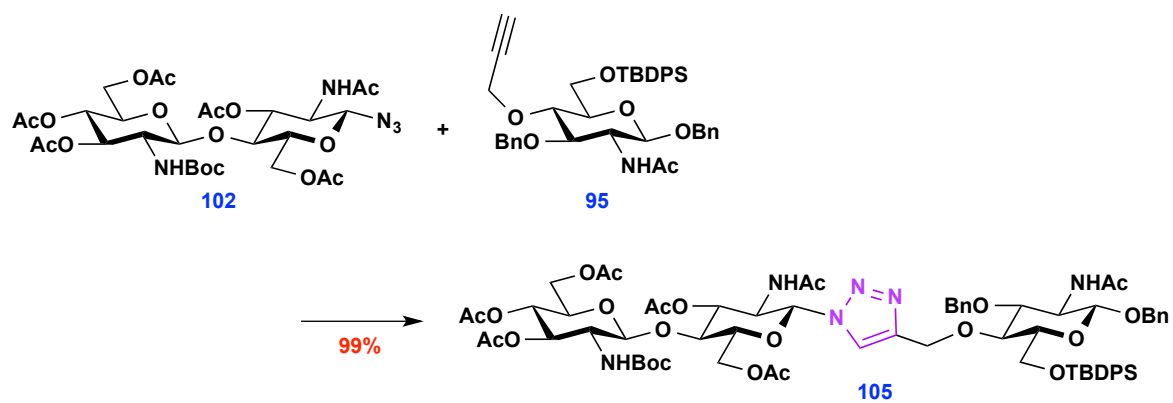


Schéma 101 : Réactifs et conditions :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (30 %mol), Asc-Na (60 %mol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (0,08M), t.a., 18h

Une conversion totale est donc possible mais les quantités de catalyseurs doivent être plus importantes que dans le cas de l'analogue de trisaccharide (**103**). Une hypothèse serait que la quantité plus importante de groupements acétate et acétamido sur le dérivé disaccharidique (**100**) pourraient complexer partiellement le cuivre et limiter ainsi la conversion en triazole (**104**).

Suite à ces essais, les conditions précédentes ont été appliquées à la synthèse d'un second analogue de tétrasaccharide à partir des dérivés saccharidiques (**102**) et (**95**). Un mélange équimolaire de (**102**) et (**95**) a été mis en réaction dans les mêmes conditions optimisées que précédemment. La conversion était totale après une nuit et le composé (**105**) a pu être obtenu pur avec un rendement de 99% après extraction (schéma 102).



**Schéma 102** : Réactifs et conditions :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (30 %mol),  $\text{Asc-Na}$  (60 %mol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (0,08M), t.a., 18h

Cet analogue de tétrasaccharide (**105**) a ainsi été utilisé pour la synthèse des analogues de lipo-chitooligosaccharides.

## II. FONCTIONNALISATION ET DEPROTECTIONS DES ANALOGUES

Afin d'obtenir les premiers analogues de tétrasaccharide, la fin de la synthèse a consisté à fonctionnaliser le composé **(105)**, plusieurs analogues ont ainsi pu être formés selon s'ils comportaient une fonction sulfate et selon la chaîne carbonée introduite. Toutes les protections ont également été clivées afin d'obtenir les analogues de lipo-chitooligosaccharide souhaités.

### A. Introduction de la fonction sulfate

#### 1) Mise au point des conditions sur l'analogue de trisaccharide

Afin d'introduire le sulfate, le groupement *tert*-butyldiphénylsilyle, introduit lors de la synthèse du monosaccharide **(95)**, a dû être retiré sélectivement pour ensuite introduire le sulfate sur l'hydroxyle libéré (schéma 103). Afin d'évaluer l'efficacité de ces 2 étapes et avant de les réaliser sur le composé d'intérêt **(105)**, les conditions ont d'abord été testées sur l'analogue de trisaccharide **(103)**.

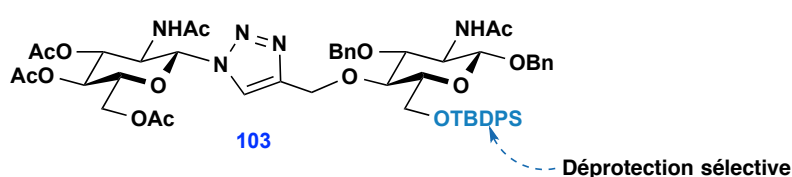


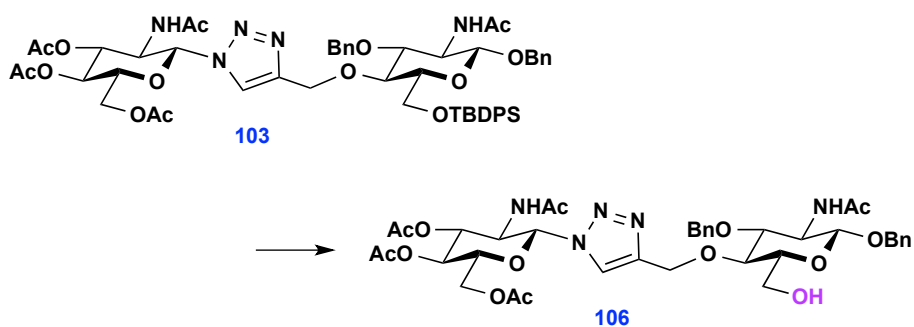
Schéma 103

Dans un premier temps, la déprotection de l'hydroxyle silylé a été envisagée. Plusieurs conditions sont alors possibles. Les éthers silylés peuvent être hydrolysés en conditions acides<sup>176</sup> ou en conditions basiques fortes,<sup>87</sup> comme vu précédemment (schéma 70), mais sur ces analogues d'oligosaccharides d'autres fonctions protectrices seraient également touchées. L'intérêt d'avoir utilisé un groupement protecteur silylé était de pouvoir le retirer sélectivement en utilisant des ions fluorures.<sup>153a,177,178</sup> Différents essais ont donc été réalisés en faisant varier la source d'ions fluorures (tableau 14).

<sup>176</sup> (a) Srivastava, P. ; Hindsgaul, O., *Carbohydr. Res.*, **1987**, 161, 195-210. (b) Kobayashi, Y. ; Ishida, N. ; Arai, M. ; Hiraoka, T., *Carbohydr. Res.*, **1991**, 222, 83-97. (c) López-Prados, J. ; Cuevas, F. ; Reichardt, N.-C. ; de Paz, J.-L. ; Morales, E. Q. ; Martín-Lomas, M., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 764-786.

<sup>177</sup> Rana, S. S. ; Matta, K. L., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 152, 195-203.

<sup>178</sup> Zhang, W. ; Robins, M. J., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33(9), 1177-1180.



Entrée	Source fluorure	Conditions	Durée, conversion*	Rdt ( <b>106</b> )
1	TBAF (5 éq.)	THF, t.a.	24h, quasi-totale	Dégradation
2	NH <sub>4</sub> F (5 éq.)	CH <sub>3</sub> OH, reflux	18h, totale	17%
3	NH <sub>4</sub> F (5 éq.)	CH <sub>3</sub> OH, reflux (3h) puis t.a.	24h, quasi-totale	58%

Tableau 14

L'équipe de Matta a effectué la déprotection de cet hydroxyle en position 6 de manière efficace en utilisant des sels de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) (schéma 104).<sup>177</sup>

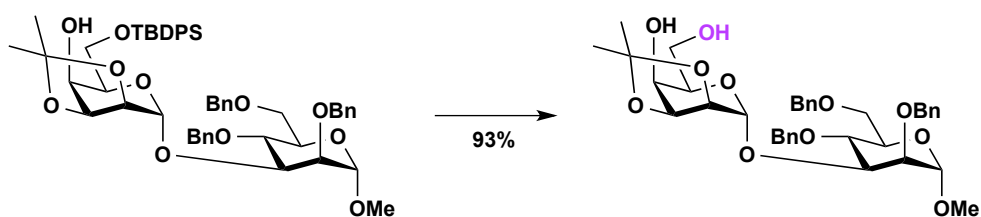


Schéma 104 : Réactifs et conditions : TBAF (1,1 éq.), oxalane/THF, t.a., 45 min

Un premier essai (entrée 1) de désilylation a été effectué dans des conditions similaires. Afin d'avoir un maximum de conversion du dérivé (**103**), 5 équivalents de TBAF ont été nécessaires. Après traitement, une forte dégradation du brut réactionnel a été observée. Le produit (**106**) n'a donc pas pu être isolé et d'autres solutions ont alors été envisagées.

Dans un souci de trouver une alternative au TBAF, l'équipe de Robins a démontré l'efficacité des sels de fluorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>F) pour retirer un groupement *tert*-butyldiphénylesilyle sur des ribonucléosides.<sup>178</sup> Les auteurs étaient même parvenus à obtenir une bonne régiosélectivité en ne retirant que le groupe *tert*-butyldiphénylesilyle de l'alcool primaire (schéma 105).

\* Conversion de (**103**) détectée par CCM.

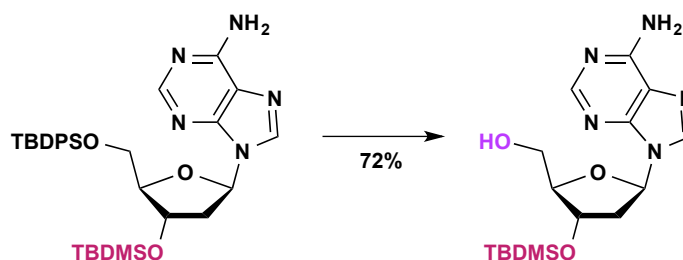


Schéma 105 : Réactifs et conditions :  $\text{NH}_4\text{F}$  (10 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 11h

Plusieurs essais (entrées 2 et 3) ont été effectués en utilisant une solution de fluorure d'ammonium dans le méthanol. Le reflux imposé à la réaction sur une longue durée (entrée 2) a visiblement dégradé le produit (**106**) qui a alors été obtenu avec un faible rendement de 17%. Un reflux modéré sur une plus courte durée avant de laisser la réaction à température ambiante (entrée 3) a permis d'avoir une conversion assez efficace en limitant la dégradation du milieu réactionnel. L'alcool (**106**) a finalement été isolé avec un rendement de 58% (schéma 106).

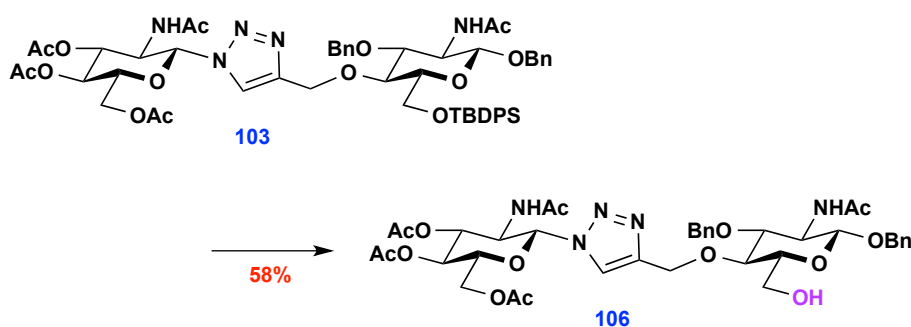


Schéma 106 : Réactifs et conditions :  $\text{NH}_4\text{F}$  (5 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , reflux, 3h puis t.a., 24h

La libération de l'hydroxyle en position 6 a donc permis d'y introduire la fonction sulfate. La première insertion d'un groupement sulfate sur un alcool a été réalisée en 1901 par Verley qui a décrit la synthèse de l'isoeugénol sulfate, avec un mélange d'acide chlorosulfurique et de pyridine, qu'il a utilisé ensuite pour synthétiser la vanilline.<sup>179</sup> En 1961, Guiselet et Ruoff ont réussi pour la première fois à isoler un monosaccharide 6-sulfaté en utilisant un sel de trioxyde de soufre-pyridine ( $\text{SO}_3\cdot\text{pyr}$ ).<sup>180</sup> L'équipe de Beau, dans leurs travaux sur la synthèse de lipo-chitooligosaccharides, a également utilisé un complexe de trioxyde de soufre-pyridine afin de sulfater l'hydroxyle en position 6 de l'unité réductrice (schéma 107).<sup>89</sup>

<sup>179</sup> Verley, A., *Bull. Soc. Chim.*, **1901**, 25, 46-49.

<sup>180</sup> Guiselet, K. B. ; Ruoff, P. M., *J. Org. Chem.*, **1961**, 1248-1254.



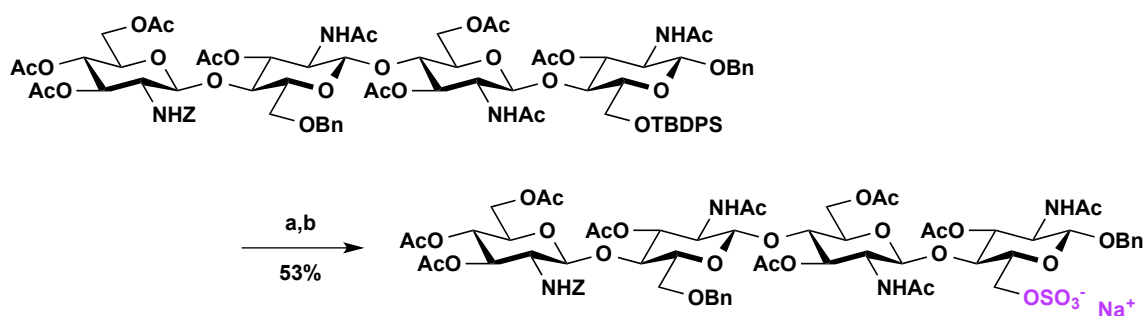


Schéma 107 : Réactifs et conditions : (a) NH<sub>4</sub>F (5 éq.), CH<sub>3</sub>OH, 75°C, 12h ; (b) SO<sub>3</sub>.pyr (3 éq.), DMF, t.a., 48h puis Dowex® Na<sup>+</sup>

La sulfatation du composé (**106**) a donc été effectuée en utilisant ce complexe trioxyde de soufre-pyridine. Le produit (**107**) a ainsi été obtenu avec un rendement de 76% après purification par chromatographie en phase normale (schéma 108).

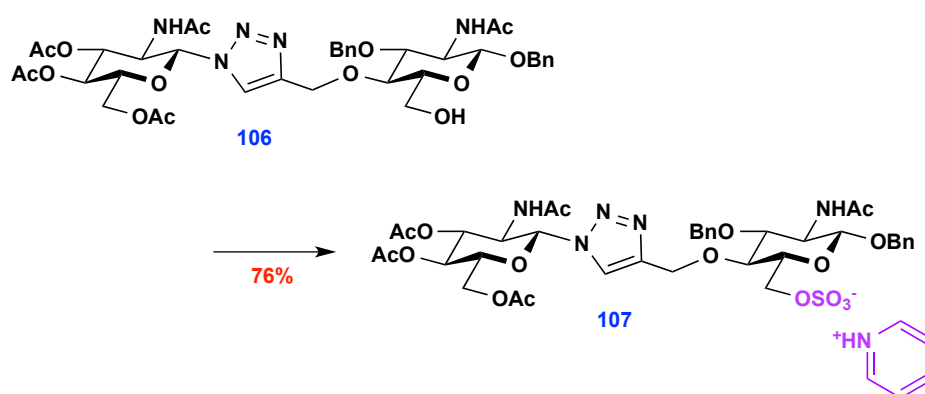


Schéma 108 : Réactifs et conditions : SO<sub>3</sub>.pyr (5 éq.), DMF, t.a., 14h

Il est à noter que le substrat (**106**) n'ayant pas réagi a pu être récupéré pour être réengagé dans une nouvelle étape de sulfatation.

## 2) Transposition des conditions à un analogue de tétrasaccharides

La fonction sulfate a pu être introduite en deux étapes sur l'analogue de trisaccharides (**103**). Ces conditions ont été reproduites sur l'analogue de tétrasaccharides d'intérêt (**105**) (schéma 109).

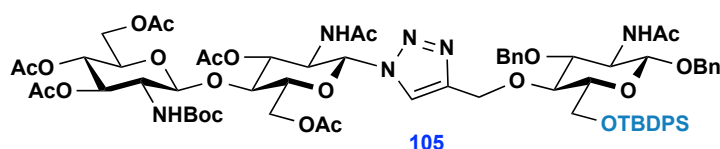
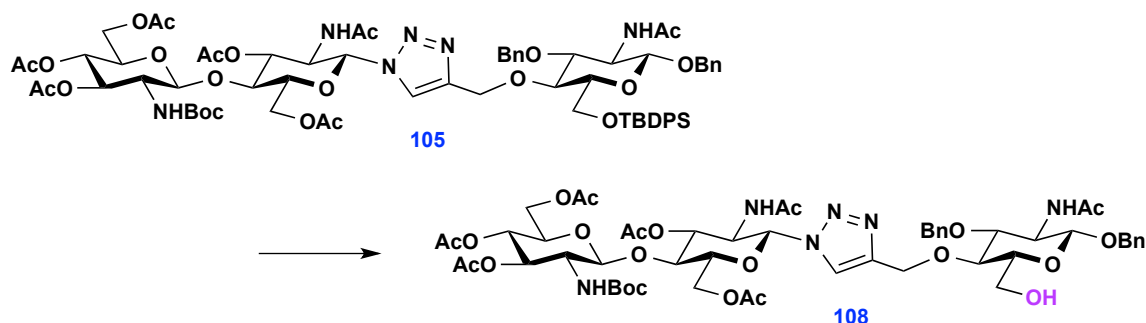


Schéma 109

Dans un premier temps, le groupement protecteur silylé a été clivé. Comme précédemment, plusieurs essais ont dû être effectués afin d'obtenir le meilleur rendement (tableau 15).



Entrée	Source fluorure	Conditions	Durée, conversion*	Rdt ( <b>108</b> )	Rdt ( <b>109</b> )
1	NH <sub>4</sub> F (10 éq.)	CH <sub>3</sub> OH, reflux	48h, quasi-totale	19%	36%
2	TBAF (5 éq.)	THF, t.a.	36h, quasi-totale	25%	45%

Tableau 15

L'utilisation de fluorure d'ammonium ayant montré les meilleurs résultats sur l'analogue de trisaccharides (**103**), un premier essai (entrée 1) a été effectué dans des conditions similaires. Afin d'obtenir une conversion quasi-totale, 10 équivalents de NH<sub>4</sub>F ont été nécessaires. Le produit (**108**) a alors été obtenu avec un rendement de 19% après purification. Ce faible rendement a en partie été expliqué par la formation simultanée du sous-produit (**109**), également isolé avec un rendement de 36%. Une analyse UPLC couplée à la spectroscopie de masse et une analyse RMN ont permis d'identifier le sous-produit (**109**) comme étant un produit de désilylation et de monodésacétylation. En effet, la masse du composé (**109**) et la perte d'un singulet autour de 2 ppm en <sup>1</sup>H RMN prouve qu'il y a eu monodésacétylation. De plus, les signaux des protons d'un même cycle sont blindés par la présence d'un hydroxyle à la place d'un acétyle. Ils sont d'autant plus blindés qu'ils sont proches de cet hydroxyle. L'analyse des spectres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (1D et 2D) et la comparaison avec les déplacements chimiques du composé (**108**) a permis d'identifier l'hydroxyle désacétylé avec certitude (schéma 110).

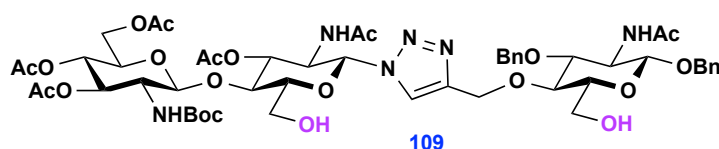


Schéma 110

\* Conversion de (**105**) détectée par CCM.

Un essai de désilylation (entrée 2) a également été réalisé avec du fluorure de tétrabutylammonium. De la même manière, la formation du diol (**109**) a été observée en parallèle de l'alcool (**108**) attendu. La conversion était quasi-totale après 2 nuits et les deux produits (**108**) et (**109**) ont pu être isolés avec des rendements respectifs de 25% et 45% (schéma 111), similaires au premier essai réalisé (entrée 1).

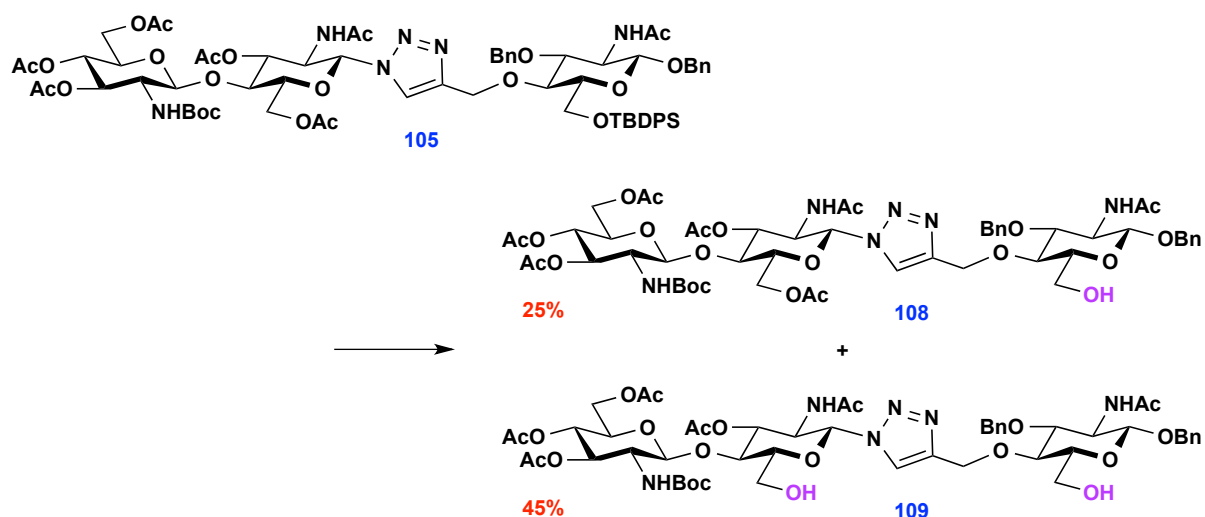


Schéma 111 : Réactifs et conditions : TBAF (5 éq.), THF, t.a., 36h

Même si sa formation n'était pas souhaité, le produit (**109**) a été conservé afin d'obtenir un analogue de LCO ne comportant pas la fonction sulfate.

Cette première voie (schéma 112) n'a donc pas permis d'obtenir l'analogue **(108)** avec un bon rendement.

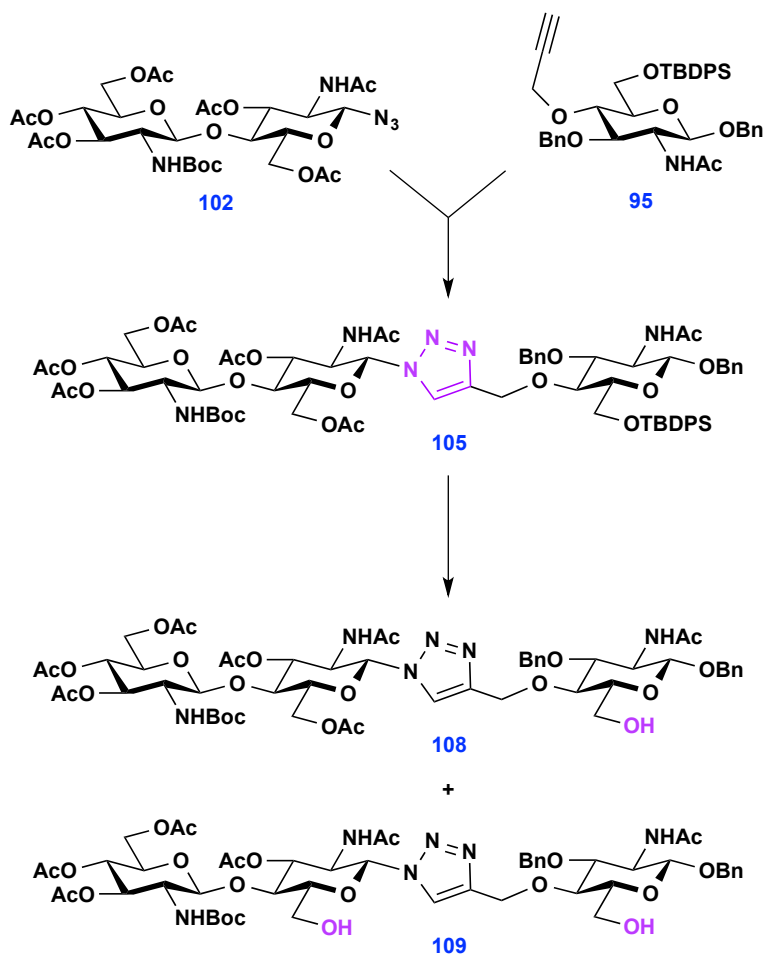


Schéma 112 : 1<sup>ère</sup> voie pour la formation du composé **(108)**, sous-produit **(109)** formé

Une alternative à cette voie a été envisagée (schéma 113). En effet, sur le produit **(109)** formé, 2 hydroxyles ont été déprotégés : le groupement silyle provenant de la brique monosaccharidique et un groupement acétyle provenant de la brique disaccharidique. Ainsi, en inversant les deux dernières étapes de synthèse, c'est-à-dire en déprotégeant l'hydroxyle silylé sur le monosaccharide **(95)**, dans un premier temps, pour ensuite réaliser la cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre, le produit **(108)** pourrait être obtenu sans le sous-produit **(109)**.

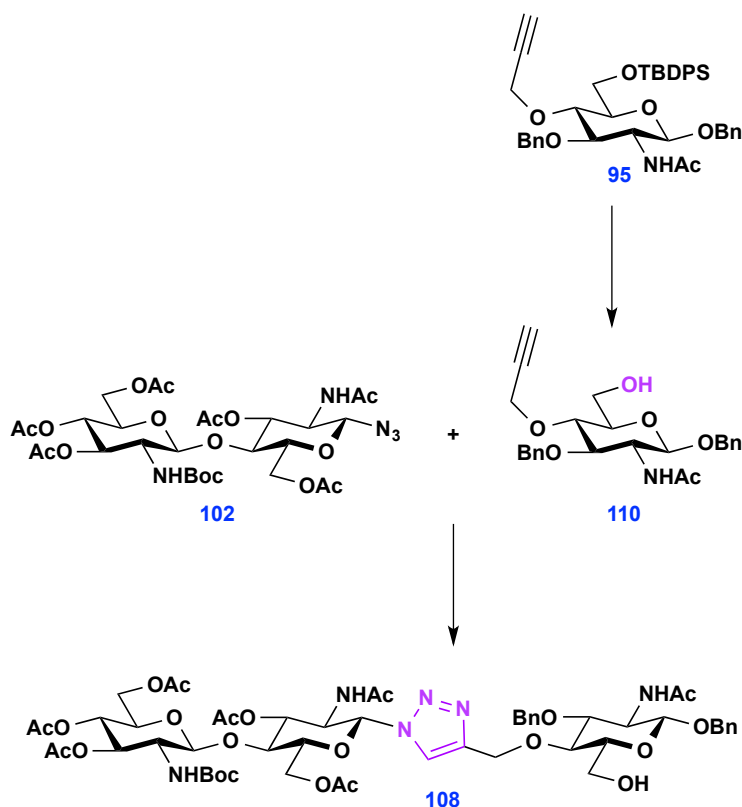


Schéma 113 : Nouvelle voie envisagée pour la formation du composé **(108)** uniquement

La déprotection de l'hydroxyle silylé du monosaccharide (**95**) a été envisagée, en utilisant des sels de  $\text{NH}_4\text{F}$ . Le composé (**95**) a été mis en réaction à chaud avec un excès de  $\text{NH}_4\text{F}$ , en solution dans du méthanol. La conversion était totale après 4 heures et l'alcool (**110**) a été obtenu avec un rendement de 73% après recristallisation. Il est à noter que le rendement a pu être amélioré à 92% en purifiant le filtrat par chromatographie sur gel de silice.

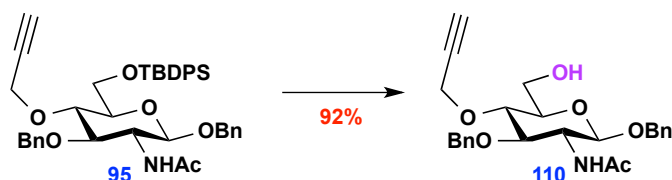


Schéma 114 : Réactifs et conditions :  $\text{NH}_4\text{F}$  (5 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , reflux, 4h

La cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre a ainsi pu être réalisée avec le propargyle (**110**) et l'azoture (**102**). Le substrat (**110**) et le produit de cycloaddition (**108**) étant peu solubles dans le dichlorométhane, les conditions ont donc été modifiées par rapport aux précédents exemples de cycloaddition (schéma 100 et schéma 102). Les quantités de catalyseur ont été conservées mais du *tert*-butanol a été ajouté au mélange de solvant dichlorométhane/eau précédemment utilisé. La conversion était totale après 2 heures et le produit (**108**) a été obtenu avec un rendement de 96% après purification.

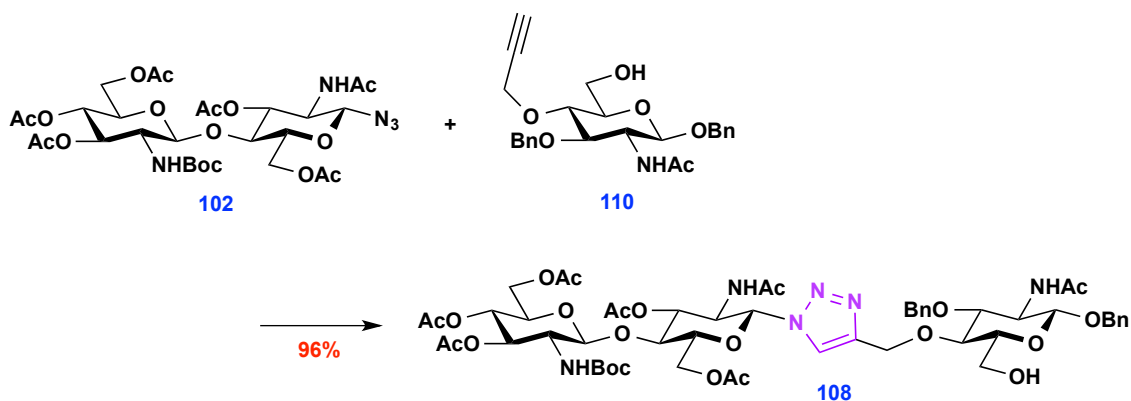
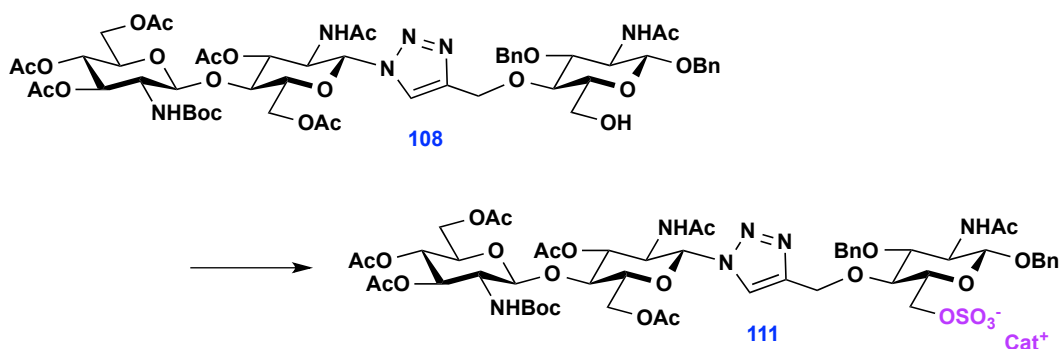


Schéma 115 : Réactifs et conditions :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (30 %mol), Ascorbate de sodium (60 %mol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /<sup>t</sup>BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 2h

Finalement, l'analogue de tétrasaccharide (**108**) a pu être obtenu, sans former le sous-produit (**109**), avec un bon rendement, en inversant les étapes de cycloaddition et de déprotection de l'hydroxyle silylé. L'étape suivante de sulfatation a donc pu être envisagée. Différents essais ont été mis en œuvre afin d'obtenir le sulfate (**111**) avec un bon rendement, de manière reproductible (tableau 16).



Entrée	Co-évaporation substrat	Complexe SO <sub>3</sub>	Conditions	Durée, conversion*	Rdt ( <b>111</b> )
1	non	SO <sub>3</sub> .pyr (10 éq.)	DMF (50 mM), t.a.	5h, moyenne	39%
2	<b>oui</b>	SO <sub>3</sub> .pyr (5 éq.)	DMF ( <b>25 mM</b> ), t.a.	2h, totale	17-65%
3	oui	<b>SO<sub>3</sub>.NEt<sub>3</sub></b> (5 éq.)	DMF (50 mM), t.a.	(15h)**, totale	<b>87%</b>
4	<b>non</b>	SO <sub>3</sub> .NEt <sub>3</sub> (5 éq.)	DMF (50 mM), t.a.	(15h)**, bonne	59%

Tableau 16

Un premier essai (entrée 1) a été réalisé en utilisant le complexe de trioxyde de soufre-pyridine comme dans le cas de l'analogue de trisaccharide (schéma 108). Le milieu réactionnel a évolué rapidement vers une conversion moyenne du substrat (**108**) puis l'avancement s'est arrêté. L'ajout supplémentaire de complexe de soufre n'a pas permis de faire évoluer la réaction à nouveau. Le produit (**111**) a alors été obtenu après purification avec un rendement de 39%.

La présence d'eau dans le milieu réactionnel a pu induire une diminution du rendement en hydrolysant une partie du complexe trioxyde de soufre-pyridine. Afin de limiter cette hydrolyse, un essai (entrée 2) a été effectué avec un séchage préalable du substrat (**108**) par co-évaporation avec du toluène. Un meilleur rendement de 65% en produit (**111**) a alors été obtenu après purification, malgré la diminution de la quantité de complexe soufré et de la concentration en substrat (**108**). Cependant, d'autres essais ont montré des problèmes de reproductibilité en utilisant ces conditions.

En 1984, l'équipe de Sinaÿ a décrit l'utilisation d'un autre complexe, le trioxyde de soufre-triméthylamine (SO<sub>3</sub>.NMe<sub>3</sub>), afin de sulfater différents hydroxyles sur des dérivés oligosaccharidiques (schéma 116),<sup>181</sup> un de ces hydroxyles étant en position 6 sur une unité glucosamine protégée.

\* Conversion de (**108**) détectée par CCM.

\*\* Conversion non évaluée plus tôt.

<sup>181</sup> Jacquinet, J.-C. ; Petipou, M. ; Duchaussoy, P. ; Lederman, I. ; Choay, J. ; Torri, G. ; Sinaÿ, P., *Carbohydr. Res.*, **1984**, 130, 221-241.

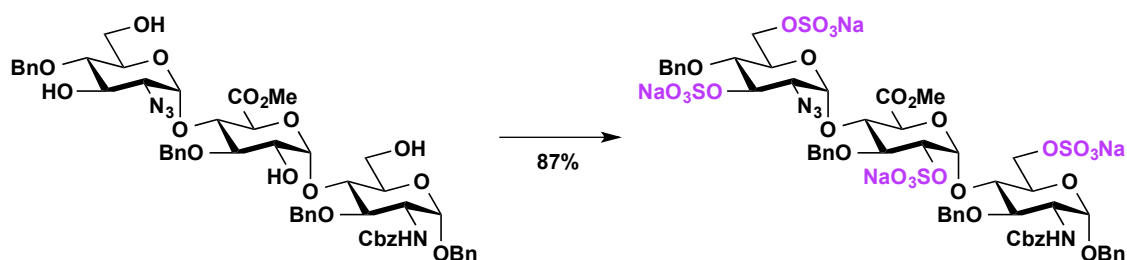


Schéma 116 : Réactifs et conditions :  $\text{SO}_3.\text{NMe}_3$  (11 éq.), DMF, 50°C, 20h

Un autre essai (entrée 3) a alors été réalisé en utilisant un complexe similaire à celui de Sinaï, le trioxyde de soufre-triéthylamine ( $\text{SO}_3.\text{NEt}_3$ ). Après une nuit, la conversion était totale et un rendement de 83% en sulfate (**111**) a été récupéré après purification par chromatographie en phase normale (schéma 117). Il est à noter que d'autres essais dans les mêmes conditions, non présentés ici, ont été effectués, permettant de prouver la bonne reproductibilité de ce résultat en utilisant le complexe avec la triéthylamine.

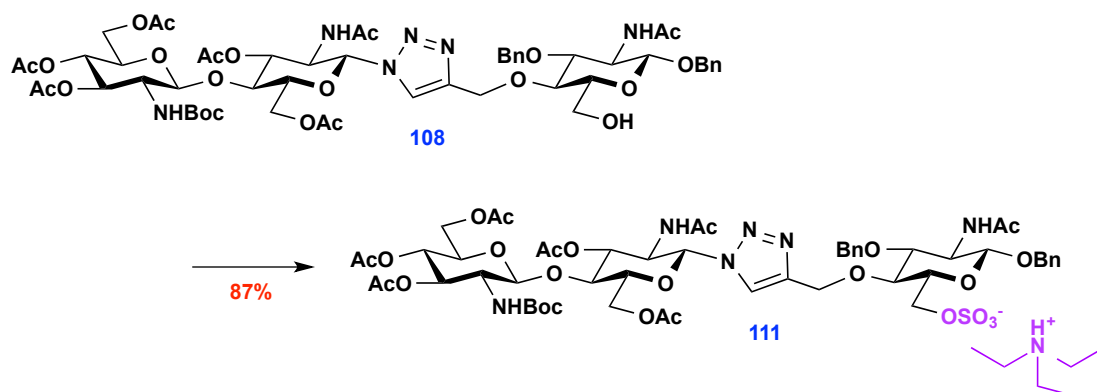


Schéma 117 : Réactifs et conditions :  $\text{SO}_3.\text{NEt}_3$  (5 éq.), DMF, t.a., 15h

Afin de montrer l'influence de la présence d'eau dans cette réaction, un dernier essai de sulfatation (entrée 4, tableau 16) a été effectué. Les conditions réactionnelles étaient identiques au précédent essai (entrée 3, tableau 16) mais le substrat n'a pas été préalablement séché par co-évaporation au toluène. La conversion alors observée n'était plus totale et un rendement plus faible de 59% en produit (**111**) a été obtenu après purification.



## B. Déprotections : obtention d'analogues de chitooligosaccharides

Avant d'insérer la chaîne lipophile, les fonctions hydroxyles et l'amine sur l'unité non réductrice ont dû être déprotégées dans un premier temps. Trois types de protections différents ont dû être clivés : les acétyles, qui pourront être retirés grâce à une base, les benzyles qui sont sensibles à l'hydrogénolyse et le *tert*-butoxycarbonyle qui est acido-labile (schéma 118).

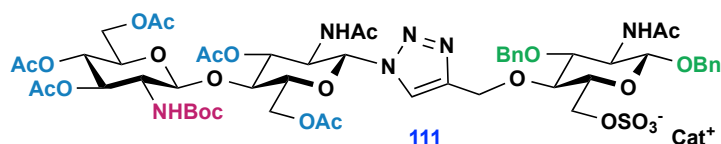


Schéma 118

### 1) Cas de l'analogue de trisaccharide

L'étape d'hydrogénolyse a été envisagée dans un premier temps. L'analogue de trisaccharide (**107**) a été utilisé afin de réaliser les premiers essais d'hydrogénolyse (schéma 119).

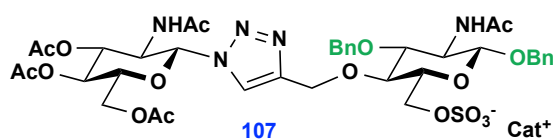


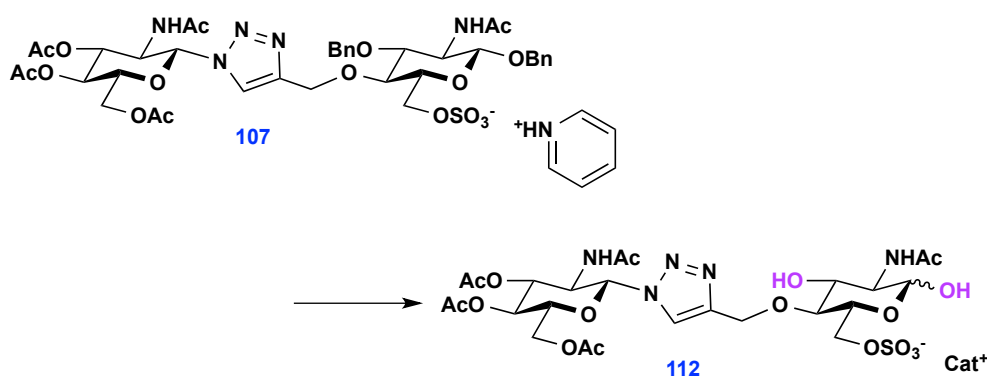
Schéma 119

Il existe de nombreux catalyseurs et sources d'hydrogène permettant de réaliser l'hydrogénolyse d'alcools benzylques sur des dérivés saccharidiques. L'utilisation de catalyseurs au palladium sous atmosphère d'hydrogène sont des conditions classiques.<sup>182</sup> Mais il est possible d'utiliser d'autres sources d'hydrogène comme des silanes<sup>183</sup> ou des résines,<sup>127</sup> ou bien d'autres méthodes de réduction, comme la réduction de Birch qui utilise un mélange d'ammoniac et de métal alcalin (classiquement du sodium mais aussi du lithium ou du potassium).<sup>184</sup> Différents essais ont été effectués afin d'obtenir le meilleur rendement d'hydrogénolyse (tableau 17).

<sup>182</sup> (a) Macchione, G. ; de Paz, J. L. ; Nieto, P. M., *Carbohydr. Res.*, **2014**, 394, 17-25. (b) Leshch, Y. ; Jacobsen, A. ; Thimm, J. ; Thiem, J., *Org. Lett.*, **2013**, 15, 4948-4959. (c) Sundberg, R. L. ; McCloskey, C. M. ; Rees, D. E. ; Coleman, G. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, 67, 1080-1084.

<sup>183</sup> Mandal, P. K. ; McMurray, J. S., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 6599-6601.

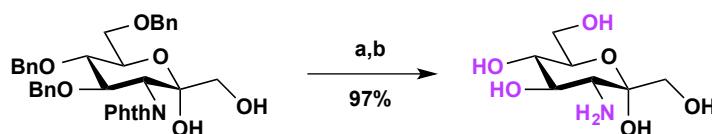
<sup>184</sup> (a) Pfäffli, P. J. ; Hixson, S. H. ; Anderson, L., *Carbohydr. Res.*, **1972**, 23, 195-206. (b) Keck, G. E. ; Kachensky, D. F. ; Enholm, E. J., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 4317-4325. (c) Yamaguchi, S ; Tanaka, H ; Takahashi, T, *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 4939-4943.



Entrée	Source d'hydrogène	"Catalyseur"	Conditions	Durée, conversion*	Rdt ( <b>112</b> )
1	H <sub>2</sub>	Pd(OH) <sub>2</sub> /C (0,5 éq.)	CH <sub>3</sub> OH, t.a.	48h, faible	/
2	Résine Dowex® Marathon® MSA	Pd/C (0,5 éq.)	iPrOH/H <sub>2</sub> O, 80°C, m.o.	40 min, totale	/
3	H <sub>2</sub>	Pd/C (1,5 éq.)	AcOEt/H <sub>2</sub> O/EtOH, t.a.	23h, totale	Quantitatif

Tableau 17

Pour le premier essai (entrée 1), les conditions classiques d'hydrogénolyse au palladium ont été envisagées. L'équipe de Thiem a utilisé de l'hydroxyde de palladium sur charbon (Pd(OH)<sub>2</sub>/C) comme catalyseur afin de déprotéger les groupements hydroxyles benzylés présents sur des dérivés heptulose (schéma 120).<sup>182b</sup>

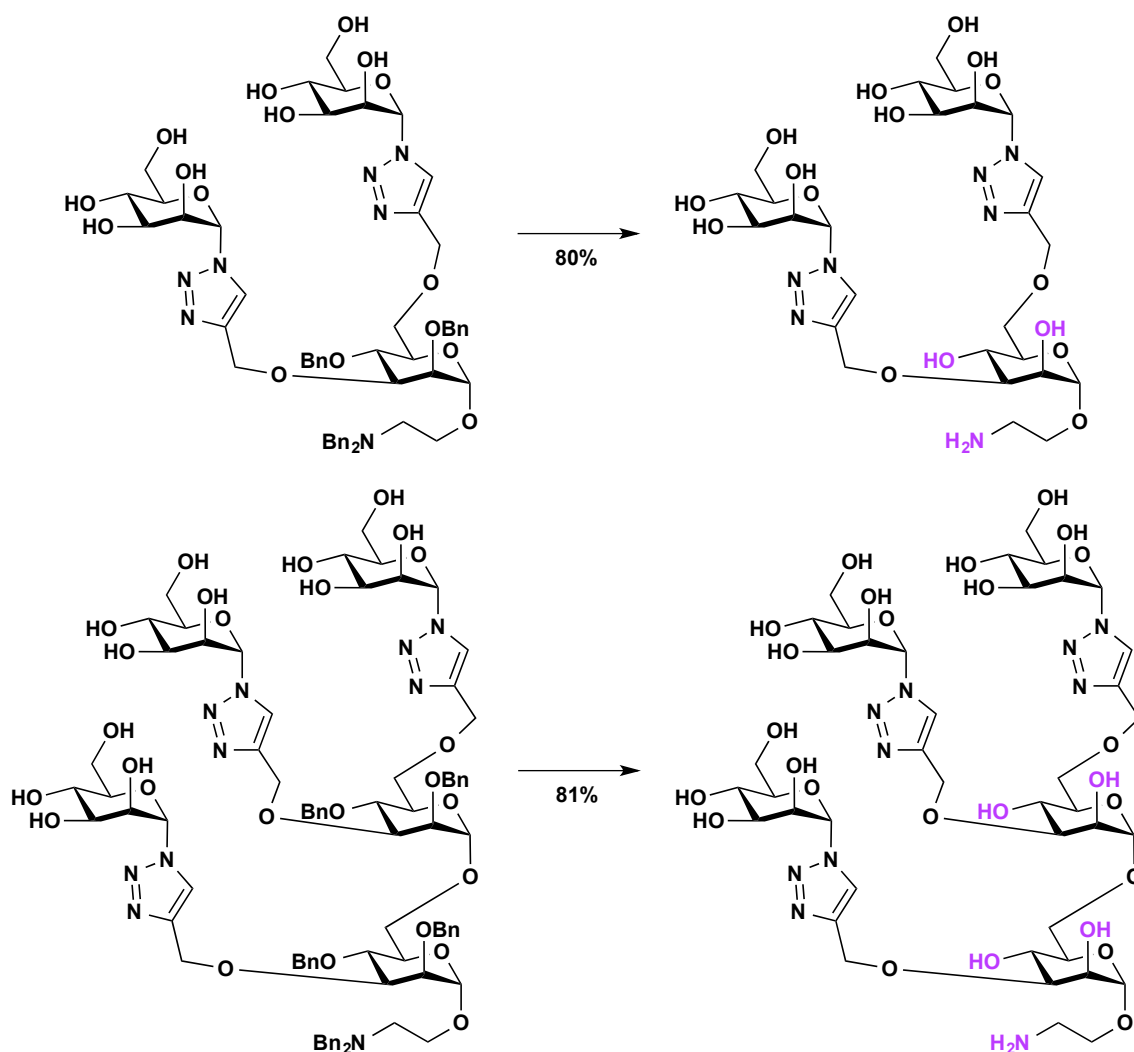


**Schéma 120** : Réactifs et conditions : (a) éthylène diamine, EtOH, 100°C, 12h ; (b) H<sub>2</sub> atm, 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (cat.), CH<sub>3</sub>OH, t.a., 24h

Dans un premier essai (entrée 1), l'analogue de trisaccharide (**107**) a été mis en réaction sous atmosphère d'hydrogène avec 20 %mol d'hydroxyde de palladium sur charbon (20% massique) dans le méthanol. Une très faible conversion a été observée après une nuit. L'augmentation de la charge catalytique à 50 %mol n'a pas permis d'améliorer la conversion, qui restait moyenne après 48 heures. De plus, la présence du substrat (**107**), de l'intermédiaire monodébenzylé et du produit (**112**) dans le brut réactionnel rendait la purification difficile à effectuer. Une autre voie d'hydrogénolyse a été envisagée.

\* Conversion de (**107**) détectée par CCM et suivi HPLC.

L'équipe de Djedaïni-Pilard a réalisé cette hydrogénélyse de manière moins classique mais efficace en utilisant une résine formate d'ammonium comme source d'hydrogène avec un catalyseur au palladium.<sup>127</sup> Ces travaux ont un intérêt particulier car ils ont été réalisés sur des analogues d'oligosaccharides dont certaines unités mannose ont été remplacées par des triazoles, qui ne semblent pas être réduits dans ces conditions.

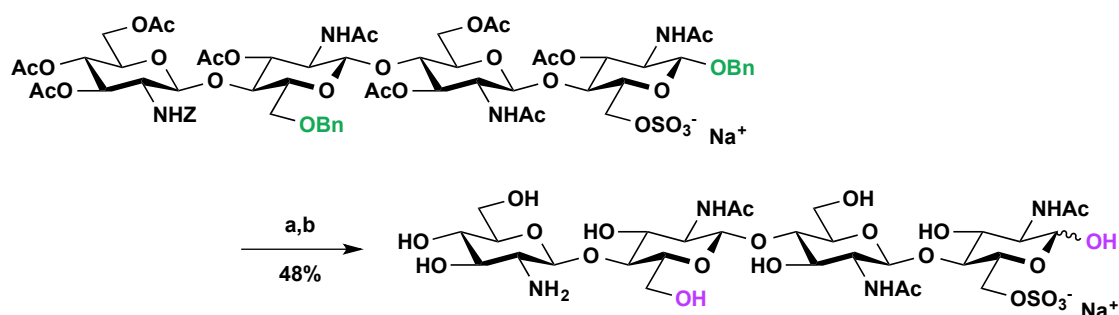


**Schéma 121** : Réactifs et conditions : Dowex® Marathon® formate d'ammonium, Pd/C (50 %mol), iPrOH/H<sub>2</sub>O, 80°C, m.o., 40 min

Les conditions de Djedaïni-Pilard ont été reproduites à l'identique dans un second essai (entrée 2, tableau 17). La conversion observée était totale mais la masse de brut réactionnel récupérée après traitement était faible et le produit (**112**) était impur. Une explication pourrait être que le composé (**112**) serait resté piégé dans la résine, du fait de sa longueur et de sa charge. Un lavage supplémentaire de la résine a permis de récupérer une petite partie de cette masse. La faible quantité de brut réactionnel récupérée n'a pas permis sa purification. Le rendement en produit (**112**) n'a donc pas pu être calculé. Même si cette résine semblait montrer une certaine efficacité

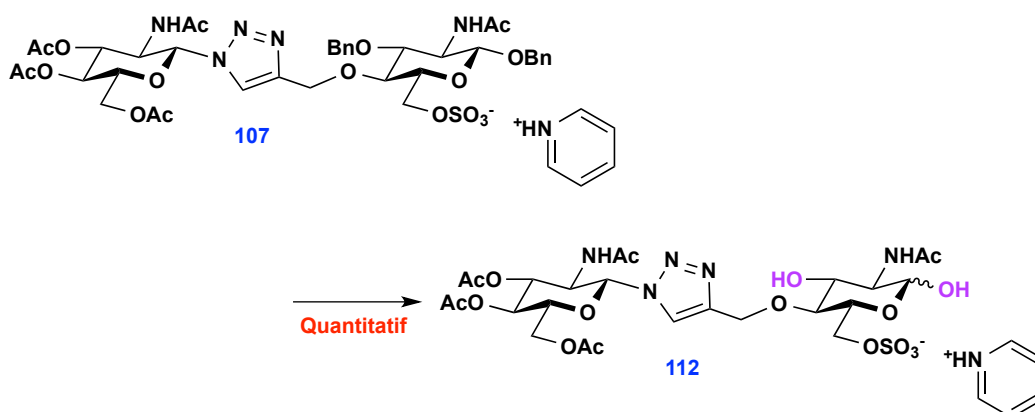
pour cette étape d'hydrogénolyse, cette méthode a apporté peu d'avantages du fait de cette perte conséquente de brut réactionnel.

Les mauvais résultats obtenus lors du premier essai d'hydrogénolyse (entrée 1, tableau 17) pourraient être dû à l'utilisation du catalyseur  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ , pas assez réactif ou provenant d'un lot dégradé par la présence d'eau. Dans leur travaux sur la synthèse de lipo-chitooligosaccharides,<sup>89</sup> suite à la sulfatation présentée précédemment (schéma 107), l'équipe de Beau a effectué la déprotection d'hydroxyles, notamment benzylés, dans des conditions d'hydrogénolyse similaires à celles de Coleman (schéma 122).<sup>182c</sup>



**Schéma 122** : Réactifs et conditions : (a)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 12 jours ; (b)  $\text{H}_2$  atm,  $\text{Pd}/\text{C}$  (cat.),  $\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 16h

Ces conditions ayant montré leur efficacité sur des dérivés proches en structure des analogues du projet, un dernier essai (entrée 3, tableau 17) a été effectué en s'inspirant de ces dernières conditions. Compte tenu des résultats précédents (entrée 1, tableau 17) et afin de d'assurer une conversion efficace, le  $\text{Pd}/\text{C}$  a été placé en excès lors de cet essai. Le substrat (**107**) a été mis en réaction sous atmosphère d'hydrogène avec 1,5 équivalents de  $\text{Pd}/\text{C}$  (10% massique) dans un mélange acétate d'éthyle/éthanol/eau (5:2,5:1). Après une nuit la conversion était totale et le produit (**112**) a pu être récupéré de manière quantitative après filtration du palladium sur Célite® (schéma 123). Aucun essai n'a été réalisé avec une quantité catalytique de  $\text{Pd}/\text{C}$ .



**Schéma 123** : Réactifs et conditions :  $\text{H}_2$  atm,  $\text{Pd}/\text{C}$  (1,5 éq.),  $\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 23h

La dernière étape était l'hydrolyse des acétates sur l'extrémité non réductrice de l'analogue de trisaccharide (**112**). Jusque là, plusieurs méthodes ont déjà pu être utilisées pour déprotéger les hydroxyles acétylés, comme les conditions de Zemplén utilisant du méthanolate de sodium (schéma 56),<sup>138</sup> classique en glycochimie, ou l'utilisation de lithine (LiOH) (schéma 97).<sup>87</sup> L'équipe de Whistler a décrit la déprotection d'acétates sur des dérivés 1,5-anhydroglucitol en utilisant un mélange de méthanol/eau/triéthylamine (schéma 124).<sup>185</sup>

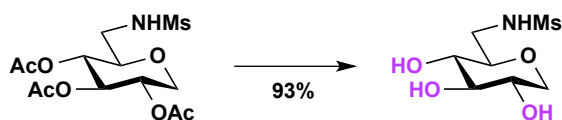


Schéma 124 : Réactifs et conditions :  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NEt}_3$  (5:4:1), t.a, 8h

L'avantage de cette méthode est d'éviter l'utilisation et la formation de sels.<sup>186</sup> A la fin de la réaction, les réactifs pourront être évaporés afin d'obtenir le produit attendu (**113**). En s'inspirant des conditions de Wistler, le substrat (**112**) a été mis en réaction à 70°C dans un mélange méthanol/eau/triéthylamine. La conversion était totale après une nuit et le produit (**113**) semblait être obtenu de manière quantitative, après purification et élution à travers une résine Dowex® échangeuse de cations, conditionnée sous forme de sodium (schéma 125).

