HAL
open science

Synthèse d'inhibiteurs d'endosulfatases humaines : vers de nouveaux outils thérapeutiques contre le cancer et les maladies inflammatoires

Pauline Quellier

To cite this version:

Pauline Quellier. Synthèse d'inhibiteurs d'endosulfatases humaines : vers de nouveaux outils thérapeutiques contre le cancer et les maladies inflammatoires. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASF008 . tel-02987041

HAL Id: tel-02987041

https://theses.hal.science/tel-02987041v1

Submitted on 3 Nov 2020

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.

Synthèse d'inhibiteurs d'endosulfatases humaines : Vers de nouveaux outils thérapeutiques contre le cancer et les maladies inflammatoires

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571, Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentations et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de chimie moléculaire et des matériaux d'Orsay, 91405, Orsay, France.
Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à ORSAY le 18/09/20, par

Pauline QUELLIER

Composition du Jury

Régis DANIEL Directeur de recherche, Université Paris Saclay	Président
Laurence MULARD Directeur de recherche, Institut Pasteur	Rapporteur & Examinateur
Jean Louis REYMOND Professeur, Université de Berne	Rapporteur & Examinateur
Sébastien GOUIN Directeur de recherche, Université de Nantes	Examinateur
Christine LE NARVOR Chargé de recherche, Université Paris Saclay	Directrice de thèse
David BONNAFFÉ Professeur, Université Paris Saclay	Co-Directeur de thèse

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASF008

Table des matières

Liste des abréviations 4

Introduction générale et objectifs de thèse 7

Chapitre 1 Endosulfatases et inhibiteurs 9

I. Endosulfatases 9

I.1 Présentation 9

I.2 Structure des endosulfatases 21

I.3 Caractéristiques des Endosulfatases 22

I.4 Endosulfatases et pathologies associées 36

II. Inhibition des Endosulfatases : Quelles molécules choisir ? 38

II.1 Molécules multi-cibles 38

II.2 Inhibiteurs des sulfatases 40

II.3 Autres fonctions réagissant avec une fonction aldéhyde 49

Chapitre 2 Synthèse d'oligosaccharides comme inhibiteurs de l'Endosulfatase Humaine HSulf2 57

I. Synthèse de fragments d'Héparane Sulfate 57

I.1 Méthodes utilisées pour la synthèse des Héparane Sulfate 57

I.2 Synthèse chimique de fragments d'HS au laboratoire 70

II. Molécules cibles et rétrosynthèse 79

II.1 Stratégie de synthèse des molécules inhibitrices 79

II.2 Rétrosynthèse des molécules cibles 80

III. Élongation des fragments pour l'introduction de la fonction sulfamate 81

III.1 Glycosylation [1+n] 81

III.2 Ouverture réductrice régiosélective 84

III.3 Introduction du sulfamate 86

IV. Déprotection et fonctionnalisation des fragments 88

IV.1 Désacétylation et réduction des groupements azotures 88

IV.2 *N*,*O*-Sulfonation 89

IV.3 Saponification et hydrogénolyse 91
V. Quantification des oligosaccharides par dosage RMN 94
V.1 Intégration des spectres RMN 95
V.2 Calcul des masses d'oligosaccharides 96
VI. Mesure de l'activité inhibitrice 98
VI.1 Protocole des tests d'inhibition 98
VI.2 Résultats préliminaires obtenus 99
Chapitre 3 Optimisation de la réaction de *N*,*O*-sulfonation 101
I. Introduction 101
I.2 Nos objectifs 105
II. Synthèse des molécules utilisées pour l'étude de la sulfatation 106
II.1 Synthèse du disaccharide 87_1 106
II.2 Synthèse de l'octasaccharide 87_4 107
III. Etude de la sulfatation 108
III.1 Suivi réactionnel 108
III.2 Étude des paramètres de la réaction 110
III.3 Étude de la *N*,*O*-sulfonation 115
III.4 *N*,*O*-sulfonation de l'octasaccharide 117
IV. Résumé du chapitre 119
Chapitre 4 Vers des inhibiteurs covalents d'HSulf2 121
I. Synthèse du dérivé glucosamine comportant une fonction oxyamine 121
I.1 Synthèse du dérivé glucosamine avec la fonction oxyamine protégée par un groupement Cbz 122
I.2 Synthèse du dérivé glucosamine avec la fonction oxyamine protégée par un groupement Phtalimide 129
II. Synthèse du dérivé glucosamine portant un groupement hydrazide 142
II.1 Oxydation de l'alcool primaire et formation de l'ester méthylique 142
II.2 Réduction de l'azoture et *N*-sulfatation 143
II.3 Introduction de la fonction hydrazide 146
Conclusions et perspectives 148

I. Conclusion 148

II. Perspectives 152

Experimental part 154

General Experimental Techniques 154

Monitoring of the sulfonation reaction 154

Determination of active Sulfur Trioxide 155

Standard solution's preparation for the NMR titration of the oligosaccharides 156

General procedure for the preparation of compounds 156

Procedures for the preparation of compounds and identification data 158

Bibliogaphie 208

Liste des abréviations

2-NAP : Naphtol méthyl éther

4-MU : 4-méthyle umbelliferol

4-MUS : 4-méthyle umbelliferyl sulfate

A

A : Arginine

Ac : Acétate

AcCl : Chlorure d'acétyle

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Arg : Arginine

ARSA : Aryl sulfatase A

ARSB : Aryl sulfatase B

ARSC : Aryl sulfatase C

ARSD : Aryl sulfatase D

ARSE : Aryl sulfatase E

ARSF : Aryl sulfatase F

ARSG : Aryl sulfatase G

ARSH : Aryl sulfatase H

ARSI : Aryl sulfatase I

ARSJ : Aryl sulfatase J

ARSK: Aryl sulfatase K

ARN : Acide Ribonucléique

Asp : Acide aspartique

B

Bn : Éther de benzyle

C

Ca : Calcium

Cat-D : Domaine Catalytique

Cbz : Carboxybenzyle

Cys : Cystéine

D

D : Acide aspartique

DABCO : 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane

DBU : 1,8-Diazobicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DDQ : 2'3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

DIAD : Diisopropyle azodicarboxylate

DMA : N,N-diméthylacétamide

DMDO : Diméthyldioxirane

DMF : N,N-diméthylformamide

E

E : Acide glutamique

E_2 : Élimination d'ordre 2

Et_2O : Diéthyl éther

EtCN : Proprionitrile

F

FPP : Farnésyl pyrophosphate

FGE : Formylglycine-Generating enzyme

FGF : Facteur de croissance des Fibroblastes

FGFR : Récepteur des facteurs de croissance des Fibroblastes

FGly : Formylglycine

G

G : Glycine

G6S : Glucosamine (*N*-acétyl)-6-sulfatase

GAG : Glycosaminoglycanes

GALNS : Galactosamine (*N*-acétyl)-6-sulfatase

GDS : 2-Sulfoglucuronate sulfatase

GlcN : Glucosamine

GlcA : Acide glucuronique

GlcNAc : *N*-acétyl glucosamine

Gln : Glutamine

H

H : Histidine

HCC : Hépatocarcinome Humain

HD : Domaine Hydrophile

His : Histidine

HP : Héparine

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

HS : Héparane Sulfate

HSBP : Heparan sulfate Binding Protein

HSPG : Héparane Sulfate Protéoglycanes

HSulf : Endosulafatase Humaine

I

IC_{50} : Concentration inhibitrice médiane

IdoA : Acide Iduronique

IDS : iduronate-2- sulfatase

IFN-γ : Interféron-γ

K

K : Lysine

Kd : Constante de dissociation

KDa : Kilo Dalton

L

L : Leucine

Lys : Lysine

M

MALDI : Désorption ionisation laser assistée par matrice

Mg : Magnésium

MS : Spectroscopie de masse

MSulf1 : Endosulfatase 1 provenant de souris

N

N : Asparagine

NA : Domaine peu sulfaté des HS

NDST : *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférase

NPTFA : *N*-phényl-2,2,2-trifluoroacétimidate

NS : Domaine sulfaté des HS

P

P : Proline

PAPS : 3'-Phosphoadénosine 5'-phosphosulfate

PARS : sulfatase de *Pseudomonas aeruginosa*

PD : Produit de départ

PEG : Polyéthylèneglycol

PFTase : Protéine farnésyl-transférase

pH : Potentiel Hydrogène

Pht : Phtalimide

PLP : Pyridoxal-5-phosphate

PMB : Para Méthobenzyle

PPh_3 : Triphénylphosphine

Q

QSulf1 : Endosulfatase 1 provenant de

caille

R

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSulf1FP1 : Endosulfatase 1 provenant de rat

RVV : Valeur de réactivité relative

S

S : Sérine

SGSH : *N*-sulfoglucosamine sulfohydrolase

SN_1 : Substitution Nucléophile d'ordre 1

SN_2 : Substitution Nucléophile d'ordre 2

SPR : Résonance Plasmonique de Surface

STS : Stéroïde sulfatase

Sulf1 : Endosulfatase 1

Sulf2 : Endosulfatase 2

T

T : Thréonine

TA : Température ambiante

TASF : Difluorotrimétylsilicate

TBAF : Fluorure de tétra-n-butylammonium

TBAI : Iodure de tétrabutylammonium

TBDPS : tert-butyldiphénylsilyle

TBDMSOTf : Tert-butyldiméthylsilyle trifluorométhane Sulfonate

tBuOH : tert-butanol

TCA : Trichloroacétimidate

Teoc : 2-triméthylsilyléthyl carbamate

THF : Tétrahydrofurane

TMSOtf : Triméthylsilyle Trifluorométhane Sulfonate

TOF : Temps de vol

TS : État de transition

TTL : Tubuline Tyrosine Ligase

U

UPLC : Chromatographie en phase Liquide à Ultra haute Performance

V

V : Valine

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

X

Xyl : Xylose

Introduction générale et objectifs de thèse

Les endosulfatases 1 et 2 sont des enzymes qui catalysent la 6-*O*-désulfatation régiosélective des chaînes d'Héparane Sulfate (HS) - des polysaccharides sulfatés appartenant à la famille des Glycosaminoglycanes – grâce à un résidu de formylglycine présent dans leur site catalytique. Les HS se lient à de nombreuses protéines de signalement telles que des chimiokines, cytokines, facteurs de croissance … via leur degré de sulfatation. En désulfatant les chaînes d'HS, les endosulfatases jouent donc un rôle crucial dans la régulation de ces signalements et dans les processus biologiques de l'organisme. L'expression de l'endosulfatase humaine 2 (HSulf2) est surexprimée ou dérégulée dans nombreux cancers (sein, ovaire, pancréas, poumons…) et représente donc une cible thérapeutique intéressante. L'objectif de cette thèse est de synthétiser des molécules inhibant de façon sélective l'activité de HSulf2. Pour ce faire, des oligosaccharides mimant les chaînes d'HS, le substrat naturel des endosulfatases, et comportant une fonction inhibitrice, un sulfamate connu comme agissant comme inhibiteur suicide des sulfatases, ont été synthétisés. La synthèse des oligosaccharides nécessite une réaction clé de *N*,*O*-sulfonation. Réalisée depuis de nombreuses années au laboratoire, cette réaction a récemment manqué de reproductibilité et des produits secondaires ont été observés. Cette étape a donc été étudiée et optimisée afin de réaliser la synthèse des oligosaccharides avec les meilleurs rendements possibles. Pour finir, deux monosaccharides dérivés de la glucosamine, fonctionnalisés avec une fonction oxyamine ou hydrazine ont été synthétisés. Ces fonctions, au contraire du sulfamate, devraient se lier de façon covalente au site catalytique de l'enzyme.

Le premier chapitre de ce manuscrit introduit les objectifs de cette thèse en décrivant la famille des sulfatases et l'état des connaissances sur les endosulfatases, enzymes découvertes dans les années 2000 et qui restent encore mal connues. Les différents inhibiteurs testés jusque là sur les endosulfatases sont ensuite présentés ainsi que le mécanisme d'inactivation des sulfatases par la fonction sulfamate. Enfin, plusieurs méthodes de bioconjugaison faisant intervenir la formylglycine sont rapportées. **Le second chapitre** est consacré à la synthèse des oligosaccharides, potentiels inhibiteurs de HSulf2. Tout d'abord, différentes méthodes de synthèse des chaînes d'Héparane Sulfate, incluant celle utilisée au laboratoire sont présentées. Puis la synthèse de quatre oligosaccharides de différentes longueurs allant du tri au nonasaccharide et comportant une fonction sulfamate est décrite. Des tests d'inhibition préliminaires ont également été réalisés et les résultats sont présentés. **Le troisième chapitre** décrit les travaux d'optimisation qui ont été réalisés sur la réaction de *N*, *O*-sulfonation, étape clé pour la fonctionnalisation des oligosaccharides. Cette optimisation a été effectuée sur un disaccharide modèle. Les conditions réactionnelles ainsi que la réactivité des

différentes positions à sulfater ont été étudiées. Les conditions optimisées ont ensuite été transposées sur un octasaccharide. Enfin, **le quatrième chapitre** décrit la synthèse des monosaccharides dérivés de la glucosamine, comportant les fonctions oxyamine et hydrazine, comme potentiels inhibiteurs bioconjugués d'HSulf2. L'introduction de ces fonctions a nécessité l'optimisation de plusieurs étapes de synthèse et l'utilisation d'un sucre modèle pour l'oxyamine. **Un chapitre conclusions et perspectives** sur ce projet précède la partie expérimentale rédigée en anglais.

Chapitre 1

Endosulfatases et inhibiteurs

I. Endosulfatases

I.1 Présentation

I.1.1 La famille des sulfatases

Les sulfatases (EC 3.1.6-) sont des enzymes de la classe des estérases qui catalysent l'hydrolyse des esters de sulfate (dénommés aussi groupements sulfates) d'un grand nombre de substrats (Schéma 1). A ce jour, environ 4600 sulfatases ont été découvertes au sein des organismes eucaryotes et procaryotes. L'équipe de Michel a créé en 2016 une base de données en ligne « SulfAtlas » (http://abims.sb-roscoff.fr/sulfatlas/) afin de recenser ces enzymes et de les classifier selon leur homologie de séquence.[1]

$$R\text{-}OSO_3^- \underset{H_2O}{\overset{\text{Sulfatase}}{\rightleftharpoons}} R\text{-}OH + HSO_4^-$$

Schéma 1 : Exemple d'hydrolyse des esters de sulfate catalysée par les sulfatases. Le substrat hydrolysé est alors sous forme alcool.

Parmi les 4600 connues, il existe à ce jour 17 sulfatases humaines identifiées (Tableau 1). [1–3] Six de ces membres (ARSA, ARSB, GALNS, G6S, GDS, IDS) sont présents dans les lysosomes, sont solubles et fonctionnent à pH acide. Ces enzymes sont impliquées dans la voie de dégradation des glycosaminoglycanes et des sulfolipides. Cinq sulfatases (ARSD, ARSF, ARSG, ARSI, ARSJ, ARSE), retrouvées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, fonctionnent à pH neutre. Quatre arylsulfatases (H, I, J, K) ont été identifiées dans les années 2000, leurs substrats restent encore inconnus (sauf pour ARSK, résolu en 2017 par Dhamale et *al*. (Tableau 1)) mais leurs expressions sont restreintes aux tissus embryonnaires et aux cellules cancéreuses.[2] Enfin deux sulfatases hydrolysant les 6-*O*-sulfates des chaînes d'Héparane Sulfate (HS) ont été identifiées en 2002 par

Morimoto-Tomita et Uchimura. Ces enzymes ont été découvertes dans le milieu ou sur la matrice extracellulaire. Ce sont les endosulfatases.

Tableau 1 : Récapitulatif des 17 sulfatases humaines identifiées à ce jour.

Nom de la sulfatase	Abréviation	Emplacement	Substrat naturel
Aryl sulfatase A[4]	ARSA	Lysosome	Cerebroside sulfate
Aryl sulfatase B[5,6]	ARSB	Lysosome	Dermatane sulfate
Stéroïde sulfatase	STS, ARSC	Réticulum endoplasmique	Stéroïde sulfate
Aryl sulfatase D[7]	ARSD	Réticulum endoplasmique	Inconnu
Aryl sulfatase E[7]	ARSE	Appareil de Golgi	Inconnu
Aryl sulfatase F[8]	ARSF	Réticulum endoplasmique	Inconnu
Aryl sulfatase G, *N*-sulfoglucosamine-3-*O*-sulfatase[9,10]	ARSG	Lysosome	Héparane Sulfate
Aryl sulfatase H[2,3]	ARSH	Inconnu	Inconnu
Aryl sulfatase I[2,3,11]	ARSI	Réticulum endoplasmique	Inconnu
Aryl sulfatase J[2,3,11]	ARSJ	Réticulum endoplasmique	Inconnu
Aryl sulfatase K, 2-Sulfoglucuronate sulfatase[2,3,12]	ARSK, GDS	Lysosome	Héparane Sulfate, Dermatane Sulfate
Galactosamine (*N*-acetyl)-6-sulfatase[13]	GALNS	Lysosome	Kératane sulfate, Chondroitine sulfate
Glucosamine (*N*-acetyl)-6-sulfatase[14]	GNS, G6S	Lysosome	Héparane sulfate
N-sulfoglucosamine sulfohydrolase ou sulfamidase[15]	SGSH	Lysosome	Kératane sulfate
iduronate-2-sulfatase[16]	IDS	Lysosome	Dermatane sulfate, Héparane sulfate
Endosulfatase 1[17]	Sulf1	Matrice et milieu extracellulaire	Héparane sulfate
Endosulfatase 2[17]	Sulf2	Matrice et milieu extracellulaire	Héparane sulfate

Ces 17 membres de la famille des sulfatases sont très conservés puisqu'ils partagent une homologie de séquence de 20 à 60 % et surtout, ces enzymes partagent le même mécanisme catalytique ainsi que les mêmes sites de coordination avec un ion métallique bivalent au sein du site catalytique.[18,19] Une caractéristique propre à cette famille d'enzymes est qu'elles possèdent toutes une activité arylsulfatase. D'où l'emploi du substrat synthétique, 4-methyl umbelliferyl sulfate (4-MUS) comme substrat standard pour doser ces enzymes *in vitro* (Schéma 2).

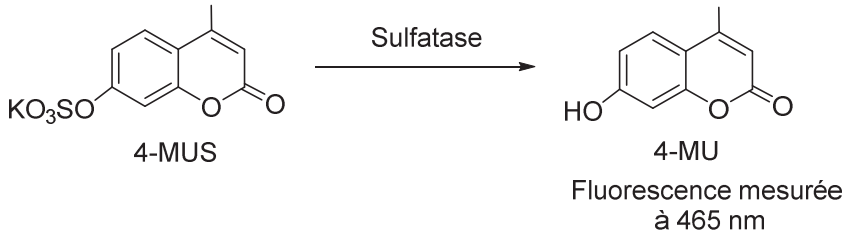


Schéma 2 : Hydrolyse du groupement sulfate du substrat synthétique 4-methyl umbelliferyl sulfate (4-MUS). Le produit résultant est le 4-methyl umbelliferol (4-MU) qui émet en fluorescence à 465 nm, ce qui justifie son utilisation lors de tests *in vitro* pour la détection de l'activité arylsulfatase.

I.1.1.a Les sulfatases humaines : des enzymes conservées

Les sulfatases humaines sont des polypeptides longs de 500 à 800 acides aminés qui partagent des homologies de séquence et ont à peu près la même structure tertiaire. L'homologie de séquence de la région *N*-terminale, d'environ 150 acides aminés et qui inclue le cycle catalytique et de nombreux résidus actifs lors de la catalyse, est plus conservée que le reste, ce qui est en faveur d'un mécanisme catalytique identique à toutes les sulfatases. La Figure 1 représente l'alignement de séquences des 17 sulfatases humaines dans trois régions qui présentent des domaines très conservés (domaine a, b et c).[20]

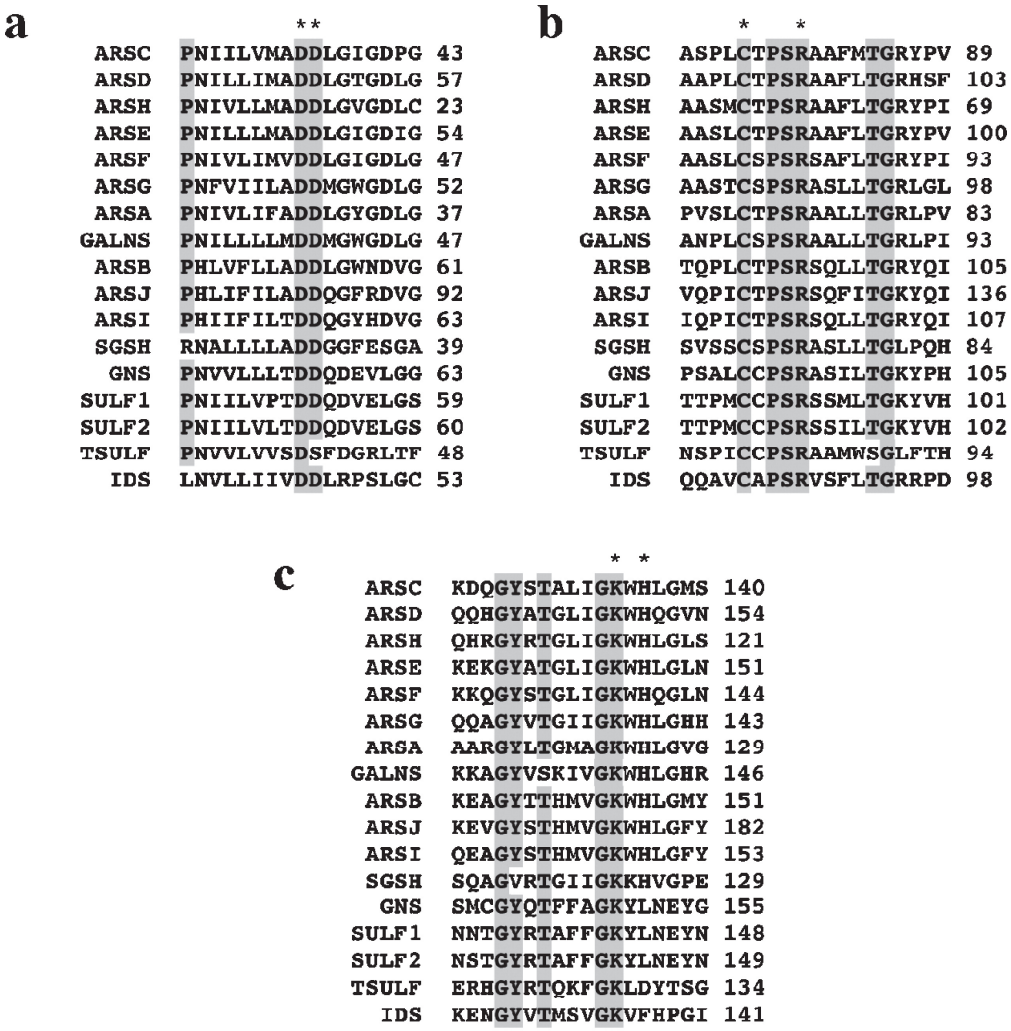


Figure 1 : Alignement de séquences de trois domaines conservés parmi toutes les sulfatases humaines. (a) et (c) représentent des domaines de la région N-terminal des enzymes. (b) contient la cystéine indispensable à l'activité catalytique des sulfatases. Les acides aminés grisés sont conservés dans 90% des sulfatases. Les astérisques marquent les acides aminés connus pour avoir une fonction dans le mécanisme catalytique.[20]

On remarque dans le domaine (b) représentant le site catalytique des sulfatases, la conservation d'un résidu de cystéine. Cet acide aminé en particulier est conservé au sein de la plupart des sulfatases humaines et non-humaines (eucaryote et procaryote). Quelques arylsulfatases bactériennes provenant notamment de *Klebsiella pneumoniae* et de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent un résidu de sérine à la place de la cystéine.[21] Mais ces deux résidus seront modifiés de façon post-traductionnelle en formylglycine (FGly).[22]

De plus, la Figure 2 représentant la superposition des sites de liaison avec l'ion métallique chez six sulfatases (ARSA, ARSB, STS, IDS, GALNS et SGSH) illustre bien l'homologie de structure au sein du site actif des enzymes (données provenant des structures cristallographique de ces enzymes). Les atomes d'oxygène des acides aminés de la lysine (K347) et des aspartates (D334, D45, D46) servent de ligand à l'ion bivalent et les atomes d'azote des histidines (H229, H138, H335) permettent la stabilisation de FGly. Ce cation métallique semble être du calcium (ou parfois du magnésium selon

l'enzyme) et est utilisé par les sulfatases humaines dans le mécanisme catalytique de l'hydrolyse du groupement sulfate.

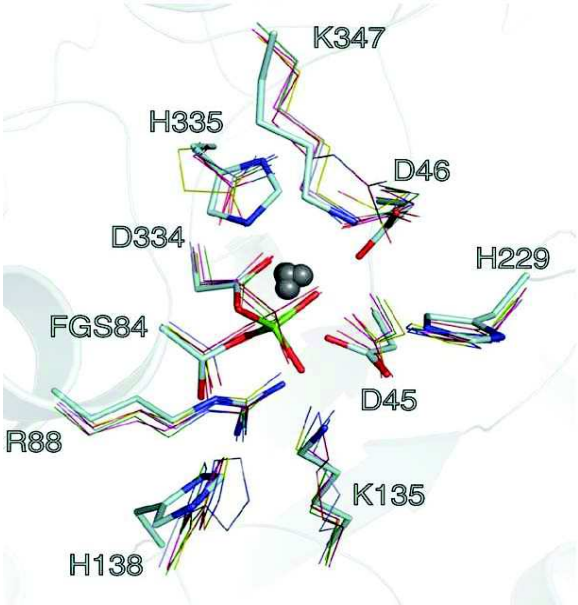


Figure 2 : La superposition du site de liaison du cation bivalent pour les sulfatases humaines : [ARSA (rose), ARSB (vert), STS (jaune), IDS (bleu), GALNS (bleu foncé) et SGSH (rouge)] montre leur similarité. L'ion métallique est représenté par des sphères grises. La formylglycine est représenté avec un sulfate (FGS).[23]

I.1.1.b Formation de la formylglycine

b.1 Acides aminés essentiels à la modification post-traductionnelle

La découverte d'un résidu de cystéine commun à la plupart des sulfatases et modifié de façon post-traductionnelle en formylglycine (FGly) a été faite en 1995 par le groupe de Von Figura.[24] Quatre ans plus tard, ce même groupe montre sur 10 sulfatases, qu'une série de 12 acides aminés commençant par la cystéine est essentielle pour la modification post-traductionnelle de celle-ci. Le pentapeptide CXPSR (X = T, S, C ou A) semble être indispensable à la formation de la formylglycine et est extrêmement bien conservé chez les sulfatases eucaryotes et procaryotes. Un second motif « auxiliaire » comprenant sept résidus $X_1X_2X_3$LTGR et qui assisterait à la présentation de la cystéine à l'enzyme modificatrice est également très bien conservé parmi les sulfatases humaines (Figure 3).[25,26]

Le pentapeptide CXPSR est toujours conservé ainsi que le motif « auxiliaire » dans les séquences des Endosulfatases (Sulf1 et Sulf2) (Figure 4).

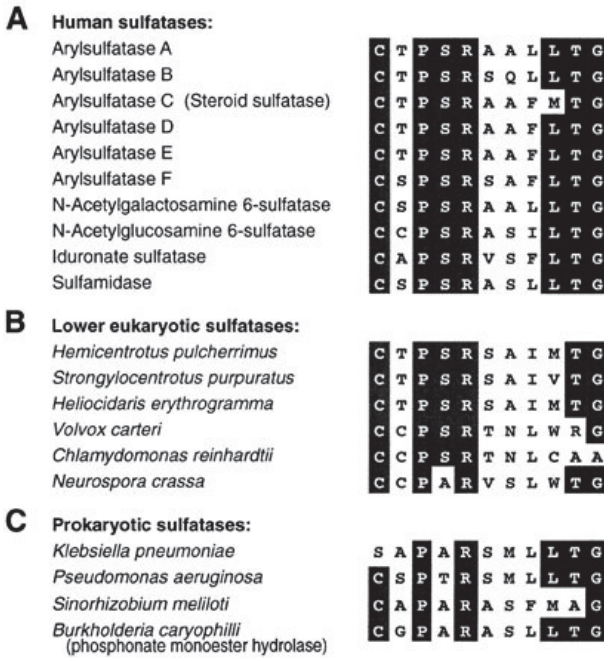


Figure 3: Homologie de séquence des 12 résidus démontrés essentiels pour la modification de la cystéine en formylglycine (A) chez 10 sulfatases humaines (B) chez 6 sulfatases d'eucaryotes inférieurs et (C) chez 4 sulfatases procaryotes. On remarque l'homologie de séquence (en noir, tous les acides aminés conservés) CXPSR chez toutes les sulfatases humaines et dans 5 des 6 eucaryotes inférieurs. Chez les sulfatases procaryotes, le motif CXPXR est conservé, excepté pour *Klebsiella pneumoniae* qui présente un résidu sérine à la place du résidu cystéine. Le motif auxiliaire XXXLTGR est également très bien conservé au sein des sulfatases humaines.[26]

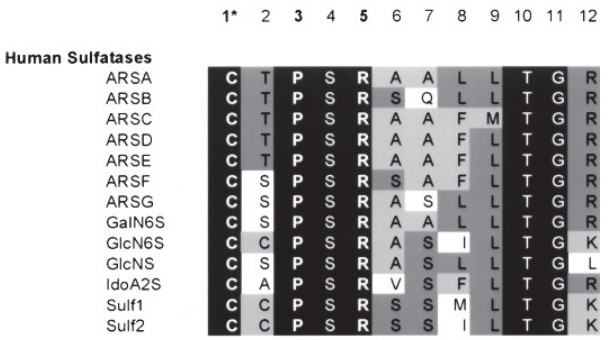


Figure 4 : Séquence des 12 acides aminés de 13 sulfatases humaines. En noir, les acides aminés conservés chez toutes les sulfatases. Du gris foncé au blanc, les acides aminés plus ou moins conservés dans ces séquences.[27]

Cette séquence de 12 acides aminés conservés C-X-P-S-R-X-X-X-L/M-T-G-R/K/L est le motif de reconnaissance de l'enzyme permettant d'initier la modification de la cystéine en formylglycine.[28,29] Des mutations et des troncatures montrent que le pentapeptide C-X-P-X-R (extrêmement bien conservé) est le motif minimum pour permettre la modification. Au sein du motif auxiliaire, les quatre résidus les mieux conservés LTGR se révèlent d'une très grande importance car ils seraient impliqués dans la reconnaissance de la sulfatase par l'enzyme modifiant la cystéine.

b.2 Mécanisme de formation de la formylglycine

La transformation du résidu de cystéine en formylglycine s'effectue de façon post-traductionnelle par une enzyme appelée « Formylglycine-Generating Enzyme » (FGE) qui est une glycoprotéine localisée dans le réticulum endoplasmique.[28,30] Ce mécanisme d'oxydation de la cystéine, découvert en 2019 par le groupe de Bertozzi, implique de l'oxygène moléculaire et un co-facteur de cuivre (I).[31] La structure 3D de l'enzyme révèle que deux cystéines (Cys272 et Cys277) sont à l'origine de la liaison avec le cuivre (I) (1) qui est lui-même lié avec le substrat (cystéine d'une sulfatase) (2) (Schéma 3). Ce

complexe FGE-Cu-substrat réagit avec O_2 : Le dioxygène se lie au cuivre (I) qui devient du cuivre (II) ce qui active l'oxygène qui se retrouve sous forme Cu(II)-$OO^{\bullet-}$ (3). Cette espèce réactive déprotonerait alors le carbone portant la cystéine du substrat (3) qui deviendrait alors un radical (4a) et pourrait former une double liaison avec le soufre (4b). Le cuivre (II) serait alors réduit en Cuivre (I) et se dissocierait rapidement de la sulfone qui serait hydrolysée en formylglycine (5). FGE serait ensuite réduite pour retourner à sa forme initiale.

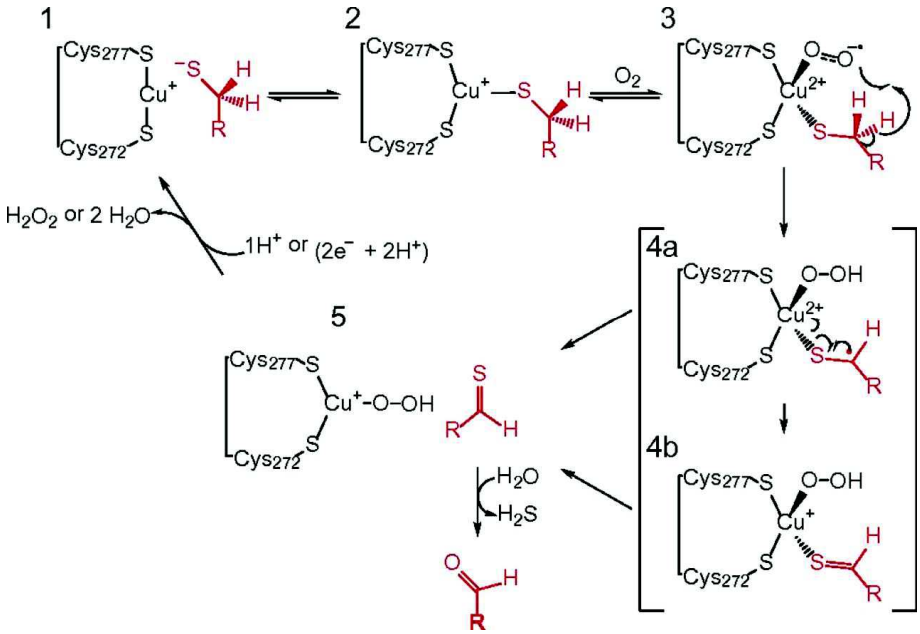


Schéma 3 : Mécanisme de formation de la formylglycine à partir d'une cystéine.[31]

I.1.1.c Hydrolyse des groupements sulfates par les sulfatases

Les acides aminés conservés au sein de la famille des sulfatases jouent un rôle important pour la modification de la cystéine en FGly, mais ils sont également essentiels au mécanisme d'hydrolyse des groupements esters de sulfates.

c.1 Rôle des acides aminés conservés

Des études cristallographiques ainsi que des mutations ont permis d'obtenir de nombreuses informations sur le site catalytique des sulfatases. De nombreux résidus ainsi que les structures sont extrêmement bien conservés, ce qui suggère que la plupart des sulfatases ont le même mécanisme catalytique.

Tout d'abord, au sein du pentapeptide clé CXPSR, le résidu d'arginine (R) a été montré comme étant : 1) Un important directeur de la modification en formylglycine : lorsque ce résidu est remplacé par une alanine, quasiment toute la modification de la cystéine est abolie *in vitro*[26] 2) un membre du site actif

stabilisant la formylglycine[32] et 3) un élément de structure crucial.[25] Ensuite, la proline (P) joue également un rôle important dans la modification de la cystéine en FGly et fait partie de l'hélice α qui permet de placer FGly au sein du site actif. De plus, une seconde séquence contenant 12 acides aminés est également très conservée au sein des sulfatases : G-Y/V-X-S/T-X-X-X-G-K-X-X-H. Les résidus de lysine (K) et d'histidine (H) appartiennent au site actif des enzymes et sont importants dans le mécanisme de catalyse car ils interagissent avec le groupement sulfate.[27,33]

c.2 Structure 3D du site catalytique

D'après la structure cristallographique de la sulfatase ARSA en présence d'un groupement sulfate (Figure 5), on peut voir que le site actif comprend 10 résidus polaires interconnectés avec un ion métallique bivalent. Cet ion métallique bivalent peut être du magnésium ou du calcium selon la sulfatases (ARSA se coordine avec Mg^{2+} alors que ARSB, ARSC et PARS se coordinent avec du Ca^{2+}). Un changement de cation chez ARSA induit une forte diminution de sa liaison avec le substrat et de son activité catalytique. Cela illustre l'importance de l'ion métallique lors de l'hydrolyse du groupement sulfate qui semble à la fois intervenir dans l'interaction avec le substrat et également sur sa réactivité afin de permettre l'attaque nucléophile.[28]

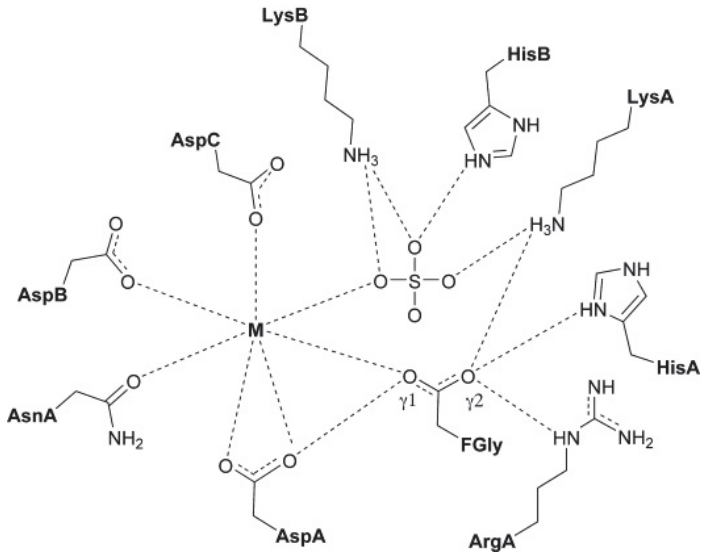


Figure 5 : Restitution du site actif catalytique des sulfatases d'après les structures cristallographiques de ARSA, ARSB, ARSC et PARS. Les interactions entre les résidus sont représentées par les traits en pointillés.[27]

De plus, on peut remarquer que la poche catalytique comporte plusieurs résidus chargés positivement (notamment LysA, LysB et HisB) ainsi que le cation, qui sont impliqués dans des interactions avec le groupement sulfate anionique. Ces interactions doivent permettre de neutraliser la charge du sulfate afin de diminuer la densité électronique autour du soufre qui devient électrophile. Ces résidus permettent aussi de positionner le substrat en face de la formylglycine afin de faciliter l'attaque nucléophile.

Ensuite, les résidus HisA et LysA possédant chacun un atome d'azote protoné et chargé positivement sont impliqués dans la protonation de l'alcoolate résultant de l'hydrolyse du groupement sulfate.

On observe également que la formylglycine est sous sa forme hydratée (Schéma 4). Ainsi, l'oxygène γ^1 interagit avec Asp1 et l'ion métallique afin d'être positionné de façon idéale pour l'attaque nucléophile sur l'atome de soufre et l'oxygène γ^2 qui interagit avec HisA, ArgA et le résidu LysA est impliqué dans l'élimination du groupement sulfate après hydrolyse.[27]

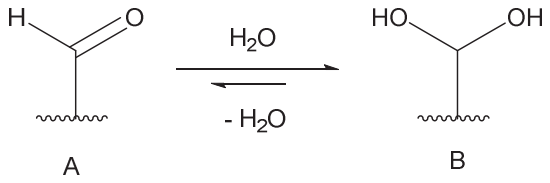


Schéma 4 : Equilibre entre le formylglycine sous sa forme aldéhyde (A) et la formylglycine sous sa forme hydratée (B). Selon les structures cristallographiques obtenues des différentes sulfatases, cet équilibre semble être en faveur de la formylglycine sous forme hydratée.

Le rôle proposé de chaque résidu impliqué dans le mécanisme catalytique de l'hydrolyse des groupements sulfates est résumé dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Récapitulatif des fonctions des acides aminés intervenant dans le mécanisme d'hydrolyse du groupement sulfate.

Résidus	Fonction dans le mécanisme d'hydrolyse du groupement sulfate
FGly	Attaque nucléophile sur le sulfate et libération du sulfate après hydrolyse
M	Interaction et activation du substrat, stabilisation de FGly
AsnA	Coordination avec le métal
AspA	Coordination avec le métal
AspB	Coordination avec le métal
AspC	Coordination avec le métal
ArgA	Stabilisation de FGly et protonation de l'alcoolate
HisA	Stabilisation de FGly et élimination du groupement sulfate après hydrolyse
HisB	Interaction et activation du substrat
LysA	Interaction et activation du substrat, stabilisation de FGly, protonation de l'alcoolate
LysB	Interaction et activation du substrat

c.3 Mécanisme de l'hydrolyse des groupements sulfates par les sulfatases

Le groupe de Von Figura a établi en 1995 que la présence du résidu de FGly est essentiel pour la catalyse de l'hydrolyse des groupements sulfates.[24] Le mécanisme résultant a pu être élucidé avec

l'apparition des premières structures cristallographiques des sulfatases contenant des groupements sulfates. Toute fois, celui-ci reste discuté dans la communauté scientifique et aujourd'hui encore, deux hypothèses sont proposées.[34] Le premier mécanisme a été proposé par le groupe de Guss en 1997 grâce à l'obtention de la structure 3D de la sulfatase ARSB, dont la formylglycine était sous forme d'un hémiacétal sulfate (B, Schéma 5).[19] Il propose donc un mécanisme d'addition nucléophile du groupement sulfate sur l'aldéhyde libre de la FGly (formation de A), puis l'introduction d'une molécule d'eau permettrait l'hydrolyse du substrat (B). Cette forme (B) est proposée comme étant la forme au repos de l'enzyme avec toutefois un équilibre vers la forme régénérée de la FGly (sous sa forme aldéhyde) (Schéma 5).

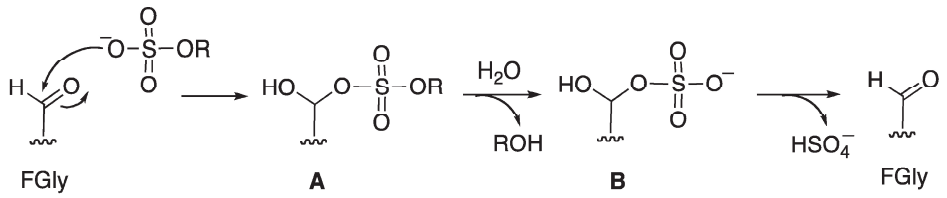


Schéma 5: Mécanisme proposé par le groupe de Guss de l'hydrolyse du groupement sulfate par les sulfatases impliquant une étape d'addition nucléophile (A) puis une étape d'hydrolyse (B), à partir de la structure cristallographique de ARSB.[35]

A partir de la structure cristallographique de la sulfatase ARSA, le groupe de Von Figura propose un autre mécanisme en 1998.[36] Celui-ci postule que la FGly est sous sa forme hydratée et propose donc une attaque nucléophile de type SN_2 d'un des deux oxygènes sur le soufre du groupement sulfate avec libération du substrat sous sa forme alcool résultante (B, Schéma 6). Le groupement sulfate serait ensuite éliminé grâce à l'alcool restant, régénérant ainsi la formylglycine sous forme aldéhyde. Une molécule d'eau permettrait de retrouver la FGly sous forme hydratée (C).

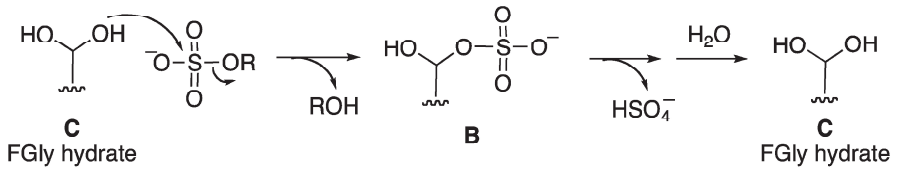


Schéma 6 : Mécanisme proposé – à partir de la structure cristallographique de ARSA – par le groupe de Von Figura pour l'hydrolyse du groupement sulfate par les sulfatases impliquant une étape d'addition nucléophile de type SN_2 (B) puis une étape d'hydrolyse du groupement sulfate et régénération de la FGly sous sa forme hydratée (C).

Ce deuxième mécanisme d'hydrolyse des groupements sulfates est très fortement supporté par l'élucidation de la structure 3D de la sulfatase PARS (provenant de la bactérie à gram-négative *Pseudomona aeruginosa*) avec une résolution atomique en 2001.[32] En effet, la structure du site catalytique montre clairement que la FGly est très proche du groupement sulfate mais n'est pas coordonné avec le groupement sulfate (hypothèse faite par le groupe de Guss pour expliquer le premier mécanisme). Ce groupement sulfate provenant sans doute des hautes concentrations utilisées

en tampon sulfate d'ammonium pour obtenir les structures cristallographiques. L'orientation du groupement sulfate par rapport à la FGly semble également optimale à l'attaque nucléophile de FGly.

La question s'est ensuite posée de la nature de la rupture de la liaison Oxygène-Soufre. L'hydrolyse est-elle associative (mécanisme type SN_2) ou dissociative (mécanisme type SN_1) (Schéma 7) ?

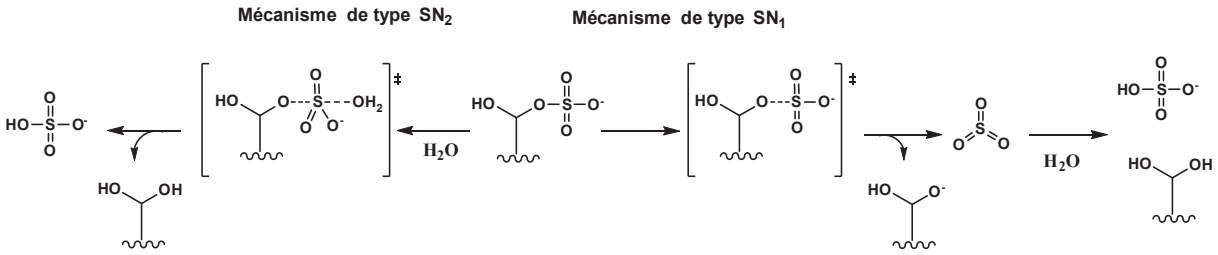


Schéma 7 : Deux différents mécanismes pour l'hydrolyse du groupement sulfate. Une fois le sulfate lié à l'oxygène de la formylglycine, celui peut soit se dissocier par un mécanisme SN_1 et conduire au groupement SO_3 libre qui réagit ensuite avec de l'eau, ou l'eau attaque le soufre du groupement sulfate et celui-ci s'élimine selon un mécanisme SN_2.

De nombreuses études tendaient pour un mécanisme SN_2, le groupement SO_3 résultant de la SN_1 étant trop haut en énergie.[37–39] Cependant une étude théorique et expérimentale de ce mécanisme a été effectuée en 2014 par le groupe de Krenske et montre que l'hydrolyse des groupements sulfates suivrait plutôt un mécanisme de type E_2 (Schéma 8).[35]

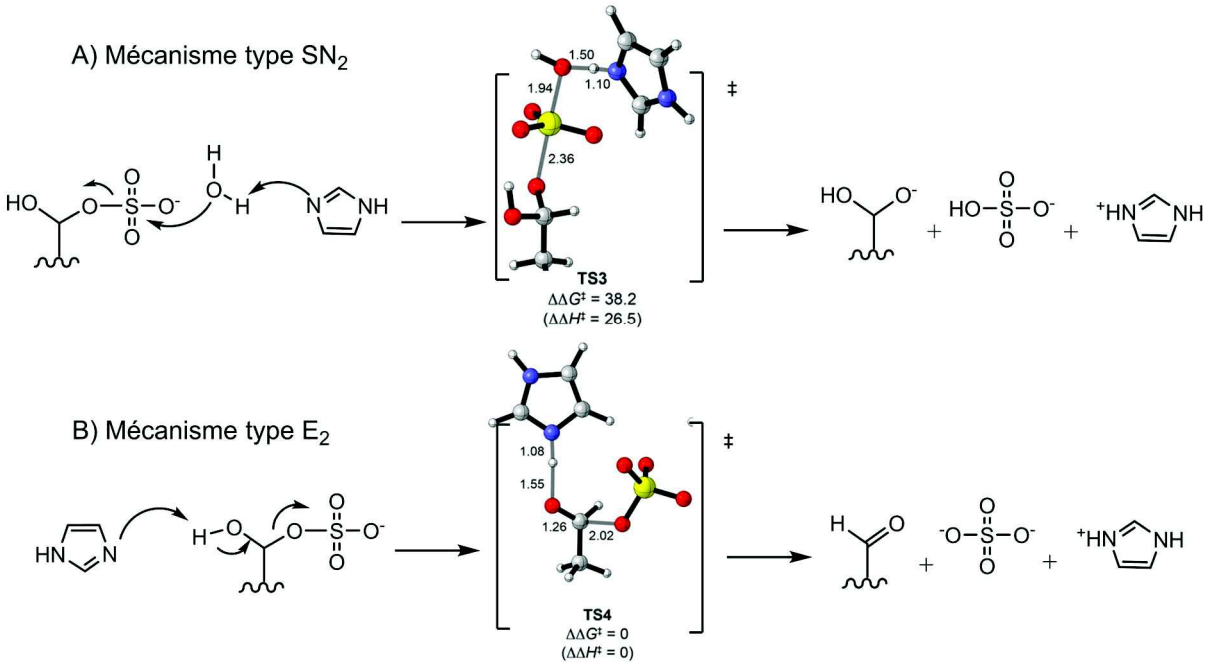


Schéma 8 : Calculs des états de transition des deux hypothétiques mécanismes de départ du groupement sulfate. L'histidine supposée jouer un rôle dans l'hydrolyse du groupement sulfate, est modélisée ici par un imidazole. Sur les états de transition, les azotes sont représentés en bleu, les carbones en gris, les oxygènes en rouge et le soufre en jaune. Le calcul de l'état de transition TS3 du mécanisme de type SN_2 montre des valeurs d'énergie d'activation $\Delta\Delta G^{\neq} = 38.2$ et d'enthalpie $\Delta\Delta H^{\neq} = 26.5$ beaucoup plus élevées que pour l'état de transition TS4 du mécanisme de type E_2 ($\Delta\Delta G^{\neq} = \Delta\Delta H^{\neq} = 0$). Ces valeurs plaident grandement pour un mécanisme de départ du groupement sulfate de type E_2.

I.1.2 Découverte des Endosulfatases Humaines (HSulfs)

Les Endosulfatases (Sulf1 et Sulf2) sont des enzymes découvertes dans les années 2000 chez les eucaryotes. Le groupe de Dhoot identifie pour la première fois, en 2001, un gène aviaire provenant d'un embryon de caille qu'il nomme QSulf1 et qui présente une homologie de séquence avec la région *N*-terminale de la sulfatase GLNS.[40] Cette nouvelle enzyme semble être exprimée à la surface des cellules et posséder une activité de désulfatation des chaînes d'Héparane Sulfate. De plus, QSulf1 contient également une cystéine conservée en position 89 (laquelle subit une modification post-traductionnelle en formylglycine comme dans toutes les sulfatases connues) et celle-ci est indispensable à son fonctionnement. Toutes ces informations semblent montrer que QSulf1 est une sulfatase extracellulaire, spécifique aux HS. Un an plus tard, le groupe d'Ohto identifie le gène RSulf1FP1 chez le rat, orthologue au gène QSulf1.[41] Sa séquence est plus grande que celle des autres sulfatases car elle comprend une séquence hydrophile insérée au milieu de la portion du gène.

En 2002, Morimoto-Tomita et *al*. clonent et expriment pour la première fois l'orthologue humain (HSulf1) ainsi que celui de la souris (MSulf1) et également des protéines homologues HSulf2 et MSulf2 respectivement.[17] Ils confirment que QSulf1 et RSulfFP1 sont bien des orthologues de HSulf1 et MSulf1 avec 94 % d'homologie de séquence. Sulf2 est quant à elle exprimée par un gêne séparé et représente bien un autre membre de la famille des sulfatases très proche de Sulf1 en longueur et en structure tertiaire, même si leur homologie de séquence est plus faible (64 %). De plus, le groupe de Morimoto-Tomita confirme l'hypothèse de Dhoot que ces enzymes sont exprimées à la surface des cellules et ont une activité sulfatase. Ils montrent que ces enzymes possèdent une activité arylsulfatase mais aussi une activité endosulfatase hautement spécifique envers le groupement 6-*O*-sulfate des résidus glucosamines de l'héparine.

La découverte de ces nouveaux membres de la famille des sulfatases chez divers eucaryotes a continué avec l'identification des gênes exprimant Sulf1 chez le poulet en 2004,[42] Sulf1 et Sulf2 chez le xénope en 2008[43] et 2009,[44] chez le poisson zèbre[45] et l'oursin[46] en 2010 et chez la drosophile en 2011.[47]

Finalement, il est important de souligner que beaucoup de sulfatases humaines sont des exosulfatases présentes dans les lysosomes avec un pH optimum d'activité acide. Ces nouveaux membres de la famille des sulfatases humaines sont les seuls connus à ce jour comme étant des endosulfatases extracellulaires opérant à pH neutre et montrant une grande spécificité envers les régions hautement sulfatées des chaînes d'Héparane sulfate.[17,48]

Jusqu'à ce jour, 17 membres de la famille des sulfatases ont été identifiés. Le site catalytique de ces enzymes est composé d'un résidu de formylglycine et d'un cation métallique bivalent. Ce résidu de formylglycine est issu de la modification post-traductionnelle d'une cystéine, catalysée par une

enzyme nommée « Formylglycine-Generating Enzyme ». La présence de cette formylglycine permet l'hydrolyse des groupements sulfates de nombreux substrats. Si toutes les sulfatases ont une séquence de domaine catalytique très conservée leur permettant de partager le même mécanisme de désulfatation, elles divergent dans leur localisation et leurs substrats. En effet, même si la plupart des sulfatases se situent dans le milieu intracellulaire et opère à pH acide, deux nouvelles enzymes extracellulaires et opérant à pH neutre ont été découvertes dans les années 2000. Celles-ci ont une activité endosulfatase sur les chaînes d'Héparane sulfate.

I.2 Structure des endosulfatases

HSulf1 et HSulf2 sont des enzymes comportant un nombre très supérieur d'acides aminés par rapport aux autres sulfatases. En effet, elles contiennent 870 acides aminés pour HSulf1 et 871 pour HSulf2, soit environ 300 résidus de plus que les autres membres de leur famille. Ces polypeptides de 125-kDa sont coupés par une protéinase de type furine pour former deux sous-unités liées par un pont disulfure : une chaîne longue de 75 kDa comportant la partie N-terminale et une chaîne courte de 50 kDa comportant la partie C-terminale. En tout, les HSulfs comportent quatre domaines allant du N au C-terminal (Figure 6) :[17,49–52]

- Un peptide signal comportant 22 acides aminés pour HSulf1 et 24 pour HSulf2, qui permet la sécrétion de l'enzyme vers le milieu extracellulaire et qui est éliminé au cours de celle-ci.
- Un domaine catalytique comportant 392 acides aminés pour HSulf1 et 391 pour HSulf2 appartenant à la région N-terminale et indispensable pour l'activité arylsulfatase et endosulfatase de l'enzyme. Ce domaine montre une homologie de séquence fortement conservée (42 – 44 %) avec la sulfatase humaine G6S.
- Un domaine hydrophile (HD) unique aux endosulfatases composé de 327 acides aminés pour HSulf1 et 307 pour HSulf2 essentiel à l'activité endosulfatase mais pas à l'activité arylsulfatase. Ce domaine est très riche en acides aminés chargés puisqu'il comporte 27 % d'acides aminés basiques et 13 % d'acides aminés acides. Les séquences N- et C-terminales du domaine HD sont très conservées au sein des sulfatases appartenant aux vertébrés, en particulier un groupe de 12 résidus basiques.
- Une partie C-terminale de 130 acides aminés pour HSulf1 et 148 pour HSulf2.

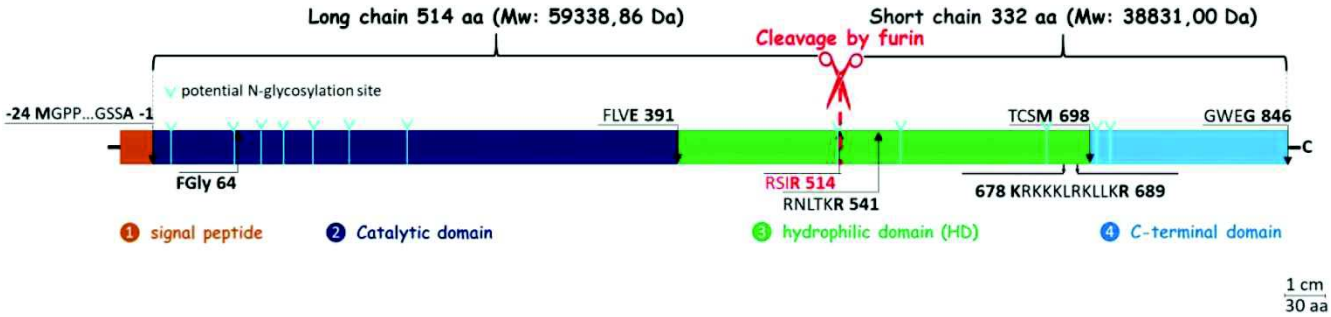


Figure 6 : Structure schématique de HSulf2. Le peptide signal de 24 aa est représenté en orange, le domaine catalytique de 391 aa en bleu foncé, le domaine hydrophile basique de 307 aa en vert et enfin la partie C-terminale de 148 aa est représenté en bleu. Le résidu comportant la formylglycine est représenté en position 64. RSIR 514 constitue le principal site de coupure par la furine, RNLTKR 541 constitue le site de coupure secondaire par la furine. 678 KRKKKLRKLLKR 689 correspond au 12 aa conservé parmi les vertébrés. Les sites potentiels de N-glycosylation sont représentés par des flèches bleues claires.[51]

La masse indiquée précédemment de 125 kDa pour les endosulfatases est une masse expérimentale estimée par Western Blot.[49] Le groupe de Morimoto-Tomita a également observé une masse de 132 kDa pour les mêmes enzymes alors que la masse théorique déduite de la séquence des acides aminés est autour des 100 kDa (98 170 g.mol^{-1} pour être précis).[17] La première analyse par spectroscopie de masse de l'enzyme HSulf2 réalisée par le groupe de Daniel en 2019 a permis de lever le doute et d'apporter une information précise sur la masse de cette enzyme.[51] En effet, après analyse par MALDI-TOF MS, une masse de 133 115 ± 297 g.mol^{-1} a été déterminée pour HSulf2. Cette masse, bien supérieure à celle théorique indique qu'un grand nombre de modifications post-traductionnelles ont lieu sur l'enzyme. Celles-ci seraient notamment des N-glycosylations, postulées par le groupe de Morimoto-Tomita qui, lorsqu'il traite les endosulfatases HSulf1 et HSulf2 avec la *N*-glycanase, retrouve une masse d'environ 100 kDa. HSulf1 compte donc 10 sites potentiels de N-glycosylation et HSulf2 en compte 12 (Figure 6). Le rôle de ces N-glycosylations reste à ce jour inconnu.

Les endosulfatases HSulf1 et HSulf2 sont des enzymes existant sous forme de deux chaînes reliées par un pont disulfure et composées de quatre domaines distincts, notamment un domaine catalytique permettant l'activité de l'enzyme grâce à son résidu formylglycine et un domaine hydrophile composés de nombreux résidus basiques.

I.3 Caractéristiques des Endosulfatases

Les Endosulfatases Sulf1 et Sulf2 ont pour substrat les chaînes d'Héparane sulfate. Ces polysaccharides sont issus d'une biosynthèse multi-étapes et ont un rôle essentiel au sein de nombreux processus biologiques.

I.3.1 Description du substrat des Endosulfatases : les chaînes d'Héparane Sulfate

I.3.1.a Biosynthèse des Héparanes Sulfate

Les Héparanes Sulfate (HS) sont des polysaccharides appartenant à la famille des Glycosaminoglycanes (GAG) et possédant un motif disaccharide répétitif d'acide uronique (GlcA ou IdoA) et de glucosamine (GlcN) (Figure 7).[53–55]

La synthèse des Héparanes Sulfate s'effectue dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi par une série de glycosylation générant un tétrasaccharide : glucuronosyl-galactosyl-galactosyl-xylosyl (GlcAβ1, 3Galβ1, 3Galβ1, 4Xyl), lié à un résidu de sérine (Figure 7). Chaque chaîne d'HS est rattachée à une protéine principale « core protein » qui peut contenir plusieurs chaînes d'HS pour former une molécule de Protéoglycane à Héparane Sulfate (HSPG).[56]

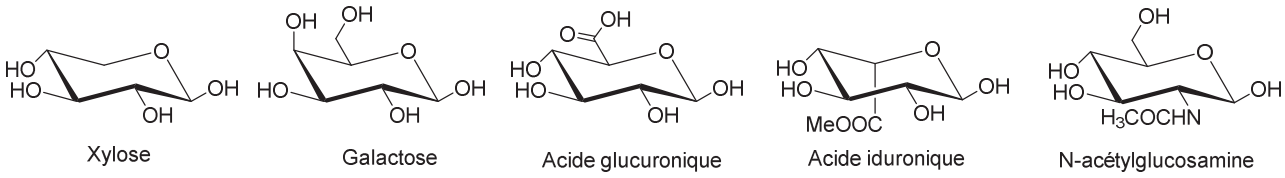


Figure 7 : Sucres présents dans les chaînes d'Héparane sulfate.

Ensuite, une autre glycosylation α-1,4 avec une *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) a lieu. S'ensuit une polymérisation alternant l'acide glucuronique (GlcA) et la *N*-acétylglucosamine menant à un précurseur d'HS du type (Glcβ1, 4GlcNAcα1,4)$_n$.[57–59] Cette chaîne précurseur subit ensuite une suite de modifications (Figure 8 & Schéma 9) :[60]

- La *N*-désacétylation/*N*-sulfatation de la glucosamine (GlcNAc) catalysée par la famille des *N*-désacétylase/*N*-sulfotransférases (NDST) comprenant 4 isoformes.
- L'épimérisation de l'acide glucuronique (GlcA) en acide iduronique (IdoA) par la C5-épimérase.
- La 2-*O*-sulfatation de l'acide iduronique par la 2-*O*-sulfotransférase.
- La *O*-sulfatation en C-6 et C-3 de la glucosamine par la famille des 6-*O*-sulfotransférases (3 isoformes) et la famille des 3-*O*-sulfotransférases (7 isoformes).

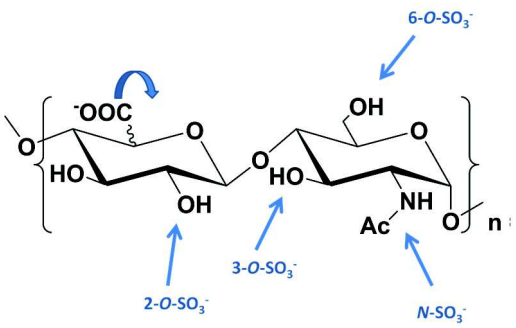


Figure 8 : Unité répétitive disaccharidique des chaînes d'HS et les différentes modifications pouvant exister : sur la glucosamine, l'amine peut être libre, acétylée ou sulfatée, les alcools en position 3 et 6 peuvent être sulfatés ou non. L'acide uronique peut être glucuronique ou iduronique et l'alcool en position 2 peut être sulfaté ou non.

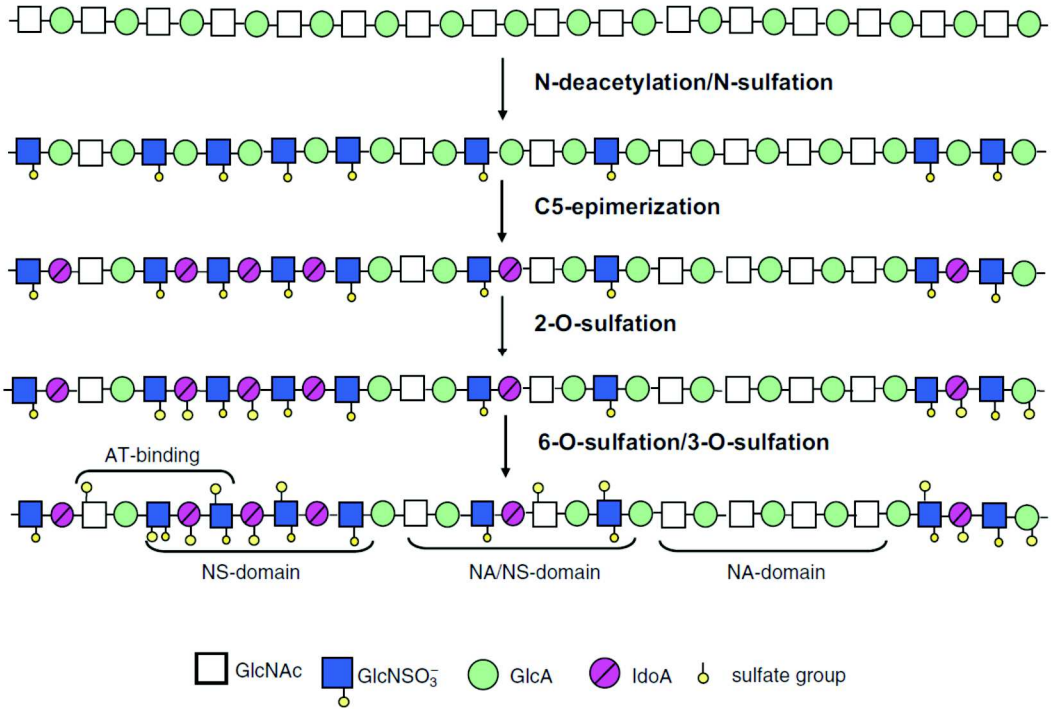


Schéma 9 : Schématisation de la biosynthèse des chaînes d'HS : une fois la polymérisation effectuée, chaque sucre peut être modifié par une ou plusieurs enzymes. Ces modifications conduisent à l'identification de plusieurs domaines au sein du polysaccharide.[59]

Due à l'action sélective des NDST, les chaînes d'héparanes sulfates comportent une structure moléculaire unique et hétérogène composé de plusieurs domaines consécutifs :[61–63]

- Le domaine NS, composé de disaccharides *N*-sulfatés avec une majorité de GlcA épimérisés en IdoA et comportant des sulfatations variables sur les oxygènes en C-6 (et parfois C-3) de la glucosamine et en C-2 sur l'acide iduronique. Ce domaine est hautement sulfaté.
- Le domaine NA, composé essentiellement de disaccharides *N*-acétylés non modifiés donc pas ou peu sulfaté et très régulier.
- Le domaine NA/NS, qui est une zone de transition entre les deux domaines NA et NS. C'est ce domaine qui comprend le plus de microhétérogénéités.

De plus, d'autres régulations du groupement 6-*O*-sulfate se font après la biosynthèse, par les endosulfatases.[64,65]

Grâce à toutes ces modifications structurales, les chaînes d'Héparane Sulfate sont très hétérogènes en termes de longueur de chaînes (de 50 à 250 unités disaccharidiques soit entre 20 à 100 kDa), d'espacement et de taille de domaines (NA et NS), d'épimérisation et de sulfatation au sein des domaines NS et des domaines de transition.

La modélisation d'un décasaccharide du domaine NS, comportant les modifications suivantes : 2-*O*-sulfatation et épimérisation de l'acide glucuronique et *N*- et 6-*O*-sulfatation de l'unité glucosamine, montre que celui-ci forme une hélice avec des clusters de 3 groupements sulfates pointant vers l'extérieur et de chaque côté de l'oligosaccharide, indiquant leur importance dans l'interaction avec leurs ligands (Figure 9).

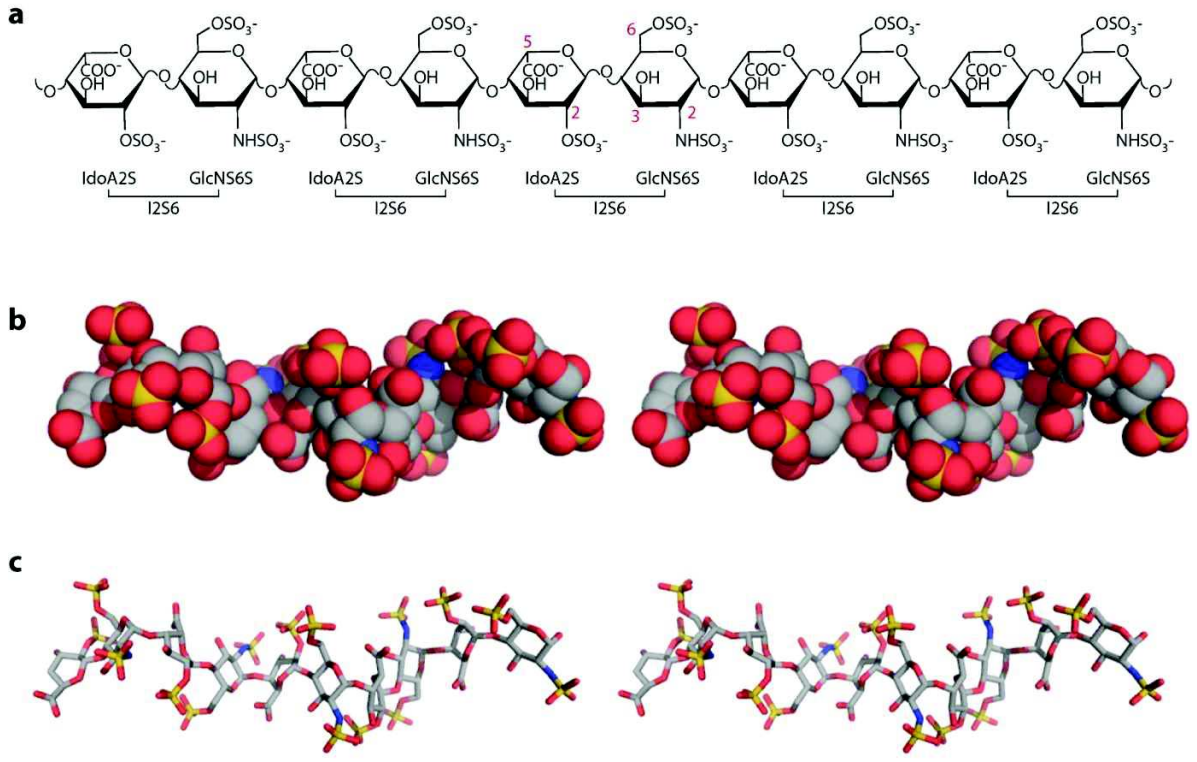


Figure 9 : Structure des Héparanes Sulfate. (a) Structure chimique d'un décasaccharide. Les carbones notés en rouge représentent les sites de modification. (b) Vue du décasaccharide en représentation pleine, basée sur la « Protein Data Bank » identifiant 1E0O (structure cristallographie du complexe ternaire du facteur de croissance des fibroblastes 1 avec son récepteur et l'héparine). Les carbones sont représentés en gris, les oxygènes en rouge, les azotes en bleu et les sulfates en jaunes. (c) Vue du décasaccharide en représentation stick. On note la nature hélicoïdale de la chaîne et les clusters alternatifs de trois sulfates de chaque côté du squelette du sucre.[66]

I.3.1.b Interaction des HS avec les protéines

De part leurs domaines hautement sulfatés, les chaînes d'Héparane Sulfate des protéoglycanes se lient à de nombreuses protéines via des interactions ioniques.[67–69] En effet, les sulfates chargés négativement ainsi que les groupements carboxylates interagissent préférentiellement avec les acides aminés chargés positivement des protéines tels que la lysine ou l'arginine. Des résidus polaires tels que l'asparagine, la glutamine ou l'histidine peuvent également participer à ces interactions par des liaisons hydrogènes avec les HS.[68–71] Ces protéines, souvent appelées « Heparan Sulfate-Binding Proteins » (HSBPs) sont très diversifiées et incluent : des chimiokines et cytokines (~60) ; des facteurs de croissance et morphogènes qui jouent un rôle important dans le développement et la réparation tissulaire (~50) ; des facteurs de coagulation sanguine comme des protéases à sérine et leurs inhibiteurs (~25) ; des protéines structurales extracellulaires comme le collagène, la fibronectine et la vitronectine (~25) ; des protéines cellulaires d'adhésion (~10) … En tout, plus de 400 protéines centrales de communication cellulaires.[72] De plus, les chaînes d'HS sont très exploitées par les agents pathogènes lors d'infections et beaucoup d'agents pathogènes ont développé ou acquis des HSBPs pour les aider dans leurs interactions avec les cellules hôtes.[73–76]

I.3.1.c Rôles des Héparane Sulfates

L'activité principale des HS est leur capacité à « attacher » les protéines et à les présenter à des lieux précis au sein des tissus. En se liant aux protéines présentes dans le milieu extracellulaire et en les « libérant », les HS permettent de créer des gradients de concentration de ces protéines. Les protéines liées aux HS sont également moins susceptibles d'être soumises à une digestion protéolytique ce qui augmente leur durée de vie dans le milieu extracellulaire.

c.1 Rôle des HS à travers les morphogènes

Les morphogènes contrôlent l'organisation spatiale et temporelle des cellules et des tissus impliqués dans le développement embryonnaire par des gradients de concentration. Les morphogènes définissent le rôle des cellules en fonction de leur concentration. En effet au cours du développement, chaque cellule possède une information de position, elle sait où elle se trouve et adopte un destin approprié à sa localisation. Cette information de localisation est fournie par un groupe de cellule, l'organisateur, sous forme de signal morphogène formant un gradient de concentration au sein du tissu. Ainsi, les cellules déterminent la distance qui les sépare de l'organisateur grâce au gradient de morphogène auquel elles sont soumises.[77] Une revue de Yan et Lin[78] décrit les mécanismes de contrôles de gradient des morphogènes par les chaînes d'HS (Schéma 10) :

- (A) Les protéines principales des HSPGs (syndecan, glypican et perlecan) peuvent se lier aux morphogènes, ce qui inhibent leur fonction de signalement.
- (B) Les morphogènes peuvent également se lier directement aux chaînes d'HS ce qui limite leur diffusion dans le milieu extracellulaire et forme un gradient de concentration.
- (C) Certains morphogènes peuvent être fonctionnalisés avec des lipides et regroupés sous forme de lipoprotéines. Les HS peuvent réguler les morphogènes en interagissant avec les lipoprotéines qui les transportent.
- (F) Les HSPGs permettent également le transport de morphogènes à l'intérieur de la cellule par endocytose. Ces morphogènes peuvent ensuite être dégradés par les lysosomes (G) ou bien transportés par transcytose afin de passer du pôle apical au pôle basal de la cellule (H).
- (D) Le nombre de HSPGs sur la surface de la cellule est contrôlé par un processus appelé « shedding » qui est une coupure protéolytique.
- (E) Enfin, les chaînes d'HS peuvent être coupées par l'héparanase extracellulaire ce qui permet de relâcher le morphogène dans le milieu extracellulaire.

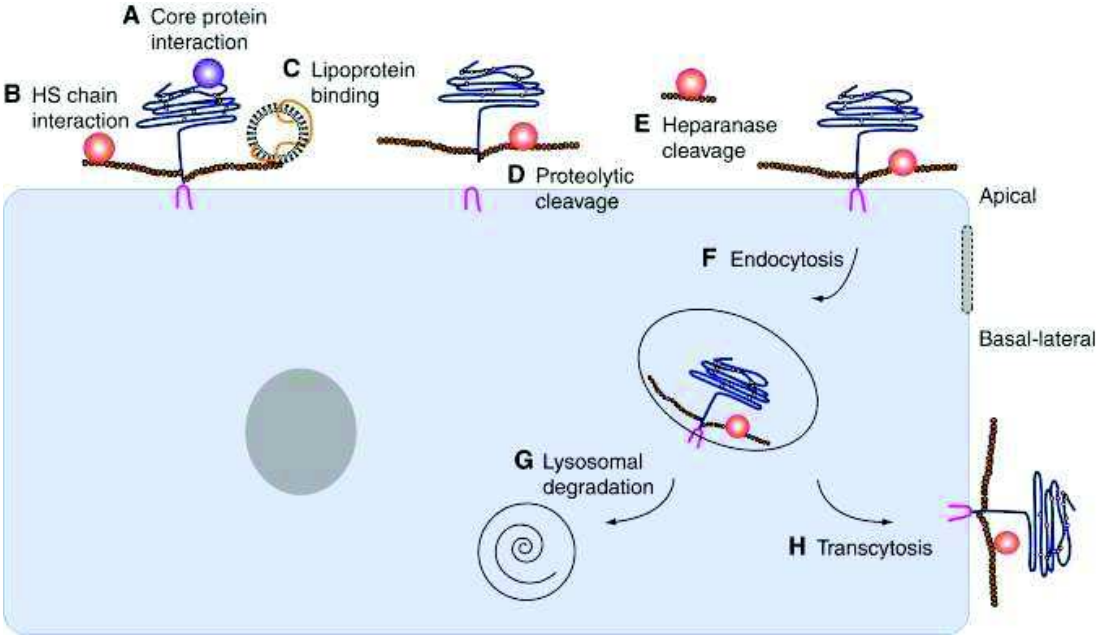


Schéma 10 : Régulation des HSPGSs à la surface des cellules. Les HSPGs peuvent interagir avec les morphogènes grâce à (A) leur core protéique (B) par leur chaîne d'HS (C) ou par des lipoprotéines. La coupure protéolytique des HPSGs (D) et les héparanases extracellulaires qui coupent les chaînes d'HS (E) relâchent ainsi les morphogènes. Les HSPGs peuvent être transportées à l'intérieur de la cellule par endocytose (F) pour être ensuite soit dégradées dans les lysosomes (G) ou alors pour être transportées sur le pole basal de la cellule par transcytose (H).[78]

c.2 Rôle des HS à travers le Facteur de Croissance des Fibroblastes 2 (FGF2)

Les Facteurs de Croissance des Fibroblastes (FGF) composent une famille de 23 protéines connues à ce jour chez l'homme. Elles font partie de la grande famille des morphogènes et régulent un grand nombre de fonctions biologiques comme la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaire.[79]

Une publication du groupe de Duchesne en 2012 dévoile le « mode de transport » du FGF2 (un des 23 FGF décrits) au sein de la matrice extracellulaire grâce aux chaînes d'HS.[72] Dans la matrice péricellulaire, les HSPGs forment une sorte de réseau, composés de plusieurs sites de liaison et c'est le FGF2 qui se déplace tout au long de ces sites de liaisons. En effet, les mouvements des chaînes d'HS et des protéines principales des HSPGs sont assez retreints à cause de nombreux ligands liés aux chaînes. Ce sont donc les molécules de FGF2 qui bougent tout au long des chaînes, de site de liaison en site de liaison, pour se déplacer (Figure 10). Cette translocation d'un site de liaison à l'autre implique des cycles successifs de liaison et de dissociation de FGF2 avec les HSPGs ce qui est favorisé par le fait que leurs interactions sont de nature électrostatique et donc que les cinétiques sont rapides. Le temps passé par FGF2 libre dans la matrice est faible par rapport à celui mesuré lié à un HS (42 ms). Ce temps de dissociation est d'ailleurs trop court pour être mesuré. De plus, FGF2 possède trois sites de liaison pour les HS, un de haute affinité (Kd ~10^{-8} à 10^{-6} M), un second site de moyenne affinité (de l'ordre du mM) et un troisième site de faible affinité ce qui augmente les probabilités d'une nouvelle liaison aux HS après dissociation.[71,80,81] Enfin, ces trois sites de liaisons permettent à FGF2 de se lier à une chaîne d'HS voisine, tout en étant toujours lié à son site d'origine et donc de progresser tout au long du polysaccharide.

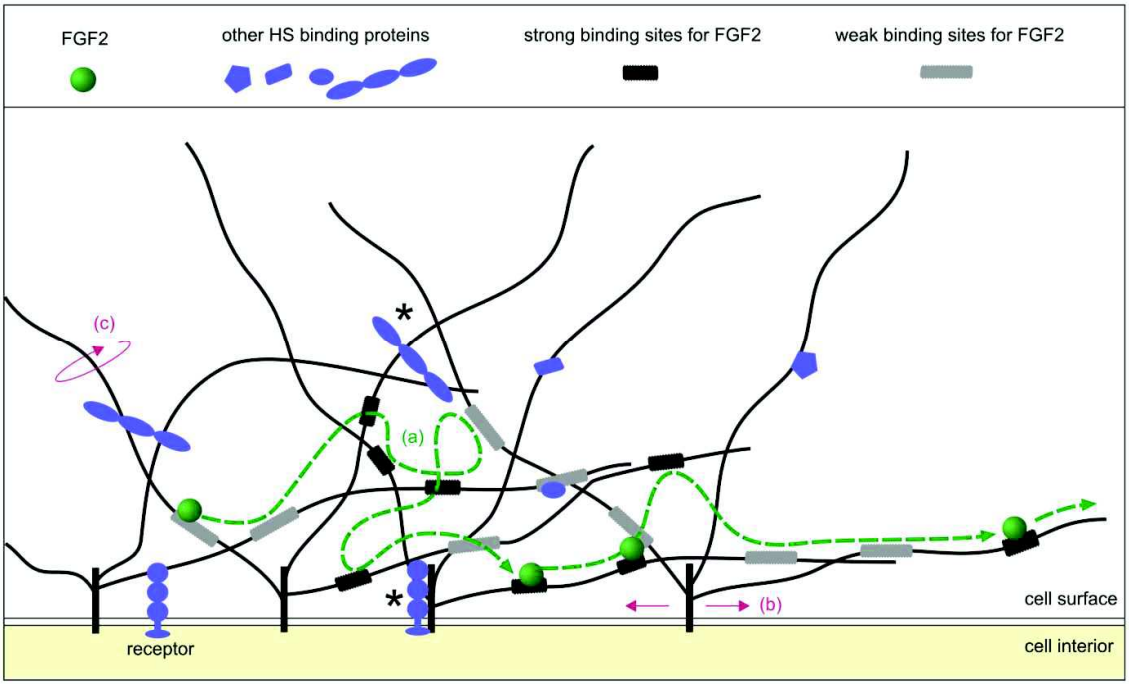


Figure 10 : Représentation schématique du transport de FGF2 dans la matrice extracellulaire par les HSPGs : dans la matrice encombrée, les protéines et les protéoglycanes interagissent les uns avec les autres. Sur ce schéma ne sont représentés que les HSPG (en noir et gris), FGF2 (en vert) et d'autres ligands des HS (en bleu). Ces ligands peuvent être des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des enzymes, des protéines de matrice et des récepteurs de surface cellulaire. Les protéines principales des protéoglycanes sont représentées en noirs, insérées dans la membrane, les chaînes d'HS sont les lignes noires qui ont une taille allant de 40 à 160 nm. Les sites de haute affinité de des HS pour FGF2 sont représentés par des rectangles noirs et ceux de faible affinité, par des rectangles gris. Dans ce réseau de HSPGs, FGF2 se déplace d'un site de liaison à l'autre. (a) Le trait vert en pointillé représente le chemin parcouru par FGF2 et les ronds verts ses positions successives. Ce déplacement de FGF2 est indépendant des mouvements propres des HSPGs. (b) Mouvement des chaines d'HS (c) sur lequel FGF2 est attaché et qui peuvent permettre le déplacement de FGF2 dans la matrice extracellulaire. Les ligands liés aux chaînes d'HS et aux protéines principales des HSPGs et qui peuvent entraver leurs mouvements sont indiqués par un astérisque.[72]

Ces deux exemples illustrent l'importance de l'affinité entre les HS et ses ligands pour la formation des gradients de concentration de morphogènes et leur déplacement au sein de la matrice extracellulaire. Cette affinité peut être diminuée par la désulfatation des 6-*O*-sulfates catalysée par les Endosulfatases.

I.3.2 Fonctionnement et rôle des Endosulfatases

Les Endosulfatases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des groupements 6-*O*-sulfate des chaînes d'Héparane Sulfate. Ces enzymes récemment découvertes et encore mystérieuses ont un mécanisme d'action très complexe et de nombreuses recherches sont en cours pour comprendre leur mode d'action.

I.3.2.a Spécificité de substrat

Dès leur découverte en 2001, les endosulfatases ont été identifiées comme enzymes interagissant avec les chaînes d'Héparane Sulfate. Cependant, elles n'ont pas la même affinité avec tous les domaines des HS. En effet, le domaine de reconnaissance des Endosulfatases comprend de nombreux résidus basiques chargés positivement et les interactions avec leurs substrats sont de nature électrostatique. Leur substrat de haute affinité correspond au domaine NS des chaînes d'Héparane Sulfate, c'est-à-dire le domaine hautement sulfaté composé du motif disaccharidique triplement sulfaté : IdoA(2S)GlcNS(6S) (Figure 11).

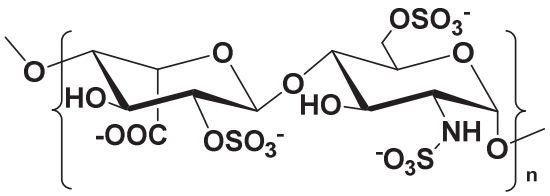


Figure 11 : Motif disaccharidique issu du domaine NS des chaînes d'HS comprenant les modifications suivantes : sulfatation de l'amine et de l'alcool en position 6 de la glucosamine, épimérisation de l'acide glucuronique en acide iduronique et sulfatation de l'alcool en position 2 de l'acide iduronique.

Cette affinité pour ce disaccharide trisulfaté a été mise en évidence par le groupe de Morimoto-Tomita dès 2002.[17] Effectivement, lorsque les Endosulfatases Humaine (HSulf1 et HSulf2) sont mises en présence d'héparine à pH neutre (substrat hautement sulfaté appartenant à la famille des GAG et comprenant une abondance de disaccharide trisulfaté), celles-ci hydrolysent environ 80 % des groupements sulfates en positions 6. Cependant, lorsqu'un substrat ne comportant pas la sulfatation sur la position 2 de l'acide iduronique est utilisé, aucune activité n'est détectée. Ces résultats ont été confirmés par d'autres groupes qui ont traité de l'Héparane Sulfate avec des endosulfatases et ont mesuré la quantité des groupements 6-*O*-sulfates après réaction enzymatique et hydrolyse de l'Héparane Sulfate en disaccharide. Les analyses ont montré que 65 % des disaccharides trisulfatés [IdoA(2S)-GlcNS(6S)] ont perdu leur groupement 6-*O*-sulfate, 20 % des disaccharides disulfatés [IdoA-GlcNS(6S)] ont perdu leur 6-*O*-sulfate et la quantité de disaccharide monosulfaté [IdoA-GlcNAc(6S)] est identique avant et après réaction avec la sulfatase. Ces résultats montrent bien l'importance du motif disaccharide trisulfaté [IdoA(2S)-GlcNS(6S)] pour l'activité des HSulfs et également la présence du *N*-sulfate de la glucosamine.[52,82–85]

a.1 Importance du domaine hydrophile dans l'activité endosulfatase

Le groupe de Frese, en 2009, a étudié l'importance du domaine hydrophile HD pour l'activité endosulfatase de HSulf1. Pour ce faire, ils ont généré l'enzyme ainsi que trois mutants (Figure 12) :

- Sulf1ΔHD sur lequel tout le domaine hydrophile HD a été enlevé (Δ 417-735),

- Sulf1ΔHDB sur lequel le domaine hydrophile HD a été enlevé à l'exception du cluster basique au niveau du C-terminal (Δ 417-720),
- Sulf1ΔHDC sur lequel le domaine hydrophile HD a été enlevé à l'exception des parties extérieures au niveau du N-terminal et du C-terminal (Δ 459-618).

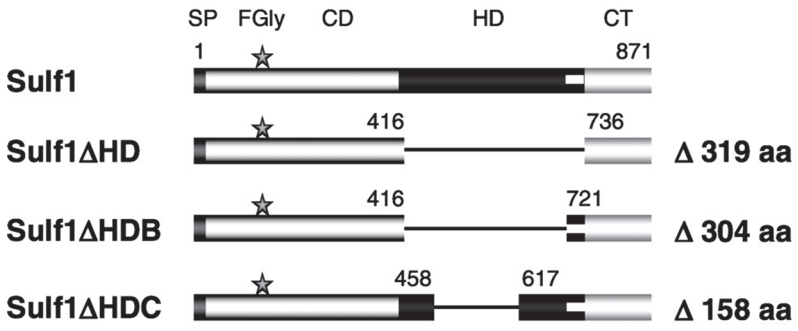


Figure 12 : Représentation schématique de la structure de HSulf1 et de ses mutants : Sulf1 comprend quatre domaines : le peptide signal, le domaine catalytique comprenant le résidu de formylglycine, le domaine hydrophile HD et le domaine C-terminal. Le mutant Sulf1ΔHD a perdu la totalité de son domaine HS, le mutant Sulf1ΔHDB a conservé le cluster basique eu niveau du C-terminal et le mutant Sulf1ΔHDC a conservé les deux régions extérieures au niveau du N-terminal et du C-terminal.[52]

Afin de vérifier l'activité arylsulfatase des quatre mutants, ceux-ci ont été mis en présence du pseudo-substrat 4-MUS. Si Sulf1 et Sulf1ΔHDC n'ont pas montrées de différence d'activité, Sulf1ΔHDB n'avait qu'une activité de 50 % et Sulf1ΔHD, une activité de 30 %. Cela indique que l'activité arylsulfatase n'est pas abolie par la suppression du domaine hydrophile mais celle-ci est tout de même diminuée, suggérant un rôle du HD dans la présentation du substrat au domaine catalytique. Lorsque les quatre mutants ont été mis en présence de chaînes d'Héparane Sulfate, l'activité de Sulf1 et Sulf1ΔHDC vis-à-vis d'HS était similaire. Par contre, elle était réduite de moitié pour Sulf1ΔHDB et nulle pour Sulf1ΔHD. Lorsque les mutants ont été incubés avec de la chondroïtine sulfate (comportant un 6-*O*-sulfate) et du dermatane sulfate (comportant un 4-*O*-sulfate), aucune activité n'a été trouvée envers ces substrats. Ces informations montrent que la perte totale du domaine hydrophile de HSulf1 amène à la perte d'activité sur son substrat naturel mais qu'une perte partielle du domaine HD (Sulf1ΔHDC) n'altère ni l'activité de l'enzyme, ni sa spécificité avec son substrat. Ces deux régions extérieures au niveau du N-terminal et du C-terminal semblent donc importantes pour la reconnaissance de l'enzyme avec son substrat et pour son activité endosulfatase.

Enfin, une mesure d'affinité du HD de Sulf1 avec de l'héparine par Résonnance Plasmonique de Surface (SPR) a été effectuée. Étant donné la longueur du site HD, il semblerait que plusieurs sites de liaison soient nécessaires pour assurer une interaction stable entre l'enzyme et son substrat. En supposant que le HD comporte deux sites de liaison, une de haute affinité et un autre de moyenne affinité, des constantes de dissociation ont pu être calculées : K_{D1} = 0,6 nM et K_{D2} = 17 nM.[52] Ces constantes de dissociation soulignent le fait que le domaine hydrophile de HSulf1 permet la haute

affinité de l'enzyme avec son substrat. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude du groupe de Dierks en 2013 qui montre également que le HD de HSulf1 a une très forte affinité avec les chaînes d'HS, mais lorsque celles-ci ne contiennent plus leurs groupements 6-*O*-sulfate (après digestion enzymatique), l'affinité avec le HD est perdue.[86]

a.2 Rôle du domaine catalytique dans l'activité endosulfatase

Le groupe de Vivès, en 2019, a réussi pour la première fois l'expression et la purification efficace de l'enzyme recombinante HSulf2.[87] Jusque là, les méthodes de production d'HSulf2 recombinante ne permettaient pas de l'obtenir en quantité suffisante et suffisamment pure pour des études *in vitro*. L'obtention de cette enzyme purifiée permet d'étudier plus en détail le rôle de chaque domaine de HSulf2 dans son activité catalytique et dans la reconnaissance de son substrat. Les auteurs identifient dans le site catalytique deux sites de liaison avec HS correspondant à deux peptides : V_{179}KEK et L_{404}KKK. L'expression de HSulf2 avec des mutants simple et double de ces peptides (mutant simple : un seul peptide à ses arginines remplacés par des alanines, mutants doubles : les deux peptides ont des alanines à la place des arginines) a montré que ces acides aminés ne sont pas nécessaires pour l'activité endosulfatase (les mutants simples de HSulf2 conservent leur activité endosulfatase sur l'héparine) mais contribue à son efficacité (le mutant double de HSulf2 a une perte considérable d'activité sur l'héparine). Ces deux motifs sont uniquement conservés parmi les isoformes et orthologues de Sulf, malgré l'homologie de séquence du domaine catalytique chez toutes les sulfatases, ce qui indique qu'ils jouent un rôle dans la reconnaissance du substrat par l'enzyme. De plus, une modélisation de HSulf2 sans son domaine HD en complexe avec un oligosaccharide d'Héparine GlcNS(6S)-[IdoA(2S)-GlcNS(6S)]$_5$ suggèrerait un alignement des deux peptides VKEK et LKKK avec le résidu de formylglycine (Figure 13).[87] La distance entre ces deux peptides correspondrait à la taille d'un octasaccharide. Cela indique que les sites de liaison VKEK et LKKK pourraient participer à l'activité endosulfatase de HSulf2 en reconnaissant et en se liant avec des motifs de HS plus grands que le disaccharide [IdoA(2S)-GlcNS(6S)].

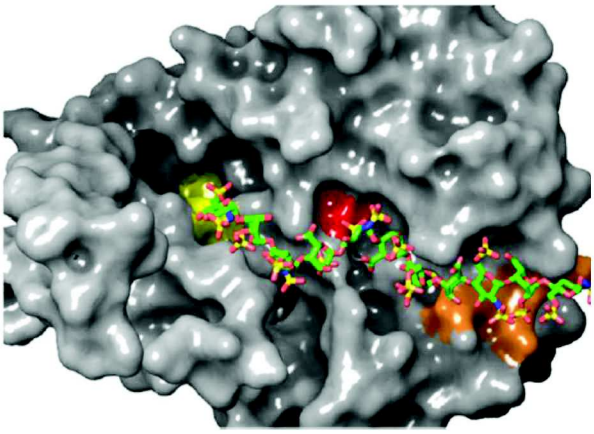


Figure 13 : Modélisation de HSulf2 sans son domaine HD en complexe avec un oligosaccharide d'héparine GlcNS(6S)-[Idoa(2S)-GlcNS(6S)]$_5$. L'emplacement de la Formylglycine (C88) est illustré en rouge, les peptides VKEK et LKKK sont représentés en jaune et orange.[87]

I.3.2.b HSulf2 catalyse de façon processive la désulfatation des HS

La façon dont les endosulfatases hydrolysent les groupements 6-*O*-sulfate des chaînes d'Héparane sulfate n'est pas aléatoire et suit un mécanisme bien précis. Le groupe de Staples a montré que HSulf2 a une activité préférentielle du côté non réducteur des chaînes d'HS.[84] Les groupes de Vivès et Daniel ont confirmé ce résultat et montré que l'extrémité non réductrice terminale et les domaines NS internes des chaînes d'HS constituent des bons sites d'initiation pour HSulf2.[85] Il est alors proposé que HSulf2 désulfate les chaînes d'HS par un mécanisme processif et orienté. Le domaine HD des Sulfs leur permettrait de reconnaitre le domaine NS des HS et de s'y lier. Le domaine catalytique serait positionné au niveau de l'extrémité non réductrice de HS et commencerait l'enlèvement des sulfates. Au fur et à mesure, l'enzyme « glisserait » le long de son substrat jusqu'à ce qu'elle rencontre un autre domaine que le NS. L'affinité de l'enzyme avec le substrat serait alors beaucoup plus faible et le complexe serait alors dissocié (Figure 14). Les deux peptides VKEK et LKKK identifiés précédemment et participant à la reconnaissance du substrat, pourraient s'aligner et permettre de présenter le polysaccharide au site catalytique. En leur absence, l'activité endosulfatase serait conservée mais serait moins efficace.

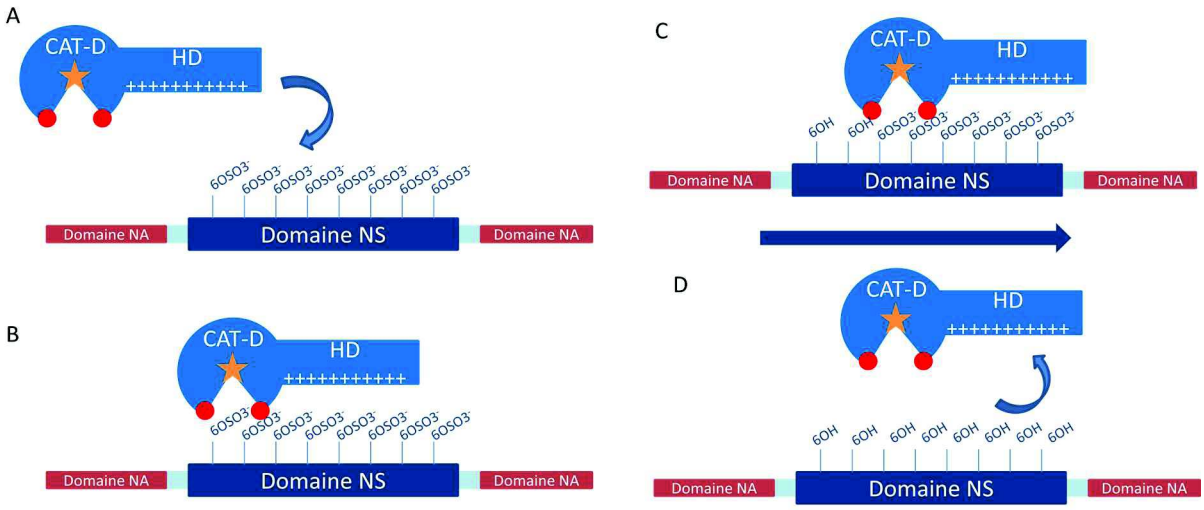


Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme processif et orienté de la désulfatation des chaînes d'HS par les HSulfs. Le résidu de formylglycine est représenté par l'étoile orange, les peptides VKEK et LKKK en rouge. A) Le domaine hydrophile (HD) de l'enzyme reconnait le domaine NS du substrat et s'y lie grâce aux groupements 6-*O*-sulfate. B) Le domaine catalytique CAT-D est positionné à l'extrémité non réductrice du domaine NS. C) Une fois la désulfatation effectuée, l'enzyme avance sur le substrat pour positionner un autre groupement sulfate au niveau du site catalytique. D) Une fois le coté réducteur du domaine NS atteint, l'absence des groupements 6-*O*-sulfate induit une perte d'affinité entre l'enzyme et le substrat et le complexe se dissocie.

I.3.2.c Les endosulfatases régule l'affinité des HS avec leurs ligands

Par leur capacité à moduler le degré de sulfatation des chaînes d'Héparane Sulfate, les endosulfatases permettent de réguler leur affinité avec leurs ligands et interviennent donc dans de nombreux processus biologiques. La régulation de ces processus est diverse. La désulfatation des HS va, par exemple, permettre au ligand Wnt, une glycoprotéine intervenant dans le développement embryonnaire et dans les cancers, ou à la protéine osseuse morphogénétique (BMP), d'accéder à leurs récepteurs (Schéma 11 A et D) alors que dans d'autres cas, par exemple FGF, l'action des HSulf va libérer FGF de son récepteur et stopper la réponse (Schéma 11 B). HSulf peut aussi altérer les gradients des chimiokines (Schéma 11 C).

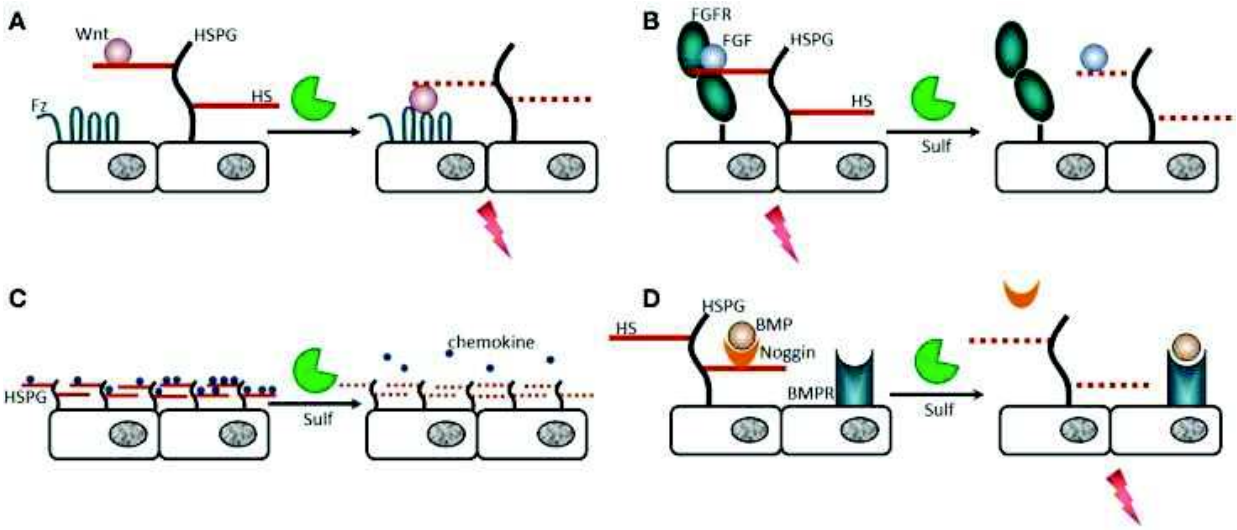


Schéma 11 : Régulation de l'affinité des HS avec leurs substrats par les endosulfatases. A) Le ligand Wnt est une glycoprotéine intervenant dans le développement embryonnaire et dans des cancers. Il se lie aux chaînes d'HS avec une haute affinité (HS montré en ligne rouge pleine) ce qui empêche l'interaction avec son récepteur. Le désulfatation des HS par les Sulfs diminue l'affinité HS/ligands (HS montré en pointillé rouge). Le ligand se retrouve alors libre d'aller interagir avec son récepteur, ce qui déclenche une réponse biologique, comme de l'angiogénèse ou de la migration cellulaire. B) FGF1 et FGF2 sont impliqués dans l'angiogénèse, la cicatrisation et les cancers. FGF2 et son récepteur (FGFR) forment un complexe qui nécessite les groupements 6-*O*-sulfates. La désulfatation des HS ne permet plus la formation de ce complexe et inhibe le signal. C) les chimiokines, protéines impliquées dans le système immunitaire, se lient aux HS afin de former des gradients. La perte de groupements sulfate altère ces gradients, ce qui peut avoir des impacts dans le développement de cancer comme la leucémie. D) Le ligand BMP (Bone Morphogenic Protein) est impliqué dans la morphogénèse des os et du cartilage. Il est séquestré par une protéine « Noggin » qui se lie aux HS. Lorsque Noggin perd son affinité avec les HS, elle perd aussi son affinité avec le ligand BMP qui peut alors aller sur son récepteur BMPR et induire un signal.[65]

I.3.3 Différence entre HSulf1 et HSulf2

HSulf1 et HSulf2 sont deux enzymes distinctes de la famille des sulfatases. Elles partagent le même mécanisme catalytique et la même activité de désulfatation des 6-*O*-sulfates des chaînes d'HS mais leurs séquences d'acides aminés ne présentent qu'une homologie de 64 %. La question se pose alors du rôle de ces 36 % de différence dans leur activité biologique. Des expériences *in vitro*, ont montré que HSulf1 et HSulf2 possédaient le même processus de désulfatation mais avec des vitesses différentes. En effet, lorsqu'un octasaccharide mimant un fragment du domaine S des HS est traité avec HSulf1, celui-ci est complètement 6-*O*-désulfaté en 48 h alors qu'avec HSulf2, la désulfatation est largement incomplète.[85] Cependant, ces enzymes présentent des fonctions redondantes, se chevauchant et même antagonistes *in vivo* selon le système biologique considéré.[65] En effet, plusieurs groupes ont effectué des simples et doubles KO (répression de l'expression de l'enzyme) de Sulf1 et Sulf2 chez des souris et les résultats sont étonnants :

- Le simple KO de Sulf1 ou Sulf2 n'a pas été mortel et n'a pas causé de graves anomalies alors que le double KO a conduit à une grande mortalité et de nombreuses anomalies du phénotype. Cela indique que les fonctions de Sulf1 et Sulf2 se recouvrent ou se compensent.[88,89]
- La quantité de 6-*O*-sulfates sur les des chaînes d'HS chez une souris double KO est beaucoup plus élevée que chez une souris simple KO, ce qui indique une forme de coopération entre les deux enzymes.[90]

De plus, ces études ont également montré des différences d'activité entre les enzymes. En effet, l'expression de Sulf1 peut compenser la perte d'expression de Sulf2, mais la réciproque n'est pas vraie. Sulf2 ne peut pas totalement compenser la perte de Sulf1. Enfin, de nombreuses différences entre Sulf1 et Sulf2 ont été observées dans des cancers. Même si cela doit encore être confirmé, il semblerait que HSulf1 ait plutôt un rôle anti-oncogénique alors que HSulf2 soit généralement associée à un rôle pro-oncogénique.[64,65]

La biosynthèse des chaînes d'Héparane Sulfate est un mécanisme biologique bien orchestré s'effectuant dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique et faisant intervenir de nombreuses enzymes. Les chaînes d'HS comportent plusieurs domaines dont un particulièrement riche en sulfate appelé le domaine NS. Il comprend une unité disaccharidique répétitive trisulfatés : IdoA(2S)-GlcNS(6S). Ces chaînes d'HS ont une affinité avec de nombreux ligands tels que des morphogènes, des chimiokines, des facteurs de croissance… Le schéma de sulfatation des Héparanes Sulfate peut également être régulé de façon post-synthétique par les endosulfatases.

Les endosulfatases HSulf1 et HSulf2 sont des enzymes ayant pour substrat les chaînes d'Héparanes Sulfate. Elles catalysent l'hydrolyse des groupements 6-O-sulfate présents sur le résidu de

glucosamine. Le mécanisme de désulfatation se fait de façon processive et orienté par le domaine hydrophile HD qui reconnait préférentiellement le trisaccharide IdoA(2S)-GlcNS(6S) présent dans les domaines NS des chaînes d'HS. Le domaine HD basique se lie à son substrat par des interactions de type électrostatique avec les groupements sulfates chargés négativement et présente le domaine catalytique à l'extrémité non réductrice du domaine NS. L'enzyme « glisse » ensuite le long du substrat au fur et à mesure de la 6-O-désulfatation de celui-ci. Une fois l'extrémité réductrice du domaine NS atteinte, l'absence de groupement sulfate affaiblit l'affinité entre l'enzyme et le substrat et le complexe se dissocie.

Le rôle des endosulfatases est très complexe, puisqu'il dépend de l'enzyme impliqué (HSulf1 ou HSulf2) du ligand et du contexte biologique. Ainsi, la désulfatation des HS peut permettre à certains ligands de se lier à leurs récepteurs et d'inhiber la formation de la réponse biologique d'autres ligands ; Sulf1 et Sulf2 peuvent montrer une certaine coopération ainsi que des fonctions redondantes et antagonistes : HSulf1 serait plutôt anti-oncogénique alors que HSulf2 aurait une activité pro-oncogénique.

I.4 Endosulfatases et pathologies associées

L'hydrolyse des 6-*O*-sulfates par HSulf diminue d'environ 5 à 7 % la teneur totale en sulfate des chaînes d'HS.[91] Ce changement dans le degré de sulfatation peut paraitre mineur mais il permet le bon fonctionnement de processus physiologiques essentiels tels que l'embryogénèse[92,93] ou la régénération des tissus.[65] Cependant, il intervient également dans de nombreuses pathologies tels les cancers,[94,95] l'amylose,[96,97] des fibroses rénales chroniques,[98] l'inflammation[99,100] et le diabète.[101,102] Depuis leur découverte en 2001, l'implication des Sulfs dans les processus pathologiques est étudiée et de nombreuses recherches semblent indiquées un lien entre dérégulation de l'expression des Sulfs et pathologies.

I.4.1 HSulf1 et HSulf2 dans les cancers

Peu de temps après la découverte des Sulfs, leur implication dans des cancers humains a été reportée. Ainsi le groupe de Lai a montré que HSulf1 était sous exprimée dans de nombreux cancers tels que le cancer des ovaires, du sein, du pancréas, du rein et des carcinomes hépatocellulaires. Sa réexpression réduit la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et augmente leur sensibilité au médicament induisant une apoptose.[103] De plus, HSulf1 a été décrite de nombreuses fois comme ayant une activité de suppression tumorale dans certains cancers du sein, du pancréas, de la tête et du cou et du myélome. Néanmoins, cette tendance anti-oncogénique de HSulf1 est contestée par d'autres études constatant

une surexpression de l'enzyme dans des leucémies, des cancers gastriques, des tumeurs cérébrales, des carcinomes du sein invasif…[65]

Quant à HSulf2, son expression est sur-régulée dans de nombreux cancers et l'enzyme montre une activité pro-oncogénique dans l'hépatocarcinome, les cancers du pancréas, du sein et des poumons. De plus, la surexpression de HSulf2 est associée à des cancers à faible pronostique chez de nombreux patients atteints de myélome et d'hépatocarcinome.[65] Le groupe de Lemjabbar-Alaoui a également corrélé la surexpression de HSulf2 aux cancers pulmonaires en montrant que celle-ci promouvait la croissance des cellules cancéreuses en augmentant leur prolifération et leur survie. Le KO de HSulf2 dans des souris a montré une réduction de la croissance des cellules cancéreuses ainsi que de la tumeur.[104]

I.4.2 HSulf2, biomarqueur de la cirrhose ?

Le groupe de Tatrai a montré en 2010 que l'ARN messager de HSulf2 pouvait être détecté chez des patients ayant un foie sain et qu'il était augmenté de 2,8 fois chez des patients comportant un foie atteint de fibrose non cancéreuse.[105] La fibrose du foie étant la première étape dans la dégradation de l'organe menant à la cirrhose, le groupe de Rosen en 2015, a mesuré l'ARNm de HSulf2 chez des patients cirrhotiques et a détecté une augmentation de 2,8 fois de l'expression par rapport à des patients sains. Puisque les produits sécrétés du foie ont accès au sang, la question s'est posée de l'augmentation de la concentration de HSulf2 dans le sang des patients. Le groupe de Rosen a alors développé un test ELISA utilisant deux nouveaux anticorps monoclonaux ciblant uniquement HSulf2 et pas HSulf1. Grâce à ce test, la mesure de la concentration en HSulf2 a été effectuée chez des patients sains (728 ± 400 pg/mL) et chez des patients atteints de cirrhose (1460 ± 1160 pg/mL). On remarque alors que la quantité en HSulf2 est environ deux fois plus élevée dans le cas d'une cirrhose, indépendamment de sa nature alcoolique ou hépatique.[106] La concentration en HSulf2 augmente également en fonction de l'âge de l'individu qu'il ait un foie sain ou pas.

Ces résultats permettent d'envisager HSulf2 comme un biomarqueur non-invasif de la fibrose du foie qui pourrait être détectée par prise de sang, une méthode plus confortable pour le patient et moins couteuse que l'actuelle biopsie.

La surexpression de HSulf2 dans de nombreux cancers, notamment des cancers à faible pronostique en fait une cible thérapeutique intéressante. Sa localisation extracellulaire lui permet également d'être envisagée en tant que biomarqueur dans la cirrhose comme vu précédemment mais également dans d'autres pathologies pour laquelle l'enzyme serait surexprimée. Un autre avantage de sa localisation extracellulaire est qu'elle peut être ciblée par des inhibiteurs dont la structure peut s'affranchir du passage de la membrane cellulaire.

II. Inhibition des Endosulfatases : Quelles molécules choisir ?

L'implication des endosulfatases dans de nombreuses pathologies a incité les chercheurs à se pencher sur la recherche de molécules permettant l'inhibition de ces enzymes.

II.1 Molécules multi-cibles

De nombreuses molécules étant déjà en test ou commercialisées pour leurs activités anticancéreuses, et la connaissance de l'implication des endosulfatases dans ces pathologies ont poussé certains groupes à tester également ces molécules sur les HSulfs.

II.1.1 Inhibiteur indirect

II.1.1.a L'hyperméthylation de l'ADN inhibe l'expression de HSulf1

Il a été montré qu'aucune activité HSulf1 n'était détectée dans certaines cellules cancéreuses, et que cette répression était due à une hyperméthylation de l'ADN dans la région promotrice d'HSulf1. Lorsque ces cellules sont traitées par un agent de deméthylation (5-aza-2-deoxycytidine), HSulf1 a été reexprimée. L'expression de l'enzyme est donc régulée par la méthylation de l'ADN dans les tumeurs ovariennes.[107] Il a également été montré que l'expression de HSulf1 est liée à une meilleure réponse aux chimiothérapies *in vitro* et *in vivo* et que le nombre de patients en rémission totale ou partielle est plus élevé chez ceux présentant un haut niveau de HSulf1.[108]

II.1.1.b Inhibiteur de protéasomes

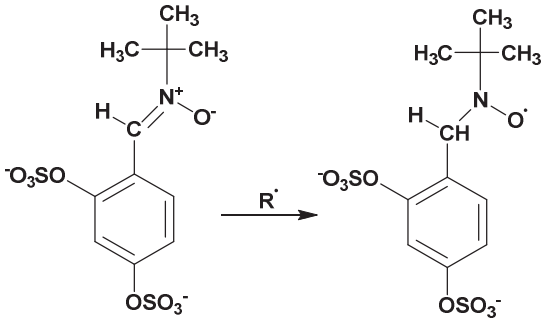
HSulf2 a été montrée comme surexprimée dans des cancers du sein. Le groupe de Shridhar a montré que des inhibiteurs du protéasome (MG132, Lactacystin et Bortezomib) abolissent l'expression de HSulf2 dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses. De plus, le traitement de cellules MCF10DCIS (lignée cellulaire dérivée du cancer du sein exprimant HSulf2 à haut niveau) par le Bortezomib induit un réduction de la taille de la tumeur, cause une apoptose massive et réduit l'expression de HSulf2 *in vivo*.[109] Cependant, les raisons expliquant la réduction de l'expression de HSulf2 par les inhibiteurs du protéasome ne sont pas connues.

II.1.2 Inhibiteur direct

II.1.2.a OKN007

L'expression de HSulf2 est surrégulée dans la majorité des Hépatocarcinomes humains (HCC) et promeut leur croissance en augmentant la voie de signalisation Wnt et de FGF2. Les patients ayant une surexpression de HSulf2 ont un plus fort taux de rechute et un plus mauvais pronostique.[110]

La molécule 2,4-Disulfophenyl-*N*-tert-butylnitrone (OKN-007) qui a déjà été testée dans le cadre de traitement des accidents vasculaires cérébraux ischémiques a montré une activité anti tumorale dans le cadre des HCC (Schéma 12).



OKN-007

Schéma 12 : La molécule OKN-007 comporte une nitrone connue pour réagir avec les radicaux libres et a été étudiée pour ses activités anti cancéreuse dans le cadre de nombreux cancers.[111]

Des études menées par le groupe de Roberts ont montré que le traitement de cellules cancéreuses du HCC exprimant HSulf2, avec OKN-007, inhibe la prolifération et la migration cellulaire et favorise l'apoptose. Par contre, le traitement par OKN-007 de cellules cancéreuses ayant l'expression de HSulf2 réprimée, montre que ces effets sont moindres sur la prolifération et migration cellulaire et sur l'apoptose. L'efficacité anti-tumorale d'OKN-007 dépendrait donc, en partie, de l'expression de HSulf2, ce qui indique qu'OKN-007 inhibe l'activité enzymatique de HSulf2 qui est une protéine oncogénique favorisant la progression du HCC.[112]

Le mécanisme d'inhibition de HSulf2 par OKN-007 n'est pas discuté mais on peut penser que les groupements sulfates de la molécule sont amenés au site catalytique et que le radical présent pourrait réagir avec les acides aminés de ce site.

II.1.2.b PI-88

PI-88 est un mélange de mannosides phosphatés, avec 90 % de pentasaccharides et tétrasaccharides et un taux de sulfatation de 2,9 à 3,1 sulfates par monosaccharide (Figure 15).[113]

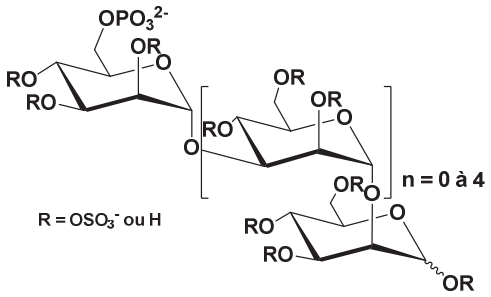


Figure 15 : Structure de PI-88 : mélange d'oligosaccharides phosphatés allant du disaccharide à l'hexasaccharide avec une forte prédominance de pentasaccharides et tétrasaccharides (90 % de sa composition). Les oligosaccharides sont partiellement sulfatés avec 2,9 à 3,1 groupements sulfates par unité monosaccharidique.

Ce mélange d'inhibiteur de l'héparanase, une enzyme qui dégrade les chaînes d'Héparane Sulfate, est allé jusqu'à la phase clinique II pour son action inhibitrice de l'angiogenèse et son activité anti-métastatique lors de la croissance des tumeurs solides.[114,115] Le groupe d'Uchimura a également voulu tester son activité inhibitrice sur les Endosulfatases 1 et 2 et il s'est avéré que PI-88 inhibe HSulf1 et HSulf2 avec des IC_{50} de l'ordre de 0,6 à 3,6 µg/mL comparables aux chiffres trouvés pour l'héparanase (2 µg/mL). HSulf-2 étant proangiogénique et surexprimée dans de nombreux cancers, on peut penser que l'effet anti-tumoral de PI-88 peut être en partie attribué à son activité inhibitrice de HSulf2.[116]

Lors des années 2000, suite à la découverte des endosulfatases, de nombreux groupes de recherche se sont penchés sur le rôle biologique de ces enzymes et ont découvert que HSulf2 était surexprimée dans de nombreux cancers. Étant devenue une cible thérapeutique, des inhibiteurs déjà connus d'autres enzymes ont alors été testés sur HSulf2 et certains d'entre eux se sont révélés efficaces. Cependant, le principal problème est qu'ils ne sont pas spécifiques des endosulfatases.

II.2 Inhibiteurs des sulfatases

II.2.1 Mise en évidence du groupement sulfamate comme inhibiteur de la Stéroïde sulfatase

II.2.1.a Découverte du groupement sulfamate comme inhibiteur de sulfatase

La stéroïde sulfatase (ou estrone sulfatase : STS) est l'enzyme qui hydrolyse le groupement ester de sulfate de l'estrone sulfate pour donner l'estrone qui est une hormone œstrogène sécrétée par l'ovaire chez la femme non-ménopausée et par les tissus adipeux chez l'homme et la femme ménopausée (Schéma 13).

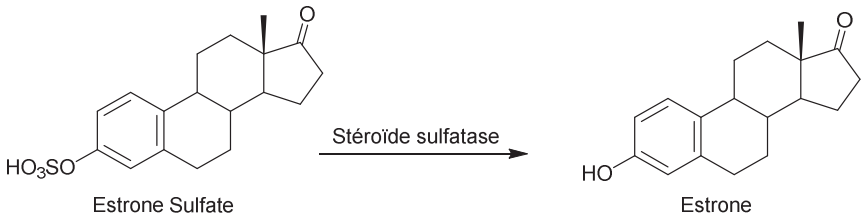


Schéma 13 : Hydrolyse de l'estrone sulfate par la stéroïde sulfatase (STS) pour la production de l'estrone.

L'estrone est retrouvée avec des concentrations beaucoup plus élevées dans le sang des femmes ménopausées ayant un cancer du sein que chez les femmes saines. Dès les années 1993, plusieurs groupes ont alors tenté de synthétiser des inhibiteurs de la stéroïde sulfatase, le contributeur majeur à cette quantité trop importante d'hormone. Le groupe de Potter synthétise alors le premier inhibiteur de la STS : une molécule d'estrone susbtitué par un groupement thiophosphonate à la place du groupement sulfate : l'estrone 3-methylthiophosphonate (E1-3-MTP) (Figure 16).[117,118] Un an plus tard, le même groupe synthétise de nouveaux dérivés de l'estrone sulfate dont l'estrone 3-sulfamate (Figure 16).[119]

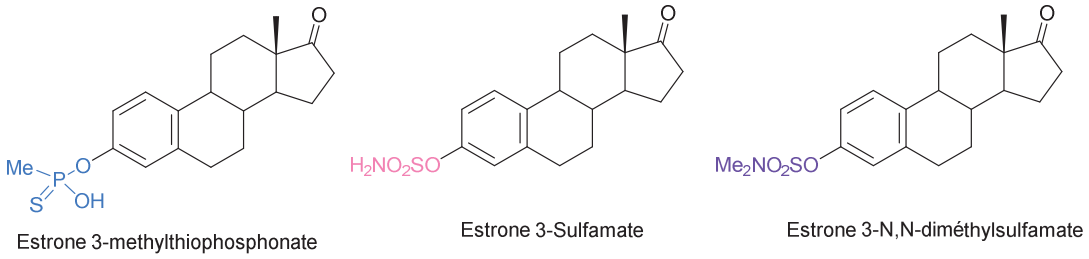
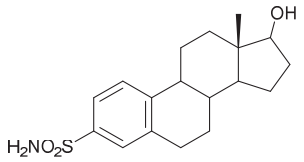


Figure 16 : Premiers inhibiteurs de la stéroïde sulfatase synthétisés par le groupe de Potter en 1993 et 1994.

Le groupement sulfamate avait déjà été utilisé pour la synthèse de molécules montrant des propriétés antibactérienne, antivirale, antitumorale…[120,121] mais n'avait jamais été testé pour inhiber l'activité sulfatase. Les tests d'inhibition de l'estrone 3-sulfamate montre que celui-ci est un bien meilleur inhibiteur que l'E1-3-MTP et surtout qu'il inactive STS de façon temps et concentration dépendants. L'enzyme est également inhibée de façon irréversible : après incubation avec l'inhibiteur pendant 2 h à 37 °C, puis après une nuit de dialyse, aucune activité de l'enzyme n'a été récupérée. A noter que l'estrone 3-*N*, *N*-diméthylsulfamate (Figure 16) a également été synthétisée et a montrée une inhibition réversible sur la STS. Cette étude est la première à montrer l'aptitude du groupement sulfamate à inhiber une sulfatase et ce de façon irréversible et temps et concentration dépendant. Cependant, lorsque l'estrogène 3-sulfamate fut testée *in vivo* oralement, cette molécule montra des effets secondaires comme l'augmentation du poids de l'utérus sur des rats ovariectomisés.[122,123] L'attention des chercheurs s'est alors portée sur des inhibiteurs non stéroïdiens de la STS pour des applications en oncologie.

II.2.1.b Un inhibiteur de sulfatase avec un sulfamate en phase clinique II

Alors que l'estrone 3-sulfamate a été mis de côté en tant que candidat pour un médicament anti-tumoral, l'estradiol 3-sulfamate (E2MATE) a quant à lui atteint la phase clinique II comme prodrogue de l'estradiol dans des thérapies de remplacement d'hormones et est un candidat potentiel pour les maladies hormono-dépendantes telles que l'endométriose (Figure 17).[124]



Estradiol 3-Sulfamate
E2MATE

Figure 17 : Estradiol 3-sulfamate, candidat potentiel comme prodrogue dans les thérapies de maladies hormono-dépendantes.

Afin de trouver des inhibiteurs de la STS, le groupe de Potter a dirigé ses recherches vers un inhibiteur non-stéroïdien, actif par prise orale, respectant les règles de Lipinski et ayant un squelette proche de l'estrone. Le dérivé de la coumarine, le 3,4-dimethylcoumarin-7-*O*-sulfamate (667 COUMATE) montre une inhibition de la STS sur les cellules MCF-7 avec un IC_{50} = 30 nM (Figure 18).[125,126]

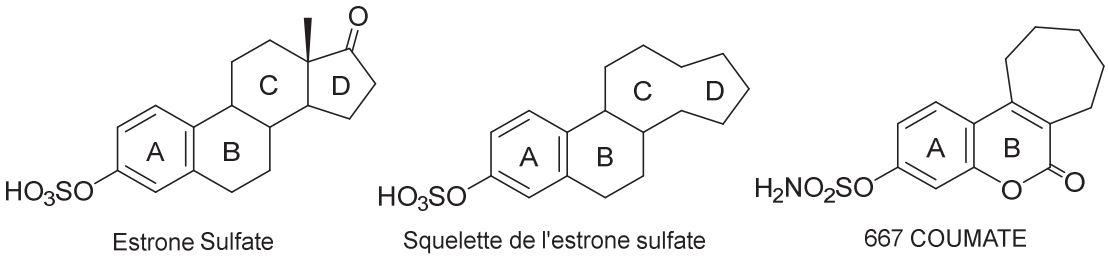


Figure 18 : Représentation de l'estrone sulfate, du squelette de l'estrone sulfate pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de la STS et la 667 COUMATE dérivée de la coumarine ayant une très bonne activité inhibitrice sur la STS.

Cette molécule, COUMATE 667, est entrée en phase clinique II pour les cancers du sein hormones dépendent.[127–129]

II.2.2 Sulfamates pour l'inhibition des Endosulfatases humaines ?

II.2.2.a Des inhibiteurs mimant les chaînes d'HS

En 2010, le groupe de Wong a publié l'effet inhibiteur sur les endosulfatases des monosaccharides dérivés du résidu glucosamine possédant un groupement sulfamate en position 6.[130,131] Quatre molécules ont été étudiées : deux glucosamines *N*-sulfatées avec soit un groupement sulfamate **1a** soit un groupement sulfamate *N*,*N*-diméthylé **1b** et deux glucosamines *N*-acétylées avec un sulfamate **2a** ou un sulfamate *N*,*N*-diméthylé **2b** (Figure 19).

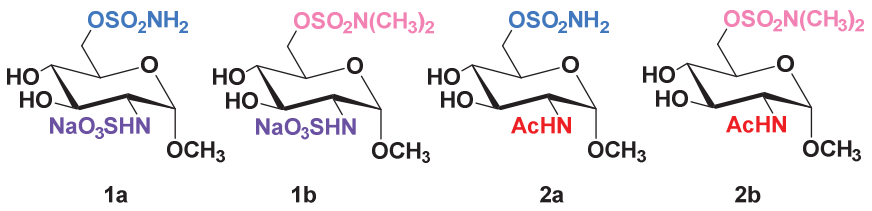


Figure 19 : Les quatre glucosamine différemment substituées utilisées pour les études d'inhibition vis-à-vis d'HSulf1 et 2.

Les deux glucosamines *N*-sulfatées **1a** et **1b** ont montré une activité inhibitrice des endosulfatases (IC_{50} de 95 et 180 µM respectivement pour HSulf1 et 130 et 240 µM respectivement pour HSulf2). On remarque que le sulfamate libre **1a** est environ deux fois plus actif que le sulfamate *N*,*N*-diméthylé **1b**. Cela est attribué à l'encombrement stérique plus important lié aux méthyles mais surtout au caractère irréversible de l'inhibition induite par la fonction sulfamate libre contrairement au caractère réversible de l'inhibition induite par la fonction sulfamate *N*,*N*-diméthylé. Mais le plus intéressant est la mesure de l'activité inhibitrice des composés de type **2** qui a montré l'importance du groupement *N*-sulfate de la glucosamine. En effet les composés **2a** et **2b** ont une activité inhibitrice sur les HSulfs de 20 à 50 fois moins importante que les composés **1a** et **1b**. Les molécules de type **1** ont un IC_{50} en dessous de 250 µM alors que celles du type **2** ont un taux d'inhibition d'environ 50 % à une concentration en inhibiteur de 5 mM.

Au début d'année 2020, le groupe de Wong a étendu son étude à la synthèse de fragments d'HS portant des groupements sulfamate sur un ou plusieurs des résidus glucosamine.[132] Dans un premier temps, les auteurs ont synthétisé des fragments d'HS de longueur variable entre di et hexasaccharide. Quantifier l'activité endosulfatase en tant que telle reste à ce jour un challenge, la façon la plus simple est de quantifier soit l'activité arylsulfatase, soit la quantité de sulfate libéré dans la réaction. Aussi, dans un premier temps, les auteurs ont cherché à doser l'activité arylsulfatase d'HSulf1 en présence des composés **3** à **6** et ont constaté que ces molécules inhibaient cette activité (Figure 20).

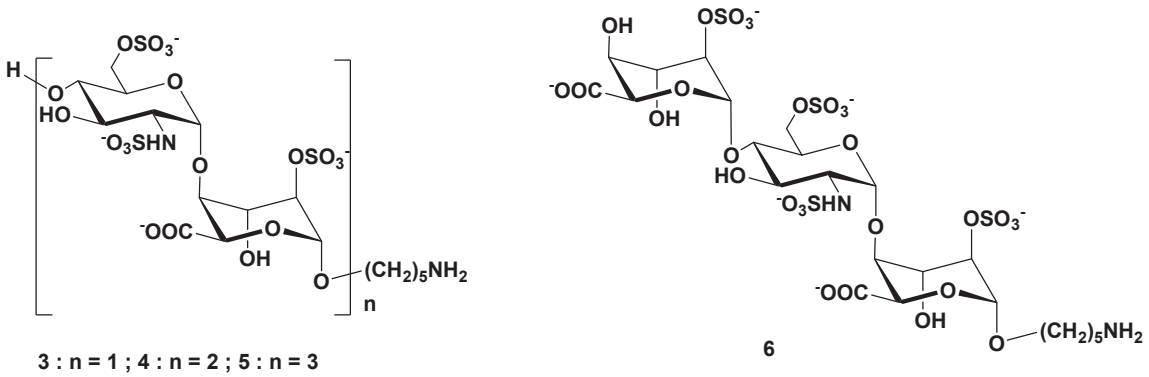


Figure 20 : Fragments d'HS synthétisés. Les molécules 3 à 5 sont du type [GlcNS(6S)-IdoA(2S)] : avec une glucosamine à l'extrémité non-réductrice alors que 6 est du type IdoA(2S)-GlcNS(6S) : avec un acide iduronique à l'extrémité non-réductrice.

Les résultats ont montré que le disaccharide **3** n'entre pas en compétition avec 4-MUS, il ne permet pas de bloquer l'entrée du pseudo-substrat dans le site catalytique de HSulf1. Le tétrasaccharide **4** et l'hexasaccharide **5** ainsi que l'héparine 3000 peuvent, quant à eux, rivaliser avec le 4-MUS. Afin de déterminer la longueur minimale requise pour l'inhibition avec 4-MUS, le trisaccharide **6** a également été testé et a montré une baisse significative de l'hydrolyse du 4-MUS. Le trisaccharide **6** apparaît donner le meilleur résultat vis-à-vis d'une inhibition contre le 4-MUS. Les IC_{50} de **4** et **6** ont été mesurés et sont de 87,8 µM et de 3,9 µM respectivement. Ce résultat a été confirmé en montrant que la quantité de sulfate libérée était supérieure lorsque le trisaccharide était utilisé comme substrat. Cela pourrait peut-être venir de la structure du trisaccharide **6** qui a un acide iduronique à son extrémité réductrice alors que le tétrasaccharide **4** à un résidu de glucosamine.

Ensuite, trois fragments ont été synthétisés avec une ou deux fonctions sulfamate, sur la position 6 de la glucosamine, emplacement du groupement sulfate hydrolysé par les Endosulfatases, afin de tester leur activité inhibitrice vis-à-vis d'HSulf1 (Figure 21).

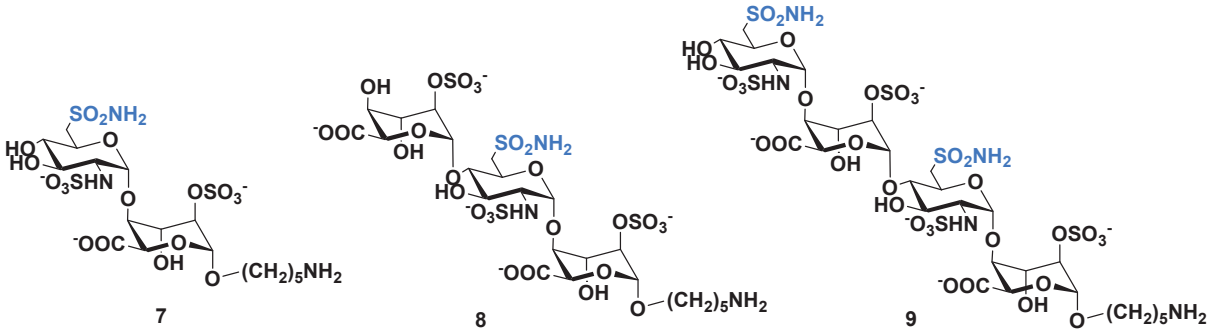


Figure 21 : Les 3 molécules synthétisées pour tester leur activité inhibitrice vis à vis HSulf1. Les molécules 7 et 9 sont du type GlcNS-IdoA(2S). Le disaccharide 7 ayant un sulfamate en position 6 à l'extrémité non-réductrice et le tétrasaccharide 9 ayant deux sulfamates sur chaque position 6 des deux glucosamines. Le trisaccharide 8 est du type IdoA(2S)-GlcNS avec un sulfamate en position 6 sur la glucosamine.

Les tests d'inhibition ont montré que le disaccharide **7** est le moins efficace avec une inhibition de 20 % de l'activité de HSulf1 à 0,7 mM d'inhibiteur. En revanche, le trisaccharide **8** et le tétrasaccharide **9** ont des IC_{50} de 0,53 µM et 29,6 µM respectivement. Le disaccharide **7** est le moins efficace des composés. Le trisaccharide **8** de type IdoA-GlcNS a la plus grande activité inhibitrice par rapport au tétrasaccharide **9** de type GlcNS-IdoA qui comportait deux fonctions sulfamate.

L'étude cinétique de l'activité inhibitrice de **8** a ensuite permis la mesure de son Ki = 0,36 µM et l'affinité de l'inhibiteur avec le domaine hydrophile (HD) de HSulf1 a pu être définie par Résonance Plasmonique de Surface (SPR). La constante de dissociation (K_D) de **8** a été déterminée à 12 nM.

Finalement, cette étude montre que la longueur minimale du substrat pour HSulf1 est un trisaccharide **6** et que sa présence dans le site catalytique entre en compétition avec celle du pseudo-substrat 4-MUS. Lorsque l'on passe du composé **6** au composé **8** en remplaçant le groupement sulfate en

position 6 de la glucosamine, par une fonction sulfamate, on obtient bien un inhibiteur (IC_{50} = 0,53 µM, *K*i = 0,36 µM et K_D = 12 nM). Il est important de retenir également que le trisaccharide **8** comportant un résidu d'acide iduronique à son extrémité non-réductrice est un meilleur inhibiteur que le tétrasaccharide **9** ayant une glucosamine au même endroit.

Cette étude est la première publiée à ce jour rapportant des activités inhibitrices de fragments d'HS ayant une fonction sulfamate vis à vis d'HSulf1 et confirme notre stratégie de synthèse d'inhibiteur des HSulf2. Les résultats de ces tests d'inhibition sont très encourageants quant au développement de nouveaux inhibiteurs des endosulfatases.

II.2.2.b Trichloroéthylsulfamate, un nouveau pharmacophore ?