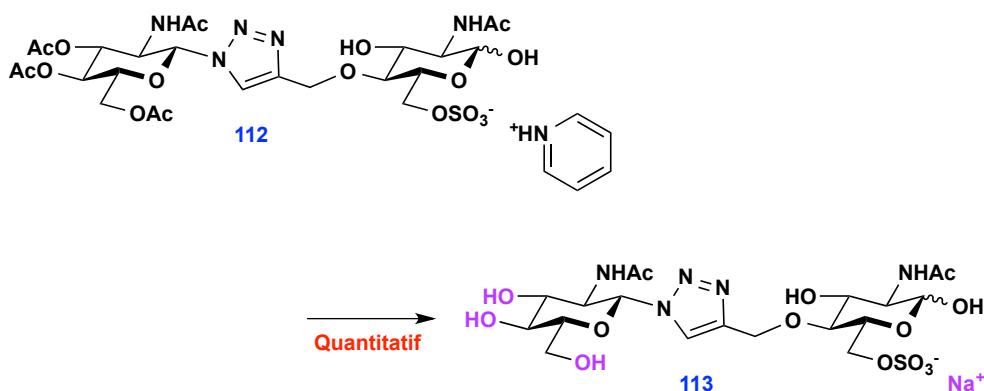


Schéma 125 : Réactifs et conditions :  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NEt}_3$  (8:1:1), 70°C, 15h puis Dowex®  $\text{Na}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$

L'analyse UPLC couplée à la spectroscopie de masse semblait montrer la présence d'un produit unique dont la masse correspondait bien à celle du composé (**113**), totalement déprotégé, mais l'analyse  $^1\text{H}$  RMN a apparemment indiqué, à l'inverse, la présence d'autres composés, notamment en observant le signal du proton  $\text{H}_1$  du cycle réducteur (Figure 3). Cet analogue de chitooligosaccharide n'a donc pas pu être purifié dans le but de pouvoir être testé biologiquement.

<sup>185</sup> Witczak, Z. J. ; Whistler, R. L., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 150, 121-131.

<sup>186</sup> Meier, L. ; Monteiro, G. C. ; Baldissera, R. A. M. ; Mandolesi Sá, M., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21, 859-866.

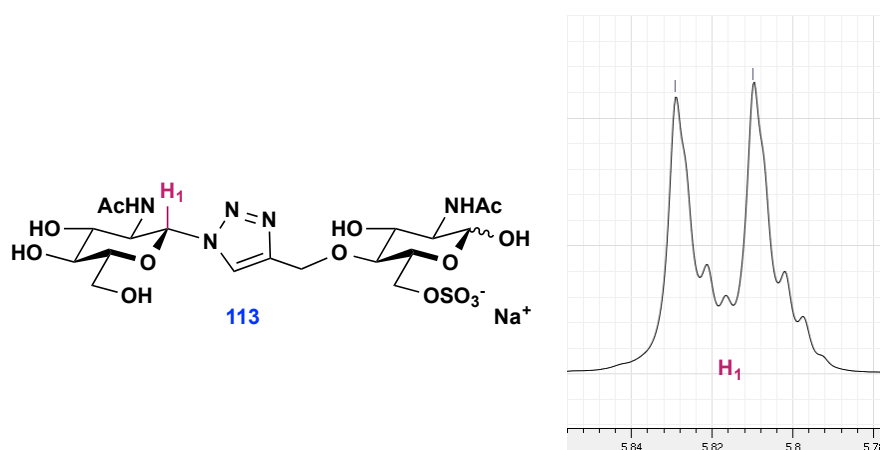


Figure 3

## 2) Cas des analogues de tétrasaccharides

Afin d'obtenir les analogues de tétrasaccharides déprotégés, les mêmes étapes de déprotection ont été mises en œuvre sur les analogues **(109)** et **(111)**.

La première étape envisagée a été la déprotection des acétates. Les substrats **(109)** et **(111)** ont chacun été mis en réaction à 70°C dans un mélange méthanol/eau/triéthylamine. Les conversions étaient totales après une nuit et les produits **(114)** et **(115)** ont pu être obtenus propres, de manière quantitative, après évaporation des réactifs et solvants (schéma 126). Il est à noter que l'analogue **(115)** a été récupéré après élution à travers une résine Dowex®  $Na^+$  afin d'échanger le contre-ion triéthylammonium du sulfate en ion sodium.

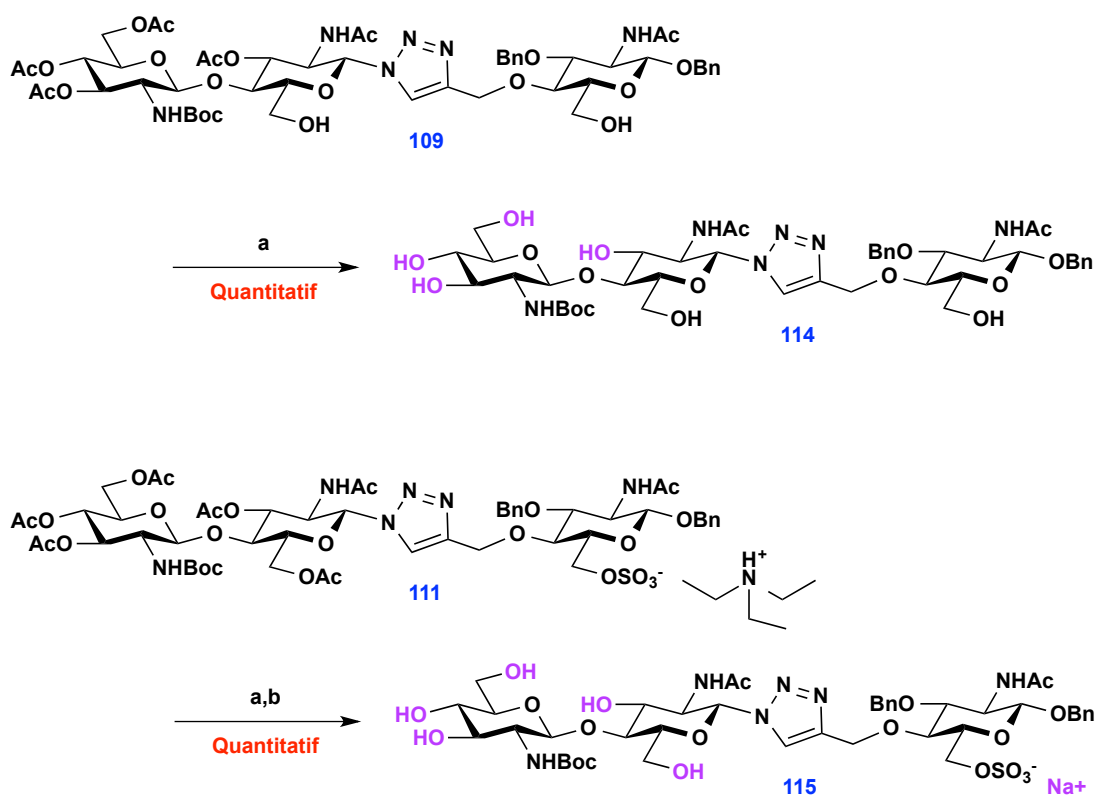


Schéma 126 : Réactifs et conditions : (a)  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NEt}_3$  (8:1:1), 70°C, 24h ; (b) Dowex®  $\text{Na}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$

Lors des deux étapes suivantes, les benzyles et le *tert*-butoxycarbonyl des analogues (**114**) et (**115**) ont dû être clivés. A priori, l'ordre de ces étapes n'avait pas d'importance. Dans le cas de l'analogue (**114**), l'hydrogénolyse, déjà mise au point, a été réalisée dans un premier temps, la déprotection en milieu acide de l'amine a été envisagée par la suite (schéma 127).

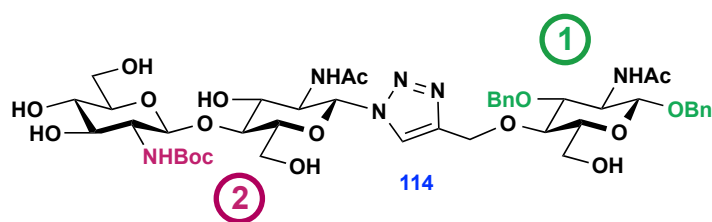


Schéma 127

L'hydrogénolyse des benzyles du composé (**114**) a été effectuée dans les mêmes conditions que dans le cas de l'analogue de trisaccharide (**112**) (schéma 123). Le Pd/C était précédemment en excès, plusieurs essais ont permis de réduire sa quantité à 50%mol. Après une nuit la conversion était totale et le produit (**116**) a été obtenu de manière quantitative après filtration du palladium sur Célite® (schéma 128).

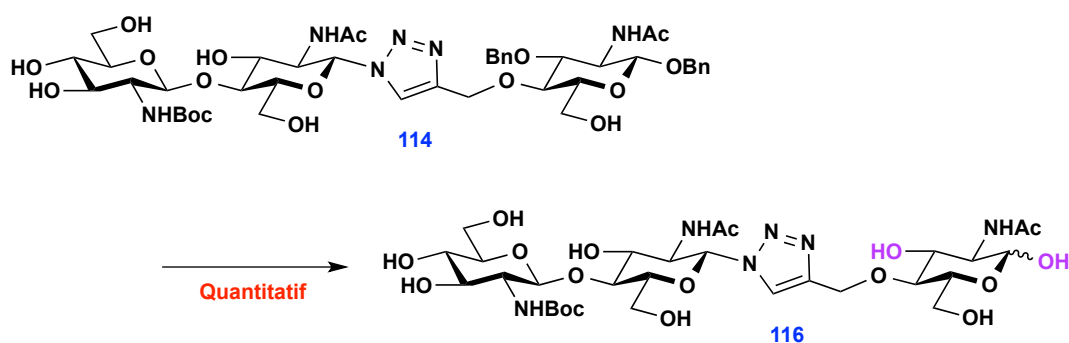


Schéma 128 : Réactifs et conditions :  $H_2$  atm, Pd/C (50 %mol), EtOAc/EtOH/ $H_2O$ , t.a., 15h

La dernière étape a donc été la déprotection de l'amine *tert*-butoxycarbonylée. La manière la plus classique de réaliser cette déprotection est d'utiliser un acide tel que l'acide chlorhydrique  $HCl$ <sup>187</sup> ou bien l'acide trifluoroacétique (TFA).<sup>188</sup> Mais d'autres méthodes sont possibles comme l'utilisation de sels de cérium (Nitrate de Cérium et d'Ammonium, CAN)<sup>189</sup> ou même plus simplement dans l'eau au reflux.<sup>190</sup> Un brevet, publié en 2012, a montré la déprotection d'une amine *tert*-butoxycarbonylée dans un mélange acide trifluoroacétique/eau à froid. Le plus intéressant dans ces travaux est que la fonction sulfate, également présente sur leur substrat, ne semble pas réagir en présence de cet acide très concentré (schéma 129).<sup>188b</sup>

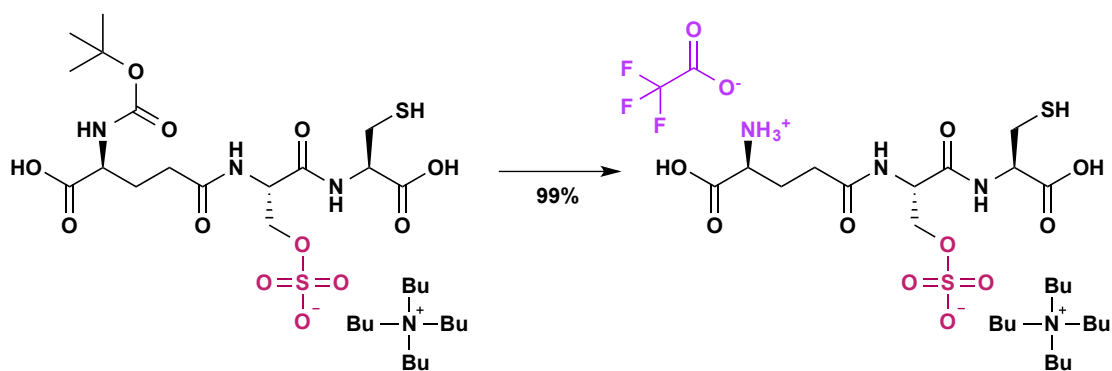


Schéma 129 : Réactifs et conditions : acide trifluoroacétique/ $H_2O$  (95:5), 0°C, 2h

<sup>187</sup> Stahl, G. L. ; Walter, R. ; Smith, C. W., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2285-2286.

<sup>188</sup> (a) Compostella, F ; Ronchi, S. ; Panza, L. ; Mariotti, S. ; Mori, L. ; De Libero, G. ; Ronchetti, F., *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 5587-5595. (b) Kato, Y. ; Mizukoshi, T. ; Suzuki, Y. ; Sato, S., Patent Appl. No. PCT/JP2012/066534, **2012**.

<sup>189</sup> Ru Hwu, J. ; Jain, M. L. ; Tsay, S.-C., Hakimelahi, G. H., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2035-2038.

<sup>190</sup> Wang, J. ; Liang, Y.-L. ; Qu, J., *Chem. Commun.*, **2009**, 5144-5146.



Par le passé, d'autres auteurs ont pourtant déjà décrit des désulfatations en milieu acide.<sup>191</sup> L'équipe de Schubert a effectué, par exemple, la désulfatation du polymère de chondroïtine avec du chlorure d'hydrogène dans le méthanol (Schéma 130).

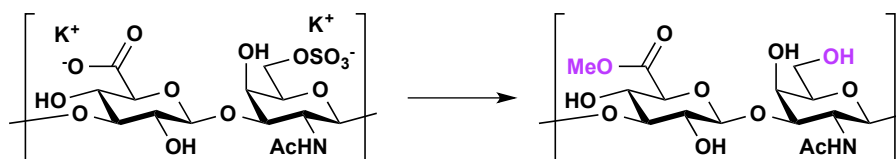


Schéma 130 : Réactifs et conditions : HCl 0.06 M dans CH<sub>3</sub>OH, t.a., 1 jour

Le composé (**116**) ne comporte pas la fonction sulfate mais les résultats du brevet peuvent être intéressants dans le cas de la déprotection de l'autre analogue de tétrasaccharide (**115**). En respectant les conditions du brevet, la conversion totale du substrat (**116**) a été observée après 10 minutes. Le produit (**117**) a pu être obtenu après purification avec un rendement quantitatif (schéma 131).

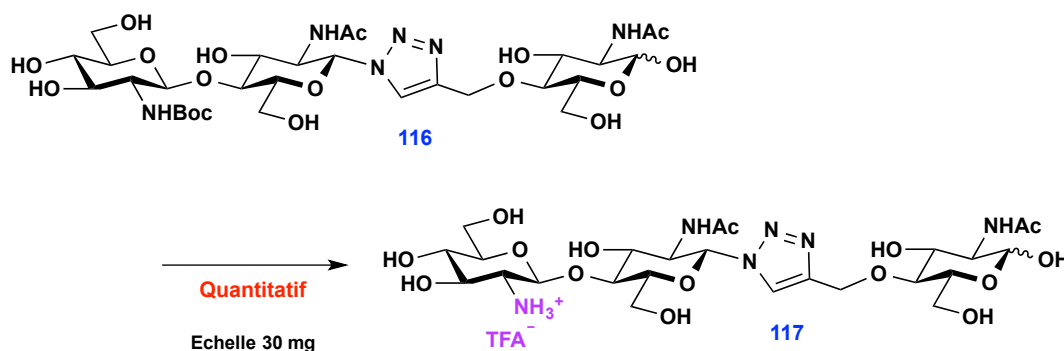


Schéma 131 : Réactifs et conditions : acide trifluoroacétique/H<sub>2</sub>O (95:5), 0°C, 10 min

<sup>191</sup> (a) Kantor, T. G. ; Schubert, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 79, 152-153. (b) Lloyd, P. F. ; Forrester, P. F., *Carbohydr. Res.*, **1971**, 19, 430-431.

Comme évoqué précédemment, le cas de l'analogue **(115)** aurait pu poser des problèmes car le risque d'hydrolyse de la fonction sulfate lors de la déprotection de l'amine *tert*-butoxycarbonylée serait possible.<sup>191</sup> Cette étape a donc été envisagée dans un premier temps, avant l'hydrogénolyse des benzyles (schéma 132).

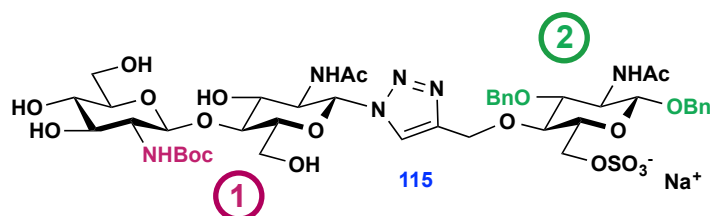


Schéma 132

Afin de déprotéger l'amine, des conditions similaires aux précédentes ont été utilisées (schéma 131). L'analogue **(115)** a été mis en réaction à 0°C dans un mélange acide trifluoroacétique/eau (85:15). Le mélange a été agité pendant 20 minutes seulement. Après concentration, une analyse UPLC couplée à la spectroscopie de masse a bien montré la présence d'un produit unique, dont la masse correspondait à l'analogue sulfaté **(118)**. Le produit **(118)** a été récupéré de manière quantitative sans purification (schéma 133).

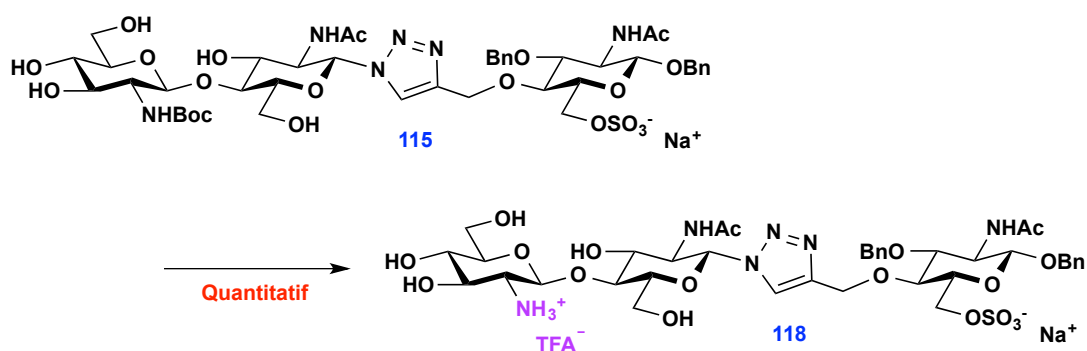


Schéma 133 : Réactifs et conditions : acide trifluoroacétique/H<sub>2</sub>O (85:15), 0°C, 20 min

Afin de terminer la déprotection des hydroxyles, le substrat **(118)** a été mis en réaction dans les mêmes conditions d'hydrogénolyse que précédemment (schéma 128). Après une nuit, la conversion était totale et le produit **(119)** a pu être obtenu de manière quantitative après filtration du palladium sur Céelite® et purification sur cartouche C18 Phenomenex®.

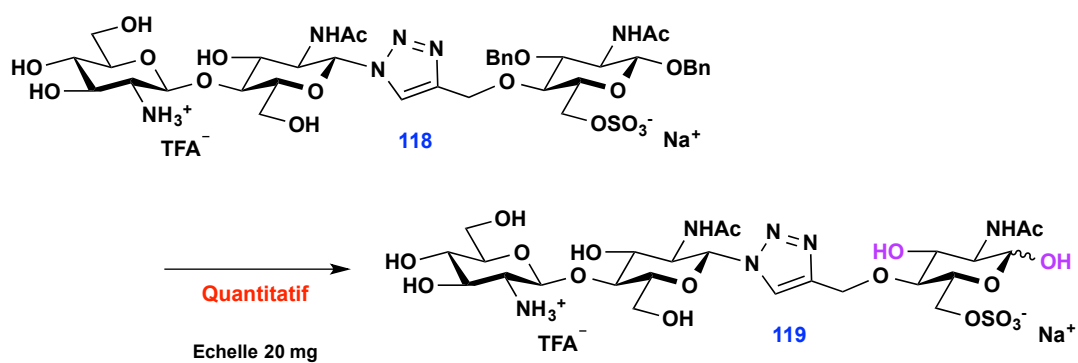


Schéma 134 : Réactifs et conditions : Pd/C (50 %mol), EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O, t.a., 18h

Les analogues de chitooligosaccharides CO-IV (**117**) et CO-IV (S) (**119**) ont finalement été obtenus propres grâce à des étapes de déprotection qui ont permis de réaliser une seule étape de purification finale. Différentes chaînes carbonées ont ainsi été couplées à l'amine déprotégée afin d'obtenir des analogues de lipo-chitooligosaccharides.

### III. SYNTHÈSES D'ANALOGUES DE LIPO-CHITOOLOGOSACCHARIDES

Les chaînes carbonées présentes sur les LCOs naturels peuvent être très variées et sont linéaires<sup>70,57</sup>. Le but du projet étant d'obtenir des analogues de facteurs symbiotiques, deux chaînes simples, trouvées couramment sur ces LCOs, ont été envisagées pour le couplage sur les analogues de COs (**117**) et (**119**) : une chaîne palmitique (C16:0) et une chaîne oléique (C18:1 Δ9) (schéma 135).

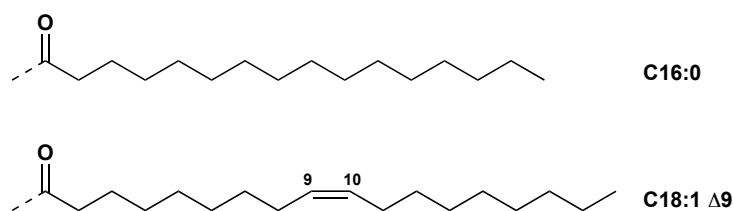
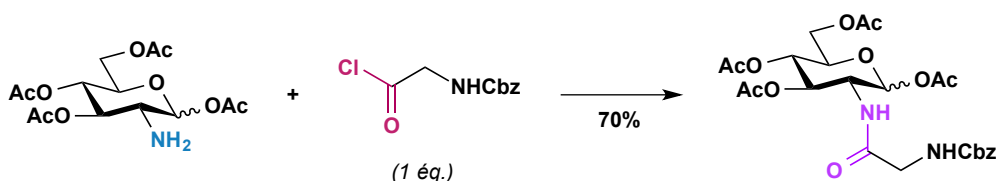


Schéma 135

#### A. Réaction d'acylation : utilisation d'esters activés

L'acylation des amines est une réaction qui a été très étudiée, de nombreuses conditions ont été mises au point, notamment grâce à la chimie peptidique.<sup>192</sup> La première acylation sur un dérivé saccharidique aminé a été réalisée en 1932 par Bergmann et Zervas.<sup>193</sup> Ils cherchaient à effectuer la synthèse de glucopeptides par acylation de la glycine sur la D-glucosamine per-O-acétylée. Ils ont utilisé une glycine dont l'acide a été modifié en chlorure d'acyle pour être plus réactif (schéma 136). Cette méthode a pu être étendue à différents acides aminés par la suite.<sup>194</sup>

Schéma 136 : Réactifs et conditions : Pyridine (4 éq.), CHCl<sub>3</sub>, t.a., 1h

Le rendement qu'ils ont obtenu était bon mais la conversion n'était pas totale. L'inconvénient de cette méthode est la formation préalable de ce chlorure d'acyle qui est une espèce facilement hydrolysable par la présence de traces d'eau. L'équipe de Beau a également

<sup>192</sup> Isidro-Llobet, A. ; Álvarez, M. ; Albericio, F., *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 2455-2504.

<sup>193</sup> Bergmann, M. ; Zervas, L., *Chem. Ber.*, **1932**, 65, 1201-1205.

<sup>194</sup> Doherty, D. G. ; Popenoe, E. A. ; Link, K. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3466-3468.

utilisé des chaînes carbonées activées par un chlorure d'acyle afin de terminer la synthèse de leur premier facteur de nodulation.<sup>77</sup> Malgré l'utilisation d'un fort excès de chaîne activée, ils ne sont pas parvenus à obtenir une conversion totale et ont dû récupérer l'oligosaccharide de départ n'ayant pas réagi (schéma 137).

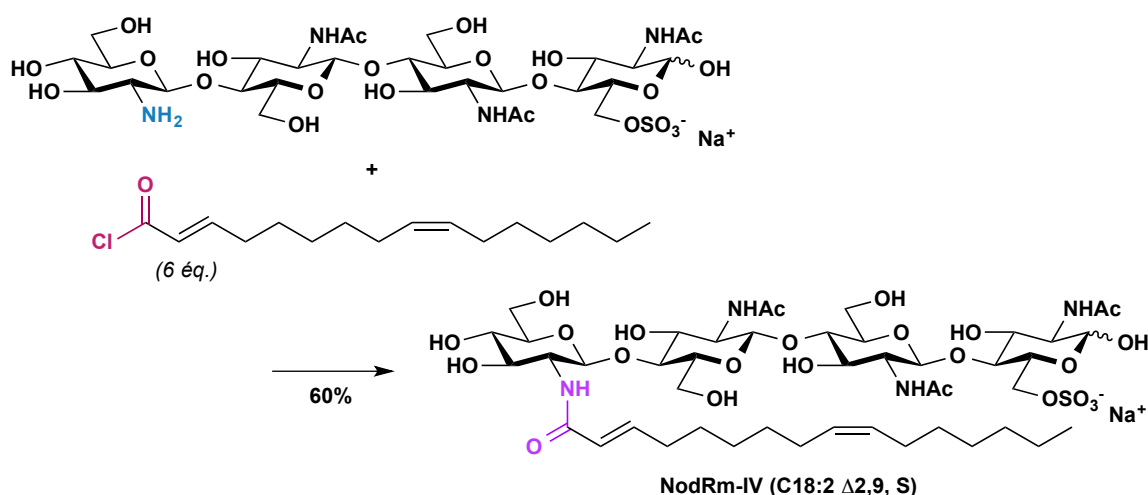


Schéma 137 : Réactifs et conditions : NaHCO<sub>3</sub>, AcOEt/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, t.a., 48h

De nombreuses méthodes d'activation *in situ* de l'acide carboxylique, sans réaliser d'étapes d'activation préalable, ont été mises au point. En glycochimie, les carbodiimides comme réactif d'acylation sont couramment utilisés. Le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)<sup>195</sup> ou le *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbonate (EDC)<sup>196</sup> sont des réactifs classiques, souvent couplés avec un additif acide comme le 1-hydroxybenzotriazole (HOBT).<sup>197</sup> L'utilisation d'uroniums, comme le HBTU, est également courante.<sup>198</sup>

L'inconvénient de ces méthodes est la formation de sous-produits, comme les urées, parfois difficilement séparables du produit attendu. Plutôt que d'activer l'acide carboxylique sous forme de chlorure d'acyle, différents travaux ont montré que l'utilisation d'esters activés permet plus de stabilité sans perdre en réactivité. Par exemple, l'utilisation du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) est très

<sup>195</sup> (a) Bonner, W. A. ; McNamee, P. I., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 2554-2555. (b) Sheehan, J. C. ; Hess, G. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 1067-1068.

<sup>196</sup> (a) Yoshimura, J. ; Sato, K.-I. ; Aqeel, A. ; Singh, R. B. ; Hashimoto, H., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 144, C15-C17. (b) Sheehan, J. C. ; Cruickshank, P. A. ; Boshart, G. L., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 2525-2528.

<sup>197</sup> Rich, D. H. ; Singh, J. dans Gross, E. ; Meienhofer, J., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York, **1979**, 1, 241-261.

<sup>198</sup> (a) Baisch, G. ; Öhrlein, R., *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 1673-1682. (b) Dourtoglou, V. ; Ziegler, J.C. ; Gross, B., *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 15, 1269-1272.

courante, notamment pour activer des acides aminés,<sup>199</sup> et permet, après couplage, d'obtenir des sous-produits hydrosolubles. Dans le cadre de la synthèse de facteurs Nod, d'autres travaux ont montré, par exemple, l'utilisation d'ester de thiazolidinethione afin d'introduire la chaîne carbonée en fin de synthèse (schéma 138).<sup>75</sup>

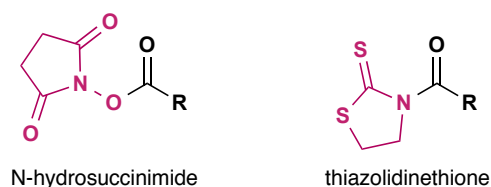


Schéma 138

En 1994, la même année que l'équipe de Beau,<sup>77</sup> le groupe de Ogawa a également effectué la synthèse du même facteur de nodulation, NodSm-IV, en utilisant une chaîne carbonée activée par le NHS. Cependant, les auteurs ne semblent avoir observé une conversion totale du substrat de départ chitooligosaccharidique.<sup>200</sup> Dans leurs travaux de 2014, Beau et son équipe sont parvenus à obtenir une conversion totale de leur CO en utilisant un faible excès de chaîne carbonée, activée sous la forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide, ainsi que de la triéthylamine (schéma 139).<sup>87</sup>

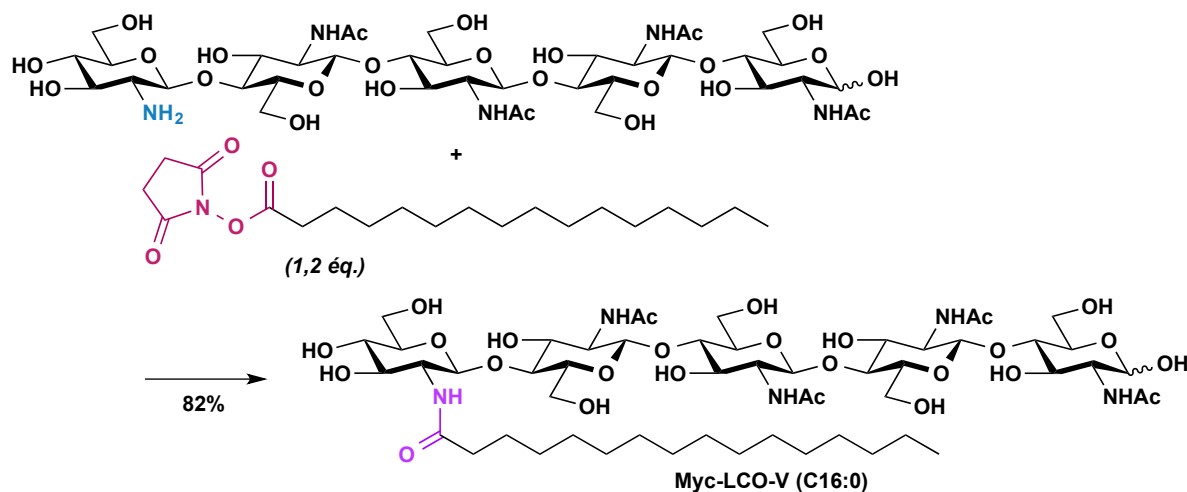


Schéma 139 : Réactifs et conditions : triéthylamine (1,3 éq.), DMSO, 60°C, 5 jours

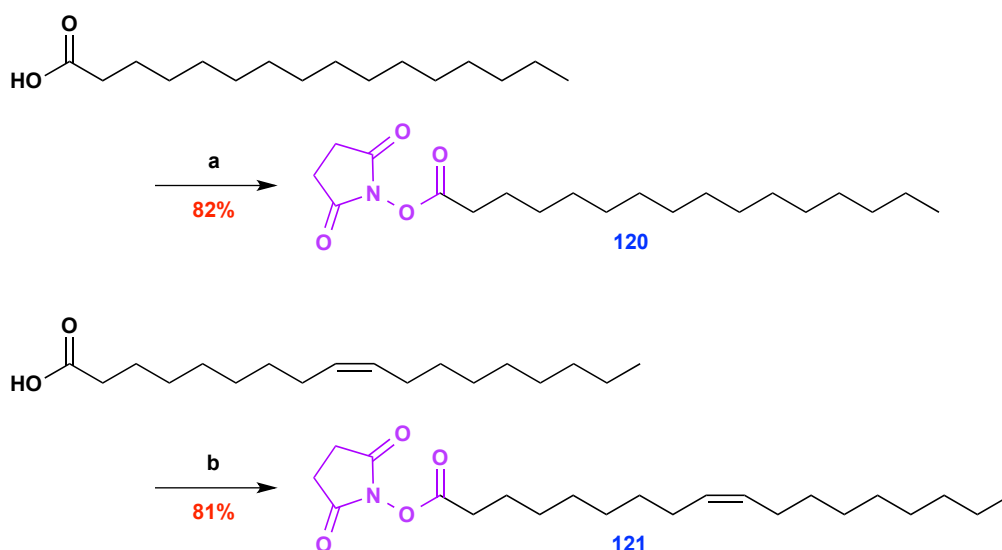
Dans le cadre du projet, leurs conditions ont été reproduites afin d'obtenir les analogues de LCOs souhaités.

<sup>199</sup> (a) Griffith, B. R. ; Krepel, C. ; Fu, X. ; Blanchard, S. ; Ahmed, A. ; Edmiston, C. E. ; Thorson, J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 8150-8155. (b) Anderson, G. W. ; Zimmerman, J. E. ; Callahan, F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1839-1842. (c) Lapidot, Y. ; Rappoport, S. ; Wolman, Y., *J. Lipid Res.*, **1967**, 8, 142-145.

<sup>200</sup> Ikeshita, S. ; Sakamoto, A. ; Nakahara, Yu. ; Nakahara, Yo. ; Ogawa, T., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 3123-3126.

## B. Couplage de la chaîne carbonée

La synthèse des deux esters activés a été effectuée dans un premier temps. Des conditions de la littérature ont été reproduites afin d'obtenir les esters de NHS, palmitate<sup>201</sup> (**120**) et oléate<sup>202</sup> (**121**). Chaque chaîne carbonée a été mise en réaction avec un excès de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide et de *N*-hydroxysuccinimide dans le tétrahydrofurane. Après 2 jours, les conversions semblaient totales et de bons rendements en esters activés (**120**) et (**121**) ont été obtenus après purification (schéma 140). Il est à noter qu'une quantité catalytique de 4-pyrrolidinopyridine a été utilisée en supplément du DCC dans le cas de l'ester oléate (**121**).



**Schéma 140** : Réactifs et conditions : (a) *N*-hydroxysuccinimide (1,4 éq.), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1,6 éq.), THF, t.a., 48h ; (b) *N*-hydroxysuccinimide (2,0 éq.), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1,5 éq.), 4-pyrrolidinopyridine (10 %mol), THF, t.a., 32h

Le couplage des chaînes (**120**) et (**121**) a été envisagé sur les deux analogues de CO-IV, sulfaté (**119**) et non sulfaté (**117**), en suivant les conditions de l'équipe de Beau.<sup>87</sup> Chaque analogue a été mis en réaction avec un faible excès de chaîne carbonée activée et de la triéthylamine. Dans tous les cas, une conversion totale a été observée après un jour et les analogues de LCO-IV ont pu être récupérés avec des rendements allant de très bon à quantitatif (schéma 141). Il est à noter qu'aucune purification par chromatographie n'a été effectuée, ces analogues étant très peu solubles dans les solvants usuels, des lavages et centrifugations ont suffi à obtenir ces produits propres.

<sup>201</sup> Shen, G. ; Fang, H. ; Song, Y. ; Bielska, A. A. ; Wang, Z. ; Taylor, J.-S. A., *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 1729-1736.

<sup>202</sup> Vávrová, K. ; Hrabálek, A. ; Doležal, P. ; Šámalová, L. ; Palát, K. ; Zbytovská, J. ; Holas, T. ; Klimentová, J., *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 5381-5390.

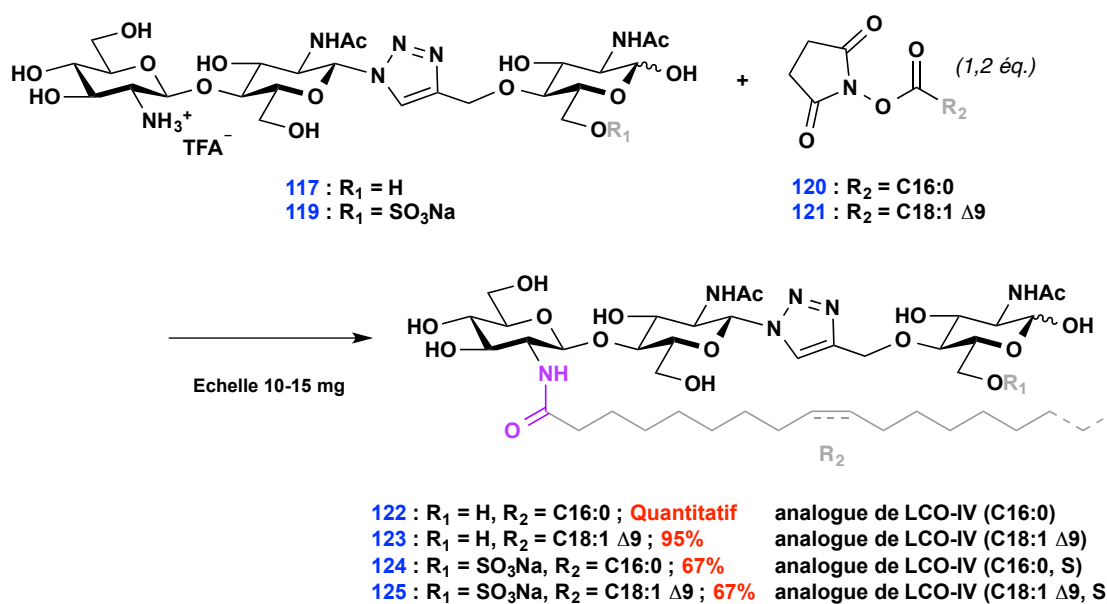


Schéma 141 : Réactifs et conditions : triéthylamine (1,8 éq.), DMSO, 60°C, 24h

Finalement, quatre analogues de facteurs symbiotiques ont été obtenus. Leur reconnaissance par des récepteurs de LCOs a ainsi pu être évaluée.



## IV. TEST DE RECONNAISSANCE BIOLOGIQUE : COMPETITION AVEC UN LIPO-CHITOLIGOSACCHARIDE RADIOMARQUE

---

Afin de savoir si ces analogues sont reconnus par une protéine de liaison des LCOs naturels, l'équipe de Cullimore et Bono m'a accepté quelques jours au Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes de Toulouse afin d'effectuer des tests préliminaires de compétition.

Dans ce test, la molécule à tester et un LCO de référence radiomarqué ont été mis en compétition en présence de la protéine d'intérêt, LYR3. Chacun de ces deux substrats en mélange a formé une certaine quantité de complexes protéiques en fonction de leur affinité respective pour le site actif. En comparant la quantité de complexes formés par le ligand radiomarqué, avec et sans l'analogue compétiteur, il a été possible de déduire l'affinité de cet analogue de LCO pour la protéine.

L'équipe de Cullimore et Bono utilise des facteurs de nodulation radiomarqués avec du  $^{35}\text{S}$  comme substrat de référence. Ce radiomarquage est important car il permet de quantifier les complexes protéiques formés avec ce LCO de référence. Ces facteurs radiomarqués sont obtenus par voie enzymatique à partir d'un LCO non sulfaté (schéma 142).<sup>203</sup> La formation du  $^{35}\text{S}$ -3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate ( $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$ ) est effectuée dans un premier temps avec du sulfate de sodium radioactif ( $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ ) et un extrait de levure contenant notamment deux enzymes, l'ATP sulfurylase et l'APS kinase. Le  $[^{35}\text{S}]\text{PAPS}$  est ensuite utilisé comme substrat de l'enzyme NodH afin de transférer le sulfate radioactif sur le LCO-V non sulfaté. Ils sont ainsi parvenus à obtenir de bons rendements en facteur de nodulation radiomarqué.

---

<sup>203</sup> (a) Gressent, F. ; Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R. ; Bono, J.-J., *BMC Biochem.*, **2004**, 5. (b) Ehrhardt, D. W. ; Morrey Atkinson, E. ; Faull, K. F. ; Freedberg, D. I. ; Sutherlin, D. P. ; Armstrong, R. ; Long, S. R., *J. Bacteriol.*, **1995**, 177, 6237-6245. (c) Bourdineaud, J.-P. ; Bono, J.-J. ; Ranjeva, R. ; Cullimore, J. V., *Biochem. J.*, **1995**, 306, 259-264.

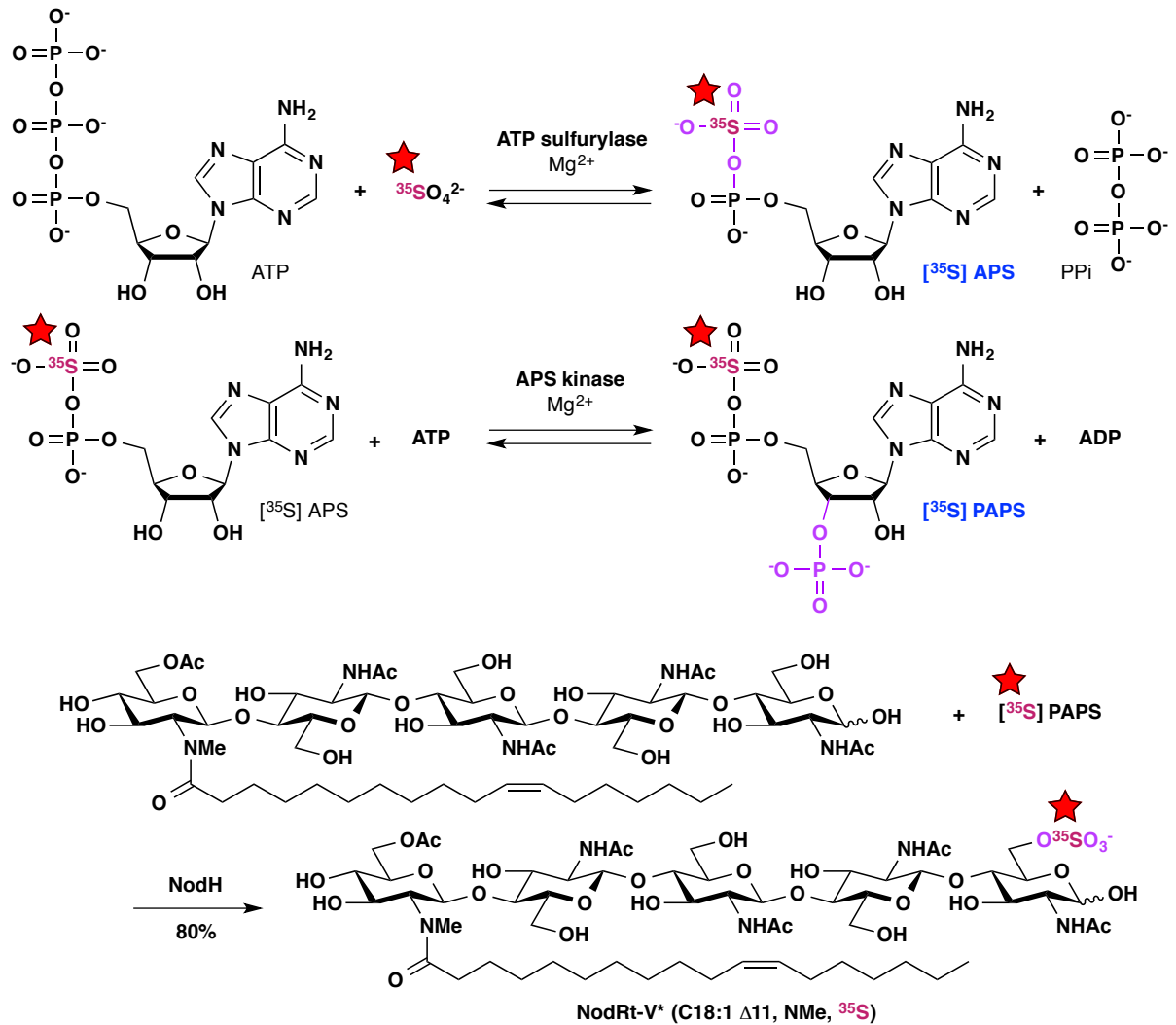
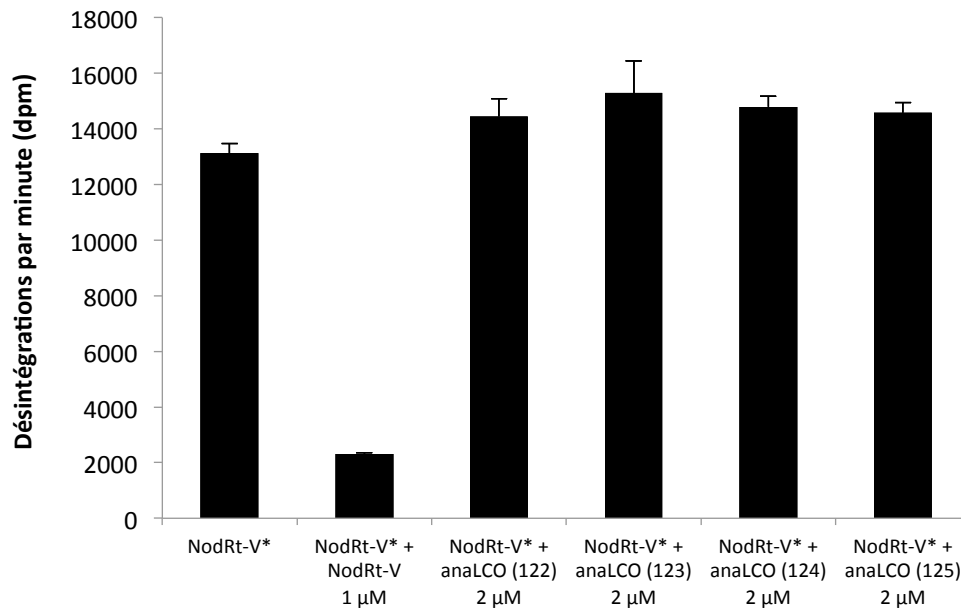


Schéma 142

Afin de réaliser les tests de compétition,<sup>102,105</sup> une quantité d'extrait membranaire contenant LYR3-NFP/YFP, protéine de liaison des LCOs, explicitée dans l'introduction du projet, a été incubée dans un tampon de liaison en présence de ligand radioactif (NodRt-V (C18:1 Δ11, NMe, <sup>35</sup>S), conditions non saturantes) et d'un ligand compétiteur froid. Après filtration, le filtre contenant les protéines complexées aux différents ligands a été placé dans un flacon contenant un mélange de scintillation afin de mesurer la radioactivité (dpm) contenue sur le filtre, qui correspond à la quantité de complexe récepteur-ligand radioactif. Plus la radioactivité mesurée est importante, moins le compétiteur étudié s'est lié spécifiquement à la protéine. Différentes expériences ont été effectuées en modifiant l'analogue de LCO compétiteur. Il est à noter que toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et dans les mêmes conditions (le tampon et les lots de référence radiomarquée et d'extrait végétal utilisés étaient identiques). La mesure de radioactivité mise en

évidence pour chaque test de compétition est une moyenne de chaque triplicata d'expérience (graphique 1).



**Graphique 1 :** *Conditions :* Extrait membranaire LYR3-NFP/YFP (10 μg), NodRt-V\* (0,5 nM), compétiteur froid, volume total 200 μL, 0°C, 1h

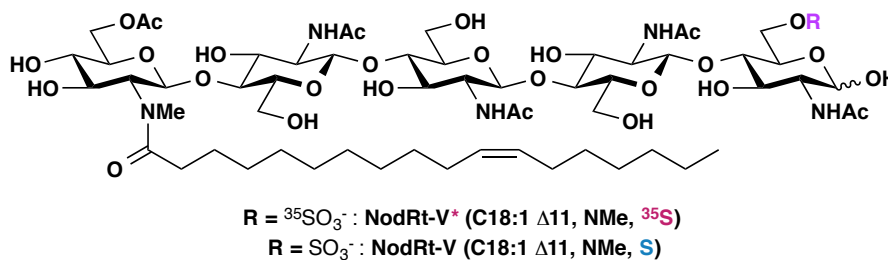


Schéma 143

Une première expérience a été réalisée sans compétiteur froid (entrée 1). Cette expérience a permis d'estimer la liaison totale du LCO radiomarqué (0,5 nM) avec la protéine. La radioactivité obtenue était donc maximale pour cette expérience puisque qu'aucune compétition n'a pu se produire.

La deuxième expérience (entrée 2) a permis de mettre en évidence la liaison non spécifique entre le LCO radiomarqué et la protéine. En effet, la liaison d'un ligand avec une protéine peut ne pas correspondre seulement à la liaison dans le site actif (liaison spécifique). Le substrat se lie également à d'autres sites non spécifiques présents sur la protéine (ou sur d'autres protéines dans le cas d'extraits biologiques, comme ici). Afin d'évaluer la liaison non spécifique du ligand radiomarqué, une grande quantité d'un bon compétiteur froid (NodRt-V) a été ajoutée dans le milieu. L'ajout d'un

excès (1  $\mu\text{M}$ ) de compétiteur par rapport au ligand radioactif (0,5 nM) a permis de supposer que la quasi-totalité des sites spécifiques est complexée au LCO froid. Peu de complexes radiomarqués sont alors formés et la quantité de radioactivité, par conséquent plus faible, correspond à la liaison non spécifique du LCO radiomarqué.

Les expériences de compétition des analogues de LCOs **(122)**, **(123)**, **(124)** et **(125)** ont ensuite été effectuées (entrées 3 à 6). Comme précédemment, un excès d'analogue froid (2  $\mu\text{M}$ ) a été ajouté au ligand radiomarqué. Pour chacune des expériences, on a pu remarquer que la quantité de radioactivité était similaire à celle obtenue pour l'expérience sans compétiteur. Aucune compétition n'a donc été observée, les quatre analogues **(122)** à **(125)** ne semblent donc pas avoir d'affinité pour le site de liaison de la protéine LYR3.

D'autres tests de compétition ont été effectués en diminuant la quantité de protéine ou en modifiant le solvant de solubilisation des analogues de LCOs synthétisés. Les résultats obtenus, non explicités ici, sont similaires aux précédents et conduisent donc à la même conclusion.

Finalement, les analogues synthétisés semblent ne pas être reconnu par la protéine de liaison des LCOs naturels, LYR3. Néanmoins, des tests sur des plantes, comme la légumineuse *Medicago truncatula*, pourront être effectués afin de vérifier les résultats des tests préliminaires de compétition et juger de l'impact réel des analogues de LCOs **(122)**, **(123)**, **(124)** et **(125)** sur les plantes.



RECHERCHE DE NOUVEAUX  
ANALOGUES



## I. ESSAIS DE MODIFICATIONS DU LIEN TRIAZOLE

### A. Modification de la structure

La non reconnaissance, observée pour les analogues de LCOs précédents, montre que ce lien ne mime pas suffisamment bien la structure de l'unité saccharidique remplacée. La longueur du lien pourrait, par exemple, être mise en cause car le triazole induirait une distance plus courte entre les unités saccharidiques I et III, qui pourrait limiter l'approche des analogues synthétisés dans le site actif. Une première idée a donc été d'obtenir de nouveaux analogues en ajoutant un carbone au lien triazole (schéma 144), permettant ainsi de mieux respecter la distance entre les unités saccharidiques.

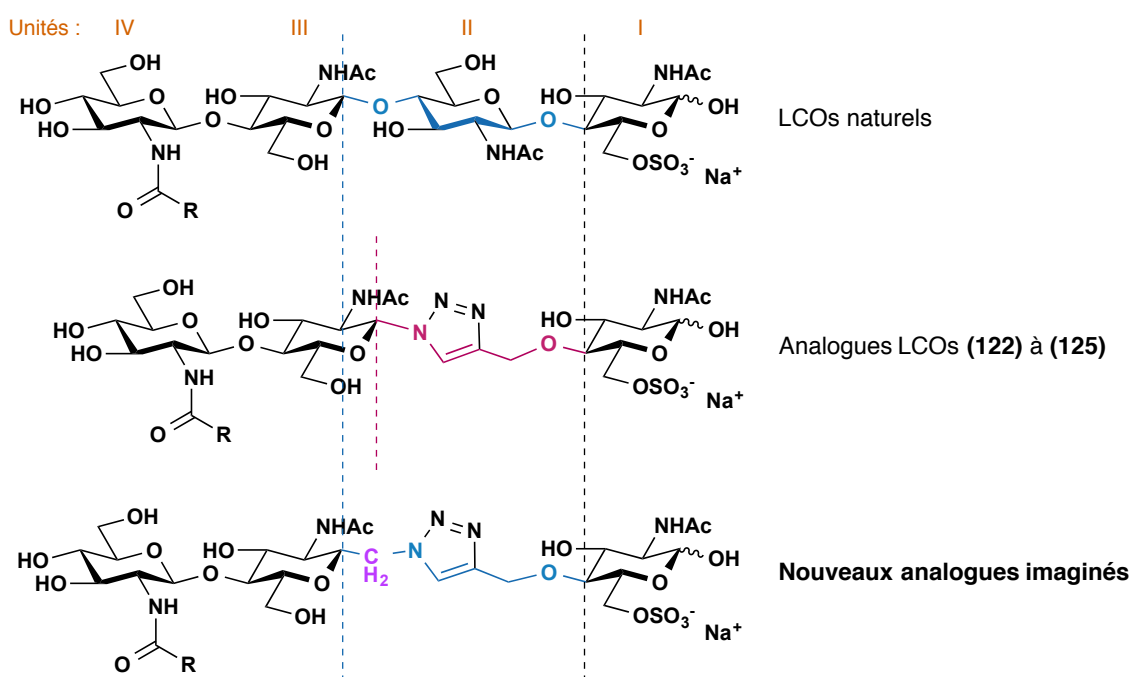


Schéma 144

Il est à noter que l'introduction d'un nouveau carbone induit une plus grande flexibilité du lien. Cela pourrait permettre de faciliter l'introduction de l'analogue dans le site de liaison ou, au contraire, apporter une trop grande flexibilité empêchant l'analogue de se complexer à la protéine (schéma 145).



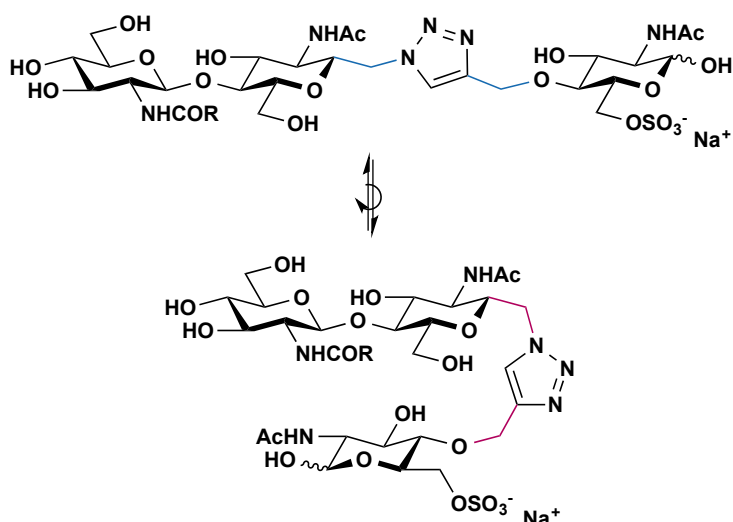


Schéma 145

Différentes stratégies de synthèse ont été envisagées afin d'obtenir ces nouveaux analogues. Toutes ces voies nécessitent la formation d'un C-glycoside disaccharidique, en modifiant la brique  $\beta$ -azoture (**102**) (schéma 98) par une brique  $\beta$ -azidométhyle (**126**) (schéma 146). La brique monosaccharidique propargylique (**110**) (schéma 114) pourrait être utilisée, à priori sans modifications, pour effectuer la cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre avec le composé (**126**).