Le groupe de Griffin a publié en 2016 la synthèse d'inhibiteur de HSulf2 comportant soit une fonction sulfamate soit une nouvelle fonction, testée pour la première fois pour son activité inhibitrice : le trichloroéthylsulfamate.[133]

Afin d'obtenir des inhibiteurs spécifiques de HSulf2, les synthèses ont été rationnalisées en superposant les structures à la structure de l'héparine dans le but d'introduire les groupements chargés négativement aux mêmes endroits. De cette modélisation a découlé la synthèse de différents composés biphényles et éther de biphényles avec une fonction sulfamate et/ou une fonction trichloroéthylsulfamate (Figure 22).

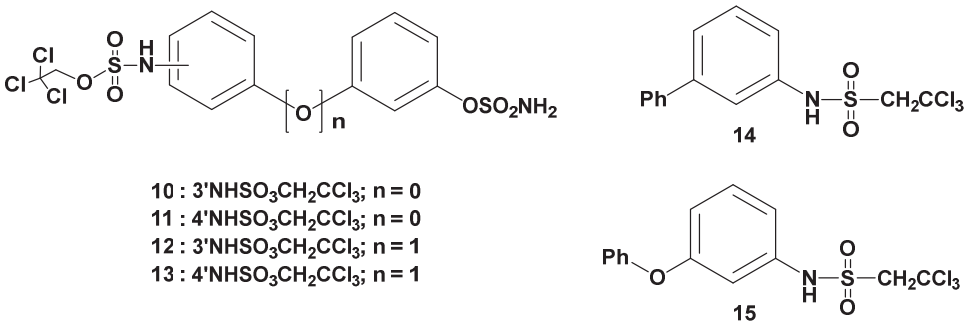


Figure 22 : Molécules synthétisées pour l'inhibition de HSulf2. Le groupe de Griffin a synthétisé et testé l'activité inhibitrice d'une trentaine de molécules, mais seules les molécules ayant les meilleures inhibitions sont représentées ici.

L'activité inhibitrice de ces molécules a été testée pour HSulf2 et également pour les sulfatases ARSA et ARSB afin de déterminer si elles étaient sélective de l'endosulfatase. Les molécules représentées Figure 22 ont toutes une inhibition de HSulf2 supérieure à 95 % à 1 mM. Cependant, ces molécules comportent également une activité inhibitrice de ARSA et ARSB, meilleure que pour HSulf2. En effet, le composé **10** par exemple, à un IC_{50} de 167 µM pour HSulf2, 55 µM pour ARSA et 130 µM

pour ARSB. Les autres molécules **11-15** ont des IC_{50} supérieurs à 250 µM pour HSulf2 et inférieurs à 150 µM pour ARSA et ARSB.

Ces résultats montrent que les inhibiteurs synthétisés ne sont pas sélectifs de HSulf2 et ont même une faible affinité pour l'enzyme. L'emplacement des groupements chargés négativement n'est pas suffisant pour obtenir une bonne interaction avec le HD. Néanmoins, cette étude a permis de montrer que le groupement trichloroéthylsulfamate est une nouvelle fonction inhibitrice des sulfatases. Son mécanisme d'inhibition n'a pas encore été étudié.

II.2.3 Mécanisme d'inhibition des sulfatases par la fonction sulfamate

Le mécanisme d'inhibition des sulfatases par la fonction sulfamate a été très étudié par le groupe de Williams à travers l'analyse de l'inactivation de l'arylsulfatase *Pseudomonas aeruginos* en 2008 puis approfondi par des calculs théoriques et modélisations en 2014.[35,134]

L'étude de l'inactivation de l'arylsulfatase bactérienne par le sulfamate a d'abord montré que la première étape irréversible était la coupure de la liaison RO-SO_2NH_2 de la fonction. Cette première information a permis de déterminer la stœchiométrie de l'inhibition. La quantité de substrat hydrolysé par l'enzyme a été mesurée sur quatre dérivés de coumarine différents et a montré qu'il fallait entre 3 et 6 molécules d'inhibiteur pour inhiber irréversiblement une molécule d'enzyme. De plus, la mesure de pKa des différents composés inhibant l'enzyme a montré que l'hydrogène du sulfamate était relativement acide (pKa ~7-8). Ces trois résultats tendent à prouver que le mécanisme d'hydrolyse du sulfamate serait de type E_1cb : un résidu basique du site catalytique de l'enzyme déprotonerait le sulfamate, ce qui causerait la rupture de la liaison oxygène-soufre et produirait un intermédiaire SO_2NH (Schéma 14). Les calculs d'énergies ont montré que SO_2NH était suffisant bas en énergie pour exister. Cet intermédiaire dioxyde d'iminosulfane SO_2NH pourrait alors réagir avec la formylglycine ou d'autres résidus du site catalytique, amenant à l'inactivation de l'enzyme (Figure 23). Cela expliquerait cette stœchiométrie d'inhibition de 3 à 6. Ce mécanisme E_1cb est cohérent avec le fait que le groupement sulfamate *N*,*N*-diméthylé ne conduise pas à une inhibition irréversible des sulfatases (composés **1a** et **1b**, Figure 19) : la première étape de déprotonation du sulfamate *N*,*N*-diméthylé n'est pas possible puisque cette fonction ne comporte pas de proton mais uniquement deux groupements méthyles.

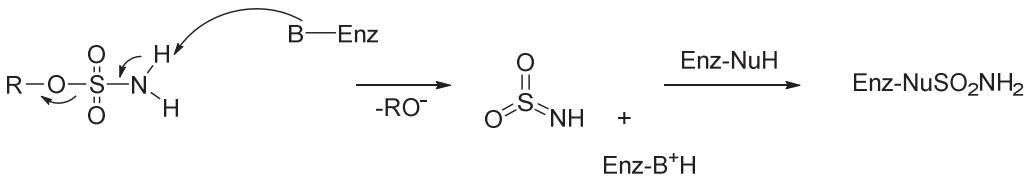


Schéma 14 : Mécanisme E_1cb proposé pour l'inactivation des sulfatases par le sulfamate.

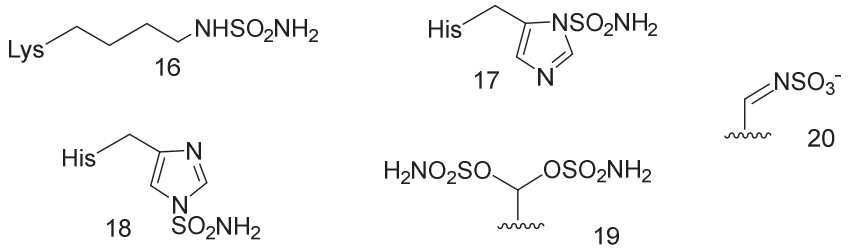


Figure 23 : Quelques produits supposés issus de la réaction de l'intermédiaire dioxyde d'iminosulfane SO_2NH avec les résidus présents dans le site catalytique qui mènerait à l'inactivation de l'enzyme. Le produit 20 est celui supposé comme celui menant à la transformation irréversible de la formylglycine.

Le produit **20** a été identifié par le groupe de William comme étant celui menant à l'inactivation des sulfatases. Il est issu de la réaction de l'intermédiaire SO_2NH avec la formylglycine (Schéma 15).

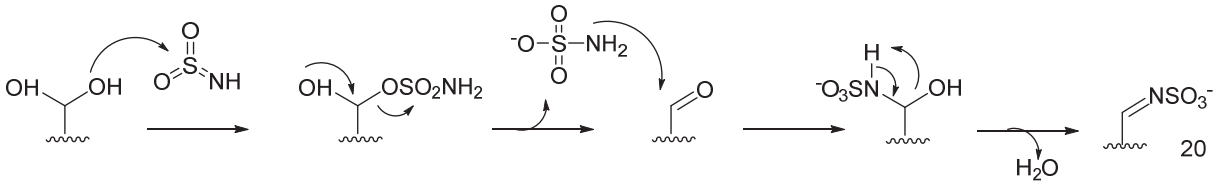


Schéma 15 : Mécanisme expliquant la formation du composé 76.

Le Schéma 16 représente tous les composés pouvant se former lors de l'inhibition des endosulfatases par un composé comportant une fonction sulfamate.

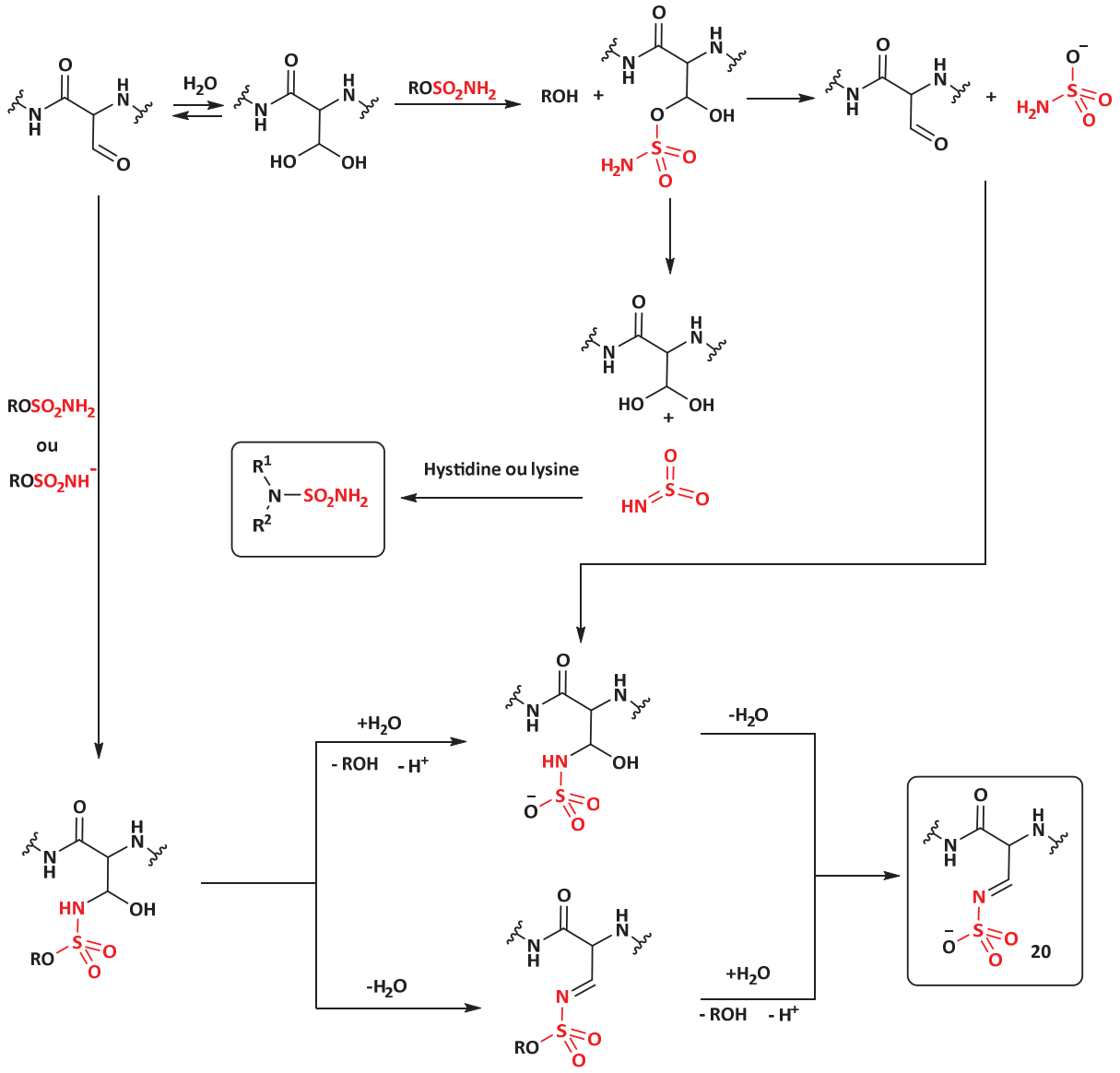


Schéma 16 : Schéma représentant les composés pouvant se former lors de l'inhibition du site catalytique des sulfatases par un sulfamate.

La découverte de la fonction sulfamate comme inhibiteur des sulfatases a eu lieu en 1994 par la recherche d'inhibiteur de la stéroïde sulfatase impliquée dans les cancers hormonaux du sein. Le sulfamate a, par la suite, été utilisé pour synthétiser également des inhibiteurs des endosulfatases impliqués dans de nombreux cancers. La découverte de son mécanisme d'inhibition a permis de déterminer que le sulfamate est un inhibiteur irréversible par la coupure de la liaison oxygène-sulfate de la fonction et que le SO_2NH résultant pourrait réagir avec les différents résidus présents dans le site catalytique de l'enzyme, ce qui mènerait à son inhibition. Cette hypothèse permet d'expliquer la stœchiométrie d'inhibition qui est comprise entre 3 et 6.

Même si le mécanisme d'inhibition des sulfatases par un sulfamate n'est pas encore complètement élucidé, ce type de molécules ne permet pas la formation d'une liaison covalente avec le substrat et

induit la destruction du site catalytique. L'inhibition du site catalytique par un inhibiteur formant une liaison covalente avec la formylglycine aurait un grand intérêt dans l'étude de ces enzymes.

II.3 Autres fonctions réagissant avec une fonction aldéhyde

La présence d'un aldéhyde au sein des sulfatases est un avantage pour avoir accès à de la bioconjugaison car cette fonction électrophile a une réactivité orthogonale aux acides aminés des protéines et à leurs fonctionnalités. Elle peut alors réagir avec de nombreuses molécules fonctionnalisées qui peuvent augmenter les propriétés des protéines. La conjugaison d'un polyéthylèneglycol (PEG) sur une protéine ou médicament peut augmenter sa demi-vie, la liaison avec une sonde fluorescente peut permettre de faire de l'imagerie *in vivo* ou de traquer les protéines, la formation d'anticorps conjugué à des médicaments (antibody-drug conjugate) est également en plein essor pour le traitement de cancer…[135–138] La présence de cette fonction représente un tel avantage que de nombreux groupes ont cherché à l'incorporer dans différentes protéines par des moyens chimique, génétique ou enzymatique.

II.3.1 Incorporation de l'aldéhyde sur la protéine

II.3.1.a Incorporation par voie chimique

L'aldéhyde peut être obtenu par oxydation de la thréonine ou de la sérine, localisé au niveau du N-terminal de la protéine, par du périodate de sodium ($NaIO_4$). Cette réaction connue sous le nom de « réaction de Malaprade » est analogue à celle effectuée sur des diols vicinaux (Schéma 17).[139] L'aldéhyde résultant pauvre en électron est nommé α-oxo aldéhyde ou glyoxylamide (Schéma 18).[140] Cette réaction d'oxydation est pratique puisqu'elle est 100 à 1000 fois plus rapide que l'oxydation de diols vicinaux, cependant elle peut également oxyder les résidus de méthionine et cystéine présents dans le reste de la protéine.[141]

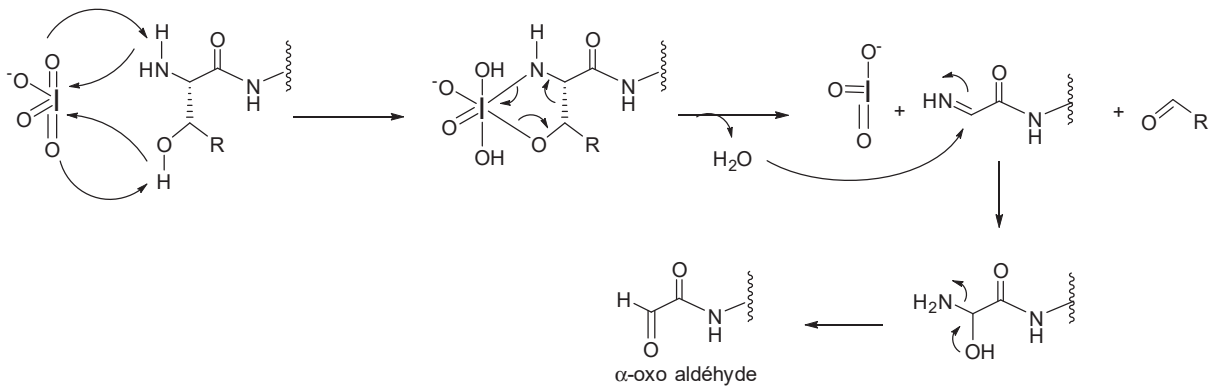


Schéma 17 : Mécanisme d'oxydation de la thréonine ou de la sérine par le périodate de sodium $NaIO_4$.

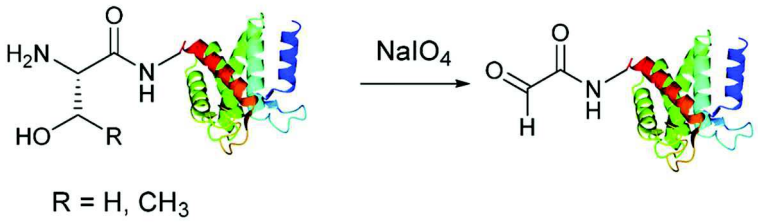


Schéma 18 : Formation de l'α-oxo aldéhyde par réaction d'une sérine ou d'une thréonine N-terminale avec le périodate de sodium.[140]

Une autre méthode d'oxydation du résidu N-terminal a été développée et permet une sélectivité pour cet acide aminé et peut être utilisée sur des protéines contenant une alanine, glycine, aspartate, glutamate, glutamine en position N-terminale. Cette oxydation est en fait une transamination biomimétique et utilise le pyridoxal 5-phosphate (forme active de la vitamine B_6 qui intervient dans le métabolisme des acides aminés) contenant un aldéhyde qui va se condenser sur l'amine de l'acide aminé pour former une imine. Après un réarrangement et une hydrolyse, l'α-oxo aldéhyde est obtenu (Schéma 19). Cette réaction est une transamination de l'acide aminé au PLP.[142–144]

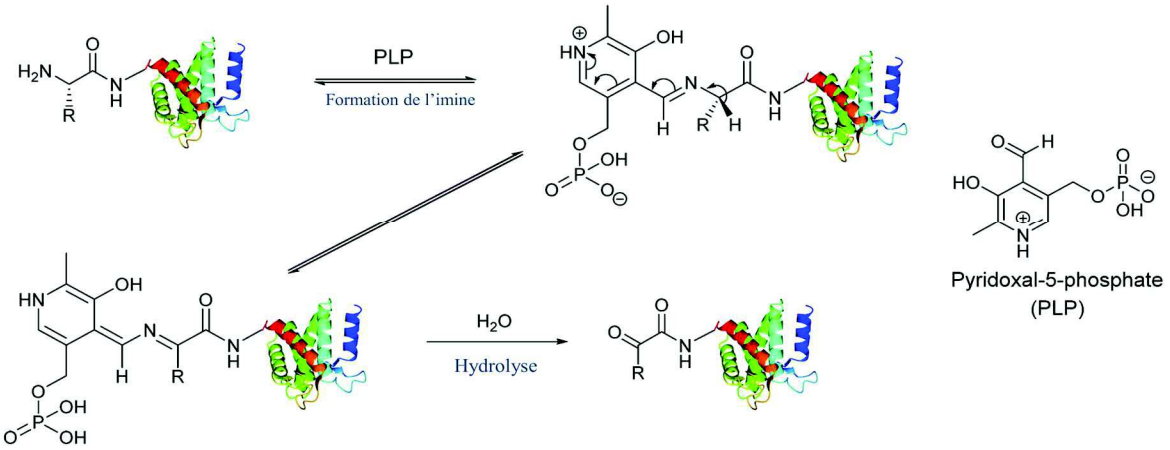


Schéma 19 : Mécanisme de formation l'α-oxo aldéhyde par transamination biomimétique du résidu N-terminal en utilisant le pyridoxal-5-phosphate.[140]

II.3.1.b Incorporation par voie enzymatique

b.1 Incorporation utilisant la protéine farnésyl-transférase

Le groupe de Poulter a développé en 2006 une méthode s'appuyant sur la protéine farnésyl-transférase (PFTase) pour fonctionnaliser des protéines. La PFTase est une enzyme qui additionne un lipide isoprénoïde tel que le farnésyl sur les thiols présents sur les cystéines de protéines (la farnélysation). Cette enzyme est spécifique de la cystéine présente dans un tétrapeptide à l'extrémité C-terminal de la protéine et utilise le farnésyl pyrophosphate (FPP) pour cette transformation. La PFTase peut utiliser des dérivés du FPP pour incorporer différentes fonctions sur la protéine. Ainsi le groupe de Poulter a d'abord utilisé des dérivés du FPP afin d'y introduire des groupements permettant la cycloaddition de Huisgen comme des azotures ou des alcynes (Schéma 20).[145]

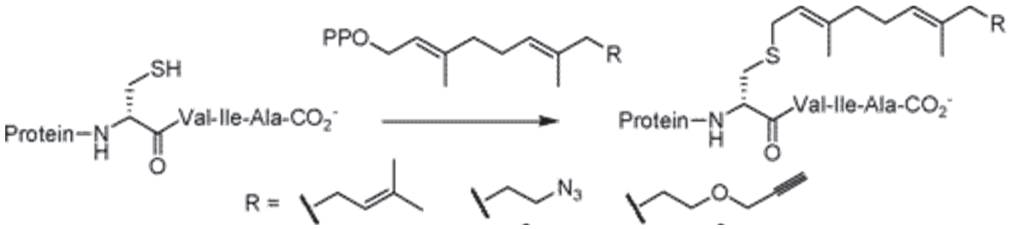


Schéma 20 : Fonctionnalisation de la protéine avec des dérivés du FPP comportant des groupements permettant la réaction de Huisgen tels que l'azoture ou l'alcyne. Le tétrapeptide indispensable à la reconnaissance de la PFTase est généralement : cystéine-valine-isoleucine-alanine.[145]

D'autres groupes ont ensuite développé d'autre dévirés du FPP comportant des aldéhydes afin de pouvoir fonctionnaliser la protéine cible (Figure 24).[146–148]

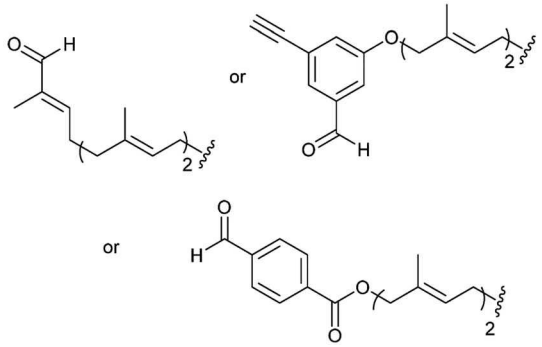


Figure 24 : Exemples de différents dérivés du FPP permettant l'introduction d'une fonction aldéhyde sur la protéine cible.[140]

b.2 Incorporation utilisant la tubuline tyrosine ligase

La tubuline tyrosine ligase (TTL) est une enzyme modifiant de façon post-traductionnelle l'α-tubuline en y ajoutant une tyrosine à son extrémité C-terminal. Le groupe de Leonhardt a récemment utilisé cette enzyme afin d'y introduire des analogues de la tyrosine comportant une fonction aldéhyde tel que la 3-formyl-L-tyrosine (3ForTyr) (Schéma 21). L'incorporation de ce dérivé a été optimisée jusqu'à obtenir 99 % de conversion.[149]

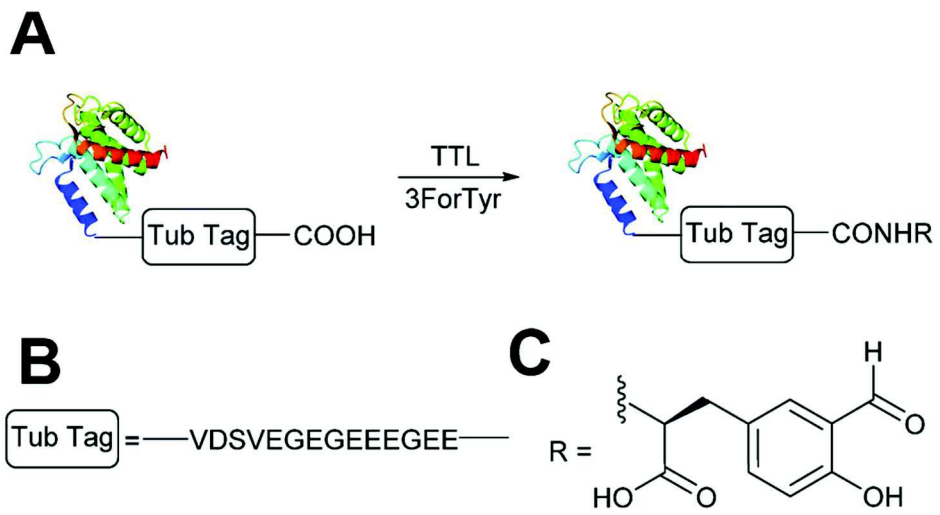


Schéma 21 : A) La tubuline tyrosine ligase reconnait le « Tub Tag » présent à l'extrémité C-terminal de la tubuline et y ajoute un résidu de tyrosine. B) Le « Tub Tag » est un peptide de 14 acides aminés permettant la reconnaissance de la TLL. C) Le dérivé de la tyrosine utilisé pour introduire une fonction aldéhyde sur la protéine : la 3-formyl tyrosine.[140]

II.3.1.c Incorporation par voie génétique

c.1 Conversion de la cystéine par l'enzyme FGE

Le groupe de Bertozzi a exploité à partir de 2007, l'enzyme FGE modifiant le résidu de cystéine en formylglycine chez les sulfatases, pour incorporer des aldéhydes dans des protéines. Le pentapeptide minimal à l'activité de FGE (CXPXR) a été introduit à l'extrémité N ou C-terminal de la séquence et les protéines recombinantes ont été exprimées dans des cellules possédant la FGE afin d'avoir accès à l'aldéhyde. Cette méthode a montré un taux de conversion supérieur à 85 % de la cystéine en FGly.[150–152]

c.2 Conversion de la sérine par l'enzyme AtsB

Une deuxième enzyme permet d'accéder à la formylglycine à partir de cystéine ou de serine. Il s'agit de la protéine AtsB appartenant à la famille des « Radical S-Adenosyl Methionine (radical-SAM) » protéine. Cette enzyme est trouvée presque exclusivement chez les procaryotes et utilise un cluster de fer et soufre afin de couper de manière réductrice la S-adénosylméthionine et former le radical 5-déoxyadénosyl. Ce radical soustrait un proton à la cystéine ou la sérine afin de former la 5-déoxyadénosine et la formyglycine (Schéma 22).[153,154]

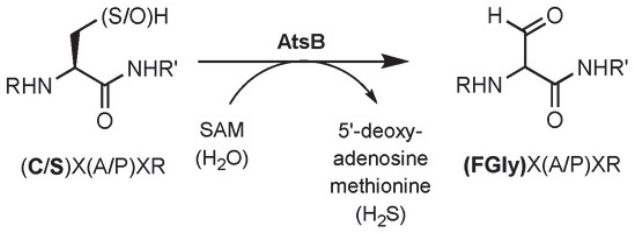


Schéma 22 : Formation de la FGly à partir d'une cystéine ou d'une serine par l'enzyme AtsB. Le pentapeptide nécessaire à la reconnaissance de l'enzyme est (C/S)X(A/P)XR.[155]

Le groupe de Dierks a exploité cette enzyme anaérobique afin d'incorporer des aldéhydes sur des protéines à partir de résidu sérine.[155] En utilisant deux peptides de reconnaissance différents, il a pu convertir sur une même protéine, deux cystéines en aldéhydes : AtsB a converti la cystéine du peptide CTAGR en FGly et FGE a converti la cystéine du peptide CTPSR en FGly.[156]

II.3.2 Modifications des enzymes présentant un aldéhyde

Il existe de nombreuses méthodes de modifications de substrat portant un aldéhyde, développées selon la nature de la liaison voulue, la réactivité de l'aldéhyde, les conditions de modifications telles que le pH ou l'ajout de co-solvant… Les plus développées étant la formation d'oxime/hydrazone. Cette partie est consacrée à présenter quatre méthodes différentes utilisées pour la fonctionnalisation des aldéhydes (Schéma 23).

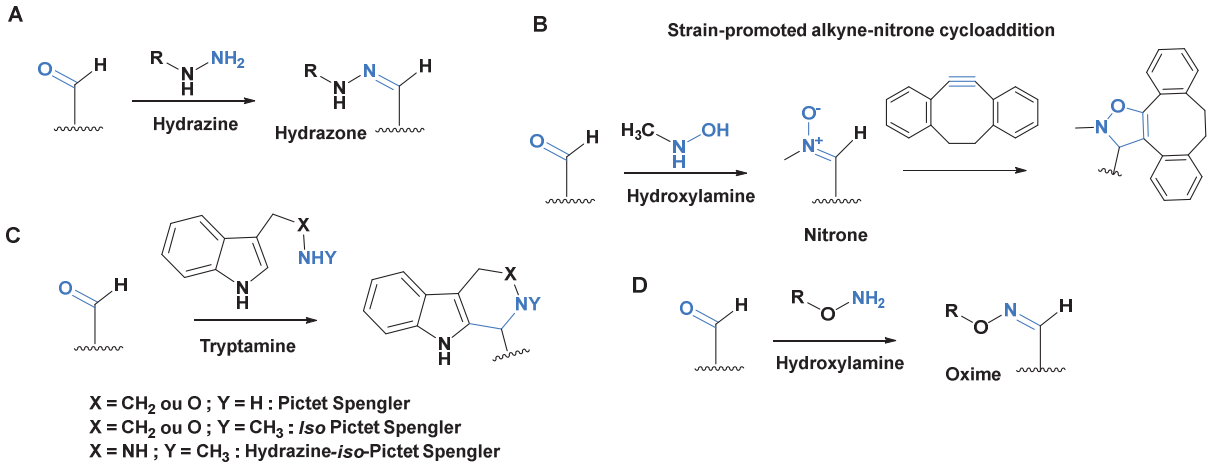


Schéma 23 : Représentation de quatre méthodes utilisées pour la fonctionnalisation des molécules portant une fonction aldéhyde. A) Fonctionnalisation par formation d'un hydrazone à partir d'une hydrazine. B) Fonctionnalisation de l'aldéhyde par réaction avec une oxyamine pour former une nitrone intermédiaire qui réagit selon une cycloaddition [3+2] avec une alkyne cyclique. C) Fonctionnalisation d'un aldéhyde avec des dérivés de tryptamine par des réactions de Pictet-Spengler. D) Fonctionnalisation de l'aldéhyde par réaction avec une oxyamine pour former une oxime.

II.3.2.a Fonctionnalisation par hydrazide et oxyamine

Les réactions utilisant l'hydrazine ou l'oxyamine sur des protéines portant un aldéhyde sont les méthodes les plus utilisées et donc les plus optimisées. La formation d'oximes et hydrazones est issue de la condensation d'une oxyamine/hydrazide sur un aldéhyde/cétone, sous catalyse acide (3<pH<7). Cette réaction libère une molécule d'eau et est réversible car l'eau générée peut hydrolyser la liaison C=N formée (Schéma 24).[157]

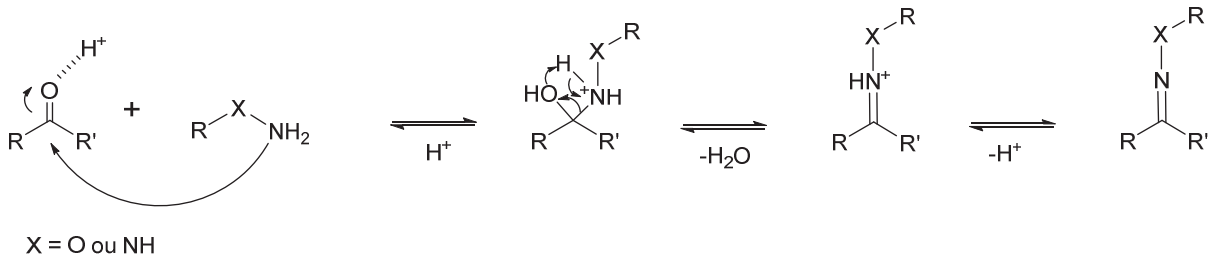


Schéma 24 : Mécanisme de formation de l'oxime/hydrazone à partir de l'oxyamine/hydrazide et de l'aldéhyde/cétone, catalysée par de l'acide.

L'hydrolyse de la double liaison C=N commence par la protonation de l'azote. L'atome X directement attaché influence donc la stabilité du conjugué : plus X est électronégatif, plus la basicité de l'azote diminuera. Ainsi, une oxime est plus stable qu'une hydrazone qui est plus stable qu'une imine [χ_P(O) = 3,5 ; (χ_P(N) = 3,0 (χ_P(C) = 2,6]. La double liaison sera également moins stable à pH acide et à haute température.[158]

II.3.2.b Fonctionnalisation par réaction de Pictet Spengler

La réaction de Pictet Spengler est une réaction de cyclisation entre un aldéhyde et une tryptamine passant par un intermédiaire iminium et formant une liaison C-C entre les deux réactifs (Schéma 25). Le produit obtenu est donc stable. Elle a été effectuée sur des tryptamines comportant une amine libre, une fonction oxyamine, une amine méthylée (iso Pictet Spengler) et sur des hydrazides méthylées (hydrazide iso Pictet Spengler). Cette réaction peut être effectuée dans une gamme de pH allant de 4 à 7.

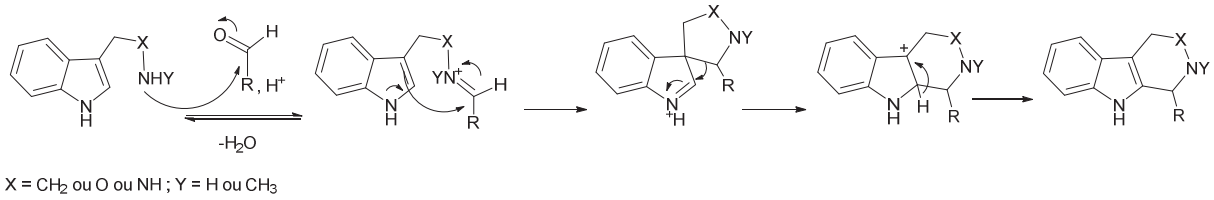


Schéma 25 : Mécanisme de la réaction de Pictet Spengler entre un aldéhyde et une tryptamine menant à la formation d'un cycle et d'une liaison C-C.

La réaction de Pictet Spengler a été utilisée pour lier des PEG, des biotines et des sondes fluorescentes sur des α-oxo aldéhyde-myoglobines, sur des protéines se liant au maltose et sur des anticorps-FGly.[159,160]

II.3.2.c Fonctionnalisation par cycloaddition nitrone-alcyne

La réaction de Huisgen entre des azotures et des alcynes est bien connue pour la fonctionnalisation des protéines. Cependant, elle est catalysée par du cuivre et n'est donc pas réalisable en milieu vivant puisque ce métal est toxique pour les cellules bactérienne et mammalienne. Le groupe de Bertozzi a alors développé une nouvelle méthode de cycloaddition [3+2], sans catalyseur. En utilisant des alcynes cycliques avec une forte tension de cycles, la réaction est accélérée et peut s'effectuer en milieu physiologique.[161] Le groupe de Van Delft a fait évoluer cette méthode en faisant réagir des nitrones sur les alcynes cycliques, afin d'avoir une vitesse de réaction plus élevée et de pouvoir partir d'un aldéhyde. La formation du cyclo-adduit se fait en trois étapes à partir du résidu N-terminal de la protéine : celui-ci est d'abord oxydé en aldéhyde qui réagit avec l'oxyamine pour former de la nitrone qui réagit ensuite avec l'alcyne (Schéma 26).[162]

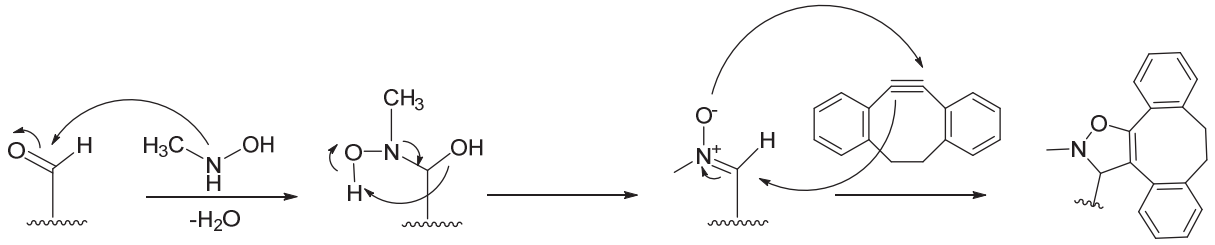


Schéma 26 : Mécanisme permettant la fonctionnalisation de substrat par cycloaddition [3+2]. L'aldéhyde formé à partir du résidu N-terminal de la protéine réagit avec l'oxyamine pour formé la nitrone qui réagit à son tour avec l'alcyne cyclique.

Cette méthode de fonctionnalisation a été utilisée pour ajouter un PEG sur l'interleukine 8.[163]

La découverte des endosulfatases s'étant fait dans les années 2000, ces enzymes sont encore peu connues. De nombreuses études ont cependant mis en lumière l'implication des HSulfs dans des pathologies telles que les cancers et ces enzymes sont alors devenues des cibles thérapeutiques. Néanmoins, peu de recherches ont mené à la synthèse d'inhibiteur spécifique des endosulfatases. La meilleure stratégie pour le moment est donc de synthétiser des inhibiteurs mimant leur substrat naturel : les Héparanes Sulfate. Le groupe de Wong a synthétisé des mimes comportant une fonction sulfamate, inhibant de façon irréversible les endosulfatases avec un Ki de l'ordre du micromolaire.

La fonction sulfamate découverte en 1994 comme inhibiteur des sulfatases, dans le cadre de la recherche d'inhibiteur de la stéroïde sulfatase, mime la fonction sulfate. Elle est également hydrolysée

par les sulfatases par un mécanisme E_1cb et la sulfonylamine résultante réagit avec les résidus du site catalytique de l'enzyme et la FGly, menant à son inactivation. Ce mécanisme d'inhibition a une stœchiométrie de 3 à 6. L'hydrolyse de la fonction sulfamate et la dégradation du site catalytique ne permet pas de réaliser des co-cristallisations de l'enzyme avec son substrat.

La synthèse d'inhibiteur ayant une fonction permettant la bioconjugaison serait alors une bonne solution. Les endosulfatases ont l'avantage d'avoir une fonction formylglycine. De nombreux groupes ont développé des méthodes chimiques, enzymatiques ou génétiques permettant d'accéder à des aldéhydes sur des protéines n'en possédant pas naturellement pour pouvoir les fonctionnaliser. Une fois ce carbonyle présent, diverses réactions permettent d'attacher des molécules d'intérêt à la protéine cible, telles que la formation d'oxime ou d'hydrazone, la réaction de Pictet Spengler, la cycloaddition [3+2] en passant par une nitrone intermédiaire.

Chapitre 2

Synthèse d'oligosaccharides comme inhibiteurs de l'Endosulfatase Humaine HSulf2

I. Synthèse de fragments d'Héparane Sulfate

I.1 Méthodes utilisées pour la synthèse des Héparane Sulfate

La synthèse chimique des HS/HP est une méthode pour obtenir des structures caractérisées et d'une pureté contrôlée par rapport à leur obtention à partir de tissu animal. Cependant, la synthèse de ces molécules est fastidieuse car elle comprend des nombreuses étapes d'élongation de chaînes et protection/déprotection des groupements sensibles. De plus, les interactions HS/protéines sont liées en partie au degré de sulfatation de ces molécules. Étant donné la diversité structurale des HS (un tétrasaccharide d'HS présente 1024 possibilités de schéma de sulfatation), synthétiser toutes les molécules possibles représente un travail titanesque. C'est pourquoi, de nombreux groupes de recherche tentent d'optimiser les synthèses afin que celles-ci soient plus courtes ou requièrent moins de purification, au moyen de méthodes variées.

I.1.1 Synthèse chimioenzymatique

La synthèse par voie chimique des HS requiert de nombreuses étapes de purification afin de séparer des isomères indésirables obtenus lors des réactions de glycosylation. Au contraire, la synthèse par voie enzymatique permet un excellent contrôle de la stéréosélectivité et de la régiosélectivité des réactions. Cependant, la synthèse par voie enzymatique nécessite des substrats bien définis reconnaissables par les enzymes. Par exemple, la 2-*O*-sulfotransférase a besoin de l'introduction du groupement *N*-sulfate sur la glucosamine pour exercer son activité.[164] Cette spécificité des enzymes peut devenir contraignante pour la synthèse de fragments d'HS ayant des degrés de sulfatation

différents. La synthèse chimioenzymatique est un bon compromis entre la flexibilité de la synthèse chimique et la haute spécificité des réactions catalysées par des enzymes.

I.1.1.a Synthèse de chaînes d'HS à motif répétitif

Plusieurs méthodes de synthèse chimioenzymatique ont été développées afin d'accéder à des chaînes d'HS du domaine S en utilisant des enzymes soit pour la fonctionnalisation du polysaccharide de base, soit pour la construction du squelette et sa fonctionnalisation. Les chaînes obtenues sont composées d'unités disaccharidiques répétitives. Trois méthodes de synthèse sont présentées :[164]

- A) Une approche semi-synthétique dans laquelle le squelette de la chaîne HS est produit *in vivo* et extrait d'un organisme et ensuite modifié *in vitro* par des enzymes. Cette approche est utilisée par le groupe de Liu qui extrait de la bactérie *Escherichia coli* le polysaccharide héparosane composé d'une unité dissacharidique répétitive [GlcA (1→4) GlcNAc]. Après *N*-désacétylation et *N*-sulfatation effectuées par voie chimique, le polysaccharide est transformé en HS en utilisant des enzymes recombinantes issues de la biosynthèse des HS. Les deux premières réactions peuvent également être effectuée par voie enzymatique en utilisant la *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférase (NDST) (Schéma 27).[165] Cette méthode ne permet pas le contrôle de la longueur et de la composition des chaînes.
- B) La synthèse totale de fragment d'HS peut également être réalisée en utilisant des monosaccharides ou disaccharides. Cette méthode a été mise au point par Liu et Linhardt qui utilisent les glycosyltransférases (KfiA et PmHS2) pour transférer des sucres UDP-activés comme donneurs sur des monosaccharides ou disaccharides accepteurs afin de construire le squelette du polysaccharide (Schéma 27 et Figure 25).[166] Cette méthode permet le contrôle de la longueur des chaînes mais est beaucoup plus coûteuse.
- C) L'échange de chaîne de GAG par transglycosylation : l'équipe de Kakizaki a mis au point cette méthode utilisant l'hyaluronidase qui, mise en présence d'acide hyaluronique, va libérer le disaccharide (IdoA-GlcNAc) du site non-terminal qui peut être directement transféré à l'extrémité non-réductrice d'une autre chaîne de GAG.[167] Cette méthode ne permet pas un bon contrôle de la longueur des chaînes synthétisées.

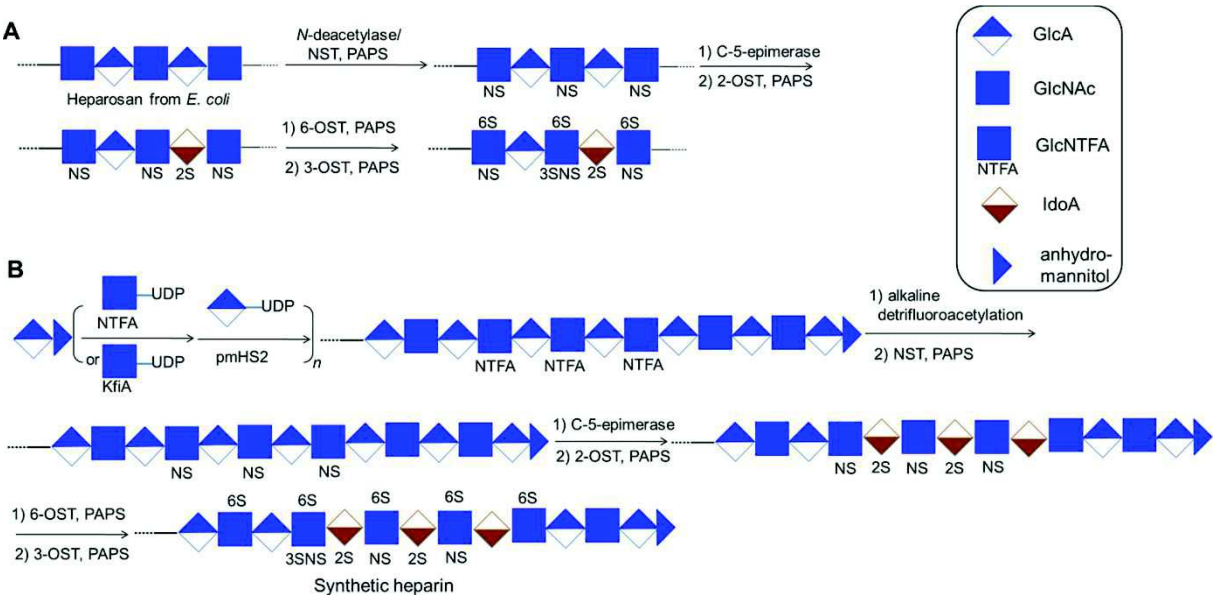


Schéma 27 : Approches chimioenzymatiques pour la synthèse de d'HS. A) Hémi-synthèse à partir du polysaccharide héparosane. Les sulfotransférases transfèrent le groupement sulfate à partir du 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), le donneur de sulfate naturel. B) L'utilisation des glycosyltransférases KfiA ou pmHS2 pour transférer des sucres UDP-activés permet de construire le squelette du polysaccharide. L'utilisation de l'enzyme bifonctionnelle *N*-désacétylase/NST (NDST) peut être problématique car elle est difficile à exprimer dans *E. coli*. Le sucre Glc *N*-trifluoroacétylé (NTFA) UDP-activé est alors une alternative. L'enlèvement du groupement trifluoroacétate par voie chimique permet alors d'accéder à GlcN qui est ensuite sulfaté par la NST.[168]

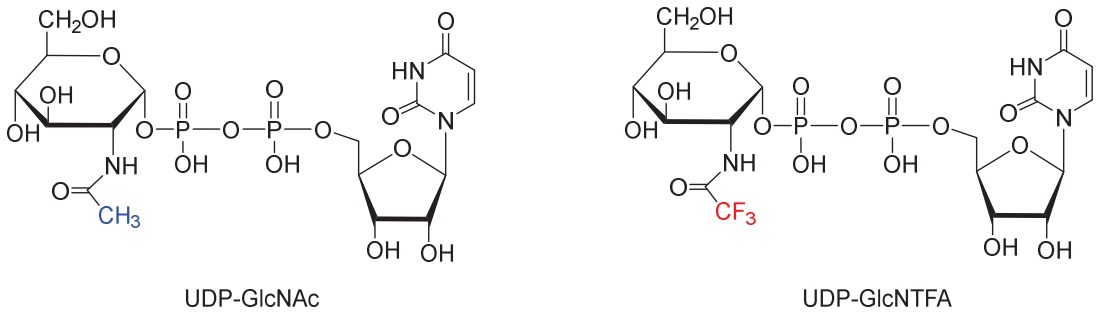


Figure 25 : Structure des sucres UDP activés transférés par les glycosyltransférases sur le saccharide donneur. UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine. UDP-GlcNTFA : Uridine diphosphate *N*-trifluoroacétylglucosamine.[166]

Ces trois méthodes de synthèse sont efficaces pour générer des chaînes d'HS mais ne permettent pas toujours un bon contrôle de leur longueur ou de leur degré de sulfatation ou épimérisation.

I.1.1.b Synthèse de chaînes d'HS avec diversité moléculaire

Le groupe de Boons a récemment développé une méthode de synthèse chimioenzymatique permettant de contrôler la sulfatation et l'épimérisation des fragments de HS en bloquant l'activité des enzymes à

différents endroits.[169] Pour cela, de nombreuses observations sur la spécificité de substrats ont été faites (Schéma 28 et Schéma 29) :

- La présence d'un éther méthylique en position 6 de la glucosamine, toléré par de nombreuses enzymes de la biosynthèse des HS, prévient la sulfatation de celui-ci.
- Le 6-*O*-méthyle bloque l'épimérisation de GlcA en IdoA sur le résidu +1 de l'oligosaccharide.
- La 6-OST a besoin du groupement *N*-sulfate sur la glucosamine cible et d'un résidu GlcA ou IdoA en position +1.
- L'enzyme NST ne sulfate pas le résidu de glucosamine se trouvant à l'extrémité réductrice.
- La *N*-sulfatation de la glucosamine côté réducteur empêche la modification de ce résidu par la 6-OST.
- La 2-OST ne sulfate que les IdoA et pas les GlcA.
- La C5-épimérase a besoin d'un résidu GlcA en position +2 pour épimériser le résidu 0.
- La C5-épimérase établit un équilibre entre le nombre de résidu IdoA et GlcA dans les séquences contenant GlcNS-GlcA-GlcNS/Ac. En utilisant la C5-épimérase en présence de la 2-OST, l'épimérisation peut être complète car la C5 épimérase ne reconnait pas IdoA2S.

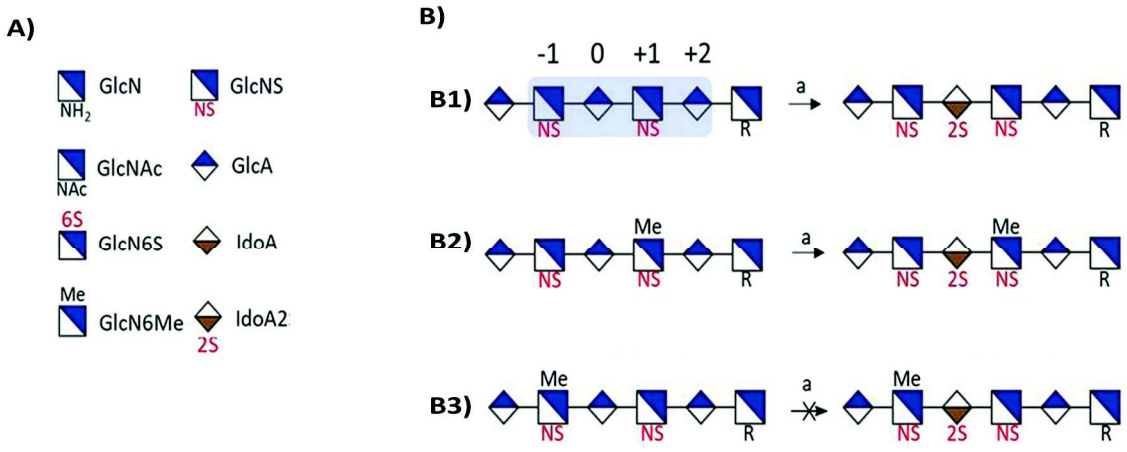


Schéma 28 : Représentation schématique de l'épimérisation/2-*O*-sulfatation sélective. A) Représentation des sucres. B) Trois cas de synthèses sélectives en utilisant les spécificités de substrat des enzymes. R peut être un *N*-sulfate ou un *N*-acétate. B1) La C5-épimérase épimérise le résidu 0 qui se trouve dans une séquence GlcNS-GlcA-GlcNS /Ac et qui est ensuite 2-*O*-sulfaté. B2) La présence d'un éther méthylique en position 6 de GlcNS ne perturbe pas l'activité de la C5-épimérase et de la 2-OST. B3) Le résidu de GlcNS méthylé bloque l'activité de la C5-épimérase sur le résidu de GlcA +1. Conditions réactionnelles : a) PAPS, C5-epi/2-OST, Tris (25 mM, pH 7.5).

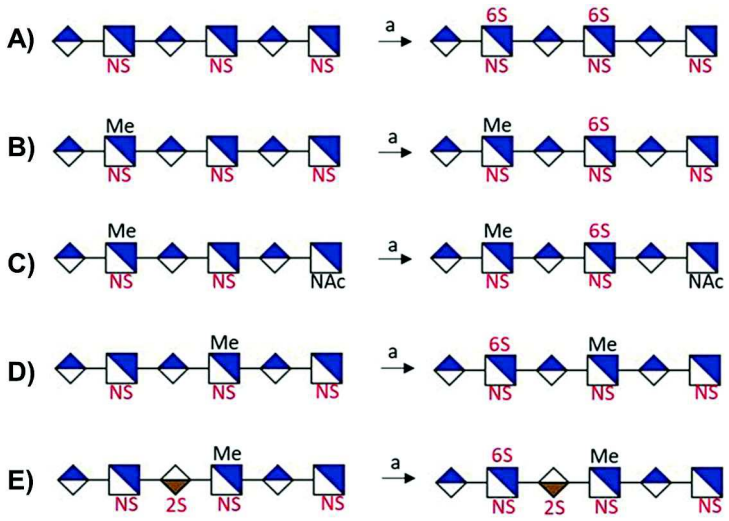


Schéma 29 : Représentation de la 6-*O*-sulfatation enzymatique sélective. A) La 6-OST a besoin d'un résidu GlcA en position +1 pour sulfater la glucosamine. B, D et E) La présence du groupement 6-*O*-méthyle n'affecte pas la 6-*O*-sulfatation des autres résidus de glucosamine. C) La présence d'un résidu GlcNAc en position +2 n'affecte pas la 6-OST. Conditions réactionnelles: a) PAPS, 6-OST, MES (50 mM, pH 7.1).

L'utilisation des spécificités de substrats des enzymes, lorsqu'elle est bien maitrisée permet d'accéder à un grand nombre de fragments différents. En effet, cette méthode a permis au groupe de Boons de réaliser la synthèse de 21 hexasaccharides avec des schémas de *O,N*-sulfatation et d'épimérisation différents à partir de seulement 3 hexasaccharides de départ.

I.1.2 Synthèse chimique

La synthèse chimique des HS à partir de monosaccharides commercialement disponibles nécessite de nombreuses étapes de protection/déprotection, de glycosylation et de nombreuses étapes de purification faisant parfois diminuer les rendements. En effet, la synthèse de disaccharides contenant l'acide iduronique ou glucuronique (présent dans les chaînes d'HS) à partir de monosaccharides disponibles peut aller de 18 à 29 étapes selon les groupements protecteurs présents. De nombreux groupes de recherche ont alors développé des méthodes permettant de réaliser plusieurs étapes en réaction monotope ou de manière itérative, à partir de disaccharide précurseur ou ont cherché à s'affranchir de certaines étapes de purification afin de faciliter les synthèses.

I.1.2.a Synthèse itérative pour la formation de longue chaînes d'HS

La synthèse itérative permet d'allonger les chaînes de polymères de façon rapide et efficace. Ainsi, le groupe de Gardiner en 2015 a synthétisé un polymère contenant 20 unités de GlcNS-IdoA par voie chimique. Cela a pu être réalisé grâce à une glycosylation itérative d'un tétrasaccharide donneur sur un

dodécasaccharide accepteur (la synthèse du dodécasaccharide a été optimisée à l'échelle du gramme lors de précédents travaux) (Schéma 30).[170,171] Le dodécasaccharide protégé avec un groupement protecteur (P = trichloroacétate) est d'abord déprotégé pour donner l'alcool libre et donc l'accepteur de glycosylation. Le tétrasaccharide donneur est ajouté afin d'effectuer la glycosylation et obtenir le 16-mer correspondant. Celui-ci est ensuite déprotégé pour obtenir l'accepteur et s'ensuit une autre glycosylation avec le tétrasaccharide accepteur. Ces deux étapes de déprotection/glycosylation ont été répétées jusqu'à obtenir l'oligosaccharide contenant 40-mer.

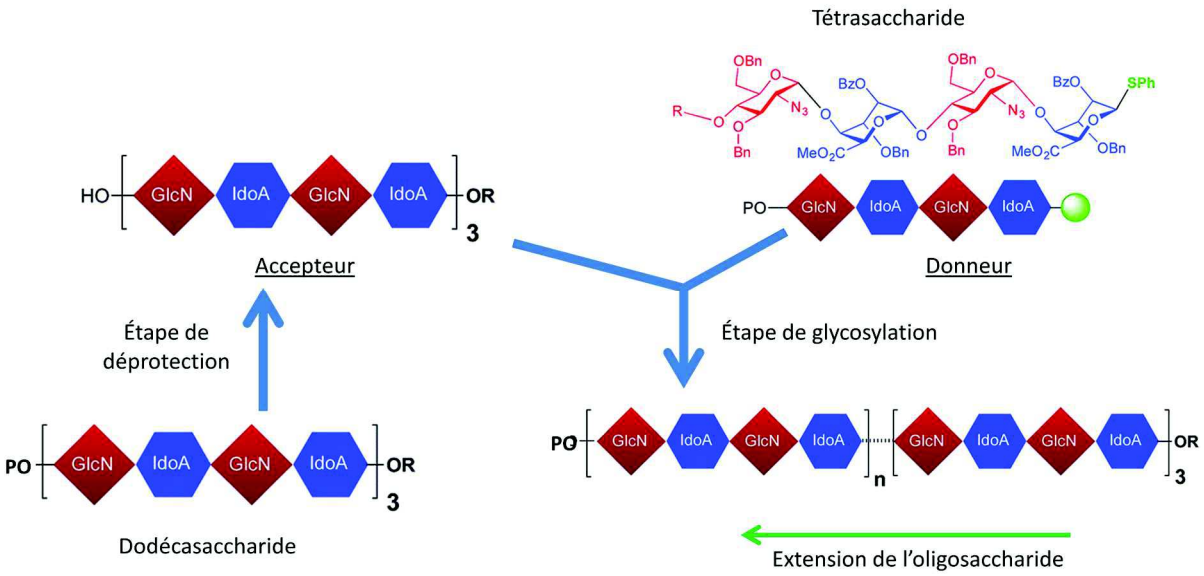


Schéma 30 : Représentation schématique de la synthèse itérative : Le dodécasaccharide est déprotégé et mis en réaction avec le tétrasaccharide donneur. L'étape de glycosylation mène à l'oligosaccharide 16-mer qui est ensuite déprotégé en accepteur glycosylé avec le tétrasaccharide donneur et ainsi de suite jusqu'au 40-mer.[170]

Cette méthode efficace permet d'accéder à de longues chaînes d'HS comportant le même motif disaccharidique mais ne permet pas de diversifier le schéma de sulfatation de l'oligosaccharide produit.

Le groupe de Gardiner toujours, a développé une autre méthode de glycosylation chimiosélective itérative basée sur le contrôle de la réactivité de la position anomérique qui ne requière pas de manipulation entre chaque glycosylation.[172,173] En effet, il utilise un motif ido-lactone comportant un thioglycoside désarmé comme accepteur de glycosylation, puis par ouverture de la lactone, celui-ci devient suffisamment réactif pour être donneur de glycosylation (Schéma 31).

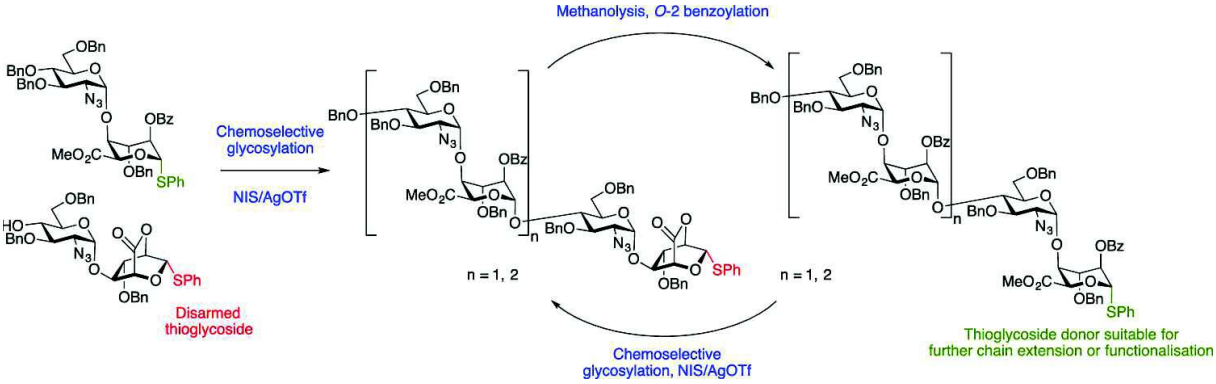


Schéma 31 : Représentation de la méthode de synthèse itérative développée par le groupe de Gardiner. Le disaccharide GlcN-Ido-lactone comporte un thioglycoside désarmé et est accepteur de glycosylation, le disaccharide GlcN-IdoA est donneur de glycosylation. Une fois l'étape de glycosylation effectuée, la lactone est ouverte par méthanolyse pour donné l'acide iduronique et l'alcool résultant est benzylé. Le thioglycoside présent est alors plus réactif, et peut être engagé dans une glycosylation en tant que donneur.[172]

La différence de réactivité entre Ido-lactone et IdoA serait due à la rigidité de la lactone qui bloquerait le sucre dans une forme ^{2,5}B et ne permettrait pas l'accès à des états de transitions de type demi chaise ou bateau croisé combiné à un mauvais recouvrement des orbitales pour chacune de ces configurations.

Cette méthode de glycosylation chimiosélective itérative permet de s'affranchir de manipulation sur la position anomérique du sucre entre chaque réaction. Ce disaccharide sous forme accepteur est transformé en deux étapes après glycosylation, en un oligosaccharide donneur pleinement protégé qui peut être engagé dans d'autres réactions de glycosylations ou être fonctionnalisé.

I.1.2.b Méthode de synthèse permettant la diversité de fragments d'HS

L'étude des interactions HS/protéines s'effectue par l'étude du schéma de sulfatation/épimérisation permettant leur affinité. La grande diversité structurelle des Héparane Sulfate représente donc un vrai challenge pour les chimistes voulant accéder à de nombreux oligosaccharides avec des structures différentes. Plusieurs groupes ont donc développé des méthodes permettant d'accéder rapidement à une diversité moléculaire.

b.1 Synthèse à partir de polysaccharide naturel

Le groupe de Hsiesh-Wilson a publié en 2019 une stratégie de synthèse dans laquelle le précurseur minimal est un disaccharide au lieu d'un monosaccharide.[174] Celui-ci est issu de la dépolymérisation de l'héparine qui est une matière première peu coûteuse et qui permet d'accéder aux quatre motifs essentiels pour la synthèse de fragments de HS : GlcN-IdoA, GlcN-GlcA, GlcA-GlcN, IdoA-GlcN déjà présent dans l'héparine (Schéma 32).

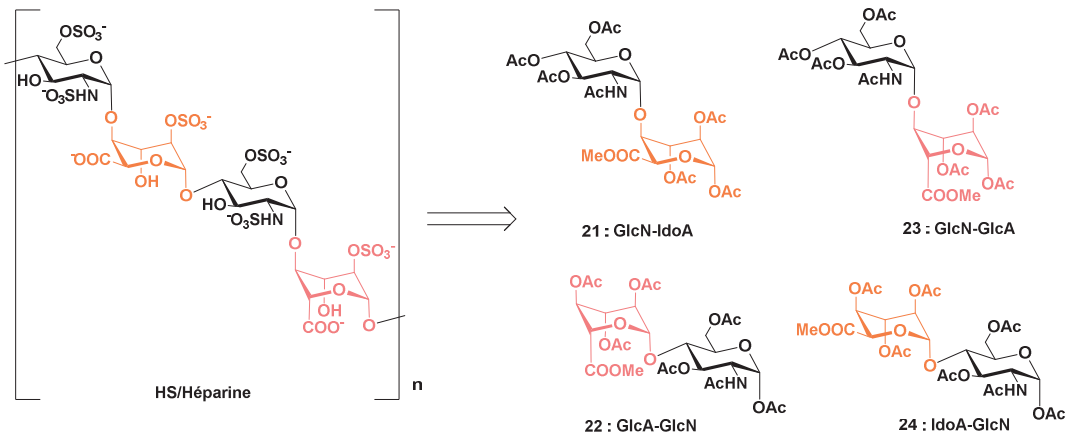


Schéma 32 : La dépolymérisation de l'héparine permet d'accéder aux quatre motifs essentiels pour la synthèse de fragments d'HS.[174]

Le traitement de l'héparine avec une solution d'acide triflique à 2 M dans l'eau à 100 °C pendant 6 h permet la coupure glycosidique du côté réducteur de IdoA et permet l'obtention du disaccharide GlcN-IdoA. Le disaccharide GlcA-GlcN est quant à lui obtenu par dépolymérisation de l'héparosane. Les disaccharides sont ensuite estérifiés, la glucosamine est acétylée, protégée par un groupement Cbz ou mise sous forme d'azoture puis le sucre est peracétylé. Cette méthode donne des rendements de 9 à 20 % sur 4 étapes et à l'échelle d'une vingtaine de gramme (Schéma 33A). Les résidus des blocs **21** et **22** sont ensuite épimérisés par une étape de bromation puis par déhalogénation radicalaire en présence de réducteur afin d'obtenir les 4 blocs de synthèse voulus (Schéma 33B). Les produits non-épimérisés peuvent facilement être recyclés.