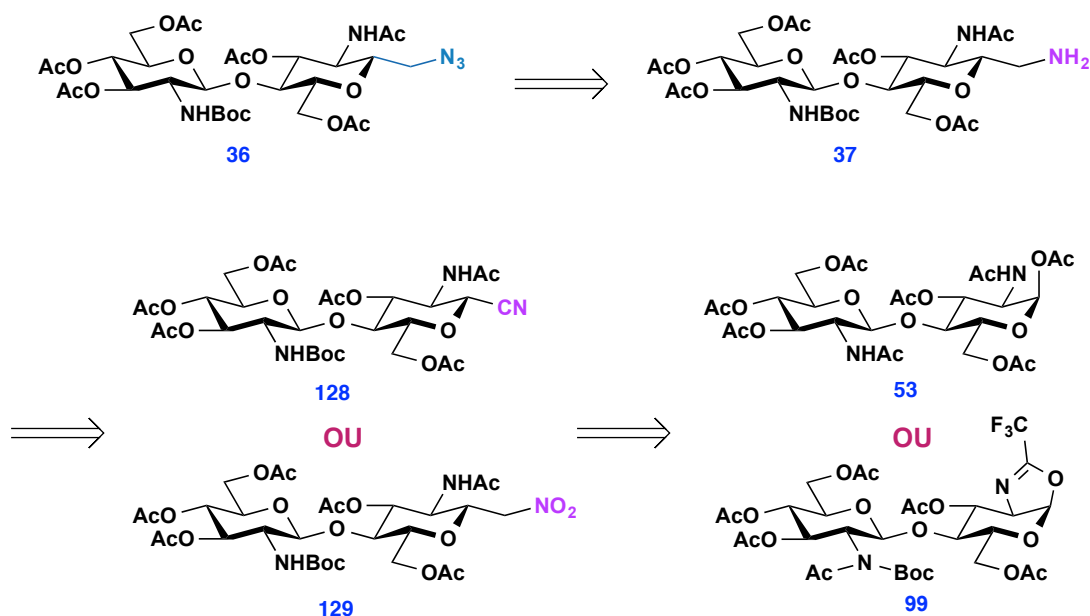


Schéma 146

La brique (**126**) pourrait être obtenue après une réaction de transfert de diazonium sur l'amine (**127**). Une étape de réduction permettrait d'obtenir cette amine à partir du nitrile (**128**) ou du composé nitro (**129**), par exemple.

La synthèse de C-glycosides a été très étudiée depuis les années 1970,<sup>204</sup> notamment grâce à la découverte de C-nucleosides naturels ayant des propriétés pharmacologiques intéressantes.<sup>205</sup> Les C-glycosides sont également de bons mimes de O-glycosides<sup>206</sup> et peuvent donc être utilisés comme analogues dans des processus naturels, comme inhibiteurs par exemple. Pour la synthèse de ces nouveaux analogues, deux stratégies ont été étudiées.

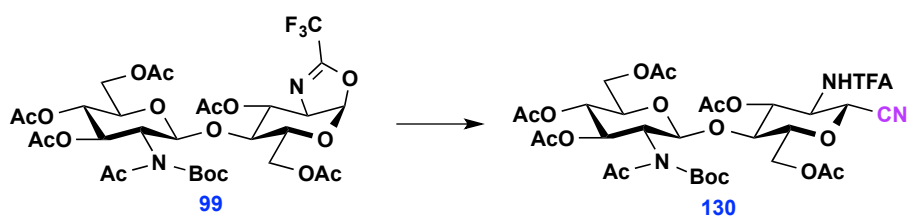
## B. Stratégie cyano

Lors de la synthèse de la précédente brique disaccharidique (**102**), l'introduction du groupement azoture avait été effectuée en formant préalablement l'oxazoline (**99**), un bon donneur de glycosyle, et en utilisant l'azoture de triméthylsilyle et des ions fluorures (TBAF) (schéma 98). Afin de valoriser cet intermédiaire oxazoline (**99**), une première stratégie a été envisagée en introduisant un groupement cyano de la même manière que le groupement azoture. Plusieurs essais ont été effectués en utilisant le cyanure de triméthylsilyle (TMSCN) et différents promoteur afin d'accélérer la réaction (tableau 18).

<sup>204</sup> (a) Beau, J.-M. ; Gallagher, T., dans Driguez, H. ; Thiem, J., *Glycoscience Synthesis of Substrate Analogs and Mimetics, Topics Curr. Chem.*, **1997**, 187, 1-54. (b) Du, Y. ; Linhardt, R. J., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 9913-9959.

<sup>205</sup> Suhadolnik, R. J., *Nucleoside Antibiotics*, Wiley-Interscience: New York, **1970**.

<sup>206</sup> Weatherman, R. ; Mortell, K. H. ; Chernevak, M. ; Kiessling, L. L. ; Toone, E. J., *Biochemistry*, **1996**, 35, 3619-3624.



Entrée	TMSCN	Promoteur	Conditions	Durée, conversion*	Rdt ( <b>130</b> )
1	1,5 éq.	<b>TBAF (1,5 éq.)</b>	THF (0.1 M), reflux	23h, moyenne	<b>dégradation</b>
2	13 éq.	<b>CuCl<sub>2</sub> (2 éq.)</b>	DCM (0,5 M), reflux	15h, moyenne	<b>dégradation</b>
3	1,4 éq.	TBAF (1,4 éq.)	THF (0,05 M), <b>-40°C à t.a.</b>	2 jours, faible	<b>dégradation</b>
4	2,0 éq.	<b>BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (1,0 éq.)</b>	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> (0,1 M), t.a.	30 min, totale	<b>dégradation</b>

Tableau 18

Un premier essai (entrée 1) a été effectué dans les conditions qui avaient donné les meilleurs résultats pour l'introduction de l'azoture (tableau 12, schéma 96). L'oxazoline (**99**) a été mise en réaction à chaud avec un excès de cyanure de triméthylsilyle et de fluorure de tétrabutylammonium. La conversion était moyenne et le brut réactionnel était complexe. Une tentative de purification a été effectuée mais une analyse du mélange obtenu par UPLC couplée à la spectroscopie de masse n'a montré aucune présence du produit attendu (**130**).

Un second essai (entrée 2) a été envisagé en utilisant le chlorure de cuivre(II) (CuCl<sub>2</sub>) qui avait donné précédemment des résultats moyens pour l'insertion de l'azoture (tableau 12). Une conversion moyenne a également été observée mais aucune dégradation n'a semblé se produire au cours de la réaction. Deux produits de polarité similaire ont été partiellement formés mais ont été dégradés par le traitement aqueux du mélange réactionnel.

Dans le but de limiter l'obtention d'un mélange complexe, un autre essai (entrée 3) a été effectué en utilisant à nouveau le fluorure de tétrabutylammonium, comme dans le premier essai (entrée 1), mais en soumettant le mélange à des conditions réactionnelles plus douces. La réaction, plus diluée, a été débutée à froid puis laissée à température ambiante. La conversion observée est faible après 2 jours et une analyse UPLC couplée à la spectroscopie de masse a montré un mélange très complexe ne contenant aucune trace de produit attendu (**130**).

Des travaux de la littérature ont déjà montré l'introduction d'un groupement cyano, sur la position anomère de différents dérivés saccharidiques, en utilisant notamment le complexe

\* Conversion de (**99**) détectée par CCM.

d'étherate de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) comme acide Lewis pour promouvoir la réaction.<sup>207</sup> Néanmoins, aucun de ces travaux n'a traité de substrats de type oxazoline. L'équipe de De Las Heras a utilisé, par exemple, des dérivés  $\beta$ -acétates, galactosyles ou ribosyles, pour introduire le groupement  $\beta$ -cyano (schéma 147).<sup>207a</sup>

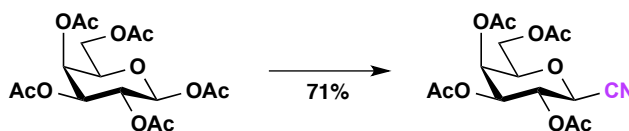


Schéma 147 : Réactifs et conditions : cyanure de triméthysilyle (3 éq.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (cat.),  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ , t.a., 1h

En revanche, l'équipe de Gervay-Hague a visiblement montré que ces conditions ne donnent aucun résultat en série glucose. Quel que soit l'acide de Lewis utilisé, le mélange obtenu à partir de glycosides  $\beta$ -acétate est complexe ou majoritairement  $\alpha$ -cyano (schéma 148).

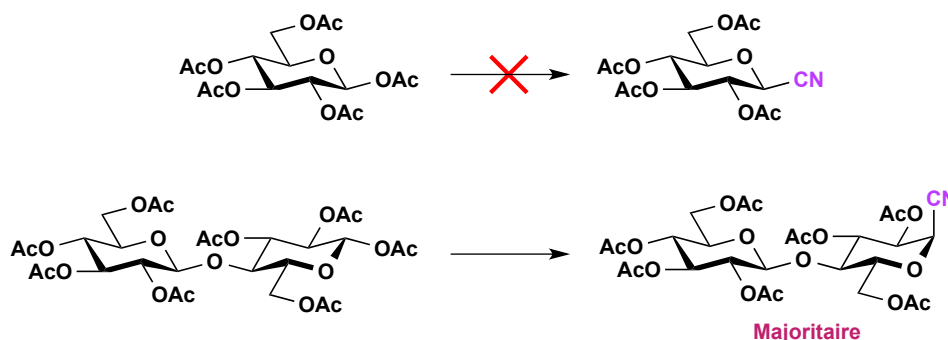


Schéma 148 : Réactifs et conditions : cyanure de triméthysilyle,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (cat.) et autres acide de Lewis

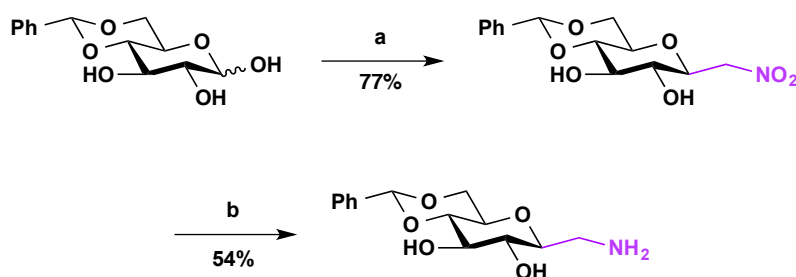
Un essai (entrée 4, tableau 18) a tout de même été réalisé en s'inspirant des conditions de de las Heras. La conversion du substrat (**99**) a été très rapide vers la formation d'un mélange très complexe. Ces conditions n'ont pas non plus permis d'obtenir le produit souhaité (**130**).

D'autres conditions pourront éventuellement être testées mais l'oxazoline semble poser des problèmes dans le cas de l'addition du cyanure. Une autre voie, excluant l'utilisation de cet intermédiaire (**99**), a donc été envisagée.

<sup>207</sup> (a) de las Heras, F. G. ; Fernández-Resa, P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1982**, 903-907. (b) Togo, H. ; Ishigami, S. ; Fujii, M. ; Ikuma, T. ; Yokoyama, M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 2931-2942. (c) Katajisto, J. ; Lönnberg, H., *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 3518-3525. (d) Abhijit, S. B. ; Gervay-Hague, *Org Lett.*, **2001**, 3, 2081-2084.

## C. Stratégie nitro

Afin de former des C-glycosides, l'introduction de nitrométhane, par addition de Henry<sup>208</sup> sur l'aldéhyde de dérivés hexoses, est également une stratégie envisageable (schéma 146). Les quelques travaux effectués dans ce domaine ont souvent montré des rendements faibles<sup>209</sup> ou impliqué des traitements longs et compliqués.<sup>210</sup> En 1991, le groupe de Gross a décrit la synthèse d'un dérivé saccharidique nitrométhylé par une condensation de Henry du nitrométhane, en conditions basiques (schéma 149).<sup>211</sup> Les auteurs ont ensuite réduit le groupement nitro afin d'obtenir l'amine libre.



**Schéma 149** : Réactifs et conditions : (a) nitrométhane (4,5 éq.), DBU (0,7 éq.), 2-hydroxypyridine (0,4 éq.), THF, tamis 3Å, t.a., 4 jours ; (b) Fe(0), THF, CO<sub>2</sub> atm, t.a., 4 jours

Cette stratégie est très intéressante puisque, à partir de cette amine, il est possible d'obtenir l'azoture par transfert de diazo. Dans le cadre du projet, l'inconvénient de cette stratégie est qu'elle nécessite quelques étapes de synthèse afin d'obtenir le disaccharide souhaité, déprotégé en position anomère. Pour cela, l' $\alpha$ -chitobiose per-acétylé (**53**), provenant de l'acétolyse de la chitine (schéma 75) a été utilisé comme substrat de départ.

Comme précédemment, la différenciation des deux amines présentes sur chacune des unités saccharidiques a été nécessaire afin de pouvoir introduire la chaîne carbonée propre aux LCOs. Dans le cas de la brique (**102**) précédente, cette différenciation avait été effectuée grâce à une transacylation sélective afin de remplacer l'acétamido de l'unité réductrice en trifluoroacétamido, dans le but de pouvoir obtenir une oxazoline anomère réactive (schéma 85). Dans cette nouvelle voie, une autre méthode de différenciation a été privilégiée puisque la nouvelle stratégie n'envisage pas la formation de cette oxazoline trifluorométhylée (schéma 150).

<sup>208</sup> Henry, L., *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, **1895**, 120, 1265-1268.

<sup>209</sup> Sowden, J. C. ; Fischer, H. O., *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 1511-1513.

<sup>210</sup> Petruš, L. ; Bystrický, S. ; Sticzay, T. ; Bílik, V., *Chem. Svesti*, **1982**, 36, 103-110.

<sup>211</sup> (a) Drew, K. N. ; Gross, P. H., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 6113-6126. (b) Wang, X. ; Gross, P. H., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 1201-1206.

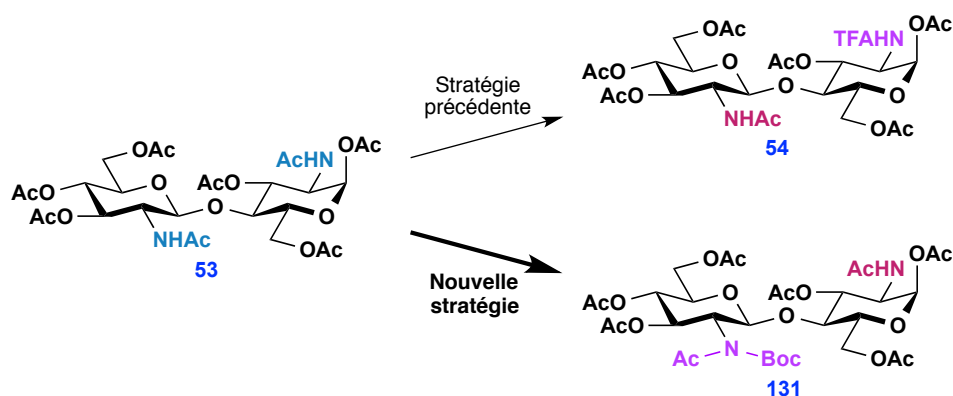


Schéma 150

Des travaux non publiés, effectués par l'équipe de Beau, ont mis en avant la formation préférentielle d'un seul imide mixte acétyle/*tert*-butoxycarboyle, sur l'unité non réductrice de ce substrat (**53**). En effet, Beau a démontré que l'amine acétylée sur l'unité  $\beta$ -glucosidique réagit plus rapidement que sur l'unité  $\alpha$ -glucosidique, dans le cadre de cette carbamoylation. Néanmoins, des conditions précises ont été nécessaires, notamment de solvant et de concentration, afin d'avoir une bonne conversion du substrat (**53**) tout en évitant la formation majoritaire du second imide. Ces conditions ont donc été suivies de manière précise.

Le disaccharide (**53**) a été mis à réagir dans un mélange dichlorométhane/tétrahydrofurane, à reflux, avec un excès de dicarbonate de di-*tert*-butyle ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) et une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP). La conversion totale du substrat (**53**) a été très rapide et un mélange de produit mono-imide (**131**)/bis-imide (**132**) a été observé. Afin d'éviter que la réaction évolue à nouveau lors de l'évaporation du solvant, le mélange a été laissé au reflux, sous atmosphère ambiante pendant une nuit, afin d'hydrolyser le  $\text{Boc}_2\text{O}$  n'ayant pas réagi. Les deux produits (**131**) et (**132**) ont été récupérés avec des rendements respectifs de 61% et 31%, après séparation par chromatographie.

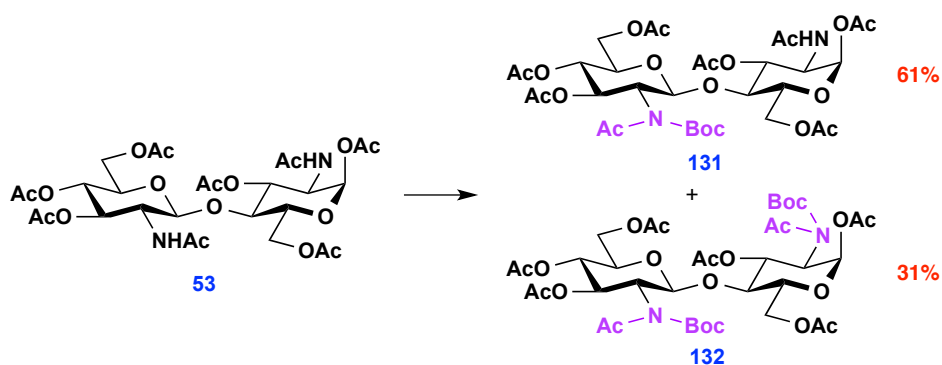
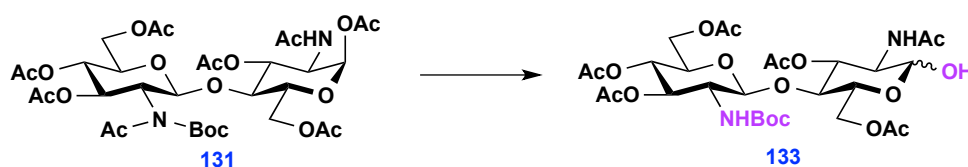


Schéma 151 : Réactifs et conditions : dicarbonate de di-*tert*-butyle (2,0 éq.), 4-diméthylaminopyridine (0,2 éq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$  (1:1, 33 mM), reflux, 22h.

Le rapport mono-imide (**131**)/bis-imide (**132**) ainsi que les rendements sont similaires à ceux obtenus par l'équipe de Beau.

Les deux amines étant différenciées, l'hydroxyle anomère a été déprotégé sélectivement avant de pouvoir réaliser l'addition du nitrométhane. Cette déprotection sélective avait déjà été mise au point précédemment, par une étape d'aminolyse douce, pour la synthèse de la brique disaccharidique (**102**) (schéma 87). Dans le cas du composé (**131**), l'acétyle présent sur l'imide précédemment formé est également très labile, l'aminolyse de ces deux acétyles a donc été envisagée en une seule étape. Différents réactifs ont été testés afin d'obtenir la meilleure efficacité d'aminolyse (tableau 19).



Entrée	Réactif d'aminolyse	Conditions	Rdt ( <b>133</b> )
1	Acétate d'éthylène diaminium (3 éq.)	THF, t.a., 22h	33%
2	Acétate d'hydrazinium (3 éq.)	DMF, t.a., 1h30	76%

Tableau 19

Le premier essai (entrée 1) a été effectué en présence du sel d'acétate d'éthylène diaminium, déjà mis en avant précédemment pour effectuer cette aminolyse (schéma 87). La conversion observée a été relativement lente et le produit (**133**) n'a pu être obtenu qu'avec un rendement de 33% après purification.

Le sel d'acétate d'hydrazinium est également couramment utilisé comme réactif d'aminolyse de dérivés saccharidiques,<sup>164</sup> malgré sa forte toxicité. Dans leurs travaux non publiés, à la suite de l'étape précédente, l'équipe de Beau a également effectué cette aminolyse en utilisant ce sel d'acétate d'hydrazinium. Ces conditions ont donc été suivies dans un second essai (entrée 2). Une conversion rapide a alors été observée et le produit (**133**) a pu être isolé avec un rendement de 76% après purification, en mélange d'anomère  $\alpha/\beta$  (4:1).

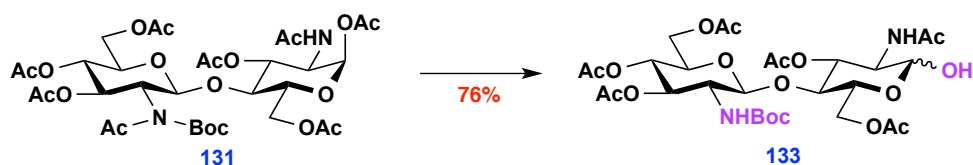


Schéma 152 : Réactifs et conditions :  $N_2H_4 \cdot AcOH$  (3,5 éq), DMF, t.a., 1h30

L'addition du nitrométhane a finalement pu être envisagée sur le composé (**133**). L'équipe de Gross a effectué cette condensation de Henry sur le 4,6-*O*-benzylidène- $\beta$ -D-glucose (schéma 149) et a décrit un mécanisme qui fait intervenir 3 étapes successives.<sup>211</sup> Dans un premier temps, le nitronate est additionné sur l'aldéhyde (addition de Henry) ; l'hydroxyle en  $\beta$  ainsi formé est ensuite éliminé pour donner un nitroalcène ; et pour terminer, le dérivé reprend sa forme pyranose par addition de Michael de l'hydroxyle en position 6 sur l'alcène (schéma 153).

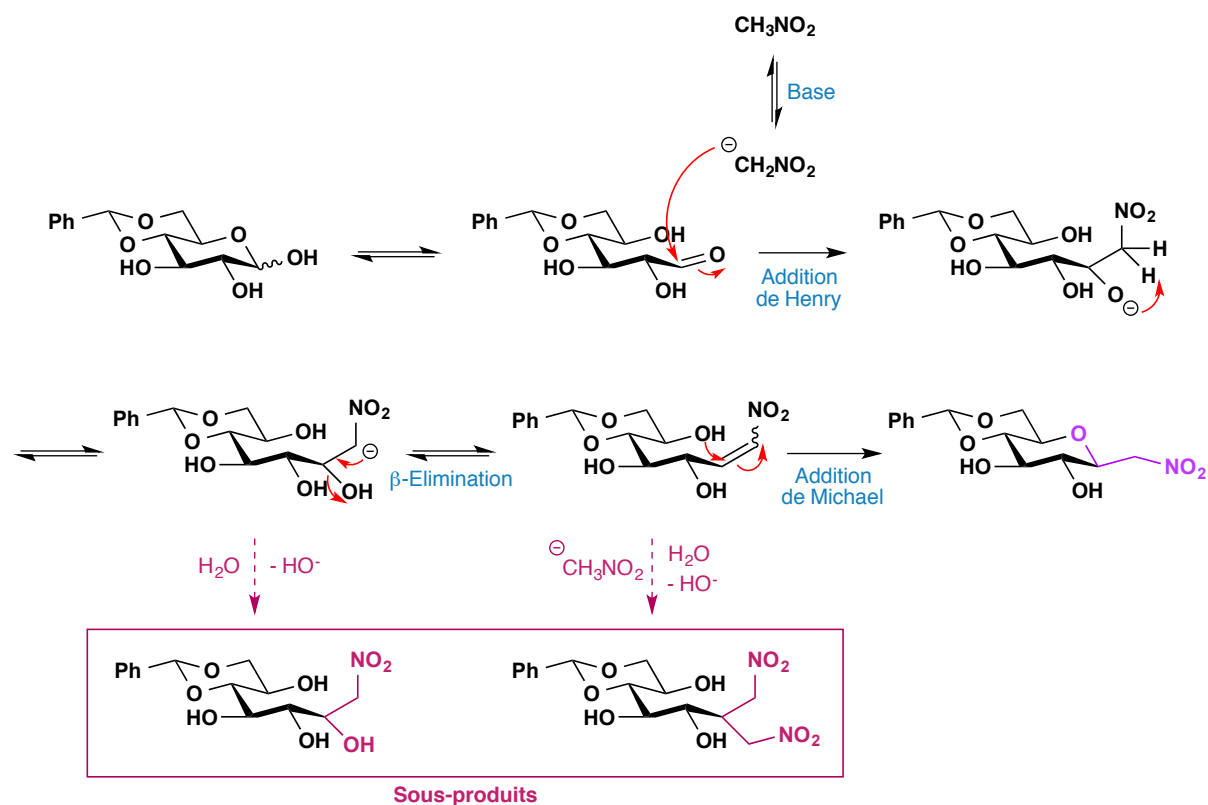


Schéma 153

L'équipe de Gross explique également que différents sous-produits peuvent se former lors de la réaction si les conditions ne sont pas parfaitement contrôlées. En effet, la présence d'eau peut limiter la formation du nitroalcène et une concentration trop importante en nitronate empêche la cyclisation finale. Ils ont donc effectué la réaction en présence de tamis moléculaire afin de piéger



l'eau et ont tamponné le milieu pour éviter l'accumulation du nitronate. Différentes conditions ont été envisagées pour la condensation du nitrométhane sur le substrat (**133**) (tableau 20).



Entrée	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	Réactifs	Conditions	Durée, conversion*	Produit, rdt
1	21 éq.	DBU (0,7 éq.) 2-HP (0,5 éq.)	THF, t.a.	(4 jour)**, totale	( <b>129</b> ) dégradation ( <b>134</b> )
2	12 éq.	CH <sub>3</sub> ONa (2 éq.)	DMSO/CH <sub>3</sub> OH, t.a.	1 jour, totale	/

Tableau 20

Le premier essai (entrée 1) s'est inspiré des conditions de Gross. Afin de tamponner la réaction, un mélange de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) et de 2-hydroxypyridine (2-HP) est nécessaire. La quantité de DBU doit être légèrement supérieure ou égale à la quantité de 2-HP.<sup>211</sup> Dans le cas du substrat (**133**), aucune conversion en produit (**129**) n'a été observée pour un mélange DBU/2-HP équimolaire, malgré l'ajout régulier de nitrométhane. Une légère variation du pH après trois jours, par ajout d'une petite quantité de DBU, a fini par former un mélange complexe au bout d'une semaine de réaction (schéma 154). Il est à noter que l'ajout de tamis déséchant avait été volontairement omis car ce premier essai avait pour but de voir si le produit (**129**) pouvait se former dans ces conditions. Aucun des sous-produits décrits par l'équipe de Gross n'a été observé.

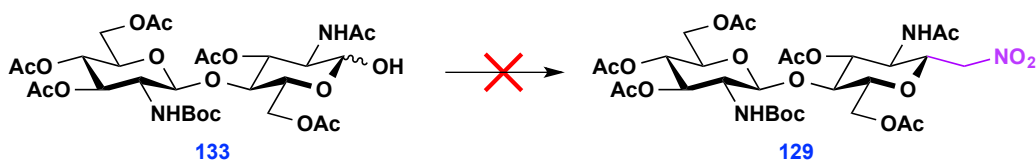


Schéma 154 : Réactifs et conditions : nitrométhane (21 éq.), DBU (0,7 éq.), 2-hydroxypyridine (0,5 éq.), THF, t.a., 1 semaine

L'équipe de Petruš a décrit des conditions d'insertion du nitrométhane, en utilisant le méthanolate de sodium comme base, sur différents dissaccharides déprotégés, comme le cellobiose (schéma 155).<sup>210</sup>

\* Conversion de (**133**) détectée par CCM et suivi HPLC.

\*\* Conversion observée à partir du rajout de DBU (0,2 éq. après 3 jours), pas de suivi entre 3 et 7 jours.

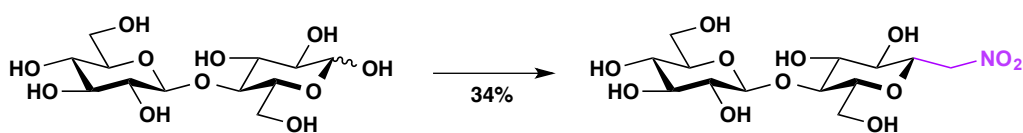


Schéma 155 : Réactifs et conditions : nitrométhane (12 éq.),  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (2 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{DMSO}$ , t.a., 24h

La réaction implique des traitements longs et les rendements obtenus sont moyens. Néanmoins, afin de vérifier s'il est possible d'obtenir un produit nitrométhylé, ces conditions ont été reproduites dans un second essai (entrée 2). La conversion du substrat (**133**) a évolué rapidement vers la déprotection des hydroxyles acétylés en présence de méthanolate. Après une journée, une analyse UPLC couplée à la spectroscopie de masse a permis de mettre en évidence un mélange réactionnel complexe mais également la formation de plusieurs produits dont la masse correspondait à celle du composé attendu (**134**). L'ajout supplémentaire de nitrométhane et de méthanolate n'a pas permis d'obtenir une meilleure conversion après une semaine. Le produit attendu (**134**) n'a finalement pas pu être isolé (schéma 156).

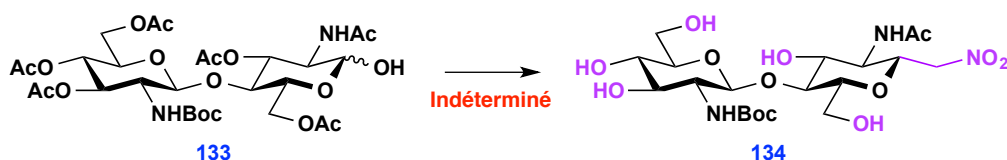


Schéma 156 : Réactifs et conditions : nitrométhane (12 éq.),  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (2 éq.),  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{DMSO}$ , t.a., 24h

N'ayant pas donné de résultats très concluants, ces différentes conditions pourront être retravaillées afin d'obtenir une meilleure conversion en produit nitrométhylé (**129**) ou (**134**). Dans des travaux plus récents, l'équipe de Gross a par exemple réussi à effectuer cette condensation avec le DBU sans la présence de 2-hydroxypyridine.<sup>212</sup> La reproduction de ces conditions pourrait être intéressante.

<sup>212</sup> Phiasivongsa, P. ; Samoshin, V. V. ; Gross, P. H., *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 5495-5498.

## II. CONCLUSION

Finalement, les premiers essais sur différentes stratégies n'ont pas permis d'introduire le groupement azidométhyle souhaité en position anomère. Néanmoins, d'autres voies pourront être envisagées, en passant par exemple par des dérivés formyl glycosides.<sup>213</sup> Ces composés ont notamment été décrits par l'équipe de Lubineau en commençant par la formation d'un intermédiaire 2-oxopropyl glycoside (schéma 157).<sup>214</sup>

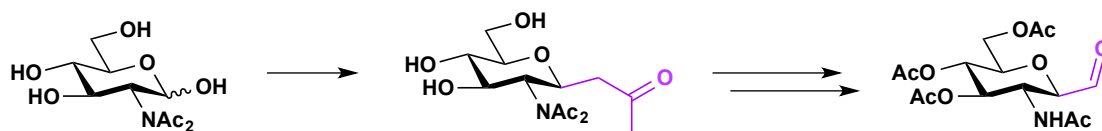


Schéma 157

<sup>213</sup> (a) Zeitouni, J. ; Norsikian, S. ; Lubineau, A., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 7761-7763. (b) Norsikian, S. ; Zeitouni, J. ; Rat, S. ; Gérard, S., Lubineau, A., *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 2716-2728.

<sup>214</sup> (a) Rodrigues, F. ; Canac, Y. ; Lubineau, A., *Chem. Commun.*, **2000**, 2049-2050. (b) Johnson, S. ; Tanaka, F., *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14, 259-264.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



En conclusion, quatre analogues de lipo-chitooligosaccharide ont pu être synthétisés et testés (schéma 158).

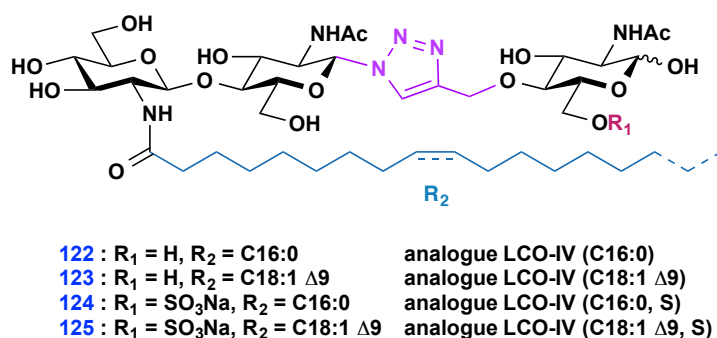


Schéma 158

Le but était de voir si le remplacement d'une unité saccharidique par un lien triazole pouvait permettre des synthèses plus efficaces que celles des LCOs "classiques", en évitant notamment des étapes de glycosylation au rendement parfois faible et en conservant une bonne activité biologique en tant que facteur de nodulation ou de mycorhization.

Le lien triazole a été choisi car il peut être obtenu de manière efficace par cycloaddition [3+2] entre un azoture et un alcyne. De plus, des travaux ont déjà prouvé que les triazoles pouvaient être de bons mimés biologiques d'unités saccharidiques.

Dans un premier temps, la synthèse de deux briques saccharidiques, l'une propargylée et l'autre comportant un azoture, a été étudiée (schéma 159).

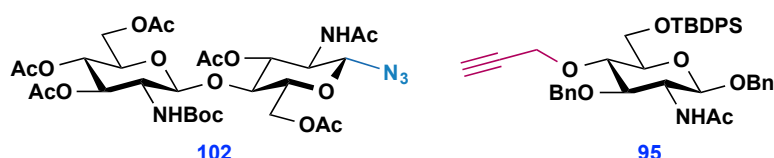


Schéma 159

Les enjeux de la synthèse de ces deux briques étaient de pouvoir introduire l'azoture et le propargyle sur les positions souhaitées, en jouant sur la réactivité des différents hydroxyles et en utilisant des protections appropriées.

La synthèse du monosaccharide (**95**) a nécessité un contrôle des différentes fonctions réactives de la *N*-acétylglucosamine (schéma 73). Une étape de glycosylation, catalysée par du triflate de Fer(III), a fourni dans un premier temps le β-glucoside de benzyle. Différentes protections des hydroxyles en position 3, 4 et 6 ont ensuite permis de libérer la position 4 afin d'introduire le propargyle. Un acétal, sélectif des hydroxyles 4 et 6, et une protection silylée encombrée, afin de

pouvoir apporter la diversité moléculaire des analogues finaux, ont notamment été utilisés (schéma 160). Ce monosaccharide (**95**) a pu être obtenu avec un rendement global de 28% en onze étapes, à l'échelle du gramme.

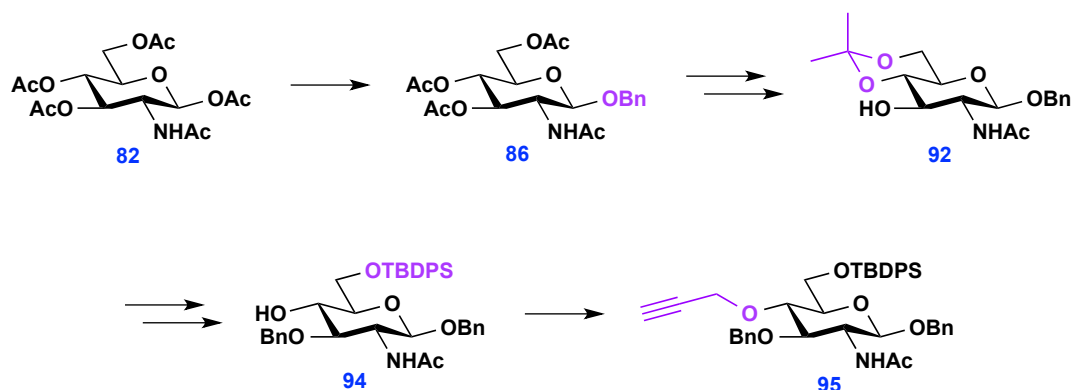


Schéma 160

La synthèse du disaccharide (**102**) (schéma 98), réalisée en collaboration avec l'équipe de Beau à l'institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, a commencé par l'obtention d' $\alpha$ -chitobiose per-acétylé, par acétolyse de la chitine. Les deux amines de ce disaccharide ont ensuite pu être différenciées par une étape de transacylation sélective, jouant sur la différence de réactivité entre les deux unités  $\alpha$  et  $\beta$ , et une étape de formation d'un imide mixte. Le  $\beta$ -azoture a finalement pu être introduit grâce à la formation préalable d'une oxazoline trifluorométhylée, donneur de glycosyle (schéma 161). Ce disaccharide (**102**) a pu être obtenu avec un rendement de 29% sur 7 étapes à partir de l'octaacétate d' $\alpha$ -chitobiose (**53**) (1,6% en incluant la première étape d'acétolyse de la chitine).

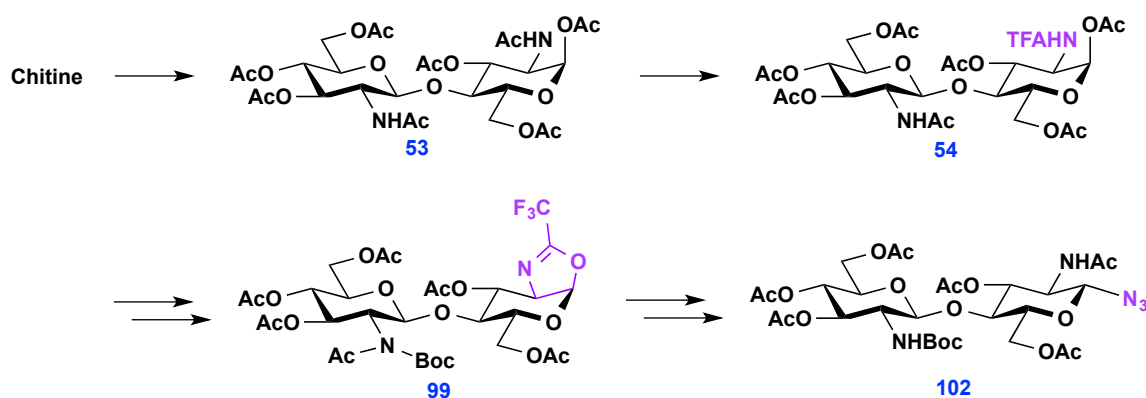


Schéma 161

La cycloaddition des deux briques a ainsi permis d'obtenir efficacement les premiers analogues de tétrasaccharides. Les différents groupements protecteurs, précédemment choisis de

manière judicieuse, ont permis d'introduire la diversité moléculaire souhaitée, le sulfate sur l'unité réductrice et la chaîne carbonée du côté non réducteur. Les quatre analogues de LCO-IV ont été obtenus avec des rendements allant de 55% à 83%, à partir de l'étape de cycloaddition.

La reconnaissance de ces analogues dans le cadre de processus symbiotiques a pu être évaluée grâce à des tests de compétition, effectués par l'équipe de Cullimore et Bono au laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes de l'INRA de Toulouse. Le test a permis de montrer que ces analogues n'avaient aucune affinité pour le site de liaison de la protéine de liaison des LCOs. L'unité II remplacée semble donc avoir une grande importance pour la reconnaissance des LCOs.

Les travaux très récents de l'équipe de Bono et Cullimore, évoqués dans la partie bibliographie, montrent que le site de liaison des LCOs est plus probablement situé sur un autre domaine du récepteur.<sup>111</sup> La modélisation des interactions protéine-LCO, effectuée en 2013, sur laquelle s'est appuyé en partie ce projet serait donc fautive. Cela pourrait être une explication au fait qu'il n'y a pas eu de reconnaissance des analogues synthétisés.

De nouveaux analogues ont donc été envisagés pour la suite du projet en modifiant la structure du lien triazole. L'ajout d'un carbone supplémentaire pourrait permettre de mieux respecter la distance entre les unités saccharidiques et donc favoriser la liaison de ces nouveaux analogues dans le site actif de la protéine (schéma 162).

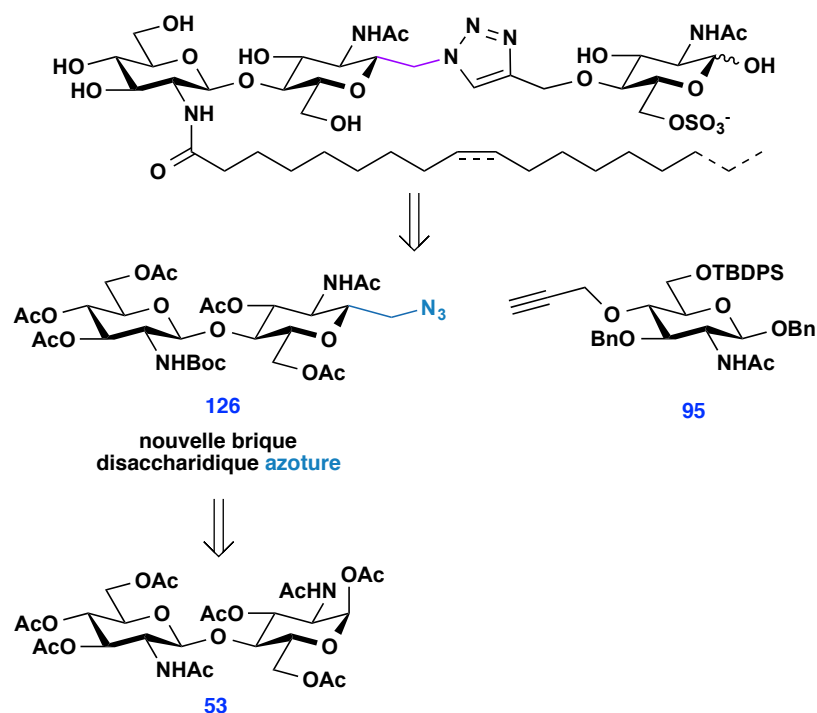


Schéma 162



La modification de la brique disaccharidique, du côté non réducteur, est donc nécessaire et passe par la formation d'un C-glycoside azidométhyle. Différentes stratégies ont été envisagées mais aucune tentative n'a permis d'isoler un C-glycoside.

D'autres analogues ont été envisagés pour l'avenir du projet. Les facteurs de nodulation et mycorhization peuvent comporter un plus grand nombre d'unités saccharidiques. Il pourrait donc être intéressant de travailler sur la synthèse d'analogues de LCO-V dont l'une des unités aurait été remplacée par le lien triazole (schéma 163). Il serait nécessaire d'obtenir une nouvelle brique disaccharidique qui comporterait un propargyle sur l'hydroxyle en position 4 (de l'unité non réductrice). L' $\alpha$ -chitobiose per-acétylé (**53**) pourrait être un bon substrat de départ.

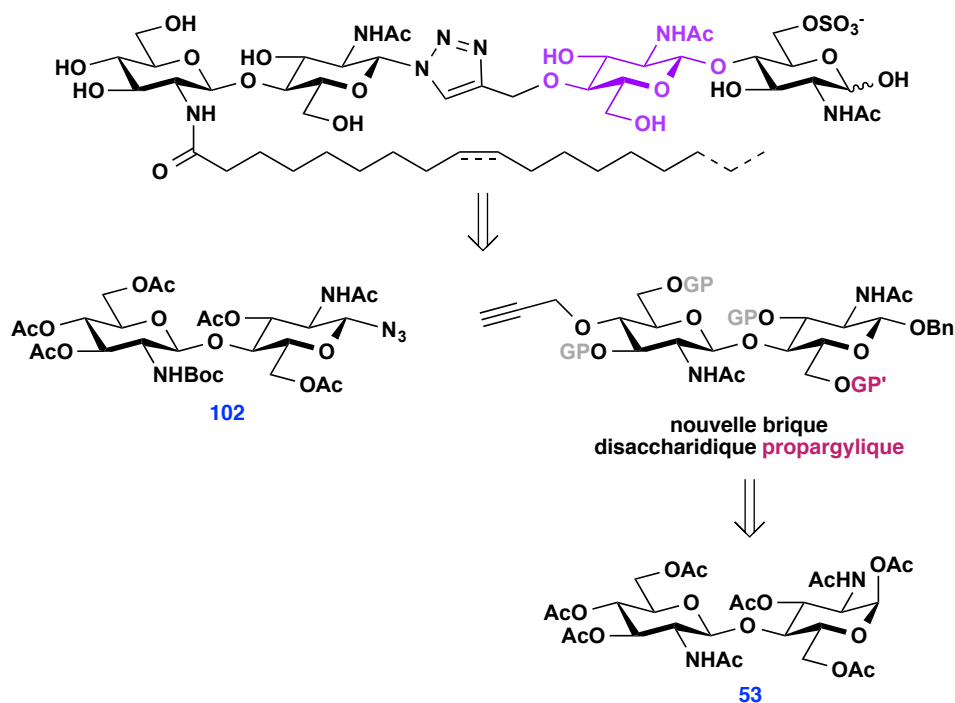


Schéma 163

Des analogues de LCO-IV dont le lien triazole aurait été déplacé pour remplacer l'unité III pourraient également être envisagés (schéma 164). Une stratégie qui demanderait peut-être plus de travail car les deux briques azoture et propargyle devraient être repensées.

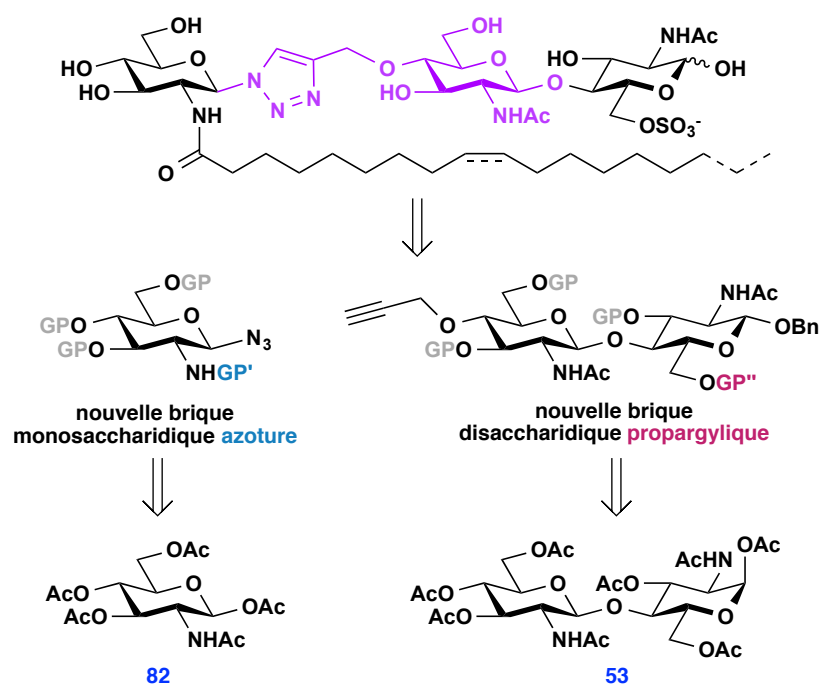


Schéma 164

A défaut d'avoir une activité biologique dans le cadre de processus symbiotiques plantes-microorganismes, les analogues de LCO-IV synthétisés pourraient avoir une activité pour d'autres processus biologiques. En 2014, Le groupe de Djordjevic, en collaboration avec d'autres laboratoires, a démontré l'activité de différents oligomères de glucosamine pour l'angiogenèse, notamment des LCOs.<sup>215</sup> C'est un domaine de recherche très différent des symbioses plantes-microorganismes mais il pourrait être intéressant de valoriser les analogues synthétisés et voir s'ils peuvent avoir une activité pro ou anti-angiogénique.

<sup>215</sup> Djordjevic, M. A. ; Bezos, A. ; Susanti ; Marmuse, L. ; Driguez, H. ; Samain, E. ; Vauzeilles, B. ; Beau, J.-M. ; Kordbacheh, F. ; Rolfe, B. G. ; Schwörer, R. ; Daines, A. M. ; Gresshoff, P. M ; Parish, C. R., *PLoS One*, **2014**, 9, e112635.



# EXPERIMENTAL SECTION



## **GENERAL CONSIDERATIONS**

All air and water sensitive reactions were carried out under argon atmosphere, or hydrogen atmosphere when needed.

Microwave irradiation experiments were carried out in an Anton Paar Monowave 300 instrument with internal fiber-optic or IR temperature control. The vials used were in Pyrex and sealed with teflon-coated septums.

Flow reactions were performed with a Vapourtec R-series system, a high-temperature (up to 250°C), high-pressure (up to 42 bar) instrument for performing homogeneous reactions.

### **Solvent and chemicals:**

In general, reagents and dry solvents were commercially available and no further purification was needed. Sodium methanolate solutions were freshly prepared by addition of suitable sodium quantity in methanol to obtain the desired concentration. Hydrazine acetate salt were obtained by mixing up equimolar quantities of hydrazine and acetic acid, followed by precipitation in diethylether and filtration. Triethylamine was dried over KOH. Acidic Ion-exchange resin was Dowex® 50WX8, 50-100 mesh or 200-400 mesh.

### **Analyses:**

Thin-layer chromatography analyses were performed on glassware plates, precoated with silica gel layers. Revelation was made by UV absorbance, followed by charring with orcinol solution (orcinol 4.0 g, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.4 mL, EtOH 200 mL). Front report are reported with elutant, except for product unrevealed by previous technics. Flash column chromatography was performed using packed cartridge or 40-63 µm silica.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, were recorded with Brüker 300, 500 and 600 MHz spectrometers. Chemical shifts (in ppm) were determined in comparison to residual undeuterated solvent as internal reference. Deuterated solvents used are specified for each product : CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O, DMSO-d<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>CN. In case of deuterated solvent mixture, internal reference is the major solvent. Temperature is specified when experiment was not performed at room temperature. Spin multiplicities are given with the following abbreviations : s = singlet, brs = broad singlet, d = doublet, brd = broad doublet, dd = doublet of doublet, brdd = broad doublet of doublet, ddd = doublet of doublet of doublet, t = triplet, tt = triplet of triplet, brtt = broad triplet of triplet, q = quadruplet, m = multiplet. Coupling constants are given in Hertz. <sup>1</sup>H-NMR spectra were assigned by standard methods using a combinaison of single frequency decoupling and COSY experiments. <sup>13</sup>C-NMR spectra were assigned by standard methods using a combinaison of single frequency decoupling, HSQC and HMBC experiments.

High-resolution mass spectra (HRMS) were determined on Waters LCT Premier XE, by electrospray ionization (ESI), in positive and negative mode of detection, coupled to a time-of-flight (ToF) analyser.

IR-FT spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum 100 spectrometer. Characteristic absorptions are reported in  $\text{cm}^{-1}$ .

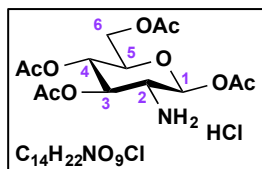
Specific optical rotations ( $[\alpha]_D^{\text{temp}}$ ) were measured at 20°C with an Anton Paar MCP 300 polarimeter in a 1 dm-length cell and at 589 nm. Data are reported with solvent and solution concentration (in g/100 mL).

Melting points of recrystallized products were measured with a Büchi Melting Point B-540 instrument.

## I. CHEMICAL SECTION

### A. Propargyl monosaccharide building block

#### 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose hydrochloride<sup>216</sup> (**85**)



To a mixture of D-glucosamine hydrochloride (25.0 g, 116.0 mmol, 1.0 eq.) in NaOH 1N (117 mL, 1.0 eq.) was added *p*-anisaldehyde (16.9 mL, 139.2 mmol, 1.2 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. A white precipitate was rapidly formed. The mixture was then

cooled at 4°C for 2 h. The precipitate (**83**) was filtered, washed with water, then EtOH/Et<sub>2</sub>O (1:1) and dried under vacuum (28.5 g, 83%) as a white amorphous solid. This compound (10.0 g, 33.7 mmol, 1.0 eq.) was added to a solution of acetic anhydride (28.5 mL, 301.0 mmol, 9.0 eq.) in pyridine (52 mL) at 0°C, under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 1 h at 0°C and then overnight at room temperature. The mixture was then poured into ice. A white precipitate (**84**) appeared rapidly, it was then filtered, washed with cold water and dried under vacuum (12.9 g, 82%) as a white amorphous solid. A solution of this white compound (16.1 g, 34.6 mmol, 1.0 eq.) in acetone (140 mL), was treated with HCl 6N (5.8 mL, 34.8 mmol, 1.0 eq.) under high stirring. A precipitate was formed and Et<sub>2</sub>O was then rapidly added to the mixture before it solidified. The reaction mixture was then stirred for 2 h at room temperature, then cooled at 4°C overnight without stirring. The white precipitate was filtered, washed with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum to give the compound (**85**) (13.0 g, 98% and 67% overall from D-glucosamine hydrochloride) as a white amorphous solid.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.74 (s, 3H, NH<sub>3</sub>); 5.90 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.7 Hz, **H-1**); 5.35 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 10.2, *J*<sub>3,4</sub> 9.3 Hz, **H-3**); 4.93 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.9, *J*<sub>3,4</sub> 9.3 Hz, **H-4**); 4.19 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 12.3, *J*<sub>5,6a</sub> 4.2 Hz, **H-6a**); 4.05 (ddd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.9, *J*<sub>5,6a</sub> 4.2, *J*<sub>5,6b</sub> 1.9 Hz, **H-5**); 3.99 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 12.3, *J*<sub>5,6b</sub> 1.9 Hz, **H-6b**); 3.57 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 10.2, *J*<sub>1,2</sub> 8.7 Hz, **H-2**); 2.17, 2.03, 2.00, 1.98 (4 s, 12H, 4 Ac).

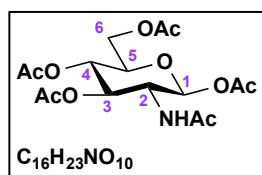
Rf: 0.12 (EtOAc).

(Analysis in accordance with litt.<sup>217</sup>)

<sup>216</sup> Inoue, Y. ; Onodera, K. ; Kitaoka, S. ; Ochiai, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 4218-4222.

<sup>217</sup> Frontana-Uribe, B. A. ; Escárcega-Bobadilla, M. V. ; Juárez-Lagunas, J. ; Toscano, R. A. ; García de la Mora, G. A. ; Salmón, M., *Synthesis*, **2009**, 6, 980-984.



**2-acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose<sup>218</sup> (**82**)**

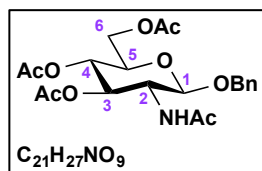
To a mixture of (**85**) (9.7 g, 25.4 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (102 mL) was slowly added acetic anhydride (14.5 mL, 153.4 mmol, 6.0 eq.) at 0°C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min and then concentrated. The residue was dissolved in toluene and concentrated three times to remove pyridine traces. The residue was dissolved in  $CH_2Cl_2$ , washed with HCl 1N, brine, dried over  $Na_2SO_4$ , filtered and concentrated to give peracetylated glucosamine (**82**) (9.5 g, 96%) without purification as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 5.67 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.8 Hz, **H-1**); 5.58 (d, 1H,  $J_{NH,2}$  9.5 Hz, **NH**); 5.15-5.07 (m, 2H, **H-3**, **H-4**); 4.32-4.21 (m, 1H, **H-2**); 4.24 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  12.5,  $J_{5,6a}$  4.7 Hz, **H-6a**); 4.11 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  12.5,  $J_{5,6b}$  2.0 Hz, **H-6b**); 3.78 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  8.2,  $J_{5,6a}$  4.7,  $J_{5,6b}$  2.0 Hz, **H-5**); 2.09, 2.06, 2.02, 2.01 (4 s, 12H, 4 OAc); 1.91 (s, 3H, NHAc).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 171.4, 170.9, 170.3, 169.8, 169.4 (5  $COCH_3$ ); 92.9 (**C-1**); 73.2 (**C-5**); 72.8, 68.0 (**C-3**, **C-4**); 67.9 (**C-6**); 53.3 (**C-2**); 23.4 ( $NCOCH_3$ ); 21.1, 20.9, 20.8, 20.7 ( $OCOCH_3$ ).

Rf: 0.33 (EtOAc).