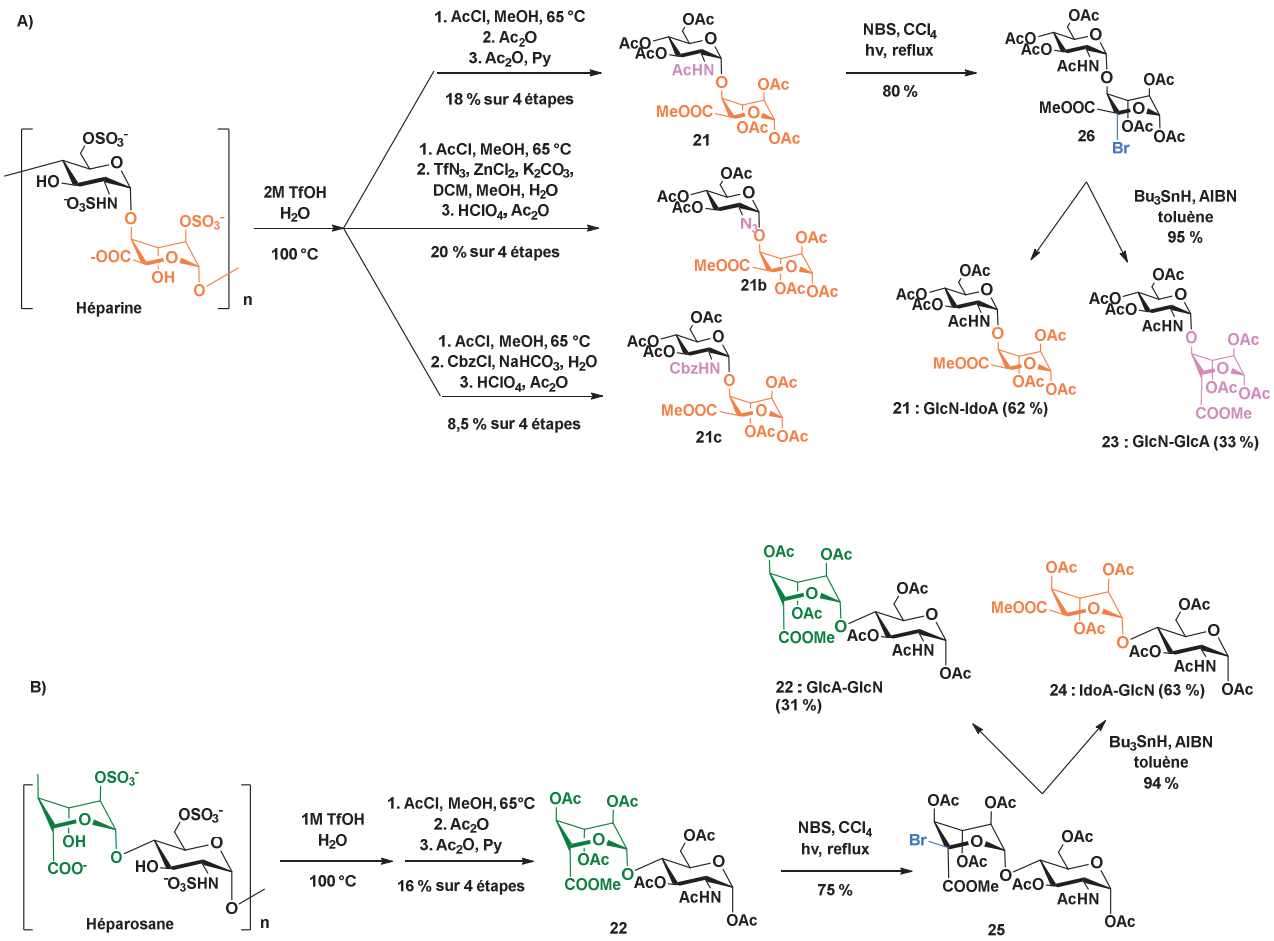


Schéma 33 : La dépolymérisation de l'Héparine puis estérification, suivi de l'enlèvement du méthyle en position anomérique et peracétylation permettent d'accéder au produit 21 : GlcN-IdoA. Sur le produit 21b, l'amine est mise sous forme azoture et est protégée par un groupement Cbz sur 21c. La dépolymérisation de l'héparosane suivie des mêmes étapes que pour 21, donne accès à la brique 22 : GlcA-GlcN. L'épimérisation de 21 et 22 par bromation puis déhalogénation radicalaire donne les produits 23 : GlcN-IdoA et 6 : IdoA-GlcN.[174]

Cette méthode permet donc d'accéder à des disaccharides précurseurs pour la synthèse de fragments d'HS en 4 à 6 étapes à partir de l'héparine. Cela permet de s'affranchir de la glycosylation entre le bloc glucosamine et iduronique/glucuronique et d'éviter de nombreuses étapes de protection/déprotection et ainsi d'être environ deux fois plus rapide que les méthodes partant d'un monosaccharide. Cependant, les rendements obtenus (8,5 à 20 % en 4 étapes) indiquent que cette méthode manque d'efficacité et n'est pas très économique en atomes. Ces 4 blocs de synthèse sont ensuite fonctionnalisés puis glycosylés afin d'obtenir des tétrasaccharides avec des schémas de sulfatation différents.

b.2 Synthèse programmable pour des réactions monotopes d'oligosaccharides

Le groupe de Wong a développé une méthode de synthèse programmable de réaction monotope depuis les années 1999.[175,176] Ce procédé s'appuie sur une base de données informatiques « optimer » qui stockent les valeurs de réactivité relatives (RVVs) de nombreux donneurs et accepteurs de glycosylation. Ces RVVs ont initialement été mesurées sur des donneurs comportant un p-méthylphényl thioglycoside (STol) en position anomérique. Leur réactivité a pu être corrélée au déplacement chimique de leur proton anomérique et cela a permis de répertorier plus d'une centaine de monosaccharides. Avec le développement de l'intelligence artificielle et grâce à l'apprentissage automatique, un nouveau programme « Auto-CHO » a permis de déterminer plus de 50 000 RVVs de bloc de synthèse virtuel, à partir de glycosylation répertoriée dans la littérature. La base de données regroupe le type de sucre, la localisation des alcools libres, la nature des groupements protecteurs et leur habilité à diriger la glycosylation et prédire également la stéréochimie du produit final. Pour un oligosaccharide donné, le programme cherche dans la base de données la meilleure voie de synthèse monotope. Cette stratégie de synthèse s'appuie sur la différence de réactivité entre plusieurs donneurs de glycosylation selon les groupements protecteurs qu'ils portent. Ainsi, lors de la synthèse « one pot », le donneur le plus réactif est utilisé à l'extrémité non-réductrice et le donneur le moins réactif à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide cible. Cela évite des réactions de protection/déprotection entre chaque réaction de glycosylation.

Cette méthode a été utilisée pour synthétiser des oligosaccharides complexes, améliorer la synthèse de l'idraparinux (dérivé de l'Arixtra (pentasaccharide dérivé de l'héparine et commercialisé comme médicament antigoagulant)), et a également permis la synthèse de pentasaccharides avec différents schémas de sulfatation.[177–180] C'est ce dernier exemple que nous allons regarder plus en détails.

Afin de synthétiser deux pentasaccharides avec des schémas de 6-*O*-sulfatation différents, le groupe de Wong a décidé d'adopter une stratégie de glycosylation [1,2,2] en synthèse monotope. Chaque liaison glycosidique formée est de stéréochimie α : ils utilisent l'influence des groupements protecteurs afin d'obtenir une excellente stéréosélectivité et également afin de créer une différence significative entre les différents RRV des mono et disaccharides. Ainsi, Les groupements N_3, TBDPS sur **27** et OAc sur **28** influencent la glycosylation α en minimisant les interactions avec la charge positive qui se développe durant l'état de transition (Schéma 34). De plus, le groupement TBDPS augmente le RRV du donneur **27.** Les blocs de synthèse **27**, **28** et **29** ont donc des RRVs bien différents (132.0, 18,2 et 0 respectivement). Lors de la synthèse « one pot », le donneur **27** le plus réactif (RRV = 132.0) est donc celui utilisé pour l'extrémité non-réductrice de l'oligosaccharide et le donneur **29**, le moins réactif (RRV = 0), celui utilisé pour l'extrémité réductrice.

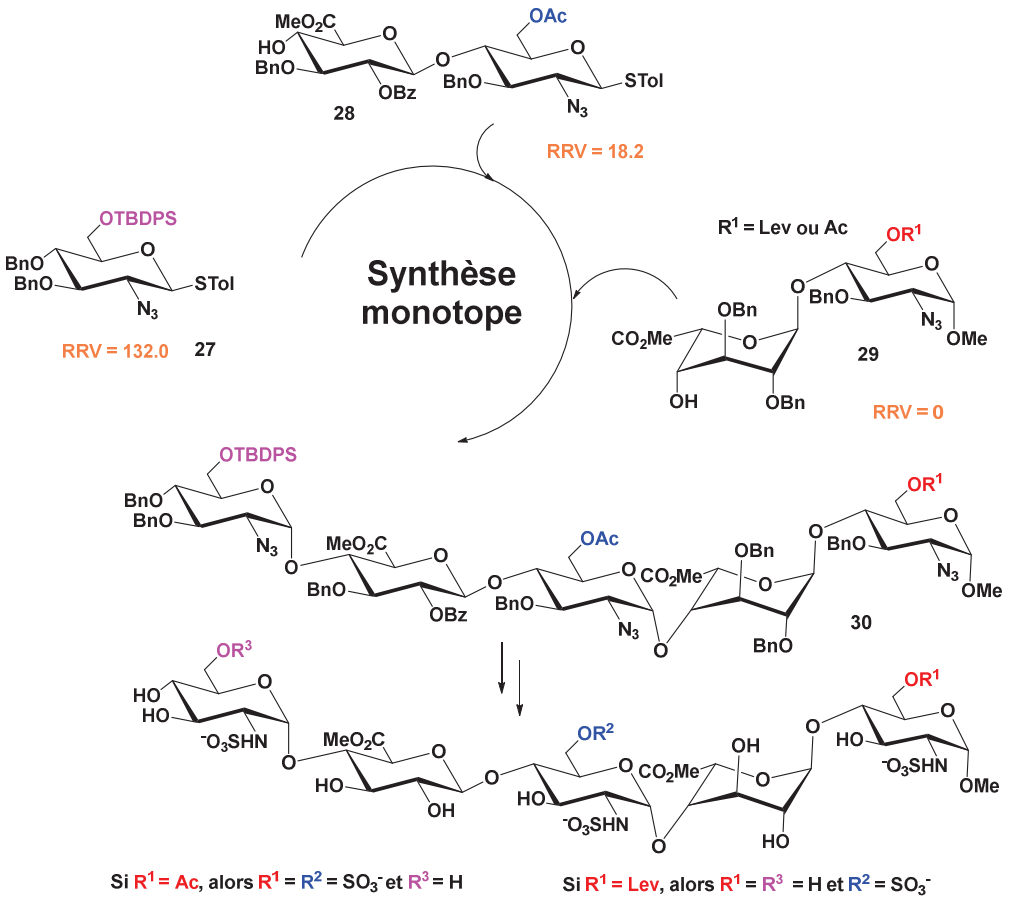


Schéma 34 : Ssynthèse monotope de deux pentasaccharides ayant des différences de 6-*O*-sulfatation. Le donneur 27 étant le plus réactif (RRV = 132) est utilisé pour l'extrémité non-réductrice du sucre et le donneur 17 étant le moins réactif est celui utilisé pour l'extrémité réductrice. Le pentasaccharide 30 issu des 3 réactions de glycosylation est ensuite déprotégé pour obtenir les deux oligosaccharides cibles. Celui avec le groupement Lev contient un 6-*O*-sulfate sur la glucosamine du côté réducteur et le sucre contenant le groupement OAc a deux 6-*O*-sulfate sur les deux glucosamines côté réducteur.

La réaction monotope menant au pentasaccharide ayant le groupement Lev est réalisée avec un rendement de 48 % alors que celle avec le groupement acétate a un rendement de 54 %.

Le groupe de Wong a donc développé une nouvelle méthode de synthèse monotope assistée d'un programme informatique permettant de prédire les réactivités des donneurs de glycosylation en fonction de groupements protecteurs présents sur la molécule. Cela permet donc la réalisation de 3 réactions de glycosylations en monotope avec d'excellentes stéréosélectivités et un très bon rendement de 48 à 54 % tout en s'affranchissant des différentes étapes de protection/déprotection et de purification, habituellement effectuée entre chaque étapes d'élongation de l'oligosaccharide.

b.3 Synthèse d'une librairie de disaccharides

Le groupe de Hung a développé une méthode de synthèse permettant de synthétiser les 48 disaccharides possibles retrouvés dans les chaînes d'HS à partir de deux monosaccharides.[181] Sa stratégie de groupement protecteur est la suivante :

- Un groupement méthyle permet de bloquer la position anomérique,
- Les alcools qui pourront être sulfatés sont protégés par différents groupements : l'alcool en position 2 de l'unité glucuronique/iduronique est protégé par un groupement benzoyle. L'alcool en position 3 de la glucosamine est masqué par un éther de naphtyl méthyle (2-NAP) et l'alcool en position 6 est protégé par un groupement tert-butyldiphénylsilyle (TBDPS),
- L'acétate protège l'alcool en position 6 qui est ensuite oxydée,
- Un groupement azoture donnera l'amine,
- Les alcools n'étant pas destinés à être sulfatés sont protégés par des groupements éther de benzyle.

Les disaccharides **31** GlcN-GlcA et **32** GlcN-IdoA ont donc été synthétisés et sont les briques de bases pour l'obtention des 48 unités (Schéma 35). Le composé **31** est ensuite désacétylé puis l'alcool primaire est oxydé pour former l'acide carboxylique présent sur l'acide glucuronique **33**. La désacétylation de Zemplén suivie d'une oxydation permet l'obtention de la lactone **34** à partir de **31**. Cette lactone permet de protéger l'acide carboxylique (Schéma 35). S'ensuit une suite de réaction de déprotection et de fonctionnalisation :

- Les azotures peuvent être réduits et l'amine acétylée en utilisant l'acide thioacétique (AcSH),
- Les groupements protecteurs des alcools à sulfater peuvent être enlevés sélectivement : Le DDQ enlève le groupement 2-NAPO, NaOMe enlève les groupements benzoyles et le TBAF enlève l'éther silylé du composé **33**. L'éther silylé du composé **34** est enlevé par du TASF car la basicité du TBAF provoque l'ouverture la lactone,
- La lactone du composé **34** est ouverture avec de l'oxyde de lithium,
- Les alcools qui ont été déprotégés sont ensuite sulfatés,
- Les azotures peuvent être réduits par du propanedithiol en présence de triéthylamine, puis l'amine sulfatée,
- Les groupements protecteurs restants (éther de benzyl, azoture, 2-NAP) sont enlevés par une hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon.

Selon les stratégies de déprotection des alcools et des amines, on obtient à la fin 24 disaccharides issus de **33** et 24 disaccharides issus de **34** en trois à sept étapes avec des rendements de 24 à 95 %.

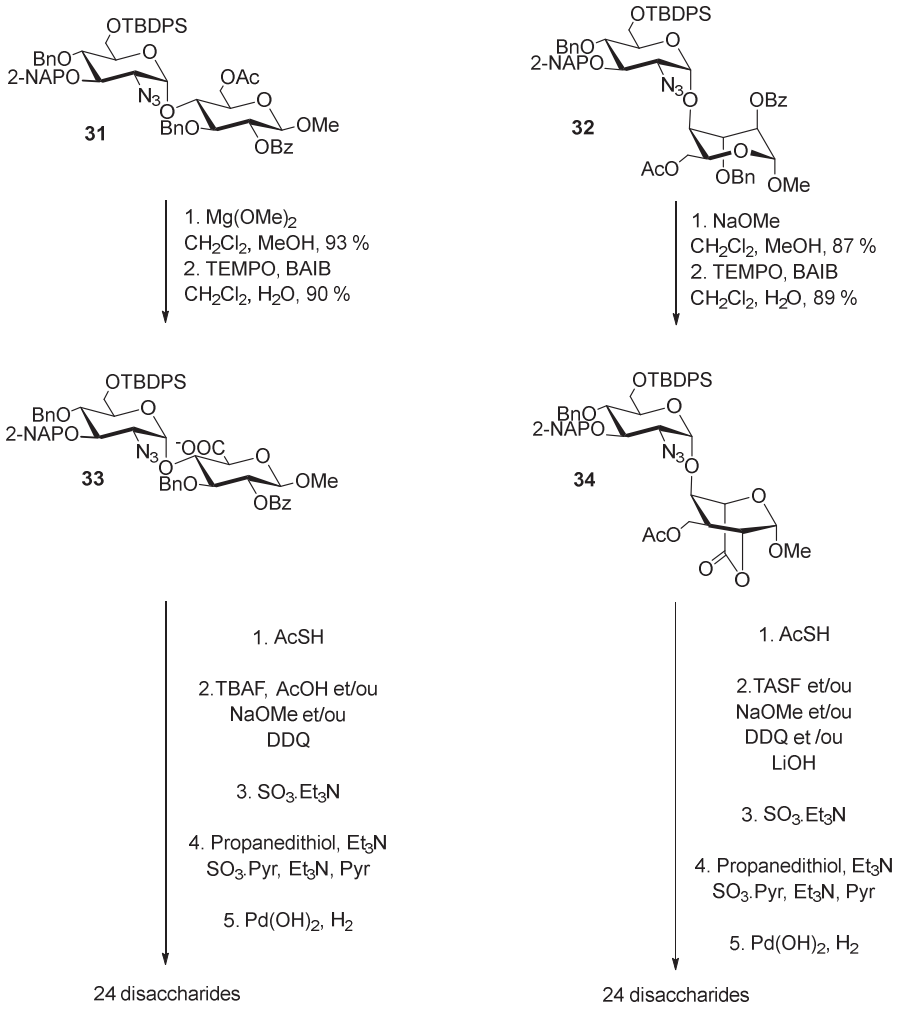


Schéma 35 : Synthèse des 48 disaccharides possibles retrouvés dans les chaînes d'HS à partir des disaccharides 19 et 20.

Les HS sont des molécules à la structure complexe et très diversifiée et qui ont un rôle très important dans de nombreux processus biologiques. C'est pourquoi ils suscitent beaucoup d'intérêt. Cependant, l'accès à des HS de structure connue et de bonne pureté est un challenge compte tenu du nombre d'étapes de synthèses qu'ils nécessitent. De nombreux groupes de recherches tentent donc de simplifier ces synthèses en partant de blocs de synthèse fonctionnalisés, en ayant recours à la synthèse sur phase solide ou en minimisant les réaction de protections/déprotection et les purifications par des réactions chimioenzymatiques hautement stéréosélectives ou de la synthèse monotope.

I.2 Synthèse chimique de fragments d'HS au laboratoire

I.2.1 Synthèse de disaccharide clé pour l'accès aux fragments d'Héparane Sulfate

Le laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années à la synthèse de fragments d'HS pour l'étude de leurs interactions avec des HSBPs comme les cytokines (Interferon-γ), les virus (VIH), les chimiokines (CXCL12).[182–185] Grâce à cette expérience, le laboratoire dispose maintenant de huit disaccharides de départ, qui permettent d'avoir accès à 24 disaccharides potentiellement présents sur les chaînes d'HS (Schéma 36).[186] Le choix de départ a été de ne pas sulfater la position 3 du résidu glucosamine pour éliminer les possibilités d'avoir une activité antithrombotique.

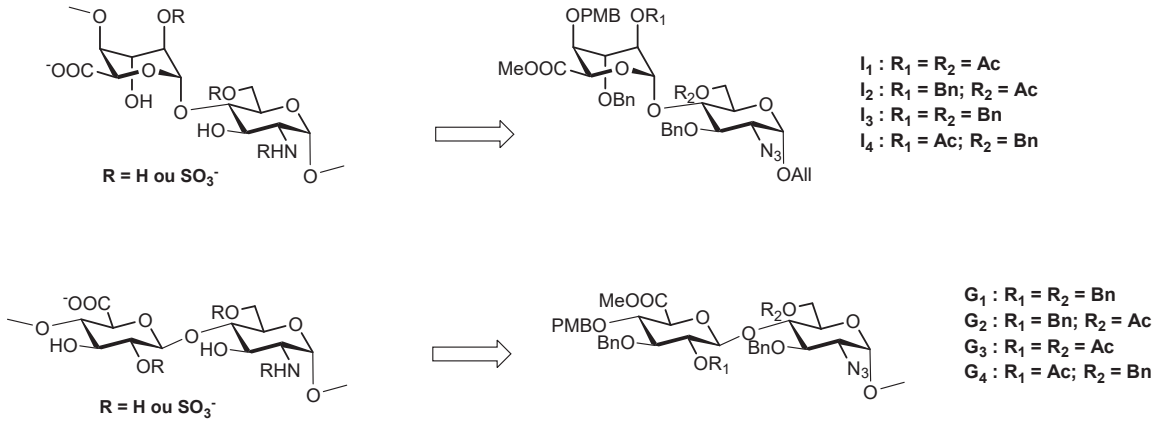


Schéma 36 : Les huit briques disaccharides de départ permettant d'accéder à 24 disaccharides potentiellement présent sur les chaînes d'HS disponibles au laboratoire.

La stratégie utilisée au laboratoire est la suivante : les hydroxyles protégés par des groupements acétates seront les futurs groupements sulfates et ceux protégés par les groupements benzyles les futurs groupements hydroxyles, tandis que le groupement azoture sera le précurseur de la fonction amine libre, sulfatée ou acétylée. La présence du groupement azoture en position C-2 du donneur est importante pour avoir une stéréochimie α souhaitée lors des oligomérisations.

De plus, dans cette stratégie, une brique peut être à la fois donneur et accepteur de glycosylation (Schéma 37). En effet, les alcools impliqués dans les réactions de glycosylation sont protégés par un groupement paraméthoxybenzyle, qui peut être enlevé sélectivement, ce qui permettra d'accéder à l'accepteur. La position anomérique, elle, est protégée par un groupement allyle, qui, après déprotection donnera accès au donneur de glycosylation.

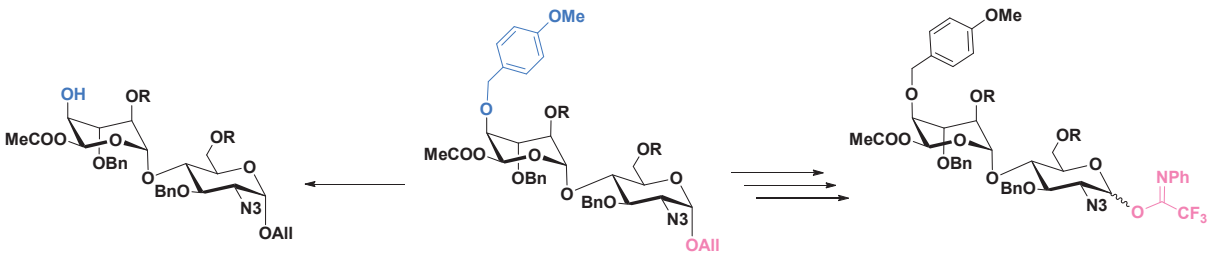


Schéma 37 : Les briques disaccharides de départ peuvent être donneur ou accepteur de glycosylation selon les étapes de déprotections effectuées.

I.2.2 Synthèse de fragments d'HS du domaine NS

Dans le contexte de cette thèse, la synthèse de fragment d'HS est ciblée sur le motif le plus présent dans le domaine NS, c'est-à-dire le motif disaccharidique de l'unité répétitive de l'héparine IdoA(2S)-GlcNS(6S). C'est donc la synthèse du bloc $\mathbf{I_1}$ permettant d'y accéder que nous allons étudier en détail.

I.2.2.a Rétrosynthèse

Comme vu précédemment, le disaccharide IdoA(2S)-GlcNS(6S) est obtenu à partir du composé **35** (Schéma 38). Celui-ci présente deux groupements acétates, un azoture, un ester méthylique protégeant l'acide carboxylique et des groupements benzyles. Le groupement allyle protège la position anomérique et peut être enlevé pour accéder au donneur de glycosylation après activation ou il peut être gardé sur le sucre à l'extrémité réductrice. Il est alors réduit en propyle lors de l'étape d'hydrogénolyse des groupements benzyles. Le groupement PMB protège l'alcool utilisé pour les glycosylations. Dans ce cas, le groupement est enlevé par un traitement acide ou oxydant pour accéder à l'accepteur.

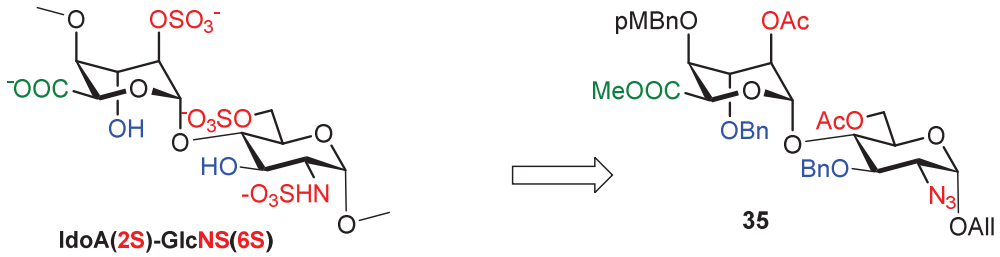


Schéma 38 : Bloc de synthèse 35 permettant l'accès au motif disaccharidique le plus présent dans le domaine NS des chaînes d'Héparane sulfate.

Le disaccharide **35** est obtenu en 7 étapes à partir des monosaccharides **36** et **37** obtenus respectivement en 10 et 9 étapes (Schéma 39). Toutes les réactions ont été optimisées afin d'obtenir les meilleures stéréosélectivé et régiosélectivité et aussi afin d'avoir le moins de purifications à

effectuer et les meilleurs rendements possibles. Cette synthèse est également réalisable à l'échelle de plusieurs dizaines de grammes.

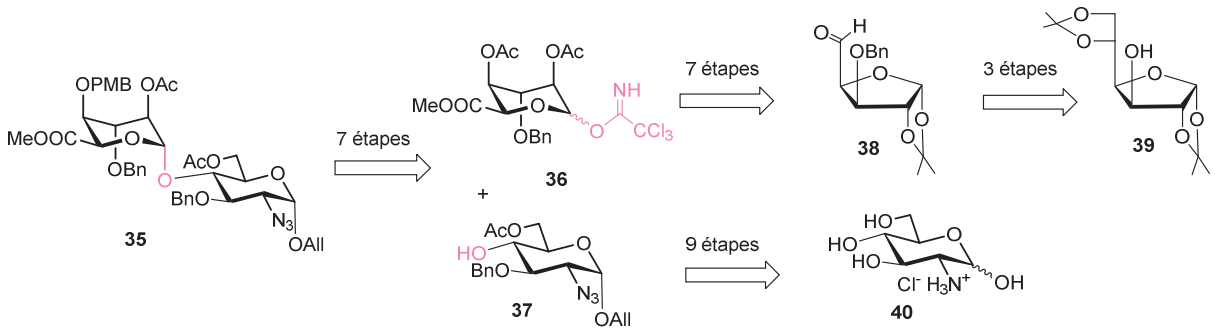


Schéma 39 : Rétrosynthèse permettant d'accéder au disaccharide 35 à partir des monosaccharides 36 et 37 synthétisés à partir des molécules commerciales 39 et 40.

I.2.2.b Synthèse des monosaccharides 36 et 37

b.1 Synthèse du monosaccharide 37

Le monosaccharide **37** est préparé en 9 étapes à partir du chlorhydrate de D-glucosamine **40** commercialement disponible, avec un rendement total de 47 % (Schéma 40).[186] La position anomérique de la *N*-acétyl glucosamine obtenue par *N*-acétylation en milieu aqueux est protégée par un groupement allyle selon une réaction de Fischer.[187] Cette réaction amène à un mélange de diastéréoisomères 90/10 en faveur de la forme α. Le mélange α/β n'étant pas séparable, celui-ci est soumis à des conditions d'hydrolyse acide, l'anomère β étant plus réactif peut être hydrolysé tout en gardant le groupement allyle sur l'anomère α. L'amine est ensuite désacétylée avec de l'hydroxyde de barium, transformée en azoture par un transfert de diazo avec de l'hydrochlorure de 1-sulfonyl azide imidazole, puis les positions 4 et 6 sont protégées sous forme de benzylidène acétal. Le produit **43** est alors isolé avec un rendement de 50 % à partir de la glucosamine **40**. Par la suite, la position 3 libre est benzylée facilement produisant **44**. L'accepteur **37** est obtenu après une déprotection des hydroxyles 4 et 6 en présence de résine acide et une acétylation sélective de la position primaire avec AcCl dans la pyridine.

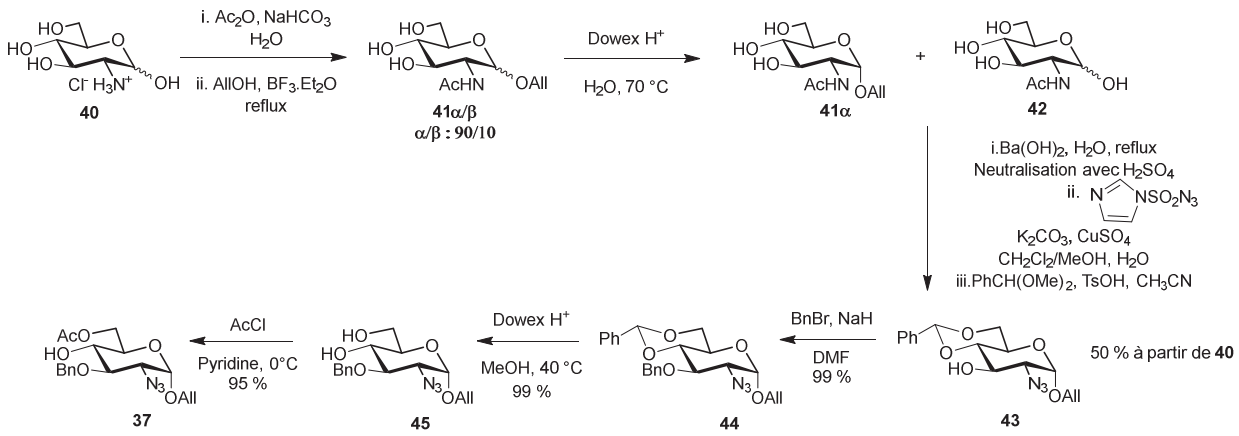


Schéma 40 : Voie de synthèse permettant d'accéder au monosaccharide 37 à partir de la glucosamine 40 en 6 étapes avec un rendement de 47 %.

Cette voie de synthèse a été optimisée afin de pouvoir être réalisée sur grosse quantité. Les réactions de **40** à **43** nécessitent uniquement des traitement/purifications par résine échangeuse d'ion, filtration sur gel de silice ou cristallisation. Cela a permis d'effectuer ces étapes à partir de 80 g de glucosamine **40**.

b.2 Synthèse du monosaccharide 36

Le monosaccharide **36** est préparé en 10 étapes à partir du composé **39** commercial, le 1,2,5,6-di-*O*-isopropylidène-D-glucose, avec un rendement total de 54 % (Schéma 41).[186,188–190] L'alcool libre du composé **39** est tout d'abord protégé avec un groupement benzyle, puis le groupement isopropylidène sur les alcools en position 5 et 6 est enlevé afin de pouvoir effectuer une coupure oxydante sur le diol résultant. Le composé **38** est obtenu en 3 étapes avec un rendement total de 94 %. L'addition du tris-phénylthiomethyllithium sur l'aldéhyde **38** a permis la formation exclusive du stéréoisomère L-*ido* .Le tris-phénylthioester formé est ensuite traité avec du cuivre (I) et cuivre (II) pour mener à l'ester méthylique **46**.[191] L'hydrolyse acide du composé **46** mène à un mélange de furanose-pyranose qui cristallise principalement sous sa forme β-pyranose **47** et qui peut être piégé par acétylation en utilisant un solvant dans lequel les cristaux sont peu solubles. Le composé **48** est donc obtenu par peracétylation à froid (-40 °C), dans le dichlorométhane avec un rendement de 92 %. L'acétate anomérique est sélectivement enlevé par transestérification en utilisant du triflate de néodyne comme catalyseur et un groupement trichloroacétimidate est introduit en position anomérique afin d'avoir le donneur de glycosylation **36**.

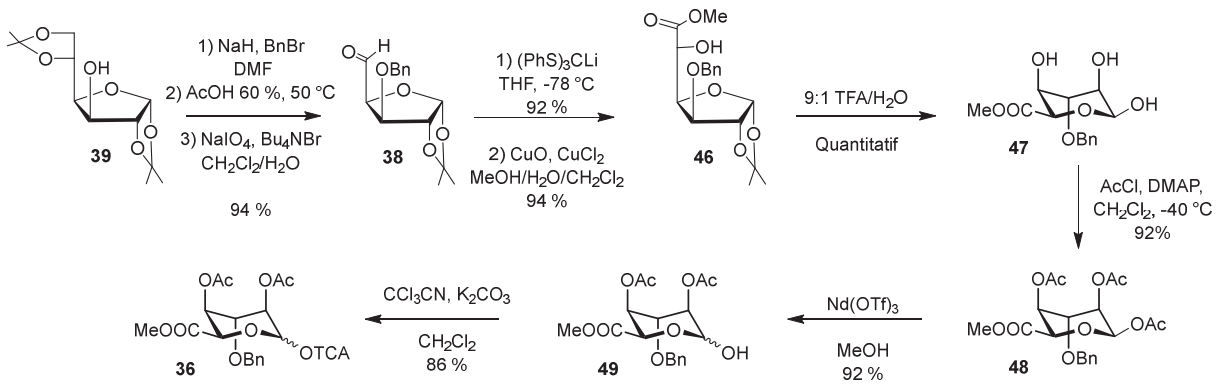


Schéma 41 : Synthèse permettant d'accéder au monosaccharide 36 à partir du composé 39 en 10 étapes avec un rendement total de 47 %.

I.2.2.c Synthèse du disaccharide 35

Le disaccharide **35** est préparé en 7 étapes à partir des monosaccharides **36** et **37** avec un rendement total de 67 % (Schéma 42).[189] La glycosylation entre le donneur **36** et l'accepteur **37** utilisant comme promoteur le triflate de tert butyl diméthylsilyle (TBDMSOTf) permet une excellente stéréosélectivité en faveur du diastéréoisomère α **50**. Ce contrôle de la stéréosélectivité est obtenu grâce au groupement participant OAc en position 2 du monosaccharide **36**. Au cours de la réaction, un orthoester se forme en premier puis se réarrange en glycoside et induit une liaison 1,2-trans. Le disaccharide **50** obtenu est ensuite désacétylé pour donner le composé **51** qui contient 3 alcools libres. Une série de 3 réactions permet de protéger de façon sélective l'alcool primaire de la glucosamine, molécule **52**. En effet, lors de l'introduction du *2',4'-O-p*-methoxybenzylidène sur le diol, en utilisant l'acétal de diméthyle p-anisaldéhyde (réactif permettant la transformation de **52** à **53**), l'alcool libre en position 6 peut réagir et mener à la formation des sous-produits. Le triol **51** est donc tout d'abord mis en réaction avec l'acide phénylboronique afin de former une « pince au bore » sur le diol. L'alcool libre en position 6 peut ensuite être protégé par un groupement acétate en utilisant du chlorure d'acétate et de la collidine, puis la « pince au bore » est enlevée par de l'eau oxygénée pour conduire au produit **52**. Ces trois étapes sont effectuées avec un rendement total de 93 %. Le paraméthoxybenzyle acétal est ensuite introduit sur le diol. Puis, l'ouverture réductrice régiosélective du groupement paraméthoxy benzylidène conduit à l'alcool libre en position 2 : Le $PhBCl_2$ se complexe avec l'alcool en position 2 qui est moins encombré (Schéma 43). L'alcool libre résultant est directement acétylé pour former le disaccharide **35** avec un rendement de 88 % sur ces deux étapes.

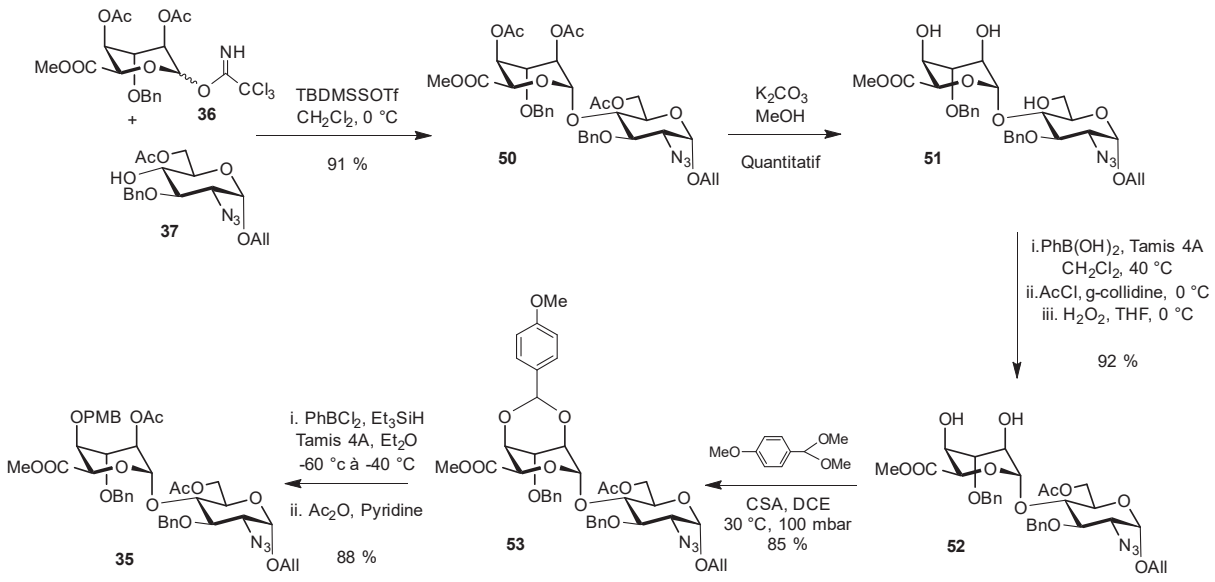


Schéma 42 : Voie de synthèse menant au disaccharide 35 à partir des monosaccharides 36 et 37 en 10 étapes avec un rendement total de 67 %.

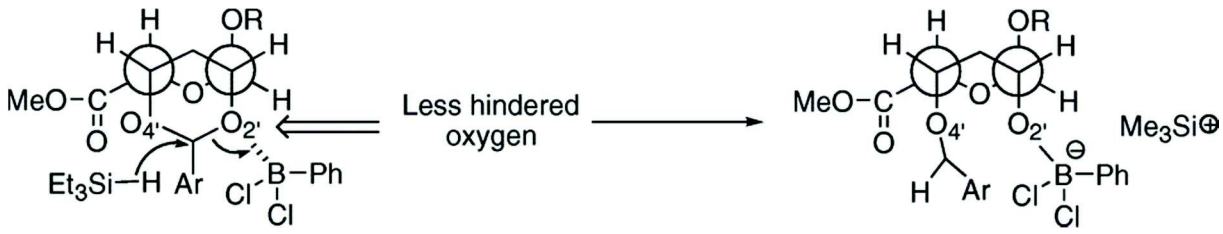


Schéma 43 : Modèle expliquant l'ouverture réductrice régiosélective du groupement PMB. $PhBCl_2$ étant un acide de Lewis encombré, se complexe avec l'oxygène le moins encombré de l'acétal cyclique, qui est $O_{2'}$. Le réducteur Et_3SiH attaque ensuite le carbone de l'acétal cyclique et la liaison C-$O_{2'}$ se brise pour former une liaison $O_{2'}$-B. Le groupement PMB est donc sur l'oxygène $O_{4'}$ et après traitement de la réaction, on obtient l'alcool libre en position 2 de l'acide iduronique.[189]

Ce disaccharide **35** est la brique de base nommée $\mathbf{I_1}$ au laboratoire. Sa synthèse étant longue mais optimisée, une partie de celle-ci est réalisée par une entreprise. Ainsi, nous disposons du disaccharide **53** qui en 2 étapes donnera $\mathbf{I_1}$ et du monosaccharide **43**. La brique $\mathbf{I_1}$ peut ensuite être utilisé comme donneur et/ou accepteur de glycosylation afin de former des fragments d'HS de différentes tailles.

I.2.2.d Synthèse des fragments d'HS

Afin d'effectuer la synthèse des fragments d'HS, le disaccharide **35** (brique $\mathbf{I_1}$) peut être transformé en donneur ou en accepteur de glycosylation. Un traitement en milieu acide, de l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane, permet d'accéder facilement à l'accepteur de glycosyle **54** avec un rendement quantitatif (Schéma 44). Une isomérisation de la double liaison de l'allyle par un catalyseur

à l'iridium, activé par de l'hydrogène, suivie d'une coupure au mercure puis de l'introduction du groupement *N*-phényl-2,2,2-trifluoroacétimidate (NPTFA) permet d'avoir accès au disaccharide donneur **55**.[192] Le groupement NPTFA plus stable, est préféré au groupement TCA, car celui-ci pouvait donner des sous-produits lors de la glycosylation, le donneur **55** utilisé étant ajouté en excès (Schéma 45).[193]

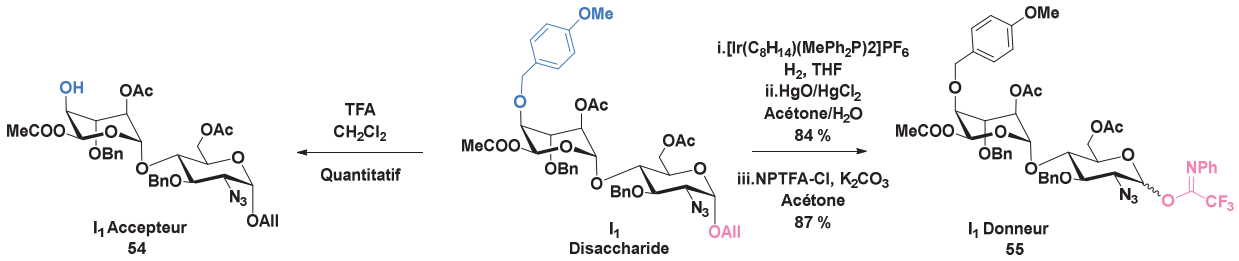


Schéma 44 : Synthèse des disaccharides donneur et accepteur de glycosylation à partir du disaccharide I_1.

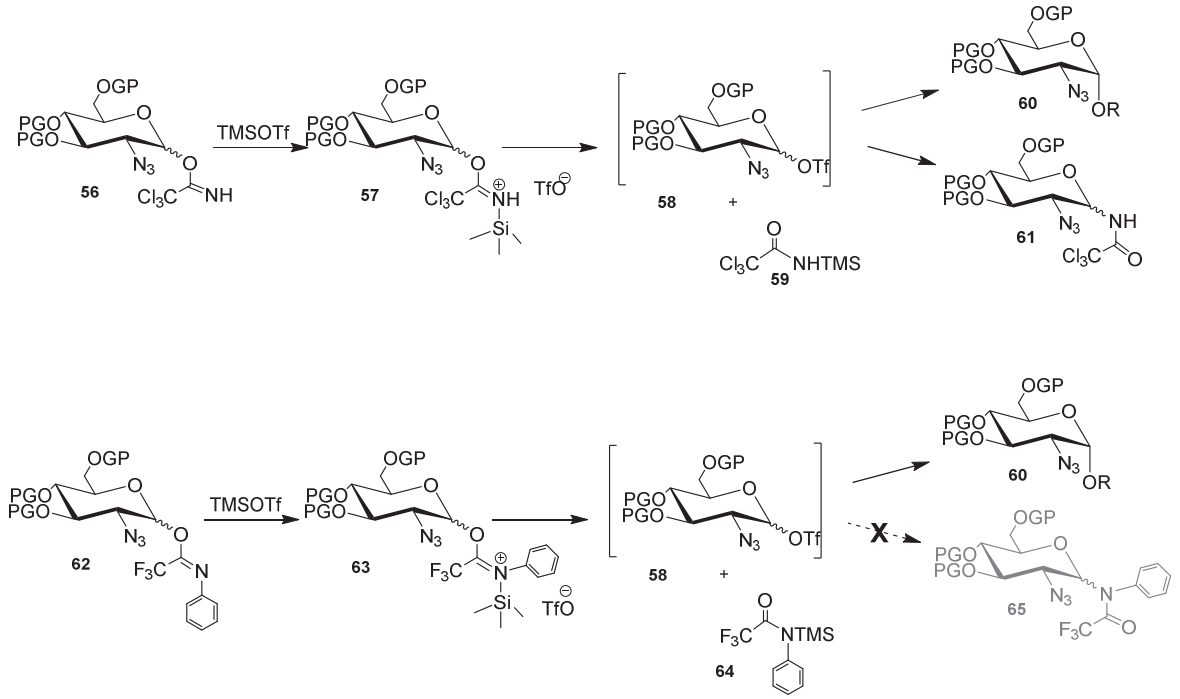


Schéma 45 : Représentation de la glycosylation avec le groupement TCA ou le groupement NPTFA. Par souci de clarté du schéma, l'accepteur utilisé est un monosaccharide et les groupements protecteurs des alcools sont représentés par « OGP ». Le donneur de glycosylation étant mis en excès, on observe la formation du composé 61 lorsque l'on utilise le donneur 56 comportant le groupement TCA. Le produit 61 est issu de la réaction du composé 59 sur l'intermédiaire réactionnel 58. Le groupement *N*-phényltrifluoroacétimidate (NPTFA) est quant à lui, moins réactif. En effet, sa densité électronique est appauvri de part la délocalisation de son doublet non liant dans le cycle aromatique et l'effet inductif attracteur du groupement trifluoro. De plus, il est plus volumineux que le TCA à cause de son groupement phényl. Le composé 64 ne réagira donc pas sur l'intermédiaire 58 et on obtiendra uniquement le composé 60 issu de la glycosylation.[193]

Une glycosylation itérative [2+2] entre le disaccharide accepteur **54** et le disaccharide donneur **55** permet d'accéder au tétrasaccharide **66** (Schéma 46). L'absence de groupement participant sur le donneur **55** permet de former préférentiellement le produit issu de l'attaque axiale de l'accepteur sur le glycosyl-cation, c'est-à-dire le stéréosisomère α. Le TBDMSOTf est préféré comme promoteur de glycosylation au TMSOTf, car ce dernier pouvait réagir avec l'accepteur et silyler sa fonction alcool.

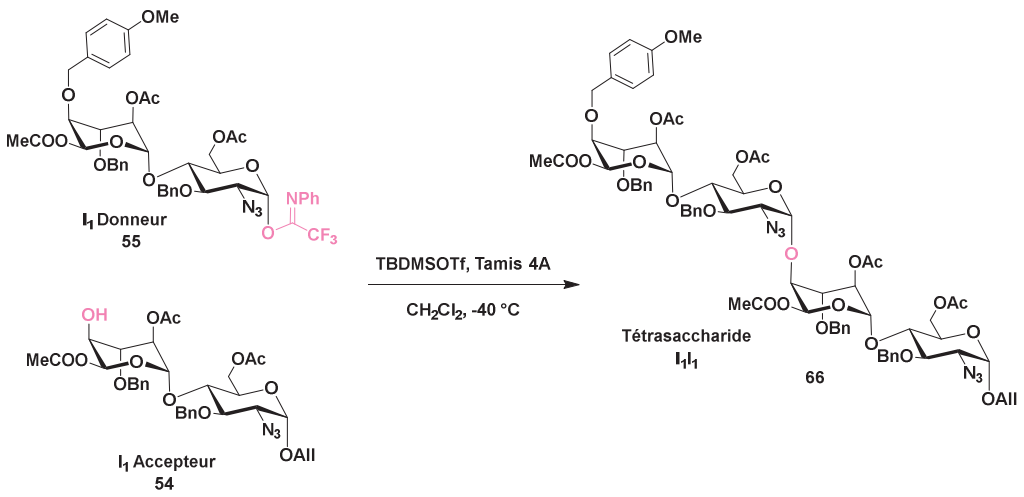


Schéma 46 : Glycosylation [2+2] entre le disaccharide donneur 55 et accepteur 54 pour fournir le tétrasaccharide 66 avec une stéréosélectivité exclusivement α.

Ensuite le tétrasaccharide **66** peut également devenir soit donneur **68** ou accepteur **67** de glycosylation (Schéma 47). Une glycosylation [4+4] permet d'accéder rapidement à l'octasaccharide **70**. La réaction [4+2] entre le tétrasaccharide accepteur **67** et le disaccharide donneur **55** permet de former l'hexasaccharide **69**. Cette stratégie d'oligomérisation itérative permet d'accéder facilement et rapidement à de longs fragments d'HS à partir d'un seul bloc commun $\mathbf{I_1}$. Cela a été utilisé pour synthétiser des glycoconjugués allant du tétra à l'octasaccharide dans le cadre de l'étude des interactions HS avec l'IFN-γ et jusqu'à un dodécasaccharide dans le cadre de l'étude d'un composé bloquant l'entrée du VIH.[184,194]

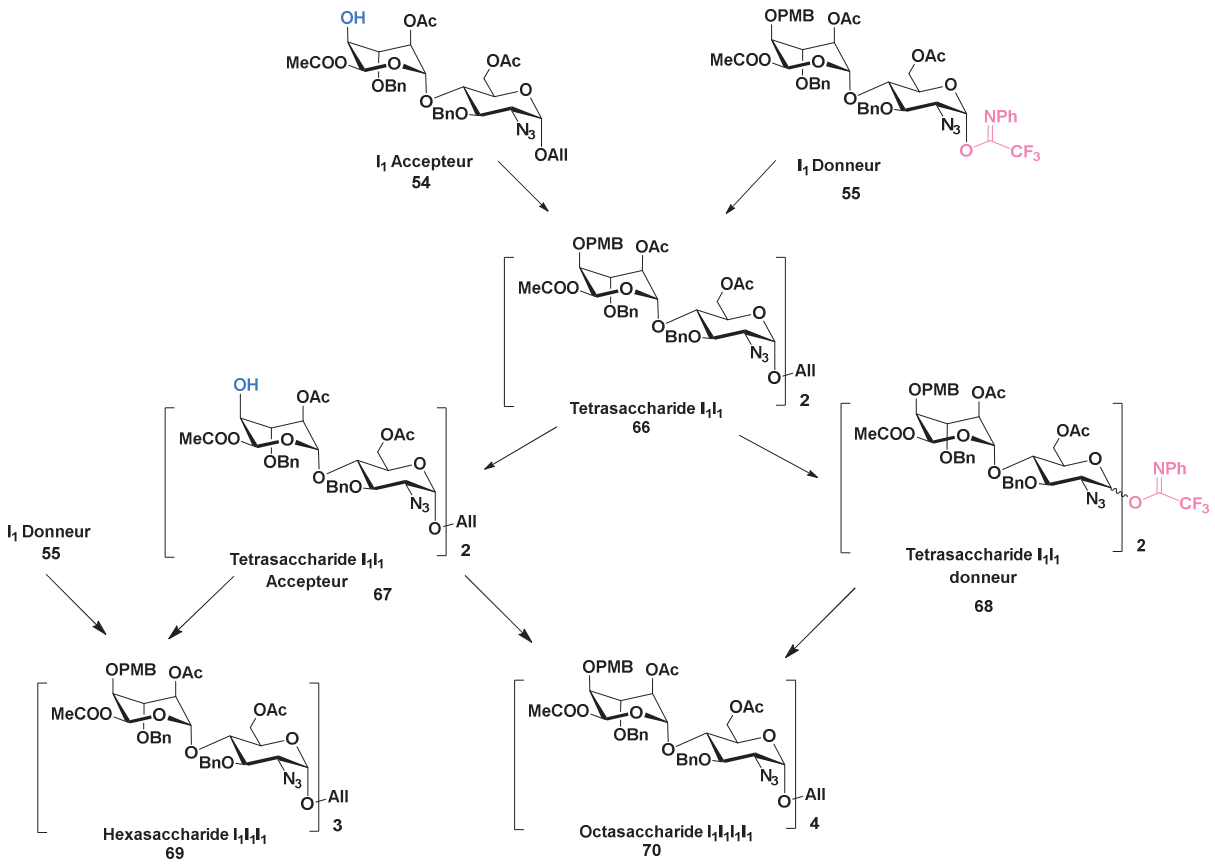


Schéma 47 : Stratégie de synthèse pour l'élongation des fragments d'HS.

Le laboratoire a développé depuis de nombreuses années la synthèse de blocs précurseurs pour accéder aux motifs les plus présents dans les domaines NS et NA/NS des chaînes d'Héparane Sulfate. Dans le cadre de cette thèse, c'est la synthèse de fragments d'HS du domaine NS qui nous intéresse, soit le motif disaccharidique répétitif IdoA(2S)-GlcNS(6S). Le précurseur de ce disaccharide est synthétisé à partir de deux monosaccharides ***36*** *et* ***37****. Le monosaccharide* ***37*** *accepteur est obtenu en 10 étapes avec 54% de rendement à partir de chlorhydrate de D-glucosamine* ***40****. Le monosaccharide* ***36*** *donneur est formé en 9 étapes avec un rendement total de 47 % à partir du glucose di-acétone commercial* ***39****. Un couplage glycosidique entre* ***36*** *et* ***37*** *ainsi que 6 autres étapes permettent d'accéder à la brique de synthèse* ***I₁****, utilisée pour l'élongation des fragments. La synthèse de* ***I₁*** *à partir de* ***36*** *et* ***37*** *est réalisée en 7 étapes avec un rendement de 67%. Finalement, la synthèse de ce bloc* ***I₁*** *requiert 26 étapes en tout, dont 17 étapes linéaires avec un rendement global de 17 %. Aujourd'hui, cette longue synthèse optimisée sur des multigrammes est, lorsque cela est possible, sous traitée à un prestataire de service.*

La brique disaccharide ***I₁*** *permet une oligomérisation rapide et efficace. En effet, elle comporte un groupement allyle à son extrémité réductrice qui peut être enlevé et remplacé par un groupement NPTFA pour avoir accès au donneur de glycosyle. Elle comporte également à son extrémité non-réductrice un groupement PMB qui se déprotège facilement pour donner l'accepteur de glycosyle.*

Une glycosylation [2+2] permet d'accéder au tétrasaccharide et celui-ci peut également être transformé en donneur ou accepteur de glycosyle. Des oligomérisations de type [4+2] ou [4+4] permettent d'accéder rapidement à l'hexasaccharide et à l'octasaccharide correspondant etc... La synthèse d'oligomères plus longs peut être envisagée mais nous nous sommes arrêtés au dodécasaccharide volontairement car des fragments plus longs n'apportaient pas d'intérêt dans notre cas.

La synthèse des différents fragments précurseurs du domaine NS des HS a été vue en détails dans cette partie. Les étapes de déprotection pour accéder aux fragments de HS seront vues dans la partie IV.

II. Molécules cibles et rétrosynthèse

II.1 Stratégie de synthèse des molécules inhibitrices

Afin de pouvoir synthétiser des inhibiteurs spécifiques de HSulf2, le choix du « corps » des molécules s'est porté sur des fragments d'Héparane Sulfate afin d'optimiser la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat. Pour pouvoir déterminer la longueur optimale des fragments, quatre molécules ont été synthétisées allant du tri au nonasaccharide. HSulf2 a un mécanisme de désulfatation processif. Sur des fragments d'Héparane Sulfate, il a été montré que l'action de l'enzyme allait du côté non réducteur jusqu'au côté réducteur. Nous avons donc choisi de placer la fonction inhibitrice à l'extrémité non réductrice des molécules. HSulf2 catalysant la 6-*O*-désulfatation des glucosamines, la fonction inhibitrice sera placée en position 6 de la glucosamine positionnée à l'extrémité non rédutrice. Enfin, le choix de la fonction inhibitrice s'est porté sur la fonction sulfamate, connue pour inhiber de façon irréversible les sulfatases (Figure 26).

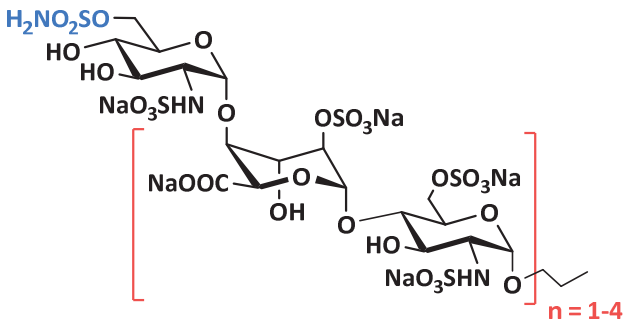


Figure 26 : Fragments d'Héparane Sulfate fonctionnalisés pour l'inhibition de HSulf2.

II.2 Rétrosynthèse des molécules cibles

Ces molécules sont obtenues à partir des briques $[\mathbf{I_1}]_n$, n = 1-4. Afin de pouvoir introduire la fonction sulfamate de façon régiosélective sur la position 6 de la glucosamine du côté non-réducteur du sucre, nous ajoutons une brique précurseur de glucosamine, le monosaccharide **43**.

La synthèse de ces molécules peut se diviser en quatre parties (Schéma 48):

1) La préparation du donneur de glycosylation à partir du monosaccharide **43**,
2) La préparation de l'accepteur de glycosylation à partir des briques disaccharide $\mathbf{I_1}$, tétrasaccharide $\mathbf{I_1I_1}$, hexasaccharide $\mathbf{I_1I_1I_1}$ et octasaccharide $\mathbf{I_1I_1I_1I_1}$,
3) La glycosylation entre l'accepteur et le donneur de glycosylation puis l'introduction de la fonction sulfamate,
4) La fonctionnalisation et déprotection des fragments afin d'accéder aux dérivés d'Héparane Sulfate.

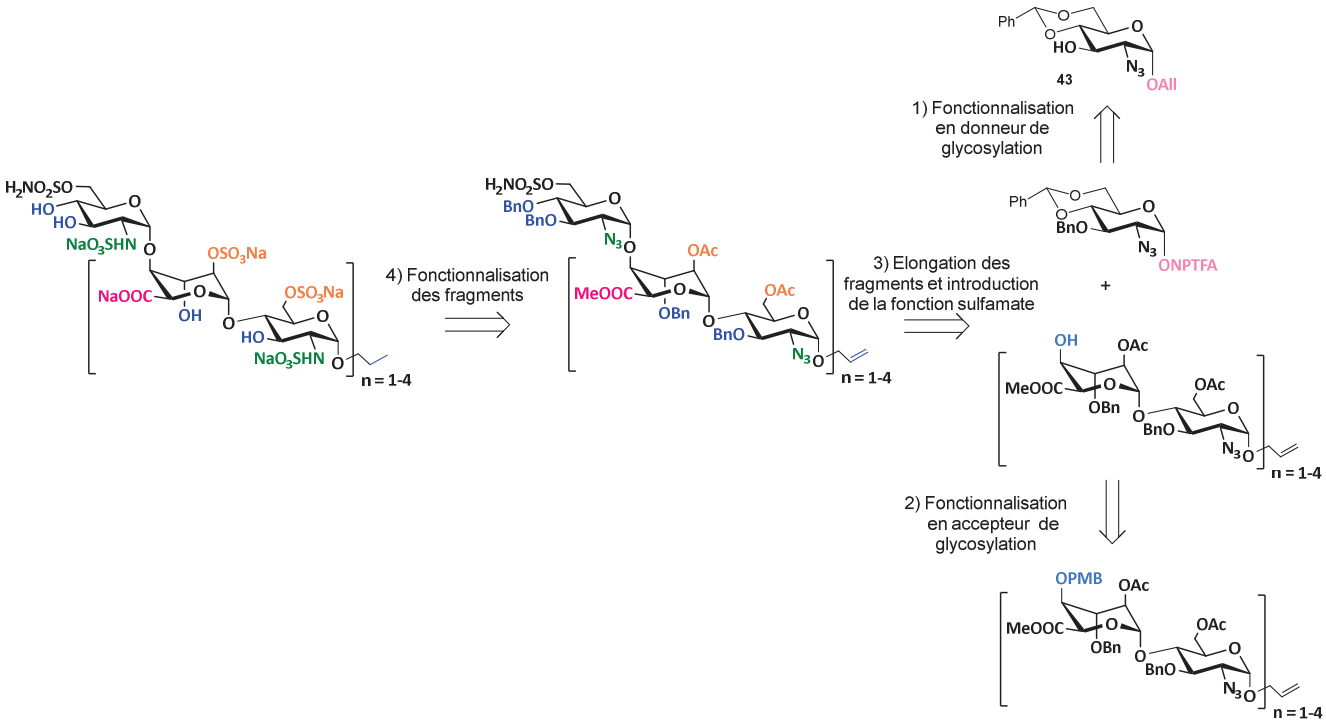


Schéma 48 : Rétrosynthèse pour accéder aux fragments d'Héparane Sulfate pleinement fonctionnalisés à partir du monosaccharide 43 et des briques $[I_1]_n$.

J'ai synthétisé le trisaccharide à partir des briques **43** et **53** et le nonasaccharide à partir du tétrasaccharide $\mathbf{I_1I_1}$. Le pentasaccharide et l'heptasaccharide ont été synthétisés par l'assistant ingénieur de notre laboratoire (Jérôme Hénault) jusqu'à l'introduction de la fonction sulfamate. J'ai ensuite effectué les étapes de fonctionnalisation sur tous les composés.

III. Élongation des fragments pour l'introduction de la fonction sulfamate

III.1 Glycosylation [1+n]

Les réactions de glycosylations et celles permettant d'accéder aux donneurs ou accepteurs de glycosylation ont été vu en détail précédemment et seront rappelées brièvement dans cette partie.

III.1.1 Préparation du donneur

Le donneur de glycosylation **73** est préparé en 3 étapes à partir du monosaccharide **43** avec un rendement global de 69 % (Schéma 49). La protection de l'alcool en position 3 de **43** est effectuée avec du bromure de benzyle, puis la double liaison du groupement allyle est isomérisée à l'aide d'un catalyseur à l'iridium activé par du dihydrogène. Le groupement est ensuite enlevé grâce à une coupure au mercure pour donner l'hémiacétal **72**. Cet hémiacétal est présent sous les formes α et β en quantité égale (Figure 27). Le groupement NPTFA est ensuite introduit selon des conditions classiques pour former le donneur de glycosylation **73** (Schéma 49). La molécule **73** est également présente sous les formes α et β, ce qui n'impacte pas la stéréochimie de la glycosylation à venir.

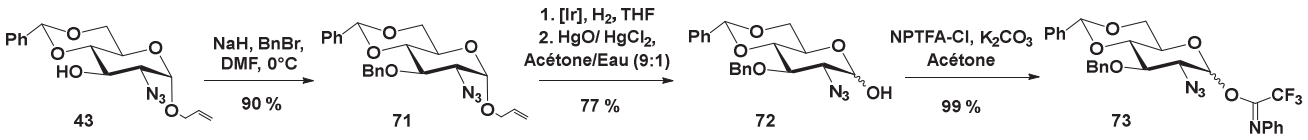


Schéma 49 : Synthèse du donneur de glycosylation 73 à parti du monosaccharide 43 en 3 étapes.

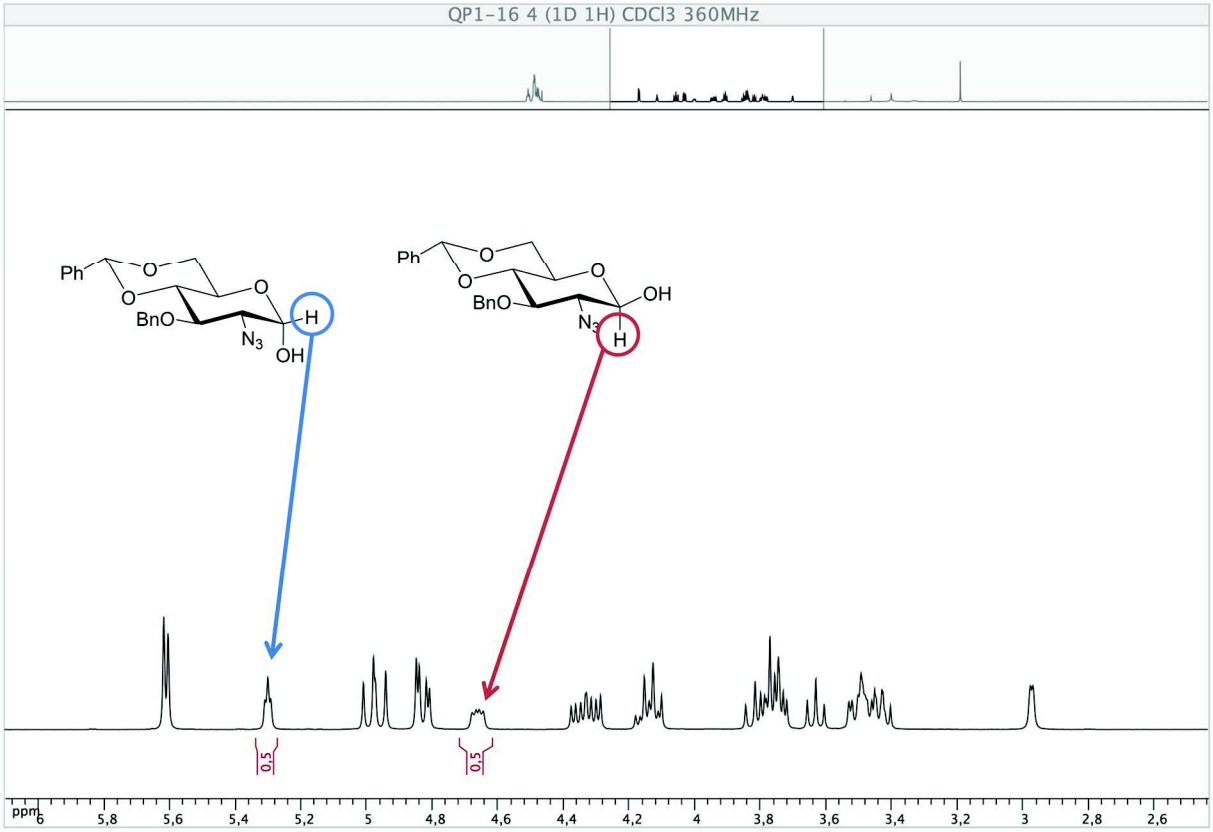


Figure 27 : Spectre RMN du composé 72 présent sous la forme α et β en quantité égale. Le signal à 5,35 ppm correspond au proton anomérique de la forme α et le signal à 4,65 ppm au proton anomérique de la forme β.[195]

III.1.2 Préparation de l'accepteur

La préparation de l'accepteur de glycosylation à partir des briques $[\mathbf{I_1}]_n$ est très succincte puisqu'elle ne compte qu'une seule étape de déprotection de l'alcool en position 4 de l'acide iduronique. Le groupement paraméthoxybenzyle est enlevé facilement avec de l'acide trifluoroacétique en quelques heures avec un rendement de l'ordre de 80 à 90 % (Schéma 50).

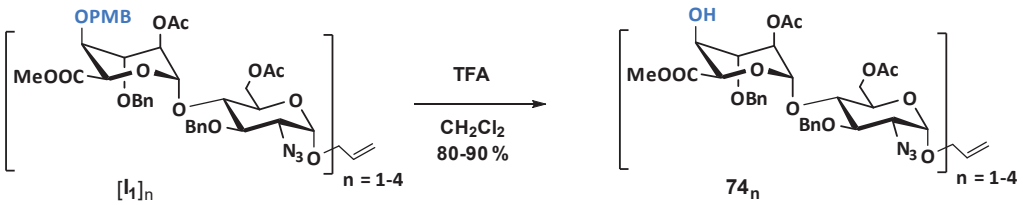


Schéma 50 : Préparation de l'accepteur de glycosylation à partir des briques $[I_1]_n$.

III.1.3 Glycosylation 1+n

Le protocole de glycosylation appliqué est le même quelque soit la longueur de l'oligosaccharide ([1+2], [1+4], [1+6], [1+8]) et est identique à celui utilisé pour les glycosylations [2+2], [4+4] et [2+4] vues précédemment. La réaction s'effectue à -40 °C dans le dichlorométhane. Le promoteur de glycosylation choisi est le terbutyldiméthylsilyle trifulorométhanesulfonate (TBDMSOTf) et du tamis moléculaire basique est ajouté afin d'éliminer toute trace d'eau et d'acide triflique formé, pour éviter toute réaction parasite qui hydrolyserait le groupement benzylidène. La réaction permet une excellente stéréosélectivité α, quelque soit la configuration du composé **73**, avec de très bons rendements allant de 79 à 91 % (Schéma 51). La stéréochimie du composé obtenu après glycosylation est confirmée par RMN. On remarque sur le spectre HSQC du composé **75$_1$** que les signaux des trois protons anomériques ont un déplacement chimique similaire (entre 4,9 et 5,2 ppm) et que les signaux des deux protons anomérique du résidu de glucosamine sont presque identiques (autour de 4,9 ppm, un résidu béta serait vers 4,5 ppm) (Figure 28). Les déplacements chimiques du carbone anomérique (99 ppm) du résidu ajouté correspond à la stéréochimie α (il serait au-delà de 100 ppm pour une configuration β). Dans les conditions de purifications et d'analyse utilisées, nous n'avons pas détecté de composé béta.[195]

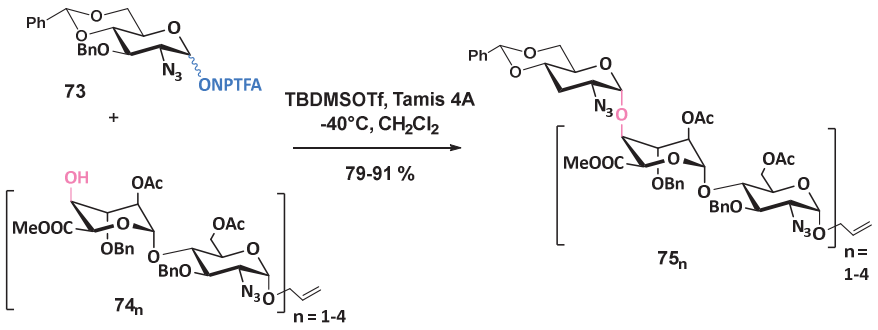


Schéma 51 : Réaction de glycosylation 1+n.

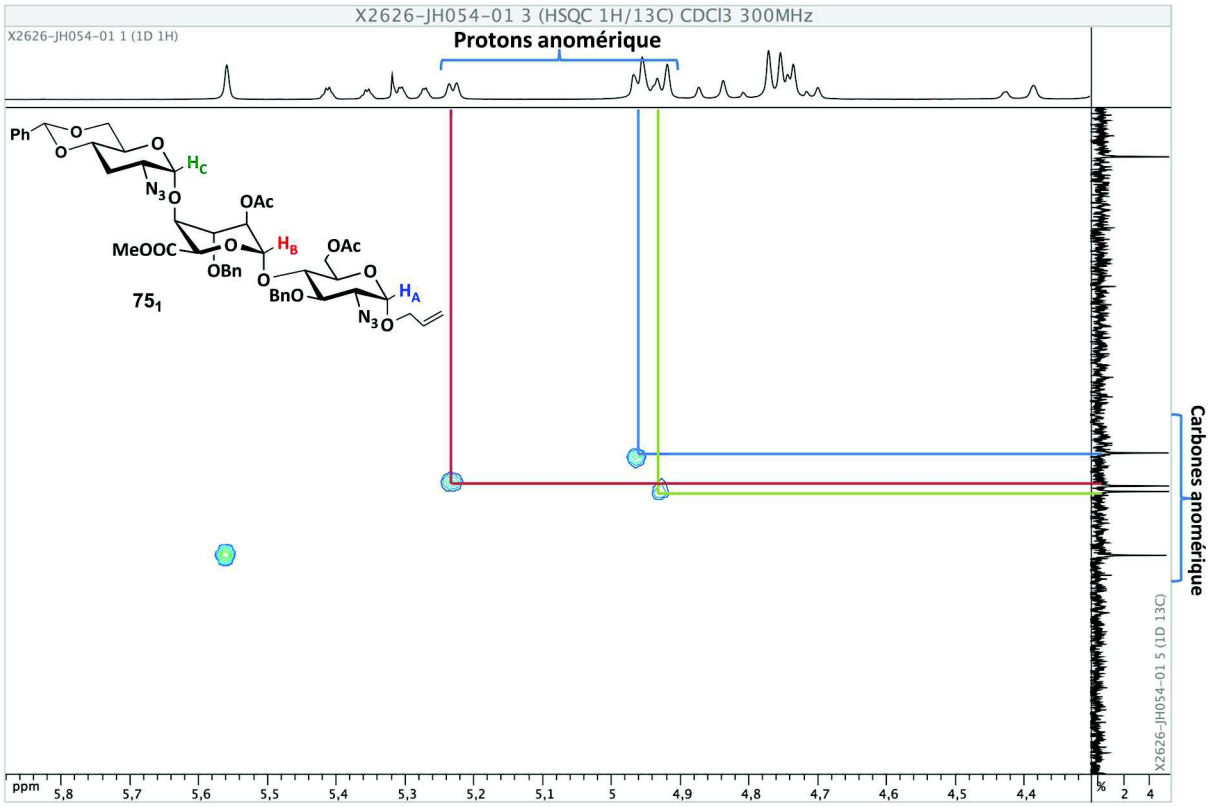


Figure 28 : Spectre RMN HSQC du composé 75_1. Les signaux des protons H_A et H_C des résidus de glucosamines ont un déplacement chimique presque identiques (entre 4,9 et 5,0 ppm) et également très proches du signal du proton H_B de l'acide iduronique (à 5,2 ppm). Les trois carbones anomériques ont des déplacements chimiques très proches (entre 99 et 96 ppm).

III.2 Ouverture réductrice régiosélective

L'ouverture réductrice régiosélective du 4,6-*O*-benzylidène menant à l'alcool primaire, par les trialkylsilanes a été développée par le groupe de Sakagami en 2000.[196] Auparavant, l'ouverture de cet acétal était effectuée en utilisant du $NaBH_3CN$-HCl[197] ou Et_3SiH-TFA[198] et permettait d'obtenir l'alcool libre secondaire (en position 4). L'utilisation de triéthylsilane permet d'avoir une ouverture régiosélective selon le réactif avec lequel il est couplé (Schéma 52). En effet, lorsque le couple Et_3SiH/TfOH est utilisé, l'alcool secondaire est obtenu alors que le couple $Et_3SiH/PhBCl_2$ permet d'obtenir l'alcool primaire (en position 6). La régiosélectivité de la réaction peut s'expliquer par la complexation préférentielle de $PhBCl_2$ sur l'oxygène moins encombré qui est celui en position primaire. Ces réactions d'ouverture réductrice sont effectuées dans du dichlorométhane. Lorsque ce solvant est changé pour du propionitrile, la réaction n'a pas lieu car $PhBCl_2$ se coordine au groupement nitrile ce qui diminue son acidité de Lewis et donc sa réactivité.[196]

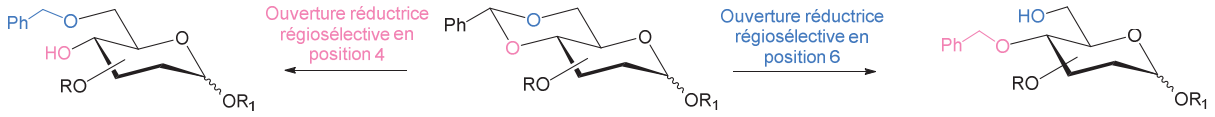


Schéma 52 : Ouverture régiosélective du 4'6-*O*-benzylidène permettant d'accéder soit à l'alcool primaire (droite) ou à l'alcool secondaire (gauche).

La réaction d'ouverture réductrice régiosélective du benzylidène sur nos sucres a été optimisée avant mon arrivée au laboratoire. Les conditions réactionnelles développées précédemment par le laboratoire sur l'ouverture régiosélective du paraméthoxy benzylidène (Schéma 42) ont du être adaptées (5 éq de Et_3SiH, 5 éq de $PhBCl_2$, dans Et_2O. L'utilisation de l'éther diéthylique permet de complexer $PhBCl_2$ et ainsi de contrôler sa réactivité).[189] En effet, le benzylidène étant moins réactif que le paraméthoxybenzylidène, la réaction est plus lente. Si la température est augmentée, de la dégradation est observée : le triéthylsilane présent en en excès réagit avec $PhBCl_2$, lui aussi présent en excès, pour conduire à des boranes qui réagissent avec l'allyle pour former des produits d'hydroboration. Afin d'obtenir une réaction plus rapide sans dégradation, le dichlorométhane est utilisé comme solvant. Celui-ci n'étant pas une base de Lewis, il ne se complexe pas avec $PhBCl_2$ (ce qui était le cas de l'éther) et la réaction est alors plus rapide. Cela permet d'effectuer la réaction en 1 h à -60 °C. Afin d'éviter toute dégradation, le nombre d'équivalents de triéthylsilane a également été diminué à 1,1 équivalents. Ces conditions de réaction permettent d'accéder à l'ouverture régiosélective du benzylidène menant à l'alcool primaire avec un rendement de 82 à 96 % (Schéma 53).

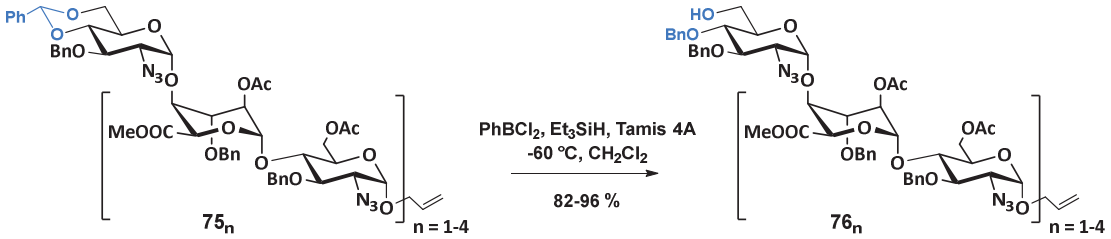


Schéma 53 : Réaction d'ouverture régiosélective du benzylidène pour accéder à l'alcool primaire.

Afin de s'assurer que l'ouverture réductrice mène bien à l'alcool primaire, une fraction du produit obtenu a été acétylé et analysé en RMN. Cela a été effectué sur le monosaccharide **71** et le comparatif des spectres RMN avant et après acétylation montre bien une différence conséquente du déplacement chimique du signal des protons en position 6 (d'environ 1 ppm) alors que la différence de déplacement chimique du signal du proton en position 4 est faible (environ 0,1 ppm) (Figure 29). Cela indique bien que l'ouverture réductrice a mené à l'alcool primaire.

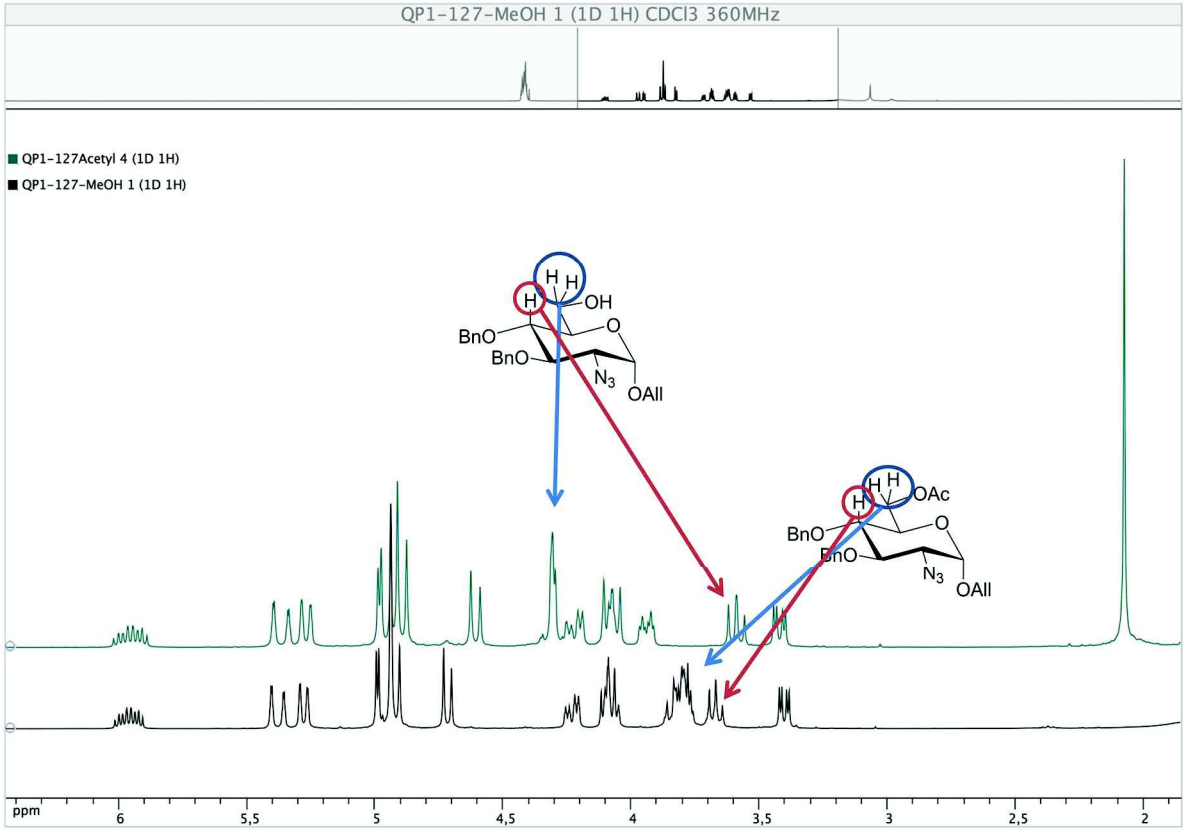


Figure 29 : Comparaison des spectres RMN de la glucosamine après l'ouverture réductrice (en noir) puis après acétylation (en vert). On remarque que la différence de déplacement chimique du signal des protons en position 6 de la glucosamine est d'environ 1 ppm avant et après acétylation alors que la différence de déplacement chimique pour le proton en position 4 est d'environ 0,1 ppm. Cette comparaison indique bien que l'ouverture réductrice a permis d'obtenir l'alcool primaire.

III.3 Introduction du sulfamate

La fonction sulfamate est introduite sur les oligosaccharides grâce à l'alcool primaire de la glucosamine. Le chlorure de sulfamate est d'abord généré *in situ* par réaction de l'acide formique avec l'isocyanate de chlorosulfonyle (Schéma 54).[199] Une réaction acido-basique entre les deux réactifs génère un iminium sur l'isocyanate. L'attaque nucléophile du formiate sur le carbone en α de l'iminium puis une décarboxylation amène au chlorure de sulfamoyle.

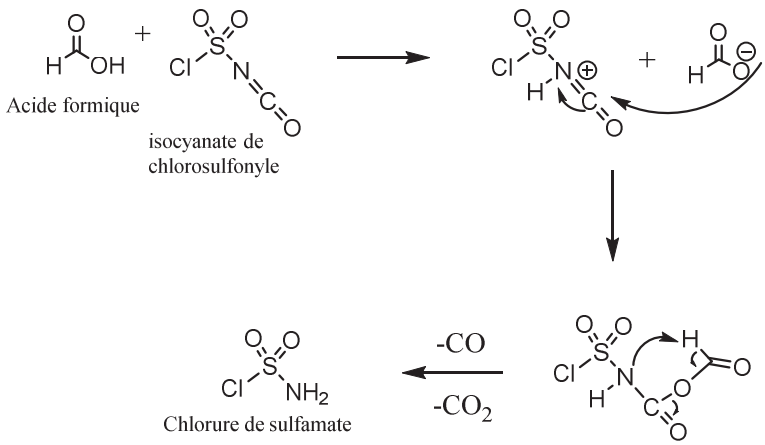


Schéma 54 : Mécanisme de formation du chlorure de sulfamate à partir de l'acide formique et de l'isocyanate de chlorosulfonyle.

Une fois le chlorure de sulfamoyle formé, l'oligosaccharide, solubilisé dans le DMA, est ajouté afin de le fonctionnaliser avec le sulfamate. L'emploi du DMA eu lieu du DMF permet de diminuer l'électrophilie du carbonyle par l'encombrement stérique des méthyles présent sur l'amine.[200] Ces conditions réactionnelles permettent d'obtenir les oligosaccharides **77$_n$** avec de bons à très bons rendements (Schéma 55).

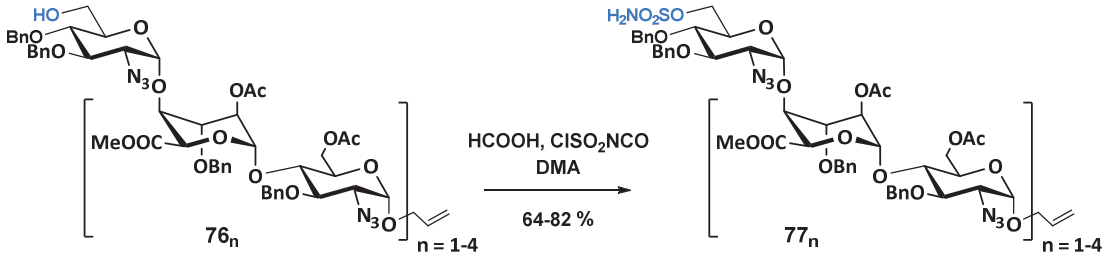


Schéma 55: Réaction d'introduction de la fonction sulfamate sur les oligosaccharides.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus pour les étapes de glycosylation, ouverture réductrice du benzylidène et l'introduction du sulfamate.

	% de composé 75$_n$ (Glycosylation)	% de composé 76$_n$ (Ouverture réductrice)	% de composé 77$_n$ (Sulfamoylation)
Trisaccharide n=1	82	96	64
Pentasaccharide n=2	91	96	82
Heptasaccharide n=3	87	88	80
Nonasaccharide n=4	74	87	75

La glycosylation entre les briques ***[I$_1$]$_n$*** *et le monosaccharide* ***43*** *permettent l'introduction de la fonction sulfamate après une étape d'ouverture régiosélective du benzylidène avec de bons rendements* (Tableau 3). *Ensuite, les fragments sont fonctionnalisés.*

IV. Déprotection et fonctionnalisation des fragments

La déprotection et la fonctionnalisation des fragments s'effectuent en cinq étapes. Les acétates sont tout d'abord enlevés puis les azotures sont réduits. Les alcools et amines libres résultant sont ensuite sulfatés. Puis la saponification des esters méthyliques et l'hydrogénolyse des groupements éthers de benzyles amènent aux produits finaux. Lors de la dernière étape, l'allyle est également réduit en propyle (Schéma 56).

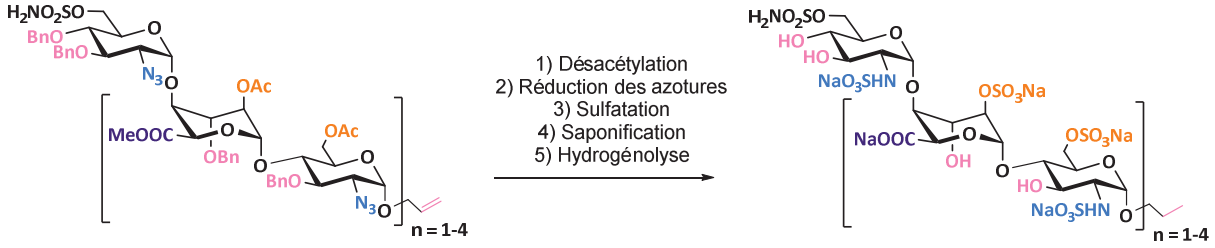


Schéma 56 : Les cinq étapes permettant d'obtenir des fragments d'Héparane Sulfate avec une fonction sulfamate en position 6 du résidu glucosamine non réducteur.

IV.1 Désacétylation et réduction des groupements azotures

La déprotection des alcools s'effectue dans le méthanol en présence de carbonate de potassium. Pour les oligosaccharides les plus longs, un mélange de méthanol/dichlorométhane (4/1) est utilisé afin de mieux les solubiliser. Cette réaction s'effectue à température ambiante en quelques heures et donne de très bons rendements (Schéma 57). Les solvants utilisés doivent être anhydres, sinon il a y un risque de saponification des esters méthyliques.

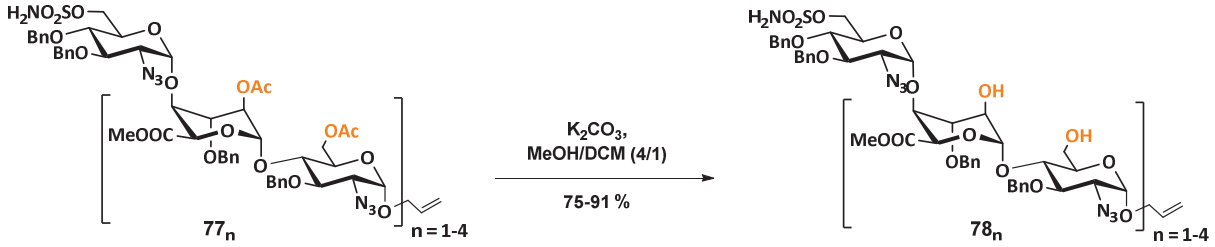


Schéma 57 : Désacétylation des oligosaccharides.

Ensuite, la réduction des azotures est effectuée en utilisant du propanedithiol et de la triéthylamine.[201] Les réactions « classiques » telles que la réduction par les hydrures, le dihydrogène en présence de catalyseur ou la réaction de Staudinger ne peuvent pas être utilisées ici. En effet, la réduction par les hydrures toucherait également les esters méthyliques et la réduction par le dihydrogène déprotégerait les éthers de benzyles. La réaction de Staudinger ne donne pas de bons rendements à cause de

l'encombrement stérique de la triphénylphosphine qui gène la réaction sur l'azoture en position secondaire.

Dans le cas de l'utilisation du propanedithiol et de la triéthylamine, c'est le composé soufré qui est le donneur d'hydrogène permettant la réduction des azotures. Une réaction acido-basique entre la triéthylamine et le propanedithiol (pKa Et_3NH^+ et BuSH ~ 11 selon les tables d'Evans) « active » le composé soufré qui vient s'additionner sur l'azote le plus électrophile de l'azoture. Une nouvelle réaction acide base entre la triéthylamine et le thiol induit une formation de la liaison disulfure, le dégagement d'azote et l'obtention de l'amine primaire. Le dégagement gazeux ainsi que la formation de la liaison disulfure permettent le déplacement de l'équilibre vers le produit final. Les sous-produits soufrés sont ici représentés par un cycle 1,2-dithiolane pour un souci de clarté mais peuvent être des polymères (Schéma 58).

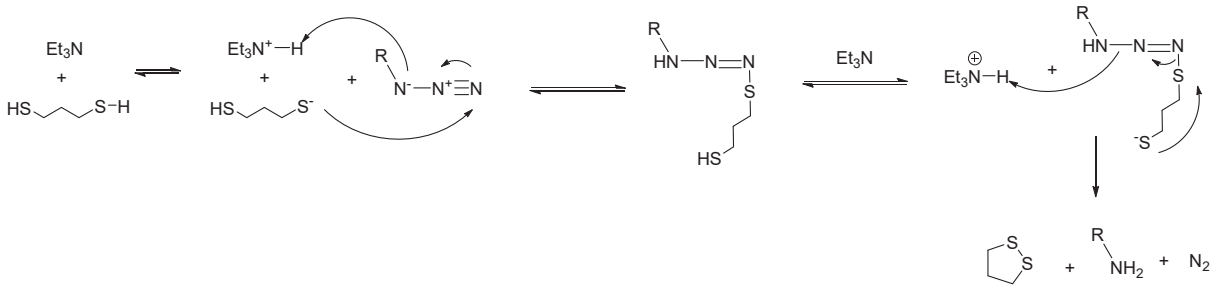


Schéma 58 : Mécanisme de réduction de l'azoture en amine par le propanedithiol et la triéthylamine.

Afin d'éviter les réactions de thiol-ène, la réaction se fait à l'abri de la lumière et le brut réactionnel est d'abord purifié par exclusion stérique, pour séparer tous les dérivés thiols formés, puis par chromatographie sur silice. Ces conditions réactionnelles et de purification permettent d'obtenir les produits $\mathbf{79_n}$ avec d'excellents rendements (Schéma 59).

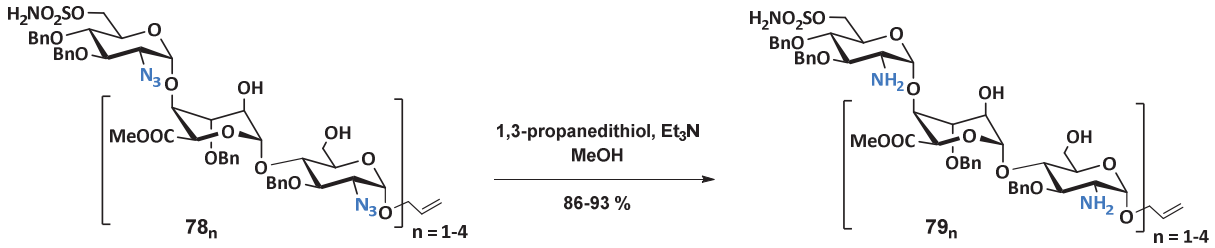


Schéma 59 : Réaction de réduction des azotures.

IV.2 *N,O*-Sulfonation

La réaction de sulfonation a été optimisée et le chapitre 3 est consacré à cette optimisation. Seuls les résultats obtenus sur les quatre oligosaccharides cibles sont décrits dans cette partie.

La *N*,*O*-sulfonation est effectuée dans la pyridine, en utilisant le complexe SO_3•Me_3N à 100 °C dans un réacteur de synthèse (Monowave 50), et est suivie par HPLC. Le temps de réaction est dépendant de la longueur de l'oligosaccharide. Ainsi, la sulfatation du trisaccharide est totale en 10 min alors qu'il faut 60 min dans le cas du nonasaccharide pour avoir 100 % de conversion. Ces conditions réactionnelles donnent de très bons rendements sur les briques $\mathbf{I_1}$ et $\mathbf{[I_1]_4}$ (voir Chapitre 3), mais pour ces oligosaccharides, les rendements obtenus sont médiocres (Schéma 60).

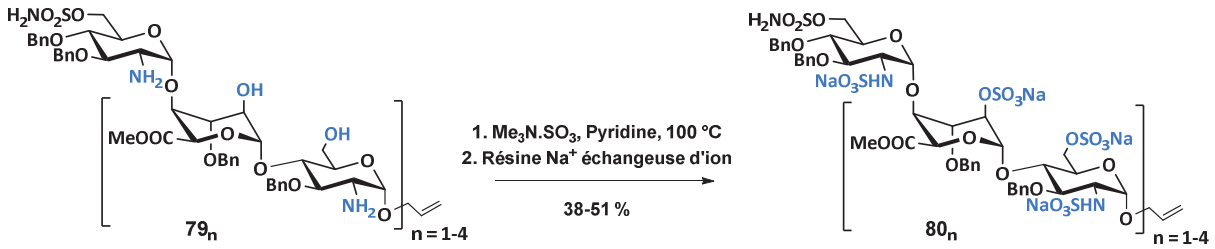


Schéma 60 : Réaction de *N*,*O*-sulfonation des oligosaccharides.

Cela est dû à la présence du sulfamate comportant une amine nucléophile qui va également réagir lors de la sulfatation. En effet, celui-ci peut être sulfaté, pour conduire aux composés $\mathbf{81_n}$ ou bien éliminé et l'alcool libéré sulfaté $\mathbf{82_n}$ (Figure 30).

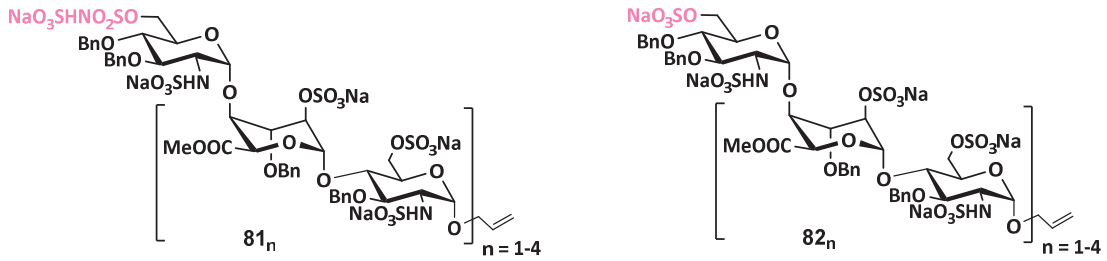


Figure 30 : Produits secondaires issus de la sulfatation des oligosaccharides.

Dans le Tableau 4 sont présentés les pourcentages de sous-produits présents dans le milieu réactionnel lorsque que le taux de conversion est de 100 %. On peut voir que le produit issu de l'enlèvement du sulfamate $\mathbf{82_n}$ représente environ 10 % de la quantité d'oligosaccharide présent dans le brut réactionnel, quelques soit la longueur du sucre. Par contre, la quantité de produit ayant un sulfamate sulfaté $\mathbf{81_n}$ augmente avec la longueur de l'oligosaccharide : on passe de 13 % pour le trisaccharide à 27 % pour le nonasaccharide. Cela est sans doute dû au temps de réaction qui augmente selon la taille du sucre : plus la réaction est longue, plus l'azote du sulfamate à le temps de réagir et d'être sulfatée.

Tableau 4 : Tableau donnant les pourcentages de sous-produits observés lors de la sulfatation des différents oligosaccharides. Ces valeurs ont été déterminées par HPLC lors du suivi cinétique de la réaction.

	% de composé 80_n	% de composé 81_n	% de composé 82_n
Trisaccharide n=1	51	13	8
Pentasaccharide n=2	48	15	7
Heptasaccharide n=3	38	23	9
Nonasaccharide n=4	40	27	11

La présence de ces deux sous-produits implique une purification plus longue et fastidieuse. Après une filtration sur colonne d'exclusion stérique afin d'éliminer la pyridine et les sels de pyridinium, les différents composés sont purifiés en utilisant une colonne phase inverse C-18 et passés sur colonne échangeuse d'ions (de type Bio-Rad Na^+) afin d'être obtenus sous forme sels de sodium.

Afin de valoriser ces sous-produits, le composé **81_4** (nonasaccharide ayant le sulfamate sulfaté) a été entièrement déprotégé afin de déterminer son activité inhibitrice.

IV.3 Saponification et hydrogénolyse

IV.3.1 Choix du réactif de saponification

La réaction de saponification est habituellement faite au laboratoire en utilisant du peroxyde d'hydrogène et de l'hydroxyde de potassium.[194] Cependant, sur les oligosaccharides comportant le sulfamate il pouvait y avoir un risque d'hydrolyse de cette fonction. Nous avons donc tenté une nouvelle approche en utilisant le triméthylsilanolate de sodium (TMSONa), utilisé pour hydrolyser les esters méthyliques dans la synthèse de mîmes d'HS.[202–204] Le pKa du couple TMSOH/$TMSO^-$ étant de 12,7 et donc inférieur à celui de H_2O/HO^- (qui est de 15,7), $TMSO^-$ peut être considéré comme équivalent à HOO^- plutôt qu'à HO^-. $TMSO^-$ est donc un nucléophile plus mou que l'ion hydroxyde et peut permettre d'éviter les réactions de β-élimination de l'acide iduronique et l'hydrolyse du sulfamate. Le TMSONa a donc été testé en parallèle de H_2O_2 et KOH sur le trisaccharide. Tout d'abord, TMSONa a été testé à 2 équivalents dans le THF et après 24 h, seulement 35 % de conversion était observé (suivi cinétique fait par HPLC utilisant une colonne en phase inverse). Lorsque l'on réalise la réaction avec 20 équivalents de TMSONa, le taux de conversion est de 99 % après 22 h. Le produit étant peu soluble dans le THF, un essai à été effectué dans l'acétonitrile. La solubilité n'a pas été améliorée et le taux de conversion était de 96 % après 24 h. L'utilisation de triméthylsilanolate de sodium semble donc donner de bon taux de conversion, néanmoins, l'utilisation

de solvant organique ne permet pas une bonne solubilité du produit. De plus, un essai utilisant le peroxyde d'hydrogène et l'hydroxyde de potassium a montré que le taux de conversion obtenu à 24 h était de 100 % et que le sulfamate était toujours présent. Ces réactifs ont donc été choisis pour effectuer les saponifications sur les autres oligosaccharides.

IV.3.2 Résultats obtenus lors de la saponification

Au laboratoire, la saponification des esters méthyliques de l'acide iduronique s'effectue avec de l'eau oxygénée et de l'hydroxyde de potassium pour générer *in situ* les ions hydroperoxydes HOO^-. Cette espèce est plus réactive et moins basique que l'ion hydroxyde, ce qui permet une réaction plus rapide tout en évitant les réactions de β-élimination de l'ester. Ainsi la saponification est complète en 24 h à 37 °C. Après neutralisation, le brut réactionnel est ensuite purifié par chromatographie phase inverse C-18 puis passé sur colonne échangeuse d'ion (de type Bio-Rad Na^+), les composés sont obtenus sous forme sel de sodium avec des rendements allant de 60 à 79 % (Schéma 61 et Figure 31).

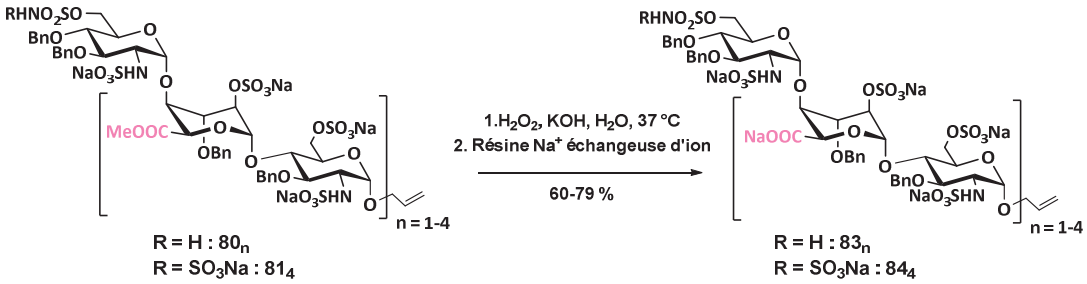


Schéma 61 : Réaction de saponification des esters méthyliques.

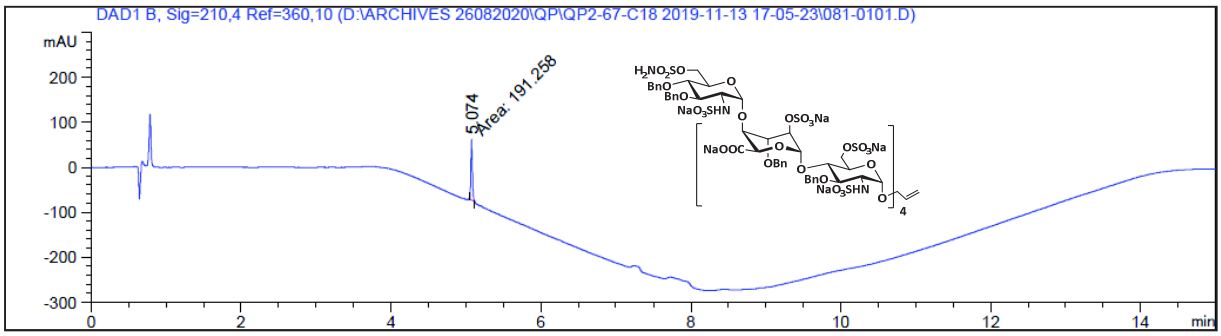


Figure 31 : Chromatogramme obtenu par analyse UPLC du nonasaccharide 83_4 après réaction de saponification et purification par chromatographie sur phase inverse-C18.

Historiquement, cette réaction était effectuée au laboratoire en utilisant de l'hydroxyde de lithium LiOH.[194] Cependant, l'hydroxyde de lithium utilisé pouvait contenir des traces de fer qui réagissait avec le peroxyde d'hydrogène pour donner les espèces radicalaires $HO^{\bullet}$ ou $H_2O^{\bullet}$, selon la réaction de

Fenton, et pouvait époxyder l'allyle. L'hydroxyde de potassium peut également contenir des traces de fer, c'est pourquoi on utilise une qualité ultrapure.

IV.3.3 Hydrogénolyse

La réaction d'hydrogénolyse s'effectue dans un mélange eau/tert-butanol en présence d'hydroxyde de palladium sur charbon, sous pression de dihydrogène (Schéma 62). L'hydroxyde de palladium est utilisé afin de limiter la présence d'acidité dans le milieu, les groupements *N*-sulfates y étant sensibles. La réaction est laissée 24 h à température ambiante puis le palladium est filtré. Pour des raisons inconnues, la réaction est parfois incomplète et le mélange doit être soumis à une nouvelle hydrogénolyse. La multiplication des manipulations explique surement les plus faibles rendements obtenus sur cette étape, la réaction ne pouvant être suivie que par une analyse RMN.

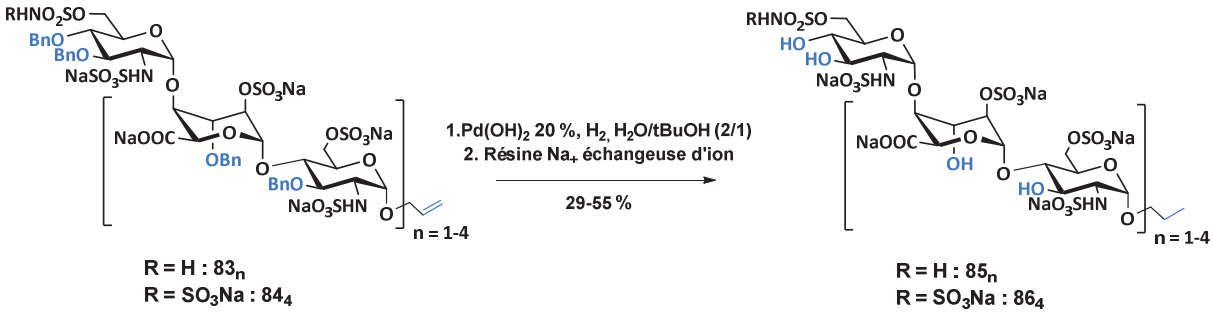


Schéma 62 : Réaction d'hydrogénolyse des oligosaccharides permettant d'obtenir les fragments d'Héparane Sulfate totalement fonctionnalisés.

Lors de l'hydrogénolyse, la double liaison du groupement allyle est également réduite.

Cette dernière étape de déprotection permet d'accéder aux cinq oligosaccharides finaux qui seront ensuite testés afin de déterminer leur activité inhibitrice (Figure 32).

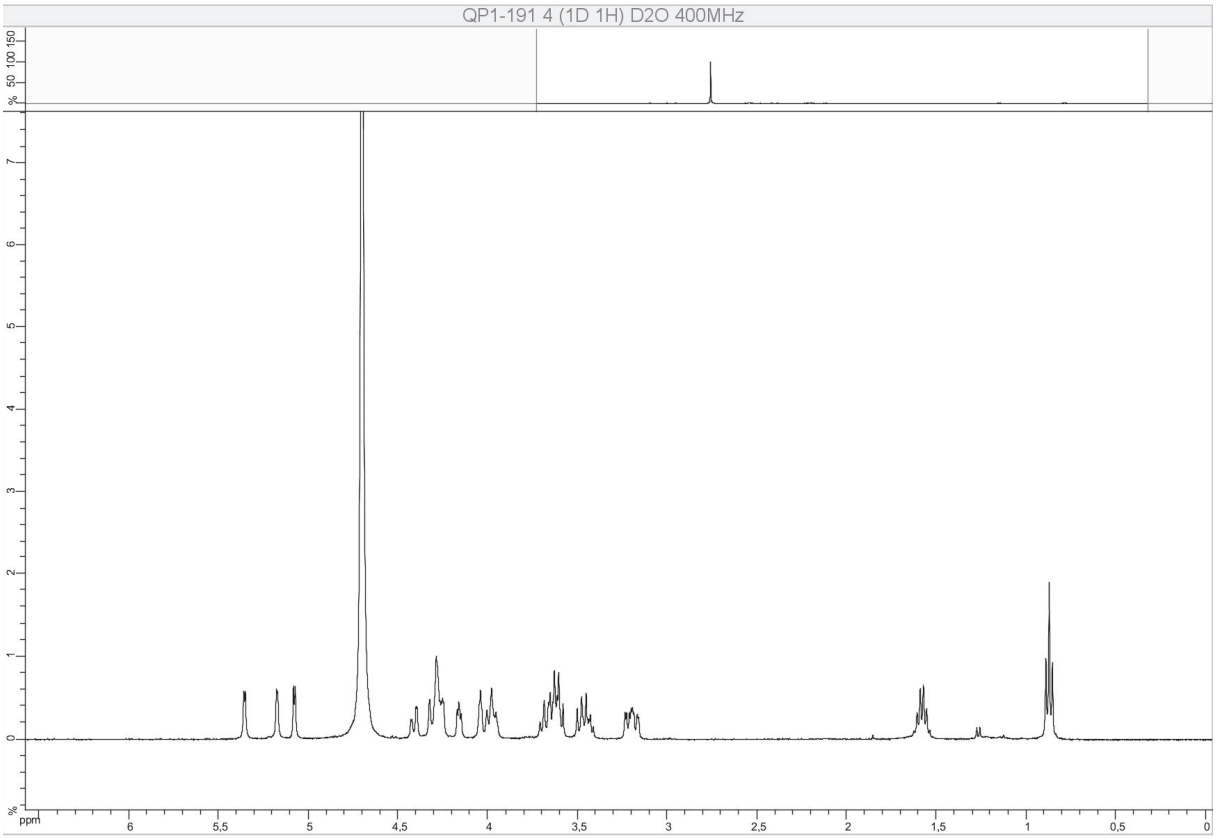


Figure 32 : Spectre RMN du trisacharide 85_1 obtenu après réaction d'hydrognéolyse.

V. Quantification des oligosaccharides par dosage RMN

Connaître les quantités exactes de produits finaux peut s'avérer compliqué. Dans un premier temps, les oligosaccharides dérivés d'HS synthétisés au laboratoire étaient quantifiés par hydrolyse en milieu acide et dosage de la glucosamine libérée par le Dr Françoise Baleux (Institut Pasteur, Paris).[184]

Puis le groupe a mis au point un dosage RMN en utilisant une solution connue d'acétonitrile comme étalon interne. Le rapport entre l'intégration des protons de l'acétonitrile et des protons des sucres n'étant pas de 1 car les protons de l'acétonitrile ont un temps de relaxation plus lent, une gamme étalon avec de l'alpha méthyl glucoside est effectuées afin de prendre en considération ce paramètre. Les conditions d'acquisition des spectres RMN ont été optimisées par le Pr David Bonnaffé et le Dr Wenqing Lu.

V.1 Intégration des spectres RMN

Pour l'intégration des spectres RMN, l'acétonitrile étant le seul présent sur le spectre du l'alpha méthyl glucoside et sur celui des oligosaccharides, son signal est aussi pris comme référence de déplacement chimique.

V.1.1 Intégration du spectre de l'alpha méthyl glucoside

Sur le spectre RMN de l'alpha méthyl glucoside, les signaux du CH_3 de l'acétonitrile sont pris comme référence et intègrent pour 1. Les signaux du CH_3, H_3 et H_6 du méthyle-glucose sont intégrés, en prenant soin de garder toujours la même fenêtre d'intégration pour les échantillons A1, A2 et A3 (Figure 33).

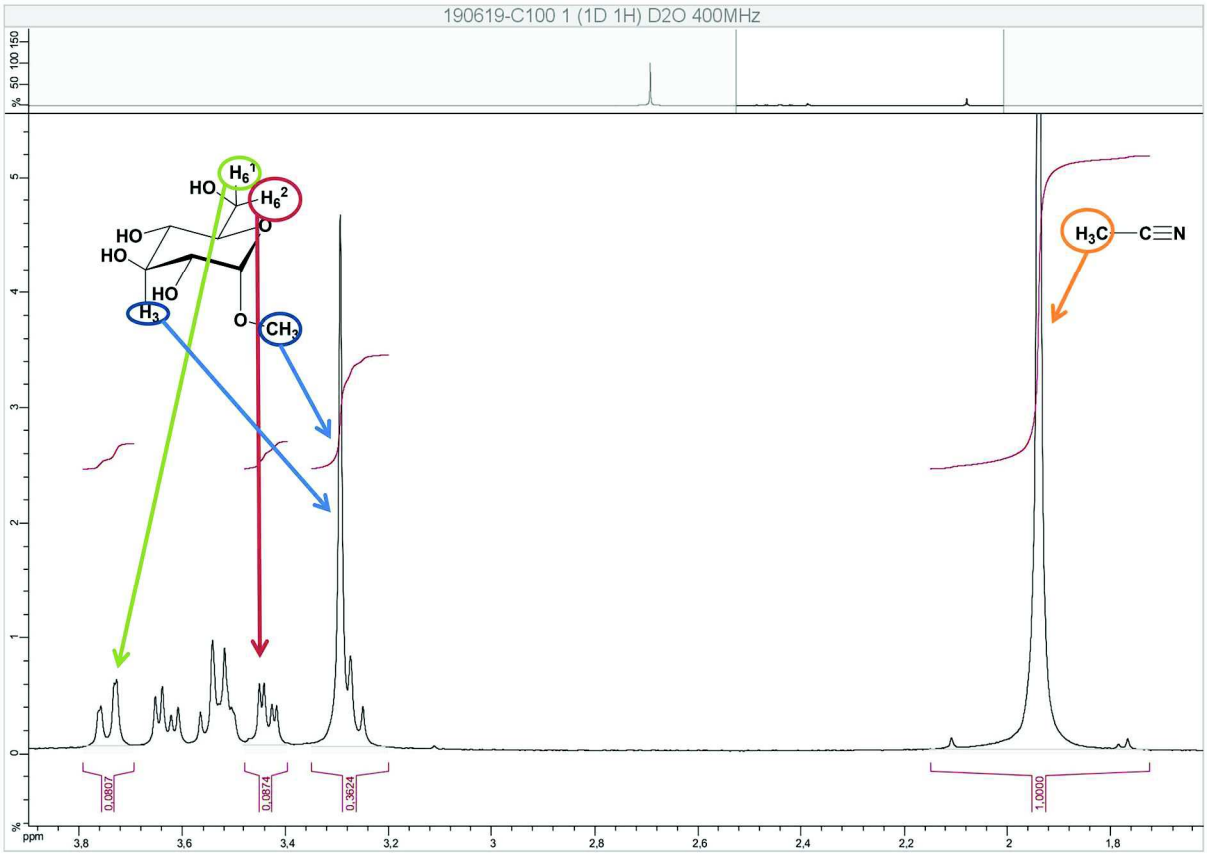


Figure 33 : Spectre RMN obtenu lors du dosage de la gamme étalon. Intégration des signaux de l'alpha méthyl glucoside et de l'acétonitrile pour l'échantillon A1.

V.1.2 Dosage des oligosaccharides

Pour les oligosaccharides, les signaux du propyle (H_b et H_c) sont intégrés ainsi que le signal de l'acétonitrile. L'intégration de H_c est prise comme référence et mise à 3. L'intégration de H_b si elle est bien faite, doit être égale à 2. La fenêtre d'intégration de l'acétonitrile est identique à celle prise pour l'intégration avec l'alpha méthyl glucoside et les fenêtres d'intégration des H_b et H_c sont identiques entre tous les oligosaccharides.

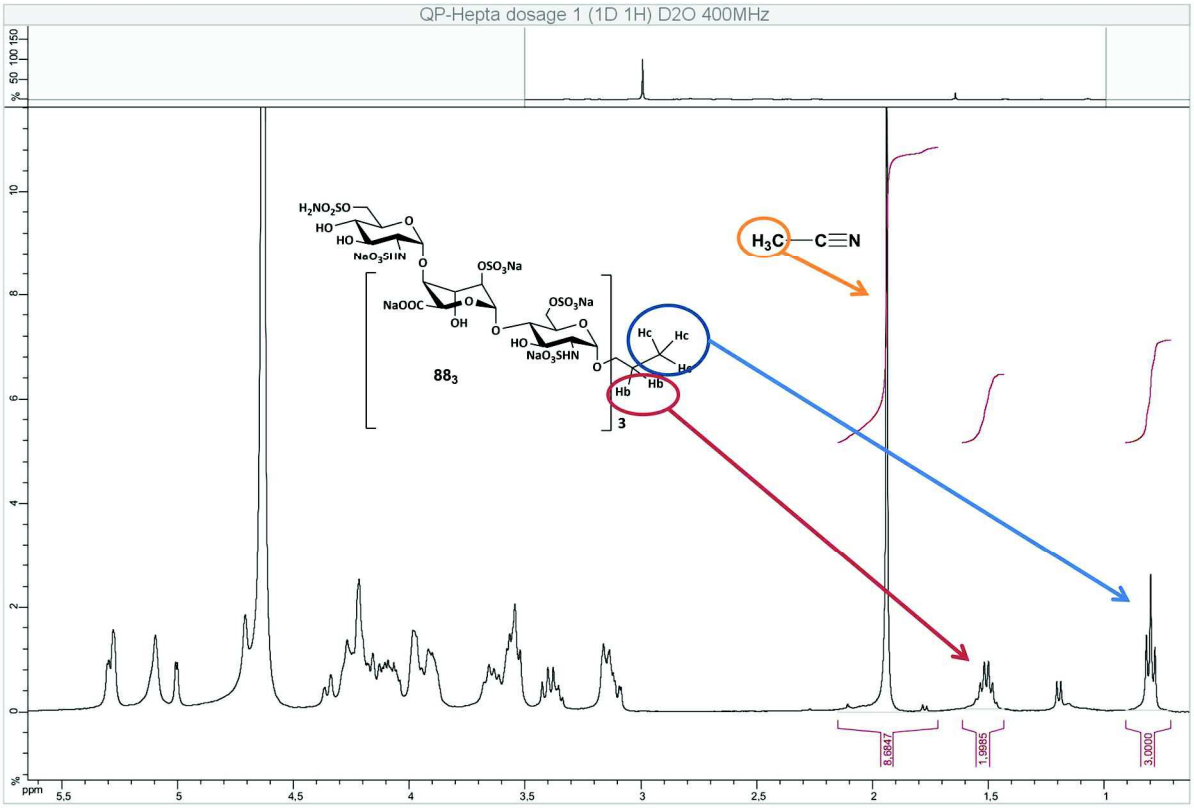


Figure 34 : Spectre RMN obtenu lors du dosage de l'heptasaccharide 85_3. Intégration des signaux H_b et H_c du propyle ainsi que le méthyle de l'acétonitrile.

V.2 Calcul des masses d'oligosaccharides

Une fois tous les spectres RMN intégrés, les données peuvent être traitées.

- Le rapport entre la concentration en acétonitrile et la concentration en alpha méthyl glucoside de chacun des 3 étalons est calculée et prise comme abscisse (1) :

$$y = \frac{[\text{Méthyl glucoside}]}{[\text{ACN}]} (1)$$

- L'intégration des protons de l'alpha méthyl glucoside (CH_3+H_3, H_6^1, H_6^2) des 3 échantillons sont pris comme ordonnées (2) :

$$x = \frac{\text{Integration } H \text{ méthyl glucoside}}{\text{Intégration } H \text{ ACN}} \qquad (2)$$

On obtient donc 3 droites x = **k**y+A (avec A < 0,1, considéré comme négligeable) comportant chacune 3 points : l'intégration de CH_3+H_3 pour A1, A2, A3 donne une droite de 3 points. De même pour H_6^1 et H_6^2 (Figure 35).

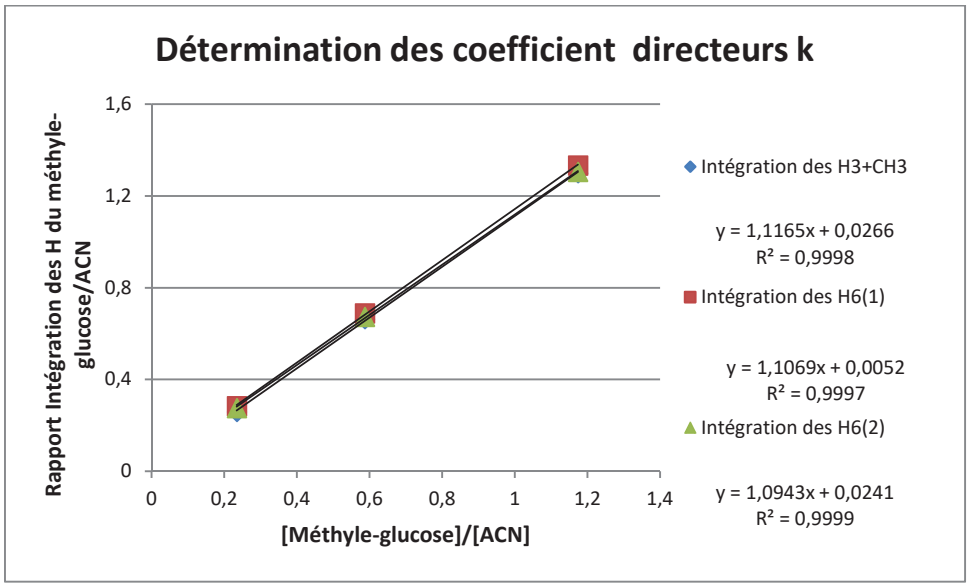


Figure 35 : Détermination des coefficients directeurs k dans la cadre du dosage du nonasaccharide.

- Le coefficient directeur **k** de chaque droite est ensuite déterminé.
- Sur le spectre de l'oligosaccharide, les signaux de l'acétonitrile et ceux du CH_3 du propyle (pris comme référence) sont ensuite intégrés. Le rapport de leur intégration nous donne la valeur de **x** (3). La valeur de **y** représente le rapport entre la concentration en oligosaccharide et la concentration en acétonitrile connue (4).

$$\mathbf{x} = \mathbf{k}\mathbf{y} \text{ avec : } \quad \mathbf{x} = \frac{\text{Integration } H \text{ oligosaccharide}}{\text{Intégration } H \text{ ACN}} \quad (3) \qquad \text{et} \qquad \mathbf{y} = \frac{[\text{Oligosaccharide}]}{[\text{ACN}]} \quad (4)$$

- **k** et [ACN] étant connus, on peut facilement calculer la concentration en oligosaccharide (5)

$$[\text{Oligosaccharide}] = \frac{\text{Intégration } H \text{ ACN x } [\text{ACN}]}{\mathbf{k} \text{ x Intégration } H \text{ oligosaccharide}} \qquad (5)$$

La moyenne des 3 valeurs calculées à partir des 3 coefficients directeurs est effectuée. Sachant que le volume de la solution contenant l'oligosaccharide est de 450 µL, la masse est facilement calculée (6).

$$m_{oligosaccharide} = [\text{oligosaccharide}] \text{ x } M_{oligosaccharide} \text{ x } 4{,}5.10^{-4} \qquad (6)$$

Ce protocole a été effectué pour chacun des cinq oligosaccharides finaux.

VI. Mesure de l'activité inhibitrice

J'ai réalisé la mesure de l'activité inhibitrice entre les molécules **85$_n$** et HSulf2 au sein de l'équipe du Dr Romain Vivès à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (IBS) qui produit l'enzyme.

VI.1 Protocole des tests d'inhibition

La mesure de l'activité arylsulfatase de l'enzyme se fait par la mesure de la fluorescence produite par le 4-MU issu de l'hydrolyse du 4-MUS (Schéma 63).

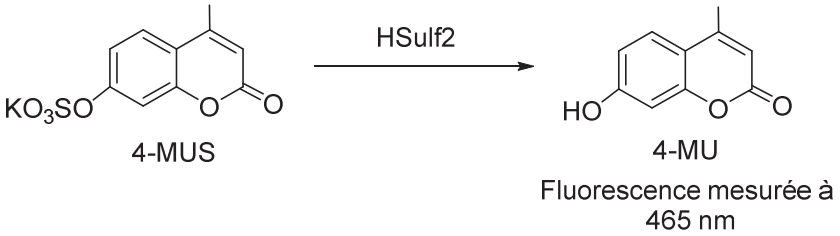


Schéma 63 : Hydrolyse du groupement sulfate du substrat synthétique 4-methyl umbelliferyl sulfate (4-MUS) par HSulf2. Le produit résultant est le 4-methyl umbelliferol (4-MU) qui émet en fluorescence à 465 nm, c'est pourquoi il est utilisé lors de tests *in vitro* pour la détection de l'activité arylsulfatase.

Le 4-MUS commercial a du être recristallisé car une contamination, vraisemblablement au 4-MU, était présente et rendait difficile la lecture des activités enzymatiques.[205]

Le protocole des tests d'inhibition est le suivant :

- Une solution à 20 mM de 4-MUS est préparée dans une solution tampon : 50 mM de TRIS, 20 mM $CaCl_2$, pH 7,5.
- Une solution de HSulf2 dans le tampon est préparée afin d'avoir 4 µg/100 µL d'enzyme par échantillon.
- Des solutions de chaque inhibiteur dans l'eau sont préparées à une certaine concentration.
- Les tests d'inhibition sont effectués dans une plaque 96 puits avec un puits « témoin positif » et un puits « témoin négatif ».
- Dans chaque puits « inhibiteur » sont mélangés la solution de HSulf2, la solution de 4-MUS et la solution contenant l'inhibiteur.
- Dans le puits « témoin négatif » sont mélangés du tampon, la solution de 4-MUS et de l'eau.

- Dans le puits « témoin positif » sont mélangés la solution de HSulf2, la solution de 4-MUS et de l'eau.

L'enzyme et l'inhibiteur sont d'abord ajoutés et mis à température ambiante pendant 15 minutes puis la solution de 4-MUS est ajoutée et incubée à 37 °C. Après une nuit, la mesure de la fluorescence de chaque échantillon est faite.

VI.2 Résultats préliminaires obtenus

Les tests d'inhibition préliminaires ont été effectués sur les quatre oligosaccharides comportant le sulfamate **85**$_n$. L'activité inhibitrice du composé **86**$_4$ sera déterminée ultérieurement lors de tests plus approfondis avec les quatre autres inhibiteurs.

D'après la Figure 36, on peut voir qu'à 1 mM, tous les oligosaccharides inhibent HSulf2. Le nonasaccharide inhibe 72 % de l'activité de l'enzyme tandis que le pentasaccharide et l'heptasaccharide ont une inhibition de 63 %. Le trisaccharide quant à lui inhibe 28 % l'activité de l'enzyme. Lorsque la concentration d'inhibiteur est de 250 µM, l'inhibition de HSulf2 par **85**$_2$, **85**$_3$ et **85**$_4$ est autour de 30 % et **85**$_1$ inhibe l'enzyme à 25 %. Enfin, lorsque la concentration d'inhibiteur est de 50 µM, on ne constate presque plus d'inhibition de HSulf2 quelque soit l'oligosaccharide.

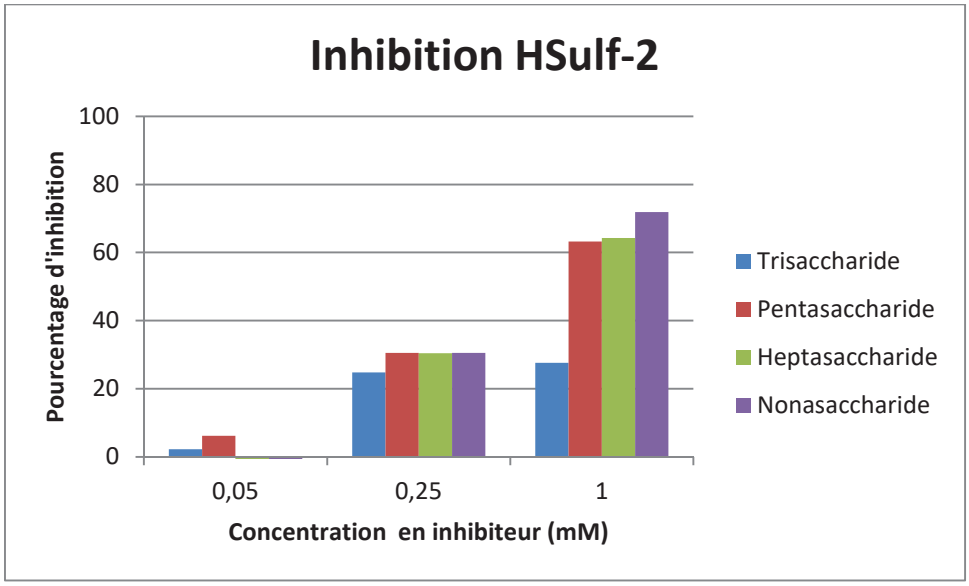


Figure 36: Pourcentage d'inhibition de HSulf2 après une nuit d'incubation à 37 °C avec les oligosaccharides dans une gamme de concentration allant de 50 µM à 1 mM.

Ces premiers tests préliminaires permettent de confirmer l'activité inhibitrice des oligosaccharides fonctionnalisés avec la fonction sulfamate sur l'enzyme HSulf2. D'autres tests seront effectués afin d'obtenir plus de données.

Grâce à l'expertise du laboratoire dans la synthèse des oligosaccharides, quatre fragments d'HS fonctionnalisés avec une fonction sulfamate ont pu être synthétisés et testés pour leur inhibition sur l'enzyme HSulf2. Les étapes de glycosylation/ouverture réductrice et introduction du sulfamate ont été effectuées avec de très bons rendements. Ensuite, les cinq étapes de déprotection ont permis d'accéder aux fragments d'HS pleinement fonctionnalisés. Le titrage RMN des oligosaccharides nous permet d'avoir une masse précise de la quantité d'inhibiteurs finaux obtenus.

Les premiers tests préliminaires ont montré que ces molécules avaient bien une activité inhibitrice à 1 mM. Une cinquième molécule devra également être testée, le nonasaccharide comportant un sulfamate sulfaté afin de déterminer si cette fonction est capable d'inhiber l'enzyme.

Chapitre 3

Optimisation de la réaction de *N*,*O*-sulfonation

I. Introduction

La sulfatation est une réaction importante chez les être vivants. C'est par exemple, un mécanisme de défense très important de notre organisme contre les xénobiotiques. La sulfatation métabolique qui se produit par l'action d'une sulfotransférase et du 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) permet de le transfert d'un groupement sulfate (SO_3^-) à un accepteur de type alcool, amine ou phénol. L'introduction de ce caractère anionique sur la molécule améliore son excrétion et évite de potentiels effets toxiques.[206] Les sulfatations permettent également de réguler la bioactivité de certaines molécules : les stéroïdes sulfates sont des précurseurs d'hormones, qui après hydrolyse de leur groupement sulfate donnent des stéroïdes actifs. Enfin, l'orientation dans l'espace des groupements sulfates, omniprésents dans les chaînes d'HS, leur permet des interactions sélectives avec leurs protéines cibles.[207–209]

L'importance des groupements sulfates dans les processus biologiques a incité le développement de méthodes de sulfatation chimique afin de synthétiser des molécules d'intérêt pour comprendre des mécanismes clés des organismes vivants. Des méthodes de sulfatation par voie enzymatique ont également été développées, en utilisant des sulfotransférases et du PAPS, mais elles ne seront pas traitées dans ce chapitre. Uniquement la sulfatation par voie chimique sera discutée. Les sulfatations chimiques

I.1.1 Agents de sulfatation

I.1.1.a Sulfatation par l'acide sulfurique

Dans les années 1950, les sulfatations se faisaient au moyen d'acide sulfurique (H_2SO_4) par addition sur des alcènes ou cycloalcènes. Des alcools pouvaient également être sulfatés par cette méthode mais la formation d'eau durant la réaction diminuait le rendement, obligeant l'utilisation de montage de

type Dean-Stark, de desséchant ou de montage sous vide.[210,211] D'autres alcools tels que du polyéthylène glycol, du glycérol ou de la cellulose ont également été sulfatés avec du H_2SO_4 à basse température.[212] Un dérivé de l'acide sulfurique a aussi été utilisée pour sulfater des alcools y compris dans des sucres, il s'agit de l'acide sulfamique (H_2NSO_3H). En présence de catalyseur comme l'urée, la pyridine ou l'acétamide, ce réactif donne de bons rendements sur les alcools secondaires.[213] L'utilisation de la pyridine en excès permet de minimiser la dégradation de polysaccharides sensibles aux conditions acides, par exemple, et ainsi , la cellulose a pu être sulfatée à 100 °C.[212]

Cependant, l'utilisation de l'acide sulfurique comme agent de sulfatation peut entraîner de nombreuses réactions secondaires comme de la déshydratation, de la dégradation de composés ou de la sulfatation non-régiosélective.

I.1.1.b Sulfatation par le N,N'dicyclohexylcarbodiimide

L'utilisation du N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de l'acide sulfurique pour sulfater des alcools aliphatiques a été reportée en 1966 par le groupe de Mumma.[214] Le mécanisme décrit implique la formation d'un intermédiaire DCC/H_2SO_4 protoné, solvaté par le DMF, suivi de l'attaque nucléophile de l'alcool sur l'atome de soufre produisant ainsi l'alcool sulfaté et la dicyclohexylurée (Schéma 64).[213]

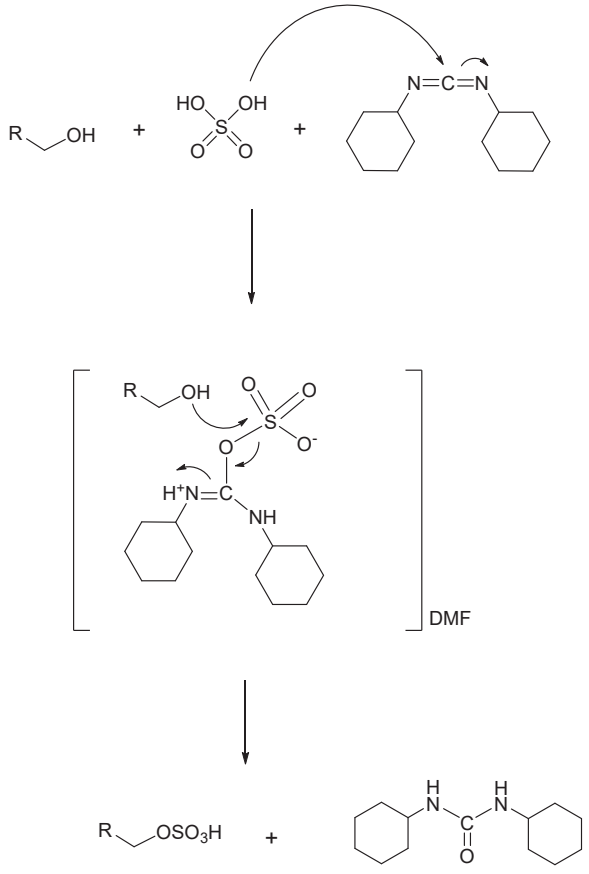


Schéma 64 : Mécanisme de sulfatation d'alcools aliphatiques par le DCC et H_2SO_4.

Le complexe DCC/H_2SO_4 formé étant encombré, cette réaction est régiosélective selon les concentrations utilisées : en conditions diluées, seuls les alcools les moins encombrés sont sulfatés alors qu'en conditions concentrées, les produits sont persulfatés.[215] Cette méthode a été utilisée pour la sulfatation d'autres composés comme des phénols, mercaptans, amines et oximes. Cependant, la dicyclohexylurée formée lors de cette réaction complique la purification des composés et l'utilisation de solvant polaire donne de nombreux produits secondaires. De plus, l'utilisation du DCC/H_2SO_4 est restreint, il ne permet pas la sulfatation de molécules sensibles en milieu acide.

I.1.1.c Sulfatation par des complexes de trioxyde de soufre

Le trioxyde de soufre (SO_3) peut également être utilisé pour sulfater des composés tels que des alcènes, des amines ou des alcools. Cependant, son utilisation en tant que gaz ou liquide peut être compliqué à mettre en œuvre car SO_3 est peu stable et peut former des polymères solides.[212] Le trioxyde de soufre est donc préférentiellement utilisé sous forme de complexe avec des amines, amides, éthers ou phosphates, facilement préparés en faisant buller du SO_3 sous forme gazeuse dans la solution organique voulu. Ces complexes sont beaucoup plus faciles à manipuler car ils sont sous forme solide à température ambiante et stables à haute température. Les complexes de trioxyde de soufre les plus utilisés sont ceux composés de bases azotées comme la pyridine (SO_3•Py), la triéthylamine (SO_3•Et_3N) et la triméthylamine (SO_3•Me_3N) ainsi que ceux composés d'amides comme le DMF (SO_3•DMF).[216–220] La stabilité de ces complexes est directement reliée à la force de la base utilisée. Plus la base sera forte, plus le complexe sera stable. Cependant, ce critère n'est pas le seul facteur déterminant de la réactivité du complexe. En effet, laes acides conjuguées de la triméthylamine et la triéthylamine ont toutes deux un pKa de 10,7, mais le complexe de triméthylamine est beaucoup plus stable et moins réactif que le complexe de triéthylamine.[212] Le DMF étant une base plus faible que les bases azotées, la charge partielle positive de l'atome de soufre est plus grande dans les complexes SO_3•DMF, ce qui implique que l'attaque nucléophile sur le complexe est favorisée et donc de meilleurs rendements sont obtenus avec ce réactif.