(Analyses in accordance with litt.<sup>219</sup>)

**Benzyl 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside<sup>220</sup> (**86 $\beta$** )**

To a mixture of (**82**) (1.00 g, 2.57 mmol, 1.00 eq.) and benzyl alcohol (347  $\mu$ L, 3.35 mmol, 1.30 eq.) in anhydrous  $CH_2Cl_2$  (19 mL) was added  $Fe(OTf)_3$  (194 mg, 0.39 mmol, 0.15 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was diluted in  $CH_2Cl_2$  (30 mL), washed with saturated  $NaHCO_3$  solution (100 mL). The aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (5 x 30 mL). The organic layers were washed with  $H_2O$  (200 mL), dried over  $Na_2SO_4$ , filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (Cyclohexane/EtOAc 25:75) to give product (**86 $\beta$** ) (1.01 g, 93%) as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.83-7.69 (m, 5H, **CH arom.**); 7.60 (d, 1H,  $J_{NH,2}$  9.1 Hz, **NH**); 5.72 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  10.5,  $J_{3,4}$  9.4 Hz, **H-3**); 5.44 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  10.0,  $J_{3,4}$  9.4 Hz, **H-4**); 5.33 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.5 Hz, **H-1**); 5.31 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, **CHHPH**); 5.08 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, **CHHPH**); 4.73 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  12.2,  $J_{5,6a}$  5.0 Hz, **H-**

<sup>218</sup> Kiso, M.; Anderson, L., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 309-323.

<sup>219</sup> Knapp, S.; Huhn, R. A.; Amorelli, B., *Org. Synth.*, **2007**, 84, 68-76.

<sup>220</sup> Cutler, W. O.; Peat, S., *J. Chem. Soc.*, **1939**, 274-279.

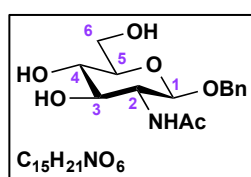
**6a**); 4.57 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  12.2,  $J_{5,6b}$  2.5 Hz, **H-6b**); 4.42 (ddd, 1H,  $J_{2,3}$  10.5,  $J_{2,NH}$  9.1,  $J_{2,1}$  8.5 Hz, **H-2**); 4.27 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  10.0,  $J_{5,6a}$  5.0,  $J_{5,6b}$  2.5 Hz, **H-5**); 2.48, 2.43, 2.38, 2.28 (4 s, 12H, 4 **Ac**).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171.2, 171.0, 170.3, 169.6 (4  $\text{COCH}_3$ ); 137.1, 128.7, 128.3 (**C arom.**); 99.6 (**C-1**); 72.6 (**C-3**); 72.1 (**C-5**); 70.9 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ); 68.8 (**C-4**); 62.3 (**C-6**); 54.8 (**C-2**); 23.5 ( $\text{NCOCH}_3$ ); 21.0, 20.9, 20.8 ( $\text{OCOCH}_3$ ).

Rf: 0.53 (EtOAc).

(Analyses in accordance with litt.<sup>135</sup>)

### Benzyl 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside<sup>221</sup> (**87**)



To a mixture of (**86 $\beta$** ) (500 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq.) in dry  $\text{CH}_3\text{OH}$  (7.3 mL) was added  $\text{NaOCH}_3$  (590  $\mu\text{L}$ , 0.2 mol/L in  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 0.12 mmol, 0.1 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. A white precipitate was rapidly formed in 10 min. The mixture was diluted in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  until the precipitate was dissolved, neutralized with Dowex<sup>®</sup>  $\text{H}^+$  resin, filtrated and concentrated to give product (**87**) (339 mg, 92%) as a white amorphous solid.

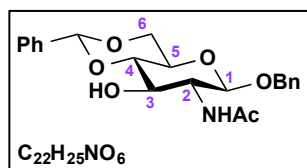
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.36-7.23 (m, 5H, **CH arom.**); 4.88 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.3 Hz, **CHHPh**); 4.61 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.3 Hz, **CHHPh**); 5.33 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.4 Hz, **H-1**); 3.91 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  12.0,  $J_{5,6a}$  1.9 Hz, **H-6a**); 3.72 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  10.0,  $J_{2,1}$  8.4 Hz, **H-2**); 3.71 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  12.0,  $J_{5,6b}$  5.7 Hz, **H-6b**); 3.45 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  10.0,  $J_{3,4}$  8.9 Hz, **H-3**); 3.34 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  9.7,  $J_{3,4}$  8.9 Hz, **H-4**); 3.27 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  9.7,  $J_{5,6b}$  5.7,  $J_{5,6a}$  1.9 Hz, **H-5**); 1.95 (s, 3H, **Ac**).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 173.9 ( $\text{COCH}_3$ ); 139.4, 129.5, 129.0, 128.8 (**C arom.**); 102.0 (**C-1**); 78.2 (**C-5**); 76.1 (**C-3**); 72.4 (**C-4**); 71.7 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ); 63.0 (**C-6**); 57.5 (**C-2**); 23.1 ( $\text{COCH}_3$ ).

Rf: 0.08 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1).

(Analyses in accordance with litt.<sup>222</sup>)

### Benzyl 2-acetamido-4,6-O-benzylidene-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside<sup>140</sup> (**88**)



To a suspension of (**87**) (1.2 g, 3.9 mmol, 1.0 eq.) and benzaldehyde dimethylacetal (1.8 mL, 12.0 mmol, 3.0 eq.) in dry  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMF}$  (30 mL, 2:1) was added *para*-toluenesulfonic acid (379 mg, 2.0 mmol, 0.5 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room

<sup>221</sup> Kuhn, R.; Kirschenlorh, W., *Chem. Ber.*, **1953**, 86, 1331-1333.

<sup>222</sup> Gudmundsdottir, A. V.; Nitz, M., *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3461-3463.

temperature for 16 h. The reaction mixture was quenched with triethylamine (285  $\mu$ L, 2.0 mmol) and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  98:2 then 96:4 and to finish 9:1) to give benzylidene product (**88**) (1.1 g, 73%) as a white amorphous solid.

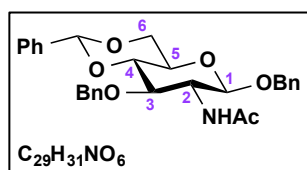
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 7.84 (d, 1H,  $J_{\text{NH},2}$  8.3 Hz, NH); 7.50-7.24 (m, 10H, CH arom.); 5.61 (s, 1H, CHPh); 5.28 (d, 1H,  $J_{\text{OH},3}$  5.1 Hz, OH); 4.77 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.5 Hz, CHHPh); 4.59 (d, 1H,  $J_{1,2}$  7.8 Hz, H-1); 4.54 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.5 Hz, CHHPh); 4.24 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  10.2,  $J_{5,6a}$  5.0 Hz, H-6a); 3.77 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  10.2,  $J_{5,6b}$  10.1 Hz, H-6b); 3.68-3.57 (m, 2H, H-2, H-3); 3.47 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  9.4,  $J_{3,4}$  8.4 Hz, H-4); 3.36 (ddd, 1H,  $J_{5,6b}$  10.1,  $J_{4,5}$  9.4,  $J_{5,6a}$  5.0 Hz, H-5); 1.83 (s, 3H, Ac).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 169.1 (COCH<sub>3</sub>); 137.9, 137.7, 128.8, 128.1, 128.0, 127.3, 127.1, 126.3 (C arom.); 101.4 (C-1); 100.6 (CHPh); 81.2 (C-4); 70.3 (C-3); 70.0 (CH<sub>2</sub>Ph); 67.8 (C-6); 66.0 (C-5); 56.2 (C-2); 23.0 (COCH<sub>3</sub>).

Rf: 0.34 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  18:1).

(Analyses in accordance with litt.<sup>141</sup>)

#### Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside<sup>140</sup> (**89**)

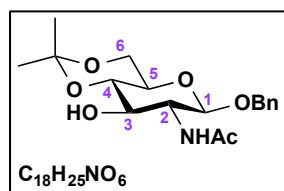


To a suspension of (**88**) (1.02 g, 2.56 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (27 mL) was added BaO (1.18 g, 7.67 mmol, 3.0 eq.) and Ba(OH)<sub>2</sub> (404 mg, 1.28 mmol, 0.5 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Benzyl bromide (489  $\mu$ L, 4.09 mmol, 1.6 eq.) was then added at 0°C under argon atmosphere and the mixture was stirred at room temperature for 21 h. Sulfuric acid (2 mL, 1 mol/L) was added and the mixture was diluted in H<sub>2</sub>O and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 50 mL) and the organic layer was filtered over Celite® plug. The filtrate was then concentrated to give product (**89**) (1.26 g, quantitative yield) as a white insoluble solid.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 8.02 (d, 1H,  $J_{\text{NH},2}$  8.0 Hz, NH); 7.47-7.23 (m, 15H, CH arom.); 5.72 (s, 1H, CHPh); 4.78 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.6 Hz, CHHPh<sub>1</sub>); 4.72 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  11.9 Hz, CHHPh<sub>3</sub>); 4.64 (d, 1H,  $J_{1,2}$  7.4 Hz, H-1); 4.59 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  11.9 Hz, CHHPh<sub>3</sub>); 4.55 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.6 Hz, CHHPh<sub>1</sub>); 4.28 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  10.1,  $J_{5,6a}$  4.9 Hz, H-6a); 3.82 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  10.1,  $J_{5,6b}$  10.2 Hz, H-6b); 3.78-3.72 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 3.44 (m, 1H, H-5); 1.82 (s, 3H, Ac).

Rf: 0.54 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  18:1).

(Analyses in accordance with litt.<sup>141</sup>)

**Benzyl 2-acetamido-2-deoxy-4,6-O-isopropylidene- $\beta$ -D-glucopyranoside<sup>223</sup> (92)**


To a solution of **(87)** (250 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq.) and 2,2-dimethoxypropane (2.5 mL, 20.2 mmol, 25.0 eq.) in dry DMF (3.2 mL) was added *para*-toluenesulfonic acid (15 mg, 0.08 mmol, 0.1 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 40°C and 250 mbar for 1 h.

The reaction mixture was quenched with triethylamine (12  $\mu$ L, 0.1 mmol) and concentrated to give isopropylidene product **(92)** without purification (318 mg, quantitative yield) as a white amorphous solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.40-7.22 (m, 5H, CH arom.); 5.65 (d, 1H,  $J_{\text{NH},2}$  5.3 Hz, NH); 4.86 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.0 Hz, CHHPh); 4.59 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.3 Hz, H-1); 4.55 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.0 Hz, CHHPh); 4.27 (s, 1H, OH); 3.93 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  10.8,  $J_{5,6a}$  5.3 Hz, H-6a); 3.83 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  9.6,  $J_{3,4}$  9.0 Hz, H-3); 3.80 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  10.8,  $J_{5,6b}$  10.5 Hz, H-6b); 3.58 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  9.8,  $J_{3,4}$  9.0 Hz, H-4); 3.51 (ddd, 1H,  $J_{2,3}$  9.6,  $J_{1,2}$  8.3,  $J_{\text{NH},2}$  5.3 Hz, H-2); 3.27 (ddd, 1H,  $J_{5,6b}$  10.5,  $J_{4,5}$  9.8,  $J_{5,6a}$  5.3 Hz, H-5); 1.93 (s, 3H, Ac); 1.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>); 1.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>).

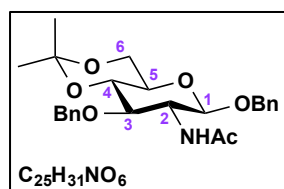
<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 172.1 (COCH<sub>3</sub>); 137.1, 128.9, 128.5, 128.4 (C arom.); 100.1 (CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>); 99.8 (C-1); 74.5 (C-4); 72.3 (C-3); 71.2 (CH<sub>2</sub>Ph); 67.5 (C-5); 62.2 (C-6); 59.1 (C-2); 29.3 (CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>); 23.7 (COCH<sub>3</sub>); 19.3 (CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>).

Rf: 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> 352.1755 [M+H<sup>+</sup>]; found 352.1740.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3600-3100, 2881, 1652, 1554, 1374, 1200, 1118, 1082, 1042, 857, 754.

$[\alpha]_D^{20}$  = -103.40 ( $c$  = 1.00, CHCl<sub>3</sub>). (in accordance with litt.<sup>224</sup>)

**Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-2-deoxy-4,6-O-isopropylidene- $\beta$ -D-glucopyranoside<sup>223</sup> (93)**


To a solution of **(92)** (1.81 g, 5.15 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (25 mL) was added BaO (2.38 g, 15.52 mmol, 3.0 eq.) and Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (814 mg, 2.58 mmol, 0.5 eq.) under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. Benzyl bromide (925  $\mu$ L, 7.73 mmol, 1.5 eq.) was then

added under argon atmosphere and the mixture was stirred at room temperature for 19 h. The mixture was diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, filtered over Celite<sup>®</sup> plug and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 99:1) to give product **(93)** (1.99 g, 87%) as yellow oil.

<sup>223</sup> Hasegawa, A. ; Fletcher, H. G. Jr., *Carbohydr. Res.*, **1973**, 29, 209-222.

<sup>224</sup> Rana, S. S. ; Barlow, J. J. ; Matta, K. L., *Carbohydr. Res.*, **1981**, 96, 231-239.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 7.36-7.21 (m, 10H, CH arom.); 5.36 (d, 1H, *J*<sub>NH,2</sub> 7.8 Hz, NH); 4.89 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.3 Hz, H-1); 4.83 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.9 Hz, CHHPh-1); 4.80 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.9 Hz, CHHPh-3); 4.57 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.9 Hz, CHHPh-3); 4.53 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.9 Hz, CHHPh-1); 3.98 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 9.9, *J*<sub>3,4</sub> 9.0 Hz, H-3); 3.94 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 10.8, *J*<sub>5,6a</sub> 5.5 Hz, H-6a); 3.79 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 10.8, *J*<sub>5,6b</sub> 10.2 Hz, H-6b); 3.70 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.5, *J*<sub>3,4</sub> 9.0 Hz, H-4); 3.35 (ddd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 9.9, *J*<sub>1,2</sub> 8.3, *J*<sub>NH,2</sub> 7.8 Hz, H-2); 3.32 (ddd, 1H, *J*<sub>5,6b</sub> 10.2, *J*<sub>4,5</sub> 9.5, *J*<sub>5,6a</sub> 5.5 Hz, H-5); 1.81 (s, 3H, Ac); 1.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>); 1.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 170.4 (COCH<sub>3</sub>); 138.9, 137.5, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9 (C arom.); 99.9 (C-1); 99.5 (CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>); 77.2 (C-3); 75.6 (C-4); 74.2 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 71.4 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 67.1 (C-5); 62.5 (C-6); 57.7 (C-2); 29.4 (CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>); 23.7 (COCH<sub>3</sub>); 19.3 (CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>).

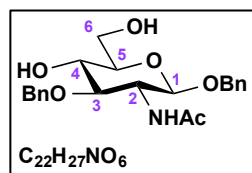
Rf: 0.18 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 99:1).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> 442.2224 [M+H<sup>+</sup>]; found 442.2211.

IR: ν (cm<sup>-1</sup>) = 3277, 3100-2800, 1654, 1563, 1374, 1201, 1117, 1084, 859, 737, 697.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -21.00 (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>). (in accordance with litt.<sup>223</sup>)

#### Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-2-deoxy-β-D-glucopyranoside<sup>225</sup> (90)



To a solution of **(93)** (1.7 g, 3.8 mmol, 1 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.8 mL) was added a solution of trifluoroacetic acid (50% in water, 5.8 mL, 37.9 mmol, 10 eq.) at 0°C. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was then diluted with H<sub>2</sub>O, cooled at 0°C and quenched with triethylamine (5.3 mL, 10 eq.). A white precipitate was formed. The precipitate was filtered and the layers of the filtrate were separated. The aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). The organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue and the precipitate were mixed and purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 96:4) to give product **(90)** (1.3 g, 88%) as a white amorphous solid.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ: 7.36-7.20 (m, 10H, CH arom.); 4.88 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 12.2 Hz, CHHPh-1); 4.87 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.3 Hz, CHHPh-3); 4.63 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.3 Hz, CHHPh-3); 4.61 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 12.2 Hz, CHHPh-1); 4.50 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.4 Hz, H-1); 3.93 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 12.0, *J*<sub>5,6a</sub> 2.0 Hz, H-6a); 3.82 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 10.1, *J*<sub>1,2</sub> 8.4 Hz, H-2); 3.72 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 12.0, *J*<sub>5,6b</sub> 6.0 Hz, H-6b); 3.57-3.45 (m, 2H, H-3 and H-4); 3.34-3.26 (m, 1H, H-5); 1.85 (s, 3H, Ac).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ: 173.5 (COCH<sub>3</sub>); 140.4, 139.3, 129.5, 129.4, 129.0, 128.9, 128.8, 128.6 (C arom.); 101.8 (C-1); 84.3 (C-3); 78.2 (C-5); 78.8 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 72.2 (C-4); 71.7 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 62.9 (C-6); 56.5 (C-2); 23.2 (COCH<sub>3</sub>).

<sup>225</sup> Yoshimura, J. ; Funabashi, M. ; Ishige, S. ; Sato, T., *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1966**, 39, 1760-1764.

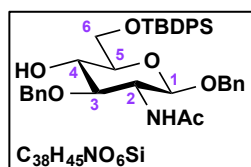
Rf: 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> 402.1911 [M+H<sup>+</sup>]; found 402.1899.

IR: ν (cm<sup>-1</sup>) = 3400-3100, 2867, 1654, 1551, 1373, 1111, 1074, 1053, 737, 699.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -24.00 (c = 1.00, CH<sub>3</sub>OH). (in accordance with litt.<sup>225</sup>)

#### Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-6-O-*tert*-butyldiphenylsilyl-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (**94**)



To a solution of (**90**) (860 mg, 2.15 mmol, 1.0 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/pyridine (4.3 mL, 1:1.5) was added *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (1.1 mL, 4.30 mmol, 2.0 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was quenched with CH<sub>3</sub>OH (10 mL) and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 100:0 to 95:5) to give product (**94**) (1.15 g, 84%) as a white foam.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.73-7.21 (m, 20H, CH arom.); 5.46 (d, 1H, *J*<sub>NH,2</sub> 7.9 Hz, NH); 4.87 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 8.2 Hz, H-1); 4.85 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.9 Hz, CHPh-1); 4.84 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.7 Hz, CHPh-3); 4.73 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.7 Hz, CHPh-3); 4.55 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.9 Hz, CHPh-1); 3.99 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 10.1, *J*<sub>3,4</sub> 8.6 Hz, H-3); 3.96 (d, 2H, *J*<sub>5,6</sub> 4.8 Hz, H-6); 3.78 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.6, *J*<sub>3,4</sub> 8.6 Hz, H-4); 3.49 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.6, *J*<sub>5,6</sub> 4.8 Hz, H-5); 3.44 (ddd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 10.1, *J*<sub>1,2</sub> 8.2, *J*<sub>NH,2</sub> 7.9 Hz, H-2); 2.82 (s, 1H, OH); 1.85 (s, 3H, Ac); 1.06 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170.6 (COCH<sub>3</sub>); 138.8-128.0 (C arom.); 99.1 (C-1); 80.8 (C-3); 74.8 (C-5); 74.4 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 73.6 (C-4); 70.8 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 65.1 (C-6); 57.1 (C-2); 27.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23.8 (COCH<sub>3</sub>); 19.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

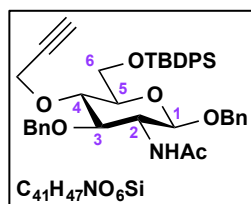
Rf: 0.65 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>6</sub>Si<sup>+</sup> 640.3089 [M+H<sup>+</sup>]; found 640.3099.

IR: ν (cm<sup>-1</sup>) = 3400-3100, 2931, 2858, 1655, 1428, 1113, 1065, 739, 701.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -31.40 (c = 0.50, CHCl<sub>3</sub>).

#### Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-6-O-*tert*-butyldiphenylsilyl-2-deoxy-4-O-propargyl-β-D-glucopyranoside (**95**).



To a solution of (**94**) (400 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq.) and propargyl bromide (91 μL, 80% in toluene, 0.81 mmol, 1.3 eq.) in DMF (3 mL) was added sodium hydride (28 mg, 60% oil dispersion, 0.69 mmol, 1.1 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min. The reaction mixture was quenched with CH<sub>3</sub>OH (10 mL) and concentrated. The residue was

purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MTBE 100:0 to 93:7) to give product **(95)** (424 mg, 66%) as a white amorphous solid.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 7.78-7.65, 7.47-7.20 (m, 20H, CH arom.); 5.38 (d, 1H, *J*<sub>NH,2</sub> 7.7 Hz, NH); 4.85 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.7 Hz, CHHPh-1); 4.85 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.4 Hz, CHHPh-3); 4.74 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> 7.8 Hz, H-1); 4.64 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.4 Hz, CHHPh-3); 4.52 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 11.7 Hz, CHHPh-1); 4.43 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 15.3, <sup>4</sup>*J*<sub>HCCCH</sub> 2.4 Hz, CHHCCH-4); 4.37 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HCH</sub> 15.3, <sup>4</sup>*J*<sub>HCCCH</sub> 2.4 Hz, CHHCCH-4); 4.00 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 11.3, *J*<sub>5,6a</sub> 2.2 Hz, H-6a); 3.96 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 9.9, *J*<sub>3,4</sub> 8.4 Hz, H-3); 3.93 (dd, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6a,6b</sub> 11.3, *J*<sub>5,6b</sub> 4.0 Hz, H-6b); 3.70 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.2, *J*<sub>3,4</sub> 8.4 Hz, H-4); 3.52 (ddd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> 9.9, *J*<sub>1,2</sub> 7.8, *J*<sub>NH,2</sub> 7.7 Hz, H-2); 3.39 (ddd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> 9.2, *J*<sub>5,6b</sub> 4.0, *J*<sub>5,6a</sub> 2.2 Hz, H-5); 2.35 (t, 1H, <sup>4</sup>*J*<sub>HCCCH</sub> 2.4 Hz, CHHCCH-4); 1.85 (s, 3H, Ac); 1.05 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 170.5 (COCH<sub>3</sub>); 138.5-127.9 (C arom.); 99.0 (C-1); 80.5 (C-3); 80.0 (CH<sub>2</sub>CCH-4); 78.4 (C-4); 75.7 (C-5); 74.9 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 74.8 (CH<sub>2</sub>CCH-4); 70.4 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 63.1 (C-6); 59.8 (CH<sub>2</sub>CCH-4); 56.8 (C-2); 27.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23.8 (COCH<sub>3</sub>); 19.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Rf:** 0.20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 99:1).

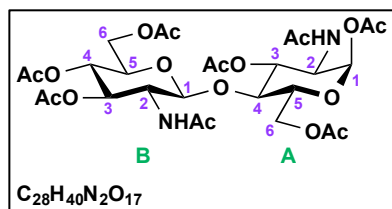
**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** calculated for C<sub>41</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>6</sub>Si<sup>+</sup> 678.3245 [M+H<sup>+</sup>]; found 678.3265.

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3287, 2931, 2858, 1654, 1563, 1113, 1074, 1056, 739, 700.

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +1.50 (*c* = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

## B. Azido disaccharide building block

### 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-1,3,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside<sup>159</sup> (**53**)



To an ice-cold mixture of acetic anhydride (400 mL) and sulfuric acid (40 mL) was added chitin (80 g) portion-wise. The suspension was stirred at 55 °C for 3 h to give a heterogeneous brown mixture, kept at room temperature for 14 h and then heated at 55 °C for 1 h to give a homogenous solution. This mixture was

then poured into an ice-cold solution of sodium acetate in water (1.6 L, 100 g/L). The resulting solid was filtered off. The filtrate was extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 2 L). The combined organic layers were washed with an ice-cold saturated  $NaHCO_3$  solution (6 L), dried over  $Na_2SO_4$ , filtrated and concentrated to afford a yellow solid (73 g). The residue was purified by silica gel chromatography ( $CH_2Cl_2$ /acetone: from 9/1 to 1/9) to afford four fractions. The first three fractions were recrystallized from  $CH_3OH/Et_2O$ . The second fraction was identified as acetylated  $\alpha$ -chitobiose (**53**) (7.5 g, 5.6%) as a white solid. The first and third fractions were respectively identified as acetylated  $\alpha$ -chitose (3.8 g, 2.5%) and acetylated  $\alpha$ -chitotriose (5.8 g, 4.6%). The highly impure fourth fraction contains longer chitooligosaccharides.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.07 (d, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  3.5 Hz, **H-1<sup>A</sup>**); 6.00 (d, 1H,  $J_{NH^B,2^B}$  9.2 Hz, **NH<sup>B</sup>**); 5.64 (d, 1H,  $J_{NH^A,2^A}$  9.0 Hz, **NH<sup>A</sup>**); 5.20 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.8,  $J_{3^A,4^A}$  9.3 Hz, **H-3<sup>A</sup>**); 5.10 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.1,  $J_{3^B,4^B}$  9.6 Hz, **H-3<sup>B</sup>**); 5.03 (dd, 1H,  $J_{3^B,4^B}$  9.6,  $J_{4^B,5^B}$  9.6 Hz, **H-4<sup>B</sup>**); 4.44 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  8.6 Hz, **H-1<sup>B</sup>**); 4.42 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.2,  $J_{5^A,6a^A}$  3.5 Hz, **H-6a<sup>A</sup>**); 4.36 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.4,  $J_{5^B,6a^B}$  4.4 Hz, **H-6a<sup>B</sup>**); 4.34 (ddd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.8,  $J_{NH^A,2^A}$  9.0,  $J_{1^A,2^A}$  3.5 Hz, **H-2<sup>A</sup>**); 4.16 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.2,  $J_{5^A,6b^A}$  1.5 Hz, **H-6b<sup>A</sup>**); 4.00 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.4,  $J_{5^B,6b^B}$  1.7 Hz, **H-6b<sup>B</sup>**); 3.94 (ddd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.1,  $J_{NH^B,2^B}$  9.2,  $J_{1^B,2^B}$  8.6 Hz, **H-2<sup>B</sup>**); 3.87 (ddd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  9.8,  $J_{5^A,6a^A}$  3.5,  $J_{5^A,6b^A}$  1.5 Hz, **H-5<sup>A</sup>**); 3.71 (dd, 1H,  $J_{3^A,4^A}$  9.8,  $J_{4^A,5^A}$  9.3 Hz, **H-4<sup>A</sup>**); 3.60 (ddd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  9.6,  $J_{5^B,6a^B}$  4.4,  $J_{5^B,6b^B}$  1.7 Hz, **H-5<sup>B</sup>**); 2.16-1.90 (8 s, 24H, 8 **Ac**).

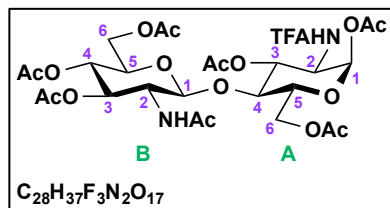
$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 171.7-169.1 (8 **COCH<sub>3</sub>**); 102.0 (**C-1<sup>B</sup>**); 90.7 (**C-1<sup>A</sup>**); 76.1 (**C-4<sup>A</sup>**); 72.8 (**C-3<sup>B</sup>**); 72.2 (**C-5<sup>B</sup>**); 71.0 (**C-5<sup>A</sup>**); 70.9 (**C-3<sup>A</sup>**); 68.1 (**C-4<sup>B</sup>**); 61.9 (**C-6<sup>B</sup>**); 61.7 (**C-6<sup>A</sup>**); 54.7 (**C-2<sup>B</sup>**); 51.4 (**C-2<sup>A</sup>**); 23,4-20.8 (8 **COCH<sub>3</sub>**).

**Rf**: 0.60 ( $CH_2Cl_2$ /Acetone 1:1).

(Analyses in accordance with litt<sup>87</sup>)



**2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-1,3,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-glucopyranoside<sup>87</sup> (**54**)**



To a solution of (**53**) (800 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq.) in dry  $CH_3CN$  (220  $\mu$ L) was added trifluoroacetic anhydride (1.15  $\mu$ L, 8.28 mmol, 7.0 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 135°C for 7 min in a sealed tube. The mixture was then allowed to cool to room temperature, diluted with  $CH_3OH$  and stirred for 1 h more. After concentration, the residue was purified by silica gel column chromatography ( $CH_2Cl_2/MTBE/CH_3OH$  100:0:0 to 70:28:2) to give product (**54**) (631 mg, 73%) as a white amorphous solid.

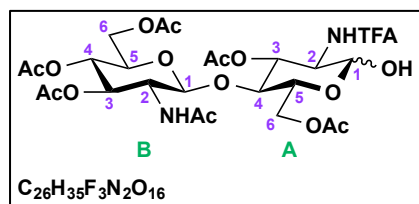
**$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$ : 6.72 (d, 1H,  $J_{NH^A,2^A}$  8.7 Hz,  $NH^A$ ); 6.16 (d, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  3.6 Hz,  $H-1^A$ ); 5.97 (d, 1H,  $J_{NH^B,2^B}$  9.2 Hz,  $NH^B$ ); 5.28 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.9,  $J_{3^A,4^A}$  9.2 Hz,  $H-3^A$ ); 5.12 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.2,  $J_{3^B,4^B}$  9.5 Hz,  $H-3^B$ ); 5.02 (dd, 1H,  $J_{3^B,4^B}$  9.7,  $J_{4^B,5^B}$  9.5 Hz,  $H-4^B$ ); 4.48 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  8.4 Hz,  $H-1^B$ ); 4.42 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.2,  $J_{5^A,6a^A}$  3.7 Hz,  $H-6a^A$ ); 4.37 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.5,  $J_{5^B,6a^B}$  4.2 Hz,  $H-6a^B$ ); 4.31 (ddd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.9,  $J_{NH^A,2^A}$  8.7,  $J_{1^A,2^A}$  3.6 Hz,  $H-2^A$ ); 4.19 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.2,  $J_{5^A,6b^A}$  1.5 Hz,  $H-6b^A$ ); 4.00 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.5,  $J_{5^B,6b^B}$  2.2 Hz,  $H-6b^B$ ); 3.92 (ddd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  9.7,  $J_{5^A,6a^A}$  3.7,  $J_{5^A,6b^A}$  1.5 Hz,  $H-5^A$ ); 3.91 (ddd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.2,  $J_{NH^B,2^B}$  9.2,  $J_{1^B,2^B}$  8.4 Hz,  $H-2^B$ ); 3.75 (dd, 1H,  $J_{3^A,4^A}$  9.7,  $J_{4^A,5^A}$  9.2 Hz,  $H-4^A$ ); 3.62 (ddd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  9.7,  $J_{5^B,6a^B}$  4.2,  $J_{5^B,6b^B}$  2.2 Hz,  $H-5^B$ ); 2.18-1.94 (7 s, 21H, 7 Ac).

**$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$ : 171.8-168.8 (7  $COCH_3$ ); 157.7 ( $^2J_{C,F}$  38.0 Hz,  $COCF_3$ ); 115.6 ( $^1J_{C,F}$  288 Hz,  $COCF_3$ ); 102.0 ( $C-1^B$ ); 89.7 ( $C-1^A$ ); 75.9 ( $C-4^A$ ); 72.7 ( $C-3^B$ ); 72.3 ( $C-5^B$ ); 71.1 ( $C-5^A$ ); 70.3 ( $C-3^A$ ); 68.1 ( $C-4^B$ ); 61.9 ( $C-6^B$ ); 61.5 ( $C-6^A$ ); 54.8 ( $C-2^B$ ); 52.2 ( $C-2^A$ ); 23,4-20.6 (7  $COCH_3$ ).

**Rf**: 0.36 ( $CH_2Cl_2$ /Acetone 4:1).

(Analyses in accordance with litt.<sup>87</sup>)

**2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-D-glucopyranose<sup>87</sup> (**97**)**



To a solution of ethylenediamine (52  $\mu$ L, 0.78 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (500  $\mu$ L) was added acetic acid (45  $\mu$ L, 0.78 mmol, 1.2 eq.) at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. A white salt was formed and a suspension of (**54**) (465 mg, 0.64 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (3 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. The mixture was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 10:0 to 9:1) to give product (**97**) (317 mg,  $\alpha/\beta$  mixture, 72%) as a white amorphous solid.

$\alpha/\beta$  mixture 4:1 (H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>CN +  $\epsilon$ HCO<sub>2</sub>H)

**<sup>1</sup>H NMR  $\alpha$  isomer (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 8.11 (d, 1H,  $J_{NH^A,2^A}$  9.7 Hz, NH<sup>A</sup>); 6.00 (d, 1H,  $J_{NH^B,2^B}$  8.6 Hz, NH<sup>B</sup>); 5.75 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.9,  $J_{3^A,4^A}$  9.3 Hz, H-3<sup>A</sup>); 5.42 (brd, 1H,  $J_{OH,1^A}$  2.8 Hz, OH); 5.27 (brdd, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  3.6,  $J_{OH,1^A}$  2.8 Hz, H-1<sup>A</sup>); 5.05 (dd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  9.7,  $J_{3^B,4^B}$  9.5 Hz, H-4<sup>B</sup>); 4.94 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.0,  $J_{3^B,4^B}$  9.5 Hz, H-3<sup>B</sup>); 4.41 (dd, 1H,  $J_{6a^B,6b^B}$  12.4,  $J_{5^B,6a^B}$  4.2 Hz, H-6a<sup>B</sup>); 4.32 (dd, 1H,  $J_{6a^A,6b^A}$  11.9,  $J_{5^A,6a^A}$  3.7 Hz, H-6a<sup>A</sup>); 4.29 (ddd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.9,  $J_{NH^A,2^A}$  9.7,  $J_{1^A,2^A}$  3.1 Hz, H-2<sup>A</sup>); 4.12 (dd, 1H,  $J_{6a^A,6b^A}$  11.9,  $J_{5^A,6a^A}$  1.8 Hz, H-6b<sup>A</sup>); 4.11-4.04 (m, 2H, H-2<sup>B</sup> and H-1<sup>B</sup>); 4.05 (ddd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  9.8,  $J_{5^A,6a^A}$  3.7,  $J_{5^A,6b^A}$  1.8 Hz, H-5<sup>A</sup>); 4.00 (dd, 1H,  $J_{6a^B,6b^B}$  12.4,  $J_{5^B,6a^B}$  1.7 Hz, H-6b<sup>B</sup>); 3.60 (dd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  9.8,  $J_{3^A,4^A}$  9.3 Hz, H-4<sup>A</sup>); 3.55 (ddd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  9.7,  $J_{5^B,6a^B}$  4.2,  $J_{5^B,6b^B}$  1.7 Hz, H-5<sup>B</sup>); 2.14-1.92 (6 s, 18H, 6 Ac).

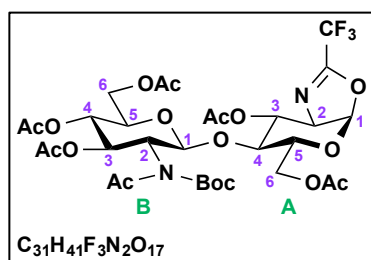
**<sup>13</sup>C NMR  $\alpha$  isomer (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 172.1-169.4 (6 COCH<sub>3</sub>); 102.6 (C-1<sup>B</sup>); 91.4 (C-1<sup>A</sup>); 77.0 (C-4<sup>A</sup>); 72.4 (C-3<sup>B</sup>); 72.1 (C-5<sup>B</sup>); 69.8 (C-3<sup>A</sup>); 68.8 (C-5<sup>A</sup>); 67.8 (C-4<sup>B</sup>); 62.2 (C-6<sup>A</sup>); 61.7 (C-6<sup>B</sup>); 54.5 (C-2<sup>B</sup>); 52.9 (C-2<sup>A</sup>); 23.4-20.2 (6 COCH<sub>3</sub>).

**Rf  $\alpha$  isomer:** 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5), **Rf  $\beta$  isomer:** 0.21 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** calculated for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>16</sub><sup>+</sup> 689.2011 [M+H<sup>+</sup>]; found 689.1989.

**IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3300, 1741, 1714, 1663, 1371, 1227, 1181, 1160, 1040.

**2-Trifluoromethyl-[[2-(*N*-acetyl-*tert*-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-*O*-acetyl-1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoso][2,1-*d*]oxazoline<sup>87</sup> (**99**)**



To a solution of (**97**) (314 mg, 0.46 mmol, 1 eq.) in dry CH<sub>3</sub>CN (7.5 mL) was added methanesulfonic anhydride (238 mg, 1.4 mmol, 3 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 35 min to form mesyl intermediate. Triethylamine (1.3 mL, 9.1 mmol, 20 eq.) was then added and the

reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h more. The mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL). Aqueous layer was then extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to give product (**98**) (325 mg, quantitative yield) as a yellow solid. A solution of this solid (**98**) in dry THF (3.1 mL) was then treated with di-*tert*-butyl dicarbonate (524  $\mu$ L, 2.3 mmol, 5.0 eq.) and 4-dimethylaminopyridine (11 mg, 0.091 mmol, 0.2 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and then concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 100:0 to 98:2) to give product (**99**) (306 mg, 87%) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70°C)**  $\delta$ : 6.27 (d, 1H,  $J_{1,2}^{A,A}$  7.5 Hz, **H-1<sup>A</sup>**); 5.63 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  10.6,  $J_{3,4}^{B,B}$  8.8 Hz, **H-3<sup>B</sup>**); 5.62 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{A,A}$  2.5,  $J_{3,4}^{A,A}$  1.5 Hz, **H-3<sup>A</sup>**); 5.40 (brs, 1H, **H-1<sup>B</sup>**); 4.99 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{B,B}$  10.1,  $J_{3,4}^{B,B}$  8.8 Hz, **H-4<sup>B</sup>**); 4.41 (ddd, 1H,  $J_{1,2}^{A,A}$  7.5,  $J_{2,3}^{A,A}$  2.5 Hz, **H-2<sup>A</sup>**); 4.24 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{B,B}$  12.2,  $J_{5,6a}^{B,B}$  4.7 Hz, **H-6a<sup>B</sup>**); 4.19 (brd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{A,A}$  12.4 Hz, **H-6a<sup>A</sup>**); 4.13 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{B,B}$  12.2,  $J_{5,6b}^{B,B}$  2.7 Hz, **H-6b<sup>B</sup>**); 4.01 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{A,A}$  12.4,  $J_{5,6b}^{A,A}$  6.2 Hz, **H-6b<sup>A</sup>**); 3.82 (ddd, 1H,  $J_{4,5}^{B,B}$  10.1,  $J_{5,6a}^{B,B}$  4.7,  $J_{5,6b}^{B,B}$  2.7 Hz, **H-5<sup>B</sup>**); 3.79 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{A,A}$  9.1,  $J_{3,4}^{A,A}$  1.5 Hz, **H-4<sup>A</sup>**); 3.42 (ddd, 1H,  $J_{4,5}^{A,A}$  9.1,  $J_{5,6b}^{A,A}$  6.2,  $J_{5,6a}^{A,A}$  1.9 Hz, **H-5<sup>A</sup>**); 2.30-1.93 (6 s, 18H, 6 Ac); 1.54 (s, 9H, Boc).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70°C)**  $\delta$ : 172.1-171.1 (6 COCH<sub>3</sub>); 157.4 (q,  $^2J_{C,F}$  40.0 Hz, OCNCF<sub>3</sub>); 118.2 (q,  $^1J_{C,F}$  274 Hz, OCNCF<sub>3</sub>); 104.4 (**C-1<sup>A</sup>**); 103.3 (**C-1<sup>B</sup>**); 86.8 (brs, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 78.6 (**C-4<sup>A</sup>**); 73.9 (**C-5<sup>B</sup>**); 72.4 (brs, **C-3<sup>B</sup>**); 71.8 (**C-4<sup>B</sup>**); 71.5 (**C-3<sup>A</sup>**); 70.9 (**C-5<sup>A</sup>**); 66.2 (**C-2<sup>A</sup>**); 65.1 (**C-6<sup>A</sup>**); 64.0 (**C-6<sup>B</sup>**); 29.1 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27.9 (brs, COCH<sub>3</sub> NAc); 21.9-21.5 (5 COCH<sub>3</sub> OAc).

**Rf**: 0.56 (Heptane/EtOAc 3:7).

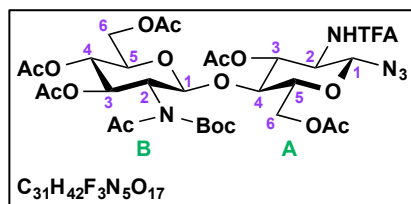
**HRMS (ESI<sup>+</sup>)**: calculated for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup> 671.1906 [M-Boc+H<sup>+</sup>]; found 671.1925.

**IR**:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2980, 1744, 1690, 1370, 1227, 1154, 1043.

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -6.20 (*c* = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

(Analyses in accordance with litt.<sup>87</sup>)

**3,4,6-tri-*O*-Acetyl-2-(*N*-acetyl-*tert*-butoxycarbonylamino)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-glucopyranosyl azide (**100**)**



To a solution of (**99**) (325 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (3.6 mL) was added trimethylsilyl azide (78  $\mu$ L, 0.59 mmol, 1.4 eq.) and tetrabutylammonium fluoride (590  $\mu$ L, 1 mol/L in THF, 0.59 mmol, 1.4 eq.). The reaction mixture was stirred at reflux,

under argon atmosphere, for 15 h. The mixture was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography (Cyclohexane/EtOAc 6:4) to give product (**100**) (282 mg, 82%) as a yellow foam.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3CN$ , 70°C)  $\delta$ : 7.48 (d, 1H,  $J_{NH^A,2^A}$  9.2 Hz,  $NH^A$ ); 5.64 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.4,  $J_{3^B,4^B}$  8.9 Hz,  $H-3^B$ ); 5.31 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  7.7 Hz,  $H-1^B$ ); 5.17 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.4,  $J_{3^A,4^A}$  9.0 Hz,  $H-3^A$ ); 4.95 (dd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  10.1,  $J_{3^B,4^B}$  8.9 Hz,  $H-4^B$ ); 4.93 (d, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  9.5 Hz,  $H-1^A$ ); 4.44 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.2,  $J_{5^A,6a^A}$  2.0 Hz,  $H-6a^A$ ); 4.32 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.3,  $J_{5^B,6a^B}$  4.7 Hz,  $H-6a^B$ ); 4.07 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.3,  $J_{5^B,6b^B}$  2.7 Hz,  $H-6b^B$ ); 4.00 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.2,  $J_{5^A,6b^A}$  5.3 Hz,  $H-6b^A$ ); 3.92 (dd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  9.8,  $J_{3^A,4^A}$  9.0 Hz,  $H-4^A$ ); 3.82 (ddd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.4,  $J_{1^A,2^A}$  9.5,  $J_{NH^A,2^A}$  9.2 Hz,  $H-2^A$ ); 3.79 (ddd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  10.1,  $J_{5^B,6a^B}$  4.7,  $J_{5^B,6b^B}$  2.7 Hz,  $H-5^B$ ); 3.75 (ddd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  9.8,  $J_{5^A,6b^A}$  5.3,  $J_{5^A,6a^A}$  2.0 Hz,  $H-5^A$ ); 2.33-1.93 (6 s, 18H, 6 Ac); 1.56 (s, 9H, Boc).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3CN$ , 70°C)  $\delta$ : 175.0 (COCH<sub>3</sub> NAc); 171.6-170.8 (5 COCH<sub>3</sub> OAc); 158.7 (q,  $^2J_{C,F}$  37.6 Hz, COCF<sub>3</sub>); 100.6 (C-1<sup>B</sup>); 88.6 (C-1<sup>A</sup>); 86.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 76.6 (C-5<sup>A</sup>); 76.0 (C-4<sup>A</sup>); 73.4 (C-3<sup>A</sup>); 73.1 (C-5<sup>B</sup>); 71.8 (C-3<sup>B</sup>); 71.3 (C-4<sup>B</sup>); 63.5, 63.3 (C-6<sup>A</sup> and C-6<sup>B</sup>); 56.0 (C-2<sup>A</sup>); 28.6 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27.6 (COCH<sub>3</sub> NAc); 21.3-21.0 (5 COCH<sub>3</sub> OAc).

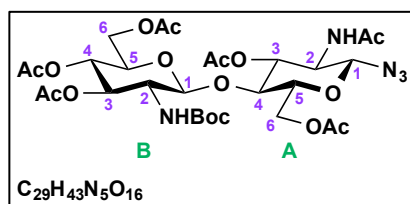
Rf: 0.50 (Cyclohexane/EtOAc 1:1).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for  $C_{31}H_{42}F_3N_5NaO_{17}^+$  836.2420 [M+Na<sup>+</sup>]; found 836.2428.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2120, 1747, 1371, 1227, 1155, 1045.

$[\alpha]_D^{20} = -51.20$  ( $c = 1.00$ , CHCl<sub>3</sub>).

**3,4,6-tri-*O*-Acetyl-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl azide (**102**)**



To a solution of (**100**) (50 mg, 0.061 mmol, 1 eq.) in CH<sub>3</sub>OH (1.2 mL) was added LiOH (920  $\mu$ L, 2 mol/L in H<sub>2</sub>O, 1.8 mmol, 30 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 22 h. The mixture was concentrated to give unprotected

intermediate (**101**) with quantitative yield and salts. A mixture of this residue in acetic anhydride (580  $\mu$ L, 6.1 mmol, 100 eq.) and pyridine (580  $\mu$ L) was then stirred at room temperature for 19 h more and then concentrated. The residue was dissolved in toluene and concentrated three times to remove pyridine traces. The residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 98:2 then 97:3) to give product (**102**) (35 mg, 78%) as a white amorphous solid.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 5.90 (d, 1H,  $J_{\text{NH}^{\text{A}},2^{\text{A}}}$  8.1 Hz, NH<sup>A</sup>); 5.22 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{\text{B},\text{B}}$  10.3,  $J_{3,4}^{\text{B},\text{B}}$  9.4 Hz, H-3<sup>B</sup>); 5.09 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{\text{A},\text{A}}$  9.4,  $J_{3,4}^{\text{A},\text{A}}$  8.5 Hz, H-3<sup>A</sup>); 4.99 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{\text{B},\text{B}}$  9.9,  $J_{3,4}^{\text{B},\text{B}}$  9.4 Hz, H-4<sup>B</sup>); 4.89 (d, 1H,  $J_{\text{NH}^{\text{B}},2^{\text{B}}}$  8.7 Hz, NH<sup>B</sup>); 4.59 (d, 1H,  $J_{1,2}^{\text{B},\text{B}}$  8.6 Hz, H-1<sup>B</sup>); 4.55 (d, 1H,  $J_{1,2}^{\text{A},\text{A}}$  8.8 Hz, H-1<sup>A</sup>); 4.45 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{\text{A},\text{A}}$  12.2,  $J_{5,6a}^{\text{A},\text{A}}$  2.2 Hz, H-6a<sup>A</sup>); 4.33 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{\text{B},\text{B}}$  12.6,  $J_{5,6a}^{\text{B},\text{B}}$  4.5 Hz, H-6a<sup>B</sup>); 4.28 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{\text{A},\text{A}}$  12.2,  $J_{5,6b}^{\text{A},\text{A}}$  4.7 Hz, H-6b<sup>A</sup>); 4.01 (ddd, 1H,  $J_{2,3}^{\text{A},\text{A}}$  9.4,  $J_{1,2}^{\text{A},\text{A}}$  8.4,  $J_{\text{NH}^{\text{A}},2^{\text{A}}}$  8.1 Hz, H-2<sup>A</sup>); 4.01 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{\text{B},\text{B}}$  12.6,  $J_{5,6b}^{\text{B},\text{B}}$  2.0 Hz, H-6b<sup>B</sup>); 3.80 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{\text{A},\text{A}}$  8.7,  $J_{3,4}^{\text{A},\text{A}}$  8.5 Hz, H-4<sup>A</sup>); 3.70 (ddd, 1H,  $J_{4,5}^{\text{A},\text{A}}$  8.7,  $J_{5,6a}^{\text{A},\text{A}}$  4.7,  $J_{5,6a}^{\text{A},\text{A}}$  2.2 Hz, H-5<sup>A</sup>); 3.62 (ddd, 1H,  $J_{4,5}^{\text{B},\text{B}}$  9.9,  $J_{5,6a}^{\text{B},\text{B}}$  4.5,  $J_{5,6b}^{\text{B},\text{B}}$  2.0 Hz, H-5<sup>B</sup>); 3.43 (ddd, 1H,  $J_{2,3}^{\text{B},\text{B}}$  10.3,  $J_{\text{NH}^{\text{B}},2^{\text{B}}}$  8.7,  $J_{1,2}^{\text{B},\text{B}}$  8.6 Hz, H-2<sup>B</sup>); 2.12-1.95 (6 s, 18H, 6 Ac); 1.38 (s, 9H, Boc).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 171.3-169.6 (6 COCH<sub>3</sub>); 155.4 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 101.1 (C-1<sup>B</sup>); 88.7 (C-1<sup>A</sup>); 80.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 75.2, 75.1 (C-4<sup>A</sup> and C-5<sup>A</sup>); 72.4 (C-3<sup>A</sup>); 72.1 (2C, C-3<sup>B</sup> and C-5<sup>B</sup>); 68.6 (C-4<sup>B</sup>); 62.2, 62.1 (C-6<sup>A</sup> and C-6<sup>B</sup>); 56.3 (C-2<sup>B</sup>); 53.3 (C-2<sup>A</sup>); 28.4 (3C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23,5-20.7 (6 COCH<sub>3</sub>).

**Rf**: 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 1:1).

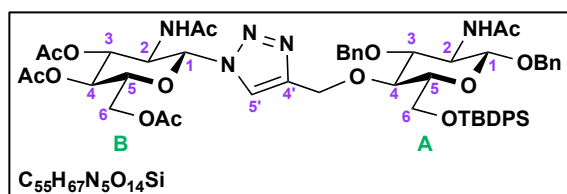
**HRMS (ESI<sup>+</sup>)**: calculated for C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub><sup>+</sup> 718.2778 [M+H<sup>+</sup>]; found 718.2784.

**IR**:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3356, 2980, 2118, 1746, 1529, 1369, 1230, 1165, 1039.

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = -39.50 ( $c$  = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

### C. Click chemistry and chitooligosaccharide analogs

**Benzyl 2-acetamido-3-*O*-benzyl-6-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2-deoxy-4-*O*-[1'-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1*H*-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside**  
(103)



To a solution of **(95)** (49.0 mg, 0.072 mmol, 1.0 eq.) and 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl azide (26.9 mg, 0.072 mmol, 1.0 eq.) in  $CH_2Cl_2$  (145  $\mu$ L)/ $H_2O$  (71  $\mu$ L) were added

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (37  $\mu$ L, 24.6 mg/mL in  $H_2O$ , 3.6  $\mu$ mol, 0.05 eq.) and sodium ascorbate (37  $\mu$ L, 39.0 mg/mL in  $H_2O$ , 7.2  $\mu$ mol, 0.10 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 17 h. The mixture was then extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$ , filtrated and concentrated to afford product **(103)** (73 mg, 97%) as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.78-7.67 (m, 4H, CH arom.); 7.62 (s, 1H, H-5'); 7.45-7.20 (m, 16H, CH arom.); 6.01 (d, 1H,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.89 (d, 1H,  $J_{NH,2}^{B,B}$  9.0 Hz, NH<sup>B</sup>); 5.49 (d, 1H,  $J_{NH,2}^{A,A}$  8.1 Hz, NH<sup>A</sup>); 5.47 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  10.3,  $J_{3,4}^{B,B}$  9.5 Hz, H-3<sup>B</sup>); 5.20 (dd, 1H,  $J_{3,4}^{B,B}$  10.0,  $J_{4,5}^{B,B}$  9.5 Hz, H-4<sup>B</sup>); 4.93 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.8 Hz, CHHtriaz); 4.85 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.8 Hz, CHHtriaz); 4.84 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.0 Hz, CHHPh-1); 4.81 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.7 Hz, CHHPh-3); 4.70 (d, 1H,  $J_{1,2}^{A,A}$  7.7 Hz, H-1<sup>A</sup>); 4.63 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.7 Hz, CHHPh-3); 4.51 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.0 Hz, CHHPh-1); 4.43 (ddd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  10.3,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0,  $J_{NH,2}^{B,B}$  9.0 Hz, H-2<sup>B</sup>); 4.24 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{B,B}$  12.5,  $J_{5,6a}^{B,B}$  5.5 Hz, H-6a<sup>B</sup>); 4.07 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{B,B}$  12.5,  $J_{5,6b}^{B,B}$  1.3 Hz, H-6b<sup>B</sup>); 4.01-3.92 (m, 3H, H-6<sup>A</sup> and H-5<sup>B</sup>); 3.91 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{A,A}$  9.5,  $J_{3,4}^{A,A}$  8.3 Hz, H-3<sup>A</sup>); 3.83 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{A,A}$  8.8,  $J_{3,4}^{A,A}$  8.3 Hz, H-4<sup>A</sup>); 3.64 (ddd, 1H,  $J_{2,3}^{A,A}$  9.5,  $J_{NH,2}^{A,A}$  8.1,  $J_{1,2}^{A,A}$  7.7 Hz, H-2<sup>A</sup>); 3.46-3.39 (m, 1H, H-5<sup>A</sup>); 2.03-1.63 (4 s, 15H, 5 Ac); 1.05 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 170.9-169.5 (5 COCH<sub>3</sub>); 145.5 (C-4'); 139.0-127.0 (C arom.); 121.9 (C-5'); 99.2 (C-1<sup>A</sup>); 85.8 (C-1<sup>B</sup>); 80.3 (C-3<sup>A</sup>); 78.6 (C-4<sup>A</sup>); 75.9 (C-5<sup>A</sup>); 75.1 (C-5<sup>B</sup>); 74.6 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 72.4 (C-3<sup>B</sup>); 70.3 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 68.2 (C-4<sup>B</sup>); 65.6 (CH<sub>2</sub>triaz); 63.0 (C-6<sup>A</sup>); 62.0 (C-6<sup>B</sup>); 56.3 (C-2<sup>A</sup>); 53.9 (C-2<sup>B</sup>); 27.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23.8-20.8 (5 COCH<sub>3</sub>); 19.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

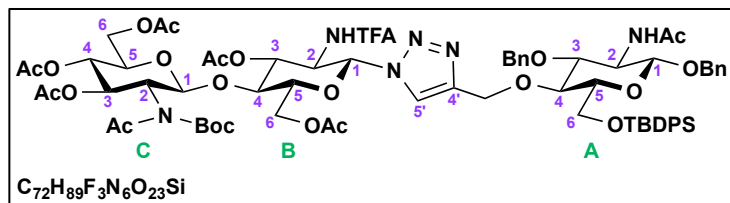
Rf: 0.18 ( $CH_2Cl_2$ /MTBE 1:1).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for  $C_{55}H_{68}N_5O_{14}Si^+$  1050.4527 [M+H<sup>+</sup>]; found 1050.4554.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3281, 2933, 2858, 1751, 1660, 1369, 1232, 1113, 1063, 1044, 741, 702.

$[\alpha]_D^{20} = -30.50$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3$ ).

**Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-6-O-tert-butylidiphenylsilyl-2-deoxy-4-O-[[1'-([2-(N-acetyl-tert-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-3,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-glucopyranosyl]-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-β-D-glucopyranoside (104)**



To a solution of **(95)** (27.1 mg, 0.040 mmol, 1.0 eq.) and **(100)** (32.4 mg, 0.040 mmol, 1.0 eq.) in  $CH_2Cl_2$  (240  $\mu$ L) were added  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (121  $\mu$ L,

24.6 mg/mL in  $H_2O$ , 12  $\mu$ mol, 0.30 eq.) and sodium ascorbate (121  $\mu$ L, 39.0 mg/mL in  $H_2O$ , 24  $\mu$ mol, 0.60 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was then extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$ , filtrated and concentrated to afford product **(104)** (59 mg, 99%) as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3CN$ , 65°C)  $\delta$ : 7.82-7.73 (m, 4H, CH arom.); 7.71 (s, 1H, H-5'); 7.55 (d, 1H,  $J_{NH^B, 2^B}$  9.1 Hz, NH<sup>B</sup>); 7.48-7.25 (m, 16H, CH arom.); 6.25 (d, 1H,  $J_{NH^A, 2^A}$  7.4 Hz, NH<sup>A</sup>); 6.04 (d, 1H,  $J_{1^B, 2^B}$  9.8 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.66 (dd, 1H,  $J_{2^C, 3^C}$  10.5,  $J_{3^C, 4^C}$  8.8 Hz, H-3<sup>C</sup>); 5.41 (dd, 1H,  $J_{2^B, 3^B}$  10.0,  $J_{3^B, 4^B}$  9.3 Hz, H-3<sup>B</sup>); 5.41-5.34 (brs, 1H, H-1<sup>C</sup>); 4.39 (dd, 1H,  $J_{4^C, 5^C}$  10.2,  $J_{3^C, 4^C}$  8.8 Hz, H-4<sup>C</sup>); 4.90 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.5 Hz, CHHtriaz); 4.82 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.9 Hz, CHHPh-1); 4.81 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.3 Hz, CHHPh-3); 4.77 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.5 Hz, CHHtriaz); 4.68 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.3 Hz, CHHPh-3); 4.57 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.9 Hz, CHHPh-1); 4.59-4.53 (brs, 1H, H-1<sup>A</sup>); 4.52 (ddd, 1H,  $J_{2^B, 3^B}$  10.0,  $J_{1^B, 2^B}$  9.8,  $J_{NH^B, 2^B}$  9.1 Hz, H-2<sup>B</sup>); 4.44 (brd, 1H,  $^2J_{6a^B, 6b^B}$  11.6 Hz, H-6a<sup>B</sup>); 4.35 (dd, 1H,  $^2J_{6a^C, 6b^C}$  12.4,  $J_{5^C, 6a^C}$  4.7 Hz, H-6a<sup>C</sup>); 4.11 (dd, 1H,  $^2J_{6a^C, 6b^C}$  12.4,  $J_{5^C, 6b^C}$  2.6 Hz, H-6b<sup>C</sup>); 4.09 (dd, 1H,  $J_{3^B, 4^B}$  9.3,  $J_{4^B, 5^B}$  9.2 Hz, H-4<sup>B</sup>); 4.06-3.93 (m, 4H, H-6<sup>A</sup>, H-6<sup>B</sup> and H-5<sup>B</sup>); 3.84 (ddd, 1H,  $J_{4^C, 5^C}$  10.2,  $J_{5^C, 6a^C}$  4.7,  $J_{5^C, 6b^C}$  2.6 Hz, H-5<sup>C</sup>); 3.84-3.75 (m, 1H, H-2<sup>A</sup>); 3.75-3.65 (m, 2H, H-3<sup>A</sup> and H-4<sup>A</sup>); 3.44-3.38 (m, 1H, H-5<sup>A</sup>); 2.34 (brs, 3H, NAc); 2.09-1.92 (5 s, 15H, 5 OAc); 1.84 (brs, 3H, NHAc); 1.58 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu Boc); 1.11 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3CN$ , 65°C)  $\delta$ : 175.0 (COCH<sub>3</sub> NAc); 171.7-170.7 (6 COCH<sub>3</sub> OAc and NHAc); 158.5 (q,  $^2J_{C,F}$  37.8 Hz, COCF<sub>3</sub>); 146.8 (C-4'); 140.6-128.7 (C arom.); 123.4 (C-5'); 101.8 (C-1<sup>A</sup>); 100.7 (C-1<sup>C</sup>); 86.0 (2C, C-1<sup>B</sup> and C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc); 83.7 (C-3<sup>A</sup>); 79.9 (C-4<sup>A</sup>); 77.4 (C-5<sup>B</sup>); 77.3 (C-5<sup>A</sup>); 75.9 (C-4<sup>B</sup>); 75.7 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 73.4 (C-3<sup>B</sup>); 73.1 (C-5<sup>C</sup>); 71.8 (C-3<sup>C</sup>); 71.5 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 71.2 (C-4<sup>C</sup>); 66.7 (CH<sub>2</sub>triaz); 64.7 (C-6<sup>A</sup>); 63.5 (C-6<sup>C</sup>); 63.4 (C-6<sup>B</sup>); 56.9 (C-2<sup>A</sup>); 55.7 (C-2<sup>B</sup>); 28.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc); 27.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> TBDPS); 27.6 (COCH<sub>3</sub> NAc); 23.8 (COCH<sub>3</sub> NHAc); 21.4-21.0 (5 COCH<sub>3</sub> OAc); 20.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> TBDPS).

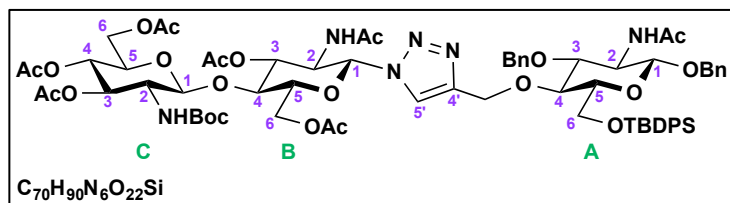
Rf: 0.25 ( $CH_2Cl_2$ /MTBE 8:2).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for  $C_{72}H_{90}F_3N_6O_{23}Si^+$  1491.5773 [M+H<sup>+</sup>]; found 1491.5712.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3200-2800, 1749, 1370, 1225, 1152, 1113, 1070, 1042, 773, 702.

$[\alpha]_D^{20} = -40.00$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3$ ).

**Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-6-O-tert-butylidiphenylsilyl-2-deoxy-4-O-[[1'-([2-(tert-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-β-D-glucopyranoside**  
(105)



To a solution of **(95)** (46.8 mg, 0.069 mmol, 1.0 eq.) and **(102)** (49.5 mg, 0.069 mmol, 1.0 eq.) in  $CH_2Cl_2$  (420  $\mu$ L) were added  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (210  $\mu$ L,

24.6 mg/mL in  $H_2O$ , 21  $\mu$ mol, 0.30 eq.) and sodium ascorbate (210  $\mu$ L, 39.0 mg/mL in  $H_2O$ , 41  $\mu$ mol, 0.60 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h. The mixture was then extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 5 mL). The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$ , filtrated and concentrated to afford product **(105)** (96 mg, 99%) as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3CN$ )  $\delta$ : 7.83-7.72 (m, 4H, CH arom.); 7.75 (s, 1H, H-5'); 7.50-7.25 (m, 16H, CH arom.); 6.43 (d, 1H,  $J_{NH}^{B,B}$  8.8 Hz, NH<sup>B</sup>); 6.41 (d, 1H,  $J_{NH}^{A,A}$  8.7 Hz, NH<sup>A</sup>); 5.96 (d, 1H,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.39 (d, 1H,  $J_{NH}^{C,C}$  9.2 Hz, NH<sup>C</sup>); 5.36-5.29 (m, 1H, H-3<sup>B</sup>); 5.13 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{C,C}$  10.1,  $J_{3,4}^{C,C}$  9.7 Hz, H-3<sup>C</sup>); 4.95 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{C,C}$  9.8,  $J_{3,4}^{C,C}$  9.7 Hz, H-4<sup>C</sup>); 4.91 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.4 Hz, CHHtriaz); 4.83 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHPh-1); 4.82 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.0 Hz, CHHPh-3); 4.77 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.4 Hz, CHHtriaz); 4.65 (d, 1H,  $J_{1,2}^{C,C}$  9.1 Hz, H-1<sup>C</sup>); 4.63 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.0 Hz, CHHPh-3); 4.54 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHPh-1); 4.50-4.41 (m, 2H, H-1<sup>A</sup> and H-6a<sup>B</sup>); 4.45 (ddd, 1H,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0,  $J_{NH}^{B,B}$  8.8,  $J_{2,3}^{B,B}$  7.8 Hz, H-2<sup>B</sup>); 4.32 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{C,C}$  12.4,  $J_{5,6a}^{C,C}$  4.1 Hz, H-6a<sup>C</sup>); 4.18 (brd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{B,B}$  12.4,  $J_{5,6b}^{B,B}$  2.6 Hz, H-6b<sup>B</sup>); 4.06-3.93 (m, 5H, H-6b<sup>C</sup>, H-4<sup>B</sup>, H-5<sup>B</sup> and H-6<sup>A</sup>); 3.80 (ddd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  9.9,  $J_{1,2}^{B,B}$  9.5,  $J_{NH}^{B,B}$  8.7 Hz, H-2<sup>A</sup>); 3.84 (brd, 1H,  $J_{4,5}^{C,C}$  9.7 Hz, H-5<sup>C</sup>); 3.72 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{A,A}$  9.5,  $J_{3,4}^{A,A}$  9.0 Hz, H-4<sup>A</sup>); 3.58 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{A,A}$  9.9,  $J_{3,4}^{A,A}$  9.0 Hz, H-3<sup>A</sup>); 3.47 (ddd, 1H,  $J_{2,3}^{C,C}$  10.1,  $J_{NH}^{C,C}$  9.2,  $J_{1,2}^{C,C}$  9.1 Hz, H-2<sup>C</sup>); 3.36 (brd, 1H,  $J_{4,5}^{A,A}$  9.5 Hz, H-5<sup>A</sup>); 2.04-1.54 (7 s, 21H, 7 Ac); 1.39 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu Boc); 1.07 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu TBDPS).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3CN$ )  $\delta$ : 171.8-170.8 (7 COCH<sub>3</sub> Ac); 156.6 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc); 146.2 (C-4'); 140.4-128.9 (C arom.); 123.4 (C-5'); 102.5 (C-1<sup>C</sup>); 101.6 (C-1<sup>A</sup>); 86.6 (C-1<sup>B</sup>); 83.6 (C-3<sup>A</sup>); 80.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc); 79.6 (C-4<sup>A</sup>); 77.1, 76.9, 76.8 (C-4<sup>B</sup>, C-5<sup>B</sup> and C-5<sup>A</sup>); 76.0 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 74.0 (C-3<sup>B</sup>); 73.9 (C-3<sup>C</sup>); 72.9 (C-5<sup>C</sup>); 71.3 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 69.8 (C-4<sup>C</sup>); 66.7 (CH<sub>2</sub>triaz); 64.2 (C-6<sup>A</sup>); 63.2, 63.1 (C-6<sup>B</sup> and C-6<sup>C</sup>); 57.0 (C-2<sup>C</sup>); 56.4 (C-2<sup>A</sup>); 54.2 (C-2<sup>B</sup>); 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc); 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> TBDPS); 23.9-21.2 (7 COCH<sub>3</sub> Ac); 20.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> TBDPS).

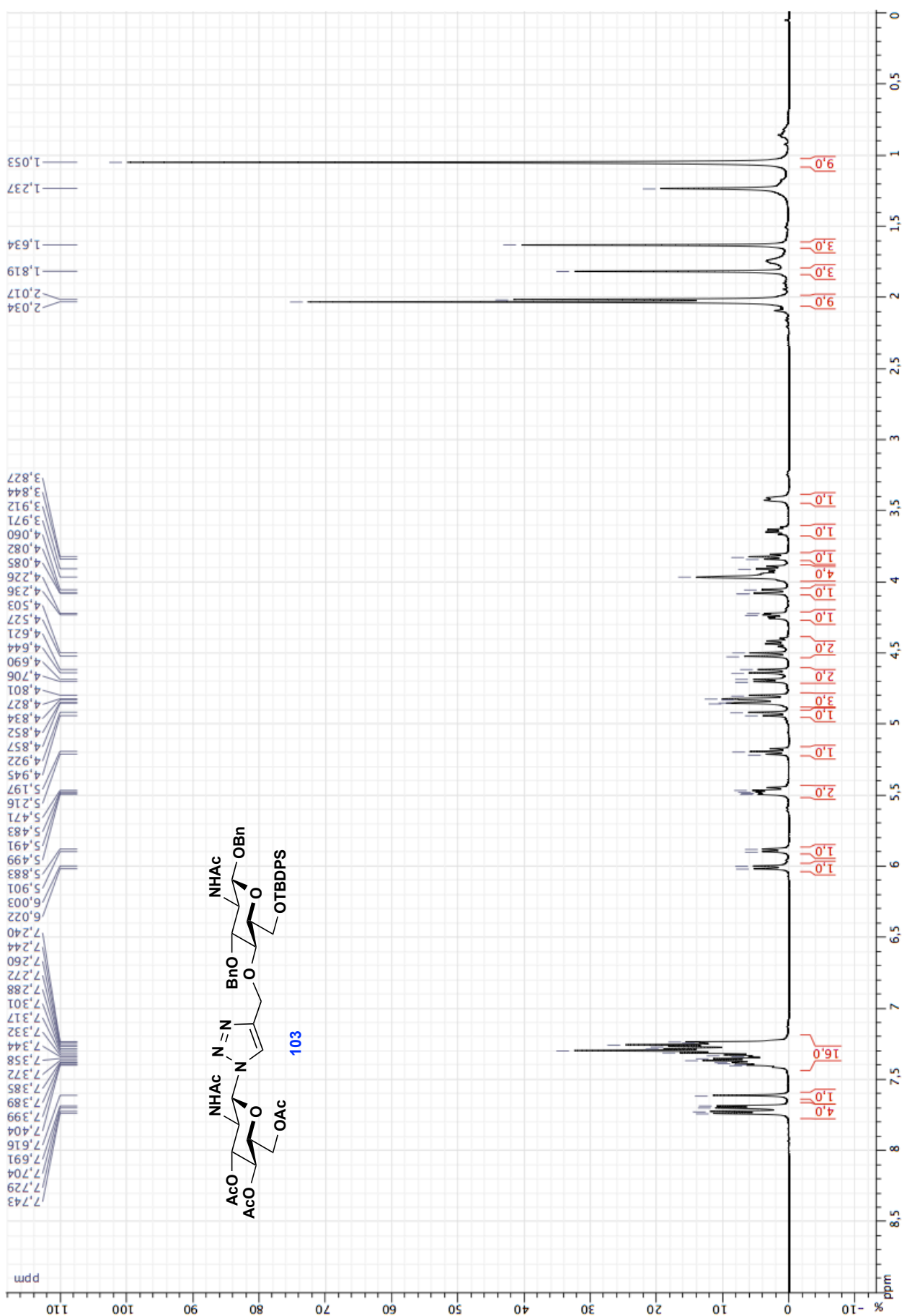
Rf: 0.30 ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  95:5).

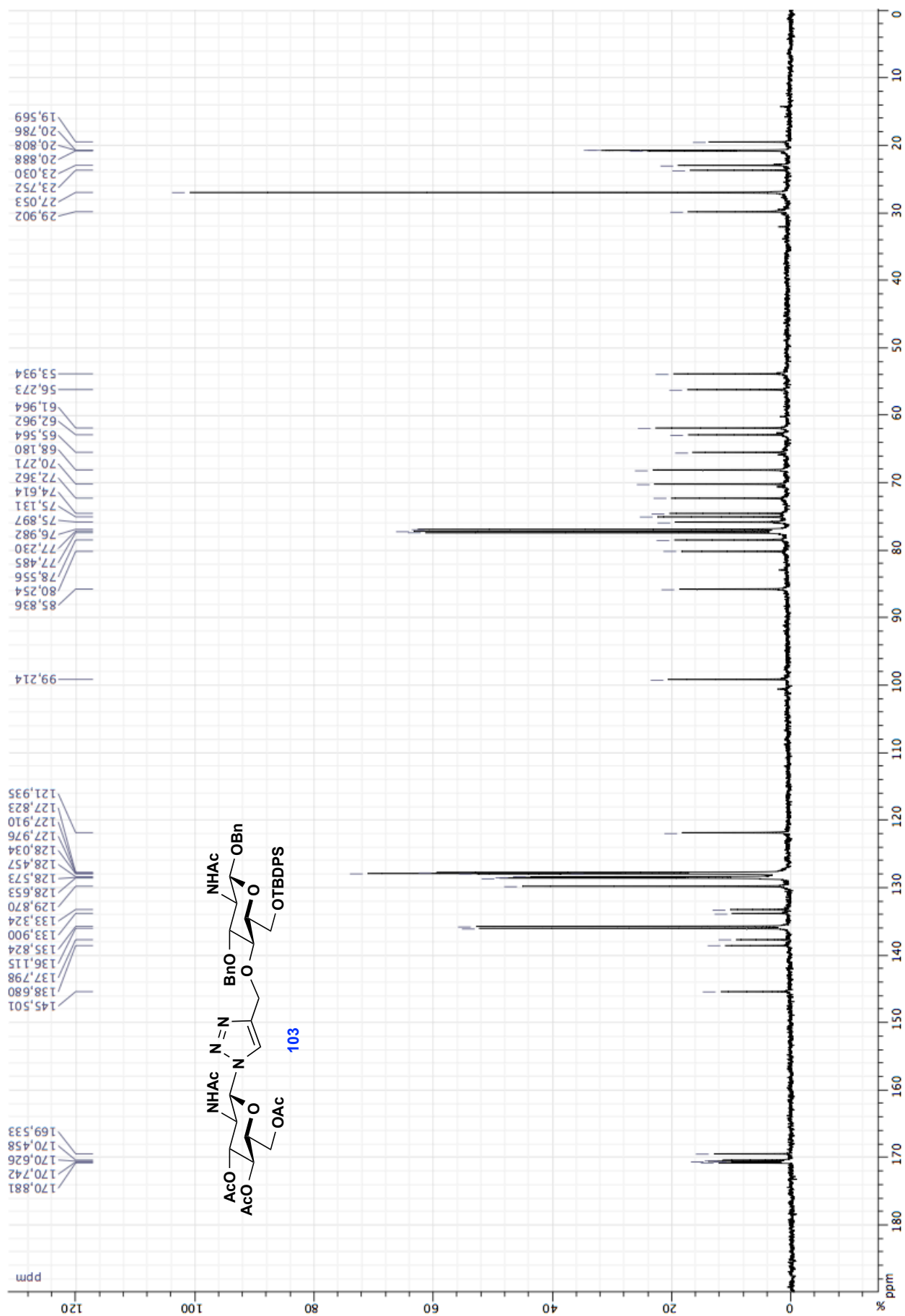
HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for  $C_{70}H_{91}F_3N_6O_{22}Si^+$  1395.5950 [M+H<sup>+</sup>]; found 1395.5951.

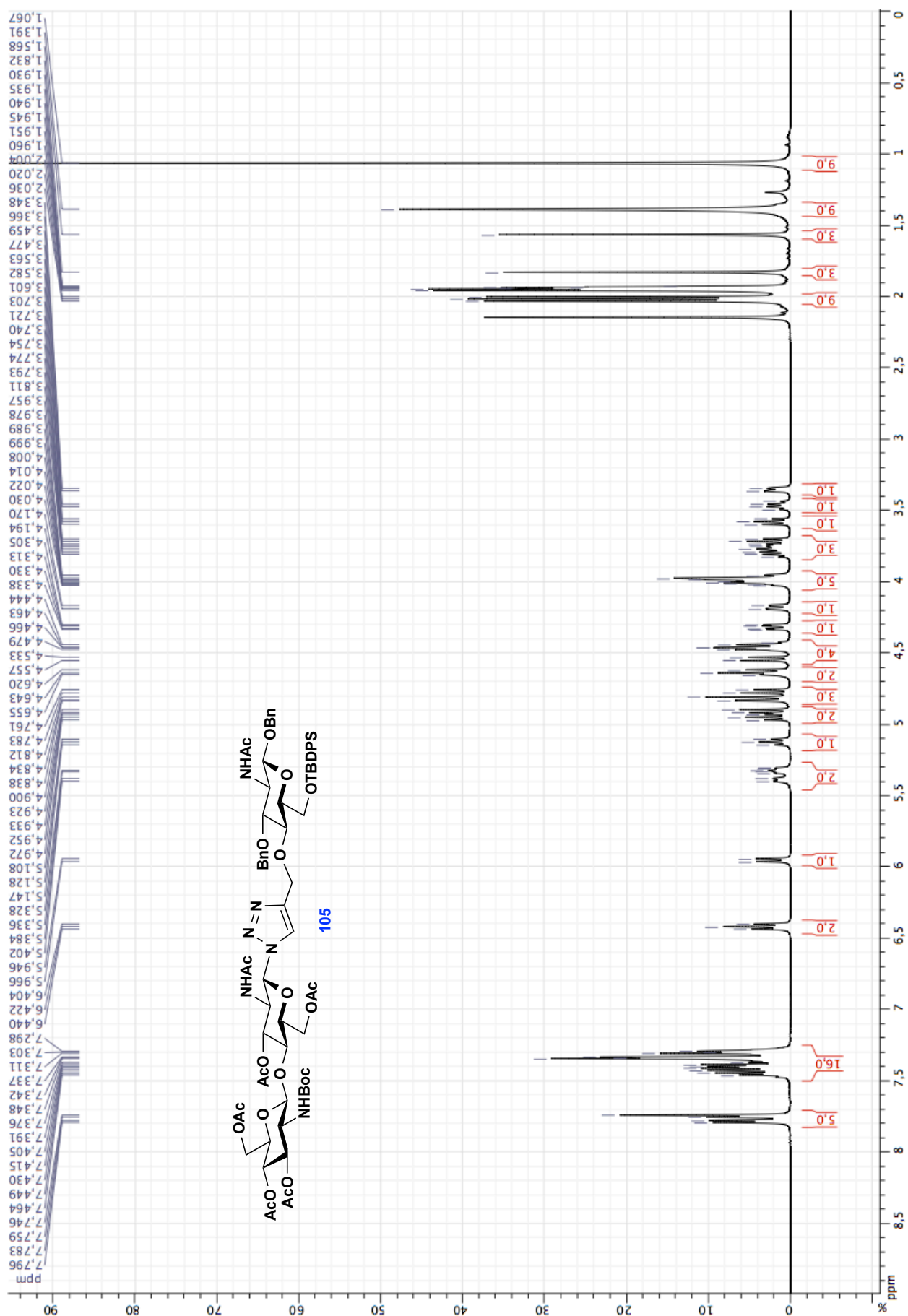
IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3400-2800, 1748, 1526, 1368, 1229, 1113, 1065, 1041, 702.

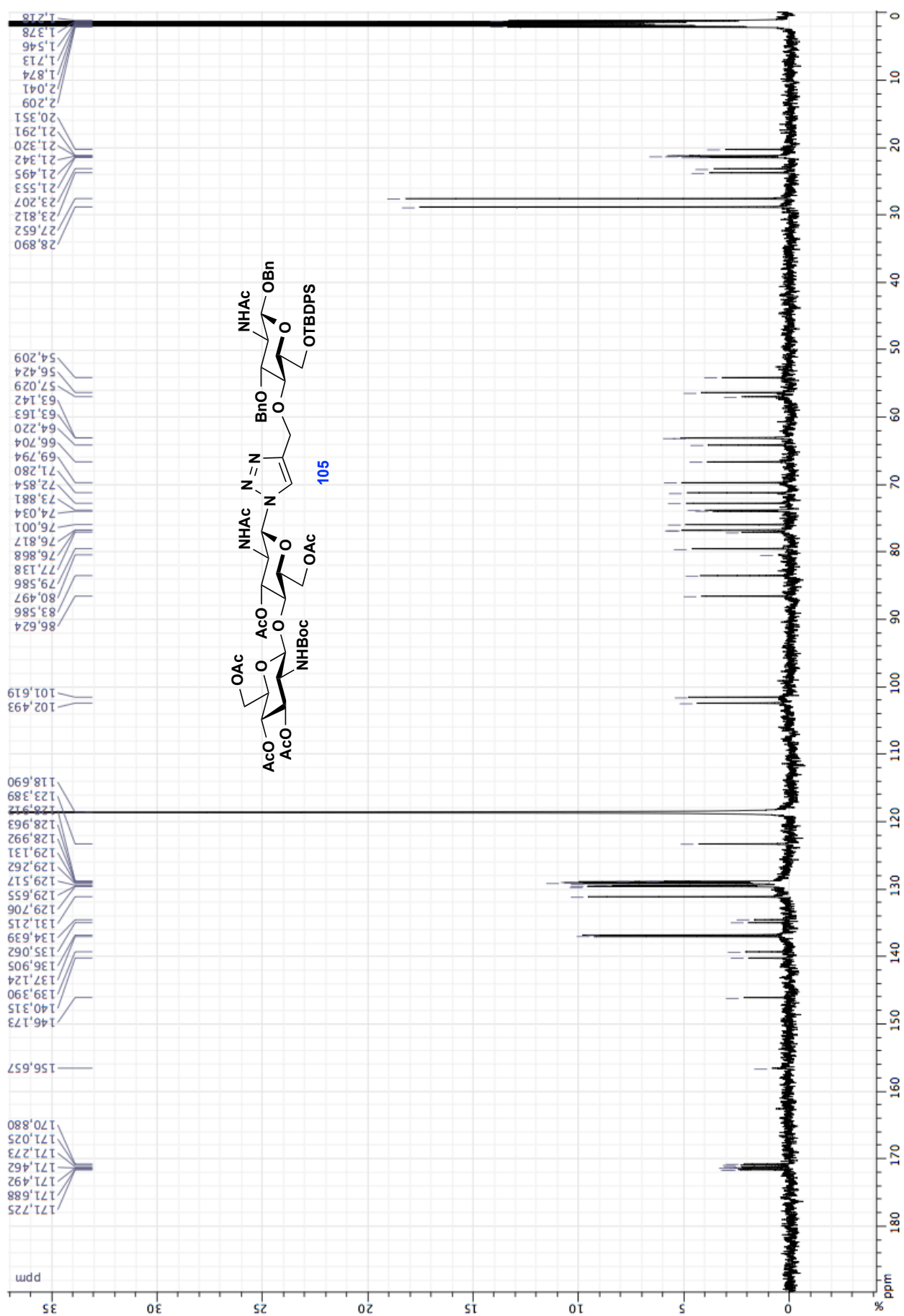
$[\alpha]_D^{20} = -31.20$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3$ ).



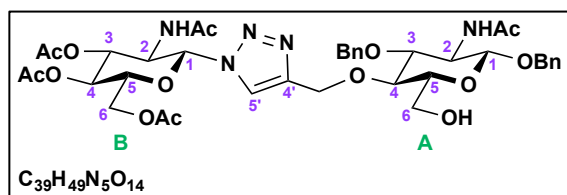








**Benzyl 2-acetamido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-4-*O*-[1'-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1*H*-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside (**106**)**



To (**103**) (93 mg, 0.089 mmol, 1.0 eq.) was added  $NH_4F$  solution (900  $\mu$ L, 0.5 mol/L in  $CH_3OH$ , 0.45 mmol, 5.0 eq.). The reaction mixture was stirred at reflux for 36 h. The mixture was then concentrated

under vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  96:4) to afford product (**106**) (42 mg, 58%) as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3 + \epsilon CD_3OD$ )  $\delta$ : 7.73 (s, 1H, **H-5'**); 7.30-7.15 (m, 10H, CH arom.); 5.87 (d, 1H,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0 Hz, **H-1<sup>B</sup>**); 5.31 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  10.2,  $J_{3,4}^{B,B}$  9.6 Hz, **H-3<sup>B</sup>**); 5.11 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{B,B}$  9.9,  $J_{3,4}^{B,B}$  9.6 Hz, **H-4<sup>B</sup>**); 4.82 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.4 Hz, CHHtriaz); 4.75 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, CHHPh-1); 4.71 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.4 Hz, CHHtriaz); 4.71 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.3 Hz, CHHPh-3); 4.59 (d, 1H,  $J_{1,2}^{A,A}$  7.8 Hz, **H-1<sup>A</sup>**); 4.57 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.3 Hz, CHHPh-3); 4.48 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, CHHPh-1); 4.40 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  10.2,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0 Hz, **H-2<sup>B</sup>**); 4.18 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{B,B}$  12.6,  $J_{5,6a}^{B,B}$  4.7 Hz, **H-6a<sup>B</sup>**); 4.04 (brd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{B,B}$  12.6 Hz, **H-6b<sup>B</sup>**); 3.91 (brdd, 1H,  $J_{4,5}^{B,B}$  9.9,  $J_{5,6a}^{B,B}$  4.7 Hz, **H-5<sup>B</sup>**); 3.78 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{A,A}$  9.2,  $J_{3,4}^{A,A}$  9.2 Hz, **H-3<sup>A</sup>**); 3.69 (brd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{A,A}$  12.0 Hz, **H-6a<sup>A</sup>**); 3.58 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{A,A}$  12.0,  $J_{5,6b}^{A,A}$  3.8 Hz, **H-6b<sup>A</sup>**); 3.57-3.50 (m, 2H, **H-2<sup>A</sup>** and **H-4<sup>A</sup>**); 3.27 (brd, 1H,  $J_{4,5}^{A,A}$  9.4 Hz, **H-5<sup>A</sup>**); 1.99-1.65 (4 s, 15H, 5 Ac).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3 + \epsilon CD_3OD$ )  $\delta$ : 171.6-169.6 (5  $COCH_3$ ); 145.4 (**C-4'**); 138.5-127.8 (**C arom.**); 121.9 (**C-5'**); 99.7 (**C-1<sup>A</sup>**); 86.0 (**C-1<sup>B</sup>**); 81.3 (**C-3<sup>A</sup>**); 78.3 (**C-4<sup>A</sup>**); 75.5 (**C-5<sup>A</sup>**); 75.0 (**C-5<sup>B</sup>**); 74.6 ( $CH_2Ph$ -3); 72.5 (**C-3<sup>B</sup>**); 70.9 ( $CH_2Ph$ -1); 68.2 (**C-4<sup>B</sup>**); 65.2 ( $CH_2triaz$ ); 61.9 (**C-6<sup>B</sup>**); 61.4 (**C-6<sup>A</sup>**); 56.2 (**C-2<sup>A</sup>**); 53.3 (**C-2<sup>B</sup>**); 23.2-20.5 (5  $COCH_3$ ).

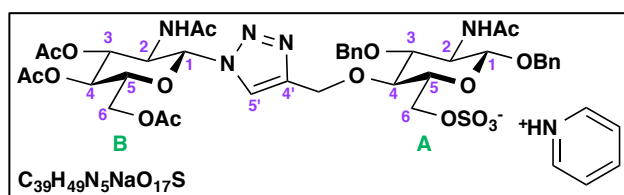
Rf: 0.29 ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  94:6).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for  $C_{39}H_{50}N_5O_{14}^+$  812.3349 [M+H<sup>+</sup>]; found 812.3388.

IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3297, 2920, 1743, 1655, 1539, 1373, 1246, 1229, 1106, 1074, 1048, 698.

$[\alpha]_D^{20} = -54.40$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3/CH_3OH$  1:1).

**Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-2-deoxy-6-O-pyridinium sulfonato-4-O-[[1'-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-β-D-glucopyranoside**  
(107)



To a solution of **(106)** (41.6 mg, 0.051 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (1.0 mL) was added  $SO_3 \cdot pyr$  (41 mg, 0.26 mmol, 5.0 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was

stirred at room temperature for 14h. The mixture was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  92:8 then 88:12) to afford starting material **(106)** (6.4 mg, 15%) and expected product **(107)** (37.9 mg, 76%) as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 8.24 (s, 1H, H-5'); 7.38-7.21 (m, 10H, CH arom.); 6.27 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  9.9 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.61 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  9.9,  $J_{3^B,4^B}$  9.7 Hz, H-3<sup>B</sup>); 5.22 (dd, 1H,  $J_{3^B,4^B}$  9.7,  $J_{4^B,5^B}$  9.6 Hz, H-4<sup>B</sup>); 4.94 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.9 Hz, CHHtriaz); 4.86 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.9 Hz, CHHtriaz); 4.84 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.2 Hz, CHHPh-3); 4.83 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHPh-1); 4.65 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.2 Hz, CHHPh-3); 4.57 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHPh-1); 4.50 (d, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  8.3 Hz, H-1<sup>A</sup>); 4.43 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  9.9,  $J_{1^B,2^B}$  9.9 Hz, H-2<sup>B</sup>); 4.30 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  13.0,  $J_{5^B,6a^B}$  5.2 Hz, H-6a<sup>B</sup>); 4.27 (brd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  10.7 Hz, H-6a<sup>A</sup>); 4.19-4.11 (m, 3H, H-5<sup>B</sup>, H-6b<sup>B</sup> and H-6b<sup>A</sup>); 3.88 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.2,  $J_{1^A,2^A}$  8.3 Hz, H-2<sup>A</sup>); 3.66 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  10.2,  $J_{3^A,4^A}$  7.6 Hz, H-3<sup>A</sup>); 3.63-3.55 (m, 2H, H-4<sup>A</sup> and H-5<sup>A</sup>); 2.05-1.72 (5 s, 15H, 5 Ac).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 174.0-171.2 (5 COCH<sub>3</sub>); 146.5 (C-4'); 140.2-128.7 (C arom.); 124.6 (C-5'); 101.7 (C-1<sup>A</sup>); 86.5 (C-1<sup>B</sup>); 84.0 (C-3<sup>A</sup>); 79.6 (C-4<sup>A</sup>); 76.3 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 76.1 (C-5<sup>B</sup>); 74.9 (C-5<sup>A</sup>); 73.5 (C-3<sup>B</sup>); 71.8 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 69.9 (C-4<sup>B</sup>); 67.9 (C-6<sup>A</sup>); 66.4 (CH<sub>2</sub>triaz); 63.3 (C-6<sup>B</sup>); 56.8 (C-2<sup>A</sup>); 55.5 (C-2<sup>B</sup>); 23.3-20.7 (5 COCH<sub>3</sub>).

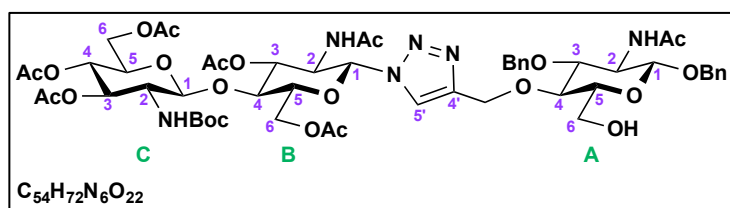
Rf: 0.35 ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  85:15).

HRMS (ESI<sup>-</sup>): calculated for  $C_{39}H_{49}N_5O_{17}S^-$  890.2771 [M-Na<sup>+</sup>]; found 890.2749.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3300, 2921, 1747, 1657, 1558, 1372, 1228, 1113, 1064, 1043, 1028, 700.

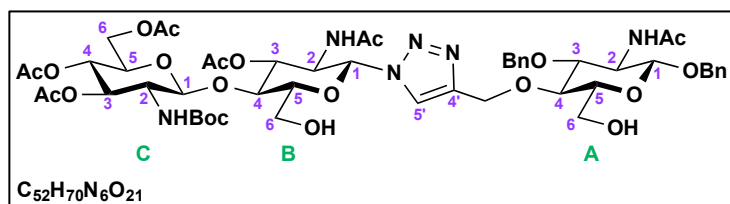
$[\alpha]_D^{20} = -30.90$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3/CH_3OH$  1:1).

**Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-2-deoxy-4-O-[[1'-((2-(tert-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl)-methyl]-β-D-glucopyranoside (108) (Method A)**



and

**Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-2-deoxy-4-O-[[1'-((2-(tert-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acetamido-3-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl)-methyl]-β-D-glucopyranoside (109).**



To a solution of **(105)** (154 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (550 μL) was added tetrabutylammonium fluoride solution (550 μL, 1 mol/L in THF, 0.55 mmol, 5.0 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 36 h. The mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 97:3 then 93:7) to afford product **(108)** (32 mg, 25%) and product **(109)** (56 mg, 45%) as white amorphous solids.

**(108):**

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD + εCDCl<sub>3</sub>) δ: 7.86 (s, 1H, H-5'); 7.36-7.18 (m, 10H, CH arom.); 5.90 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  9.9 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.34 (brdd, 1H,  $J$  8.6,  $J$  8.1 Hz, H-3<sup>B</sup>); 5.23 (dd, 1H,  $J_{2^C,3^C}$  10.0,  $J_{3^C,4^C}$  9.4 Hz, H-3<sup>C</sup>); 4.97 (dd, 1H,  $J_{4^C,5^C}$  9.8,  $J_{3^C,4^C}$  9.4 Hz, H-4<sup>C</sup>); 4.88 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHtriaz); 4.84 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, CHHPh-1); 4.78 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.4 Hz, CHHPh-3); 4.75 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHtriaz); 4.74-4.67 (m, 1H, H-1<sup>C</sup>); 4.64 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.4 Hz, CHHPh-3); 4.57 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, CHHPh-1); 4.53-4.34 (m, 3H, H-6a<sup>B</sup>, H-1<sup>A</sup> and H-2<sup>B</sup>); 4.40 (brd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  12.2 Hz, H-6a<sup>C</sup>); 4.20 (brd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.1 Hz, H-6b<sup>B</sup>); 4.04 (brd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  12.2 Hz, H-6b<sup>C</sup>); 4.00-3.91 (m, 2H, H-4<sup>B</sup> and H-5<sup>A</sup>); 3.83 (dd, 1H,  $J$  9.9,  $J$  8.6 Hz, H-2<sup>A</sup>); 3.78 (brd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.3 Hz, H-6a<sup>A</sup>); 3.80-3.71 (m, 1H, H-5<sup>C</sup>); 3.70-3.61 (m, 2H, H-3<sup>A</sup> and H-6b<sup>A</sup>); 3.57 (dd, 1H,  $J$  9.3,  $J$  8.8 Hz, H-4<sup>A</sup>); 3.44 (dd, 1H,  $J_{2^C,3^C}$  10.0,  $J_{1^C,2^C}$  7.9 Hz, H-2<sup>C</sup>); 3.85-3.26 (m, 1H, H-5<sup>A</sup>); 2.10-1.66 (5 s, 21H, 7 Ac); 1.40 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD + εCDCl<sub>3</sub>) δ: 172.9-170.9 (7 COCH<sub>3</sub>); 157.1 (COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 145.9 (C-4'); 139.5-128.3 (C arom.); 122.9 (C-5'); 102.1 (C-1<sup>C</sup>); 101.0 (C-1<sup>A</sup>); 88.6 (C-1<sup>B</sup>); 83.4 (C-3<sup>A</sup>); 80.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 79.1 (C-4<sup>A</sup>); 76.8, 76.7 (C-4<sup>B</sup> and C-5<sup>B</sup>); 76.5 (C-5<sup>A</sup>); 75.8 (CH<sub>2</sub>Ph-3); 73.9 (C-3<sup>B</sup>); 73.5 (C-3<sup>C</sup>); 72.5 (C-5<sup>C</sup>);

71.4 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 69.5 (C-4<sup>C</sup>); 66.0 (CH<sub>2</sub>triaz); 63.1 (C-6<sup>B</sup>); 62.8 (C-6<sup>C</sup>); 61.9 (C-6<sup>A</sup>); 56.7 (C-2<sup>C</sup>); 56.5 (C-2<sup>A</sup>); 54.2 (C-2<sup>B</sup>); 28.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23.3-20.8 (7 COCH<sub>3</sub>).

Rf: 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 94:6).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>54</sub>H<sub>73</sub>N<sub>6</sub>O<sub>22</sub><sup>+</sup> 1157.4772 [M+H<sup>+</sup>]; found 1157.4789.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3341, 2925, 1746, 1684, 1660, 1230, 1111, 1071, 1037, 698.

$[\alpha]_D^{20} = -35.80$  ( $c = 0.50$ , CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:1).

**(109):**

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD +  $\epsilon$ CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.96 (s, 1H, H-5'); 7.36-7.20 (m, 10H, CH arom.); 5.87 (d, 1H,  $J_{1,2}^{B,B}$  9.8 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.30 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  10.0,  $J_{3,4}^{B,B}$  9.2 Hz, H-3<sup>B</sup>); 5.20 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{C,C}$  9.7,  $J_{3,4}^{C,C}$  9.5 Hz, H-3<sup>C</sup>); 4.97 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{C,C}$  9.7,  $J_{3,4}^{C,C}$  9.5 Hz, H-4<sup>C</sup>); 4.89 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.1 Hz, CHHtriaz); 4.84 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.1 Hz, CHHPh-1); 4.80 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  11.3 Hz, CHHPh-3); 4.75 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.1 Hz, CHHtriaz); 4.72-4.68 (m, 1H, H-1<sup>C</sup>); 4.65 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  11.3 Hz, CHHPh-3); 4.57 (d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  12.1 Hz, CHHPh-1); 4.49 (d, 1H,  $J_{1,2}^{A,A}$  8.3 Hz, H-1<sup>A</sup>); 4.42 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{B,B}$  10.0,  $J_{1,2}^{B,B}$  9.8 Hz, H-2<sup>B</sup>); 4.44-4.38 (m, 1H, H-6a<sup>C</sup>); 4.07 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{B,B}$  9.7,  $J_{3,4}^{B,B}$  9.2 Hz, H-4<sup>B</sup>); 4.04 (brd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{C,C}$  12.3 Hz, H-6b<sup>C</sup>); 3.88-3.79 (m, 3H, H-2<sup>A</sup>, H-6a<sup>B</sup> and H-6b<sup>B</sup>); 3.77 (brd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{A,A}$  12.2 Hz, H-6a<sup>A</sup>); 3.79-3.72 (m, 1H, H-5<sup>C</sup>); 3.71-3.65 (m, 1H, H-5<sup>B</sup>); 3.67 (dd, 1H,  $J_{3,4}^{A,A}$  9.3,  $J_{2,3}^{A,A}$  9.0 Hz, H-3<sup>A</sup>); 3.63 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{A,A}$  12.2,  $J_{5,6b}^{A,A}$  4.8 Hz, H-6b<sup>A</sup>); 3.55 (dd, 1H,  $J_{3,4}^{A,A}$  9.3,  $J_{4,5}^{A,A}$  9.0 Hz, H-4<sup>A</sup>); 3.48 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{C,C}$  9.7,  $J_{1,2}^{C,C}$  8.8 Hz, H-2<sup>C</sup>); 3.32-3.27 (m, 1H, H-5<sup>A</sup>); 2.10-1.68 (4 s, 18H, 6 Ac); 1.42 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD +  $\epsilon$ CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 173.0-170.9 (6 COCH<sub>3</sub>); 145.8 (C-4'); 139.5-128.4 (C arom.); 123.2 (C-5'); 102.3 (C-1<sup>C</sup>); 101.1 (C-1<sup>A</sup>); 87.0 (C-1<sup>B</sup>); 83.6 (C-3<sup>A</sup>); 80.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 79.4 (C-5<sup>B</sup>); 78.9 (C-4<sup>A</sup>); 76.6 (C-5<sup>A</sup>); 75.8 (C-4<sup>B</sup> and CH<sub>2</sub>Ph-3); 74.0 (C-3<sup>B</sup>); 73.8 (C-3<sup>C</sup>); 72.4 (C-5<sup>C</sup>); 71.4 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 69.6 (C-4<sup>C</sup>); 65.9 (CH<sub>2</sub>triaz); 62.9 (C-6<sup>C</sup>); 61.9 (C-6<sup>A</sup>); 60.4 (C-6<sup>B</sup>); 56.6 (C-2<sup>C</sup>); 56.5 (C-2<sup>A</sup>); 54.4 (C-2<sup>B</sup>); 28.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23.2-20.8 (6 COCH<sub>3</sub>).

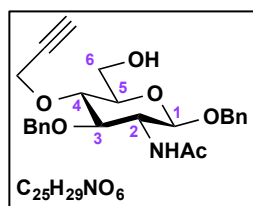
Rf: 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 94:6).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>52</sub>H<sub>71</sub>N<sub>6</sub>O<sub>21</sub><sup>+</sup> 1115.4667 [M+H<sup>+</sup>]; found 1115.4711.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3700-3200, 2926, 1745, 1660, 1535, 1369, 1232, 1162, 1068, 1043, 740, 699.

$[\alpha]_D^{20} = -44.90$  ( $c = 1.00$ , CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 1:1).



**Benzyl 2-acetamido-3-O-benzyl-2-deoxy-4-O-propargyl-β-D-glucopyranoside (110).**

To **(95)** (80 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq.) was added  $NH_4F$  solution (1.2  $\mu L$ , 0.5 mol/L in  $CH_3OH$ , 0.60 mmol, 5.0 eq.). The reaction mixture was stirred at reflux for 4 h. The mixture was then concentrated under vacuum and the residue was recrystallized from  $CH_3OH/Et_2O$  to give part of product **(110)** (39 mg, 74%) as white needles. The filtrate was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  99:1 then 98:2) to afford second part of product **(110)** (12 mg, 92% total yield) as a white amorphous solid.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_3OD + \epsilon CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.37-7.19 (m, 10H, CH arom.); 4.85 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, CHHPh-1); 4.81 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.2 Hz, CHHPh-3); 4.64 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.2 Hz, CHHPh-3); 4.58 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.2 Hz, CHHPh-1); 4.49 (d, 1H,  $J_{1,2}$  8.4 Hz, H-1); 4.38 (dd, 1H,  $^2J_{HCH}$  15.4,  $^4J_{HCCCH}$  2.3 Hz, CHHCCH-4); 4.32 (dd, 1H,  $^2J_{HCH}$  15.4,  $^4J_{HCCCH}$  2.3 Hz, CHHCCH-4); 3.93 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  12.1,  $J_{5,6a}$  2.1 Hz, H-6a); 3.82 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  10.2,  $J_{1,2}$  8.4 Hz, H-2); 3.72 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}$  11.3,  $J_{5,6b}$  4.0 Hz, H-6b); 3.64 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  10.2,  $J_{3,4}$  8.7 Hz, H-3); 3.47 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  9.8,  $J_{3,4}$  8.7 Hz, H-4); 3.31 (ddd, 1H,  $J_{4,5}$  9.8,  $J_{5,6b}$  5.3,  $J_{5,6a}$  2.1 Hz, H-5); 2.72 (t, 1H,  $^4J_{HCCCH}$  2.3 Hz, CHHCCH-4); 1.85 (s, 3H, Ac).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3OD + \epsilon CDCl_3$ )  $\delta$ : 171.9 (COCH<sub>3</sub>); 138.3-127.4 (C arom.); 100.0 (C-1); 82.4 (C-3); 79.5 (CH<sub>2</sub>CCH-4); 77.6 (C-4); 75.5 (C-5); 74.8, 74.7 (CH<sub>2</sub>CCH-4 and CH<sub>2</sub>Ph-3); 70.4 (CH<sub>2</sub>Ph-1); 61.2 (C-6); 59.3 (CH<sub>2</sub>CCH-4); 55.5 (C-2); 22.1 (COCH<sub>3</sub>).

Rf: 0.22 ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  96:4).

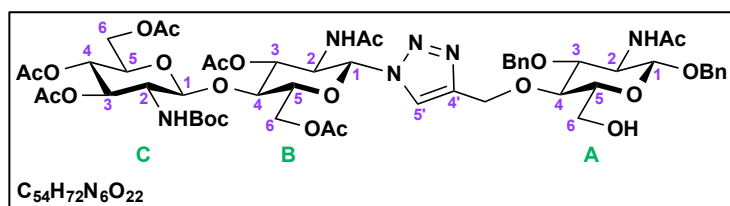
HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for  $C_{25}H_{30}NO_6^+$  440.2068 [M+H<sup>+</sup>]; found 440.2087.

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3290, 1647, 1555, 1374, 1121, 1090, 1027, 742, 730, 696.

$[\alpha]_D^{20} = -7.80$  ( $c = 1.00$ ,  $CHCl_3/CH_3OH$  1:1).

m.p. 212°C ( $CH_3OH/Et_2O$ )

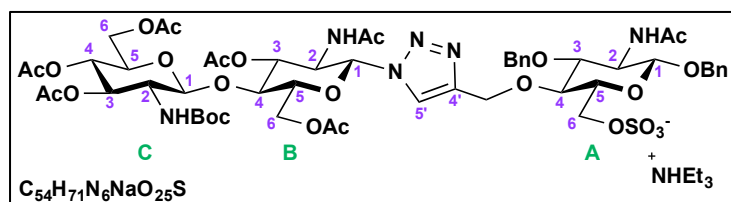
**Benzyl 2-acetamido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-4-*O*-[1'-([2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1*H*-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside (**108**) (Method B)**



To a mixture of (**110**) (40.3 mg, 0.093 mmol, 1.0 eq.) and (**102**) (66.9 mg, 0.093 mmol, 1.0 eq.) in  $t$ BuOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.1 mL, 1:1) were

added CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (280  $\mu$ L, 24.6 mg/mL in H<sub>2</sub>O, 0.028 mmol, 0.30 eq.) and sodium ascorbate (280  $\mu$ L, 39.0 mg/mL in H<sub>2</sub>O, 0.056 mmol, 0.60 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2h. The mixture was then concentrated under vacuum and the residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 96:4 then 95:5) to afford product (**108**) (104.2 mg, 96%) as a white amorphous solid.

**Benzyl 2-acetamido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-6-*O*-sodium sulfonato-4-*O*-[1'-([2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1*H*-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside (**111**)**



To a solution of (**108**) (22.0 mg, 0.019 mmol, 1 eq.) in dry DMF (380  $\mu$ L) was added SO<sub>3</sub>·Et<sub>3</sub>N (17.2 mg, 0.095 mmol, 5 eq.) under argon

atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15h. The mixture was concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95:5 then 90:10) to obtain product (**111**) (22.0 mg, 87%) as a white amorphous solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD +  $\epsilon$ CD<sub>3</sub>CN +  $\epsilon$ D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.15 (s, 1H, H-5'); 7.41-7.28 (m, 10H, CH arom.); 6.11 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  9.7 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.45 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  9.1,  $J_{3^B,4^B}$  8.8 Hz, H-3<sup>B</sup>); 5.20 (dd, 1H,  $J_{2^C,3^C}$  10.4,  $J_{3^C,4^C}$  9.4 Hz, H-3<sup>C</sup>); 4.99 (dd, 1H,  $J_{4^C,5^C}$  10.0,  $J_{3^C,4^C}$  9.4 Hz, H-4<sup>C</sup>); 4.93 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.7 Hz, CHHtriaz); 4.87 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.7 Hz, CHHtriaz); 4.87 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.3 Hz, CHHPh-1); 4.83 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.4 Hz, CHHPh-3); 4.70 (d, 1H,  $J_{1^C,2^C}$  8.3 Hz, H-1<sup>C</sup>); 4.65 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.4 Hz, CHHPh-3); 4.60 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.3 Hz, CHHPh-1); 4.54 (brd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.2 Hz, H-6a<sup>B</sup>); 4.53 (d, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  8.1 Hz, H-1<sup>A</sup>); 4.45 (dd, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  9.7,  $J_{2^B,3^B}$  9.1 Hz, H-2<sup>B</sup>); 4.41 (dd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  12.4,  $J_{5^C,6a^C}$  3.7 Hz, H-6a<sup>C</sup>); 4.26 (brd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  10.8 Hz, H-6a<sup>A</sup>); 4.21 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.2,  $J_{5^B,6b^B}$  4.9 Hz, H-6b<sup>B</sup>); 4.17 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  10.8,  $J_{5^A,6b^A}$  3.1 Hz, H-6b<sup>A</sup>); 4.08 (brd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  12.4 Hz, H-6b<sup>C</sup>); 4.10-4.01 (m, 2H, H-4<sup>B</sup> and H-5<sup>B</sup>); 3.89-3.82 (m, 1H, H-5<sup>C</sup>); 3.85 (dd,

$^1\text{H}$ ,  $J_{2,3}^{\text{A,A}}$  10.0,  $J_{1,2}^{\text{A,A}}$  8.1 Hz, **H-2<sup>A</sup>**); 3.69-3.57 (m, 3H, **H-3<sup>A</sup>**, **H-4<sup>A</sup>** and **H-5<sup>A</sup>**); 3.52 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{\text{C,C}}$  10.4,  $J_{1,2}^{\text{C,C}}$  8.3 Hz, **H-2<sup>C</sup>**); 2.14-1.68 (6 s, 21H, 7 **Ac**); 1.42 (s, 9H, **tBu**).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \varepsilon\text{D}_2\text{O} + \varepsilon\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 173.9-172.0 (7 **COCH<sub>3</sub>**); 146.0 (**C-4'**); 139.7-128.9 (**C arom.**); 124.8 (**C-5'**); 102.6 (**C-1<sup>C</sup>**); 101.7 (**C-1<sup>A</sup>**); 86.3 (**C-1<sup>B</sup>**); 83.5 (**C-3<sup>A</sup>**); 81.2 (**C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**); 79.3 (**C-4<sup>A</sup>**); 77.3, 76.7 (**C-4<sup>B</sup>** and **C-5<sup>B</sup>**); 76.1 (**CH<sub>2</sub>Ph-3**); 74.5 (**C-5<sup>A</sup>**); 74.1 (**C-3<sup>B</sup>** and **C-3<sup>C</sup>**); 72.5 (**C-5<sup>C</sup>**); 72.1 (**CH<sub>2</sub>Ph-1**); 69.8 (**C-4<sup>C</sup>**); 67.5 (**C-6<sup>A</sup>**); 66.2 (**CH<sub>2</sub>triaz**); 63.5 (**C-6<sup>B</sup>**); 63.2 (**C-6<sup>C</sup>**); 56.8 (**C-2<sup>C</sup>**); 56.4 (**C-2<sup>A</sup>**); 54.8 (**C-2<sup>B</sup>**); 28.7 (**C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**); 23.4-20.9 (7 **COCH<sub>3</sub>**).

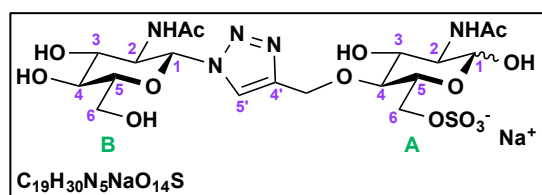
Rf: 0.17 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1).

HRMS (ESI<sup>-</sup>): calculated for  $\text{C}_{54}\text{H}_{71}\text{N}_6\text{O}_{25}\text{S}^-$  1235.4195 [ $\text{M-H}^+$ ]; found 1235.4171.

IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3800-3200, 2927, 1745, 1685, 1660, 1529, 1370, 1232, 1110, 1068, 1045, 699.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24.60$  ( $c = 0.50$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  1:1).

**2-Acetamido-2-deoxy-6-O-sodium sulfonato-4-O-[[1'-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-D-glucopyranose (**113**)**



To a solution of (**107**) (21.5 mg, 0,022 mmol, 1.0 eq.) in  $\text{EtOAc}/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (850  $\mu\text{L}$ , 5:2.5:1) was added Pd/C (10% wt, 32 mg, 0.031 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 23 h

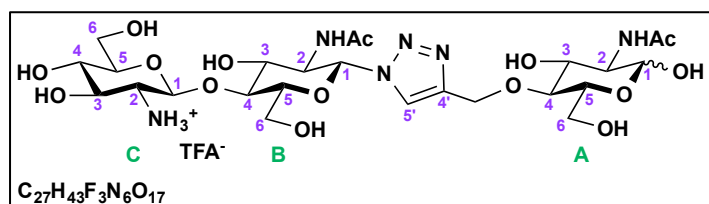
under hydrogen atmosphere. The mixture was then filtered over Celite<sup>®</sup> plug and concentrated to give (**112**) with quantitative yield. A mixture of this residue (**112**) in  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{triethylamine}$  (880  $\mu\text{L}$ , 8:1:1) was stirred at 70°C for 15 h more and concentrated under vacuum. The residue was purified over C18 cartridge (Phenomenex<sup>®</sup> 500 mg,  $\text{H}_2\text{O}$  100%) and the purified fraction was then eluted through ion exchange Dowex<sup>®</sup>  $\text{Na}^+$  resin to obtain product (**113**) (15.6 mg,  $\alpha/\beta$  mixture, quantitative yield) as a white amorphous solid.

Rf: 0.25 ( $\text{EtOAc}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  56:24:20).

HRMS (ESI<sup>-</sup>): calculated for  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{S}^-$  584.1515 [ $\text{M-Na}^+$ ]; found 584.1517.

Unexpected results were obtained by NMR analyses.