I.1.2 Utilisation des complexes de trioxyde de soufre

Les premières réactions de sulfatations utilisant les complexes de trioxyde de soufre remontent à 1936, lorsque le groupe de Sobel cherche de nouvelles méthodes pour isoler le cholestérol et ses dérivés présents dans le matériel biologique.[221] En faisant réagir la fonction alcool de celui-ci avec le complexe SO_3•Py, le dérivé cholestérol formé est devenu insoluble dans l'éther de pétrole et a pu facilement être isolé. En 1941, Sobel et Spoerri développent la préparation de steryl sulfate, présent en

grande quantité dans notre organisme, afin de pouvoir étudier ses propriétés biologiques.[222] Dès les années 1960, les réactions de sulfatations sont déjà bien connues puisque Gilbert publie une revue sur les différents dérivés de trioxide de soufre et ses utilisations dans des réactions avec des composés organiques tels des alcools, esters, amines...[212] En 1968, le groupe de Bernstein utilise le complexe $Et_3N•SO_3$, toujours dans la pyridine, afin de préparer des sulfates de stéroïdes.[223] La première synthèse d'un dérivé de l'estriol (une des trois œstrogènes produite pas le corps humain) est réalisé par le groupe de Joseph en 1969, en utilisant du $SO_3•Me_3N$ dans la pyridine à température ambiante.[224]

Depuis, de nombreuses autres synthèses ont été reportées utilisant différentes méthodes de sulfatation : sulfatation de polyol utilisant de l'acide triflique afin de promouvoir la réaction,[225] de la *O*-sulfatation à basse température (de -15 °C à -5 °C°) avec du SO_3•DMF,[226] des réactions de *O*-sulfatation utilisant différents couples de réactif/solvant : $SO_3•Me_3N$/DMF,[227] SO_3•Py/Pyridine,[228] $SO_3•Me_3N$/Pyridine,[229] $SO_3•Et_3N$/Pyridine,[194] $SO_3•Et_3N$/DMF.[230]

Les réactions de *N*-sulfonation, ont également été développées en utilisant les complexes de trioxyde de soufre. Contrairement aux réactions de *O*-sulfatation, des conditions réactionnelles aqueuses ou en présence de solvant polaire (méthanol) sont utilisées : SO_3•Py/H_2O,[180] SO_3•Py/MeOH/Et_3N 0,1 M /NaOH.[228] Ces méthodes sont chimiosélectives : uniquement le produit de la *N*-sulfonation est obtenu, même si des alcools libres sont présents. En effet, le complexe de trioxide de soufre se dégradant rapidement en présence d'eau ou de méthanol, la réaction de *N*-sulfatation étant plus rapide que la *O*-sulfatation, ces conditions permettent la sulfatation de l'amine sans la sulfatation des alcools.

I.1.3 Sulfatation pour la synthèse chimique d'HS

Dans la plupart des stratégies de synthèse chimique d'HS, *O*-sulfatation et *N*-sulfonation sont effectuées l'une après l'autre : les alcools sont déprotégés puis sulfatés, les amines sont ensuite déprotégées puis sulfatées. Même si chacune des ces réactions est optimisée et a de bons rendements, elles ne sont pas économiques en atome et la *N*,*O*-sulfonation simultanée permet de s'affranchir d'une étape de synthèse. Certaines équipes se sont donc attelées à développer cette réaction. La première *N*,*O*-sulfonation reportée date de 2004, effectuée par notre laboratoire sur des composés allant des tétrasaccharides aux octasaccharides en utilisant le complexe SO_3•Py dans la pyridine avec des rendements allant de 73 % à 96 %.[194] En 2006, le groupe de Seeberger utilise également la *N*,*O*-sulfonation sur un disaccharide avec le même couple de réactif : SO_3•Py/Pyridine avec un bon rendement de 86 %.[229]

Devant des temps de réaction relativement longs (7 jours pour *O*-sulfater un disaccharide), le groupe de Nieto et de Paz décide d'utiliser pour la première fois, en 2011, un appareil à micro-ondes pour sulfater des dérivés d'héparine. Cela leur permet d'effectuer la *O*-sulfatation d'un hexasaccharide en

30 min à 100 °C avec un rendement de 90 %.[231] En 2015, Le groupe de Yu effectue la réaction de *N*,*O*-sulfatation en utilisant un appareil à micro-ondes sur un trisaccharide à 100 °C en 15 min avec un rendement de 95 %.[227] Cette réaction a été réalisée avec le complexe SO_3•Py dans la pyridine et ajout de triéthylamine.

I.2 Nos objectifs

La stratégie mise au point au laboratoire pour la synthèse des fragments d'HS passe par une étape permettant la sulfatation des amines et des alcools. Cette étape quoique longue n'avait posé aucun problème jusqu'à récemment. En effet, depuis quelques temps, nous avons observé des diminutions de rendement, un manque de reproductibilité et l'apparition de produits secondaires. Nous nous sommes donc intéressés à cette réaction de plus près afin de mieux la comprendre et de déterminer des conditions réactionnelles nous permettant de retrouver cette reproductibilité. En nous appuyant sur toutes les réactions reportées dans la littérature et la connaissance du laboratoire sur cette réaction, nous avons d'abord étudié l'influence des conditions réactionnelles sur le taux de conversion ainsi que l'importance du traitement de la réaction. Nous avons réalisé cette étude sur le disaccharide de base des synthèses des fragments d'HS et suivi les réactions par HPLC ou UPLC en utilisant une colonne C-18 phase inverse (Figure 37). Une fois les conditions réactionnelles optimales déterminées, nous nous sommes attelés à la *N*, *O*-sulfonation de l'octasaccharide, partie répétitive de l'héparine.

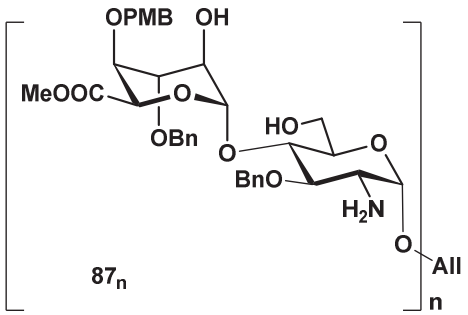


Figure 37 : Molécules utilisées 87_1 (disaccharide) et 87_4 (octasaccharide) pour l'optimisation de la réaction de sulfatation.

Le disaccharide utilisé correspond à la partie répétitive du domaine S des HS et comporte 3 positions à sulfater : une amine et deux alcools, l'un en position 6 de la glucosamine et l'autre en position 2 de l'acide iduronique (Figure 38).

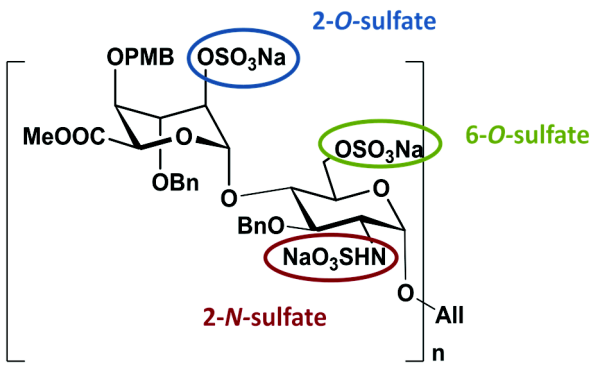


Figure 38 : Positions sulfatées sur les molécules utilisées, disaccharide (n=1) et octasaccharide (n=4).

II. Synthèse des molécules utilisées pour l'étude de la sulfatation

La synthèse des molécules **87**$_1$ et **87**$_4$ utilisées pour l'optimisation de la réaction de sulfatation reprend des étapes vues dans les chapitres précédents. Une brève description sera donnée ici.

II.1 Synthèse du disaccharide 87$_1$

Le disaccharide **87**$_1$ est obtenu à partir du composé **53** (Schéma 65)**.** L'ouverture régiosélective du benzylidène est d'abord effectuée avec du dichlorophénylborane et du triéthylsilane pour obtenir l'alcool libre en position 2 du résidu iduronique.[189] Celui-ci est directement acétylé afin de faciliter la purification du composé. Le disaccharide est ensuite désacétylé puis l'azoture est réduit pour donner l'amine libre.

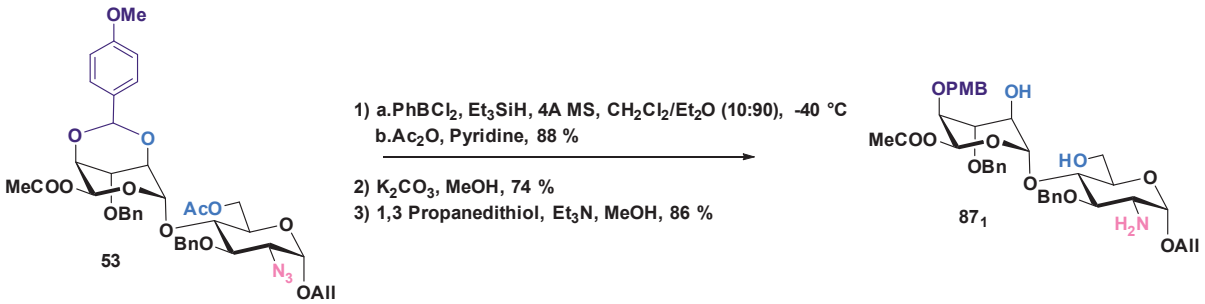


Schéma 65: Synthèse du disaccharide 87$_1$.

II.2 Synthèse de l'octasaccharide 87_4

L'octasaccharide est obtenu après glycosylation [2+2] de la brique $\mathbf{I_1}$ donneur et de la brique $\mathbf{I_1}$ accepteur comme vu dans le chapitre 2. Le tétrasaccharide résultant est alors transformé, pour une partie en donneur de glycosylation et l'autre partie en accepteur de glycosylation. Une glycosylation [4+4] permet alors d'accéder à l'octasaccharide **70** (Schéma 66).

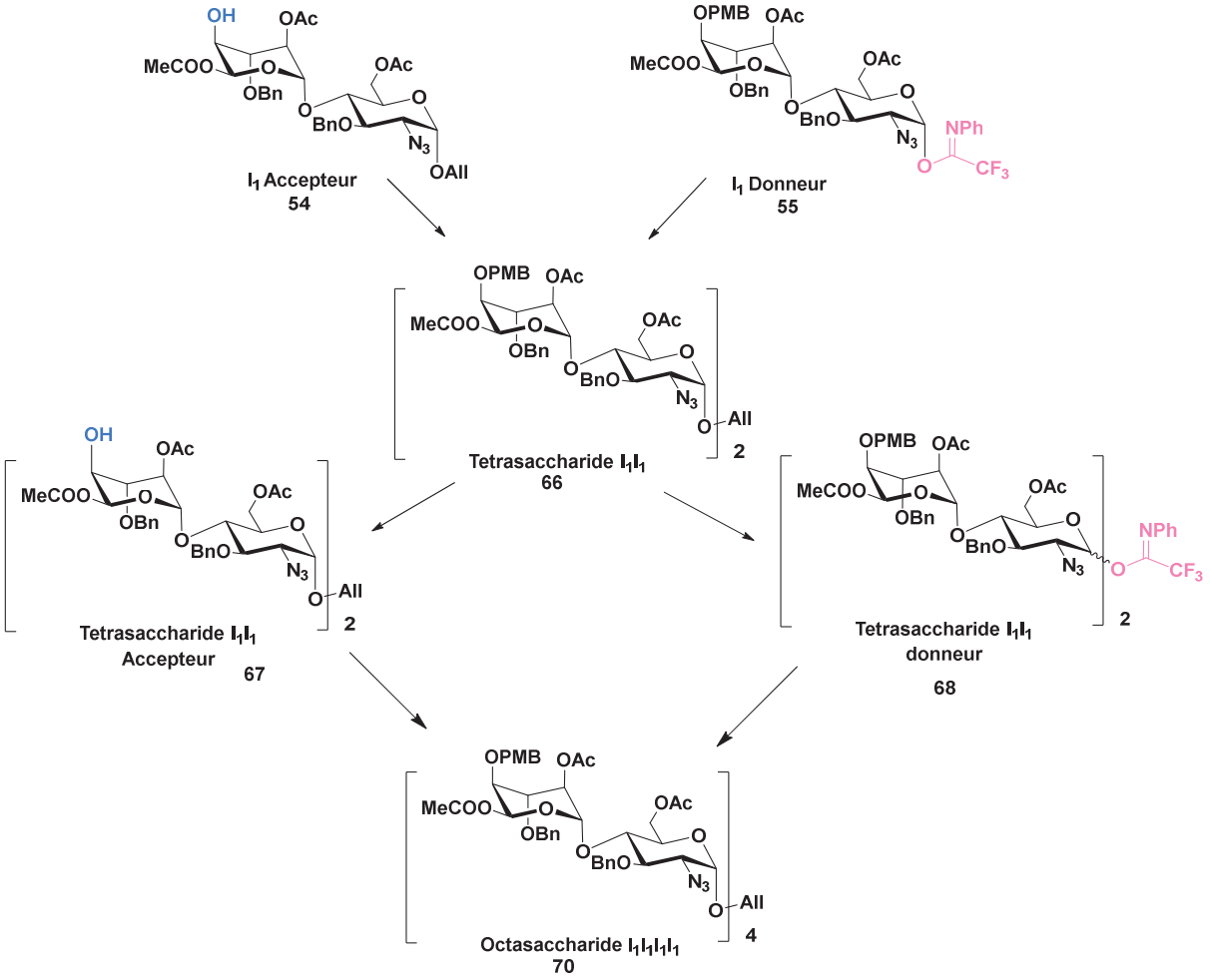


Schéma 66 : Synthèse de l'octasaccharide 70 à partir de la brique disaccharide I_1.

L'octasaccharide $\mathbf{87_4}$ est ensuite obtenu en deux étapes à partir de **70** : les alcools sont déprotégés et les azotures sont réduits (Schéma 67).

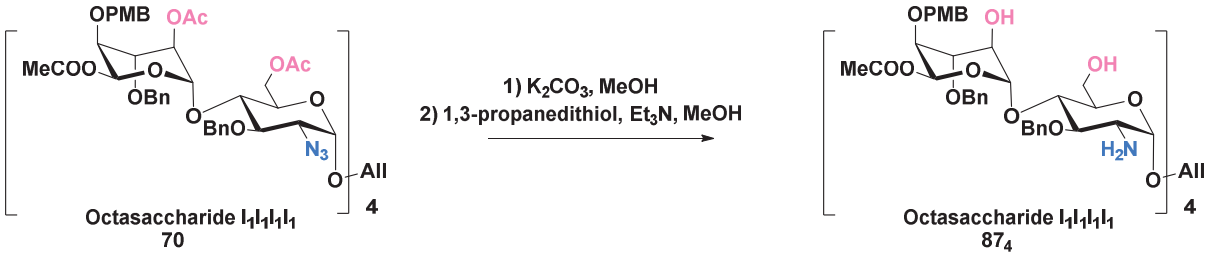


Schéma 67: Synthèse de l'octasaccharide 87_4 à partir de l'octasaccharide 70 pour l'optimisation de la réaction de sulfatation.

III. Etude de la sulfatation

III.1 Suivi réactionnel

Afin d'étudier et comprendre la réaction de sulfatation, des suivis réactionnels sont effectués au cours de chaque réaction et sont analysés par UPLC.

III.1.1 Détermination des temps de rétention des différents composés pouvant être obtenus

Dans un premier temps, nous avons identifié les différents composés pouvant être obtenus au cours de la réaction. Chaque composé a été isolé et caractérisé. Le Tableau 5 représente les différents temps de rétention des composés se formant lors de la sulfatation du disaccharide (Figure 39). Le signal à 14,1 min, peut représenter deux composés : **89** et **91**. Ceux-ci ont pu être différenciés en modifiant le pH (de 6,8 à 8,0) de la phase mobile lors de l'analyse HPLC de l'échantillon.

Tableau 5 : Nature du composé en fonction du temps de rétention pour la sulfatation du disaccharide 87_1. Conditions HPLC : 10 % - 60 % Tampon Et_3NAc/ACN (Table 15)

Temps de rétention (min)	Composé
18,2	Disaccharide **87_1** – Produit de départ
15,8	Disaccharide **90** – 6-*O*SO_3
15,2	Disaccharide **88** – *N*HSO_3
14,1	Disaccharide – *N*,6-*O*-SO_3 **91** et 2,6-*O*-SO_3 **89**
13,5	Disaccharide **92** – *N*,2-*O*-SO_3
12,9	Disaccharide Trisulfaté **93**

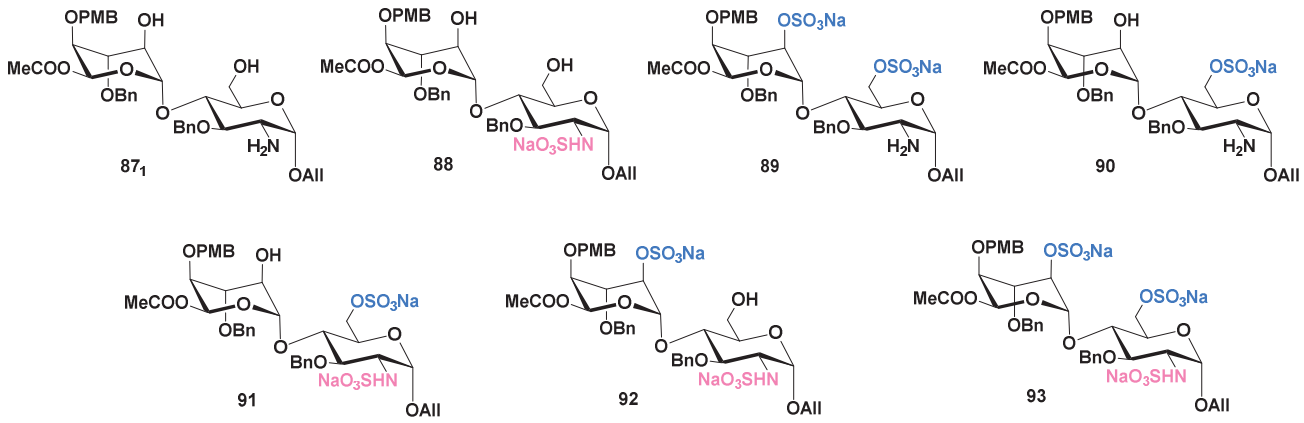


Figure 39 : Composés obtenus lors de la sulfatation du disaccharide 87_1.

III.1.2 Importance du traitement de la réaction

Dans la littérature, on retrouve différents types de traitement pour la réaction de *N*,*O*-sulfonation : traitement avec triéthylamine puis méthanol[180,229] ou uniquement méthanol[231] et dilution dans du dichlorométhane.[194,226] Au laboratoire, nous utilisons la méthode de traitement par la triéthylamine (1,8 éq/complexe•SO_3) puis par le méthanol (16 éq/complexe•SO_3). Nous nous sommes donc interrogés sur l'importance de l'ajout de la triéthylamine en fin de réaction. Cette étude à été effectuée par Louise Morgenthaler (assistant ingénieur au laboratoire).

La réaction de *N*,*O*-sulfonation a été réalisée sur la brique disaccharide dans les conditions habituellement utilisées au laboratoire : 5 équivalents de SO_3•Py par position à sulfater dans la pyridine, avec [SO_3•Py] = 0,3 M, à température ambiante. La fin de la réaction (100 % de produit trisulfaté **93**) a été confirmée par UPLC et du méthanol a été ajouté au milieu réactionnel (16 éq/complexe•SO_3) et un suivi a été effectué. A t = 15 min (après l'ajout de MeOH), le milieu réactionnel ne contient plus que 86 % de produit trisulfaté **93** et 14 % de produit di-*O*-sulfaté **89**. Après 2 h, il ne reste plus que 28 % de produit trisulfaté **93** et au bout de 6 h, le milieu réactionnel contient 97 % de produit di-*O*-sulfaté **89** (Figure 40).

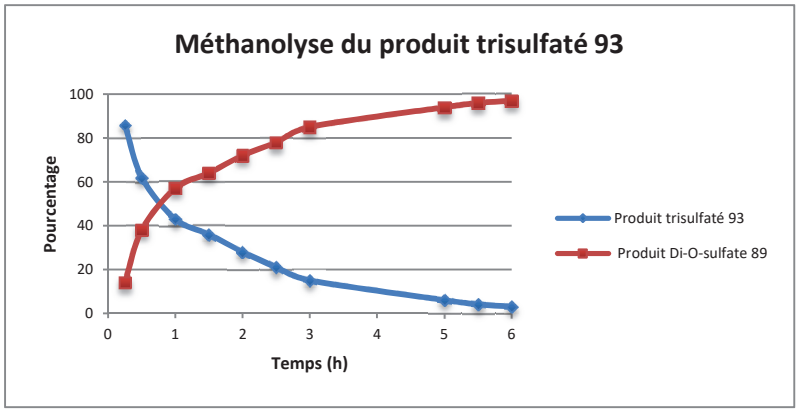


Figure 40 : Influence de l'ajout de méthanol comme traitement.

Le produit obtenu a été montré comme étant le produit **89**, ayant perdu le sulfate sur l'amine. L'ajout de méthanol dans le milieu réactionnel, en fin de réaction, provoque donc une dé-*N*-sulfonation du produit **93**. En effet, le méthanol réagit avec le complexe de trioxyde de soufre selon l'équation chimique suivante :[212]

$$2\ CH_3OH \xrightarrow{R_3N.SO_3} 2\ CH_3OSO_3H + R_3N \longrightarrow (CH_3O)_2SO_2 + H_2SO_4 + R_3N$$

Équation 1 : Réaction du méthanol avec le complexe•SO_3.

Cette réaction libère de l'acide sulfurique. Ces conditions réactionnelles acides sont connues pour entrainer la dé-*N*-sulfonation de produit $NHSO_3$.[232] L'ajout de triéthylamine permet donc de neutraliser l'acidité crée par la réaction entre le méthanol et le trioxide de soufre. Afin d'éviter tout risque de méthanolyse du groupement *N*-sulfate, la triéthylamine doit donc être ajoutée en premier au moment du traitement de la réaction.

III.2 Étude des paramètres de la réaction

III.2.1 Influence de la quantité d'eau

Afin de déterminer les conditions réactionnelles optimales nécessaires pour la *N*,*O*-sulfonation, la qualité de la pyridine utilisée (solvant de la réaction) ainsi que l'influence de sa quantité en eau ont été étudiées. La réaction de *N*,*O*-sulfonation a été réalisée avec de la pyridine fraîchement distillée (quantité en eau inférieure à 25 ppm, mesurée par titrage volumétrique avec la méthode du Karl Fischer) et avec de la pyridine contenant 712 ppm d'eau.

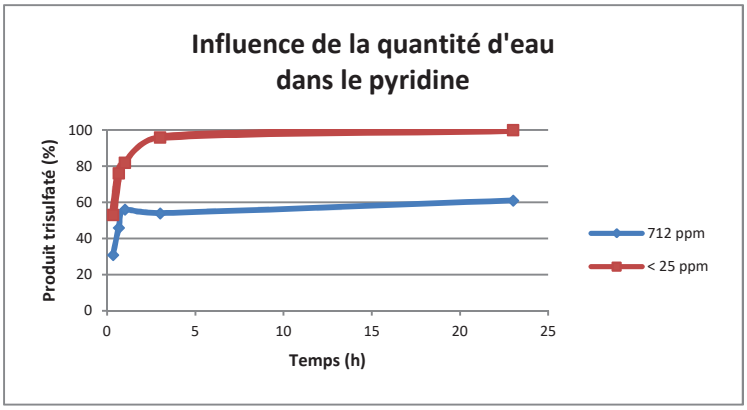


Figure 41 : Influence de la quantité d'eau présente dans la pyridine.

D'après les résultats obtenus, la présence d'eau dans la pyridine ne permet pas d'obtenir une conversion totale en produit **93** (Figure 41). En effet, l'eau présente dans le milieu réactionnel réagit avec le complexe SO_3•Py pour donner de l'acide (Équation 2).[233] On peut penser que cet acide formé induit la dé-*N*-sulfonation du composé **93**, ce qui explique ce taux de conversion (~ 60 %).

$$H_2O + SO_3{\cdot}Py \longrightarrow PyH^+ + HSO_4^-$$

Équation 2 : Hydrolyse du complexe SO_3•Py par l'eau générant de l'ion hydrogénosulfate, acide.

De plus, l'utilisation de plusieurs bouteilles commerciales vendues comme ayant une teneur en eau inférieure à 30 ppm s'est montré être un échec, sans que l'on puisse savoir pourquoi. Les spectres RMN et les analyses au Karl Fischer n'ont montré aucune impureté. La pyridine utilisée doit donc être distillée sur CaH_2 pour avoir une teneur en eau minimale.

III.2.2 Influence du réactif

III.2.2.a Détermination de l'activité du complexe

La qualité du réactif utilisé pour la réaction a été étudiée. En effet, le complexe SO_3•Py commercial ne donnait pas de résultats reproductibles d'une expérience à l'autre. L'activité du complexe a alors été mesurée selon le protocole établi par Dunham.[233] Il utilise le fait que lorsque le SO_3•Py est dissous dans la pyridine contenant 0,1% d'eau, l'hydrolyse du complexe s'effectue en 5 minutes.

L'activité du complexe a été mesurée sur plusieurs lots commerciaux et est de 31 % à 35 % en masse contre 50 % en théorie.[233] Cette faible activité indique que le complexe a dû se dégrader au contact de l'humidité et ainsi former de l'acide sulfurique. Cela explique l'impossibilité d'obtenir des réactions à 100 % de conversion : le nombre d'équivalents de complexe introduits était donc inférieur à 5

équivalents et la présence d'acidité dans le milieu réactionnel empêchait l'obtention de produit *N*-sulfaté.

Afin d'obtenir un réactif de meilleure pureté, le complexe SO_3•Py a donc été lavé à l'eau froide afin de solubiliser l'acide formé, sans solubiliser la complexe, puis rincé au méthanol et au dichlorométhane froid et séché une nuit sur P_2O_5.[226] Son activité a ensuite été mesurée à 42 % et a permis d'obtenir de meilleurs résultats.

III.2.2.b Choix du réactif

Devant le manque de stabilité du complexe SO_3•Py, d'autres complexes plus stables ont été testés. D'après la littérature le complexe SO_3•Me_3N est très peu réactif à l'eau puisqu'à 50 °C, en présence d'eau (25 % de son poids), il n'est hydrolysé qu'à 6,4 % en 24 h.[212] Le complexe SO_3•Et_3N est quant à lui un peu moins stable et plus réactif que SO_3•Me_3N, mais toujours moins réactif à l'eau que SO_3•Py. Ces deux complexes, le SO_3•Me_3N et le SO_3•Et_3N commerciaux ont donc été testés dans les mêmes conditions que le complexe SO_3•Py. Un suivi réactionnel a permis de constater que les deux nouveaux complexes testés (SO_3•Me_3N et SO_3•Et_3N) étaient moins réactifs que SO_3•Py puisqu'il faut 24 h pour sulfater le disaccharide **87**$_1$ contre 3 h pour SO_3•Py (Figure 42).

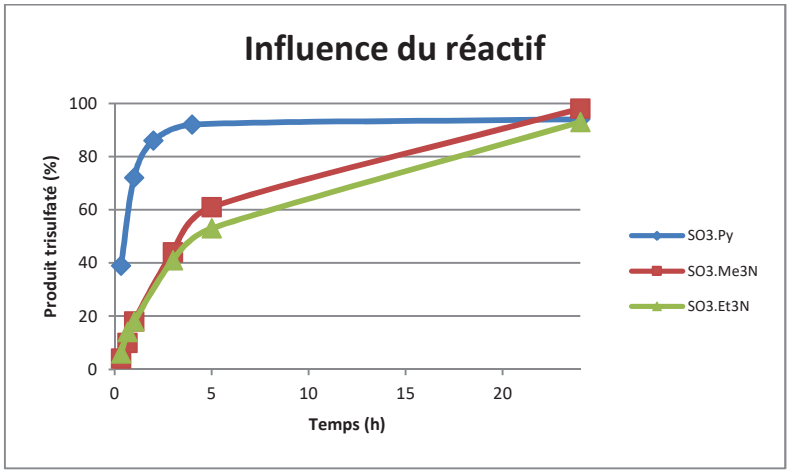


Figure 42 : Influence du réactif sur la conversion de la réaction.

Cependant, les taux de conversion de 100 % ont été obtenus avec les deux complexes SO_3•Me_3N et SO_3•Et_3N. Le complexe SO_3•Me_3N, le réactif le plus stable des trois, a été choisi pour effectuer le reste des réactions.

III.2.3 Diminution du nombre d'équivalents de réactif

Ensuite, la quantité de réactif a été optimisée. Habituellement, la réaction s'effectue avec 5 équivalents de complexe par position à sulfater. La quantité à été réduite à 3 équivalents par position sans perte de taux de conversion ni d'allongement du temps de réaction (Figure 43). La concentration du milieu réactionnel est restée inchangée : [SO_3•Me_3N] = 0,3 M.

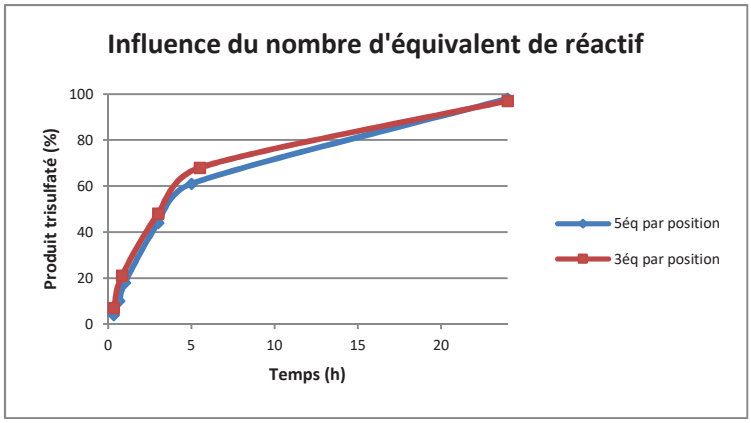


Figure 43 : Influence du nombre d'équivalent de réactif par position sur la réaction de sulfatation.

III.2.4 Influence de la température

Nous avons étudié l'influence de la température sur la réaction de sulfatation avec deux complexes : le complexe SO_3•Py et le complexe SO_3•Me_3N. Pour rappel ces deux complexes ont des réactivités différentes : le disaccharide est entièrement sulfaté en 3 h à 30 °C avec SO_3•Py contre 24 h avec le SO_3•Me_3N.

La réaction avec le SO_3•Py a été effectuée à 15 °C, 30 °C et 50 °C. A 15 °C, la réaction est terminée en 6 h. A 30 °C, après 3 h, le taux de conversion est total et à 50 °C, il faut 20 min pour obtenir le même résultat (Figure 44).

Quant à la réaction avec le SO_3•Me_3N, elle est terminée après 24 h à 30 °C. A 20 °C, il faut le double de temps (48 h) pour obtenir un taux de conversion de 100 % (Figure 44).

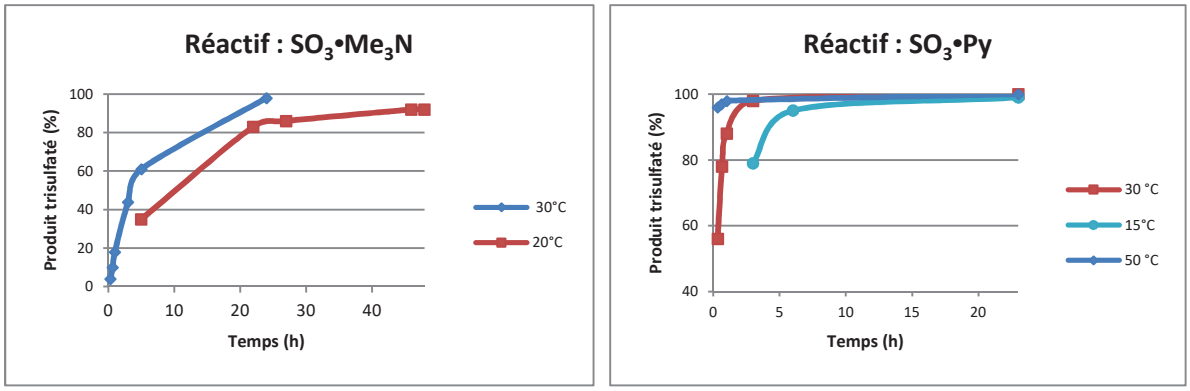


Figure 44 : Influence de la température sur le temps de réaction avec le complexe SO_3•Me_3N (à gauche) et le complexe SO_3•Py (à droite).

Que ce soit avec le complexe SO_3•Py ou le complexe SO_3•Me_3N, la réaction suit bien la loi d'Arrhénius (doublement du temps de réaction par palier de 10 °C de température du milieu réactionnel). La *N*,*O*-sulfonation du disaccharide à 20 °C avec le SO_3•Me_3N étant relativement longue (48 h), le reste des réactions se feront à 30 °C.

III.2.5 Ajout de triéthylamine dans le milieu réactionnel

Enfin, nous avons effectué une réaction de *N*,*O*-sulfonation dans les conditions classiques (réactif : SO_3•Py dans la pyridine à 0,3 M) avec ajout de triéthylamine au milieu réactionnel (Et_3N/pyridine : 1/10 v/v). Ces conditions ont été appliquées dans la littérature et ont montré de bons taux de conversion.[227]

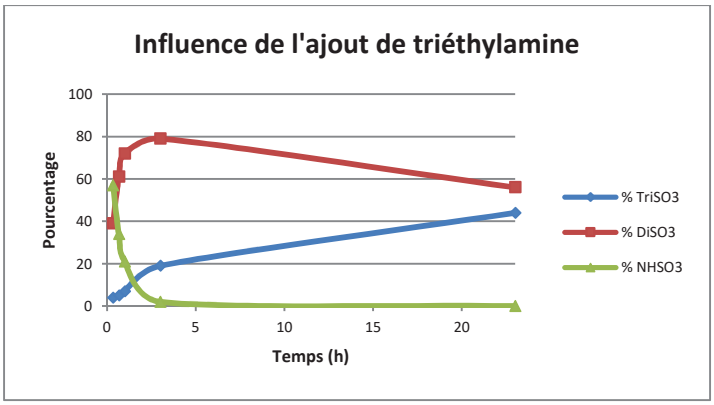


Figure 45 : Influence de l'ajout de triéthylamine sur la réaction de *N*,*O*-sulfonation.

En présence de triéthylamine, on peut constater que la *N*-sulfonation s'effectue en premier (à 20 min, 57 % de $NHSO_3^-$), s'ensuit la sulfatation des deux alcools libres pour mener au produit **93**. Cependant, au bout de 24 h, la conversion en produit trisulfate n'est pas totale (44 % de produit final **93**, 56 % de produit di-sulfaté) (Figure 45). L'ajout de triéthylamine ne nous a donc pas permis d'obtenir un taux de conversion de 100 % en produit trisulfaté **93**.

Afin d'obtenir une réaction de N,O-sulfonation reproductible, nous avons étudié les différents paramètres influençant la réaction. La pyridine utilisée doit être distillée et anhydre. L'utilisation du complexe SO_3•Py comme réactif ne permet pas d'obtenir des résultats reproductibles car celui-ci est très sensible : il est très réactif avec l'eau et peut s'hydrolyser rapidement. L'acide alors généré ne permet pas d'obtenir un bon rendement. Afin de palier ce problème, d'autres complexes ont été testés, et le SO_3•Me_3N s'est avéré donner des taux de conversion de 100 % pour le produit trisulfaté. Ce complexe étant moins réactif, la durée de la réaction est plus longue et la température a été augmentée à 30 °C afin d'avoir une réaction complète en 24 h. Le nombre d'équivalents de réactif a pu être diminué de 5 à 3 équivalents par position à sulfater.

III.3 Étude de la *N,O*-sulfonation

III.3.1 Suivi cinétique

Une fois les conditions réactionnelles optimisées, des suivis cinétiques de la *N,O*-sulfonation ont été réalisées afin de déterminer l'ordre de sulfonation des positions réactives (amine et alcools en position 6 de la glucosamine et en position 2 de l'acide iduronique). L'étude a été faite avec les complexes SO_3•Py et SO_3•Me_3N afin de déterminer si les mécanismes de sulfatation étaient les mêmes pour ces deux réactifs.

Pour le complexe SO_3•Py, à t = 30 secondes, 55 % du produit de départ n'est pas encore sulfaté, 32 % du produit est *N*-sulfaté **88** et 12 % est *N*, 6-*O*-disulfaté **91** (Figure 46). Après 1 min, il n'y a plus de produit de départ **87$_1$**, 50 % du disaccharide est *N*-sulfaté **88** et 41 % est *N*, 6-*O*-disulfaté **91**. Au fur et à mesure de la réaction, le signal du produit *N*-sulfaté **88** diminue au profit du signal correspondant au produit *N*, 6-*O*-disulfate **91** (à t = 5 min, on observe 3 % de produit *N*-sulfate et 78% de produit *N*, 6-*O*-sulfate). Ce dernier diminue également au profit du signal correspondant au produit trisulfaté **93** (Figure 46).

La même réactivité est observée pour la réaction effectuée avec le complexe SO_3•Me_3N dans des temps un peu plus longs. A t = 5 min, on observe 82 % du produit *N*-sulfaté **88** et 15 % de produit **91**. Après 20 min, le produit majoritaire est le **91** (73 %) et il ne reste plus que 11 % de produit *N*-sulfaté.

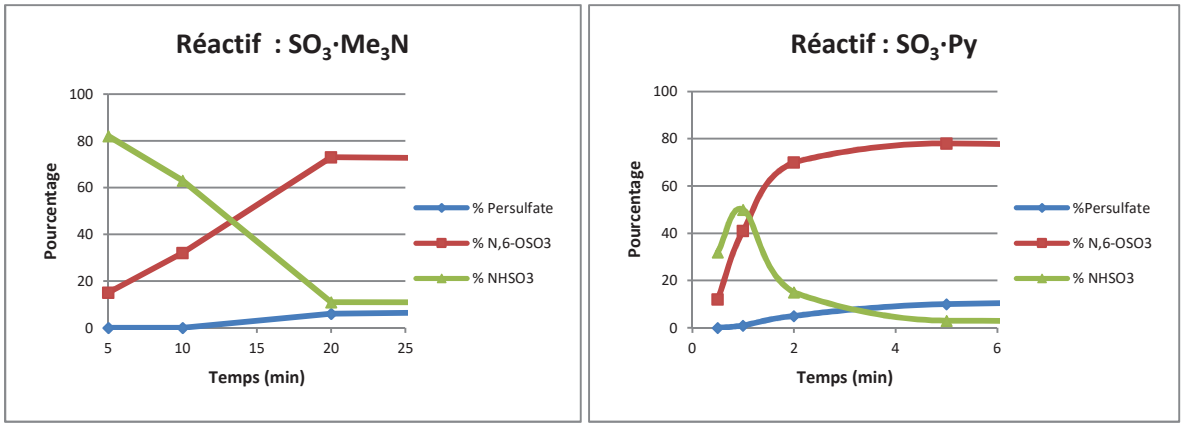


Figure 46 : Etude de la cinétique de sulfatation avec le complexe SO_3•M e_3N (à gauche) et le complexe SO_3•Py (à droite).

D'après le suivi cinétique effectué, la fonction amine est la première à réagir, ce qui est en accord avec la nucléophilie plus grande des amines par rapport aux alcools. Ensuite, a lieu la 6-*O* sulfatation qui est également très rapide puis la sulfatation du 2-OH qui est plus lente quelque soit le complexe utilisé (complexe SO_3•Py ou SO_3•Me_3N). Ce résultat est également en accord avec la littérature et la réactivité des alcools primaires par rapport aux alcools secondaires.[234] Sur le disaccharide, la *N*-sulfonation est donc effectuée en premier suivie de la 6-*O*-sulfatation puis la 2-*O*-sulfatation.

III.3.2 Suivi de la réaction avec du SO_3•Py non lavé

Une fois la cinétique de la réaction comprise, celle-ci a été étudiée en présence de SO_3•Py ayant une activité de 31 % afin de comprendre ce qu'il se passait dans le milieu réactionnel et pourquoi la réaction n'était pas totale. D'après la Figure 47, on peut voir qu'à t = 30 secondes, 60 % du produit est *N*-sulfaté et 35 % est di-SO_3 soit ici, *N*,6-SO_3 **91**. Ces résultats sont en accord avec les observations précédentes. On a bien, en premier lieu, la sulfonation de l'amine libre puis la sulfatation de l'alcool primaire. A t = 5 min, on observe une augmentation du pourcentage de produit di-sulfaté **91** (78 %), une forte diminution de la quantité de produit *N*-sulfaté **88** (2 %), ainsi que la formation de produit trisulfaté **93** (18 %). Ces résultats sont toujours en accord avec ceux observés précédemment. Cependant, à t = 3,5 h, on observe une diminution du pourcentage de produit di-sulfaté (30 %), non pas au profit du produit trisulfaté **93** (1 %), mais au profit du produit **90** portant seulement un sulfate en position 6 (66 %).

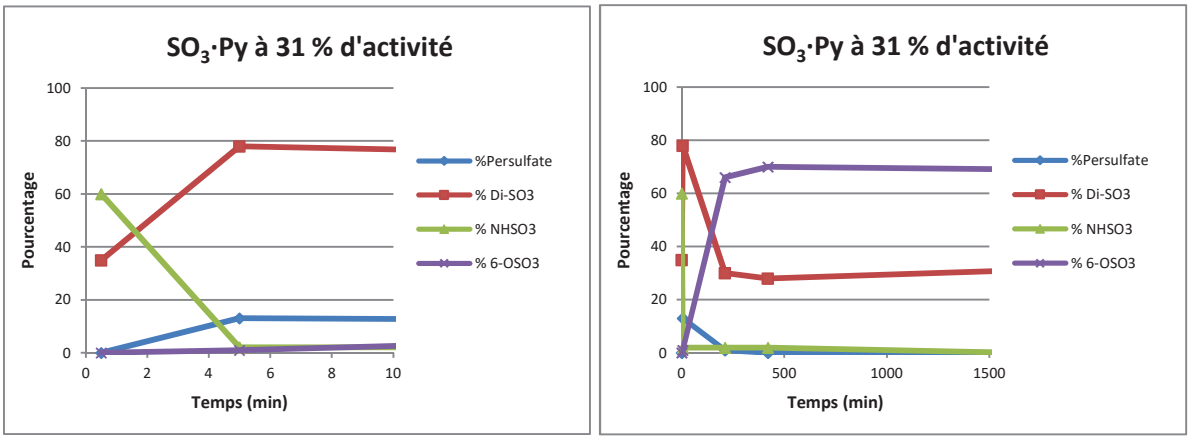


Figure 47 : Suivi cinétique de la réaction avec du SO_3•Py à 31 % d'activité (A gauche : suivi entre 0 et 5 min, à droite : suivi entre 0 et 24h).

Ces résultats indiquent donc qu'au cours de la réaction, le produit *N*,6-*O*SO_3 qui s'est formé a été dé-*N*-sulfaté. En effet, la dégradation du complexe SO_3•Py avec l'eau forme l'ion hydrogénosulfate (HSO_4^-), ce qui amène à l'hydrolyse du *N*-sulfate qui est une fonction sensible à l'acidité du milieu. Le produit di-sulfaté résultant serait alors du produit **89** 6-*O*-,2-*O*-sulfaté, les *O*-sulfates étant moins sensibles aux conditions acides. Ces résultats se confirment à t = 7 h et t = 24 h où la réaction a atteint un équilibre.

Le suivi cinétique de la N,O-sulfonation a permis de montrer que l'amine qui est la fonction la plus réactive est la première à être sulfatée, suivi de l'alcool le plus réactif (alcool primaire en position 6 de la glucosamine) puis de l'alcool en position 2 du résidu iduronique. Cet ordre de réaction est le même quelque soit le réactif utilisé et sa pureté. Cependant, lors de l'utilisation de complexe SO_3•Py moins pur, on observe une dé-N-sulfonation du disaccharide, causée par l'acidité présente dans le réactif, provenant de son hydrolyse avec l'eau.

III.4 *N,O*-sulfonation de l'octasaccharide

Après avoir optimisé les conditions réactionnelles de sulfatation sur le disaccharide, celles-ci ont été testées sur l'octasaccharide **87**$_4$ couramment utilisé au laboratoire. Le suivi réactionnel est également effectué par UPLC et est identique à celui effectué pour le disaccharide. Le temps de rétention de l'octasaccharide *N*,*O*-persulfaté **94** (Figure 49) est de 11,5 min (Figure 48).

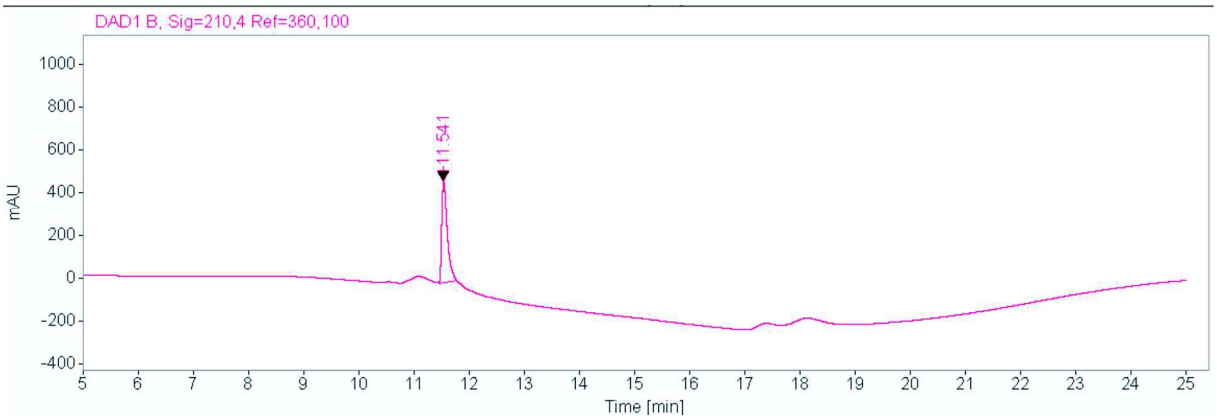


Figure 48 : Chromatogramme obtenu lors de l'analyse UPLC sur colonne pahse inverse C-18 de l'octasaccharide 94.

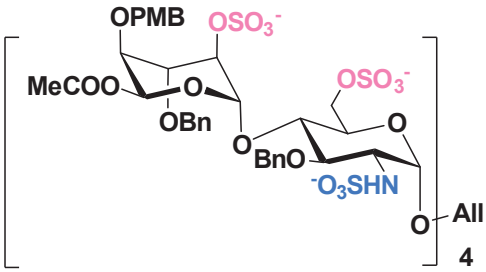


Figure 49 : Octasaccharide 94.

Le temps de réaction étant plus long avec un oligosaccharide plus grand, une optimisation a été effectuée. En effet, à 55 °C (température de réaction habituellement utilisée par le laboratoire), après 24 h de réaction, le taux de conversion n'est que de 68 % lorsque le complexe SO_3•Py est utilisé (Tableau 6, Entrée 1). Lorsque le temps de réaction est allongé à 44 h, un taux de conversion quasiment complet est obtenu quelque soit le réactif (SO_3•Py ou SO_3•Me_3N) (entrée 2 et 3). Afin de diminuer ce temps de réaction, la réaction est effectuée à 100 °C (chauffage thermique classique (bain d'huile) ou chauffage dans un réacteur de synthèse (Monowave)). A cette température, la réaction est quasiment quantitative en 1 h (Tableau 6).

Tableau 6 : Optimisation de la réaction sur l'octasaccharide. 5 équivalents par position à sulfater, [0,3M]. [a]Chauffage thermique. [b]Chauffage dans un réacteur de synthèse.

Entrée	Agent de sulfatation	Température (°C)	Temps de réaction (h)	Rendement UPLC estimé de 94 (%)
1	SO_3•Py	55 [a]	24	68
2	SO_3•Py	55 [a]	44	98
3	SO_3•Me_3N	55 [a]	44	100
4	SO_3•Py	100 [c]	1	99
5	SO_3•M e_3N	100 [c]	1	99

Ensuite, le nombre d'équivalent de complexe utilisé a été optimisé. Avec 5 équivalents de SO_3•Me_3N par position à sulfater, la réaction s'effectue en 1 h à 100 °C (Tableau 7, Entrée 1). Lorsque le nombre d'équivalent est diminué à 3, on obtient une réaction quasiment complète après 1 h 30 de réaction (Entrée 2 et 3), mais si la quantité de réactif est diminuée à 2 équivalents par position, même après 4 h 30 de réaction, la réaction est incomplète (Entrée 4 et 5). On remarque que le mode de chauffage (chauffage thermique ou utilisation d'un réacteur de synthèse) n'a pas d'incidence sur la durée de la réaction et le rendement obtenu.

Tableau 7 : Optimisation du nombre d'équivalent de réactif par position à sulfater pour la sulfatation de l'octasaccharide. [a]Chauffage au réacteur de synthèse. [b]Chauffage thermique.

Entrée	Nbr d'éq de $SO_3 \cdot Me_3N$	Température (°C)	Temps de réaction	Rdt de 94 estimé par UPLC (%)
1	5	100 [b]	1 h	99
2	3	100 [a]	1 h 30	99
3	3	100 [b]	1 h 30	99
4	2	100 [a]	4 h 30	88
5	2	100 [b]	4 h 30	70

IV. Résumé du chapitre

La réaction de sulfatation est connue depuis de nombreuses années et est très utilisée, notamment par les groupes synthétisant des fragments d'HS. La plupart du temps, cette réaction est faite en deux fois : tout d'abord la *O*-sulfatation puis la *N*-sulfonation. Le laboratoire a développée une méthode de *N*,*O*-sulfonation qui permet de s'affranchir de quelques étapes de synthèse. Depuis peu, cette réaction ne donnait plus de résultats reproductibles. Une étude a donc été menée afin de comprendre cette réaction, les paramètres l'influençant pour déterminer des conditions réactionnelles fiables et donnant des résultats reproductibles. Les premiers paramètres étudiés ont montré que la qualité de la pyridine est importante pour avoir un taux de conversion complet. Ainsi, la pyridine doit contenir le moins d'eau possible. Le choix du réactif est également très important. Le SO_3•Py commercial classiquement utilisé s'est révélé être instable, ce qui génère de l'acidité et ne permet pas l'obtention du produit entièrement sulfaté : la dé-*N*-sulfonation a lieu au cours de la réaction. D'autres réactifs plus stables ont été testés et ont montré d'excellents taux de conversion. Le complexe SO_3•Me_3N a donc été choisi comme nouveau réactif. Celui-ci étant plus stable, la réaction est moins rapide. Ensuite, le suivi de la réaction a permis de déterminer la cinétique de sulfatation des différentes fonctions. Ainsi, l'amine de la glucosamine est la première à être sulfatée, suivie de l'alcool en position 6 de la glucosamine puis l'alcool en position 2 de l'acide iduronique. Cette cinétique de sulfatation est valable quelque soit le

réactif utilisé (complexe SO_3•Py ou SO_3•Me_3N). Enfin l'optimisation a été effectuée sur l'octasaccharide de référence du laboratoire. Les temps de réaction étant plus longs (44 h à 55 °C pour un octasaccharide au lieu de 24 h à t.a. pour un disaccharide lors d'une réaction avec SO_3•Me_3N), la réaction a été effectuée à 100 °C avec un chauffage soit classique soit dans un réacteur de synthèse. Quelque soit le mode de chauffage, la sulfatation a été complète en 1 h, avec 5 équivalents de réactif par position à sulfater. Lorsque le nombre d'équivalents a été diminué à 3, il a fallu 1 h 30 pour obtenir une sulfatation complète. A 2 équivalents de réactif, la sulfatation n'est pas complète, même après 4 h 30 à 100 °C.

Chapitre 4

Vers des inhibiteurs covalents d'HSulf2

Afin d'obtenir des inhibiteurs permettant une liaison covalente avec la formylglcyine de HSulf2, nous avons décidé d'introduire deux nouvelles fonctions à la place du sulfamate : une oxyamine et une hydrazide. Ces fonctions sont très utilisées pour la bioconjugaison avec des protéines.[140]

Le groupe de Bertozzi a utilisé l'Alexa Fluor C5-aminoxyacétamide pour le marquage de FGly.[150] Une telle molécule n'atteint pas le site catalytique des sulfatases,[235] un composé plus proche des substrats naturels devraient permettre l'ouverture de la protéine et atteindre le site catalytique.

La synthèse de deux dérivés glucosamine *N*-sulfatés portant soit une fonction oxyamine soit une fonction hydrazide a été réalisée (Figure 50). L'activité inhibitrice de ces composés vis-à-vis d'HSulf2 sera ensuite testée en les comparants au dérivé glucosamine portant le groupement sulfamate.

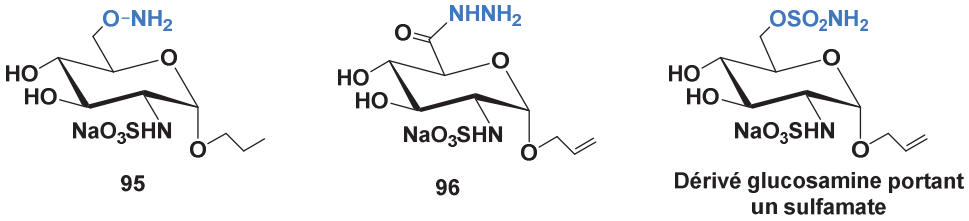


Figure 50 : Dérivés glucosamine, à gauche, le résidu de glucosamine comportant la fonction oxyamine 95 et au milieu, le résidu de glucosamine comportant la fonction hydrazide 96 et à droite, le dérivé glucosamine portant un sulfamate.

I. Synthèse du dérivé glucosamine comportant une fonction oxyamine

Idéalement, la synthèse du monosaccharide comportant la fonction oxyamine devrait ressembler le plus possible à la synthèse du monosaccharide comportant la fonction sulfamate afin d'avoir le moins d'optimisations à faire. La fonction oxyamine comportant un azote nucléophile, celle-ci nécessite la présence d'un groupement protecteur afin de ne pas former de sous-produit lors de l'étape de sulfatation. Un groupement protecteur idéal devrait pouvoir s'installer sur la fonction oxyamine facilement et s'enlever lors de la déprotection des benzyles. Le groupement carboxybenzyle est celui

qui répond à ces critères. En effet, celui-ci est commercial sous la forme oxyamine (Figure 51), ce qui nous permet d'installer l'oxyamine et son groupement protecteur en une seule étape.

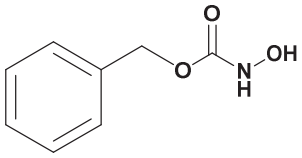


Figure 51 : Réactif N-(Benzyloxycarbonyl)oxyamine commercialement disponible.

Quant à l'enlèvement de ce groupement protecteur, cette réaction est identique à l'enlèvement des éthers de benzyle présent sur le monosaccharide. Une hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène devrait permettre son enlèvement. Cette étape est bien connue du laboratoire et ne devrait pas nécessiter d'optimisation.

I.1 Synthèse du dérivé glucosamine avec la fonction oxyamine protégée par un groupement Cbz

I.1.1 Synthèse de la molécule cible

I.1.1.a Introduction de la fonction oxyamine

L'introduction de la fonction oxyamine protégée s'effectue en trois étapes à partir du monosaccharide de départ **43** (Schéma 68). L'alcool en position 3 de la glucosamine est tout d'abord protégé par un groupement éther de benzyle puis le benzylidène est ouvert de façon régiosélective afin d'avoir le groupement benzyle sur la position 4 et l'alcool primaire **97** (Chapitre 2). Un groupement mésyle est alors introduit sur l'alcool libre[236] afin d'avoir un bon groupement partant **98**, permettant ensuite l'introduction de l'oxyamine protégée **99**.

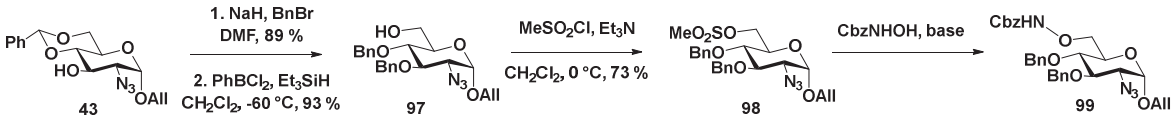


Schéma 68 : Synthèse permettant d'introduire le groupement oxyamine protégé à partir du monosaccharide 43 en trois étapes.

Sur cette suite réactionnelle, l'étape d'introduction de l'oxyamine protégée s'est avéré compliqué et a nécessité une optimisation. L'utilisation de la DBU comme base,[237] quelque soit son nombre d'équivalent, le solvant utilisé ou la température (Entrées 1 et 2, Tableau 8) n'a pas permis l'obtention

du produit voulu. La température du milieu réactionnel ne peut pas être augmentée au dessus de 40 °C car des produits de cycloaddition entre l'azoture et le groupement allyle pourraient se former. Notre choix s'est donc porté sur une base plus forte (NaH), qui a permis de synthétiser la molécule **99** mais avec de faibles rendements (Entrées 3 et 5). L'augmentation de la concentration (Entrée 4), a améliorée faiblement le rendement mais ne permet pas d'augmenter la quantité d'équivalent de base ou d'oxyamine protégée (on obtient alors un milieu réactionnel trop visqueux pour être agité). Une réaction de Mitsunobu a également été tentée afin d'introduire l'oxyamine sur le sucre, mais sans succès, une majorité de produit de départ ayant été récupérée.

Tableau 8 : Optimisation de la réaction d'introduction de l'oxyamine protégée. [a] PD = Produit de départ récupéré en fin de réaction.

Entrée	Base	Eq base	Eq CbzNHOH	Solvant	T (°C)	[C]	Temps	Rendement de 99[a]
1	DBU	3,0	1,5	DCM	TA	0,5 M	18h	86 % PD
2	DBU	1,5	1,5	DMF	40	0,25 M	4h	78 % PD
3	NaH	3,0	1,1	DMF	TA	0,20 M	30h	19 % + 46 % PD
4	NaH	1,1	1,1	DMF	TA	1 M	18h	29 % + 29 % PD
5	NaH	1,5	1,5	DMF	TA	0,5 M	18h	16 % + 56 % PD

A la suite de ces réactions, nous avions assez de produit pour continuer la synthèse, l'optimisation de la réaction n'a donc pas été continuée.

I.1.1.b Fonctionnalisation et déprotection

Une fois la fonction oxyamine protégée introduite sur la molécule, les étapes de déprotection et fonctionnalisation ont été effectuées. Celles-ci sont similaires aux réactions effectuées sur les oligosaccharides (Chapitre 2). L'azoture est d'abord réduit en utilisant du propanedithiol et de la triéthylamine dans le méthanol avec un rendement quantitatif (Schéma 69). L'amine résultante est ensuite *N*-sulfatée en utilisant le complexe SO_3•Py en présence de triéthylamine dans le méthanol. Après une filtration sur colonne d'exclusion stérique afin d'éliminer les sels de pyridinium, le produit est passé sur colonne échangeuse d'ions (de type Bio-Rad Na^+) afin d'être obtenu sous forme sels de sodium.

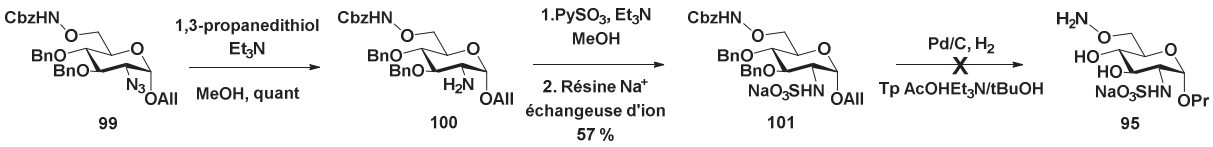


Schéma 69 : Stratégie de synthèse pour obtenir la molécule cible 95 à partir de la molécule 99.

L'étape suivante est l'hydrogénolyse de groupements benzyles et du groupement Cbz. Celle-ci a été effectuée dans les conditions classiques utilisées au laboratoire (20 % $Pd(OH)_2/C$ sous atmosphère d'hydrogène) mais ne nous a pas permis d'obtenir le produit voulu **95**. En effet, lors de la réaction, la liaison N-O est réuite et nous ne retrouvons que l'alcool correspondant **102** (Schéma 70).

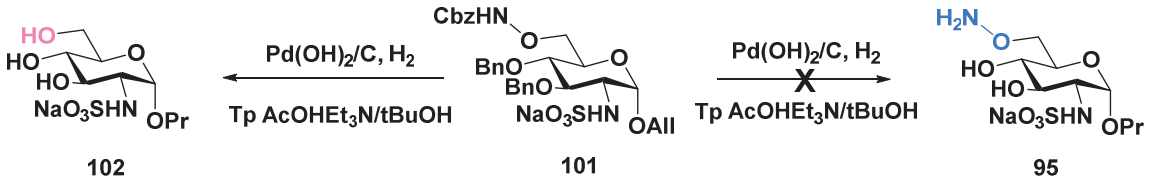


Schéma 70 : Produit obtenu lors de l'hydrogénolyse des groupements OBn et Cbz en utilisant du Palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène.

Un second essai utilisant un palladium sur charbon moins chargé (10 % Pd/C sous H_2) s'est également soldé par un échec. Nous avons donc décidé d'optimiser cette réaction sur une brique glucose modèle. Cela permettra également l'optimisation de l'introduction du groupement oxyamine protégé.

I.1.2 Optimisation sur une molécule modèle

I.1.2.a Introduction de l'oxyamine protégée

Nous avons choisi comme brique modèle un glucose protégé **103** disponible en quantité suffisante au laboratoire (Schéma 71). Sur ce sucre, le groupement benzylidène a d'abord été enlevé à chaud dans une solution aqueuse acide,[238] puis un groupement tosyle a été introduit sur l'alcool libre en position 6, utilisant les même conditions que lors de l'introduction du groupement mésyle. Aucune trace de produit comportant le tosyle sur l'alcool en position 4 n'a été observé. Le groupement tosyle a été choisi afin de déterminer l'influence du groupement partant lors de la réaction de substitution par l'oxyamine protégée. Cette dernière réaction a ensuite été optimisée.

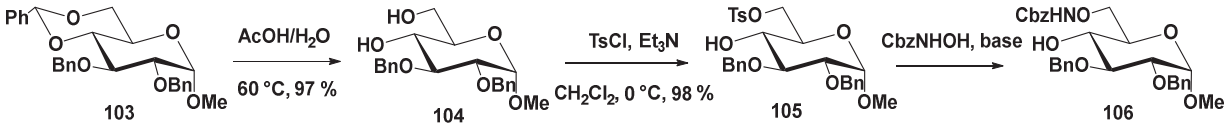


Schéma 71 : Stratégie de synthèse permettant l'introduction de l'oxyamine sur la brique modèle.

En premier lieu, les meilleures conditions réactionnelles trouvées lors de la précédente optimisation (1,5 éq NaH, 1,1 éq CbzNHOH à 1 M dans le DMF) ont été reproduites avec cette brique modèle (Entrée 1, Tableau 9). Le rendement de la réaction effectuée avec le tosyle (26 %) n'a pas été amélioré par rapport à celui obtenu avec le mésyle (29 %). Le changement de groupe partant ne semble pas

avoir d'influence sur la réaction. Ensuite, la concentration a été diminuée (de 1 M à 0,2 M) pour permettre l'augmentation des quantités en base et oxyamine protégée introduites dans le milieu réactionnel (Entrée 2 et 5). Ces nouvelles conditions ont permis d'augmenter le rendement de la réaction à 69 % avec 5 équivalents mais celui-ci chute à 30 % avec 3 équivalents, illustrant l'importance de l'ajout des réactifs en excès. Cependant, la réaction n'est toujours pas totale, du produit de départ est retrouvé après purification. Afin d'augmenter le taux de conversion, l'ajout d'additifs permettant de mieux solvater l'anion de l'oxyamine formé par déprotonation par NaH, a été étudiée (Entrées 3 et 4). La présence d'éther couronne ou d'iodure de terbutylammonium dans le milieu réactionnel n'a pas permis d'augmenter le rendement de la réaction.

Tableau 9 : Optimisation de l'introduction de l'oxyamine protégée sur la brique modèle. Toutes ces réactions ont été effectuées en utilisant le NaH comme base, le DMF comme solvant, à température ambiante, pendant 18 h. [a]PD = Produit de départ.

Entrée	Éq base	Éq CbzNHOH	[C]	Additif	Rendement de 106[a]
1	1,5	1,1	1,0 M	-	26 % + 68% PD
2	5,0	5,0	0,2 M	-	69 % + 13 % PD
3	5,0	5,0	0,2 M	18-Ether-6	68 % + 13% PD
4	5,0	5,0	0,2 M	TBAI	61 % + 20 % PD
5	3,0	3,0	0,2 M	-	30 % + 54 % PD

L'optimisation effectuée sur cette réaction d'introduction de l'oxyamine protégée a permis d'obtenir un rendement de 69 %, avec récupération de 13 % de produit de départ.

I.1.2.b Déprotection de la fonction oxyamine sur le modèle glucose

Une fois la fonction oxyamine protégée introduite sur la brique modèle, la dernière étape est l'optimisation de l'hydrogénolyse (Schéma 72). Celle-ci a été effectuée à partir de différents protocoles de la littérature.

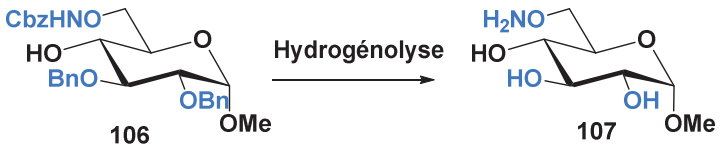


Schéma 72 : Optimisation de l'étape d'hydrogénolyse des groupements OBn et Cbz sur la brique modèle.

Plusieurs publications ont montré que l'on pouvait enlever un groupement éther de benzyle ou carboxybenzyle porté par une oxyamine, sans réduction de cette fonction, dans les conditions standard (H_2, Pd/C)[239–242] ou avec ajout d'additifs[243,244] comme une base (DABCO) ou de l'acide (HCl) (Tableau 10, Entrées 3 et 4). Dans notre cas, ces conditions réactionnelles n'ont pas permis d'éviter la

réduction de la liaison « N-O » et seul le produit ayant un alcool en position 6 a été retrouvé. Nous nous sommes ensuite penchés sur des protocoles utilisant le formiate d'ammonium ($HCOONH_4$) comme source d'hydrogène afin de déprotéger la fonction oxyamine : [245,246] en présence de palladium sur charbon, le formiate d'ammonium se décompose sous forme de dihydrogène, de dioxyde de carbone et d'ammoniac (Équation 3). Le dihydrogène formé s'adsorbe sur le palladium et peut ensuite réagir avec le groupement Cbz de notre molécule.

$$HCO_2NH_4 \xrightarrow{Pd/C} H_2 + CO_2 + NH_3$$

Équation 3 : Décomposition du formiate d'ammonium en présence de palladium sur charbon pour former du dihydrogène, du dioxyde de carbone et de l'ammoniac.

Le dihydrogène est donc introduit dans le milieu réactionnel de façon beaucoup plus lente et catalytique et permet une réaction plus douce que celle utilisant une atmosphère saturée en gaz. Cependant, ces protocoles permettent uniquement la déprotection de l'oxyamine **108**. Les groupements éthers de benzyle sont toujours présents en fin de réaction (Schéma 73).

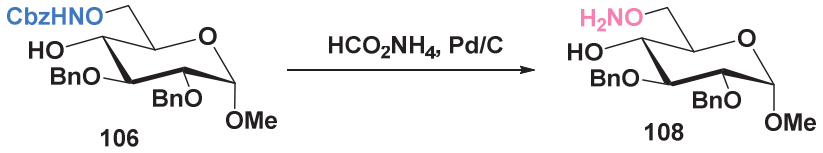


Schéma 73 : Déprotection du groupement Cbz avec le formiate d'ammonium, les groupements éthers de benzyle restent en place.