**2-Acetamido-2-deoxy-4-O-[[1'-([2-ammoniumyl trifluoroacetate-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-  
(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-D-  
glucopyranose (117)**



A solution of **(109)** (25.3 mg, 0.023 mmol, 1.0 eq.) in  $CH_3OH/H_2O$ /triethylamine (900  $\mu$ L, 8:1:1) was stirred at 70°C for 18 h. The mixture

was then concentrated to give **(114)** with quantitative yield. To a solution of this residue **(114)** in  $EtOAc/H_2O/EtOH$  (900  $\mu$ L, 5:2.5:1.5) was added Pd/C (10% wt, 36 mg, 0.034 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h under hydrogen atmosphere. The mixture was then filtered over Celite® plug and concentrated to give **(116)** with quantitative yield. A mixture of **(116)** in trifluoroacetic acid/ $H_2O$  (920  $\mu$ L, 95:5) was stirred at 0°C for 5 min. The reaction mixture was concentrated and the residue was purified over C18 cartridge (Phenomenex® 500 mg,  $H_2O$  100%) to obtain product **(117)** (21.7 mg,  $\alpha/\beta$  mixture, quantitative yield) as a white amorphous solid.

$\alpha/\beta$  mixture 6:4 ( $D_2O$ )

**$^1H$  NMR (500 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$ : 8.31 (brs, 1H, **H-5'**); 5.93 (d, 1H,  $J_{1',2'}^{B,B}$  9.7 Hz, **H-1<sup>B</sup>**); 5.22 (d, 0.6H,  $J_{1',2'}^{A,A}$  2.1 Hz, **H-1<sup>A</sup> $\alpha$** ); 5.01, 5.00 (2 d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.3 Hz and  $^2J_{HCH}$  12.3 Hz, **CHHtriaz  $\alpha$ & $\beta$** ); 4.98 (d, 1H,  $J_{1',2'}^{C,C}$  8.4 Hz, **H-1<sup>C</sup>**); 4.89, 4.88 (2 d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.3 Hz and  $^2J_{HCH}$  12.3 Hz, **CHHtriaz  $\alpha$ & $\beta$** ); 4.71 (d, 0.4H,  $J_{1',2'}^{A,A}$  7.7 Hz, **H-1<sup>A</sup> $\beta$** ); 4.37 (dd, 1H,  $J_{2',3'}^{B,B}$  10.3,  $J_{1',2'}^{B,B}$  9.7 Hz, **H-2<sup>B</sup>**); 4.16 (dd, 1H,  $J_{4',5'}^{B,B}$  9.9,  $J_{3',4'}^{B,B}$  8.9 Hz, **H-4<sup>B</sup>**); 4.05 (dd, 1H,  $J_{2',3'}^{B,B}$  10.3,  $J_{3',4'}^{B,B}$  8.9 Hz, **H-3<sup>B</sup>**); 4.02-3.97 (m, 1H, **H-5<sup>B</sup>**); 3.99 (dd, 1H,  $^2J_{6a',6b'}^{C,C}$  12.3,  $J_{5',6a'}^{C,C}$  1.7 Hz, **H-6a<sup>C</sup>**); 3.97 (dd, 1H,  $^2J_{6a',6b'}^{B,B}$  12.7,  $J_{5',6a'}^{B,B}$  1.7 Hz, **H-6a<sup>B</sup>**); 3.94-3.91 (m, 1.2H, **H-2<sup>A</sup> $\alpha$**  and **H-3<sup>A</sup> $\alpha$** ); 3.90-3.86 (m, 0.6H, **H-5<sup>A</sup> $\alpha$** ); 3.87 (dd, 1H,  $^2J_{6a',6b'}^{B,B}$  12.7,  $J_{5',6b'}^{B,B}$  4.6 Hz, **H-6b<sup>B</sup>**); 3.84 (dd, 0.4H,  $^2J_{6a',6b'}^{A,A}$  12.2,  $J_{5',6a'}^{A,A}$  1.9 Hz, **H-6a<sup>A</sup> $\beta$** ); 3.82 (dd, 1H,  $^2J_{6a',6b'}^{C,C}$  12.3,  $J_{5',6b'}^{C,C}$  5.4 Hz, **H-6b<sup>C</sup>**); 3.79 (dd, 0.6H,  $^2J_{6a',6b'}^{A,A}$  12.3,  $J_{5',6a'}^{A,A}$  2.1 Hz, **H-6a<sup>A</sup> $\alpha$** ); 3.75 (dd, 1H,  $J_{2',3'}^{C,C}$  10.6,  $J_{3',4'}^{C,C}$  9.1 Hz, **H-3<sup>C</sup>**); 3.75-3.67 (m, 0.8H, **H-2<sup>A</sup> $\beta$**  and **H-3<sup>A</sup> $\beta$** ); 3.72 (dd, 0.6H,  $^2J_{6a',6b'}^{A,A}$  12.3,  $J_{5',6b'}^{A,A}$  4.8 Hz, **H-6b<sup>A</sup> $\alpha$** ); 3.68 (dd, 0.4H,  $^2J_{6a',6b'}^{A,A}$  12.2,  $J_{5',6b'}^{A,A}$  5.1 Hz, **H-6b<sup>A</sup> $\beta$** ); 3.61 (ddd, 1H,  $J_{4',5'}^{C,C}$  9.7,  $J_{5',6b'}^{C,C}$  5.4,  $J_{5',6a'}^{C,C}$  1.7 Hz, **H-5<sup>C</sup>**); 3.59-3.53 (m, 0.6H, **H-4<sup>A</sup> $\alpha$** ); 3.55 (dd, 1H,  $J_{4',5'}^{C,C}$  9.7,  $J_{3',4'}^{C,C}$  9.1 Hz, **H-4<sup>C</sup>**); 3.54 (dd, 0.4H,  $J_{4',5'}^{A,A}$  9.8,  $J_{3',4'}^{A,A}$  8.4 Hz, **H-4<sup>A</sup> $\beta$** ); 3.49 (ddd, 0.4H,  $J_{4',5'}^{A,A}$  9.8,  $J_{5',6b'}^{A,A}$  5.1,  $J_{5',6a'}^{A,A}$  1.9 Hz, **H-5<sup>A</sup> $\beta$** ); 3.22 (dd, 1H,  $J_{2',3'}^{C,C}$  10.6,  $J_{1',2'}^{C,C}$  8.4 Hz, **H-2<sup>C</sup>**); 2.08, 1.86 (2 s, 6H, 2 **Ac**).

**$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$ : 175.5, 175.2, 174.7 (2 **COCH<sub>3</sub>  $\alpha$ , $\alpha$ , $\beta$ , $\beta$** ); 163.6 (q,  $^2J_{C,F}$  35.4 Hz, **COCF<sub>3</sub>**); 144.7, 144.9 (**C-4' $\alpha$ & $\beta$** ); 124.6 (**C-5'**); 116.9 (q,  $^1J_{C,F}$  290 Hz, **COCF<sub>3</sub>**); 98.1 (**C-1<sup>C</sup>**); 95.5 (**C-1<sup>A</sup> $\beta$** ); 91.3 (**C-1<sup>A</sup> $\alpha$** ); 86.7 (**C-1<sup>B</sup>**); 78.6 (**C-4<sup>A</sup> $\alpha$** ); 78.3 (**C-4<sup>A</sup> $\beta$** ); 78.0 (**C-5<sup>B</sup>**); 77.1 (**C-5<sup>C</sup>**); 76.5 (**C-4<sup>B</sup>**); 75.5 (**C-5<sup>A</sup> $\beta$** ); 74.6 (**C-3<sup>A</sup> $\beta$** ); 72.5 (**C-3<sup>C</sup>**); 72.2 (**C-3<sup>B</sup>**); 71.4 (**C-3<sup>A</sup> $\alpha$** ); 71.1 (**C-5<sup>A</sup> $\alpha$** ); 70.2 (**C-4<sup>C</sup>**); 65.2, 65.1 (**CH<sub>2</sub>triaz  $\alpha$ & $\beta$** ); 61.1,

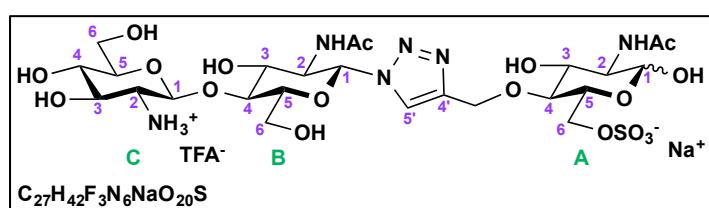
61.0, 60.9, 60.8 (C-6<sup>A</sup><sub>α&β</sub>, C-6<sup>B</sup> and C-6<sup>C</sup>); 57.4 (C-2<sup>A</sup><sub>β</sub>); 56.4 (C-2<sup>C</sup>); 55.9 (C-2<sup>B</sup>); 54.8 (C-2<sup>A</sup><sub>α</sub>); 22.8, 22.5, 22.3 (2 COCH<sub>3</sub> A<sub>α,β</sub>, B).

Rf: 0.21 (EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O 4:4:2).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>15</sub><sup>+</sup> 689.2600 [M-TFA+Na<sup>+</sup>]; found 689.2596.

IR: ν (cm<sup>-1</sup>) = 3600-3000, 2933, 1675, 1646, 1554, 1375, 1203, 1127, 1070, 1039, 838, 801.

**2-Acetamido-2-deoxy-6-O-sodium sulfonato-4-O-[[1'-([2-ammoniumyl trifluoroacetate-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-D-glucopyranose (119)**



A solution of **(111)** (7.3 mg, 0.055 mmol, 1.0 eq.) in CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O/triethylamine (300 μL, 8:1:1) was stirred at 70°C for 21 h. The

mixture was then concentrated and the residue was eluted through ion exchange Dowex® Na<sup>+</sup> resin to give **(115)** with quantitative yield. A mixture of **(115)** in trifluoroacetic acid/H<sub>2</sub>O (250 μL, 85:15) was stirred at 0°C for 10 min. The reaction mixture was concentrated to obtain **(118)** with quantitative yield. To a solution of this residue **(118)** in EtOAc/H<sub>2</sub>O/EtOH (270 μL, 5.5:3:1.5) was added Pd/C (10% wt, 9 mg, 8.3 μmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h under hydrogen atmosphere. The mixture was then filtered over Celite® plug and concentrated. The residue was purified over C18 cartridge (Phenomenex® 200 mg, H<sub>2</sub>O 100%) to obtain product **(119)** (6.0 mg, α/β mixture, quantitative yield) as a white amorphous solid.

α/β mixture 6:4 (D<sub>2</sub>O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 8.32 (brs, 1H, H-5'); 5.93 (d, 1H, J<sub>1,2</sub><sup>B</sup> 9.8 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.23 (d, 0.6H, J<sub>1,2</sub><sup>A</sup> 2.1 Hz, H-1<sup>A</sup><sub>α</sub>); 5.04, 5.03 (2 d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HCH</sub> 12.0 Hz and <sup>2</sup>J<sub>HCH</sub> 12.0 Hz, CHHtriaz α&β); 4.93, 4.92 (2 d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HCH</sub> 12.0 Hz and <sup>2</sup>J<sub>HCH</sub> 12.0 Hz, CHHtriaz α&β); 4.75 (d, 0.4H, J<sub>1,2</sub><sup>A</sup> 8.4 Hz, H-1<sup>A</sup><sub>β</sub>); 4.61 (d, 1H, J<sub>1,2</sub><sup>C</sup> 8.2 Hz, H-1<sup>C</sup>); 4.34 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub><sup>B</sup> 9.8, J<sub>2,3</sub><sup>B</sup> 9.7 Hz, H-2<sup>B</sup>); 4.29 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub><sup>A</sup> 11.2, J<sub>5,6a</sub><sup>A</sup> 3.3 Hz, H-6a<sup>A</sup><sub>α&β</sub>); 4.26-4.21 (m, 0.4H, H-6b<sup>A</sup><sub>β</sub>); 4.23 (dd, 0.6H, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub><sup>A</sup> 11.2, J<sub>5,6b</sub><sup>A</sup> 1.9 Hz, H-6b<sup>A</sup><sub>α</sub>); 4.09 (ddd, 0.6H, J<sub>4,5</sub><sup>A</sup> 9.9, J<sub>5,6a</sub><sup>A</sup> 3.3, J<sub>5,6b</sub><sup>A</sup> 1.9 Hz, H-5<sup>A</sup><sub>α</sub>); 4.08-3.88 (m, 7.2H, H-4<sup>B</sup>, H-3<sup>B</sup>, H-6a<sup>B</sup>, H-6a<sup>C</sup>, H-2<sup>A</sup><sub>α</sub>, H-5<sup>B</sup>, H-6b<sup>B</sup> and H-3<sup>A</sup><sub>α</sub>); 3.80 (dd, 1H, <sup>2</sup>J<sub>6a,6b</sub><sup>C</sup> 12.5, J<sub>5,6b</sub><sup>C</sup> 5.7 Hz, H-6b<sup>C</sup>); 3.80-3.68 (m, 1.2H, H-2<sup>A</sup><sub>β</sub>, H-3<sup>A</sup><sub>β</sub>, H-5<sup>A</sup><sub>β</sub>); 3.63 (dd, 0.6H, J<sub>4,5</sub><sup>A</sup> 9.9, J<sub>3,4</sub><sup>A</sup> 8.7 Hz, H-4<sup>A</sup><sub>α</sub>); 3.62 (dd, 0.4H, J 9.5, J 7.7 Hz, H-4<sup>A</sup><sub>β</sub>); 3.57 (ddd, 1H, J<sub>4,5</sub><sup>C</sup> 9.4, J<sub>5,6b</sub><sup>C</sup> 5.7, J<sub>5,6a</sub><sup>C</sup> 2.2 Hz, H-5<sup>C</sup>); 3.51-3.42 (m, 2H, H-3<sup>C</sup>, H-4<sup>C</sup>); 3.77 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub><sup>C</sup> 9.2, J<sub>1,2</sub><sup>C</sup> 8.2 Hz, H-2<sup>C</sup>); 2.08, 1.86 (2 s, 6H, 2 Ac).

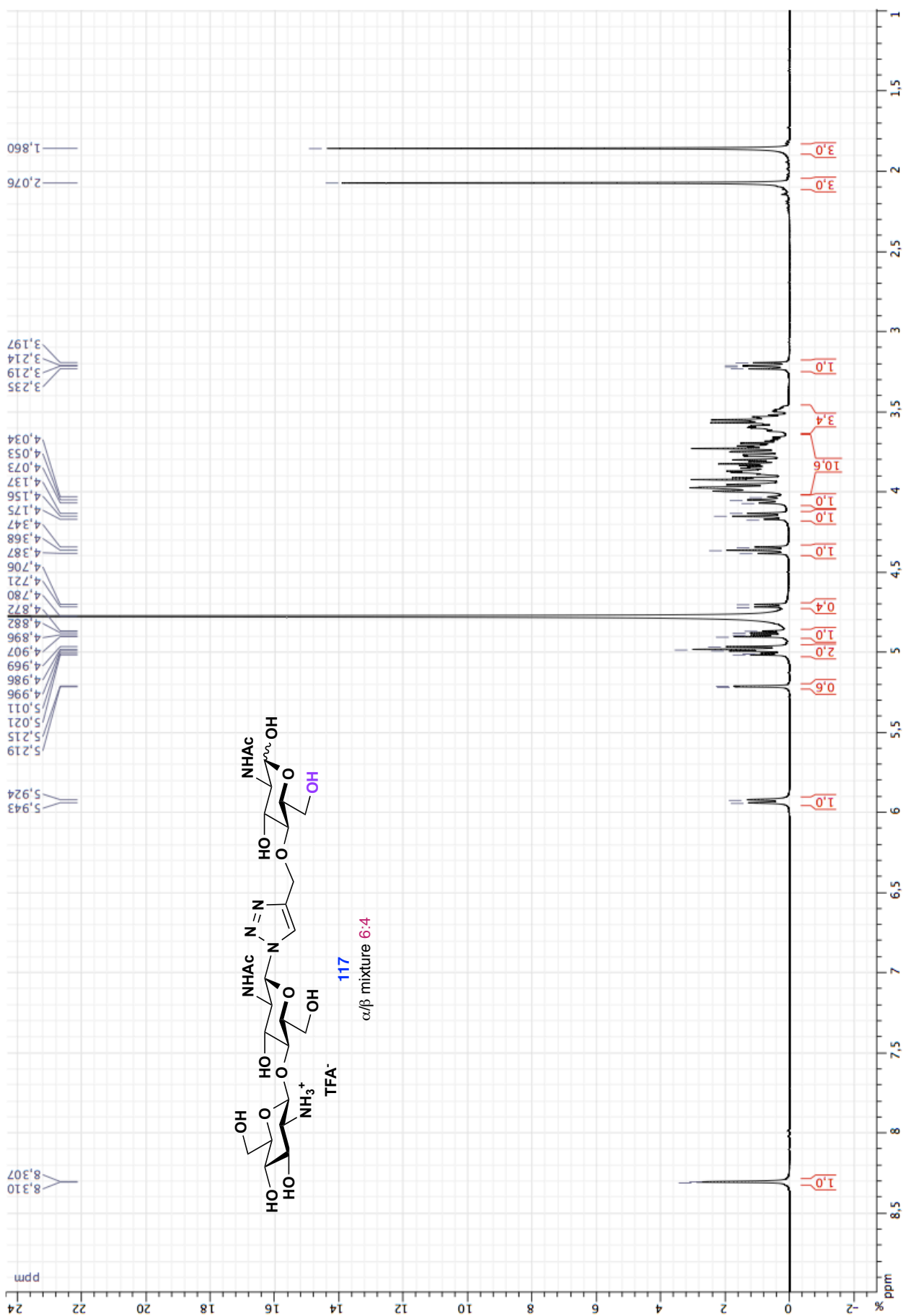
**$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )**  $\delta$ : 174.8, 174.5, 174.2 (2  $\text{COCH}_3$   $\text{A}\alpha, \text{A}\beta, \text{B}$ ); 144.0 (**C-4'**); 124.2 (**C-5'**); 102.5 (**C-1<sup>C</sup>**); 95.1 (**C-1<sup>A</sup> $\beta$** ); 90.9 (**C-1<sup>A</sup> $\alpha$** ); 86.1 (**C-1<sup>B</sup>**); 77.9 (**C-4<sup>A</sup> $\alpha$** ); 77.7 (**C-5<sup>B</sup>**); 77.6 (**C-4<sup>A</sup> $\beta$** ); 77.4 (**C-4<sup>B</sup>**); 76.3 (**C-5<sup>C</sup>**); 75.5 (**C-3<sup>C</sup>**); 73.9 (**C-3<sup>A</sup> $\beta$** ); 72.7 (**C-5<sup>A</sup> $\beta$** ); 72.0 (**C-3<sup>B</sup>**); 70.8 (**C-3<sup>A</sup> $\alpha$** ); 69.6 (**C-4<sup>C</sup>**); 68.5 (**C-5<sup>A</sup> $\alpha$** ); 66.8 (**C-6<sup>A</sup> $\alpha$** ); 66.7 (**C-6<sup>A</sup> $\beta$** ); 64.9, 64.8 ( $\text{CH}_2$ triaz  $\alpha\&\beta$ ); 60.7 (**C-6<sup>C</sup>**); 60.0 (**C-6<sup>B</sup>**); 56.7 (**C-2<sup>A</sup> $\beta$**  and **C-2<sup>C</sup>**); 55.2 (**C-2<sup>B</sup>**); 54.1 (**C-2<sup>A</sup> $\alpha$** ); 22.2, 21.9, 21.7 (2  $\text{COCH}_3$   $\text{A}\alpha, \text{A}\beta, \text{B}$ ).

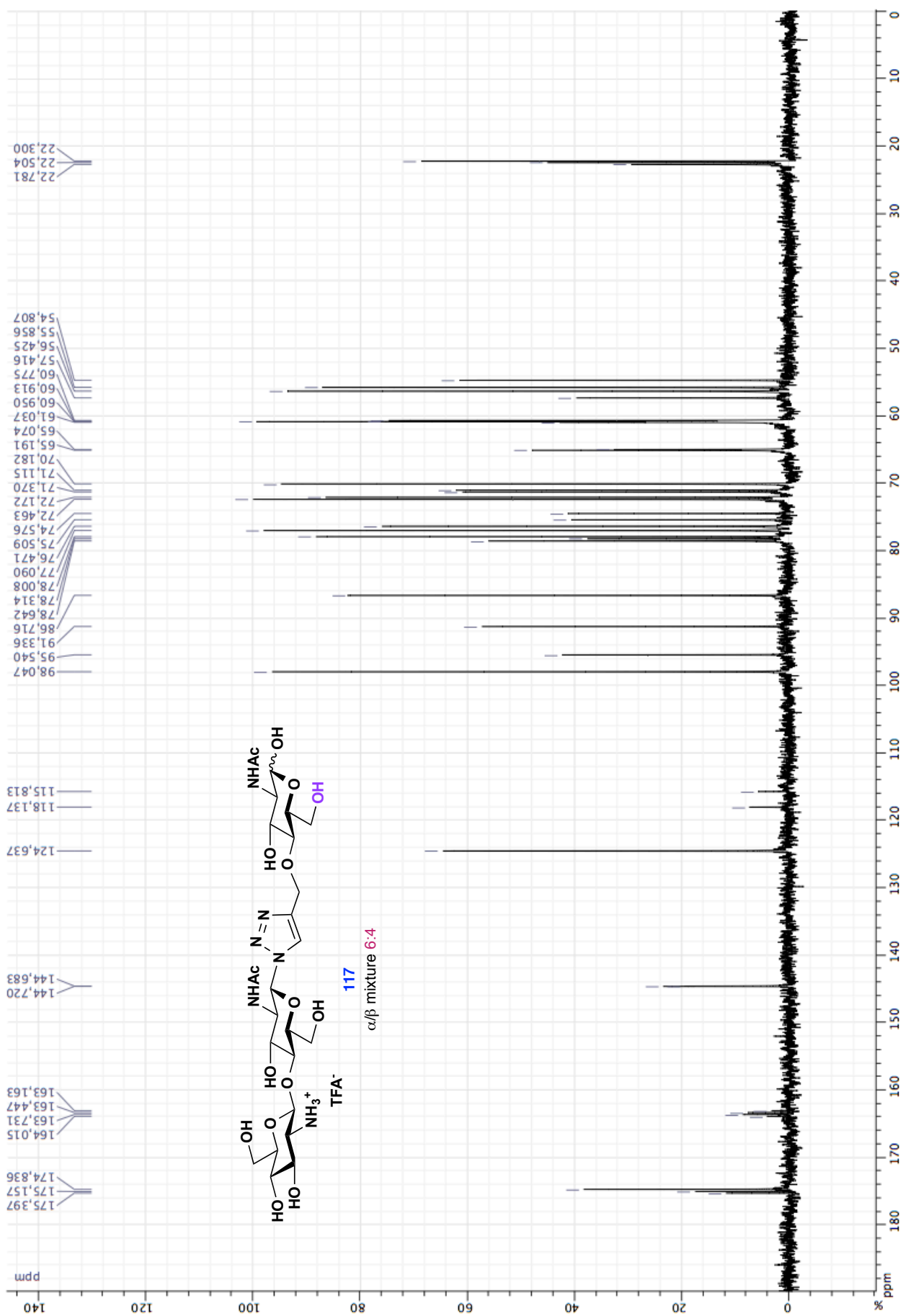
**Rf**: 0.25 (EtOAc/EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  5:3:2).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>)**: calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{S}^-$  745.2204 [ $\text{M-TFA-Na}^+$ ]; found 745.2195.

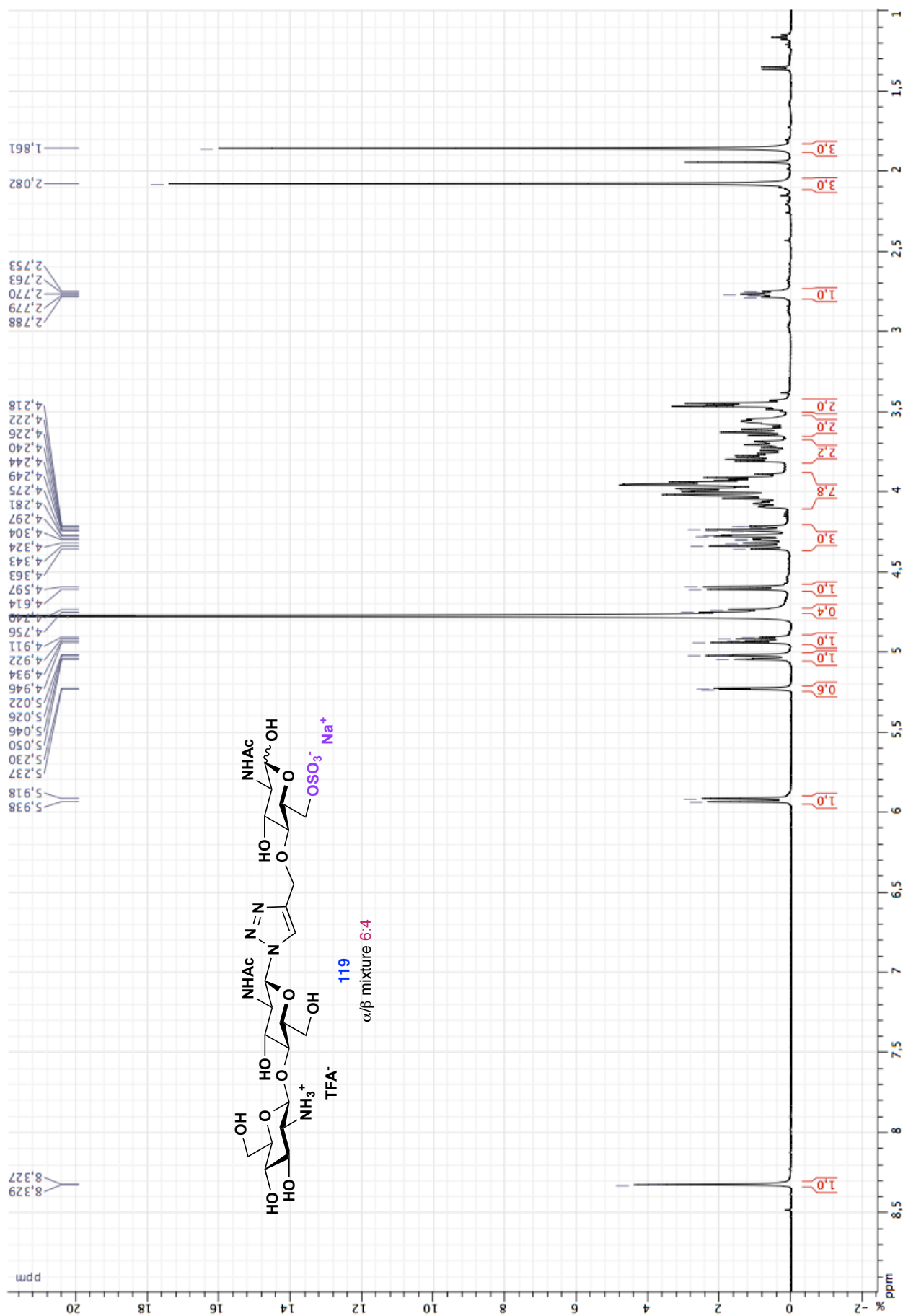
**HRMS (ESI<sup>+</sup>)**: calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{S}^+$  747.2349 [ $\text{M-TFA}^- \text{-Na}^+ \text{+H}^+$ ]; found 747.2360.

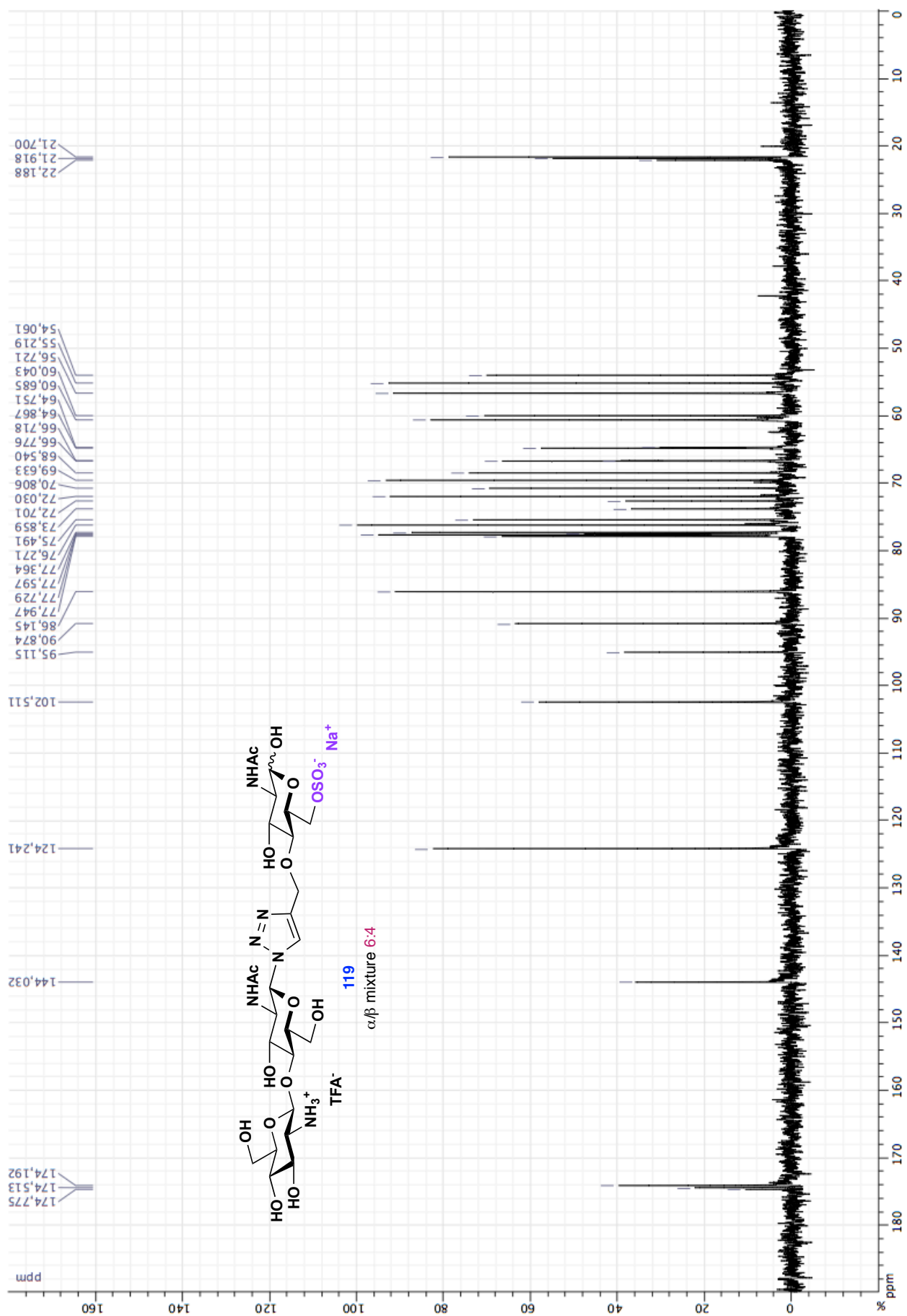
**IR**:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3600-3000, 2934, 1644, 1555, 1375, 1227, 1065, 1051, 1012, 824.





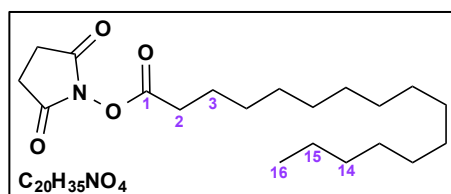






## D. Lipo-chitooligosaccharide analogs

### 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl palmitate<sup>226</sup> (**120**)



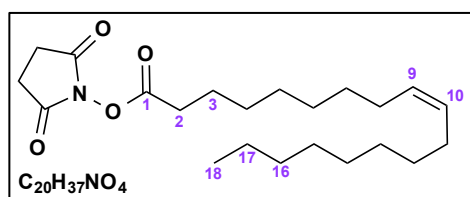
Three solutions of palmitic acid (100 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.), *N*-hydroxysuccinimide (63 mg, 0.55 mmol, 1.4 eq.) and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (129 mg, 0.62 mmol, 1.6 eq.) were prepared in dry THF (respectively 600  $\mu$ L, 900  $\mu$ L and 700  $\mu$ L) under argon atmosphere. Solutions were mixed and stirred at room temperature for 2 days. The mixture was then filtered and concentrated. The residue was resuspended in EtOAc and left a night at 4°C. The precipitate was filtered again and the filtrate was concentrated. The crude residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 100:0 to 96:4) to afford product (**120**) (113 mg, 82%) as a white amorphous solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.81 (brs, 4H, 2 CH<sub>2</sub>succi); 2.58 (t, 2H, *J*<sub>2,3</sub> 7.5 Hz, **H-2**); 1.72 (tt, 2H, *J*<sub>2,3</sub> 7.5, *J*<sub>3,4</sub> 7.5 Hz, **H-3**); 1.38 (brtt, 2H, *J*<sub>3,4</sub> 7.5, *J*<sub>4,5</sub> 7.5 Hz, **H-4**); 1.33-1.19 (m, 22H, **H-5** to **H-15**); 0.86 (t, 3H, *J*<sub>15,16</sub> 6.8 Hz, **H-16**).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 169.4, 168.9 (C=O<sub>succi</sub> and **C-1**); 32.2 (**C-14**); 31.2 (**C-2**); 30.0-29.0 (**C-4** to **C-13**); 25.8 (CH<sub>2</sub>succi); 24.8 (**C-3**); 22.9 (**C-15**); 14.3 (**C-16**).

(Analyses in accordance with litt.<sup>201</sup>)

### 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl oleate<sup>202</sup> (**121**)



To a mixture of oleic acid (112  $\mu$ L, 0.35 mmol, 1.0 eq.), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (80 mg, 0.39 mmol, 1.1 eq.) and 4-pyrrolidinopyridine (5 mg, 0.035 mmol, 0.1 eq.) in dry THF (1.0 mL) was added, at 0°C, under argon atmosphere, a solution of *N*-hydroxysuccinimide (81 mg, 0.71 mmol, 2.0 eq.) in dry THF (0.4 mL). The reaction mixture was stirred at 0°C for 2 h and then at room temperature for 2 days. The mixture was then filtered and concentrated. The residue was resuspended in EtOAc and left a night at 4°C. The precipitate was filtered again and the filtrate was concentrated. The crude residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 100:0 to 98:2) to afford product (**121**) (108 mg, 81%) as a colorless gel.

<sup>226</sup> Higushi, K. ; Yamashina, T. ; Ishikawa, K. ; Hirata, H., *Yukagaku*, **1987**, 36, 16-20.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 5.37-5.27 (m, 2H, **H-9** and **H-10**); 2.81 (brs, 4H, 2 CH<sub>2</sub>succi); 2.58 (t, 2H, *J*<sub>2,3</sub> 7.5 Hz, **H-2**); 2.03-1.95 (m, 4H, **H-8** and **H-11**); 1.72 (tt, 2H, *J*<sub>2,3</sub> 7.5, *J*<sub>3,4</sub> 7.5 Hz, **H-3**); 1.43-1.35 (m, 2H, **H-4**); 1.35-1.20 (m, 18H, **H-5** to **H-7** and **H-12** to **H-17**); 0.86 (t, 3H, *J*<sub>17,18</sub> 6.9 Hz, **H-18**).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 169.3, 168.9 (C=Osucci and **C-1**); 130.3, 129.9 (**C-9** and **C-10**); 32.1 (**C-16**); 31.2 (**C-2**); 30.0-29.0 (**C-4** to **C-7** and **C-12** to **C-15**); 27.5, 27.4 (**C-8** and **C-11**); 25.8 (CH<sub>2</sub>succi); 24.8 (**C-3**); 22.9 (**C-17**); 14.3 (**C-18**).

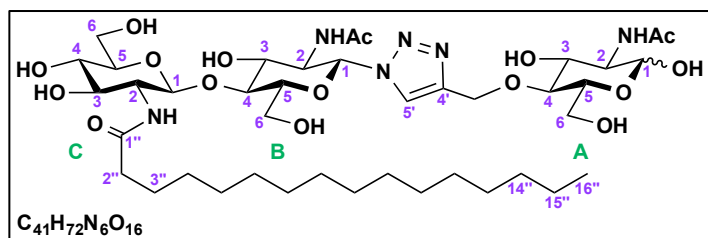
**Rf:** 0.89 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 9:1).

(Analyses in accordance with litt.<sup>202</sup>)

### **General procedure for carbon chain acylation**

To a solution of **(117)** or **(119)** (1.0 eq.) in dry DMSO (40-50 mM) were added triethylamine (1.8 eq.) and then **(120)** or **(121)** (1.2 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 60°C overnight in a sealed tube. The mixture was then concentrated and lyophilized. The lyophilized residue was resuspended in EtOAc/CH<sub>3</sub>OH (150 mM, 9:1), triturated for 10 min, centrifuged (7000 rpm, 10 min) and the supernatant was removed. This operation was repeated four times and the residue was lyophilized to afford final analog.

**2-Acetamido-2-deoxy-4-O-[[1'-([2-palmitamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-D-glucopyranose (**122**)**



General procedure with (**117**) (9.3 mg, 0.012 mmol) and (**120**) (5.0 mg, 0.014 mmol) give product (**122**) (11.0 mg,  $\alpha/\beta$  mixture, quantitative yield) as a white lyophilisate.

$\alpha/\beta$  mixture 8:2 (DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )  $\delta$ : 8.09, 8.08 (2 s, 1H, H-5' $\alpha\&\beta$ ); 5.73 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  10.0 Hz, H-1 $^B$ ); 4.90 (d, 0.8H,  $J_{1^A,2^A}$  2.0 Hz, H-1 $^A\alpha$ ); 4.87, 4.85 (2 d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.9 Hz and  $^2J_{HCH}$  11.9 Hz, CHHtriaz  $\alpha\&\beta$ ); 4.63 (d, 1H,  $^2J_{HCH}$  11.9 Hz, CHHtriaz  $\alpha\&\beta$ ); 4.43 (d, 0.2H,  $J_{1^A,2^A}$  8.5 Hz, H-1 $^A\beta$ ); 4.40 (d, 1H,  $J_{1^C,2^C}$  8.5 Hz, H-1 $^C$ ); 4.13 (2 dd, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  10.0,  $J_{2^B,3^B}$  10.0 Hz, H-2 $^B\alpha\&\beta$ ); 3.73 (dd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  11.5,  $J_{5^C,6a^C}$  2.2 Hz, H-6a $^C$ ); 3.71 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.0,  $J_{3^B,4^B}$  7.8 Hz, H-3 $^B$ ); 3.67-3.37 (m, 9.6H, H-2 $^A\alpha$ , H-3 $^A\alpha$ , H-5 $^A\alpha$ , H-6a $^B$ , H-6a $^A\beta$ , H-6a $^A\alpha$ , H-5 $^B$ , H-2 $^C$ , H-4 $^B$ , H-6b $^B$ , H-3 $^A\beta$ , H-6b $^A\alpha$  and H-6b $^A\beta$ ); 3.39 (dd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  11.5,  $J_{5^C,6b^C}$  7.5 Hz, H-6b $^C$ ); 3.37 (dd, 0.2H,  $J_{2^A,3^A}$  10.5,  $J_{1^A,2^A}$  8.5 Hz, H-2 $^A\beta$ ); 3.29 (dd, 1H,  $J_{2^C,3^C}$  9.6,  $J_{3^C,4^C}$  9.2 Hz, H-3 $^C$ ); 3.27 (dd, 0.8H,  $J$  9.2,  $J$  8.4 Hz, H-4 $^A\alpha$ ); 3.21 (dd, 0.2H,  $J_{4^A,5^A}$  9.7,  $J_{3^A,4^A}$  8.0 Hz, H-4 $^A\beta$ ); 3.20 (ddd, 1H,  $J_{4,5^C}$  8.9,  $J_{5^C,6b^C}$  7.5,  $J_{5^C,6a^C}$  2.2 Hz, H-5 $^C$ ); 3.10 (ddd, 0.2H,  $J_{4^A,5^A}$  9.7,  $J_{5^A,6a^A}$  5.5,  $J_{5^A,6b^A}$  1.9 Hz, H-5 $^A\beta$ ); 3.06 (dd, 1H,  $J_{3^C,4^C}$  9.2,  $J_{4^C,5^C}$  8.9 Hz, H-4 $^C$ ); 2.07 (t, 2H,  $J_{2'',3''}$  7.3 Hz, H-2''); 1.83, 1.82, 1.62 (3 s, 6H, 2 Ac  $\alpha\alpha, \alpha\beta, \beta$ ); 1.47 (brtt, 2H,  $J_{2'',3''}$  7.3,  $J_{3'',4''}$  7.0 Hz, H-3''); 1.29-1.16 (m, 24H, H-4'' to H-15''); 0.84 (t, 3H,  $J_{15'',16''}$  6.8 Hz, H-16'').

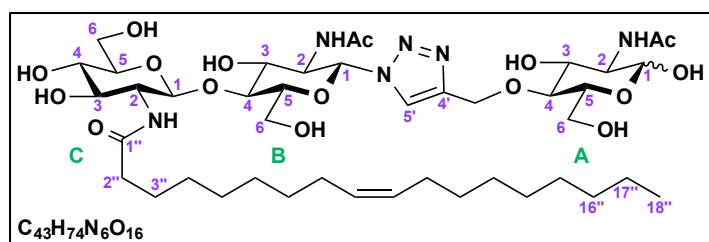
$^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )  $\delta$ : 172.5 (C-1''); 170.0, 169.9, 169.5 (2 COCH $_3$   $\alpha\alpha, \alpha\beta, \beta$ ); 144.7, 144.6 (C-4' $\alpha$  and C-4' $\beta$ ); 122.5 (C-5'); 102.0 (C-1 $^C$ ); 95.3 (C-1 $^A\beta$ ); 90.6 (C-1 $^A\alpha$ ); 85.8 (C-1 $^B$ ); 80.2 (C-4 $^B$ ); 79.1 (C-4 $^A\alpha$ ); 78.6 (C-4 $^A\beta$ ); 77.8 (C-5 $^B$ ); 77.0 (C-5 $^C$ ); 75.5 (C-5 $^A\beta$ ); 74.4 (C-3 $^A\beta$ ); 74.0 (C-3 $^C$ ); 72.3 (C-3 $^B$ ); 70.8 (C-5 $^A\alpha$ ); 70.7 (C-3 $^A\alpha$  and C-4 $^C$ ); 65.1, 64.9 (CH $_2$ triaz  $\alpha\&\beta$ ); 61.1 (C-6 $^C$ ); 60.7, 60.6 (C-6 $^A\alpha$  and C-6 $^A\beta$ ); 59.7 (C-6 $^B$ ); 57.5 (C-2 $^A\beta$ ); 55.3 (C-2 $^C$ ); 54.6 (C-2 $^A\alpha$ ); 53.9 (C-2 $^B$ ); 35.8 (C-2''); 31.4 (C-14''); 29.4-28.7 (C-4'' to C-13''); 25.1 (C-3''); 23.2, 22.8, 22.7 (2 COCH $_3$   $\alpha\alpha, \alpha\beta, \beta$ ); 22.3 (C-15''); 14.1 (C-16'').

Rf: 0.86 (EtOAc/EtOH/H $_2$ O 4:4:2).

HRMS (ESI $^+$ ): calculated for C $_{41}$ H $_{73}$ N $_6$ O $_{16}$  $^+$  905.5078 [M+H $^+$ ]; found 905.5112.

IR:  $\nu$  (cm $^{-1}$ ) = 3600-3000, 2920, 2851, 1647, 1628, 1550, 1375, 1318, 1105, 1076, 1045.

**2-Acetamido-2-deoxy-4-O-[[1'-([2-oleamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-D-glucopyranose (**123**)**



General procedure with (**117**) (12.1 mg, 0.016 mmol) and (**121**) (7.1 mg, 0.019 mmol) afford product (**123**) (13.7 mg,  $\alpha/\beta$  mixture, 95%) as a white lyophilisate.

$\alpha/\beta$  mixture 8:2 (DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )  $\delta$ : 8.09, 8.08 (2 s, 1H, H-5' $\alpha$ & $\beta$ ); 5.73 (brd, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  10.1 Hz, H-1 $^B\alpha$ & $\beta$ ); 5.35-5.27 (m, 2H, H-9'' and H-10''); 4.90 (d, 0.8H,  $J_{1^A,2^A}$  2.3 Hz, H-1 $^A\alpha$ ); 4.87, 4.85 (2 d, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz and  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHtriaz  $\alpha$ & $\beta$ ); 4.63 (brd, 1H,  $^2J_{HCH}$  12.1 Hz, CHHtriaz  $\alpha$ & $\beta$ ); 4.43 (d, 0.2H,  $J_{1^A,2^A}$  8.4 Hz, H-1 $^A\beta$ ); 4.40 (d, 1H,  $J_{1^C,2^C}$  8.6 Hz, H-1 $^C$ ); 4.13 (2 dd, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  10.1,  $J_{2^B,3^B}$  10.0 Hz, H-2 $^B\alpha$ & $\beta$ ); 3.73 (dd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  11.6,  $J_{5^C,6a^C}$  2.0 Hz, H-6a $^C$ ); 3.71 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.0,  $J_{3^B,4^B}$  7.8 Hz, H-3 $^B$ ); 3.67-3.57 (m, 2.4H, H-2 $^A\alpha$ , H-3 $^A\alpha$  and H-5 $^A\alpha$ ); 3.59 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.3,  $J_{5^B,6a^B}$  1.6 Hz, H-6a $^B$ ); 3.56 (dd, 0.2H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  11.9,  $J_{5^A,6a^A}$  1.7 Hz, H-6a $^A\beta$ ); 3.54-3.37 (m, 6H, H-6a $^A\alpha$ , H-2 $^C$ , H-4 $^B$ , H-6b $^B$ , H-5 $^B$ , H-3 $^A\beta$ , H-6b $^A\alpha$  and H-6b $^A\beta$ ); 3.39 (dd, 1H,  $^2J_{6a^C,6b^C}$  11.6,  $J_{5^C,6b^C}$  7.2 Hz, H-6b $^C$ ); 3.37 (dd, 0.2H,  $J_{2^A,3^A}$  10.3,  $J_{1^A,2^A}$  8.4 Hz, H-2 $^A\beta$ ); 3.29 (dd, 1H,  $J_{2^C,3^C}$  10.0,  $J_{3^C,4^C}$  8.9 Hz, H-3 $^C$ ); 3.27 (dd, 0.8H,  $J$  9.7,  $J$  8.7 Hz, H-4 $^A\alpha$ ); 3.21 (dd, 0.2H,  $J_{4^A,5^A}$  9.5,  $J_{3^A,4^A}$  9.3 Hz, H-4 $^A\beta$ ); 3.20 (ddd, 1H,  $J_{4^C,5^C}$  9.5,  $J_{5^C,6b^C}$  7.2,  $J_{5^C,6a^C}$  2.0 Hz, H-5 $^C$ ); 3.10 (ddd, 0.2H,  $J_{4^A,5^A}$  9.5,  $J_{5^A,6b^A}$  5.4,  $J_{5^A,6a^A}$  1.7 Hz, H-5 $^A\beta$ ); 3.06 (dd, 1H,  $J_{4^C,5^C}$  9.5,  $J_{3^C,4^C}$  8.9 Hz, H-4 $^C$ ); 2.09-2.05 (m, 2H, H-2''); 1.99-1.93 (m, 4H, H-8'' and H-11''); 1.83, 1.82, 1.63 (3 s, 6H, 2 Ac  $\alpha$ , $\beta$ , $\beta$ ); 1.51-1.44 (m, 2H, H-3''); 1.31-1.18 (m, 20H, H-4'' to H-7'' and H-12'' to H-17''); 0.84 (t, 3H,  $J_{17'',18''}$  7.0 Hz, H-18'').

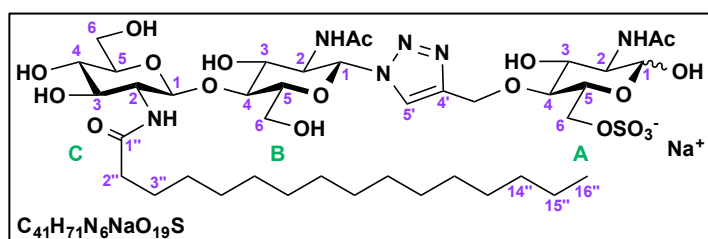
$^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )  $\delta$ : 172.4 (C-1''); 169.9, 169.8, 169.4 (2 COCH $_3$   $\alpha$ , $\beta$ , $\beta$ ); 144.7, 144.6 (C-4' $\alpha$  and C-4' $\beta$ ); 129.8 (C-9'' and C-10''); 122.4 (C-5'); 102.0 (C-1 $^C$ ); 95.2 (C-1 $^A\beta$ ); 90.5 (C-1 $^A\alpha$ ); 85.8 (C-1 $^B$ ); 80.2 (C-4 $^B$ ); 79.1 (C-4 $^A\alpha$ ); 78.6 (C-4 $^A\beta$ ); 77.8 (C-5 $^B$ ); 77.0 (C-5 $^C$ ); 75.5 (C-5 $^A\beta$ ); 74.4 (C-3 $^A\beta$ ); 74.0 (C-3 $^C$ ); 72.3 (C-3 $^B$ ); 70.9 (C-5 $^A\alpha$ ); 70.6 (C-3 $^A\alpha$  and C-4 $^C$ ); 65.1, 64.8 (CH $_2$ triaz  $\alpha$ & $\beta$ ); 61.0 (C-6 $^C$ ); 60.7, 60.6 (C-6 $^A\alpha$  and C-6 $^A\beta$ ); 59.7 (C-6 $^B$ ); 57.5 (C-2 $^A\beta$ ); 55.3 (C-2 $^C$ ); 54.5 (C-2 $^A\alpha$ ); 53.9 (C-2 $^B$ ); 35.8 (C-2''); 31.4 (C-16''); 29.4-28.6 (C-4'' to C-7'' and C-12'' to C-15''); 26.8, 26.7 (C-8'' and C-11''); 25.1 (C-3''); 23.1, 22.8, 22.7 (2 COCH $_3$   $\alpha$ , $\beta$ , $\beta$ ); 22.2 (C-17''); 14.1 (C-18'').

Rf: 0.86 (EtOAc/EtOH/H $_2$ O 4:4:2).

HRMS (ESI $^+$ ): calculated for C $_{43}$ H $_{74}$ N $_6$ NaO $_{16}$  $^+$  953.5054 [M+Na $^+$ ]; found 953.5073.

IR:  $\nu$  (cm $^{-1}$ ) = 3600-3000, 2926, 2857, 1649, 1555, 1376, 1322, 1103, 1074, 1047.

**2-Acetamido-2-deoxy-6-O-sodium sulfonato-4-O-[[1'-([2-palmitamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl]-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-D-glucopyranose (124)**



General procedure with **(119)** (9.2 mg, 0.010 mmol) and **(120)** (4.6 mg, 0.013 mmol) give product **(124)** (7.0 mg, α/β mixture, 67%) as a white lyophilisate.

α/β mixture 8:2 (DMSO-d<sub>6</sub> + εD<sub>2</sub>O)

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + εD<sub>2</sub>O)** δ: 8.12, 8.11 (2 s, 1H, **H-5'α&β**); 5.82 (d, 1H,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0 Hz, **H-1<sup>B</sup>**); 4.89 (d, 0.8H,  $J_{1,2}^{A,A}$  2.7 Hz, **H-1<sup>A</sup>α**); 4.85, 4.84 (2 d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  11.8 Hz and  $^2J_{\text{HCH}}$  11.8 Hz, **CHHtriaz α&β**); 4.68, 4.67 (2 d, 1H,  $^2J_{\text{HCH}}$  11.8 Hz and  $^2J_{\text{HCH}}$  11.8 Hz, **CHHtriaz α&β**); 4.43 (d, 0.2H,  $J_{1,2}^{A,A}$  8.2 Hz, **H-1<sup>A</sup>β**); 4.40 (d, 1H,  $J_{1,2}^{C,C}$  8.5 Hz, **H-1<sup>C</sup>**); 3.99, 3.98 (2 dd, 1H,  $J_{1,2}^{B,B}$  10.0,  $J_{2,3}^{B,B}$  9.8 Hz, **H-2<sup>B</sup>α&β**); 3.92 (dd, 0.2H,  $^2J_{6a,6b}^{A,A}$  10.9,  $J_{5,6a}^{A,A}$  1.6 Hz, **H-6a<sup>A</sup>β**); 3.88-3.72 (m, 3.6H, 2 **H-6<sup>A</sup>α**, **H-3<sup>B</sup>**, **H-5<sup>A</sup>α** and **H-6b<sup>A</sup>β**); 3.73 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{C,C}$  11.7,  $J_{5,6a}^{C,C}$  2.0 Hz, **H-6a<sup>C</sup>**); 3.66-3.57 (m, 2.6H, **H-2<sup>A</sup>α**, **H-3<sup>A</sup>α** and **H-6a<sup>B</sup>**); 3.51 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{C,C}$  9.8,  $J_{1,2}^{C,C}$  8.5 Hz, **H-2<sup>C</sup>**); 3.50-3.43 (m, 3.2H, **H-4<sup>B</sup>**, **H-5<sup>B</sup>**, **H-6b<sup>B</sup>** and **H-3<sup>A</sup>β**); 3.39 (dd, 1H,  $^2J_{6a,6b}^{C,C}$  11.7,  $J_{5,6b}^{C,C}$  7.2 Hz, **H-6b<sup>C</sup>**); 3.37 (dd, 0.2H,  $J_{2,3}^{A,A}$  10.3,  $J_{1,2}^{A,A}$  8.2 Hz, **H-2<sup>A</sup>β**); 3.32-3.28 (m, 0.2H, **H-5<sup>A</sup>β**); 3.28 (dd, 1H,  $J_{2,3}^{C,C}$  9.8,  $J_{3,4}^{C,C}$  9.1 Hz, **H-3<sup>C</sup>**); 3.24 (dd, 0.8H,  $J$  9.9,  $J$  8.3 Hz, **H-4<sup>A</sup>α**); 3.20 (ddd, 1H,  $J_{4,5}^{C,C}$  9.4,  $J_{5,6b}^{C,C}$  7.0,  $J_{5,6a}^{C,C}$  1.8 Hz, **H-5<sup>C</sup>**); 3.21-3.17 (m, 0.2H, **H-4<sup>A</sup>β**); 3.06 (dd, 1H,  $J_{4,5}^{C,C}$  9.4,  $J_{3,4}^{C,C}$  8.9 Hz, **H-4<sup>C</sup>**); 2.07 (t, 2H,  $J_{2'',3''}$  7.5 Hz, **H-2''**); 1.83, 1.81, 1.62 (3 s, 6H, 2 **Ac Aα,Aβ,B**); 1.51-1.44 (m, 2H, **H-3''**); 1.28-1.17 (m, 24H, **H-4''** to **H-15''**); 0.84 (t, 3H,  $J_{15'',16''}$  6.9 Hz, **H-16''**).

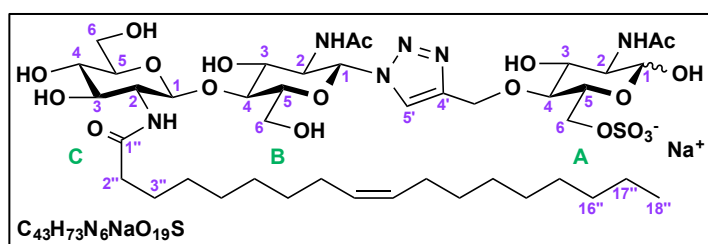
**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> + εD<sub>2</sub>O)** δ: 172.4 (**C-1''**); 169.8, 169.5 (2 **COCH<sub>3</sub>**); 144.7 (**C-4'**); 122.6 (**C-5'**); 102.0 (**C-1<sup>C</sup>**); 95.2 (**C-1<sup>A</sup>β**); 90.5 (**C-1<sup>A</sup>α**); 85.4 (**C-1<sup>B</sup>**); 80.3 (**C-4<sup>B</sup>**); 79.1 (**C-4<sup>A</sup>α**); 78.7 (**C-4<sup>A</sup>β**); 77.9 (**C-5<sup>B</sup>**); 77.0 (**C-5<sup>C</sup>**); 74.3 (**C-3<sup>A</sup>β**); 74.0 (**C-3<sup>C</sup>**); 73.1 (**C-5<sup>A</sup>β**); 71.9 (**C-3<sup>B</sup>**); 70.7, 70.6 (**C-3<sup>A</sup>α** and **C-4<sup>C</sup>**); 68.8 (**C-5<sup>A</sup>α**); 65.5 (**C-6<sup>A</sup>α&β**); 65.2 (**CH<sub>2</sub>triaz α&β**); 61.0 (**C-6<sup>C</sup>**); 59.7 (**C-6<sup>B</sup>**); 57.4 (**C-2<sup>A</sup>β**); 55.2 (**C-2<sup>C</sup>**); 54.4 (**C-2<sup>A</sup>α** and **C-2<sup>B</sup>**); 35.8 (**C-2''**); 31.4 (**C-14''**); 29.3-28.7 (**C-4''** to **C-13''**); 25.1 (**C-3''**); 23.1, 22.7, 22.6 (2 **COCH<sub>3</sub> Aα,Aβ,B**); 22.2 (**C-15''**); 14.1 (**C-16''**).