Une première expérience de déprotection avec 1,5 équivalents de formiate d'ammonium, 50 % en poids de Pd/C dans un mélange DMF/H_2O (v/v : 8/1) a montrée que l'on obtenait partiellement la fonction voulue (23 %) (Tableau 10, Entrée 1), le reste correspondant à l'oxyamine réduite **109** (Figure 52). En contrôlant le pH de la solution par ajout de tampon de formiate d'ammonium, afin que celle-ci soit acide (tampon à pH = 4 par ajout d'acide formique), nous avons réussi à augmenter le rendement du produit voulu à 33 % (Entrée 5). Cependant, lorsque la concentration du tampon a été augmentée, la réduction de l'oxyamine est totale (Entrée 6). Cela pourrait être dû au fait que le tampon se dégrade au cours de la réaction pour former de l'hydrogène et de l'ammoniac et donc, en présence plus importante de tampon, plus d'ammoniac serait formé, le pH de la réaction serait donc plus basique. Afin de remédier à cela, le tampon a été changé pour de l'acétate d'ammonium qui ne devrait pas se dégrader au cours de la réaction (Entrée 7). Un nouveau co-solvant a également été testé (Entrée 8). Ces changements ne se sont pas révélés être bénéfique, puisque le rendement du produit avec l'oxyamine tombe à 0 %. Afin d'avoir un milieu acide sans utilisation de tampon, de l'acide formique pur a été introduit en excès par rapport au monosaccharide (Entrée 9), cet essai s'est également soldé par un échec. Enfin, un dernier essai a été tenté en reprenant les conditions qui ont donné le meilleur

résultat (Entrée 5) mais cette fois-ci en augmentant la proportion en eau, afin d'augmenter la proportion en tampon (Entrée 10). Cela n'a également pas été concluant.

Tableau 10 : Optimisation de la réaction d'hydrogénolyse

Entrée	Quantité Pd/C	Source H_2	Éq H_2	Additif	Solvant	Rendement 112[a]
1	50 % wt	HCO_2NH_4	1,5	-	DMF/H_2O : 8/1	23 %
2	50 % wt	HCO_2NH_4	20	-	DMF/H_2O : 8/1	0 %
3	7 mg/mL	H_2	-	1 éq HCl	DMF/H_2O : 8/1	0 %
4	3 % wt	H_2	-	2 mol % DABCO	DMF/H_2O : 8/1	0 %
5	50 % wt	HCO_2NH_4	1,5	Tp HCO_2NH_4 0,1 M	DMF/H_2O : 8/1	33 %
6	50 % wt	HCO_2NH_4	1,5	Tp HCO_2NH_4 1,5 M	DMF/H_2O : 8/1	0 %
7	50 % wt	HCO_2NH_4	3	Tp $CH_3CO_2NH_4$ 1M	DMF/H_2O : 8/1	0 %
8	50 % wt	HCO_2NH_4	3	Tp $CH_3CO_2NH_4$ 1M	tBuOH/H_2O : 8/1	0 %
9	50 % wt	HCO_2NH_4	3	4,5 éq HCOOH	DMF/H_2O : 8/1	0 %
10	50 % wt	HCO_2NH_4	3	Tp HCO_2NH_4 0,1 M	DMF/H_2O : 1/1	0 %

[a] : Rendement du produit possédant l'oxyamine estimé par RMN ^{13}C, le reste correspondant au produit comportant l'alcool en position 6.

Afin de s'affranchir des purifications lors de cette optimisation, les bruts réactionnels ont été analysés par RMN ^{13}C afin de déterminer approximativement le ratio de produit comportant la fonction oxyamine **108** et de produit avec l'alcool en 6 **109** (Figure 53). La présence du produit **108** a été confirmée par spectrométrie de masse et l'attribution des signaux ^{13}C a été effectuée grâce une analyse RMN HSQC.

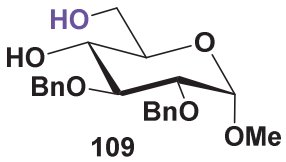


Figure 52 : Molécule 109 obtenue lors de la déprotection de l'oxyamine avec le formiate d'ammonium.

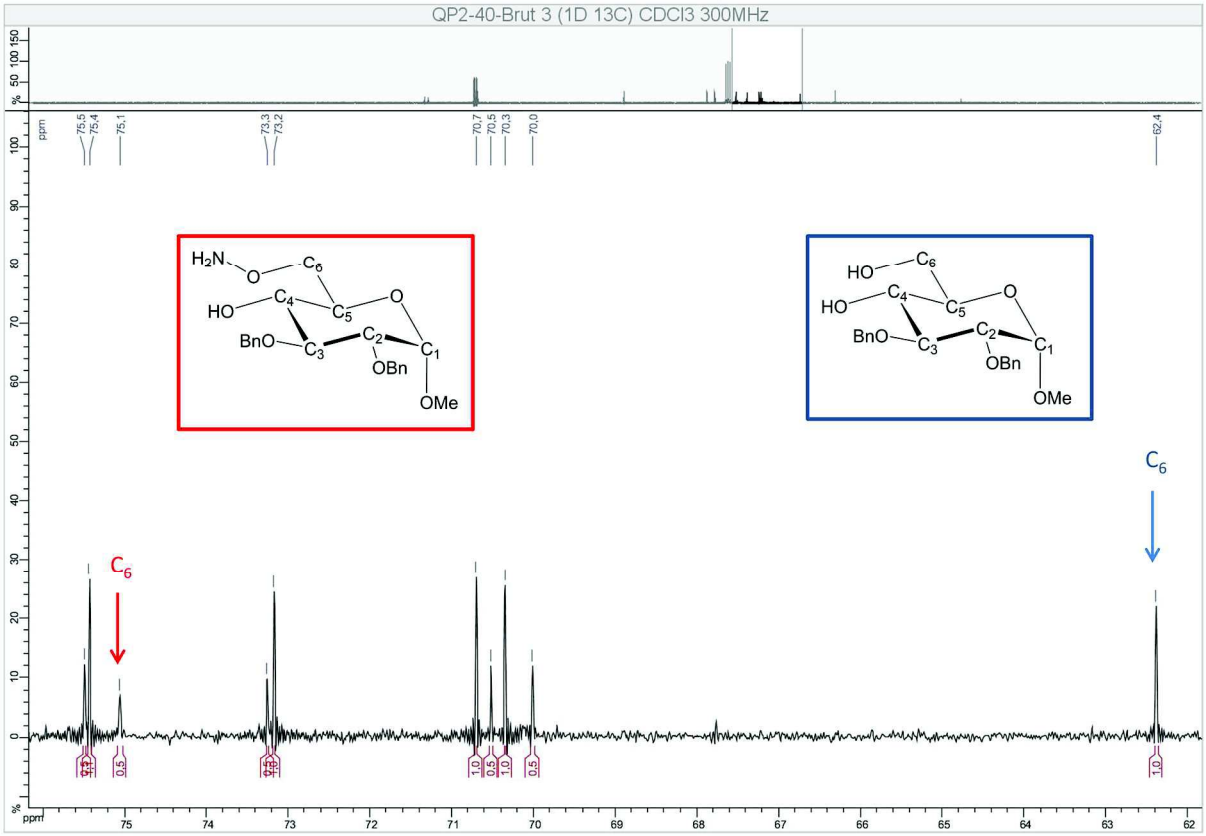


Figure 53 : Spectre RMN ^{13}C du brut réactionnel de la réaction de déprotection de la fonction oxyamine (Entrée 5, Tableau 3). L'intégration du signal du C_6 ayant l'alcool 109 est fixée à 1 et le signal du C_6 ayant l'oxyamine est intégré afin de déterminer le ratio des deux produits. Ici le signal du produit comportant l'oxyamine 108 intègre pour 0,5, donc le ratio entre les deux produits est de 1 pour 3, soit 33% de rendement pour le produit contenant la fonction oxyamine.

Aucuns de ces essais n'a permis de déprotéger l'oxyamine avec un bon rendement. De plus, comme dit précédemment, cette méthode ne permet pas l'hydrogénolyse des groupements protecteurs benzyles éthers présents sur la molécule. Parallèlement à ces essais, différentes méthodes d'oxydation des groupements éthers de benzyle par des méthodes alternatives au palladium sur charbon et au dihydrogène ont été testées et n'ont pas fonctionné. En effet, l'oxydation par $NaBrO_3$ a conduit à une mélange de produit partiellement débenzylés mais avec rupture de la liaison N-O.[247] Et l'oxydation par le DMDO n'a conduit qu'à des mélanges de produits partiellement déprotégés quelque soit le nombre d'équivalents introduits (2 éq/OBn et 5 éq/OBn).

Face à cette incapacité à enlever les groupements protecteurs carboxybenzyle et éther de benzyle, tout en gardant la fonction oxyamine intacte, nous avons décidé de changer de groupement protecteur de l'oxyamine.

I.2 Synthèse du dérivé glucosamine avec la fonction oxyamine protégée par un groupement Phtalimide

I.2.1 Choix du groupement protecteur

Suite à l'impossibilité d'obtenir la fonction oxyamine lorsque celle-ci est protégée avec un groupement carboxybenzyle, un autre groupement protecteur doit être trouvé. Le choix de celui-ci doit prendre en compte les paramètres suivants :

- Il ne doit pas s'enlever grâce à une hydrogénolyse,
- Il ne doit pas s'enlever en conditions acides (risque de perdre le *N*-sulfate, sensible aux conditions acides),
- Il doit être résistant aux conditions basiques (présence de triéthylamine lors de la réduction de l'azoture en amine primaire),

Quelques groupements protecteurs répondent à ces critères : les groupements photolabiles, le groupement Teoc, le groupement Phtalimide … Ce dernier est un groupement protecteur très utilisé dans la littérature pour introduire et protéger la fonction oxyamine.[248–250] En effet, celui-ci est disponible commercialement sous la forme *N*-hydroxyphtalimide (Figure 54) et est généralement introduit par une réaction de Mitsunobu, ce qui est compatible avec notre molécule qui comporte un alcool libre en position 6 après déprotection du groupement benzylidène.

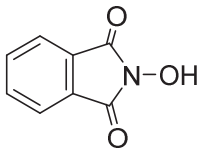


Figure 54 : *N*-hydroxyphtalimide commercialement disponible.

I.2.2 Stratégie de synthèse

Dans l'optique d'utiliser ce nouveau groupement, son introduction par réaction de Mitsunobu a d'abord été testée sur un sucre modèle glucose protégé **110** (Schéma 74). La réaction a donnée 67 % de rendement.

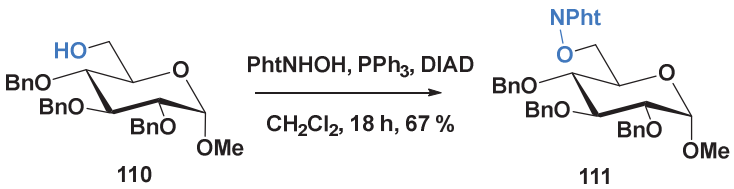


Schéma 74 : Introduction du groupement phtalimide par réaction de Mitsunobu.

Cette molécule **111** a ensuite été soumise aux conditions de déprotection par hydrogénolyse (H_2, Pd/C) afin de déterminer si la liaison N-O allait résister comme vue dans la littérature, avec un groupement succinimide à la place du groupement phtalimide.[239] Dans notre cas, nous avons observé la rupture de la liaison N-O. Compte tenu des difficultés rencontrées lors de l'hydrogénolyse du groupement Cbz et des groupements OBn sur notre molécule cible, nous avons fait le choix de ne pas protéger les alcools libres présents. La nouvelle synthèse de notre molécule se fera donc à partir du même monosaccharide de départ **43**, mais cette fois-ci, l'alcool en position 3 restera libre et le groupement benzylidène sera hydrolysé afin d'obtenir les alcools en position 4 et 6 libres (Schéma 75).[186] La présence de ces deux alcools libres (en position 3 et 4) lors de la réaction de Mitsunobu ne devrait pas poser de problème, l'alcool en position 6 étant moins encombrée. Une telle réaction avec des alcools libres a déjà été réalisée dans la littérature et a donné de bons rendement.[251]

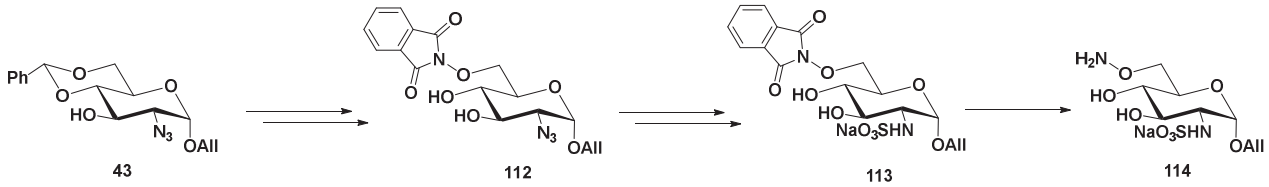


Schéma 75 : Stratégie de synthèse du monosaccharide comportant l'oxyamine avec un groupement protecteur phtalimide.

Par la suite, la réduction de l'azoture en amine primaire, suivie de la *N*-sulfatation de celle-ci puis de l'enlèvement du groupement phtalimide mèneront à notre molécule cible **114**.

I.2.3 Optimisation de la réaction de Mitsunobu

Le benzylidène du composé **43** a d'abord été hydrolysé en milieu acide (résine H^+) dans un mélange dicholorométhane/méthanol afin d'obtenir le monosaccharide avec les alcools libres en position 4 et 6 (Schéma 76).[186] Ensuite, une première réaction de Mistunobu a été effectuée selon les conditions vues dans la littérature (Schéma 76) (Tableau 11, Entrée 1).[251]

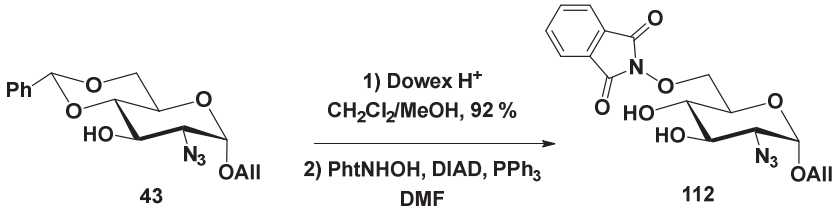


Schéma 76 : Hydrolyse du benzylidène sur le composé 43 permettant d'obtenir l'alcool primaire libre afin de pouvoir introduire l'oxyamine protégée par une réaction de Mitsunobu.

La comparaison des spectres RMN ^{13}C du produit de départ (en vert) et du produit obtenu (en noir) (Figure 55) montre un changement du signal du C_6 de 62,6 ppm à 78,5 ppm. Les changements de déplacement chimique des signaux des C_3 et C_4 (72,5 ppm à 72,7 ppm pour C_3 et 72,2 ppm à 72, 5 ppm pour C_4) étant minime, on peut en déduire que la réaction a bien donné le produit portant le groupement oxyamine protégé sur l'alcool primaire en position 6.

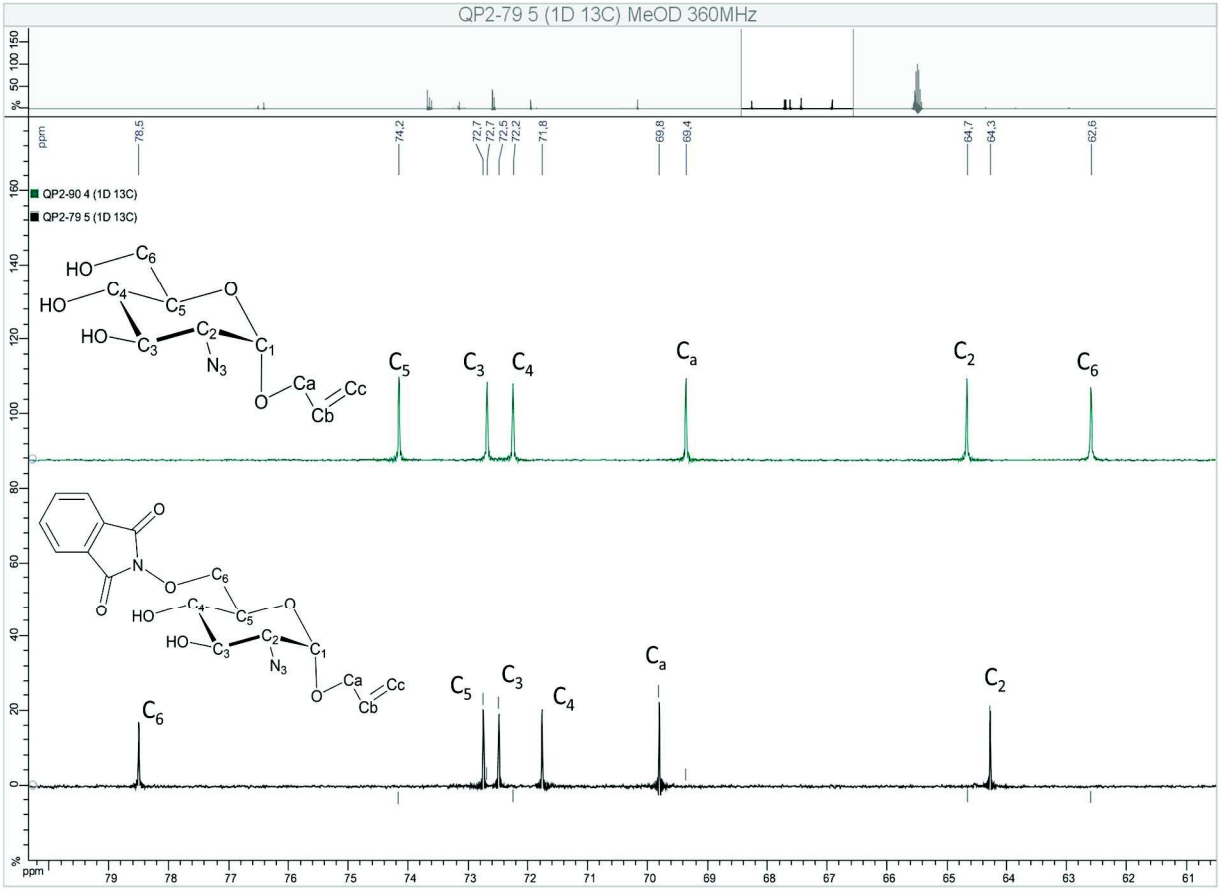


Figure 55 : Spectre RMN 13C du produit de départ (en vert) et du produit obtenu (en noir) après la réaction de Mitsunobu.

Cependant, le produit est contaminé par une grosse quantité d'oxyde de triphénylphosphine qui ne peut pas être enlevé par purification sur colonne de silice. Afin de s'affranchir de cette impureté, de la triphénylphospine sur résine a été utilisée, avec les mêmes conditions de réaction que précédemment (Tableau 11, Entrée 2). Ce polymère ajouté en solution a rendu le milieu réactionnel très compliqué à agiter et une dilution a été nécessaire pour permettre le bon déroulement de la réaction. Ces conditions réactionnelles n'ont pas permis d'obtenir le produit souhaité, seulement du produit dégradé a été retrouvé. Un second essai avec le triphénylphosphine sur résine a été effectué, cette fois-ci en diminuant les quantités de réactifs ajoutés afin de garder un milieu réactionnel concentré (Entrée 3). Uniquement du produit de départ a été récupéré de cette réaction. Même si la triphénylphosphine sur résine semblait être une bonne solution pour obtenir des composés propres en fin de réaction, sa

réactivité semble être beaucoup moins élevée et ne permet pas d'obtenir le produit désiré. Le groupe de Weix a montré qu'une précipitation de l'oxyde de triphénylphosphine avec du chlorure de zinc (II) dans un solvant polaire permettait d'enlever cette impureté par filtration.[252] Une nouvelle réaction de Mitsunobu a donc été effectuée dans les conditions permettant l'obtention du produit (Entrée 4). Après séchage du brut réactionnel, celui-ci a été dilué dans de l'éthanol et du chlorure de Zinc (II) a été ajouté selon les conditions décrites dans la publication. La précipitation d'un solide blanc a bien été observée. La solution a été filtrée, concentrée puis purifiée sur colonne de silice. Cette méthode a permis d'obtenir 64 % de produit pur et une autre fraction de produit avec encore une petite quantité d'oxyde de triphénylphosphine.

Tableau 11: Optimisation de la réaction de Mitsunobu.

Entrée	Eq DIAD et PPh_3	Eq PhtNOH	[C] (mol/L)	Forme de PPh_3	Purification	Rendement de 112 pur
1	2,7	2,5	0,1	Solide	2 colonnes de silice	58 %
2	2,7	2,5	0,05	Sur résine	Filtration de la résine	0 %
3	1,2	1,2	0,1	Sur résine	Filtration de la résine	0 %
4	2,5	2,7	0,1	Solide	Précipitation avec $ZnCl_2$ puis colonne de silice	64 %

L'optimisation de la réaction de Mitsunobu et son traitement a permis d'obtenir le produit désiré avec une bonne pureté, ce qui nous permet de continuer la synthèse de notre molécule cible.

I.2.4 Optimisation de la réduction de l'azoture

L'étape suivante est la réduction de l'azoture en amine primaire. Pour ce faire, nous utilisons les conditions réactionnelles bien connues au laboratoire (Schéma 77).

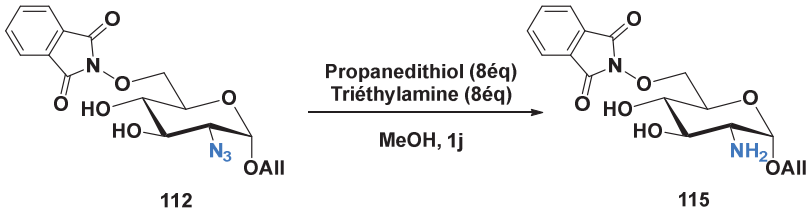


Schéma 77 : Réduction de l'azoture par du propanedithiol avec de la triéthylamine.

Cependant, après réaction et purification sur colonne de silice, l'analyse RMN ne nous permet pas de déterminer si le produit voulu est présent car le spectre comporte beaucoup de signaux, indiquant la présence d'un mélange. L'analyse de l'échantillon par spectroscopie de masse (Figure 56) nous permet d'identifier le produit voulu (symbolisé par un rond jaune en haut du pic), mais confirme également la présence d'autres molécules dont une issue de l'ouverture du groupement phtalimide par de l'eau.

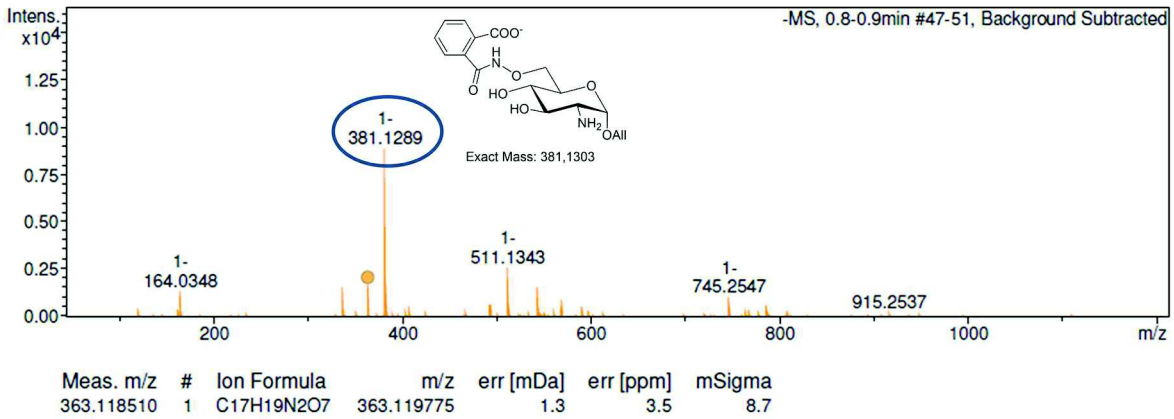


Figure 56 : Spectre obtenu par analyse en spectrométrie de masse haute résolution mode négatif, après réduction de l'azoture et purification sur silice. Le produit 115 est repéré par un rond jaue en haut du pic. On remarque également la présence de produit issu de l'ouverture du groupement phtalimide.

Même si l'origine de cette eau est inconnue puisque la réaction s'effectue en milieu anhydre et que la purification s'est faite avec des solvants organiques, nous avons pu constater que le groupement phtalimide n'était pas si résistant que nous le pensions. La littérature fait également référence à cela puisqu'une publication de Weigel en 1991 évoque la fragilité de ce groupement protecteur face aux bases et aux nucléophiles. [253]

I.2.4.a Réduction de l'azoture par réaction de Staudinger

Étant donné la fragilité du groupement phtalimide, nous avons décidé de changer de conditions réactionnelles pour la réduction de l'azoture et de l'effectuer par la réaction de Staudinger. Habituellement, cette réaction n'a pas de bons résultats avec nos oligosaccharides car la position à réduire est relativement encombrée, tout comme la triphénylphosphine. Pour palier à cela, la n-tributylphosphine est utilisée dans un mélange THF/H_2O avec 1,6 équivalents d'hydroxyde de sodium afin d'hydrolyser l'iminophosphorane résultant (Schéma 78).

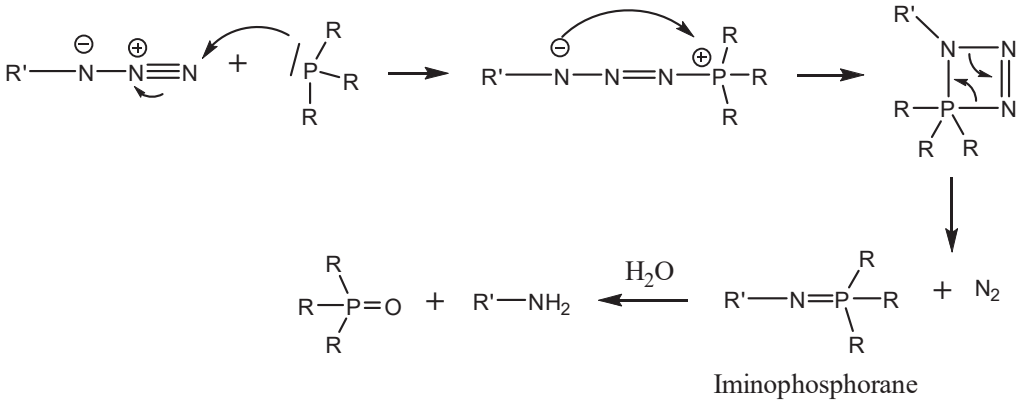


Schéma 78 : Mécanisme de la réaction de Staudinger.

Afin de ne pas dégrader le produit par purification, le brut réactionnel a directement été analysé en spectroscopie de masse. Le spectre correspondant (Figure 57) montre un mélange de plusieurs produits dont certains non identifiés. Parmi tous ces composés, on constate la présence du produit désiré (symbolisé par un rond jaune en haut du pic), du produit issu de l'ouverture partielle du groupement phtalimide et du produit issu de la déprotection de ce groupement. La présence d'hydroxyde de sodium même en faible quantité provoque donc l'ouverture du phtalimide.

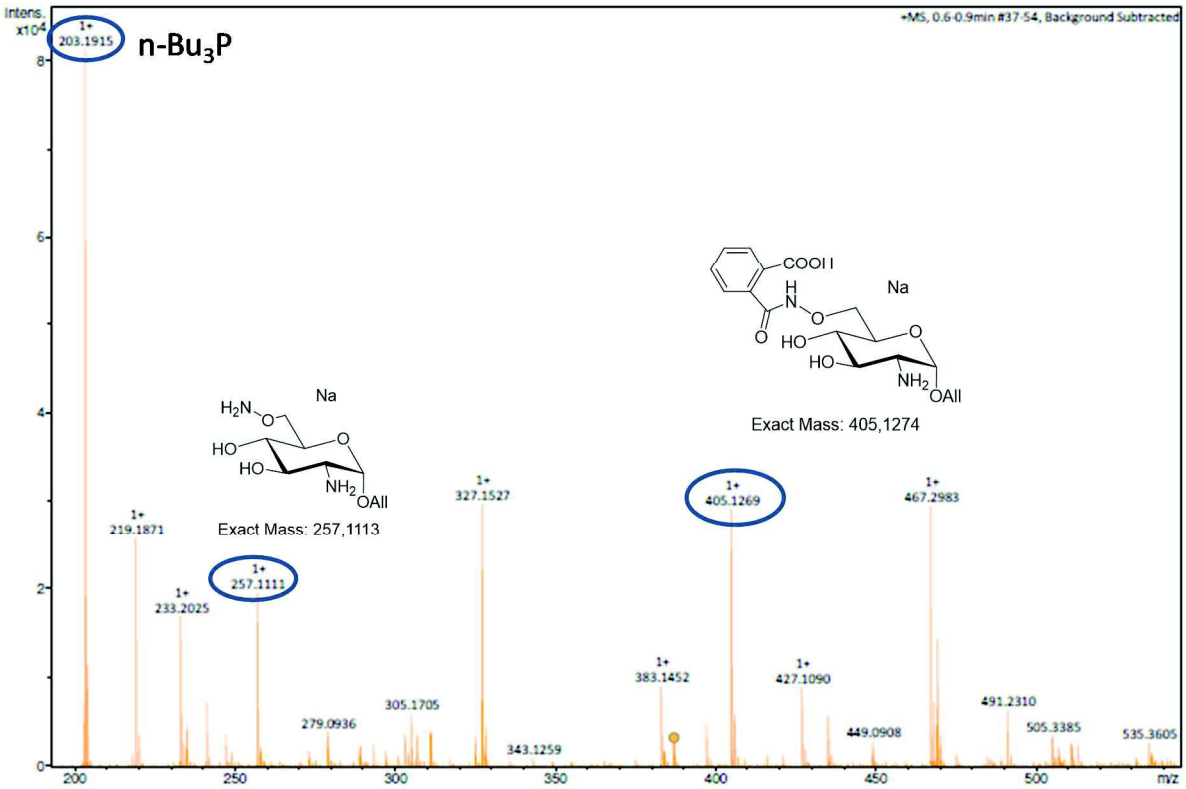


Figure 57 : Spectre obtenu par analyse en spectrométrie de masse haute résolution mode positif, de la réduction de l'azoture avec la tributyl-phosphine et NaOH.

Cependant, ce résultat nous montre que la réaction de réduction a bien fonctionné puisqu'aucune trace de produit ouvert ou partiellement ouvert avec l'azoture n'a été détectée. La réaction de Staudinger avec le n-tributylphosphine semble donc être réussie. Un second essai est donc effectué, cette fois en n'utilisant aucune base (Schéma 79).

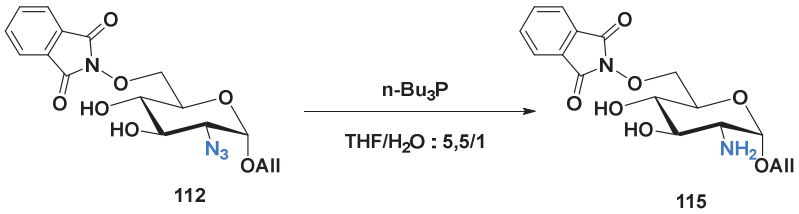


Schéma 79 : Réaction du Staudinger effectuée sans base.

Toujours dans un souci d'éviter trop de manipulations et donc de dégradation du produit, le brut réactionnel est directement analysé par spectrométrie de masse. La Figure 58 nous montre que la réaction a permis d'obtenir le bon produit (symbolisé par des ronds jaunes en haut des pics) mais l'on observe également la présence d'autres molécules dont une avec le groupement phtalimide ouvert par du méthanol. Aucune trace de méthanol n'a été utilisée pendant la réaction, mais ce solvant est utilisé lors de l'analyse des échantillons de masse. Une purification utilisant une phase réverse C-18 a été faite pour tenter d'isoler le bon produit, mais celui-ci ne semble pas s'accrocher sur la silice greffée C-18.

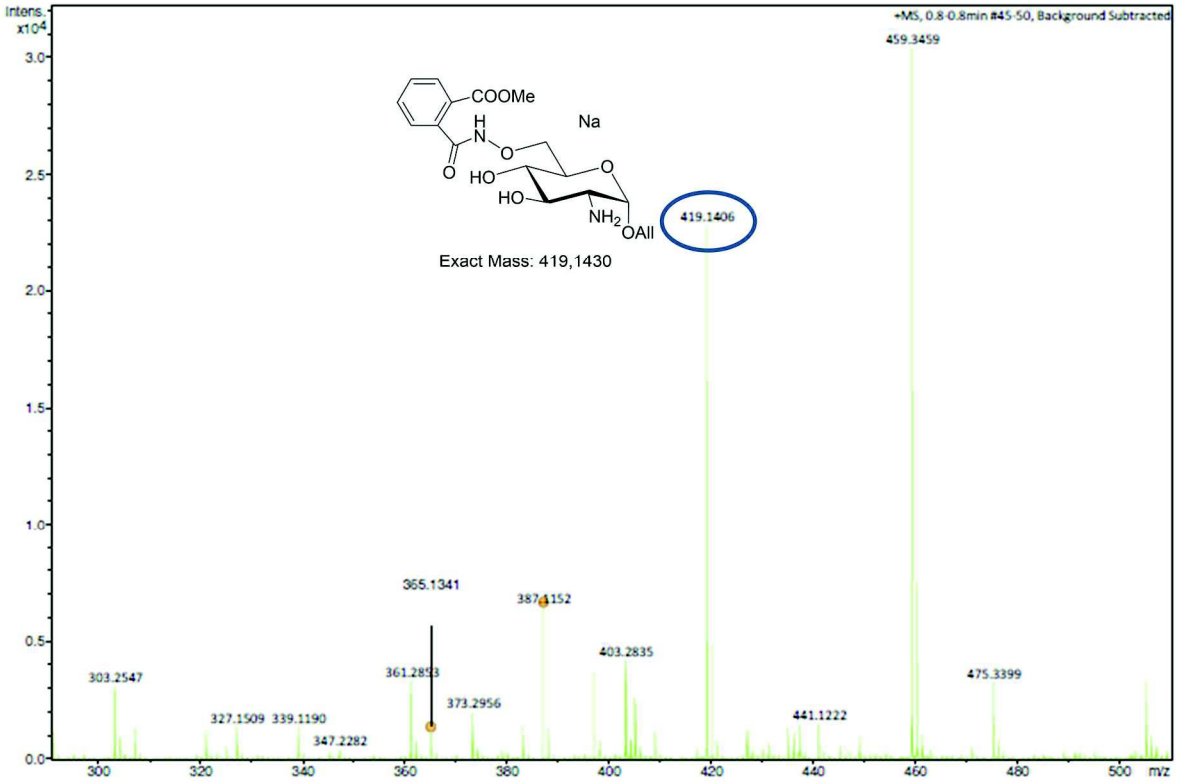


Figure 58 : Spectre obtenu par analyse en spectrométrie de masse haute résolution mode positif après la réduction de l'azoture par le n-tributyle phosphine.

Face à ces problèmes d'analyse (la spectrométrie de masse dégrade notre produit et il est aussi possible que celui-ci se dégrade lors de la concentration par évaporateur rotatif avec un bain à 30 °C), la réaction a été réalisée dans un mélange de solvant deutéré en tube RMN afin de pouvoir la suivre et comprendre ce qu'il se passe.

I.2.4.b Suivi RMN de la réaction de Staudinger

Les conditions réactionnelles utilisées précédemment (n-Bu_3P, THF/H_2O) ont été reproduites en utilisant des solvants deutérés pour permettre le suivi RMN.

Après une nuit à température ambiante, on constate que le signal du proton en position 2 du résidu glucosamine s'est déplacé de 3,97 ppm à 3,44 ppm indiquant que la réaction de réduction de l'azoture est complète (Figure 59). On observe également que le produit semble n'avoir pas subi de dégradation au cours de la réaction, le spectre RMN ne montrant pas d'ouverture importante du phtalimido.

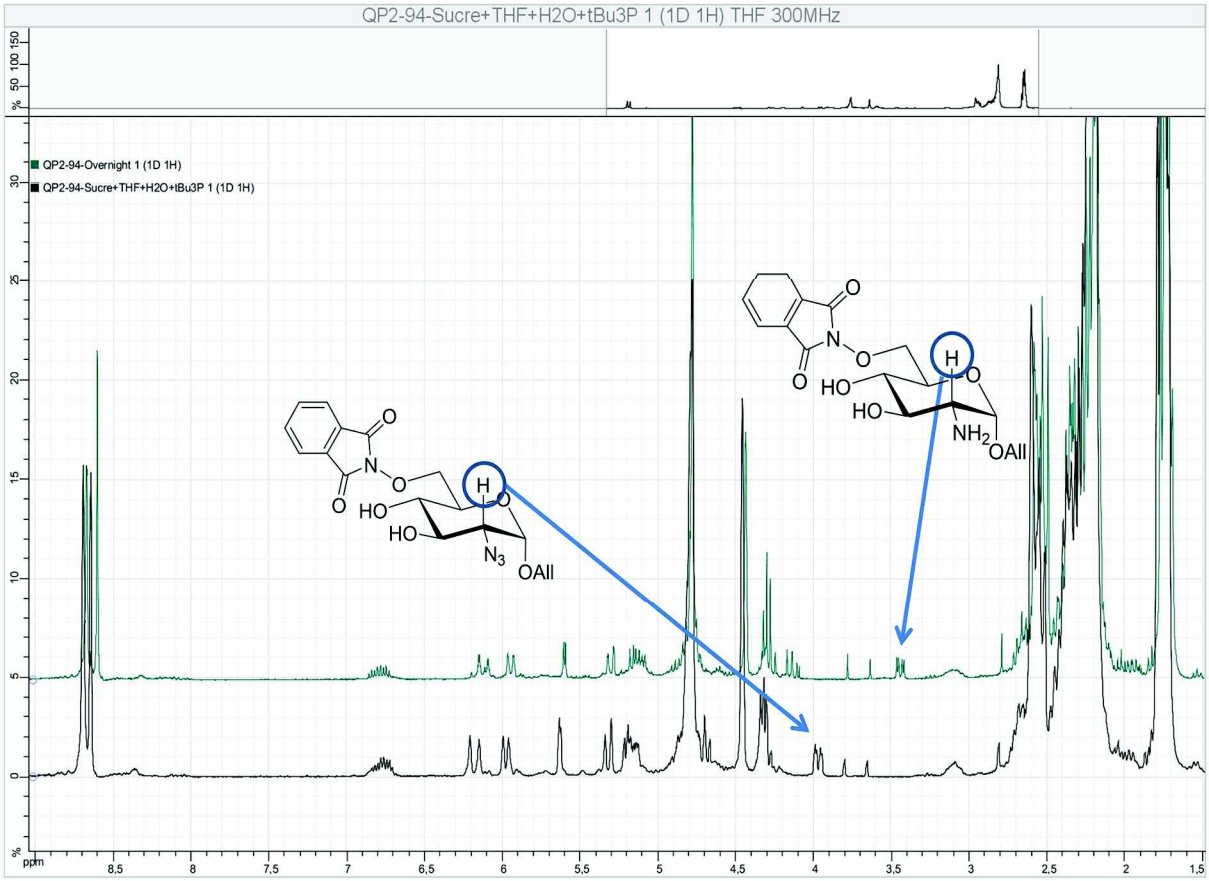


Figure 59 : Suivi RMN de la réaction de Staudinger effectuée dans un mélange de THF_{d8}/D_2O (en noir, le spectre RMN à t = 0, en vert le spectre RMN après une nuit à température ambiante sous agitation magnétique). On remarque un changement du déplacement chimique de l'hydrogène en position 2 de la glucosamine de 3,97 ppm à 3,44 ppm.

I.2.4.c Suivi RMN de la N-sulfatation

Encouragé par ce résultat, nous avons alors décidé d'effectuer la réaction de *N*-sulfatation toujours dans un tube RMN. Habituellement, cette réaction se fait dans l'eau ou le méthanol, en fonction de la solubilité du produit à sulfater, avec 5 équivalents de complexe SO_3•Py et 10 équivalents de triéthylamine afin de neutraliser l'acidité générée par la réaction ainsi que par la dégradation du complexe par l'eau ou le méthanol. Suite à l'optimisation effectuée sur la réaction de sulfatation, le complexe SO_3•Me_3N a été utilisé. Afin de limiter le nombre de composés et leur quantité dans le

milieu réactionnel, la réaction a été effectuée avec seulement 2 équivalents de complexe SO_3•Me_3N et seulement 1 équivalent de K_2CO_3 afin de neutraliser l'ion hydrogénosulfate formé (Équation 4) (Schéma 80).

$$\text{Monosaccharide-}NH_2\ (1\ \text{éq}) + SO_3.Me_3N\ (2\ \text{éq}) \longrightarrow \text{Monosaccharide}\ NHSO_3^-\ Me_3NH^+\ (1\ \text{éq}) + SO_3.Me_3N\ (1\ \text{éq})$$

$$H_2O + SO_3.Me_3N(1\ \text{éq}) \longrightarrow Me_3N\ (1\ \text{éq}) + H_2SO_4\ (1\ \text{éq}) \longrightarrow Me_3NH^+\ (1\ \text{éq}) + HSO_4^-\ (1\ \text{éq})$$

Équation 4 : Équations permettant de déterminer la quantité minimale nécessaire de base à introduire afin de neutraliser l'acidité formé lors de la *N*-sulfatation : 1 éq de complexe réagit avec 1 éq de sucre, formant ainsi 1 éq de Me_3NH^+. Le complexe SO_3·Me_3N étant introduit en excès, il va s'hydrolyser par réaction avec l'eau formant de l'acide sulfurique et de la triméthylamine. La triméthylamine va réagir avec H_2SO_4 pour former Me_3NH^+ et HSO4$^-$. Finalement seul 1 équivalent de base est requis pour neutraliser l'ion hydrogénosulfate et ainsi neutraliser l'acidité formé lors de la réaction.

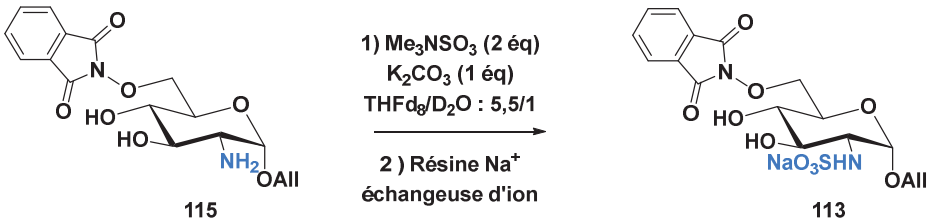


Schéma 80 : Réaction de *N*-sulfatation effectuée dans le tube RMN à la suite de la réaction de Staudinger.

Après 1 h de réaction, on peut voir sur le spectre RMN que le signal du proton en position 2 du résidu glucosamine s'est déplacé de 3,44 ppm à 4,04 ppm (Figure 60). On remarque également un déplacement du signal du proton en position anomérique qui était à 5,60 ppm avant la réaction et se situe à 5,86 ppm après 1 h. On peut donc en déduire que la réaction de *N*-sulfatation est complète après 1 h à température ambiante.

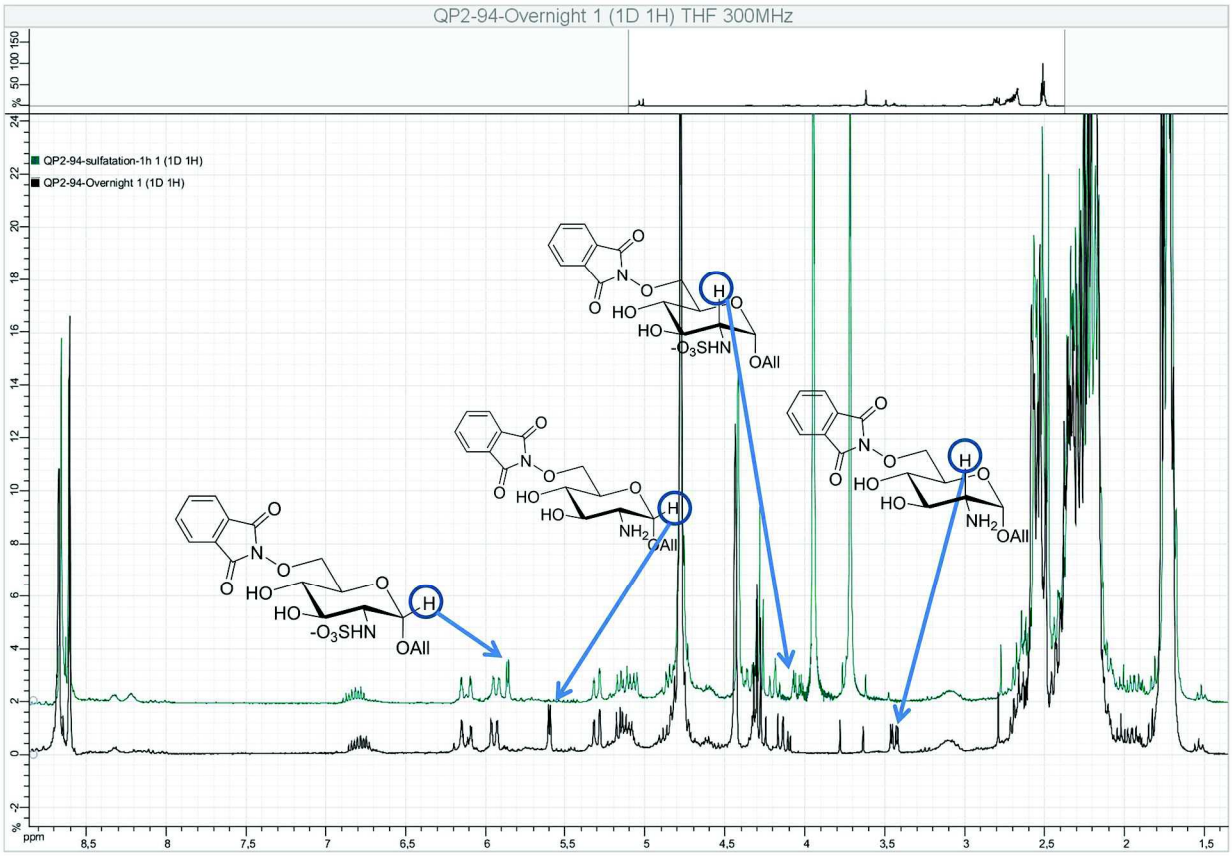


Figure 60 : Suivi RMN de la réaction de sulfatation effectuée dans un mélange THF_{d8}/D_2O (en noir, le spectre RMN après la réaction de Staudinger, en vert le spectre RMN après une 1 h à température ambiante sous agitation magnétique). On remarque un déplacement des protons en position 2 de la glucosamine de 3,44 ppm à 4,04 ppm et également un déplacement des protons anomérique de la glucosamine de 5,60 ppm à 5,86 ppm, caractéristique d'une glucosamine *N*-sulfatée.

I.2.5 Optimisation de la réaction de Staudinger et de la *N*-Sulfonation

L'enchaînement sans purification intermédiaire de la réaction de Staudinger et de la *N*-sulfatation ayant donné le produit espéré selon le suivi RMN, nous avons décidé d'optimiser ces deux réactions toujours en les suivant par RMN (Schéma 81).

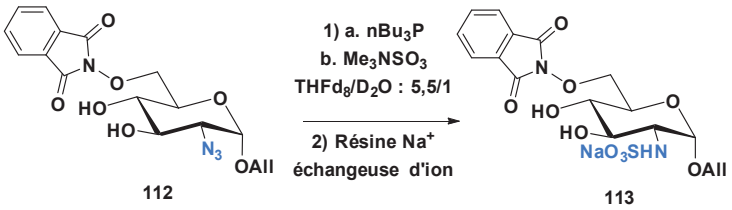


Schéma 81 : Réactions de Staudinger et de N-sulfatation réalisées de façon monotope et suivies par RMN.

L'optimisation des ces réactions a consisté en la diminution des réactifs ajoutés dans le milieu réactionnel. Ainsi, dans un premier temps, la première réaction de Staudinger a été effectuée avec 3 équivalents de tributylphosphine. Cette quantité a été diminuée à 1,5 équivalents mais le suivi RMN a indiqué qu'environ 33 % de produit de départ n'avait pas réagit au bout de 18 h. En fixant la quantité de tributylphosphine à 2 équivalents, la réaction est totale après 18 h. Ensuite, le nombre d'équivalents de complexe SO_3•Me_3N a également été diminué. Initialement, 2 équivalents étaient introduits dans le milieu réactionnel. En n'utilisant que 1,2 équivalents, la réaction est toujours totale au bout d'une heure. Le carbonate de potassium utilisé précédemment pour neutraliser l'acide généré par l'ajout de SO_3•Me_3N en excès (ici 0,2 équivalent en excès) a été supprimé.

I.2.6 Optimisation de la réaction de déprotection de l'oxyamine

La réaction de déprotection de l'oxyamine a ensuite été étudiée. Afin de diminuer le nombre de manipulations et donc le risque d'ouverture du groupement protecteur, cette réaction est également faite à la suite de la réduction de l'azoture et de la *N*-sulfatation (Schéma 82). L'enlèvement du groupement phtalimide se faisant avec de l'hydrazine aqueuse (Hydrazine à 64 % dans l'eau), le suivi RMN ne peut être fait sur cette réaction, le signal RMN de HOD masquant le reste des signaux. L'étape de déprotection est donc effectuée sans suivi RMN.

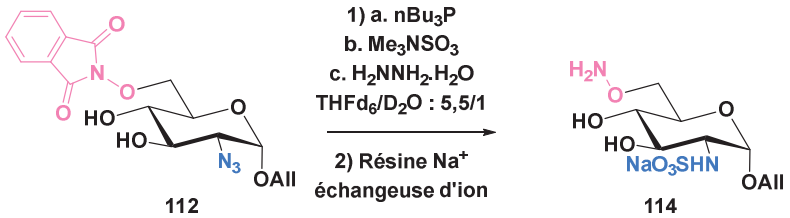


Schéma 82 : Réactions de Staudinger, *N*-sulfatation et déprotection du groupement phtalimide réalisées en monotope.

Le premier essai de déprotection de la fonction oxyamine a été effectué selon des conditions vues dans la littérature, avec 3,7 équivalents d'hydrazine (Tableau 12, Entrée 1).[249] Le produit obtenu a été analysé par RMN et spectroscopie de masse. Le spectre RMN montre la présence résiduelle de signaux aromatiques et l'analyse par spectroscopie de masse montre l'obtention de plusieurs produits, mais aucun n'étant la molécule attendue. Deux bases ont également été testées pour tenter d'enlever le groupement phtalimide. Le carbonate de potassium étant déjà utilisé pour neutraliser l'acide généré lors la *N*-sulfatation, 6 équivalents ont été rajouté au milieu réactionnel (Entrée 3). Après 24 h, seul le produit ouvert **115** a été retrouvé. Une base plus forte a alors été utilisée, l'hydroxyde de sodium (Entrée 4), mais uniquement le produit issu de l'ouverture du cycle du phtalimide **115** a également été retrouvé (Figure 61).

Un second essai de déprotection avec de l'hydrazine a été effectué. Cette fois-ci, une étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique sur G15 a été faite avant le déprotection de l'oxyamine. Une plus grande quantité d'hydrazine a été ajouté (10 équivalents, Entrée 2). L'analyse RMN du produit obtenu a montré une faible présence résiduelle de signaux aromatiques, ce qui semble montrer que la déprotection a été efficace, mais que le produit obtenu comporte des impuretés. L'analyse en spectrométrie de masse, confirme la présence du produit voulu **95** (Figure 62). Le produit **95** obtenu ne comporte plus de groupement allyle qui a été réduit en groupement propyle. En effet, l'hydrazine peut réagir avec le dioxygène présent dans le milieu réactionnel pour former du diimide qui est un réducteur (Équation 5).[254]

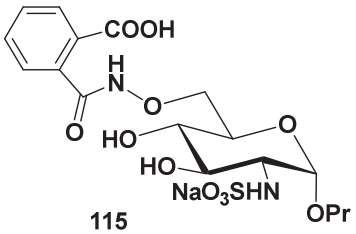
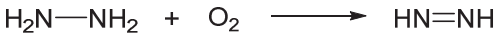


Figure 61 : Produit 115 obtenu lors de la tentative de déprotection du groupement phtalimide par des bases (K_2CO_3 et NaOH).

Tableau 12 : Optimisation de l'étape de déprotection de la fonction oxyamine.

Entrée	Réactif	Éq	Temps	Produit obtenu
1	H_2NNH_2	3,7	18 h	Produit inconnu
2	H_2NNH_2	10	18 h	Produit **95**
3	K_2CO_3	6	24 h	Produit **115**
4	NaOH	6	24 h	Produit **115**



Équation 5 : Réaction entre l'hydrazine et le dioxygène formant la diimide qui est un réducteur.

Une filtration sur Sephadex G-25 nous a permis d'analyser les produits de la réaction par spectrométrie de masse et analyse RMN. Parmi les différents produits obtenus figurent le produit attendu **95**, le produit d'ouverture du phtalimide **115** et également un composé issu de la réaction de l'oxyamine avec de l'acétone **116** (Figure 62). Une étape par purification sur Sephadex G-15 n'a pas permis d'obtenir le composé pur. On observe en effet sur le spectre RMN obtenu les signaux aromatiques caratéristiques du groupement phtalimide aux alentours de 7,5 ppm. L'intégration de ces signaux permet d'estimer la proportion du produit **115** à environs 26 % du mélange final. On observe également à 1,96 ppm la présence de deux singulets caractéristiques des deux méthyles de l'oxime

correspondant au produit **116**. L'intégration de ces signaux permet d'estimer à 19 % leur proportion dans le mélange final (Figure 63).

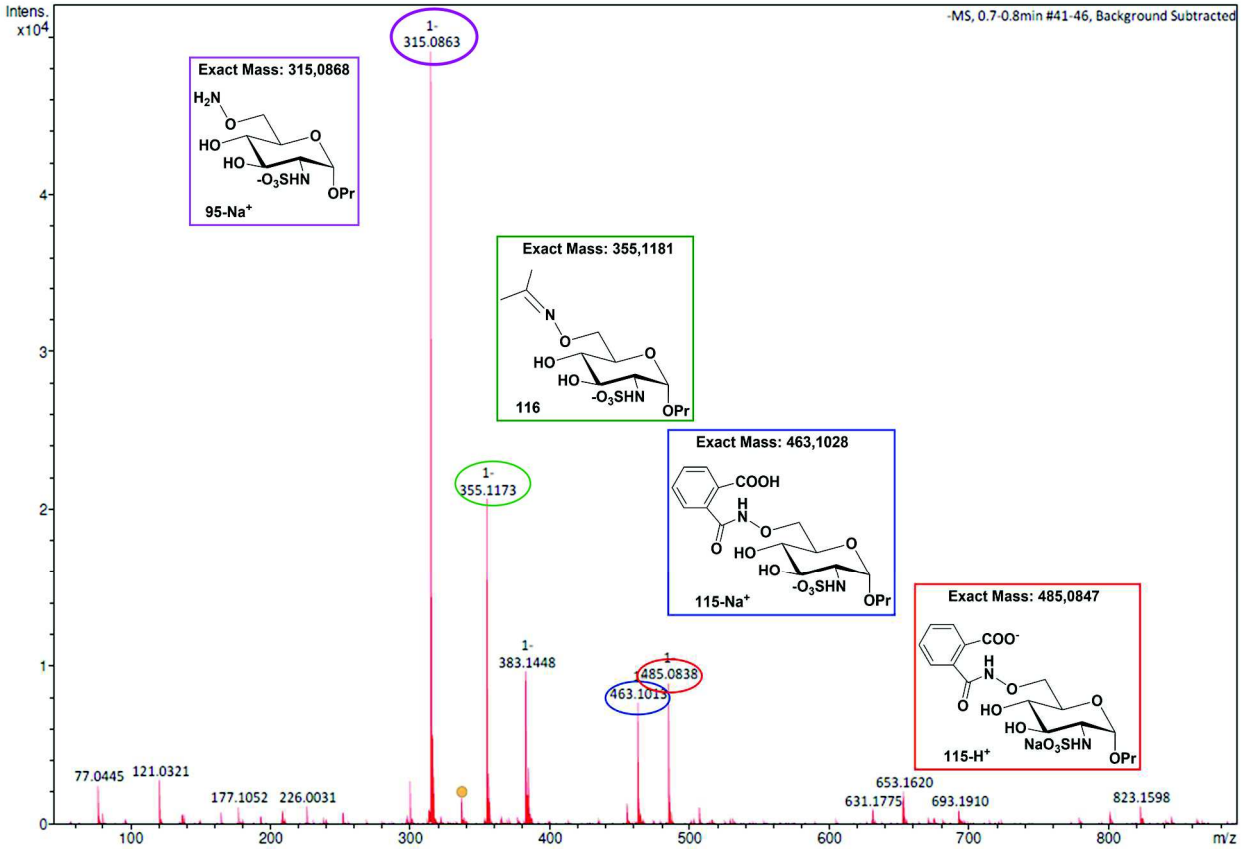


Figure 62 : Spectre obtenu par analyse en spectrométrie de masse haute résolution mode négatif après l'enlèvement du groupement phtalimide avec l'hydrazine. On remarque que la masse du produit désiré est obtenue (violet), mais on observe également d'autres produits secondaires dont un issu de la réaction de l'oxyamine avec de l'cétone (vert) et deux produits issus de l'ouverture du groupement phtalimide (bleu et rouge).

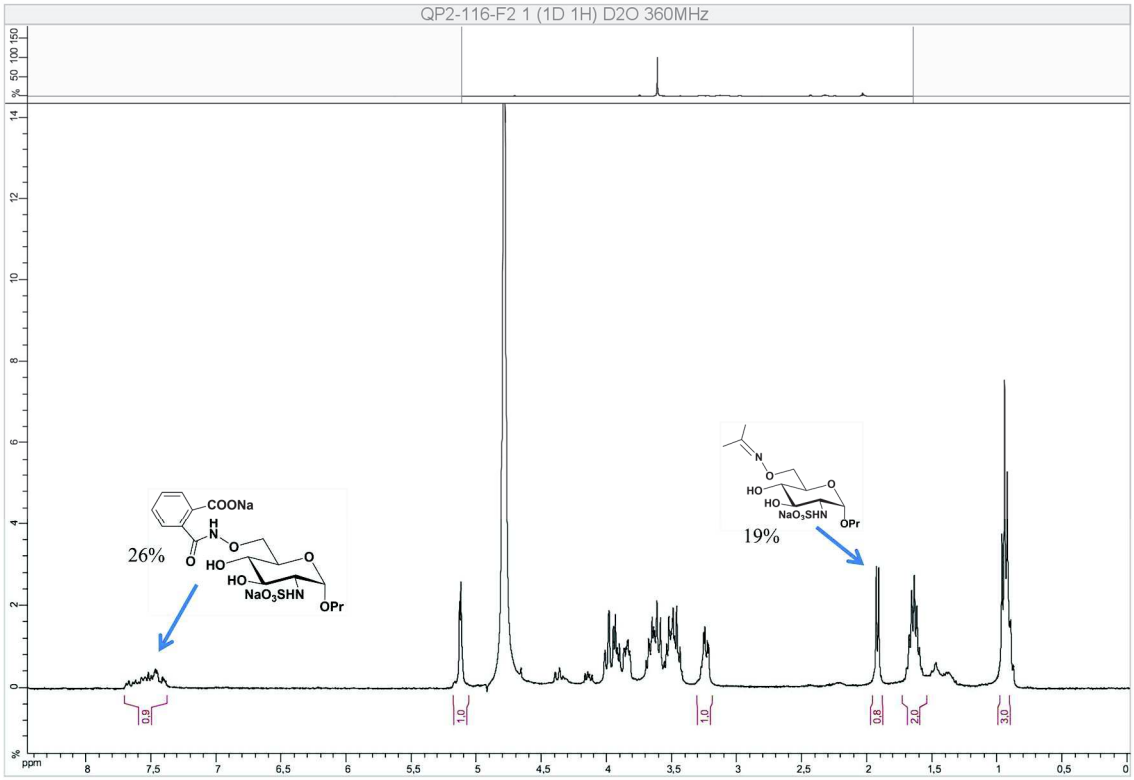


Figure 63 : Spectre RMN du dérivé glucosamine 95 comportant également les produits 115 et 116 dans des proportions de 26 % et 19 % respectivement.

II. Synthèse du dérivé glucosamine portant un groupement hydrazide

II.1 Oxydation de l'alcool primaire et formation de l'ester méthylique

Le composé **117** est obtenu par hydrolyse du benzylidène **43** vue précédemment. L'alcool primaire est ensuite oxydé en acide carboxylique. Une première oxydation a été effectuée en utilisant du NaOCl, du KBr et du 2,2,6,6-tétramethyl-1-piperidinyloxyl (TEMPO)[255] mais le groupement allyle a été dégradé lors de la réaction. Du di acétate d'iodobenzène (BAIB) a alors été utilisé, ce qui a permis d'avoir une oxydation en condition douce, qui n'affecte pas le groupement allyle (Schéma 83).[256,257] L'acide carboxylique résultant est mis sous forme carboxylate par ajout de bicarbonate de sodium afin que le produit soit soluble dans l'eau. Le TEMPO et BAIB sont éliminés par des lavages, la phase aqueuse est lyophilisée et le produit est directement mis en réaction pour l'estérification.

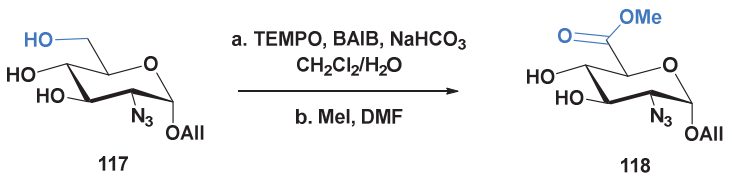


Schéma 83 : Réaction d'oxydation de l'alcool primaire en acide carboxylique, protégé par la suite par un ester méthylique.

La phase aqueuse contenant le bicarbonate de sodium, aucune base n'a besoin d'être ajoutée lors de la réaction d'estérification. Cependant, la quantité de $NaHCO_3$ introduite lors de l'oxydation a du être optimisée car lorsque celle-ci était trop importante, des problèmes de solubilité survenaient lors de l'ajout du DMF, ce qui diminuait le rendement de l'étape de méthylation de l'acide carboxylique (Tableau 13). En réduisant le nombre d'équivalent de $NaHCO_3$ de 7 à 3, le rendement est passé de 33 à 62 % (Entrée 1 et 2,). Enfin, le nombre d'équivalent d'iodure de méthyle a été augmenté car la réaction de méthylation ne semblait pas être complète. Cependant, lorsque 6 équivalents ont été ajoutés au lieu de 3, le rendement a chuté à 53 % (Entrée 3).

Tableau 13: Optimisation de la réaction d'oxydation de l'alcool primaire suivie de la protection de l'acide carboxylique en ester méthylique.

Entrée	Nbr Eq $NaHCO_3$	Nbr Eq MeI	Rendement de 118
1	7	3	33 %
2	3	3	62 %
3	3	6	53 %

II.2 Réduction de l'azoture et *N*-sulfatation

II.2.1 Réduction de l'azoture

Pour effectuer la réduction de l'azoture du composé **118**, les conditions obtenues lors de l'optimisation de la réaction de Staudinger sur le composé **112** ont d'abord été essayées. La réaction a donc été faite en condition permettant le suivi RMN avec la tributylphosphine (Schéma 84). Cependant, le suivi RMN a montré que la réaction n'était pas complète et qu'un second produit se formait au cours de la réaction.

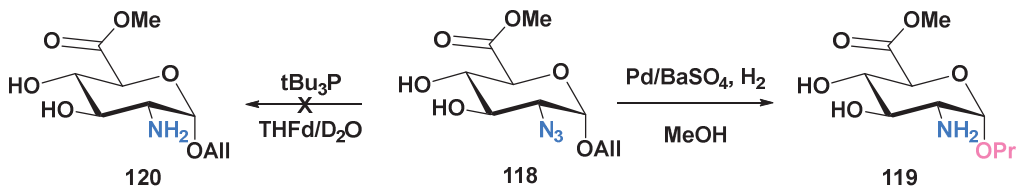


Schéma 84 : Réduction de l'azoture du composé 118. La réaction de Staudinger n'a pas donné le composé voulu. En utilisant du palladium sur sulfate de baryum sous atmosphère d'hydrogène, l'azoture a pu être réduit sans incidence sur l'ester méthylique. Lors de cette réaction, le groupement allyle est également réduit en groupement propyle.

La réduction de l'azoture a été effectuée sous atmosphère d'hydrogène en présence de palladium sur sulfate de baryum afin de limiter la réduction de l'ester méthylique.[258,259] Le temps de réaction doit être réduit au minimum car après 4 h, une légère réduction de l'ester a été observée. Après 2 h de réaction, la réduction de l'azoture est complète et aucune trace de réduction de l'ester n'est constatée. Lors de cette étape, le groupement allyle est également réduit en groupement propyle **119**.

I.1.1 Optimisation de la *N*-Sulfonation

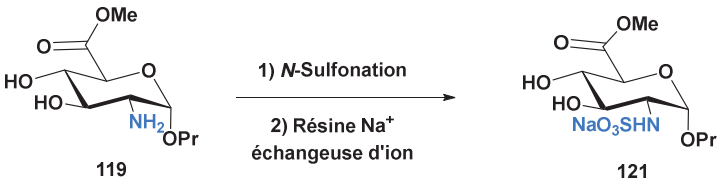


Schéma 85 : Réaction de *N*-Sulfonation du composé 119 pour obtenir le composé 121.

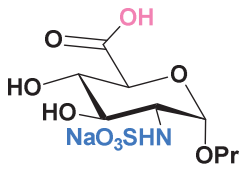
L'étape de *N*-sulfatation (Schéma 85) a d'abord été effectuée dans l'eau avec 1,2 équivalents de complexe SO_3•Me_3N (Entrée 1, Tableau 14). Le produit de départ étant faiblement soluble dans l'eau, la réaction de sulfatation a mené à la présence de plusieurs produits. Ce mélange de produit ne peut pas être séparé : compte tenu de l'absence de groupement hydrophobe, une chromatographie en phase reverse C-18 n'est pas possible et les masses moléculaires des produits résultant de la réaction sont trop proches pour une chromatographie d'exclusion stérique. Une seconde réaction a été effectuée dans le méthanol, mais ces conditions ont également menés à la présence de plusieurs produits (Entrée 2). Un troisième essai a été effectué avec un mélange de solvant méthanol/eau afin de solubiliser le produit de départ et le produit issu de la *N*-sulfatation (Entrée 3, Tableau 14). Ces conditions n'ont pas permis d'améliorer l'issue de la réaction. Enfin, une dernière réaction de *N*-sulfatation a été effectuée dans le méthanol avec le réactif SO_3•Py (5 éq) et de la triéthylamine (10 éq) (Entrée 4). La purification du composé obtenu par G-25 n'a pas permis d'enlever tous les sels de $MeOSO_3Na$ (issus de la réaction du méthanol avec SO_3•Py) et rend difficile la caractérisation du produit. Le spectre RMN montre que l'amine a bien été sulfatée mais que la purification préliminaire par gel filtration n'a

pas permis d'enlever les sels de sulfate de méthyle. De plus, le spectre de masse indique que le produit majoritaire est le produit *N*-sulfaté mais sans méthyle **122** (Figure 64).

Une dernière réaction a été effectuée en reprennant les conditions réactionnelles utilisées pour la *N*-sulfatation du dérivé glucosamine portant la fonction oxyamine (Entrée 5). Les solvants utilisés sont deutérés afin de permettre le suivi RMN. Après 1h de réaction, on peut voir sur le spectre RMN que la réaction de *N*-sulfatation a fonctionné : le déplacement chimique du proton en position 2 du dérivé glucosamine s'est déplacé de 2,69 ppm à 3,26 ppm (Figure 65). Le signal à 3,73 ppm correspondant au groupement méthyle de l'ester méthylique ainsi que celui correspond au proton en position 5 du dérivé glucosamine (à 4,05 ppm) n'ont pas subit de changement avant et après réaction, ce qui semble indiquer que l'ester méthylique est toujours présent sur la molécule. L'analyse du spectre RMN semble donc indiquer que ces conditions réactionnelles ont permis d'obtenir le produit désiré **121**.

Tableau 14 : Optimisation de la réaction de *N*-sulfatation sur le composé 119.