**Rf:** 0.71 (EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O 56:26:18).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** calculated for C<sub>41</sub>H<sub>71</sub>N<sub>6</sub>O<sub>19</sub>S<sup>-</sup> 983.4500 [M-Na<sup>+</sup>]; found 983.4470.

**IR:** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3600-3000, 2922, 2853, 1649, 1554, 1378, 1317, 1226, 1104, 1057.

**2-Acetamido-2-deoxy-6-O-sodium sulfonato-4-O-[[1'-([2-oleamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-  
(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-1H-[1',2',3']-triazol-4'-yl]-methyl]-D-  
glucopyranose (**125**)**



General procedure with (**119**) (10.8 mg, 0.012 mmol) and (**121**) (6.0 mg, 0.016 mmol) afford product (**125**) (8.4 mg,  $\alpha/\beta$  mixture, 67%) as a white lyophilisate.

$\alpha/\beta$  mixture 8:2 (DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )**  $\delta$ : 8.12, 8.11 (2 s, 1H, H-5' $\alpha$ & $\beta$ ); 5.82 (d, 1H,  $J_{1',2'}^{B,B}$  10.0 Hz, H-1<sup>B</sup>); 5.35-5.27 (m, 2H, H-9'' and H-10''); 4.90 (d, 0.8H,  $J_{1',2'}^{A,A}$  2.7 Hz, H-1<sup>A</sup> $\alpha$ ); 4.85, 4.84 (2 d, 1H,  $J_{HCH}^2$  11.7 Hz and  $J_{HCH}^2$  11.7 Hz, CHHtriaz  $\alpha$ & $\beta$ ); 4.68, 4.67 (2 d, 1H,  $J_{HCH}^2$  11.7 Hz and  $J_{HCH}^2$  11.7 Hz, CHHtriaz  $\alpha$ & $\beta$ ); 4.43 (d, 0.2H,  $J_{1',2'}^{A,A}$  8.3 Hz, H-1<sup>A</sup> $\beta$ ); 4.40 (d, 1H,  $J_{1',2'}^{C,C}$  8.4 Hz, H-1<sup>C</sup>); 3.99, 3.98 (2 dd, 1H,  $J_{1',2'}^{B,B}$  10.0,  $J_{2',3'}^{B,B}$  9.8 Hz, H-2<sup>B</sup> $\alpha$ & $\beta$ ); 3.92 (dd, 0.2H,  $J_{6a',6b'}^{A,A}$  11.3,  $J_{5',6a'}^{A,A}$  1.7 Hz, H-6a<sup>A</sup> $\beta$ ); 3.88-3.72 (m, 3.6H, 2 H-6<sup>A</sup> $\alpha$ , H-3<sup>B</sup>, H-5<sup>A</sup> $\alpha$  and H-6b<sup>A</sup> $\beta$ ); 3.73 (dd, 1H,  $J_{6a',6b'}^{C,C}$  11.8,  $J_{5',6a'}^{C,C}$  2.0 Hz, H-6a<sup>C</sup>); 3.66-3.57 (m, 2.6H, H-2<sup>A</sup> $\alpha$ , H-3<sup>A</sup> $\alpha$  and H-6a<sup>B</sup>); 3.51 (dd, 1H,  $J_{2',3'}^{C,C}$  9.9,  $J_{1',2'}^{C,C}$  8.4 Hz, H-2<sup>C</sup>); 3.50-3.45 (m, 3H, H-4<sup>B</sup>, H-5<sup>B</sup>, H-6b<sup>B</sup>); 3.45 (dd, 0.2H,  $J_{2',3'}^{A,A}$  10.4,  $J_{3',4'}^{A,A}$  8.9 Hz, H-3<sup>A</sup> $\beta$ ); 3.39 (dd, 1H,  $J_{6a',6b'}^{C,C}$  11.8,  $J_{5',6b'}^{C,C}$  7.2 Hz, H-6b<sup>C</sup>); 3.37 (dd, 0.2H,  $J_{2',3'}^{A,A}$  10.4,  $J_{1',2'}^{A,A}$  8.3 Hz, H-2<sup>A</sup> $\beta$ ); 3.32-3.28 (m, 0.2H, H-5<sup>A</sup> $\beta$ ); 3.28 (dd, 1H,  $J_{2',3'}^{C,C}$  9.9,  $J_{3',4'}^{C,C}$  8.9 Hz, H-3<sup>C</sup>); 3.24 (dd, 0.8H,  $J$  9.7,  $J$  8.2 Hz, H-4<sup>A</sup> $\alpha$ ); 3.21 (ddd, 1H,  $J_{4',5'}^{C,C}$  9.6,  $J_{5',6b'}^{C,C}$  7.2,  $J_{5',6a'}^{C,C}$  2.0 Hz, H-5<sup>C</sup>); 3.21-3.17 (m, 0.2H, H-4<sup>A</sup> $\beta$ ); 3.06 (dd, 1H,  $J_{4',5'}^{C,C}$  9.6,  $J_{3',4'}^{C,C}$  8.9 Hz, H-4<sup>C</sup>); 2.07 (t, 2H,  $J_{2'',3''}$  7.6 Hz, H-2''); 1.99-1.93 (m, 4H, H-8'' and H-11''); 1.83, 1.81, 1.62 (3 s, 6H, 2 Ac A $\alpha$ ,A $\beta$ ,B); 1.51-1.44 (m, 2H, H-3''); 1.31-1.18 (m, 20H, H-4'' to H-7'' and H-12'' to H-17''); 0.84 (t, 3H,  $J_{15'',16''}$  6.9 Hz, H-18'').

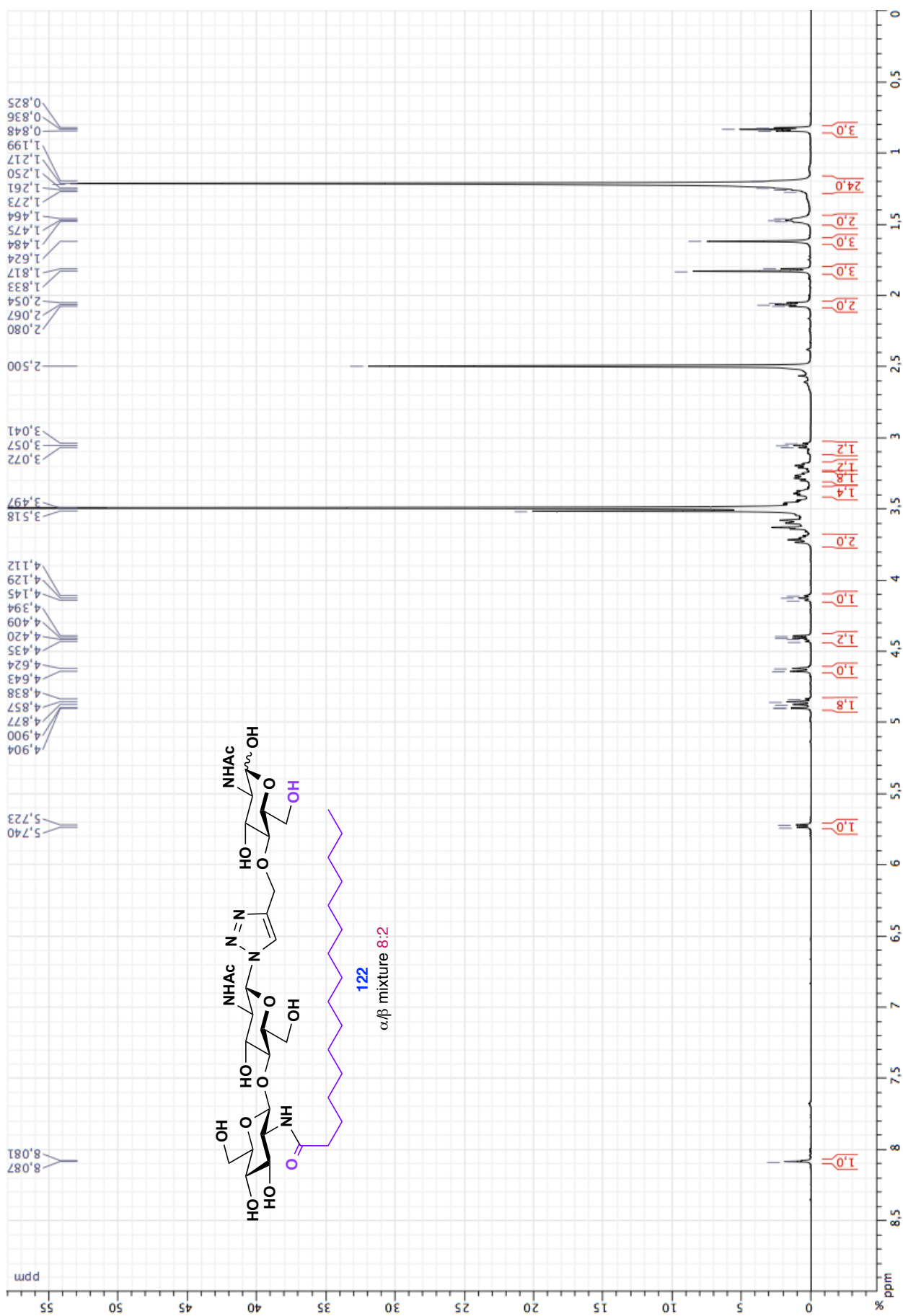
**<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\epsilon D_2O$ )**  $\delta$ : 172.4 (C-1''); 169.8, 169.5 (2 COCH<sub>3</sub>); 144.7 (C-4'); 129.8 (C-9'' and C-10''); 122.6 (C-5'); 102.0 (C-1<sup>C</sup>); 95.2 (C-1<sup>A</sup> $\beta$ ); 90.5 (C-1<sup>A</sup> $\alpha$ ); 85.5 (C-1<sup>B</sup>); 80.3 (C-4<sup>B</sup>); 79.2 (C-4<sup>A</sup> $\alpha$ ); 78.7 (C-4<sup>A</sup> $\beta$ ); 77.9 (C-5<sup>B</sup>); 77.0 (C-5<sup>C</sup>); 74.3 (C-3<sup>A</sup> $\beta$ ); 74.0 (C-3<sup>C</sup>); 73.1 (C-5<sup>A</sup> $\beta$ ); 71.9 (C-3<sup>B</sup>); 70.7, 70.6 (C-3<sup>A</sup> $\alpha$  and C-4<sup>C</sup>); 68.8 (C-5<sup>A</sup> $\alpha$ ); 65.5 (C-6<sup>A</sup> $\alpha$ & $\beta$ ); 65.2 (CH<sub>2</sub>triaz  $\alpha$ & $\beta$ ); 61.0 (C-6<sup>C</sup>); 59.7 (C-6<sup>B</sup>); 57.4 (C-2<sup>A</sup> $\beta$ ); 55.2 (C-2<sup>C</sup>); 54.4 (C-2<sup>A</sup> $\alpha$  and C-2<sup>B</sup>); 35.8 (C-2''); 31.4 (C-16''); 29.4-28.6 (C-4'' to C-7'' and C-12'' to C-15''); 26.8, 26.7 (C-8'' and C-11''); 25.1 (C-3''); 23.1, 22.8, 22.7 (2 COCH<sub>3</sub> A $\alpha$ ,A $\beta$ ,B); 22.2 (C-17''); 14.1 (C-18'').

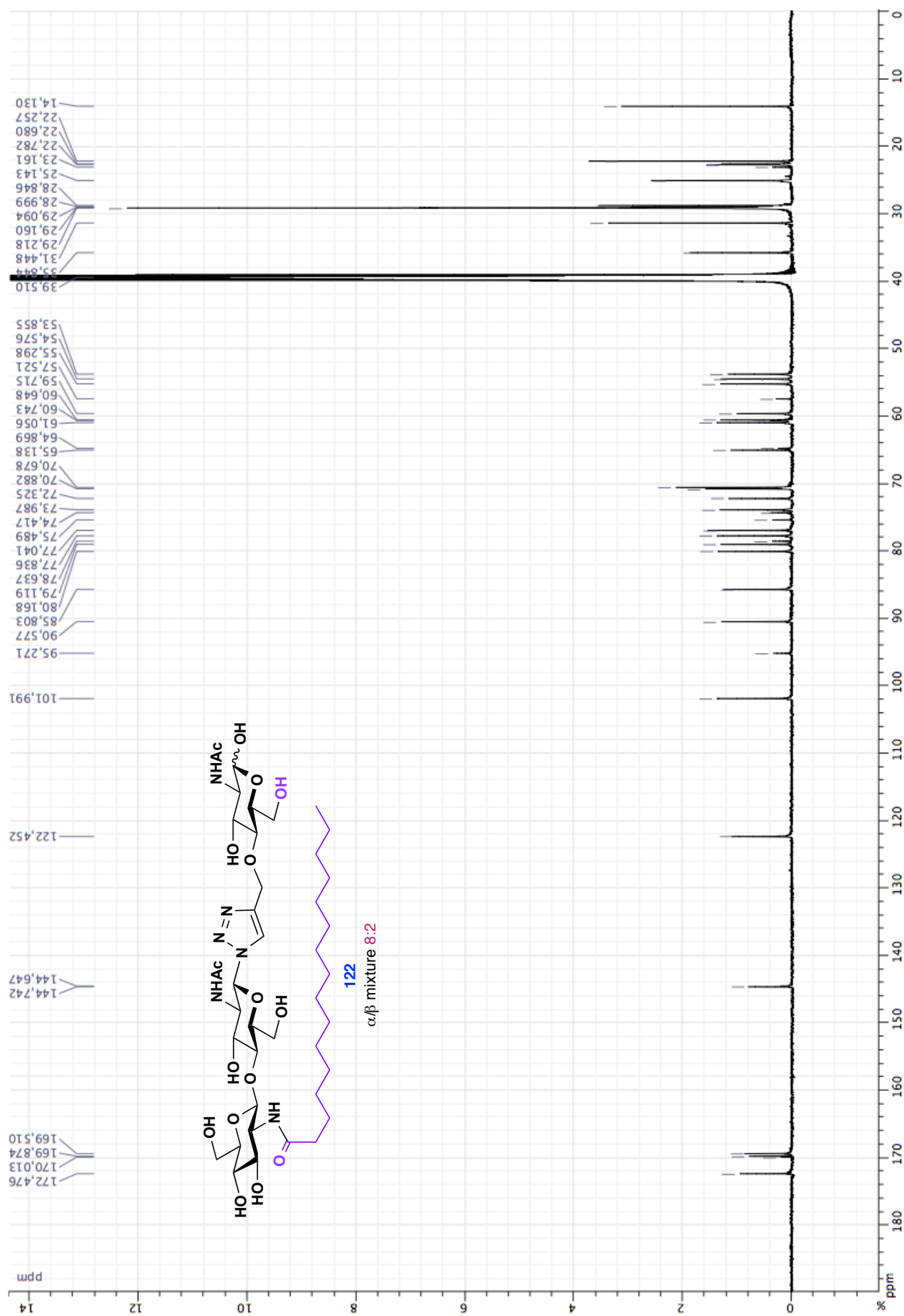
**Rf**: 0.66 (EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O 56:26:18).

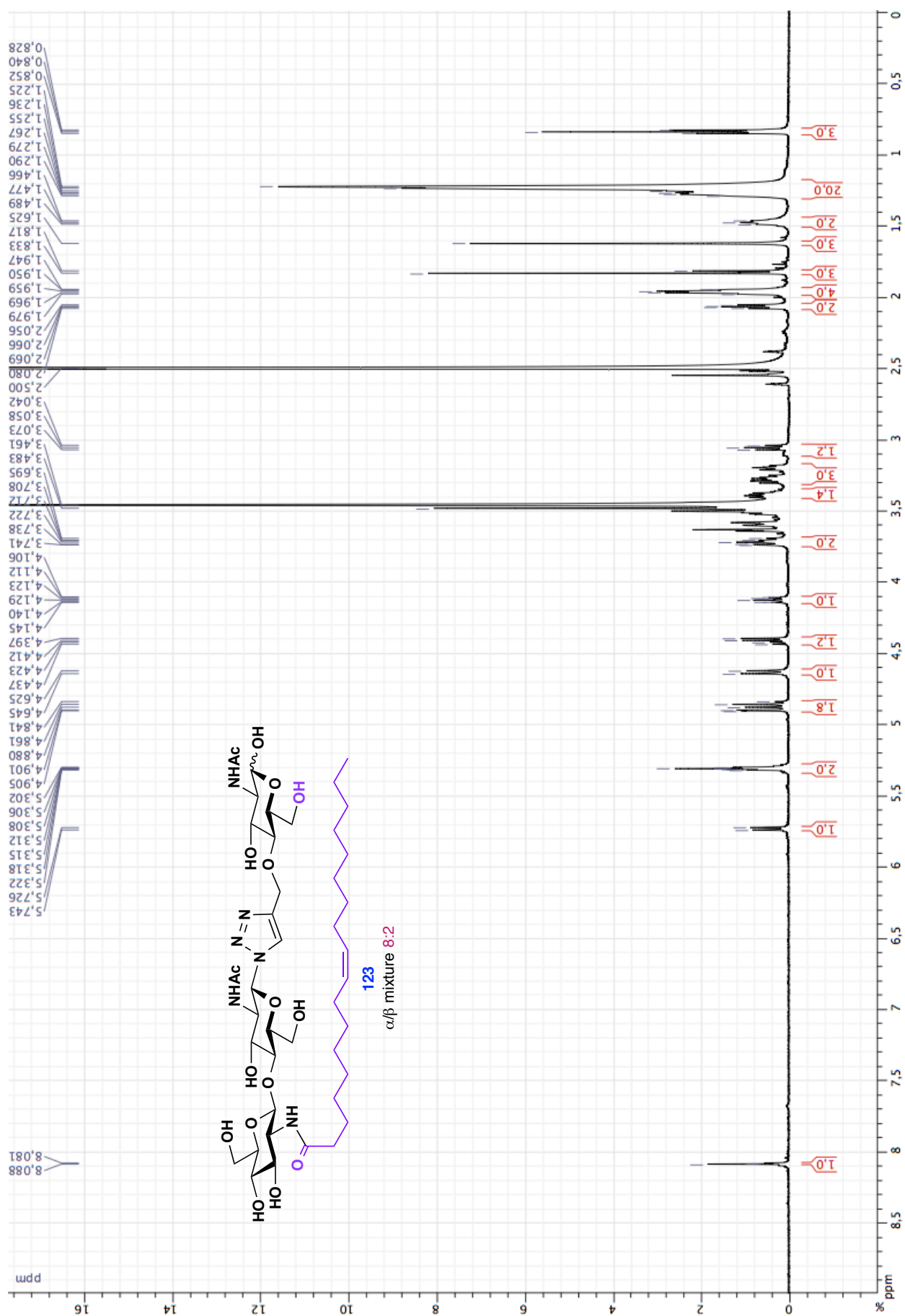
**HRMS (ESI<sup>+</sup>)**: calculated for C<sub>43</sub>H<sub>73</sub>N<sub>6</sub>O<sub>19</sub>S<sup>-</sup> 1009.4657 [M-Na<sup>+</sup>]; found 1009.4703.

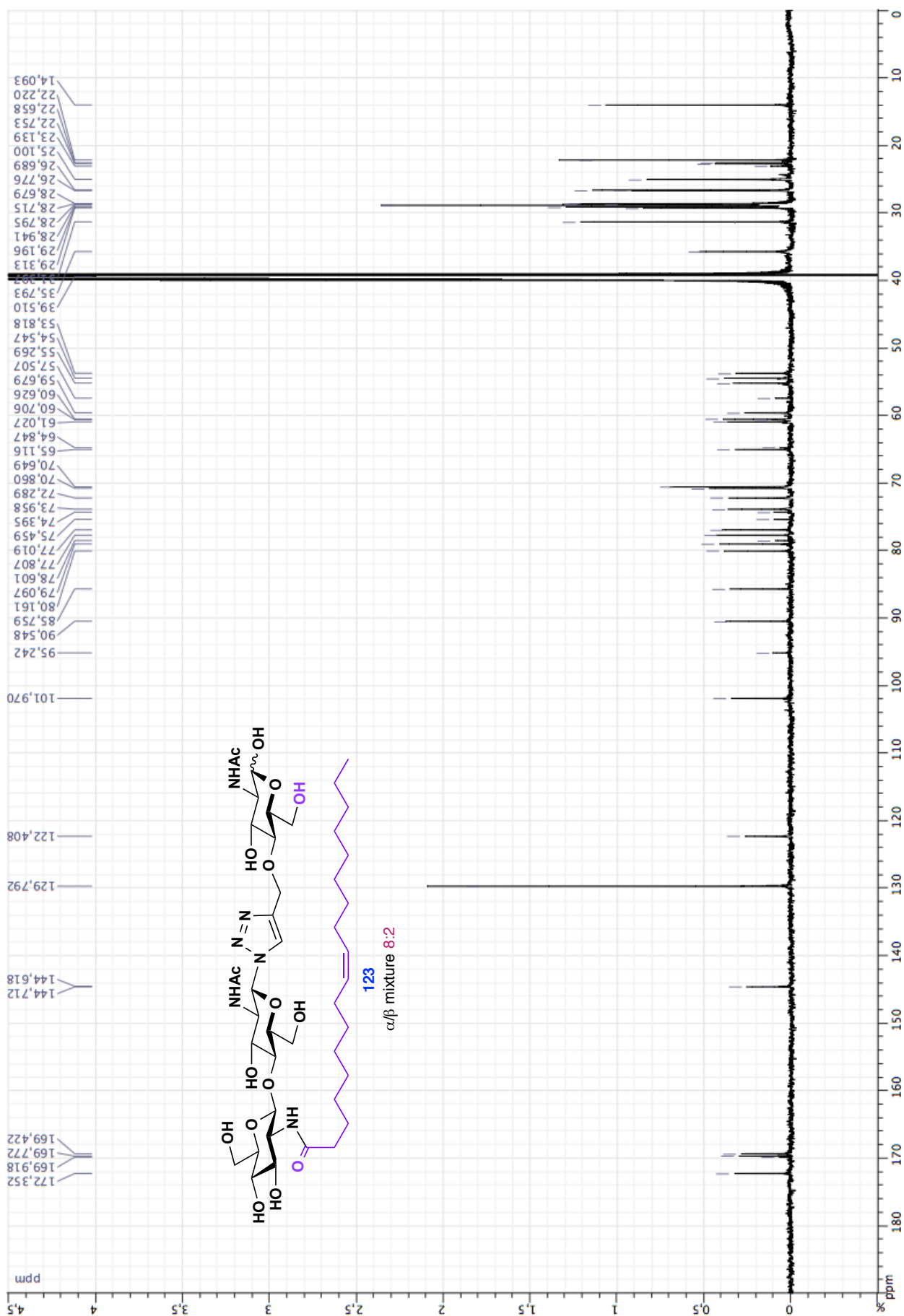
**IR**:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3600-3000, 2925, 2857, 1649, 1559, 1378, 1324, 1228, 1103, 1059.

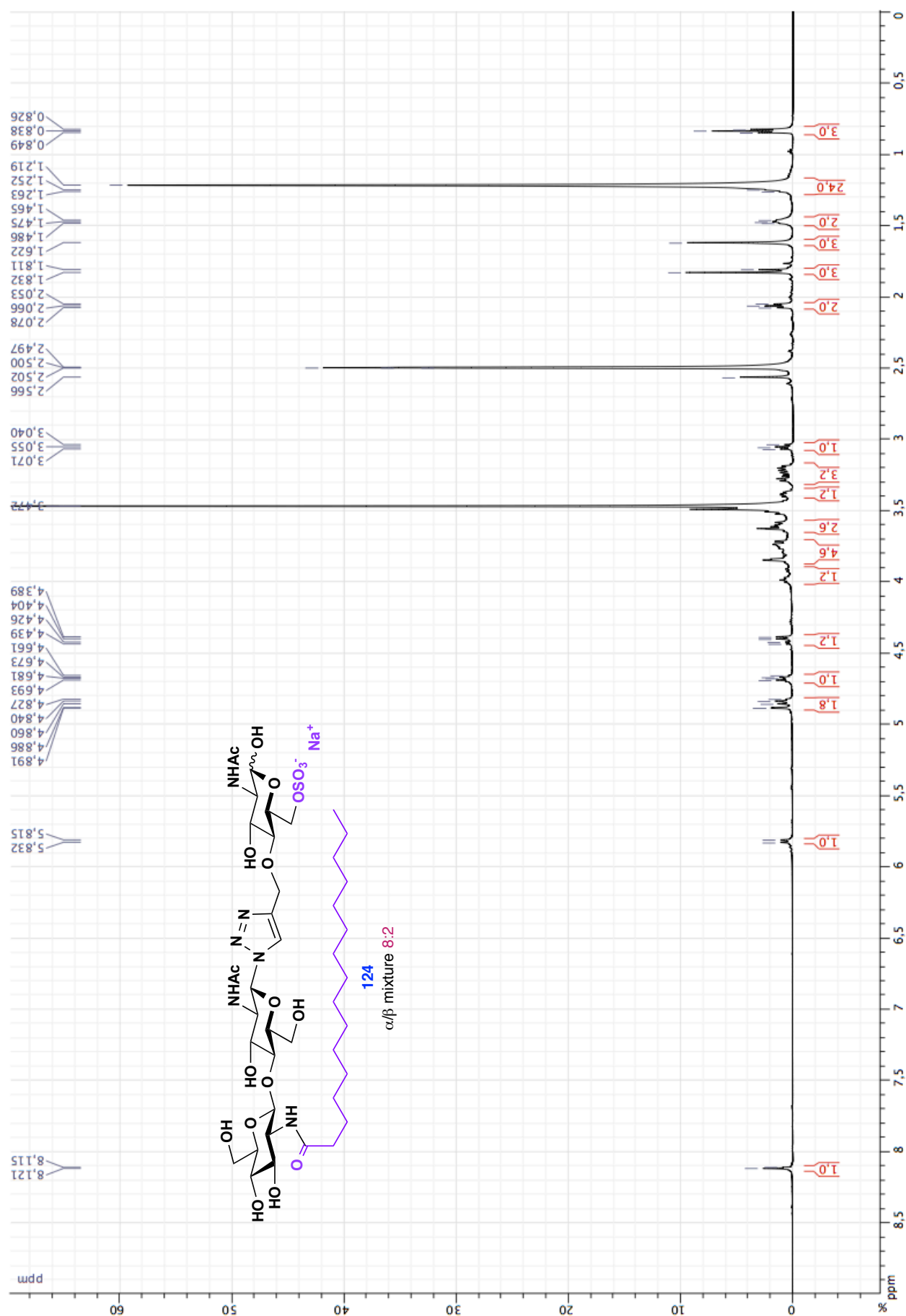


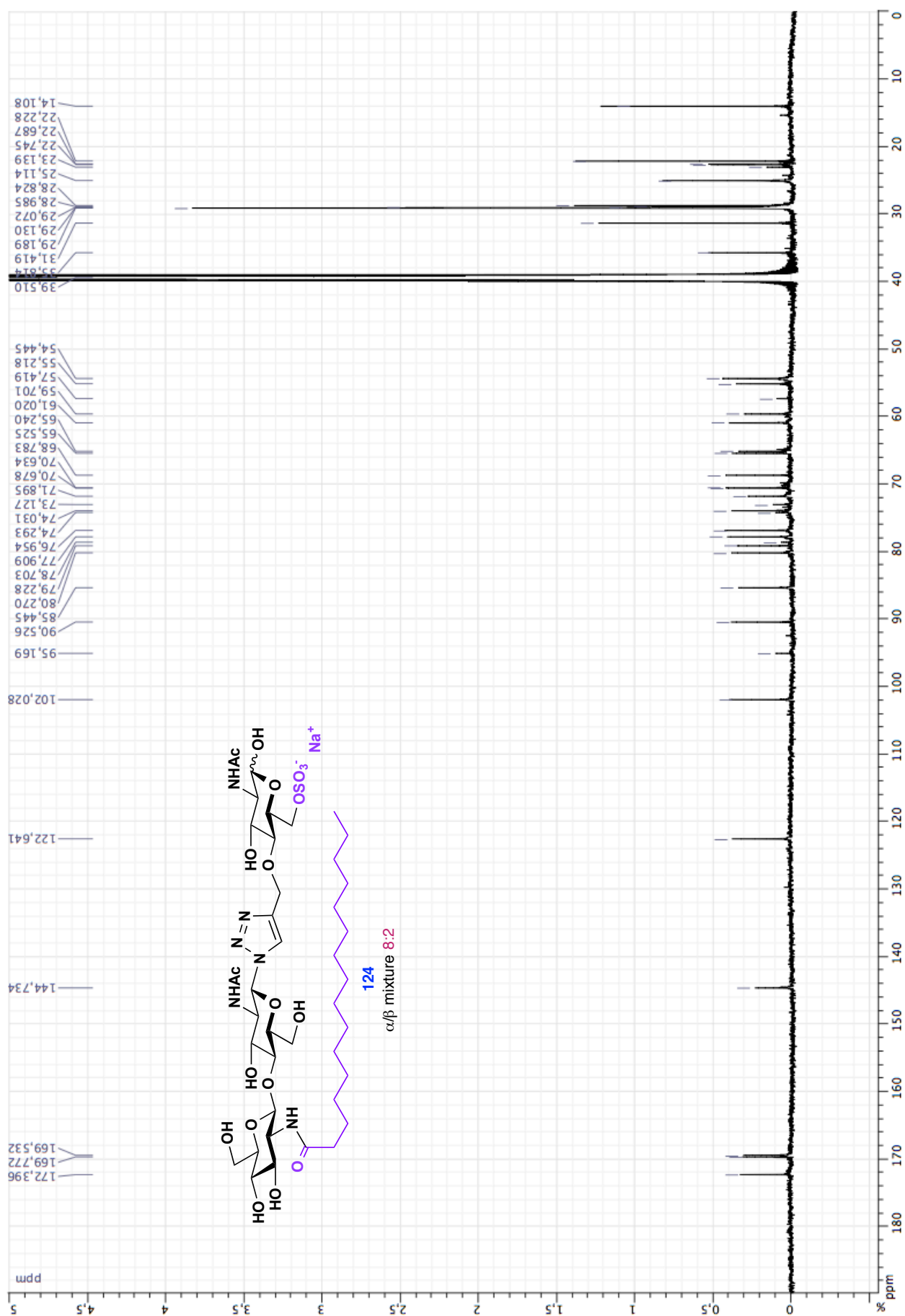


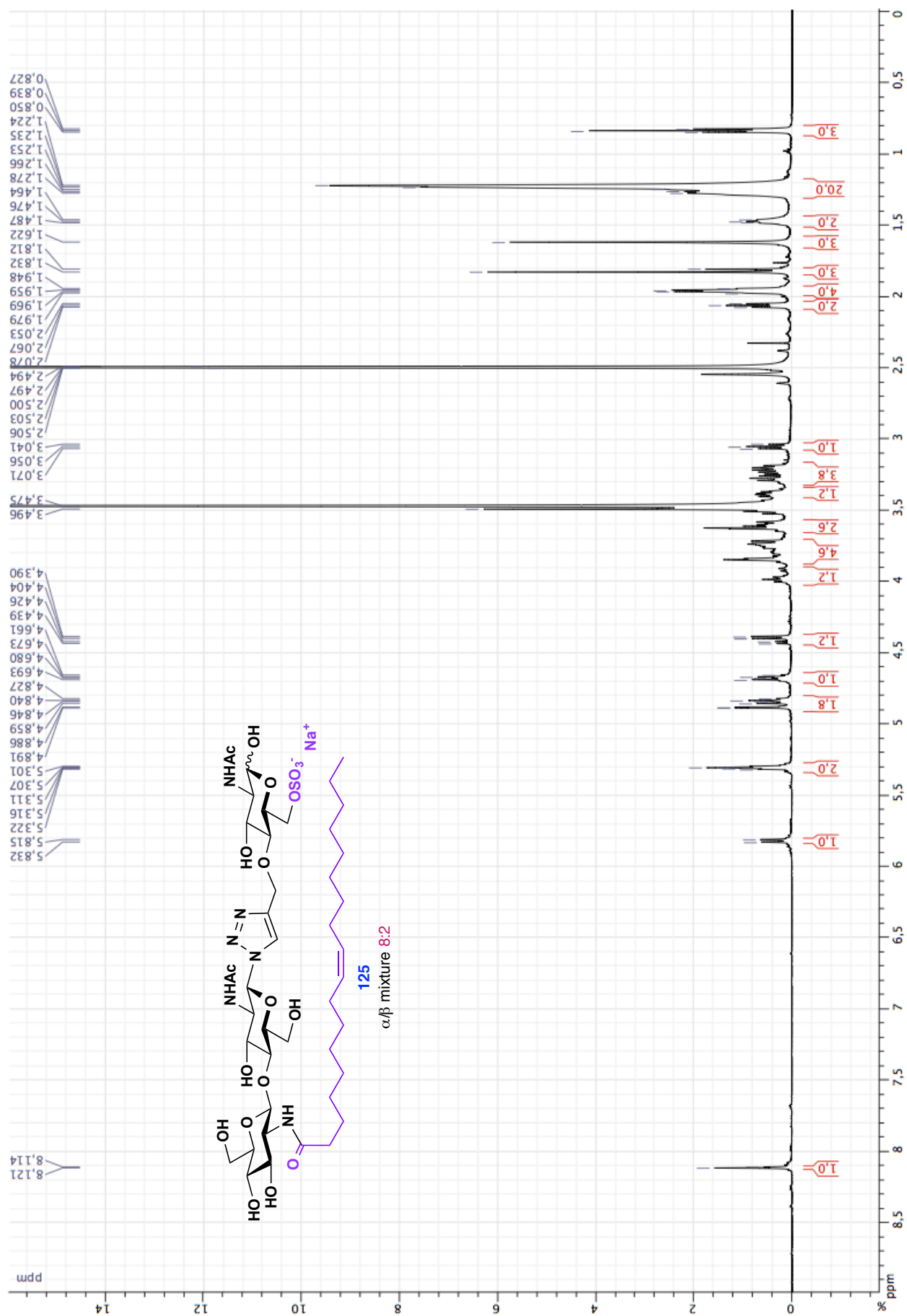


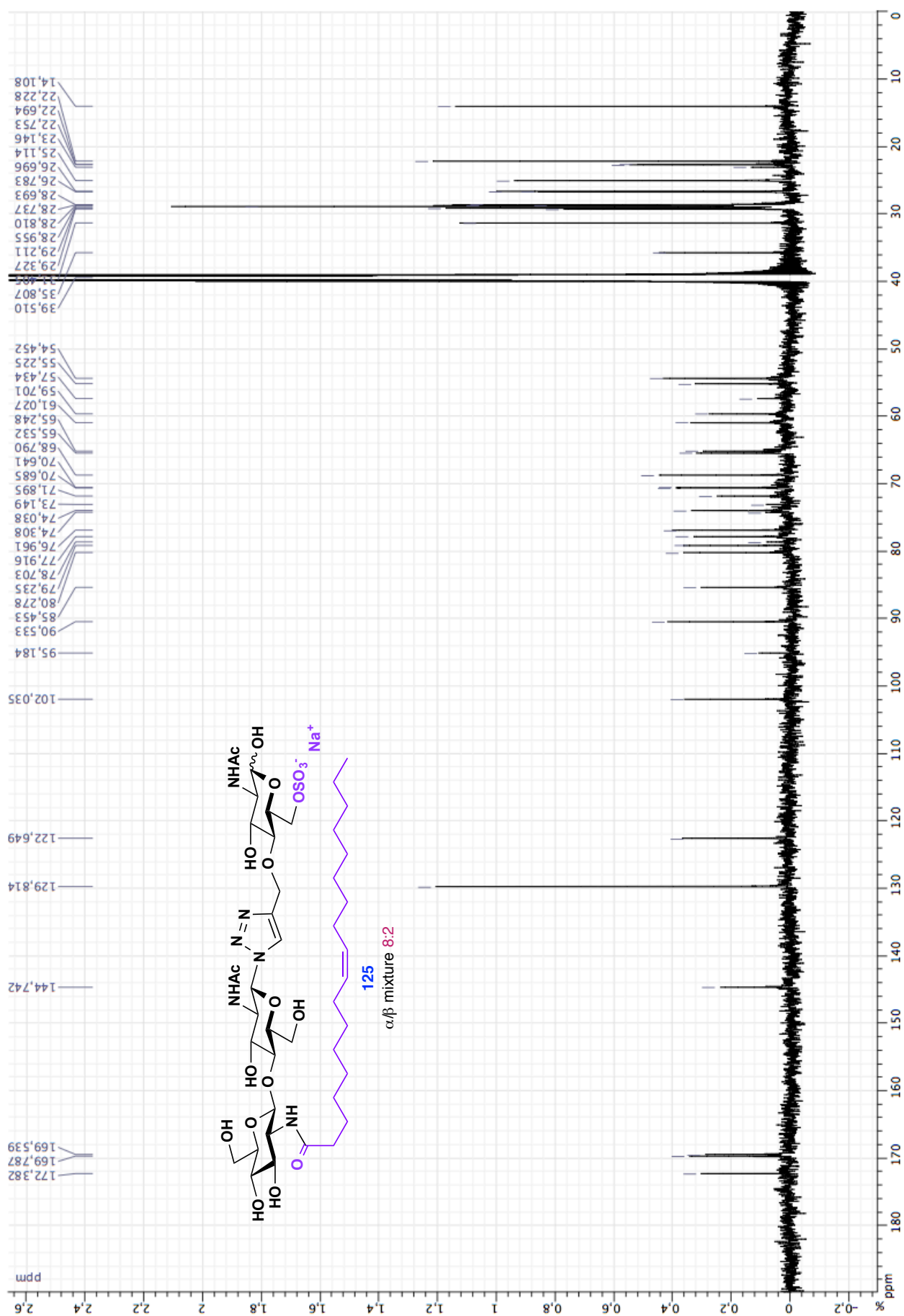








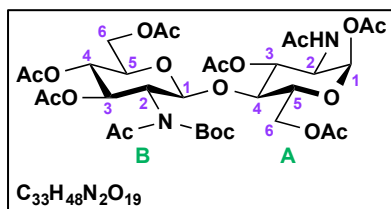






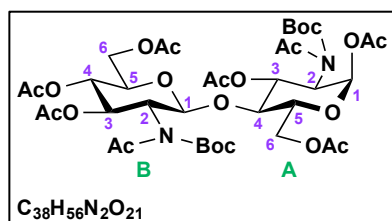
## E. New building blocks

### Acetyl [2-(*N*-acetyl-*tert*-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (**131**)



and

### Acetyl [2-(*N*-acetyl-*tert*-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (1 $\rightarrow$ 4)-2-(*N*-acetyl-*tert*-butoxycarbonylamino)-3,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside (**132**)



To a suspension of (**53**) (300 mg, 0.44 mmol, 1.0 eq.) in a mixture of dry THF and dry  $CH_2Cl_2$  (13.3 mL, 1:1) were added di-*tert*-butyl dicarbonate (204  $\mu$ L, 0.89 mmol, 2.0 eq.) and 4-dimethylaminopyridine (11 mg, 0.089 mmol, 0.2 eq.). The reaction mixture was stirred at reflux for 22 h. The mixture was

concentrated and the residue was purified by silica gel column chromatography ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  100:0 to 97:3) to give product (**131**) (210 mg, 61%) as a slightly yellow oil and product (**132**) (119 mg, 31%) as an uncolored oil.

#### (**131**):

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3CN$ , 70°C)  $\delta$ : 6.14 (d, 1H,  $J_{NH^A,2^A}$  8.4 Hz,  $NH^A$ ); 5.96 (d, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  3.6 Hz,  $H-1^A$ ); 5.65 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.4,  $J_{3^B,4^B}$  8.9 Hz,  $H-3^B$ ); 5.32 (d, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  7.8 Hz,  $H-1^B$ ); 5.17-5.09 (m, 1H,  $H-3^A$ ); 4.96 (dd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  10.0,  $J_{3^B,4^B}$  8.9 Hz,  $H-4^B$ ); 4.39-4.31 (m, 1H,  $H-6a^A$ ); 4.33 (dd, 1H,  $J_{6a^B,6b^B}$  12.4,  $J_{5^B,6a^B}$  4.6 Hz,  $H-6a^B$ ); 4.27 (ddd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  11.7,  $J_{NH^A,2^A}$  8.4,  $J_{1^A,2^A}$  3.6 Hz,  $H-2^A$ ); 4.08 (dd, 1H,  $J_{6a^B,6b^B}$  12.4,  $J_{5^B,6b^B}$  2.6 Hz,  $H-6b^B$ ); 3.97-3.88 (m, 3H,  $H-4^A$ ,  $H-5^A$ ,  $H-6b^A$ ); 3.79 (ddd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  10.0,  $J_{5^B,6a^B}$  4.6,  $J_{5^B,6b^B}$  2.6 Hz,  $H-5^B$ ); 2.32 (s, 3H,  $NAC$ ); 2.14, 2.05, 2.05, 2.04, 1.98, 1.93 (6 s, 18H, 6  $OAc$ ); 1.85 (s, 3H,  $NHAc$ ); 1.57 (s, 9H,  $Boc$ ).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3CN$ , 70°C)  $\delta$ : 171.8-170.4 (7  $COCH_3$   $OAc$  and  $NHAc$ ); 100.6 ( $C-1^B$ ); 91.8 ( $C-1^A$ ); 76.0 ( $C-4^A$ ); 73.0 ( $C-5^B$ ); 72.3, 71.8 ( $C-3^A$ ,  $C-3^B$  and  $C-5^A$ ); 71.3 ( $C-4^B$ ); 63.5, 63.3 ( $C-6^A$  and  $C-6^B$ ); 52.3 ( $C-2^A$ ); 28.6 ( $C(CH_3)_3$ ); 27.5 ( $COCH_3$   $NAC$ ); 23.2 ( $COCH_3$   $NHAc$ ); 21.7-21.0 (6  $COCH_3$   $OAc$ ).

Rf: 0.16 ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  98:2).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for  $C_{33}H_{48}N_2NaO_{19}^+$  799.2743 [ $M+Na^+$ ]; found 799.2756.

IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 2942, 1746, 1686, 1370, 1227, 1153, 1135, 1077, 1037.

$[\alpha]_D^{20}$  = 23.30 ( $c$  = 1.00,  $CHCl_3$ ).

**(132) :**

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70°C) δ: 6.07 (d, 1H,  $J_{1^A,2^A}$  3.6 Hz, **H-1<sup>A</sup>**); 5.92 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  11.4,  $J_{3^A,4^A}$  8.7 Hz, **H-3<sup>A</sup>**); 5.68 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.1,  $J_{3^B,4^B}$  9.0 Hz, **H-3<sup>B</sup>**); 5.30 (brd, 1H,  $J_{1^B,2^B}$  5.8 Hz, **H-1<sup>B</sup>**); 4.96 (dd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  9.9,  $J_{3^B,4^B}$  9.0 Hz, **H-4<sup>B</sup>**); 4.83 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  11.4,  $J_{1^A,2^A}$  3.6 Hz, **H-2<sup>A</sup>**); 4.44-4.34 (m, 1H, **H-6a<sup>A</sup>**); 4.36 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.5,  $J_{5^B,6a^B}$  5.0 Hz, **H-6a<sup>B</sup>**); 4.08 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.5,  $J_{5^B,6b^B}$  2.5 Hz, **H-6b<sup>B</sup>**); 3.87 (brdd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  10.2,  $J_{3^A,4^A}$  8.7 Hz, **H-5<sup>A</sup>**); 3.97 (dd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  10.2,  $J_{3^A,4^A}$  8.7 Hz, **H-4<sup>A</sup>**); 3.99-3.90 (m, 1H, **H-6b<sup>A</sup>**); 3.81 (ddd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  9.9,  $J_{5^B,6a^B}$  5.0,  $J_{5^B,6b^B}$  2.5 Hz, **H-5<sup>B</sup>**); 2.34 (s, 6H, 2 NAc); 2.09, 2.05, 2.03, 2.00, 1.97 (5 s, 18H, 6 OAc); 1.60, 1.56 (2 s, 18H, 2 Boc).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>CN, 70°C) δ: 174.6 (2 COCH<sub>3</sub> NAc); 171.6-169.8 (6 COCH<sub>3</sub> OAc); 153.9 (2 CO NBoc); 100.6 (**C-1<sup>B</sup>**); 91.9 (**C-1<sup>A</sup>**); 86.0 (2 C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 77.3 (**C-4<sup>A</sup>**); 73.1, 72.8 (**C-5<sup>A</sup>** and **C-5<sup>B</sup>**); 71.8 (**C-3<sup>B</sup>**); 71.3 (**C-4<sup>B</sup>**); 70.5 (**C-3<sup>A</sup>**); 63.5, 63.3 (**C-6<sup>A</sup>** and **C-6<sup>B</sup>**); 57.6 (**C-2<sup>A</sup>**); 28.6, 28.5 (2 C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27.5, 27.3 (2 COCH<sub>3</sub> NAc); 21.8-21.0 (6 COCH<sub>3</sub> OAc).

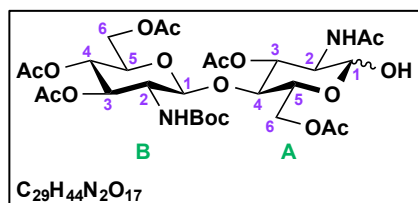
Rf: 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 98:2).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculated for C<sub>38</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>21</sub><sup>+</sup> 899.3268 [M+Na<sup>+</sup>]; found 899.3297.

IR: ν (cm<sup>-1</sup>) = 2984, 1748, 1693, 1369, 1224, 1149, 1045, 1021.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -1.40 (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

**2-(tert-butoxycarbonylamino)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-deoxy-D-glucopyranose (133)**



To a solution of **(131)** (40.0 mg, 0.052 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (640 μL) was added hydrazine acetate salt (17.8 mg, 0.19 mmol, 3.5 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction

mixture was then diluted with EtOAc (10mL), washed with brine (2 x 10 mL) and the organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The obtained residue was purified by silica gel column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 97:3 then 96:4) to give product **(133)** (27.3 mg, α/β mixture, 76%) as a white amorphous solid.

α/β mixture 4:1 (H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>CN + εHCO<sub>2</sub>H)

<sup>1</sup>H NMR α isomer (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.36 (d, 1H,  $J_{NH^A,2^A}$  9.8 Hz, NH<sup>A</sup>); 5.68 (dd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  11.3,  $J_{3^A,4^A}$  8.5 Hz, **H-3<sup>A</sup>**); 5.42 (brs, 1H, OH); 5.19 (brs, 1H, **H-1<sup>A</sup>**); 5.05 (dd, 1H,  $J_{3^B,4^B}$  9.6,  $J_{4^B,5^B}$  9.6 Hz, **H-4<sup>B</sup>**); 4.94-4.87 (d, 1H, NH<sup>B</sup>); 4.91 (dd, 1H,  $J_{2^B,3^B}$  10.4,  $J_{3^B,4^B}$  9.6 Hz, **H-3<sup>B</sup>**); 4.41 (dd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$  12.3,  $J_{5^B,6a^B}$  3.7 Hz, **H-6a<sup>B</sup>**); 4.33 (dd, 1H,  $^2J_{6a^A,6b^A}$  12.2,  $J_{5^A,6a^A}$  1.7 Hz, **H-6a<sup>A</sup>**); 4.27 (ddd, 1H,  $J_{2^A,3^A}$  11.3,  $J_{NH^A,2^A}$  9.8,  $J_{1^A,2^A}$  3.1 Hz, **H-2<sup>A</sup>**); 4.13-4.06 (m, 2H, **H-1<sup>B</sup>** and **H-6b<sup>A</sup>**); 4.02 (brd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  10.2 Hz, **H-5<sup>A</sup>**); 3.99 (brd, 1H,  $^2J_{6a^B,6b^B}$

12.3 Hz, **H-6<sup>B</sup>**); 3.75-3.65 (m, 1H, **H-2<sup>B</sup>**); 3.68 (dd, 1H,  $J_{4^A,5^A}$  10.2,  $J_{3^A,4^A}$  8.5 Hz, **H-4<sup>A</sup>**); 3.52 (brd, 1H,  $J_{4^B,5^B}$  9.6 Hz, **H-5<sup>B</sup>**); 2.15-1.95 (5 s, 18H, 6 **Ac**); 1.37 (s, 9H, **Boc**).

**<sup>13</sup>C NMR  $\alpha$  isomer (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 171.5-169.4 (6 COCH<sub>3</sub>); 156.8 (CO Boc); 103.3 (**C-1<sup>B</sup>**); 92.1 (**C-1<sup>A</sup>**); 81.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 77.0 (**C-4<sup>A</sup>**); 72.4 (**C-3<sup>B</sup>**); 71.9 (**C-5<sup>B</sup>**); 71.0 (**C-3<sup>A</sup>**); 68.4 (**C-5<sup>A</sup>**); 68.0 (**C-4<sup>B</sup>**); 61.9 (**C-6<sup>B</sup>**); 61.6 (**C-6<sup>A</sup>**); 55.8 (**C-2<sup>B</sup>**); 52.0 (**C-2<sup>A</sup>**); 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 23,2-20.6 (6 COCH<sub>3</sub>).

**Rf**: 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 94:6).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)**: calculated for C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub><sup>+</sup> 693.2713 [M+H<sup>+</sup>]; found 693.2718.

**IR**:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3363, 2938, 1744, 1694, 1664, 1534, 1369, 1235, 1165, 1041.

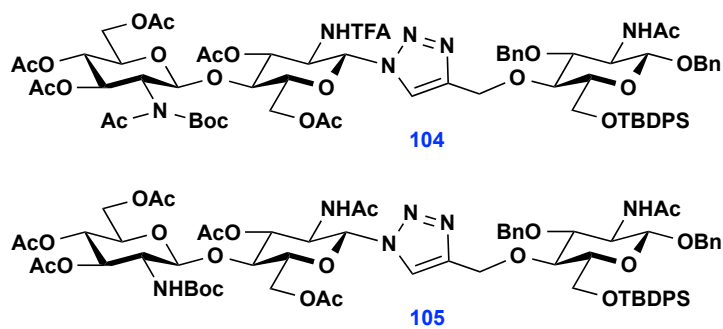
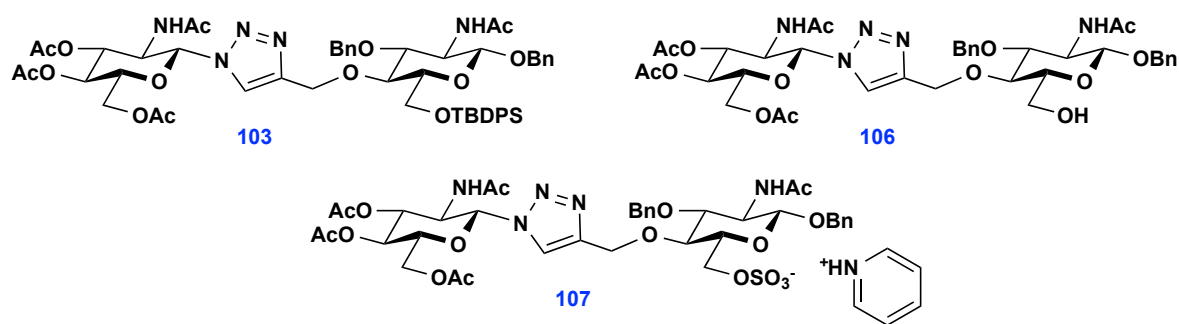
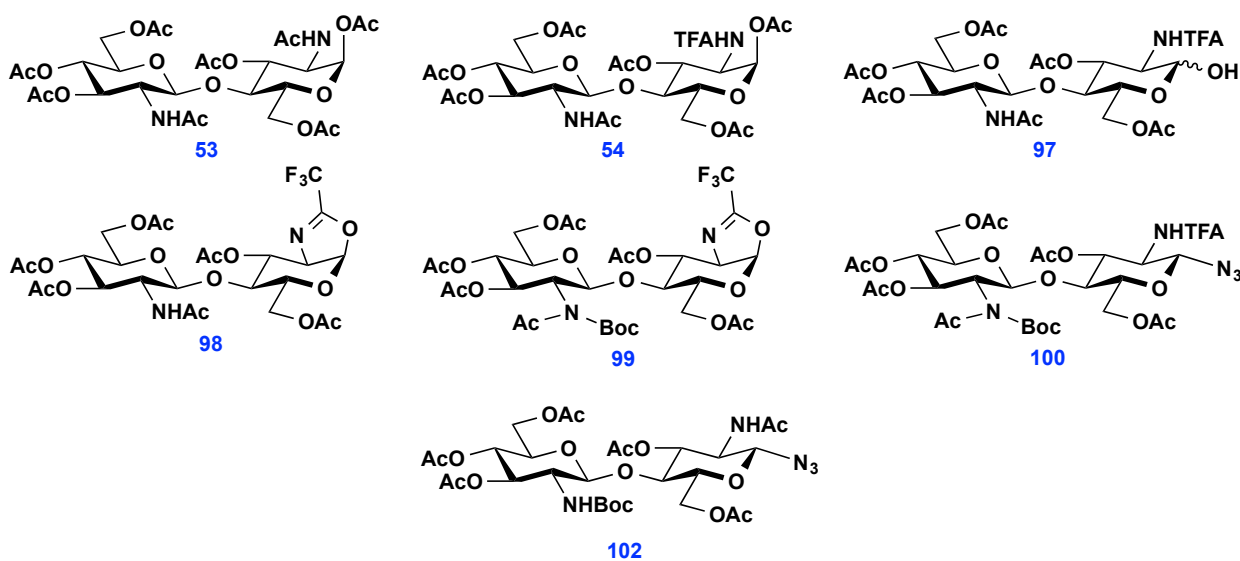
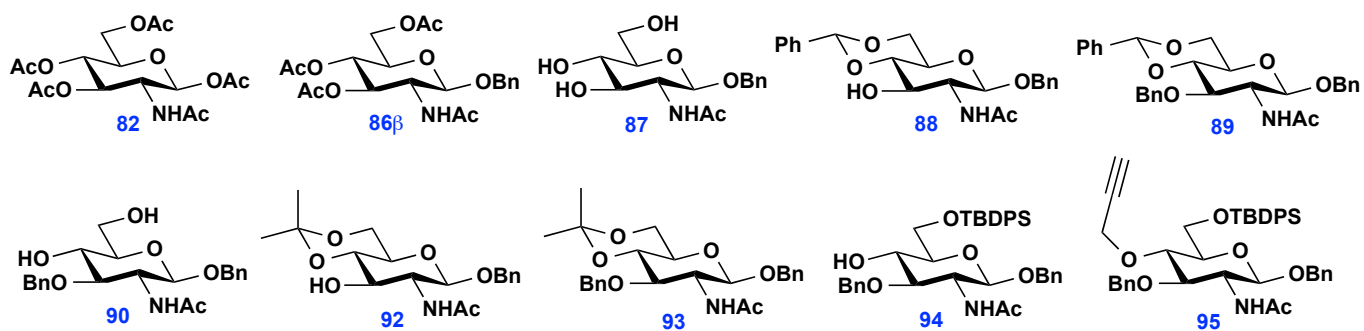
## II. BIOLOGICAL SECTION

### General procedure for equilibrium binding assays

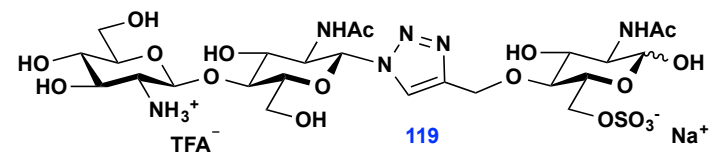
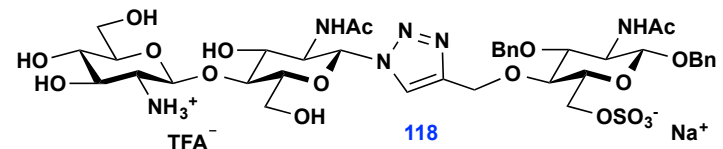
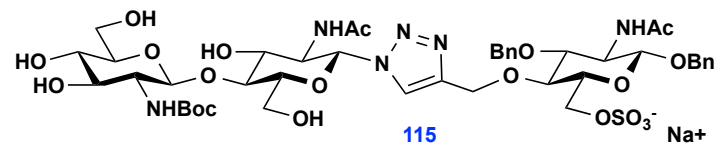
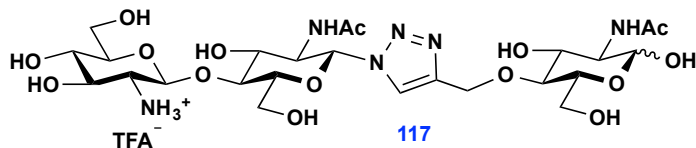
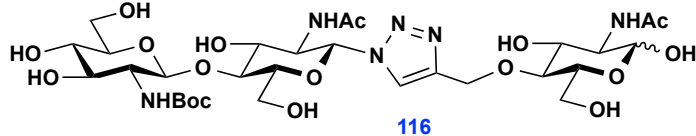
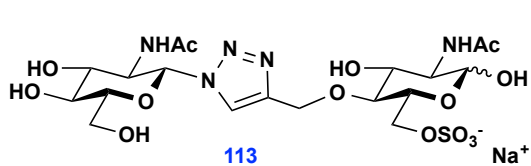
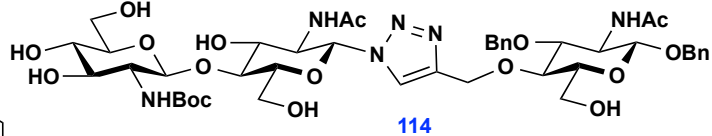
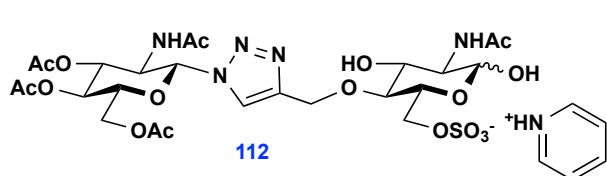
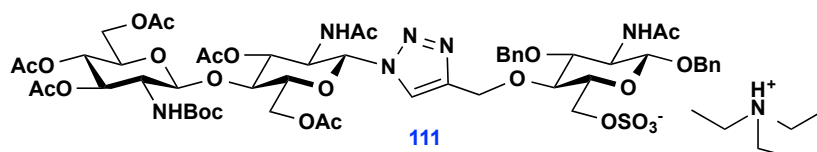
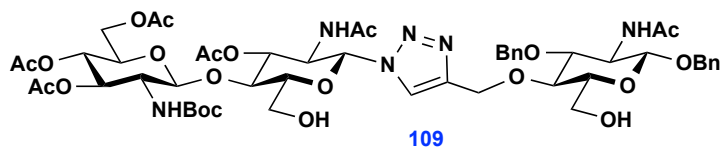
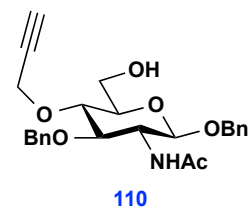
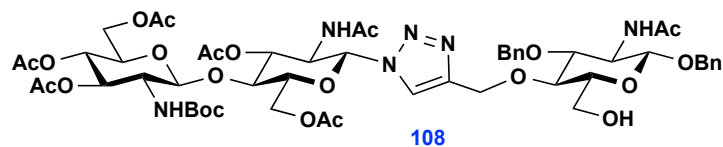
Membrane protein fraction (10  $\mu\text{g}$ ) was incubated in the presence of LCO-IV (C16:2,<sup>35</sup>S) (0.5 nM) and different cold competitor in binding buffer (pH 6.0, saccharose 0.25 M, Na-cacodylate 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1 mM, leupeptine 2 mM, total volume 200  $\mu\text{l}$ ). All assays were performed in triplicate. Incubations were performed 1 h at 0°C in 96-well microtiter polystyrene plates (Nunc), filtered through filtermats (1,5  $\mu\text{m}$  sieve) with a Skatron Cell Harvester. Each filterdisk (9 mm diameter) was washed (Tris-HCl buffer pH 7.0,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM) and then transferred into scintillation vials and radioactivity was measured scintillation spectroscopy with RADLIG software version 4 (Biosoft, Cambridge, UK).

The total binding component was determined by incubation without cold competitor. The nonspecific binding component was determined in the presence of LCO-IV (C16:2,S) competitor (1  $\mu\text{M}$ ) and subtracted from total binding to obtain specific binding. Competition assays were performed by using LCO analogs **(122)**, **(123)**, **(124)** and **(125)** (2  $\mu\text{M}$ ) as competitor.



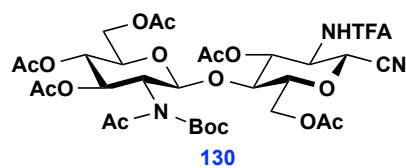
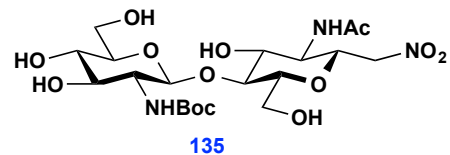
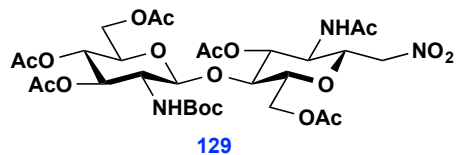
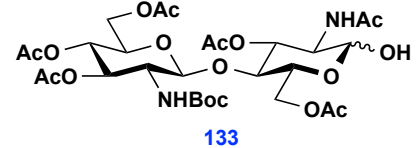
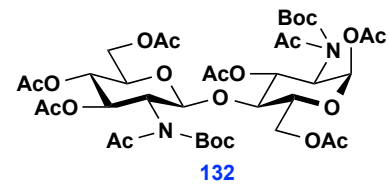
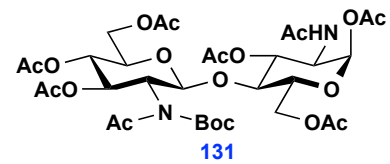
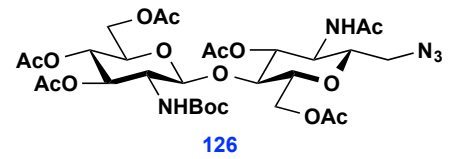
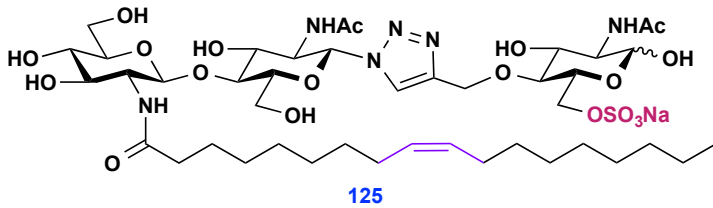
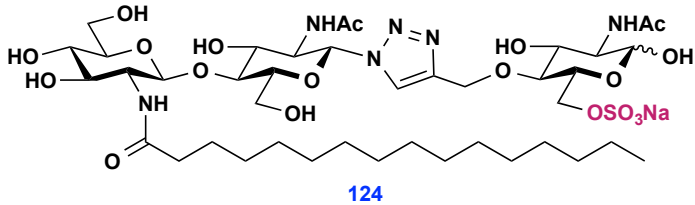
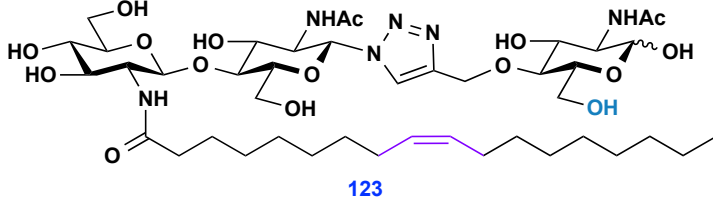
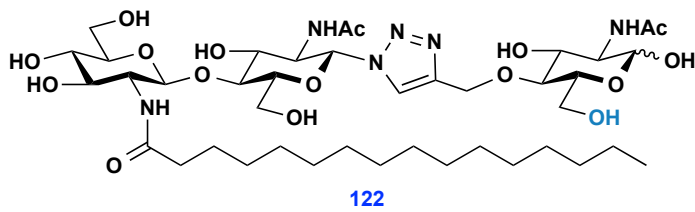
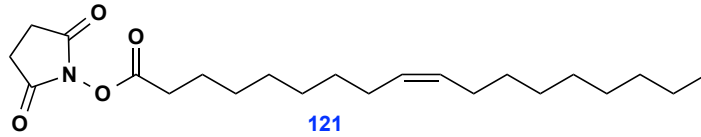
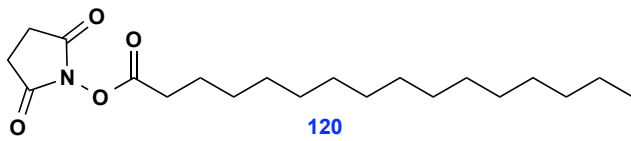














# BIBLIOGRAPHIE ET RESUME



- [1] Brundrett, M. C., *Plant Soil*, **2009**, 320, 37-77.
- [2] Smith, S. E. ; Read, D. J., *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed., Academic Press, **2008**.
- [3] Herendeen, P. S. ; Magallón-Puebla, S. ; Lupia, R. ; Crane, P. R. ; Kobylinska, J., *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **1999**, 86, 407-471.
- [4] Vincent, J. dans *Biology of Nitrogen Fixation*, A. Quispel ed., North Holland Press, Amsterdam, **1974**, 265-341.
- [5] Cohn, J. ; Day, R. B. ; Stacey, G., *Trends Plant Sci.*, **1998**, 3, 105-110.
- [6] Peters, N. K. ; Frost, J. W. ; Long, S. R., *Science*, **1986**, 233, 977-980.
- [7] (a) Lerouge, P. ; Roche, P. ; Faucher, C. ; Maillet, F. ; Truchet, G. ; Promé, J.-C. ; Dénarié, J., *Nature*, **1990**, 344, 781-784 ; (b) Truchet, G. ; Roche, P. ; Vasse, J. ; Camut, S. ; de Billy, F. ; Promé, J.-C. ; Dénarié, J., *Nature*, **1991**, 351, 670-673.
- [8] Rossen, L. ; Davis, E. O. ; Johnston, A. W. B., *Trends Biochem. Sci.*, **1987**, 12, 430-433.
- [9] Peters, N. K. ; Long, S. R., *Plant Physiol.*, **1988**, 88, 396-400.
- [10] Kondorosi, E. ; Banfalvi, Z. ; Kondorosi, A., *Mol. Gen. Genet.*, **1984**, 193, 445-452.
- [11] Van Rhijn, P. ; Vanderleyden, J., *Microbiol. Rev.*, **1995**, 59, 124-142.
- [12] (a) Mulligan, J. T. ; Long, S. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 6609-6613. (b) Peters, N. K. ; Verma, D. P. S., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1990**, 3, 4-8.
- [13] Spaink, H. P. ; Wijffelman, C. A. ; Pees, E. ; Okker, P. J. H. ; Lugtenberg, B. J. J., *Nature*, **1987**, 328, 337-340.
- [14] Schultze, M. ; Kondorosi, A., *Annu. Rev. Genet.*, **1998**, 32, 33-57.
- [15] Exemples de récepteurs : (a) NFR1/NFR5 *Lotus japonicus* : Radutoiu, S. ; Madsen, L. H. ; Madsen, E. B. ; Felle, H. H. ; Umehara, Y. ; Grønlund, M. ; Sato, S. ; Nakamura, Y. ; Tabata, S. ; Sandal, N. ; Stougaard, J., *Nature*, **2003**, 425, 585-592. (b) LYK3/NFP *Medicago truncatula* : Limpens, E. ; Franken, C. ; Smit, P. ; Willemse, J. ; Bisseling, T. ; Geurts, R., *Science*, **2003**, 302, 630-633.
- [16] Riely, B. K. ; Ané, J.-M. ; Penmetsa, R. V. ; Cook, D. R., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2004**, 7, 408-413.
- [17] McCoy, E., *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1932**, 110, 514-533.
- [18] (a) Ehrhardt, D. W. ; Wais, R. ; Long, S. R., *Cell*, **1996**, 85, 673-681. (b) 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] (a) Murray, J. D. ; Karas, B. J. ; Sato, S. ; Tabata, S. ; Amyot, L. ; Szczyglowski, K., *Science*, **2007**, 315, 101-104. (b) Tirichine, L. ; Sandal, N. ; Madsen, L. H. ; Radutoiu, S. ; Albrektsen, A. S. ; Sato, S. ; Asamizu, E. ; Tabata, S. ; Stougaard, J., *Science*, **2007**, 315, 104-107.
- [20] Oldroyd, G. E. D., *Science*, **2007**, 315, 52-53.
- [21] (a) Hirsch, A. M., *New Phytol.*, **1992**, 122, 211-237. (b) Oldroyd, G. E. D. ; Murray, J. D. ; Poole, P. S. ; Downie, J. A., *Annu. Rev. Genet.*, **2011**, 45, 119-144.
- [22] Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R. ; Bono, J.-J., *Trends Plant Sci.*, **2001**, 6, 24-30.
- [23] Parniske, M., *Nat. Rev. Microbiol.*, **2008**, 6, 763-775.
- [24] Bonfante, P. Genre, A. ; *Nat. Commun.*, **2010**, 1, 48.
- [25] (a) Karandashov, V. ; Bucher, M., *Trends Plant Sci.*, 2005, 10, 22-29. (b) Bucher, M., *New Phytol.*, **2007**, 173, 11-26. (c) López-Arredondo, D. L. ; Leyva-González, M. A. ; González-Morales, S. I. ; López-Bucio, J. ; Herrera-Estrella, L., *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2014**, 65, 95-123.
- [26] Hodge, A. ; Campbell, C. D. ; Fitter, A., *Nature*, **2001**, 413, 297-299.
- [27] Marschner, H. ; Dell, B., *Plant Soil*, **1994**, 159, 89-102.
- [28] (a) Safir, G. R. ; Boyer, J. S. ; Gerdemann, J. W., *Science*, **1971**, 172, 581-583. (b) Duddridge, J. A. ; Malibari, A. ; Read, D. J., *Nature*, **1980**, 287, 834-836.
- [29] Bowen, G. D. ; Bevege, D. I. ; Mosse, B. dans Sanders, F. E. ; Mosse, B. ; Tinker, P. B., *Endomycorrhizas*, Academic Press, London, **1975**, 241-260.
- [30] Aroca, R. ; Porcel, R. ; Ruiz-Lozano, J. M., *New phytol.*, **2007**, 173, 808-816.
- [31] Augé, R. M., *Mycorrhiza*, **2001**, 11, 3-42.
- [32] Hartley, J. ; Cairney, W. G. ; Meharg, A. A., *Plant Soil*, **1997**, 189, 303-319.
- [33] Andrade, G. ; Mihara, K. L. ; Linderman, R. G. ; Bethlenfalvay, G. J., *Plant Soil*, **1998**, 202, 89-96.
- [34] (a) Whipps, J. M., *Can. J. Bot.*, **2004**, 82, 1198-1227. (b) 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. (c) Pozo, M. J. ; Azcón-Aguilar, C., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2007**, 10, 393-398.
- [35] Azcón-Aguilar, C. ; Barea, J. M., *Mycorrhiza*, **1996**, 6, 457-464.
- [36] Trofast, J. ; Wickberg, B., *Tetrahedron*, **1977**, 33, 875-879.
- [37] Liu, J. ; Maldonado-Mendoza, I. ; Lopez-Meyer, M. ; Cheung, F. ; Town, C. D. ; Harrison, M. J., *Plant J.*, **2007**, 50, 529-544.

- [38] LePage, B. A. ; Currah, R. S. ; Stockey, R. A. ; Rothwell, G. W., *Am. J. Bot.*, **1997**, 84, 410-412.
- [39] Hawksworth, D. L., *Mycol. Res.*, **2001**, 105, 1422-1432.
- [40] Tedersoo, L. ; May, T. W. ; Smith, M. E., *Mycorrhiza*, **2010**, 20, 217-263.
- [41] Horton, T. R. ; Bruns, T. D., *Molecular Ecology*, **2001**, 10, 1855-1871.
- [42] Franck, A. B., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **1885**, 3, 128-145.
- [43] Simon, L. ; Bousquet, J. ; Lévesque, R. C. ; Lalonde, M., *Nature*, **1993**, 363, 67-69.
- [44] (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.
- [45] (a) Pirozinsky, 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.
- [46] Schüßler, A. ; Schwarzott, D. ; Walker, C., *Mycol. Res.*, **2001**, 105, 1413-1421.
- [47] Harrison, M. J., *Annu. Rev. Microbiol.*, **2005**, 59, 19-42.
- [48] Raudaskoski, M. ; Kothe, E., *Mycorrhiza*, **2015**, 25, 243-252.
- [49] 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, 179-189.
- [50] (a) Siquiera, J. O. ; Nair, M. G. ; Hammerschmidt, R. ; Safir, G.R., *Crit. Rev. Plant Sci.*, **1991**, 10, 63-121. (b) Vierheilig, H. ; Piché, Y. dans Buslig, B. S. ; Mantley, J. A., *Flavonoids in cell functions*, New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2002**, 23-39.
- [51] Bécard, G. ; Taylor, L. P. ; Douds, D. D. ; Pfeffer, P. E. ; Doner, L. W., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1995**, 8, 252-258.
- [52] (a) Akiyama, K. ; Matsuzaki, K.-I. ; Hayashi, H., *Nature*, **2005**, 435, 824-827. (b) 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.
- [53] (a) Cook, C. E. ; Whichard, L. P. ; Turner, B. ; Wall, M. E. ; Egly, G. H., *Science*, **1966**, 154, 1189-1190.
- [54] Xie, X. ; Yoneyama, K. ; Yoneyama, K., *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2010**, 48, 93-117.
- [55] (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.
- [56] (a) 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. (b) Lopez-Obando, M ; Ligerot, Y. ; Bonhomme, S. ; Boyer, F.-D. ; Rameau, C., *Development*, **2015**, 142, 3615-3619.
- [57] Mailliet, 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, 58-64.
- [58] Oláh, B. ; Brière, C. ; Bécard, G. ; Dénarié, J. ; Gough, C., *Plant J.*, **2005**, 44, 195-207.
- [59] (a) Laressergues, D. ; André, O. ; Peng, J. ; Wen, J. ; Chen, R. ; Ratet, P. ; Tadege, M. ; Mysore, K. S. ; Rochange, S. F., *J. Exp. Bot.*, **2015**, 66, 1237-1244. (b) Liu, W. ; Kohlen, W. ; Lillo, A. ; Op den Camp, R. ; Ivanov, S. ; Hartog, M. ; Limpens, E. ; Jamil, M. ; Smaczniak, C. ; Kaufmann, K. ; Yang, W.-C. ; Hooiveld, G. J. E. J. ; Charnikhova, T. ; Bouwmeester, H. J. ; Bisseling, T. ; Geurts, R., *Plant Cell*, **2011**, 23, 3853-3865.
- [60] Sun, J. ; Miller, J. B. ; Granqvist, E. ; Wiley-Kalil, A. ; Gobbato, E. ; Mailliet, F. ; Cottaz, S. ; Samain, E. ; Venkateshwaran, M., Fort, S. ; Morris, R. J. ; Ané, J.-M. ; Dénarié, J. ; Oldroyd, G. E. D., *Plant Cell*, **2015**, 27, 823-838.
- [61] Paszkowski, U. ; *New Phytol.*, **2006**, 172, 35-46.
- [62] (a) Pumplun, N. ; Mondo, S. J. ; Topp, S. ; Starker, C. G. ; Gantt, J. S. ; Harrison, M. J., *Plant J.*, **2010**, 61, 482-494. (b) Camps C. ; Jardinaud, M.-F. ; Rengel, D. ; Carrère, S. ; Hervé, C. ; Debelle, F. ; Gamas, P. ; Bensmihen, S. ; Gough, C., *New phytol.*, **2015**, 208, 224-240 (c) Gobbato, E., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2015**, 26, 1-7
- [63] Venkateshwaran, M. ; Volkening, J. D. ; Sussman, M. R. ; Ané, J.-M., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2013**, 16, 118.
- [64] Hiruma, K. ; Gerlach, N. ; Sacristán, S. ; Nakano, R. T. ; Hacquard, S. ; Krachner, B. ; Neumann, U. ; Ramírez, D. ; Bucher, M. ; O'Connell, R. J. ; Schulze-Lefert, P., *Cell*, **2016**, 165, 464-474.
- [65] (a) van der Heijden, M. G. A. ; de Bruin, S. ; Luckerhoff, L. ; van Logtestijn, R. S. P. ; Schlaeppi, K., *ISME J.*, **2016**, 10, 389-399. (b) Venturi, V. ; Keel, C., *Trends Plant Sci.*, **2016**, 21, 187-198. (c) van der Heijden, M. G. A. ; Martin, F. M. ; Selosse, M.-A. ; Sanders, I. R., *New Phytol.*, **2015**, 205, 1406-1423.
- [66] Hume, D. J. ; Blair, D. H., *Can. J. Microbiol.*, **1992**, 38, 588-593.

- [67] Schultze, M. ; Kondorosi, A., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1996**, 6, 631-638.
- [68] Tanaka, K. ; Cho, S.-H. ; Lee, H. ; Pham, A. Q. ; Batek, J. M. ; Cui, S. ; Qiu, J. ; Khan, S. M. ; Joshi, T. ; Zhang, Z. J. ; Xu, D. ; Stacey, G., *J. Exp. Bot.*, **2015**, 66, 5727-5738.
- [69] Fliegmann, J. ; Bono, J.-J., *Glycoconj. J.*, **2015**, 32, 455-464.
- [70] Dénarié, J. ; Debelle, F. ; Promé, J.-C., *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 503-535.
- [71] Perret, X. ; Staehelin, C. ; Broughton, W. J., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2000**, 180-201.
- [72] Beau, J.-M., *Chimia*, **2011**, 65, 45-48.
- [73] Nicolaou, K. C. ; Bockovich, N. J. ; Carcanague, D. R. ; Hummel, C. W. ; Even, L. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 8701-8702.
- [74] Suzuki, K. ; Maeta, H. ; Suzuki, T. ; Matsumoto, T., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 6879-6882
- [75] (a) Wang, L.-X. ; Li, C. ; Wang, Q.-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., Perkin Trans. 1*, **1994**, 621-628.
- [76] Grundler, G. ; Schmidt, R. R., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 135, 203-218.
- [77] Tailler, D. ; Jacquinet, J. C. ; Beau, J. M., *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.*, **1994**, 1827-1828.
- [78] Tailler, D. ; Jacquinet, J.-C. ; Noirot, A.-M. ; Beau, J.-M., *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, **1992**, 3163-3164.
- [79] Debenham, J. S. ; Rodebaugh, R. ; Fraser-Reid, B., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4591-4600
- [80] Scholla, M. H. ; Elkan, G. H., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1984**, 484-486.
- [81] Fraser-Reid, B. ; Udogong, U. E. ; Wu, Z. ; Ottoson, H. ; Merrit, J. R. ; Srinivas Rao, C. ; Roberts, C. ; Madsen, R., *Synlett*, **1992**, 927-942.
- [82] Lobry de Bruyn, C. A. ; Alberda van Ekenstein, W., *Ber.*, **1895**, 28, 3078-3082
- [83] Samain, E. ; Drouillard, S. ; Heyraud, A. ; Driguez, H. ; Geremia, R. A., *Carbohydr. Res.*, **1997**, 302, 35-42.
- [84] Rasmussen, M. O. ; Hogg, B. ; Bono, J.-J. ; Samain, E. ; Driguez, H., *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1908-1910.
- [85] Samain, E. ; Chazalet, V. ; Geremia, R. A., *J. Biotechnol.*, **1999**, 72, 33-47.
- [86] Chambon, R. ; Despras, G. ; Brossay, A. ; Vauzeilles, B. ; Urban, D. ; Beau, J.-M. ; Armand, S. ; Cottaz, S. ; Fort, S., *Green Chem.*, **2015**, 17, 3923-3930.
- [87] Despras, G. ; Alix, A. ; Urban, D. ; Vauzeilles, B. ; Beau, J.-M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 11912-11916.
- [88] Gillard, L. ; Tran, A.-T. ; Boyer, F.-D. ; Beau, J.-M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 1103-1109.
- [89] Gillard, L. ; Stévenin, A. ; Schmitz-Afonso, I. ; Vauzeilles, B. ; Boyer, F.-D. ; Beau, J.-M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 7382-7390.
- [90] Price, N. P. J. ; Relić, B. ; Talmont, F. ; Lewin, A. ; Promé, D. ; Pueppke, S. G. ; Maillet, F. ; Dénarié, J. ; Promé, J.-C. ; Broughton, W. J., *Mol. Microbiol.*, **1992**, 6, 3575-3584.
- [91] Sedinkin, S. L. ; Zinin, A. I. ; Malysheva, N. N. ; Shashkov, A. S. ; Torgov, V. I. ; Shibaev, V. N., *Mendeleev Commun.*, **2007**, 17, 10-13.
- [92] Belot, F. ; Jacquinet, J.-C., *Carbohydr. Res.*, **1996**, 290, 79-86.
- [93] (a) Gadella, Jr., T. W. J. ; Vereb, Jr., G. ; Hadri, A.-E. ; Röhrig, H. ; Schmidt, J. ; John, M. ; Schell, J. ; Bisseling, T., *Biophys. J.* ; **1997**, 72, 1986-1996. (b) Goedhart, J. ; Röhrig, H. ; Hink, M. A. ; van Hæk, A. ; Visser, A. J. W. G. ; Bisseling, T. ; Gadella, Jr., T. W. J., *Biochemistry*, **1999**, 38, 10898-10907.
- [94] Broghammer, A. ; Krusell, L. ; Blaise, M. ; Sauer, J. ; Sullivan, J. T. ; Maolanon, M. ; Vinther, M. ; Lorentzen, A. ; Madsen, E. B. ; Jensen, K. J. ; Roepstorff, P. ; Thirup, S. ; Ronson, C. W. ; Thygesen, M. B. ; Stougaard, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 13859-13864.
- [95] (a) Seidel, S. A. I. ; Dijkman, P. M. ; Lea, W. A. ; van der Bogaart, G. ; Jerabek-Willemsen, M. ; Lazic, A. ; Joseph, J. S. ; Srinivasan, P. ; Baaske, P. ; Simeonov, A. ; Katritch, I. ; Melo, F. ; A. ; Ladbury, J. E. ; Schreiber, G. ; Watts, A. ; Braun, D. ; Duhr, S., *Methods*, **2013**, 59, 301-315. (b) Jerabek-Willemsen, M. ; André, T. ; Wanner, R. ; Roth, H. M. ; Duhr, S. ; Baaske, P. ; Breitsprecher, D., *J. Mol. Struct.*, **2014**, 1077, 101-113.
- [96] 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.
- [97] Grenouillat, N. ; Vauzeilles, B. ; Bono, J.-J. ; Samain, E. ; Beau, J.-M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 4644-4646.
- [98] Beau, J.-M. ; Dénarié, J. ; Greiner, A. ; Grenouillat, N. ; Maillet, F. ; Vauzeilles, B., *WO 2005/063784 A1*, **2005**
- [99] Morais, L. L. ; Bennis, K. ; Ripoché, I. ; Liao, L. ; Auzanneau, F.-I. ; Gelas, J., *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 1369-1379.
- [100] (a) Robina, I. ; López-Barba, E. ; Fuentes, J., *Tetrahedron*, **1996**, 52, 10771-10784. (b) Robina, I. ; Gómez-Bujedo, S. ; Fernández-Bolaños, J. ; G. ; Fuentes J. ; Spink, H. P., *Tetrahedron*, **2002**, 58, 521-530.



- [101] Bakkers, J. ; Semino, C. E. ; Stroband, H. ; Kijne, J. W. ; Robbins, P. W. ; Spaink, H. P., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, 94, 7982-7986.
- [102] 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. ; Imberly, A. ; Cullimore, J. ; Bono, J.-J., *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8, 1900-1906.
- [103] Bono, J.-J. ; Riond, J. ; Nicolaou, K. C. ; Bockovich, N. J. ; Estevez, V. A. ; Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R., *Plant J.*, **1995**, 7, 253-260.
- [104] Niebel, A ; Bono, J.-J. ; Ranjeva, R. ; Cullimore, J. V., *Mol. Plant Microbe Interact.*, **1997**, 10, 132-134.
- [105] Gressent, F. ; Drouillard, S. ; Mantegazza, N. ; Samain, E. ; Geremia, R. A. ; Canut, H. ; Niebel, A. ; Driguez, H. ; Ranjeva, R. ; Cullimore, J. V. ; Bono, J.-J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 4704-4709.
- [106] Hogg, B. V. ; Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R. ; Bono, J.-J., *Plant Physiol.*, **2006**, 140, 365-373.
- [107] Arrighi, J.-F. ; Barre, A. ; Ben Amor, B. ; Bersoult, A. ; Campos Soriano, L. ; Mirabella, R. ; de Carvalho-Niebel, F. ; Journet, E.-P. ; Ghérardi, M. ; Huguet, T. ; Geurts, R. ; Dénarié, J. ; Rougé, P. ; Gough, C., *Plant Physiol.*, **2006**, 142, 265-279.
- [108] Goodin, M. M. ; Zaitlin, D. ; Naidu, R. A. ; Lommel, S. A., *Mol. Plant Microbe Interact.*, **2008**, 21, 1015-1026.
- [109] Pietraszewska-Bogiel, A. ; Levebvre, B. ; Koini, M. A. ; Klaus-Heisen, D. ; Takken, F. L. W. ; Geurts, R. ; Cullimore, J. V. ; Gadella, T. W. J., *PLoS One*, **2013**, 8, e65055.
- [110] Liu, T. ; Liu, Z. ; Song, C. ; Hu, Y. ; Han, Z. ; She, J. ; Fan, F. ; Wang, J. ; Jin, C. ; Chang, J. ; Zhou, J.-M. ; Chai, J., *Science*, **2012**, 336, 1160-1164.
- [111] Malkov, N. ; Fliegmann, J. ; Rosenberg, C. ; Gascioli, V. ; Timmers, A. C. J. ; Nurisso, A. ; Cullimore, J. V. ; Bono, J.-J., *Biochem. J.*, **2016**, 473, 1369-1378.
- [112] Huisgen, R., *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 357-396.
- [113] (a) Tornøe, C. W. ; Christensen, C. ; Meldal, M., *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064. (b) Rostovtsev, V. V. ; Green, L. G. ; Fokin, V. V., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41(14), 2596-2599.
- [114] Kolb, H. C. ; Finn, M. G. ; Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021
- [115] (a) Lutz, J.-F. ; Zarfshani, Z., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 958-970. (b) Hein, C. D. ; Liu, X.-M. ; Wang, D., *Pharm. Res.*, **2008**, 25, 2216-2230.
- [116] Tiwari, V. K. ; Mishra, B. B. ; Mishra, K. B. ; Mishra, N. ; Singh, A. S. ; Chen, X., *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 3086-3240
- [117] Nikaïdo, H., *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, 78, 119-46.
- [118] Deniaud, D. ; Julienne, K. ; Gouin, S., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 966-979.
- [119] (a) Gouin, S. G. ; Vanquelef, E. ; García Fernández, J. M. ; Ortiz Mellet, C. ; Dupradeau, F.-Y. ; Kovensky, J., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 9032-9045. (b) Almant, M. ; Mastouri, A. ; Gallego-Yerga, L. ; García Fernández, J. M. ; Ortiz Mellet, C. ; Kovensky, J. ; Morandat, S. ; El Kirat, K. ; Gouin, S. G., *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 729-738. (c) Chalopin, T. ; Brissonet, Y. ; Sivignon, A. ; Deniaud, D. ; Cremet, L. ; Barnich, N. ; Bouckaert, J. ; Gouin, S. G., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 11369-11375.
- [120] Fraser, D. W. ; Tsai, T. R. ; Orenstein, W. ; Parkin, W. E. ; Beecham, H. J. ; Sharrar, R. G. ; Harris, J. ; Mallison, G. F. ; Martin, S. M. ; McDade, J. E. ; Shepard, C. C. ; Brachman, P. S., *N. Engl. J. Med.*, **1977**, 297, 1189-1197.
- [121] Dumont, A. ; Malleron, A. ; Awwad, M. ; Dukan, S. ; Vauzeilles, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 3143-3146.
- [122] Chang, P. V. ; Bertozzi, C. R., *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 8864-8879.
- [123] Mas Pons, J. ; Dumont, A. ; Saujeteau, G. ; Fugier, E. ; Baron, A. ; Dukan, S. ; Vauzeilles, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 1275-1278.
- [124] (a) Cheshev, P. ; Marra, A. ; Dondoni, A., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 3225-3227. (b) Lo Conte, M. ; Marra, A. ; Chambery, A. ; Gurcha, S. S. ; Besra, G. S. ; Dondoni, A., *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 6326-6336.
- [125] Vandekerckhove, F. ; Schenkman, S. ; de Carvalho, L. P. ; Tomlinson, S. ; Kiso, M. ; Yoshida, M. ; Hasegawa, A. ; Nussenzweig, V., *Glycobiology*, **1992**, 2, 541-548.
- [126] Campo, V. L. ; Sesti-Costa, R. ; Carneiro, Z. A. ; Silva, J. S. ; Schenkman, S. ; Carvalho, I., *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 145-156.
- [127] François-Heude, M. ; Méndez-Ardoy, A. ; Cendret, V. ; Lafite, P. ; Daniellou, R. ; Ortiz Mellet, C. ; García Fernández, J. M. ; Moreau, V. ; Djedaïni-Pilard, F., *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 1978-1991.
- [128] (a) Salo, W. L. ; Fletcher, Jr., H. G., *J. Org. Chem.*, **1968**, 33, 3585-3588. (b) Stévenin, A. ; Boyer, F.-D. ; Beau, J.-M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 1699-1702. (c) Aguilera, B. ; Fernández-Mayoralas, A. ; Jaramillo, C., *Tetrahedron*, **1997**, 53, 5863-5876.

- [129] Wakamiya, T. ; Yamanoi, K. ; Kanou, K. ; Shiba, T., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 5887-5888.
- [130] Myszk, H. ; Bednarczyk, D. ; Najder, M. ; Wieslaw, K., *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 133-141.
- [131] Pravdić, N. ; Inch, T. D. ; Fletcher, Jr., H. G., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 1815-1818.
- [132] Kelly, N. M. ; Jensen, K. J., *J. Carb. Chem.*, **2001**, 20, 537-548.
- [133] Sowell, C. G. ; Livesay, M. T. ; Johnson, D. A., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 609-610.
- [134] Christensen, H. ; Christiansen, M. S. ; Petersen, J. ; Jensen, H. H., *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 3276-3283.
- [135] Xolin, A. ; Stévenin, A. ; Pucheault, M. ; Norsikian, S. ; Boyer, F.-D. ; Beau, J.-M., *Org. Chem. Front.*, **2014**, 1, 992-1000.
- [136] Kappe, C. O. ; Pieber, B. ; Dallinger, D., *Angew. Essays*, **2013**, 52, 1088-1094.
- [137] Glasnov, T. N. ; Kappe, C. O., *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 11956-11968.
- [138] Zemplén, G. ; Kunz, A., *Chem. Ber.*, **1923**, 56, 1705-1710.
- [139] Zemplén, G. ; Gerecs, A. ; Hadácsy, I., *Chem. Ber.*, **1936**, 69, 1827-1829.
- [140] (a) Gross, P. H. ; Jeanloz, R. W., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 2759-2763. (b) Shaban, M. A. E. ; Jeanloz, R. W., *Carbohydr. Res.*, **1976**, 52, 115-127.
- [141] Bera, S. ; Linhardt, R. J., *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 3181-3193.
- [142] Wood, Jr., H. B. ; Fletcher, Jr., H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 2849-2851.
- [143] Paulsen, H. ; Lorentzen, J. P., Kutschker, W., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 136, 153-176.
- [144] Lubineau, A. ; Augé, C. ; Bouxom, B. ; Gautheron, C., *J. Carb. Chem.*, **1992**, 11, 59-70.
- [145] Thomas, R. L. ; Abbas, S. A. ; Matta, K. L., *Carbohydr. Res.*, **1988**, 183, 163-173.
- [146] Ferro, V. ; Mocerino, M. ; Stick, R. V. ; Tilbrook, M. G., *Aust. J. Chem.*, **1988**, 41, 813-815.
- [147] Dasgupta, F. ; Anderson, L., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 202, 239-255.
- [148] Roche, D. ; Greiner, J. ; Aubertin, A.-M. ; Vierling, P., *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 1568-1581.
- [149] Kasun, Z. A. ; Geary, L. M. ; Kirsche, M. J., *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 7545-7547.
- [150] Bredenkamp, A. ; Zhu, Z.-B. ; Kirsch, S. F., *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 252-254.
- [151] Segat-Dioury, F. ; Mulard, L. A., *Tetrahedron : Asymmetry*, **2002**, 13, 2211-2222.
- [152] Hanessian, S. ; Lavallée, P., *Can. J. Chem.*, **1975**, 53, 2975-2977.
- [153] (a) Corey, E. J. ; Venketeswarlu, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6190-6191. (b) Corey, E. J. ; Varma, R. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 7319-7320.
- [154] Clinch, K. ; Evans, G. B. ; Furneaux, R. H. ; Rendle, P. M. ; Rhodes, P. L. ; Robertson, A. M. ; Rosendale, D. I. ; Tyler, P. C. ; Wright, D. P., *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337, 1095-1111.
- [155] Ireland, R. E. ; Norbeck, D. W. ; Mandel, G. S. ; Mandel, N. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3285-3294.
- [156] Davies, J. S. ; Higginbotham, C. L. ; Tremeer, E. J. ; Brown, C. ; Treadgold, R. C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1992**, 3043-3048.
- [157] Jun Lee, D. ; Yang, S.-H. ; Williams, G. ; Brimble, M. A., *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 7564-7571.
- [158] (a) Muzzarelli, R. ; Jeuniaux, C. ; Gooday, G. W., *Chitin in Nature and Technology*, Plenum, New York, NY, **1986**. (b) Rinaudo, M., *Prog. Polym. Sci.*, **2006**, 31, 603-632.
- [159] Barker, S. A. ; Foster, A. B. ; Stacey, M. ; Webber, J. M., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 2218-2227.
- [160] Rota, P. ; Allevi, P. ; Colombo, R. ; Costa, M. L. ; Anastasia, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1850-1853.
- [161] Tai, V. W.-F. ; Imperiali, B., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 6217-6228.
- [162] Busca, P. ; Martin, O. R., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 8101-8104.
- [163] Rowell, R. M. ; Feather, M. S., *Carbohydr. Res.*, **1967**, 4, 486-491.
- [164] Excoffier, G. ; Gagnaire, G. ; Utile, J.-P., *Carbohydr. Res.*, **1975**, 39, 368-373.
- [165] Trumtel, M. ; Tavecchia, P. ; Veyrières, A. ; Sinaÿ, P., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 191, 29-52.
- [166] Lee, H. Y. ; Kwon, J.-T. ; Koh, M. ; Cho, M.-H. ; Park, S. B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 6335-6339.
- [167] Zhou, W. ; Hsieh, P.-H. ; Xu, Y. ; O'Leary, T. R. ; Huang, X. ; Liu, J., *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 11019-11021.
- [168] (a) Fujinaga, M. ; Matsushima, Y., *Bull. Chem. Soc. J.*, **1963**, 37, 468-470. (b) Henderson, A. S. ; Medina, S. ; Bower, J. F. ; Galan, M. C., *Org. Lett.*, **2015**, 17, 4846-4849.
- [169] Grehn, L. ; Gunnarsson, K. ; Ragnarsson, U., *Chem. Commun.*, **1985**, 1317-1318.
- [170] Flynn, D. L. ; Zelle, R. E. ; Grieco, P. A., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2424-2426.
- [171] Benakli, K. ; Zha, C. ; Kerns, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 9461-9462.
- [172] von Itzstein, M. ; Jin, B. ; Wu, W.-Y. ; Chandler, M., *Carbohydr. Res.*, **1993**, 244, 181-185.
- [173] Wittmann, V. ; Lennartz, D., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 1363-1367.
- [174] Soli, E. D. ; Manoso, A. S. ; Patterson, M. C. ; DeShong, P. ; Favor, D. A. ; Hirschmann, R. ; Smith, A. B., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3171-3177.
- [175] Lee, B.-Y. ; Park, S. R. ; Jeon, H. B. ; Kim, K. S., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 5105-5109.

- [176] (a) Srivastava, P. ; Hindsgaul, O., *Carbohydr. Res.*, **1987**, 161, 195-210. (b) Kobayashi, Y. ; Ishida, N. ; Arai, M. ; Hiraoka, T., *Carbohydr. Res.*, **1991**, 222, 83-97. (c) López-Prados, J. ; Cuevas, F. ; Reichardt, N.-C. ; de Paz, J.-L. ; Morales, E. Q. ; Martín-Lomas, M., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 764-786.
- [177] Rana, S. S. ; Matta, K. L., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 152, 195-203.
- [178] Zhang, W. ; Robins, M. J., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33(9), 1177-1180.
- [179] Verley, A., *Bull. Soc. Chim.*, **1901**, 25, 46-49.
- [180] Guiselet, K. B. ; Ruoff, P. M., *J. Org. Chem.*, **1961**, 1248-1254.
- [181] Jacquinet, J.-C. ; Petipou, M. ; Duchaussoy, P. ; Lederman, I. ; Choay, J. ; Torri, G. ; Sinaÿ, P., *Carbohydr. Res.*, **1984**, 130, 221-241.
- [182] (a) Macchione, G. ; de Paz, J. L. ; Nieto, P. M., *Carbohydr. Res.*, **2014**, 394, 17-25. (b) Leshch, Y. ; Jacobsen, A. ; Thimm, J. ; Thiem, J., *Org. Lett.*, **2013**, 15, 4948-4959. (c) Sundberg, R. L. ; McCloskey, C. M. ; Rees, D. E. ; Coleman, G. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, 67, 1080-1084.
- [183] Mandal, P. K. ; McMurray, J. S., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 6599-6601.
- [184] (a) Pfäffli, P. J. ; Hixson, S. H. ; Anderson, L., *Carbohydr. Res.*, **1972**, 23, 195-206. (b) Keck, G. E. ; Kachensky, D. F. ; Enholm, E. J., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 4317-4325. (c) Yamaguchi, S. ; Tanaka, H. ; Takahashi, T., *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 4939-4943.
- [185] Witczak, Z. J. ; Whistler, R. L., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 150, 121-131.
- [186] Meier, L. ; Monteiro, G. C. ; Baldissera, R. A. M. ; Mandolesi Sá, M., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21, 859-866.
- [187] Stahl, G. L. ; Walter, R. ; Smith, C. W., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2285-2286.
- [188] (a) Compostella, F. ; Ronchi, S. ; Panza, L. ; Mariotti, S. ; Mori, L. ; De Libero, G. ; Ronchetti, F., *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 5587-5595. (b) Kato, Y. ; Mizukoshi, T. ; Suzuki, Y. ; Sato, S., Patent Appl. No. PCT/JP2012/066534, **2012**.
- [189] Ru Hwu, J. ; Jain, M. L. ; Tsay, S.-C., Hakimelahi, G. H., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2035-2038.
- [190] Wang, J. ; Liang, Y.-L. ; Qu, J., *Chem. Commun.*, **2009**, 5144-5146.
- [191] (a) Kantor, T. G. ; Schubert, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 79, 152-153. (b) Lloyd, P. F. ; Forrester, P. F., *Carbohydr. Res.*, **1971**, 19, 430-431.
- [192] Isidro-Llobet, A. ; Álvarez, M. ; Albericio, F., *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 2455-2504.
- [193] Bergmann, M. ; Zervas, L., *Chem. Ber.*, **1932**, 65, 1201-1205.
- [194] Doherty, D. G. ; Popenoe, E. A. ; Link, K. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3466-3468.
- [195] (a) Bonner, W. A. ; McNamee, P. I., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 2554-2555. (b) Sheehan, J. C. ; Hess, G. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 1067-1068.
- [196] (a) Yoshimura, J. ; Sato, K.-I. ; Aqeel, A. ; Singh, R. B. ; Hashimoto, H., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 144, C15-C17. (b) Sheehan, J. C. ; Cruickshank, P. A. ; Boshart, G. L., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 2525-2528.
- [197] Rich, D. H. ; Singh, J. dans Gross, E. ; Meienhofer, J., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic Press, New York, **1979**, 1, 241-261.
- [198] (a) Baisch, G. ; Öhrlein, R., *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 1673-1682. (b) Dourtoglou, V. ; Ziegler, J.C. ; Gross, B., *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 15, 1269-1272.
- [199] (a) Griffith, B. R. ; Krepel, C. ; Fu, X. ; Blanchard, S. ; Ahmed, A. ; Edmiston, C. E. ; Thorson, J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 8150-8155. (b) Anderson, G. W. ; Zimmerman, J. E. ; Callahan, F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1839-1842. (c) Lapidot, Y. ; Rappoport, S. ; Wolman, Y., *J. Lipid Res.*, **1967**, 8, 142-145.
- [200] Ikeshita, S. ; Sakamoto, A. ; Nakahara, Yu. ; Nakahara, Yo. ; Ogawa, T., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 3123-3126.
- [201] Shen, G. ; Fang, H. ; Song, Y. ; Bielska, A. A. ; Wang, Z. ; Taylor, J.-S. A., *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 1729-1736.
- [202] Vávrová, K. ; Hrabálek, A. ; Doležal, P. ; Šámalová, L. ; Palát, K. ; Zbytovská, J. ; Holas, T. ; Klimentová, J., *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 5381-5390.
- [203] (a) Gressent, F. ; Cullimore, J. V. ; Ranjeva, R. ; Bono, J.-J., *BMC Biochem.*, **2004**, 5. (b) Ehrhardt, D. W. ; Morrey Atkinson, E. ; Faull, K. F. ; Freedberg, D. I. ; Sutherlin, D. P. ; Armstrong, R. ; Long, S. R., *J. Bacteriol.*, **1995**, 177, 6237-6245. (c) Bourdineaud, J.-P. ; Bono, J.-J. ; Ranjeva, R. ; Cullimore, J. V., *Biochem. J.*, **1995**, 306, 259-264.
- [204] (a) Beau, J.-M. ; Gallagher, T., dans Driguez, H. ; Thiem, J., *Glycoscience Synthesis of Substrate Analogs and Mimetics, Topics Curr. Chem.*, **1997**, 187, 1-54. (b) Du, Y. ; Linhardt, R. J., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 9913-9959.
- [205] Suhadolnik, R. J., *Nucleoside Antibiotics*, Wiley-Interscience: New York, **1970**.
- [206] Weatherman, R. ; Mortell, K. H. ; Chernevak, M. ; Kiessling, L. L. ; Toone, E. J., *Biochemistry*, **1996**, 35, 3619-3624.

- [207] (a) de las Heras, F. G. ; Fernández-Resa, P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1982**, 903-907. (b) Togo, H. ; Ishigami, S. ; Fujii, M. ; Ikuma, T. ; Yokoyama, M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 2931-2942. (c) Katajisto, J. ; Lönnberg, H., *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 3518-3525. (d) Abhijit, S. B. ; Gervay-Hague, *Org Lett.*, **2001**, 3, 2081-2084.
- [208] Henry, L., *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, **1895**, 120, 1265-1268.
- [209] Sowden, J. C. ; Fischer, H. O., *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 1511-1513.
- [210] Petruš, L. ; Bystrický, S. ; Sticzay, T. ; Bílik, V., *Chem. Svesti*, **1982**, 36, 103-110.
- [211] (a) Drew, K. N. ; Gross, P. H., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 6113-6126. (b) Wang, X. ; Gross, P. H., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 1201-1206.
- [212] Phiasivongsa, P. ; Samoshin, V. V. ; Gross, P. H., *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 5495-5498.
- [213] (a) Zeitouni, J. ; Norsikian, S. ; Lubineau, A., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 7761-7763. (b) Norsikian, S. ; Zeitouni, J. ; Rat, S. ; Gérard, S., Lubineau, A., *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 2716-2728.
- [214] (a) Rodrigues, F. ; Canac, Y. ; Lubineau, A., *Chem. Commun.*, **2000**, 2049-2050. (b) Johnson, S. ; Tanaka, F., *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14, 259-264.
- [215] Djordjevic, M. A. ; Bezos, A. ; Susanti ; Marmuse, L. ; Driguez, H. ; Samain, E. ; Vauzeilles, B. ; Beau, J.-M. ; Kordbacheh, F. ; Rolfe, B. G. ; Schwörer, R. ; Daines, A. M. ; Gresshoff, P. M. ; Parish, C. R., *PLoS One*, **2014**, 9, e112635.
- [216] Inoue, Y. ; Onodera, K. ; Kitaoka, S. ; Ochiai, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 4218-4222.
- [217] Frontana-Uribe, B. A. ; Escárcega-Bobadilla, M. V. ; Juárez-Lagunas, J. ; Toscano, R. A. ; García de la Mora, G. A. ; Salmón, M., *Synthesis*, **2009**, 6, 980-984.
- [218] Kiso, M. ; Anderson, L., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 309-323.
- [219] Knapp, S. ; Huhn, R. A. ; Amorelli, B., *Org. Synth.*, **2007**, 84, 68-76.
- [220] Cutler, W. O. ; Peat, S., *J. Chem. Soc.*, **1939**, 274-279.
- [221] Kuhn, R. ; Kirschenlorh, W., *Chem. Ber.*, **1953**, 86, 1331-1333.
- [222] Gudmundsdottir, A. V. ; Nitz, M., *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3461-3463.
- [223] Hasegawa, A. ; Fletcher, H. G. Jr., *Carbohydr. Res.*, **1973**, 29, 209-222.
- [224] Rana, S. S. ; Barlow, J. J. ; Matta, K. L., *Carbohydr. Res.*, **1981**, 96, 231-239.
- [225] Yoshimura, J. ; Funabashi, M. ; Ishige, S. ; Sato, T., *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1966**, 39, 1760-1764.
- [226] Higushi, K. ; Yamashina, T. ; Ishikawa, K. ; Hirata, H., *Yukagaku*, **1987**, 36, 16-20.

## **Titre :** Synthèse d'analogues de lipo-chitooligosaccharides

**Mots clés :** Glycochimie, chimie Click, symbiose plante-microorganisme, lipo-chitooligosaccharide, analogues

**Résumé :** La compréhension et l'exploitation des processus biologiques, tels que la symbiose fixatrice d'azote (plante-bactéries) et la symbiose endomycorhizienne (plante-champignons), représentent un intérêt agronomique et écologique majeur. Les lipo-chitooligosaccharides (LCO) jouent un rôle essentiel dans la mise en place de ces deux symbioses et il est donc important de mieux comprendre les mécanismes symbiotiques induits par ces molécules signal, et notamment au niveau de la liaison avec les récepteurs des plantes.

Les synthèses chimiques de ces molécules sont souvent longues, difficiles et les rendements finaux sont très faibles, il est donc intéressant de s'intéresser à l'obtention d'analogues biologiquement actifs dont la synthèse serait plus efficace. Différents travaux ont déjà montré qu'un cycle triazole pouvait être un bon mime d'une unité saccharidique. De plus, des travaux de modélisation des interactions protéine-ligand ont permis de supposer que l'unité II d'un LCO-IV pourrait avoir un rôle moins important dans la liaison avec le récepteur. Le but du projet a donc été de réaliser la synthèse de ces analogues de LCO-IV dont l'unité II est remplacée par un lien triazole.

La stratégie s'est orientée sur la synthèse de deux briques moléculaires, un monosaccharide propargylé en position 4 et un disaccharide comportant un azoture en position anomère.

Grâce à la mise au point des différentes étapes de synthèse, ces deux briques ont pu être obtenues avec de bons rendements. La cycloaddition [3+2] catalysée au cuivre a permis d'obtenir le triazole souhaité et les premiers analogues de tétrasaccharides de manière efficace. L'utilisation préalable de protections adéquates a finalement permis d'introduire la diversité moléculaire souhaitée, une fonction sulfate sur la position 6 de l'unité réductrice et une chaîne carbonée lipophile sur l'amine de l'unité non-réductrice, et ainsi d'obtenir quatre analogues de facteurs symbiotiques (Nod ou Myc) avec de très bons rendements. Les tests de compétitions, effectués sur ces analogues, n'ont montré aucune affinité pour le récepteur et donc aucune activité pour les processus symbiotiques. D'autres analogues ont donc été envisagés pour la suite du projet.

La compréhension et l'exploitation des processus biologiques, tels que la symbiose fixatrice d'azote (plante-bactéries) et la symbiose endomycorhizienne (plante-champignons), représentent un intérêt agronomique, écologique et sociétal majeur. Les lipo-chitooligosaccharides (LCO) jouent un rôle essentiel dans la mise en place de ces deux symbioses et il est donc important de mieux comprendre les mécanismes symbiotiques induits par ces molécules signal, et notamment au niveau de la liaison avec les récepteurs des plantes.

## **Title :** Synthesis of lipo-chitooligosaccharide analogs

**Keywords :** Glycochemistry, Click chemistry, plant-microorganism symbiosis, lipo-chitooligosaccharide, analogs

**Abstract :** Understanding and exploitation of biological processes, such as symbiotic nitrogen fixation (plant-bacteria) and endomycorrhizal symbiosis (plant-fungi), represent important agricultural and ecological interest. The lipo-chitooligosaccharides (LCO) play an essential role in the implementation of these symbioses, it is then important to better understand the symbiotic mechanisms induced by these molecular signals, the interaction with plant receptors for example.

The chemical syntheses of these molecules are often long, difficult and the final yields are very low, so it could be interesting to obtain biological active analogs more efficiently. Various studies have already shown that a triazole could be a good saccharide unit mime. Furthermore, modelisation studies of protein-ligand interactions showed that the monosaccharidic unit II of a LCO-IV could have a less important role in the interaction with the receptor. The project aimed at synthesize these LCO-IV analogs in which unit II is replaced by a triazole link.

The strategy was directed towards the synthesis of two molecular bricks, a monosaccharide propargylated in position 4 and a disaccharide with an azide in anomer position. Methodology was performed on various synthetic steps and these two bricks could then be obtained in good yields. Copper-catalyzed [3+2] cycloaddition gave the desired triazole and the first tetrasaccharides analogs with good efficiency. The prior use of adequate protections finally permit to introduce the desired molecular diversity, a sulphate function on position 6 of the reducing unit and a lipophilic carbon chain on the amine of the non-reducing unit, and thus to obtain four symbiotic factors analogs (Nod and Myc) with very good yields. Competition tests performed on these analogs have shown no affinity for the receptor and therefore no activity for the symbiotic processes. Other analogs were then considered for project prospects.