Entrée	Solvant	Réactif	Temps	Base	Produit obtenu
1	H_2O	SO_3•Me3N	1 h	-	Mélange
2	MeOH	SO_3•Me3N	1 h	-	Mélange
3	H_2O/MeOH : 1/1	SO_3•Me3N	1 h	-	Mélange
4	MeOH	SO_3•Py	1 h	Et_3N	**122**
5	THFd/D_2O : 5,5/1	SO_3•Me3N	1 h	-	**121**



122

Figure 64 : Produit 122 résultant de l'hydrolyse de l'ester méthylique.

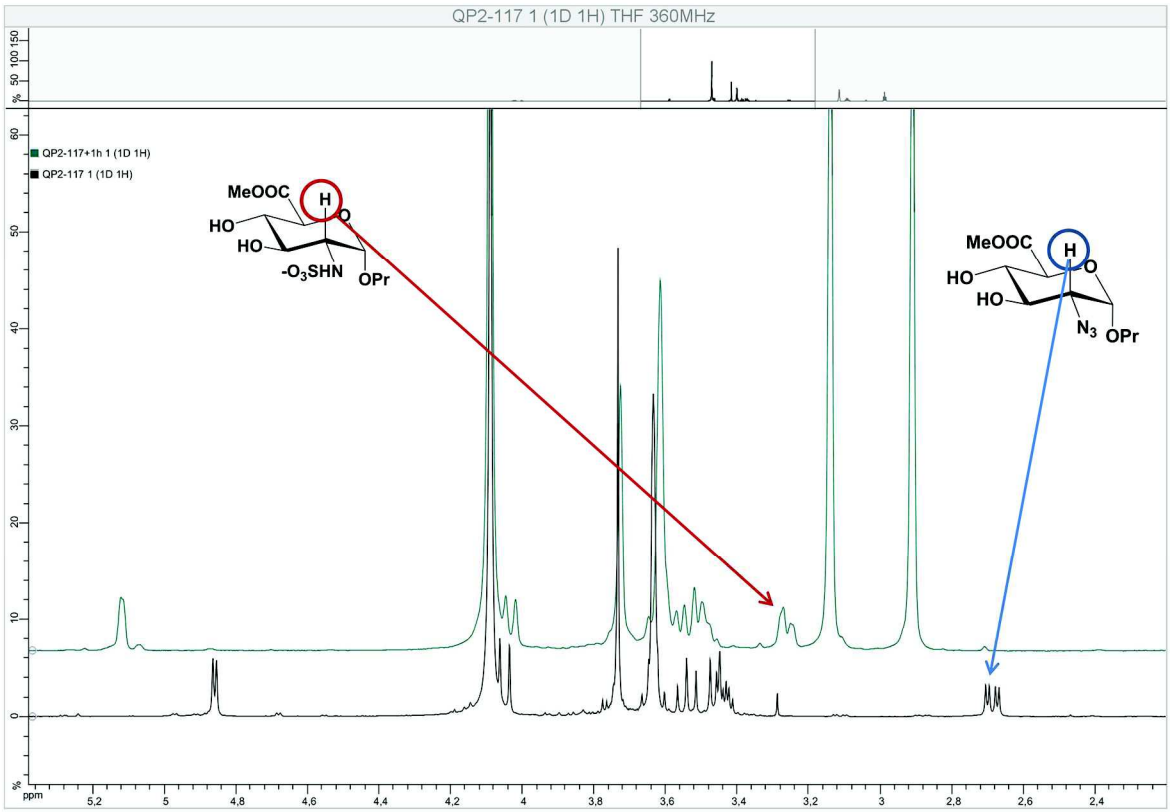


Figure 65 : Suivi RMN de la réaction de *N*-sulfatation effectué dans le THF/H_2O avec le Me_3•NSO_3 (en noir, le spectre RMN du composé 119, en vert le spectre RMN après une 1 h à température ambiante sous agitation magnétique).

II.3 Introduction de la fonction hydrazide

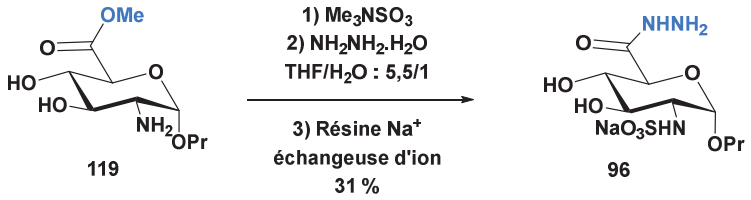


Schéma 86 : Réaction d'introduction de la fonction hydrazide effectuée de façon monotope, après la réaction de *N*-sulfonation, pour obtenir le composé 96.

L'introduction de la fonction hydrazide a été effectuée directement après la réaction de N-sulfonation. Une fois cette dernière effectuée, de l'hydrazine aqueuse a été ajoutée dans le milieu réactionnel. Après réaction, le milieu réactionnel a été déposé sur Séphadex G-25 afin d'éliminer les sels formés lors de la *N*-sulfonation, puis mis sur résine Na^+ échangeuse d'ion et le produit obtenu a analysé. L'analyse en spectrométrie de masse indique la présence d'un seul composé majoritaire correspondant au produit **96** attendu (Figure 66). L'analyse en RMN du produit obtenu semble indiquer que celui-ci ne comporte pas d'impureté ou de produit secondaire (Figure 67).

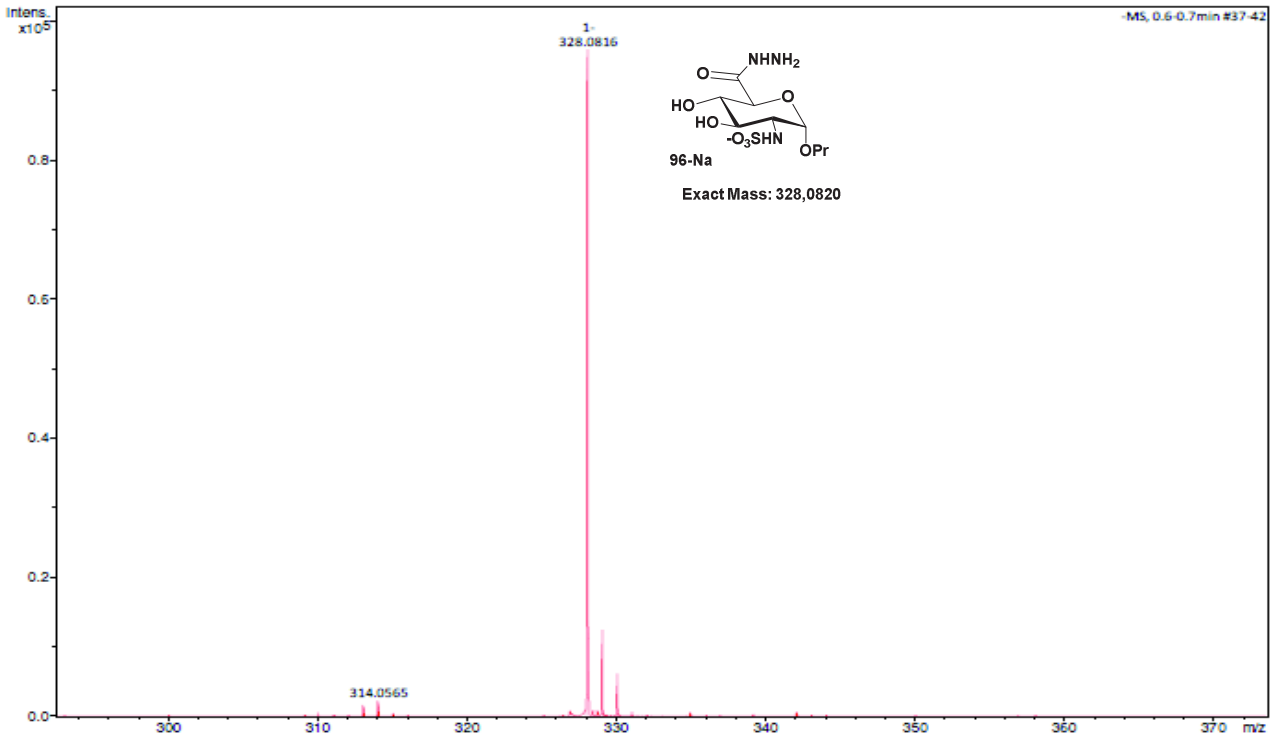


Figure 66 : Spectre obtenu par analyse en spectrométrie de masse haute résolution mode négatif après l'introduction de la fonction hydrazide. On observe bien le signal du dérivé glucosamine 96 attendu.

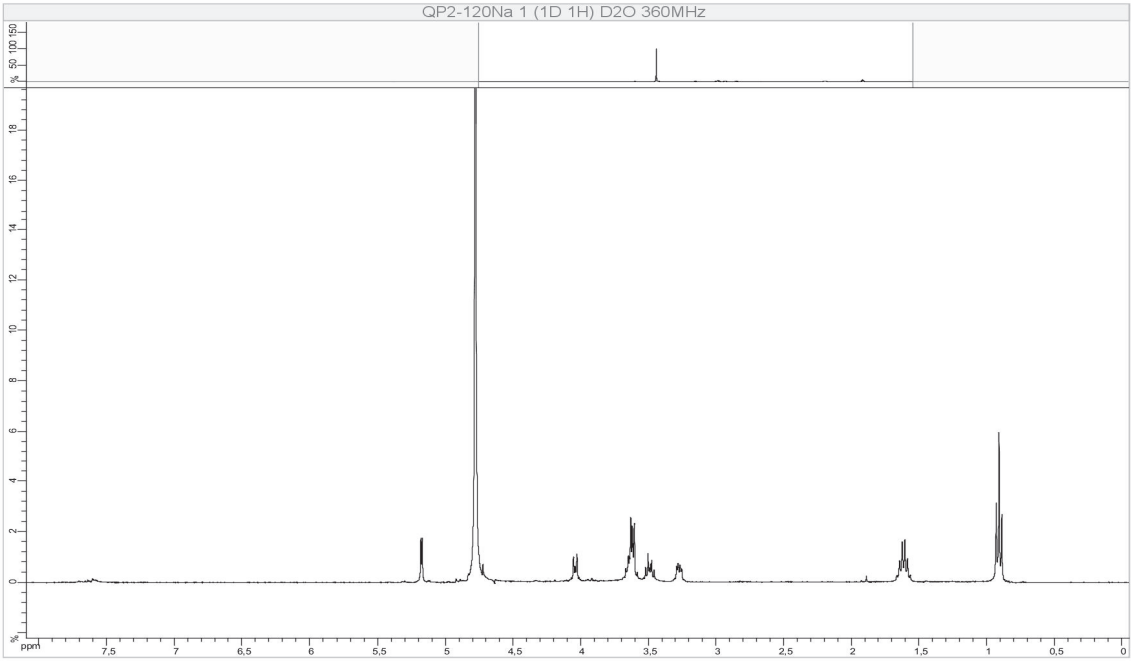


Figure 67 : Spectre RMN obtenu pour le composé 96. Celui semble indiquer l'absence d'impureté ou de produit secondaire.

Conclusions et perspectives

I. Conclusion

Ces travaux de thèse s'intéressent aux endosulfatases 1 et 2. Découvertes dans les années 2000, ces enzymes appartiennent à la famille des sulfatases : des estérases hydrolysant les groupements sulfate de nombreux substrats. A ce jour, 17 sulfatases humaines on été identifiées et elles comportent toutes le même site catalytique composé d'un résidu de formylglycine et d'un cation métallique bivalent pouvant être du calcium ou du magnésium. Les sulfatases humaines, à l'exception des endosulfatases 1 et 2, sont des exosulfatases présentes dans les lysosomes ayant un pH optimum d'activité acide. HSulf1 et HSulf2 ont quant à elle une activité endosulfatase extracellulaire et opèrent à pH neutre. Les endosulfatases ont pour substrat les chaînes d'Héparane Sulfate (HS). Ces polysaccharides hautement sulfatés font partis de la famille des Glycosaminoglycanes et sont présents dans le milieu extracellulaire. Ils sont composés d'une unité disaccharidique répétitive (GlcA-GlcN) qui peut être fonctionnalisée par un groupement sulfate en position 2 de l'acide glucuronique, et en position 3, 6 et sur l'amine de la glucosamine. L'acide glucuronique peut également être épimérisé en acide iduronique (Figure 68).

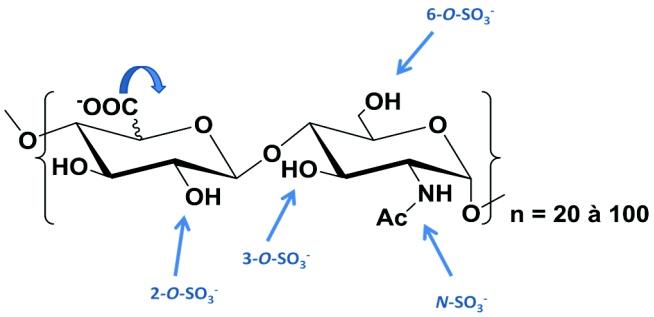


Figure 68 : Unité répétitive disaccharidique des chaînes d'HS et les différentes modifications pouvant exister : sur la glucosamine, l'amine peut être libre, acétylée ou sulfatée, les alcools en position 3 et 6 peuvent être sulfatés ou non. L'acide uronique peut être glucuronique ou iduronique et l'alcool en position 2 peut être sulfaté ou non.

Les HS comportent plusieurs domaines selon les modifications apportées à la chaîne et le domaine d'affinité avec les endosulfatases est celui qui comporte le disaccharide modifié : IdoA(2S)-

GlcNS(6S). Les endosulfatases hydrolysent le groupement sulfate en position 6 de la glucosamine, de manière processive en commençant par le côté non réducteur du polysaccharide. Les chaînes d'HS se lient avec de nombreux ligands et l'activité des HSulfs régulent ces affinités. La dérégulation de l'expression de HSulf-2 est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que des cancers, du diabète, des maladies inflammatoires … Ces enzymes sont donc des cibles thérapeutiques. Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont focalisés sur la synthèse d'inhibiteurs sélectifs d'HSulf2.

Le chapitre II est consacré à la synthèse d'inhibiteurs d'HSulf2. Afin d'obtenir des inhibiteurs sélectifs, le choix du « corps » des molécules s'est porté sur la partie répétitive du domaine S - IdoA(2S)-GlcNS(6S) - des chaînes d'Héparane Sulfate. HSulf2 ayant une activité processive de 6-*O*-désulfatation des résidus de glucosamine, la fonction inhibitrice est introduite en position 6 d'une glucosamine à l'extrémité non réductrice. La fonction inhibitrice choisie est le sulfamate, connu pour inhiber de façon irréversible les sulfatase. Grâce à l'expertise du laboratoire en synthèse de fragment d'HS, quatre fragments d'HS ont pu être synthétisés, allant du tri au nonasaccharide, avec une fonction sulfamate. La stratégie de synthèse utilisée s'est portée sur la glycosylation itérative de la brique disaccharide $\mathbf{I_1}$ permettant d'accéder facilement au tétrasaccharide $\mathbf{I_1I_1}$, à l'hexasaccharide $\mathbf{I_1I_1I_1}$ et à l'octasaccharide $\mathbf{I_1I_1I_1I_1}$. Ensuite, une glycosylation avec le monosaccharide **43** avec chacune des quatre brique a permis l'obtention du « corps » des inhibiteurs sous la forme GlcN-[IdoA-GlcN]$_n$ (Figure 69).

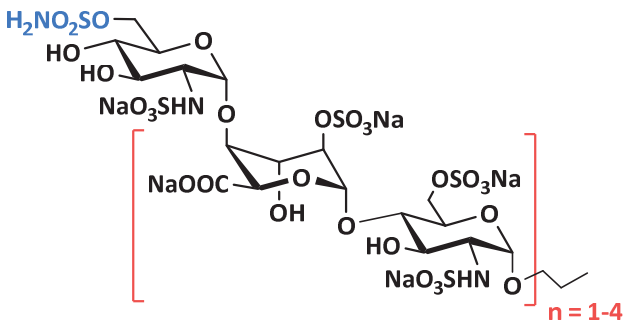


Figure 69 : Fragments d'Héparane Sulfate fonctionnalisés pour l'inhibition de HSulf2.

L'introduction de la fonction sulfamate ainsi que la déprotection et la fonctionnalisation des molécules se sont ensuite effectuées en 7 étapes. Les tests préliminaires d'inhibition d'HSulf2 pour ces molécules ont enfin été effectués dans le laboratoire de notre collaborateur, le Dr Vivès à l'IBS de Grenoble. Les inhibiteurs ont montré une certaine efficacité puisqu'au moins 60 % de l'activité de l'enzyme est inhibée à une concentration de 1 mM pour le penta, hepta et le nonasaccharide. On remarque également une corrélation entre la longueur de l'inhibiteur et son efficacité. En effet, le nonasaccharide, inhibiteur le plus long, a le pourcentage d'inhibition le plus élevé à 1 mM (Figure 70). Une cinquième molécule, un nonasaccharide comportant une sulfamate sulfaté, a également été obtenue et sera testée pour sa capacité à inhiber HSulf2.

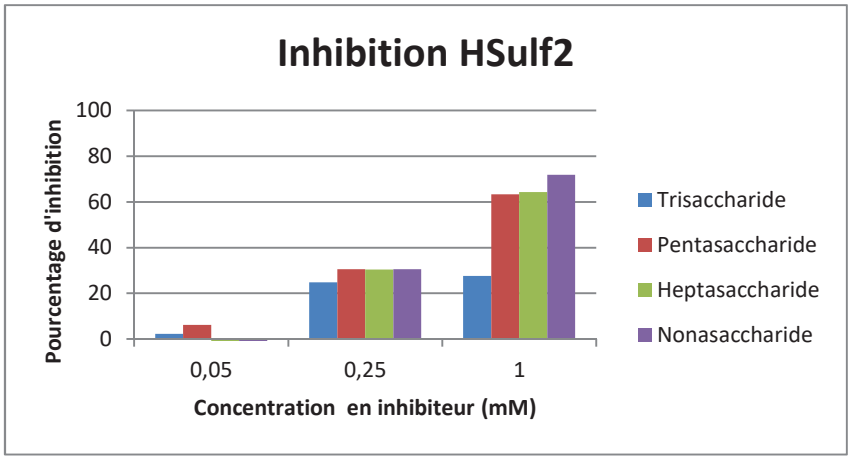


Figure 70 : Pourcentage d'inhibition de HSulf2 après une nuit d'incubation à 37 °C avec les oligosaccharides dans une gamme de concentration allant de 50 µM à 1 mM.

Le chapitre III est ensuite dédié à la réaction de *N*,*O*-sulfonation. Étape inéluctable de la synthèse des fragments d'HS, celle-ci, donnait de moins bons rendements avec des produits secondaires et un manque de reproductibilité depuis quelques temps au laboratoire. Afin de mieux comprendre cette réaction et retrouver une reproductibilité, une étude sur l'impact des conditions réactionnelles sur le taux de conversion a été menée. Le disaccharide de base des HS (IdoA(2S)-GlcNS(6S)) a été utilisé pour l'optimisation des conditions réactionnelles puis celles-ci ont été transposées à l'octasaccharide [IdoA(2S)-GlcNS(6S)]$_4$ (Figure 71).

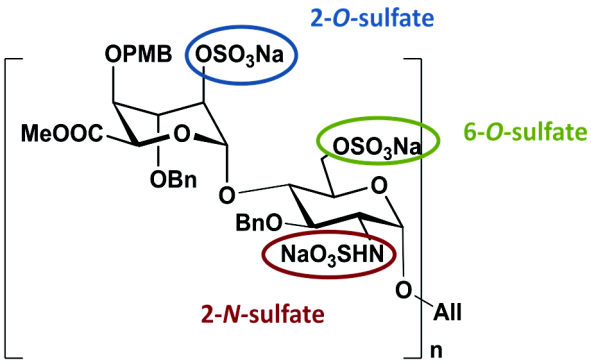


Figure 71 : Molécules utilisées pour l'optimisation de la réaction de *N*,*O*-sulfonation : disaccharide (n=1) et octasaccharide (n=4) et les positions à sulfater.

Cette étude a permis de montrer que des conditions réactionnelles anhydres sont nécessaires pour avoir un taux de conversion complet. De plus, le réactif commercial SO_3•Py classiquement utilisé s'est révélé être instable, ce qui génère une acidité et ne permet pas l'obtention du produit entièrement sulfaté. L'utilisation du complexe plus stable SO_3•Me_3N a permis de retrouver d'excellent taux de conversion et d'effectuer une étude cinétique de la réaction. Il a donc été montré que l'amine de la glucosamine est la première position à être sulfaté, suivi de l'alcool en position 6 puis, de l'alcool en

position 2 de l'acide iduronique. Ces conditions réactionnelles ont enfin été transposées à l'octasaccharide et un chauffage à 100 °C a permis d'excellent taux de conversion en 1 h 30 au lieu de 48 h selon la méthode utilisée précédemment au laboratoire.

Le chapitre IV traite de la synthèse de deux dérivés de glucosamine avec de nouvelles fonctions inhibitrices. En effet, même si la fonction sulfamate est bien connue pour inhiber les sulfatases, celle-ci ne se lie pas de façon covalente avec la formylglycine et dégrade le site catalytique de l'enzyme. De plus, environ 6 molécules inhibitrices sont nécessaires pour inhiber 1 molécule d'enzyme. Afin d'obtenir des inhibiteurs pouvant former une liaison covalente avec la formylglycine de HSulf2, un résidu de glucosamine a été fonctionnalisé avec soit une fonction oxyamine, soit une fonction hydrazide (Figure 72).

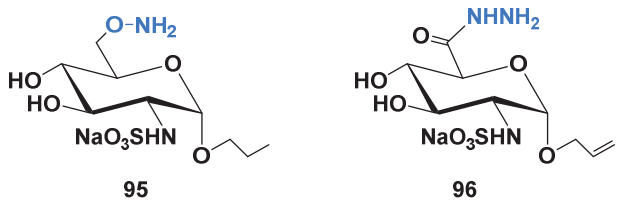


Figure 72 : Monosaccharides cibles pour la bioconjugaison avec HSulf2. A gauche, le résidu de glucosamine comportant la fonction oxyamine 95 et à droite, le résidu de glucosamine comportant la fonction hydrazide 96.

La synthèse de la molécule comportant la fonction oxyamine à partir de la molécule **43** a été plus complexe que prévu et a nécessité plusieurs étapes d'optimisation (introduction de la fonction oxyamine protégée par un groupement Cbz et déprotection des groupements éthers de benzyles et Cbz) sur la molécule cible et sur un glucose modèle **103**. Malgré de nombreuses conditions réactionnelles testées, la voie de synthèse initialement prévue a du être modifiée car la dernière étape d'hydrogénolyse ne permettait pas d'obtenir le produit voulu. Partant du monosaccharide **43**, une nouvelle voie de synthèse a été choisie afin de s'affranchir de l'étape d'hydrogénolyse. Le monosaccharide **119** comportant des alcools libres en position 3, 4 et 6 a donc été utilisé. Une réaction de Mistunobu a permis d'introduire la fonction oxyamine protégée par un groupement phtalimido **112**. Une réaction de Staudinger suivie de la *N*-sulfatation effectuée de façon monotope a permis d'obtenir la molécule **113**. La déprotection de la fonction oxyamine a ensuite été effectuée et le produit **95** voulu a été obtenu quoique contaminé.

L'obtention de la molécule **96** à partir de la molécule **43** a pu être effectuée. L'optimisation de l'étape d'oxydation de l'alcool primaire en acide carboxylique suivie de la méthylation a permis d'obtenir le composé **117** avec un bon rendement (62 %). La réduction de l'azoture en amine par la réaction de Staudinger n'a pas donné le produit voulu, mais une hydrogénolyse catalysée par du sulfate de barium a permis d'obtenir le composé **119** sans hydrolyse de l'ester méthylique. Lors de cette étape, le groupement allyle a été réduit en groupement propyle. Ensuite, l'optimisation de la réaction de *N*-

sulfatation a donné le produit voulu **121**. L'introduction de la fonction hydrazide a enfin été effectuée et a permis d'obtenir le composé **96** attendu.

II. Perspectives

Prochainement, d'autres tests d'inhibition sur les quatre molécules $\mathbf{85_n}$ seront effectués afin de pouvoir étudier leur cinétique d'inhibition et déterminer un IC_{50}. Le nonasaccharide $\mathbf{86_4}$ sera également testé sur HSulf2 afin de déterminer si cette fonction, un sulfamate sulfaté, peut inhiber le site catalytique de l'enzyme. Il serait également très intéressant de tester les molécules $\mathbf{85_n}$ sur HSulf1 afin de déterminer si les inhibiteurs sont spécifiques d'une des deux sulfatases et si les cinétiques d'inhibition diffèrent. L'expression d'une seule des deux endosulfatases étant généralement dérégulée dans les pathologies associées, trouver un inhibiteur spécifique d'HSulf1 ou d'HSulf2 semble crucial.

Le dérivé glucosamine **95** obtenu n'a pas pu être obtenu pur après une purification sur Sephadex G-15. On peut envisager l'ajout d'un bras contenant un groupement hydrophobe de type Cbz qui pourrait permettre de purifier les composés par colonne phase inverse C-18. La présence du groupement allyle sur le dérivé glucosamine pourrait permettre l'ajout de ce bras par une réaction de thiol-ène par exemple.[190] Quant au dérivé glucosamine fonctionnalisé par une fonction hydrazide, sa synthèse a pu être faite. L'étape de *N*-sulfatation s'est avérée être délicate pour ce composé et après plusieurs conditions réactionnelles testées, le produit voulu **121** a été obtenu. La dernière étape d'introduction de l'hydrazine sur le carbonyle a permis d'obtenir le produit voulu.

Malgré la présence d'impurtés dans le produit **95**, les deux dérivés glucosamines comportant une fonction oxyamine et hydrazide pourront être testés pour leur capacité à inhiber HSulf2. L'IC_{50} du dérivé glucosamine comportant la fonction sulfamate étant déjà connu, il sera possible de déterminer laquelle de ces fonctions est la plus efficace dans l'inhibition de l'enzyme. Ces deux dérivés glucosamine pourront également servir aux essais de co-cristallisation de l'enzyme afin d'obtenir une structure cristallographique de HSulf2 ou pour marquer la formylglycine et pouvoir effectuer des dosages.

En fonction des résultats d'inhibition obtenus, la synthèse de nouveaux inhibiteurs pourra être envisagée en combinant la longueur et la fonction inhibitrice donnant les meilleurs résultats. La méthode permettant d'obtenir les monosaccharides oxyamine ou hydrazide n'étant pas applicable aux oligosaccharides, une nouvelle voie de synthèse devra être développée.

Afin de diversifier la librairie d'inhibiteurs potentiels des HSulfs, d'autres fragments d'HS pourraient être synthétisés en ayant par exemple un résidu d'acide iduronique à l'extrémité non réductrice ou d'autres fonctions inhibitrices. En effet, Le groupe de Taylor a développé des inhibiteurs de sulfatase

contenant un groupement fluorosulfonate ($-CF_2SO_3^-$) ou fluorosulfonamide ($-CF_2SO_2NH_2$) et a montré sur l'inhibition de la STS que ces groupements étaient jusqu'à 10 fois plus efficaces que la fonction sulfamate.[260–262]

Experimental part

General Experimental Techniques

All moisture-sensitive reactions were performed under an argon atmosphere using oven-dried glassware. Evaporations were performed under reduced pressure. All solvents were dried by filtration on alumine columns or over standard drying agents and freshly distilled prior to use. Flash column chromatographies were performed on Silica Gel 60 A.C.C. (15–40 µm or 40–63 µm) and size exclusion chromatographies were performed on Sephadex LH-20 or G25. Reactions were monitored by TLC on Silica Gel 60 F254 plates with detection by UV light at 254 nm and by charring with 5 % ethanolic H_2SO_4.

^{13}C and ^{1}H NMR spectra were recorded at room temperature in $CDCl_3$, MeOD, D_2O and THF on a Bruker Avance 300 (^{1}H: 300.13 MHz, ^{13}C: 75.47 MHz), 360 (^{1}H: 360.13 MHz, ^{13}C: 90.55 MHz) or 400 (^{1}H: 400.13 MHz, ^{13}C: 100.61 MHz). Chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to Me_4Si for ^{1}H NMR (δ = 0.00 ppm) and to the residual solvent peak used as an internal standard for ^{13}C NMR (δ = 77.0 ppm). The following abbreviations were used to describe the multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintet), m (multiplet), br (broad). All multiplicities were approximated to the first order; coupling constants, J, are reported in Hz and with an accuracy of +/- 0.2 unit on the last digit. ^{13}C NMR spectra were run using a proton-decoupled pulse sequence. HRMS analyses were recorded in positive mode on a Bruker Micro Tof Q spectrometer using electrospray ionization. UPLC was performed using Agilent poroshel 120 EC-C18 2.7 µm column and a diode-array detector.

Monitoring of the sulfonation reaction

For each analysis, 10 µL of the reaction mixture were collected and diluted in 500 µL of 5 % acetonitrile and 2 % trimethylammonium acetate aqueous buffer, pH = 6,8. The sample were then analysed by UPLC on a reverse phase column with the solvent's gradient indicated in the Table 15.

Table 15: Gradient of the solvent used for the UPLC analysis of the sample from the sulfonation reaction.

Time (min)	% Et_3NAc Buffer	% ACN
0	10	90
10	60	40
15	10	90
25	10	90

Determination of active Sulfur Trioxide

The determination of the active sulphur trioxide in the complex SO_3•Py was carried out as follow:

- Water was added to a freshly opened bottle of pyridine in order to have around 1 mg/mL. The water quantity in the wet pyridine was precisely determined by Karl Fischer titration (KF).
- Around exactly 50 mg of SO_3•Py complex (exactly weighed) were diluted in 50 mL of wet pyridine.
- The mixture was placed in an ultrasonic cleaner for 30 min to ensure complete dissolution of the sample.
- The water content of the resulting solution was determined by KF. Triplicate titrations were carried out.

The active sulphur trioxide was calculated according to the equation **(1)**. The (B-S) part represent the water quantity that react with the SO_3•Py complex.

$$\% \text{ active } SO_3 = \frac{(B-S)*P*\frac{80.06}{18.01}}{W} * 0.1 \qquad \textbf{(1)}$$

With :

B = The quantity of water in the wet pyridine at about 1 mg/mL (ppm)

S = The quantity of water in the wet pyridine at about 1 mg/mL with the SO_3•Py complex (ppm)

W = The quantity of SO_3•Py (mg)

P = The quantity of pyridine for the titration (1 mL)

Standard solution's preparation for the NMR titration of the oligosaccharides

- The methyl-glucose is first dried under vacuum for 24 h, then around exactly 80 mg was weighed,
- The methyl glucose was diluted in water in a 50 mL graduated flask : solution **A**,
- With microsyringes, 3 different volumes was collected from the solution **A** : 100 µL (sample **A1**), 250 µL (sample **A2**), 500 µL (sample **A3**),
- These sample were lyophilised diluted with D_2O and lyophilised again 3 times,
- At the same time, 40 µL of ACN were diluted with D_2O to have 1 mL of solution **B**,
- 50 µL of solution **B** were collected and diluted in D_2O to have 5 mL of solution **C**,
- Each sample **A1, A2, A3** were diluted in 450 µL of solution **C** and put into NMR tubes,
- The oligosaccharides, after 3 exchanges with D_2O, were diluted in 450 µL of solution **C.**

General procedure for the preparation of compounds

General protocol for glycosylation

Acceptor (1.3 eq) and donor (1 eq) were azeotropically dried with toluene and dissolved in DCM (0.1 M). Powdered 4-A molecular sieves were added and the mixture was then stirred for 20 minutes at room temperature. The solution was cooled to -40 °C and TBDMSOTf (0.2 eq) was added. The reaction was left to stir at this temperature overnight and quenched with a solution of triethylamine (0.1 M in DCM). The solution was filtrated trough a pad of silica and evaporation in vacuo.

General protocol for reductive opening

To a solution of the corresponding benzylidene (1.0 eq) in DCM (0.12 M) were added Et_3SiH (1.1 eq) and powdered 4-A molecular sieves. The mixture was left to stir for 15 minutes and then cooled at -60 °C. $PhBCl_2$ (65 %, 3.4 eq) was added and the reaction mixture was left to stir during 1h at this temperature. The reaction was quenched at -60 °C with triethylamine, methanol and $NaHCO_3$sat. The mixture was diluted in diethyl ether, washed with a solution of NaOH [0.1 M], KH_2PO_4 (5 %) and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo.

General protocol for sulfamoylation

Procedure for the synthesis of sulfamoyl chloride

Formic acid (4.8 mg, 0.104 mmol, 1.0 eq) was added dropwise to chlorosulfonyl isocyanate (14.7 mg, 0.104 mmol, 1.0 eq) at 0 °C. The mixture was left to stir 1 h at this temperature and then allowed to warm up at room temperature and stir 2 h to give a white solid. The solid was dissolved in anhydrous DMA (260 µL) to give 1 M solution. The stock solution was used immediately.

Sulfamoylation method

Sulfamoyl chloride (4.0 eq) was added to the substrate alcohol (1.0 eq, 0.1 M) in anhydrous DMA at 0 °C. The reaction was quenched with triethylamine (16 eq) and methanol (16 eq). The mixture was diluted in diethyl ether, the organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo.

General protocol for Deacetylation

To a solution of the corresponding acetylated compound (1.0 eq) in methanol [0.05 M/per OAc], was added potassium carbonate (0.2 eq per OAc). The solution was left to stir at room temperature during 2 h. The reaction was quenched by addition of Dowex® 50WX2 hydrogen form. The mixture was filtered and concentrated in vacuo.

General protocol for the azide reduction

To a solution of the corresponding azide compound (1.0 eq) in methanol [0.11 M/per N_3] was added triethylamine (8 eq per N_3) and 1,3-propanedithiol (8 eq per N_3). The mixture was protected from light and left to stir at room temperature for 2 days. At the end of the reaction, the methanol was evaporated by argon's flow.

General protocol for *N*, *O*-Sulfonation

The compound was dissolved in pyridine ([SO_3•Me_3N] = 0.3 M) and the SO_3•Me_3N complex (3 eq per OH and NH_2) was added. The mixture was heated up at 100 °C in the reactor. The reaction time was determined according the length of the saccharide. The reaction was quenched by addition of NEt_3 (1.8 eq/Me_3NSO_3) and MeOH (16 eq/Me_3NSO_3) and successively purified by Sephadex LH-20 chromatography (CH_2Cl_2/MeOH (1:1)) and RP-18 flash chromatography (50 mM AcOH-NEt_3/ACN (90:10→70:30)), followed by ion exchange on BioRad AG50W-8 200 sodium form after removal of AcOH-NEt_3 salt by lyophilisation.

General protocol for saponification

The compound was dissolved in water ([COOMe] = 18 mM) and cooled at 0 °C. Potassium hydroxide (115 eq/COOMe) was added slowly, followed by the addition of hydrogen peroxide (3 eq/KOH). The solution is left to warm up at room temperature and then heated upat 37 °C for 24 h. The reaction was

quenched by successive addition of phosphate buffer ([COOMe] = 0,1 M) and AcOH (0,7 eq/KOH). The mixture was purified by RP-18 flash chromatography (50 mM AcOH-NEt_3/ACN (90:10→70:30)), followed by ion exchange on BioRad AG50W-8 200 sodium form after removal of AcOH-NEt_3 salt by lyophilisation.

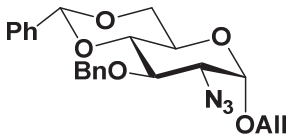
General protocol for hydrogenolysis

The corresponding benzylated compound was dissolved in a solution of 50 mM AcOH-NEt_3/tBuOH (2:1) (4,4 mM). $Pd(OH)_2$ (20 % on charcoal, 33 mg/mL) was added, the solution was degassed and stirred for 24 h under hydrogen (1atm), filtered, followed by ion exchange on BioRad AG50W-8 200 sodium form after removal of AcOH-NEt_3 salt by lyophilisation.

Procedures for the preparation of compounds and identification data

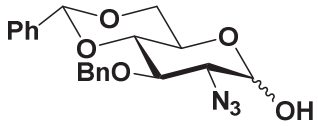
Compound from Chapter 2

Compond 71 : Allyl 2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



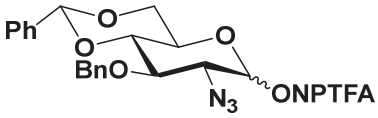
To a solution of Allyl 2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranoside **43** (1.50 g, 4.50 mmol, 1.0 eq) in DMF (23 mL) cooled at 0 °C was added NaH (270 mg, 6.75 mmol, 1.5 eq). The mixture was left to stir during 20 minutes. Benzyl bromide (848 mg, 4.96 mmol, 1.1 eq) was added drop by drop and the mixture was left to stir during 3 h at room temperature. The reaction was quenched with isopropanol and water, and diluted with diethyl ether. The organic layer was separated and the resulting aqueous layer was extracted two times with diethyl ether. The combined organic layers were washed two times with KH_2PO_4 (5 %), water and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 20 % Ethyl acetate/petroleum ether) afforded the compound as white solid (1.72 g, 90 %), whose ^1H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[186]

Compound 72 : 2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α/β-D-glucopyranosyl.



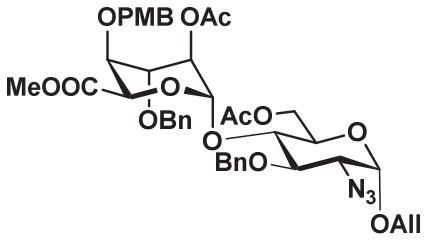
The iridium catalyst ($C_8H_{14}(MePh_2P)_2Ir^I$-PF_6) (165 mg, 0.20 mmol, 0.05 eq) was added to a solution of compound **71** (1.72 g, 4.06 mmol, 1.0 eq) in THF (54 mL). The solution was cooled at 0 °C, degassed and the iridium catalyst was activated with H_2. The solution became nearly colourless. The reaction mixture was degassed and stirred 2 h under argon at room temperature. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in acetone/water (81 mL, 9:1), HgO (1.14 g, 5.28 mmol, 1.3 eq) and $HgCl_2$ (1.32 g, 4.87 mmol, 1.2 eq) were added. After stirring for 2 h at room temperature, the mixture was diluted in diethyl ether, washed with a solution of KI (10 %), a solution of saturated Na_2SO_3 and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (20 % - 40 % Ethyl acetate/petroleum ether) afforded α/β mixture of the desired compound as white solid (1.20 g, 77 %) ; **^{1}H NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.46-7.20 (m, 10H, ArH), 5.52 (d, J = 4.6 Hz, 1H, CH_2Ph), 5.21 (t, $J_{1,2} = J_{OH}$ = 3.0 Hz, 0.5H, 1-H_α), 4.89 (d, J = 14.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.74 (dd, J = 11.5 Hz, J = 3.4 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.57 (q, J = 4.0 Hz Hz, 0.5H, 1-H_β), 4.24 (qd, J = 16.2 Hz, J = 5.5 Hz, 1H, 6-H), 4.05 (td, $J_{5,6}$ = 9.5 Hz, $J_{5,6'}$ = 5.0 Hz, 1H, 5-H), 3.68 (m, 2H, 3-H, 4-H_β, 6-H), 3.54 (t, J = 10.5 Hz, 1H, 4-H_α), 3.37 (m, 2H, 2-H, 3-H, 5-H), 2.88 (d, $J_{OH,1}$ = 3.0 Hz, 0.5H, OH) **^{13}C NMR** 127.7, 137.7, 137.2, 137.0 (C_{quat}), 129.1, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 127.8, 127.7, 126.0, 126.0 (C_{arom}), 101.5 (OCH_2Ph), 101.4 (OCH_2Ph), 96.5 (C-1_α), 92.7 (C-1_β), 82.7 (C-4_β), 81.5 (C-4_α), 79.0 (C-3_β), 76.2 (C-3_α), 75.1 (OCH_2Ph), 75.0 (OCH_2Ph), 68.9 (C-6_β), 68.5 (C-6_α), 67.3 (C-2_β), 66.4 (C-5_β), 63.6 (C-2_α), 62.6 (C-5_α),**; HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{20}H_{21}N_3NaO_5$ [M*Na*+] : 406,1373, found : 406.1362.

Compound 73 : 2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α/β-D-glucopyranosyl *N*-phenyltrifluoroacetimidate.



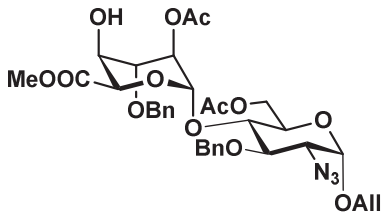
Compound **72** (1.20 g, 3.13 mmol, 1.0 eq) was dissolved in acetone (21 mL). K_2CO_3 (1.30 g, 9.39 mmol, 3.0 eq) and *N*-phenyl-2,2,2-trifluoroacetimidoyl chloride (0.78 g, 3,76 mmol, 1,2 eq) were subsequently added. The reaction mixture was vigorously stirred until total consumption of the hemiacetal. The mixture was then filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (0 % - 10 % Ethyl acetate/petroleum ether + 0.1 % Et_3N) afforded α/β mixture of the desired compound as white solid (1.73 g, quantitative yield).

Compound 35 : Allyl [methyl 2-*O*-Acetyl-3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-α-L-ido pyranosyl uronate]-(1→4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



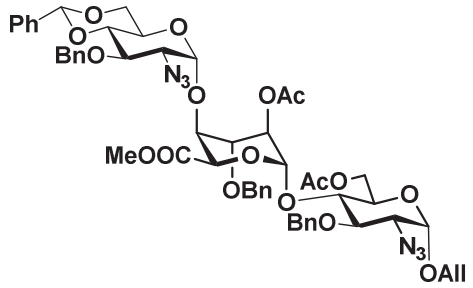
Compound **53** (200 mg, 0.258 mmol, 1.0 eq) in DCM (218 µL) was added Powdered 4-A molecular sieves (140 mg) and diethyl ether (1.96 mL). Et_3SiH (150 mg, 1.290 mmol, 5.0 eq) was added and left to stir during 15 minutes. Then the solution was cooled to -60 °C and $PhBCl_2$ (139 mg, 0.879 mmol, 3.4 eq) was added. The solution was left to stir overnight at -40 °C. The reaction was quenched at this temperature with triethylamine, methanol and $NaHCO_3$. The mixture was diluted in diethyl ether, washed with a solution on NaOH [0.1 M], KH_2PO_4 (5 %) and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. The residue was dissolved in pyridine (2.6 mL) and acetic anhydride (289 mg, 2.83 mmol, 11 eq) was added. The mixture was left to stir overnight at room temperature. The solution was azeotropically evaporated with toluene and purification by flash chromatography on silica gel (20 % - 40 % Ethyl acetate/petroleum ether) afforded the desired compound as white solid (170 mg, 81 %) whose ^1H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[189]

Compound 54 : Allyl [methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-α-L-idopyranosyluronate]-(1→4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



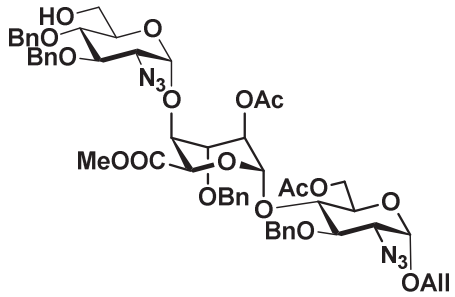
To a solution of compound **35** (170 mg, 0.207 mmol, 1.0 eq) in DCM (2.1 mL) was added trifluoroacetic acid (260 mg, 2.281 mmol, 11.0 eq). The mixture was left to stir during 2 h at room temperature. The reaction was quenched with triethylamine and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (20 % - 40 % Ethyl acetate/petroleum ether) afforded the desired compound as white solid (120 mg, 83 %), whose ^1H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[186]

Compound 75_1 : Allyl (2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)- (methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-α-L-idopyranosyluronate)-(1→4)-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



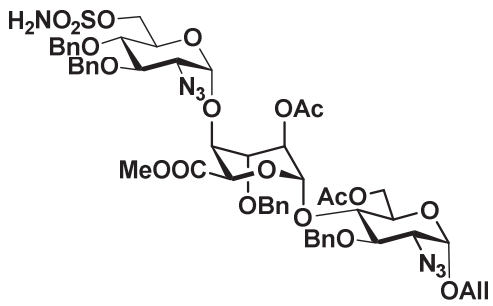
Compound **75_1** was prepared from acceptor **54** (80.0 mg, 0.114 mmol, 1.0 eq) and donor **55** (82.6 mg, 0.114 mmol, 1.3 eq) according the general procedure of glycosylation. Purification by flash chromatography on silica gel (15 % Acetone/Toluene) afforded the desired compound as white solid (100 mg, 82 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.41-7.20 (m, 20H, ArH), 5.88 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.47 (s, 1H, H-Benz), 5.29 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.20 (dd, $J_{cc,b}$ = 11.0 Hz, J = 1.0 Hz 1H, 1-Hcc), 5.14 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-HB), 4.89 – 4.83 (m, 4H, 1-HA, 1-HC, 2-HB, OCH_2Ph), 4.78 – 4.71 (d, J = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.69 – 4.60 (m, 5H, 5-HB, OCH_2Ph), 4.32 (d, J = 12.0 Hz, 1H, 6-H^bA), 4.22 – 4.09 (m, 2H, 6-H^aA, H-a), 4.01 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H-a'), 3.98 – 3.92 (m, 1H, 6-HC), 3.87 – 3.79 (m, 5H, 3-HA, 4-HA, 3-HB, 3-HC, 5-HC), 3.74 (dd, $J_{4,5}$ = 10.0 Hz, $J_{4,3}$ = 5.0 Hz, 1H, 4-HB), 3.60 (dd, $J_{5,4}$ = 10.0 Hz, $J_{5,6}$ = 5.0 Hz, 1H, 5-HA), 3.55 (d, J = 2.5, 1H, 4-HC), 3.42 (s, 3H, COOMe), 3.34 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, 2-HA), 3.22 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, 2-HC), 2.05 (s, 3H, CH_3 OAc), 1.98 (s, 3H, CH_3 OAc). **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 170.7, 169.9, 169.1 (C=O), 137.9, 137.7, 137.3, 137.3 ($C_{quat\ arom}$),133.1 (C-b), 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.45, 126.0, (C_{arom}), 118.3 (C-c), 101.5 (C-benz), 98.5 (C-1^C), 98.2 (C1^B), 96.6 (C-1^A), 82.5 (C-4^C), 78.5 (C-3^A), 75,6 (C-4^A), 75,4 (C-3^B), 74,5 (2C, *C*H_2Ph), 74,1 (C-3^C), 73,4 (2C, C-4^B, *C*H_2Ph), 69,2 (C-5^A), 69,1 (C-5^B), 68,8 (2C, C-2^B, Ca), 68,5 (C-6^C), 63,4 (C-2^A), 63,2 (C-5^C), 62,8 (C-2^C), 62,2 (C-6^A), 51,9, (COO*C*H_3), 20,8 (2C, C(O)*C*H_3) **; HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{54}H_{60}N_6NaO_{17}$ [M*Na*+] : 1087.3907, found 1087.4006.

Compound 76_1 : Allyl (2-azido-3,4 di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-(methyl-2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-α-L-idopyranosyluronate)-(1→4)-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



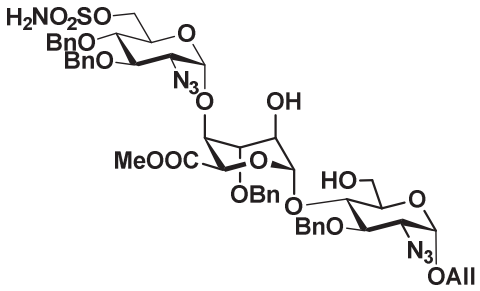
To a solution of compound **75$_1$** (30.0 mg, 0.028 mmol, 1.0 eq) in DCM (235 µL) were added Et_3SiH (3.6 mg, 0.031 mmol, 1.1 eq) and powdered 4-A molecular sieves (15.6 mg). The mixture was left to stir for 15 minutes and then cooled at -60 °C. $PhBCl_2$ (15.1 mg, 0.095 mmol, 3.4 eq) was added and the reaction mixture was left to stir during 1h at this temperature. The reaction was quenched at -60 °C with triethylamine, methanol and $NaHCO_3$. The mixture was diluted in diethyl ether, washed with a solution on NaOH [0.1 M], KH_2PO_4 (5 %) and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (20 % - 50 % Ethyl acetate/petroleum ether) afforded the compound as white solid (23.5 mg, 78 %) ; **^{1}H NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.32-7.20 (m, 20H, ArH), 5.90 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.30 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.20 (dd, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, J = 1.0 Hz, 1H, H-cc), 5.14 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-HB), 4.87 (m, 3H, 1-HA, 1-HC, 2-HB), 4.80 – 4.71 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.70 – 4.64 (m, 3H, 5-HB, OCH_2Ph), 4.60 (d, J = 10.5 Hz, 2H, OCH_2Ph), 4.32 (d, J = 12.0 Hz, 1H, 6-H^{b}A), 4.19 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 6-H^{a}A), 4.14 (ddt, J_{gem} = 13.5 Hz, $J_{a,b}$ = 5.5 Hz, $J_{a,cc}$ = $J_{a,ct}$ = 1.0 Hz 1H, H-a), 4.00 (dt, $J_{a',b}$ = 6.0 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ = 1.5 Hz, 1H, H-a'), 3.96 (t, J = 5.5 Hz, 1H, 4-HB), 3.87 (t, J = 5.0 Hz, 1H, 3-HB), 3.84 – 3.78 (m, 3H, 3-HA, 4-HA, 5-HA), 3.85 (dd, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz, $J_{3,2}$ = 9.5 Hz, 1H, 3-HC), (dt, J = 10.0 Hz, J = 3.0 Hz, 2H, 5-HC, 6-HC), 3.53 (t, J = 13.0 Hz, 1H, 4-HC), 3.53 (s, 3H, COOMe), 3.42 (dd, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, 2-HA), 3.23 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, 2-HC), 2.06 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.02 (s, 3H, CH_3 OAc), 1.66 (bs, 1H, OH) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.2, 169.6 (C=O), 138.1, 138.1, 137.8, 137.5 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 128.7, 128.7, 128.7, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7 (C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.3 (C-1^B), 98.0 (C-1^c), 96.8 (C-1^A), 79.8, 79.8, 78.7, 77.9 (C-4^C), 77.4, 75.6 (CH$_2$Ph), 75.5, 75.1, 75.0, 74.4 (C-3^B), 73.6 (CH$_2$Ph), 73.2 (C-4^B), 72.6, 69.4, 69.2 (C-5^B), 69.0 (C-a), 69.0 (C-2^B), 63.6 (C-2^A), 63.5 (C-2^C), 62.5, 62.4 (C-6^A), 61.6, 52.2 (COOCH$_3$), 21.0 (C(O)CH$_3$) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{54}H_{62}N_6O_{17}Na$ [M*Na*+] : 1089.4064, found : 1089.4027.

<u>Compound 77$_1$: Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-α-L-idopyranosyluronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



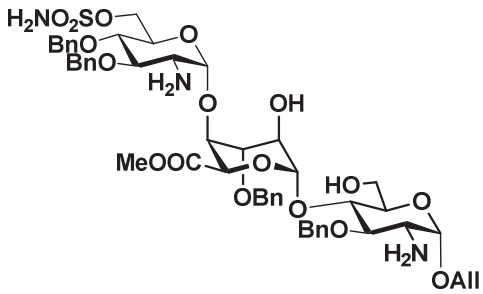
Compound **77$_1$** was prepared from compound **76$_1$** (23.5 mg, 0.022 mmol, 1.0 eq) according to the general procedure of sulfamoylation. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 10 % Acetone/Toluene) afforded the compound as white solid (23.5 mg, 78 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.38-7.18 (m, 20H, ArH), 5.93 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.35 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.25 (dd, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, J = 1.0 Hz 1H, H-cc), 5.11 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-HB), 4.94 (d, J =3.5 Hz, 2H, 1-HA, OCH_2Ph), 4.89 (t, J = 3.5 Hz, 1H, 2-HB), 4.85 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-HC), 4.83 – 4.58 (m, 9H, 5-HB, OCH_2Ph), 4.37 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 6-HA), 4.30 (dd, J_{gem} = 11.5 Hz, $J_{6,5}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-HC), 4.27 – 4.23 (m, 3H, H-a, 6-HA, 6-HC), 4.06 (dt, $J_{a',b}$ = 6.0 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ = 1.5 Hz, 1H, H-a'), 4.03 – 3.99 (m, 1H, 4-HB), (dq, $J_{5,4}$ = 10.5 Hz, $J_{5,6\alpha}$ = $J_{5,6\beta}$ = 2.0 Hz, 5-HC), 3.92 – 3.77 (m, 5H, 3-HA, 3-HB, 3-HC, 4-HA, 5-HA), 3.52 – 3.47 (m, 1H, 4-HC), 3.45 (s, 3H, COOMe), 3.37 (dd, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, 2-HA), 3.22 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, 2-HC), 2.09 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.06 (s, 3H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.2, 169.6 (C=O), 138.0, 137.7, 137.6, 137.3 ($C_{quat\ arom}$), 133.3(C-b), 129.9, 129.2, 128.8, 128.8, 128.7, 128.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.7 (C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.4 (C-1^B), 98.2 (C-1^C), 96.8 (C-1^A), 79.9 (C-3^C), 78.7 (C-3^A), 77.6 (C-4^C), 75.4 (CH$_2$Ph), 75.3 (CH$_2$Ph), 75.2 (C-4^A), 74.9 (CH$_2$Ph), 73.9 (C-3^B), 73.8 (C-4^B), 73.2 (CH$_2$Ph), 70.2 (C-5^C), 69.4 (C-5^A), 69.0 (C-a), 68.9 (C-6^C), 68.4 (C-5^B), 68.1 (C-2^B), 63.7 (C-2^A), 63.4 (C-2^C), 62.5 (C-6^A), 52.4 (COOCH$_3$), 21.1 (C(O)CH$_3$), 21.0 (C(O)CH$_3$) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{54}H_{63}N_7O_{19}SNa$ [M*Na*+] : 1168.3792, found : 1168.3758.

<u>Compound 78$_1$: Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-α-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



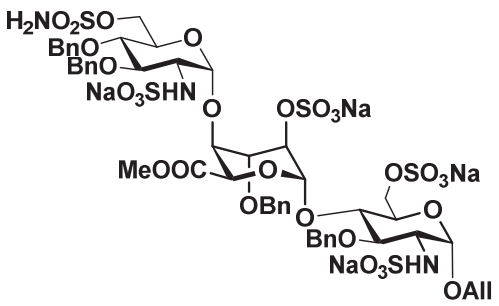
Compound **78₁** was prepared from compound **77₁** (210 mg, 0.183 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of deacetylation. Purification by flash chromatography on silica gel (10 % - 30 % Acetone/Toluene + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as white solid (145 mg, 75 %).**^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.34 – 7.07 (m, 20H, ArH), 5.88 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.29 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.19 (m, 2H, H-ct, 1-HB), 5.02 (s (br), 2H, NH_2), 4.88 (d, *J* =3.5 Hz, 2H, 1-Hgluc), 4.81 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 5-HB), 4.77 – 4.71 (m, 3H, OCH_2Ph), 4.66 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.60 – 4.51 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.19 (dd, J_{gem} = 11.0 Hz, $J_{6,5}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-HC), 4.16 – 4.07 (m, 2H, 6-H), 4.03 – 3.95 (m, 2H, 6-H, 4-HB), 3.87 – 3.81 (m, 2H, 3-HB, 5-HC), 3.80 – 3.65 (m, 6H, H-a, 2-HB, 3-Hgluc, 4-HA), 3.61 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 5-HA), 3.49 – 3.38 (m, 2H, 2-HA, 4-HC), 3.35 (s, 3H, COOMe), 3.33 – 3.29 (m, 1H, 2-HC), 2.19 (s (br), 1H, OH) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.0, (C=O), 138.0, 137.6, 137.4, 137.3 ($C_{quat\ arom}$), 133.4 (C-b), 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.6, 127.4 (C_{arom}), 118.4 (C-c), 101.0 (C-1^B), 96.9 (C-1^{gluc}), 96.2 (C-1^{gluc}), 80.8 (C-3^{gluc}), 78.6 (C-4^A), 77.4 (C-4^C), 76.0 (*C*H_2Ph), 75.1 (*C*H_2Ph), 74.6 (*C*H_2Ph), 74.3 (C-3^B), 73.2 (C-4^B), 73.0 (C-5^c), 72.7 (*C*H_2Ph), 71.8 (C-3^{gluc}), 70.3 (C-5^A), 68.8 (C-6), 67.9 (C-5^B), 67.2 (C-3^{gluc}), 63.8 (C-2^A), 63.6 (C-2^C), 61.6 (C-a), 57.0 (C-2^B), 52.6 (COO*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{50}H_{59}N_7O_{17}S$ [M*Na*+] : 1084.3580,found : 1084.3520.

<u>Compound 79₁ : Allyl (2-amino-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-α-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



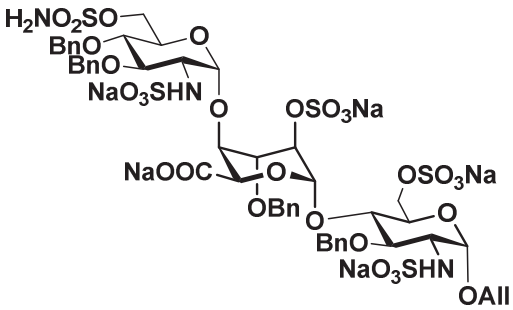
Compound **79₁** was prepared from compound **78₁** (145 mg, 0.137 mmol, 1eq) according the general procedure of azide reduction. Purification by flash chromatography on silica gel (2 % - 4 % Methanol/Dichloromethane + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as white solid (125 mg, 91 %).

<u>Compound 80₁ : Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-α-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamine-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl tetrasodium salt.</u>



Compound **80₁** was prepared from compound **79₁** (115 mg, 0.108 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of *N*, *O*-sulfonation. Purification afforded the compound as white solid (78 mg, 51 %). **^{1}H NMR** (360 MHz, D_20) δ (ppm) 7.56 – 7.15 (m, 20H, ArH), 5.99 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.35 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.0 Hz, 1H, H-cc), 5.23 (d, $J_{cc,b}$ = 17.0 Hz, 1H, H-ct), 5.18 – 5.13 (m, 2H, 1-HB, 1-HC), 5.10 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 1-HA), 4.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.83 (s, 1H, 5-HB), 4.80 – 4.74 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.68 – 4.61 (m, 3H, OCH_2Ph), 4.55 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.46 (s, 1H, 2-HB), 4.42 (s, 1H, 3-HB), 4.32 – 4.21 (m, 3H, OCH_2Ph, 6-H), 4.20 – 4.11 (m, 3H, H-a, 4-HB, 6-H), 4.04 (dd, $J_{a,a'}$ = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 6.5 Hz, 1H, H-a), 4.01 – 3.95 (m, 1H, 5-HA), 3.38 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, 2-HA), 3.30 – 3.21 (m, 4H, COOMe, 2-HC) ; **^{13}C NMR** from HSQC (360 MHz, D_2O) δ (ppm) 133.4 (C-b), 118.0 (C-c), 100.1 (C-1^C), 97.8 (C-1^B), 96.2 (C-1^A), 79.0 (C-3^C), 77.4 (C-3^A), 76.1 (C-4^C), 75.8 (CH_2Ph), 75.8 (CH_2Ph), 75.6 (C-4^B), 74.3 (C-3^B), 74.7 (CH_2Ph), 74.4 (CH_2Ph), 74.3 (CH_2Ph), 73.5 (C-4^a), 73.0 (C-3^b), 72.5 (CH_2Ph), 70.8 (C-2^B), 68.8 (C-a), 68.8 (C-5^a), 68.7 (C-5^c), 67.5 (C-6), 66.7 (C-5^B), 66.5 (C-6), 58.1 (C-2^C), 57.5 (C-2^a), 52.3 ($COOCH_3$).

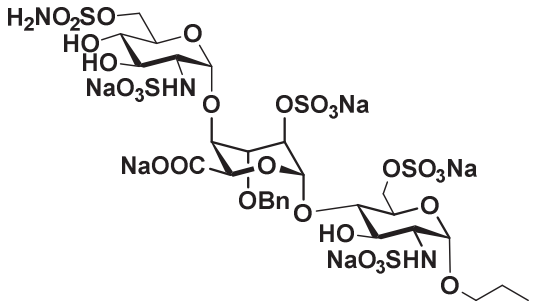
<u>Compound 83₁ : Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-α-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamine-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl tetrasodium salt.</u>



Compound **83₁** was prepared from compound **80₁** (78 mg, 55.4 μmol, 1.0 eq) according to the general procedure of saponification. Purification afforded the compound as a white solid (48 mg, 65 %). **^{1}H NMR** (360 MHz, D_20) δ (ppm) 7.45 – 7.19 (m, 20H, ArH), 5.91 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b),5.32 – 5.24 (m, 2H, H-cc, 1-HB), 5.20 – 5.13 (m, 2H, H-ct, 1-HC), 5.04 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 1-HA), 4.97 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.80 – 4.65 (2H under D_2O

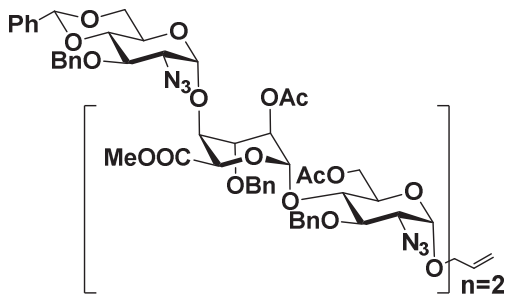
peak, OCH_2Ph), 4.65 – 4.45 (m, 7H, 2-HB, 5-HB, OCH_2Ph), 4.33 (q, *J* = 12.0 Hz, 2H, 6-H), 4.27 – 4.07 (m, 5H, H-a, 3-HB, 4-HB, 6-H), 4.01 – 3.92 (m, 2H, 5-HA, 5-HC), 3.85 – 3.74 (m, 2H, 3-HC, 4-HA), 3.61 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H, 3-HC), 3.52 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H, 3-HC), 3.32 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, 2-HC), 3.27 (dd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, 2-HA) ; **^{13}C NMR** from HSQC (360 MHz, D_2O) δ (ppm) 133.6 (C-b), 118.1 (C-c), 98.2 (C-1^C), 97.7 (C-1^B), 96.2 (C-1^A), 79.4 (C-3^C), 76.7 (C-3^A), 76.5 (C-4^C), 75.7 (CH_2Ph), 75.1 (C-4^B), 74.9 (C-3^B), 74.8 (CH_2Ph), 74.6 (C-4^a), 72.6 (CH_2Ph), 72.5 (CH_2Ph), 72.3 (C-2^b), 68.7 (C-5^a), 68.6 (C-5^c), 68.5 (C-a), 68.4 (C-5^B), 67.9 (C-6), 66.8 (C-6), 58.2 (C-2^C), 56.8 (C-2^a) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{49}H_{56}Na_5O_{29}S_5$ [M-*2Na+H*]$^-$: 1380.1380, found :1380.1327.

<u>Compound 85_1 : 1-Propyl (2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-α-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamine-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl tetrasodium salt.</u>



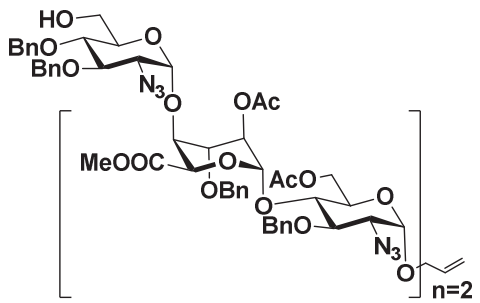
Compound **85_1** was prepared from compound **83_1** (10 mg, 7.0 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of hydrogenolysis. Purification afforded the compound as a white solid (3 mg, 43 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, D_20) δ (ppm) 5.36 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-HC), 5.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 1-HB), 5.08 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 1-HA), 4.78 – 4.64 (5-HB under D2O peak), 4.41 (dd, J_{gem} = 11.0 Hz, $J_{6,5}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 4.34 – 4.23 (m, 4H, 4-HB, 6-H), 4.16 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, 3-HB), 4.04 (s, 1H, 4-HB), 4.02 – 3.94 (m, 2H, 5-Hgluc), 3.71 – 3.58 (m, 4H, H-a, 3-Hgluc, 4-Hgluc), 4.51 – 3.41 (m, 2H, H-a, 4-Hgluc), 3.25 – 3.15 (m, 2H, 2-Hgluc), 1.58 (sex, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-b), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-c) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 99.1 (C-1^B), 97.1 (C-1^C), 96.9 (C-1^A), 77.0 (C-4^{gluc}), 76.1 (C-4^B), 76.0 (C-2^B), 70.9 (C-3^{gluc}), 70.3 (C-a), 70.1 (C-3^{gluc}), 69.6 (C-5^{gluc}), 69.3 (C-4^{gluc}), 69.2 (C-5^B), 69.0 (C-3^B), 68.6 (C-5^{gluc}), 68.0 (C-6), 66.9 (C-6), 58.0 (C-2^{gluc}), 57.8 (C-2^{gluc}), 21.9 (C-b), 9.9 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{21}H_{34}N_3Na_5O_{29}S_5$ [M-*Na*+] : 1043.9478, found : 1043.9418.

<u>Compound 75_2 : Allyl (2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



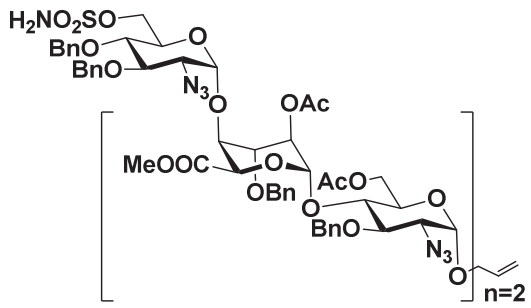
Compound **75$_2$** was prepared from acceptor **74$_2$** (100 mg, 0.143 mmol, 1.0 eq) and donor **73** (222 mg, 0.0.186 mmol, 1.3 eq) according the general procedure of glycosylation. Purification by flash chromatography on silica gel (10 % - 30 % Ethyl acetate/Toluene) afforded the desired compound as white solid (222 mg, 91 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.46 - 7.25 (m, 30H, ArH), 5.93 (ddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.53 (s, 1H, H-Benz), 5.34 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.38 - 5.20 (m, 3H, H-cc, 1-H$_{idu}$), 4.95 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 1-H$_{gluc}$), 4.93 – 4.87 (m, 5H, 1-H$_{gluc}$, 2-H$_{idu}$, OCH$_2$Ph), 4.82 (dd, J = 10.5 Hz, J = 8.0 Hz, 2H, OCH$_2$Ph), 4.75 – 4.62 (m, 8H, 5-HD, OCH$_2$Ph), 4.59 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 5-HB), 4.36 (t, J = 15.0 Hz, 2H, 6-H), 4.26 – 4.14 (m, 4H, 6-H, H-a), 4.04 (ddt, J_{gem} = 13.5 Hz, $J_{a,b}$ = 6.0 Hz, $J_{a,cc}$ = $J_{a,ct}$ = 1.0 Hz, 1H, H-a'), 4.00 – 3.96 (m, 2H, 4-H$_{idu}$), 3.92 – 3.77 (m, 9H, 3-H$_{idu}$, 3-H$_{gluc}$, 4-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$, 6-H), 3.69 – 3.62 (m, 3H, 3-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$), 3.51 (s, 3H, COOMe), 3.47 (s, 3H, COOMe), 3.28 (t, J = 4.5 Hz, 1H, 2-HA), 3.26 (t, J = 4.5 Hz, 1H, 2-H$_{gluc}$), 2.10 (s, 3H, CH$_3$ OAc), 2.07 (s, 3H, CH$_3$ OAc), 2.05 (s, 3H, CH$_3$ OAc), 2.00 (s, 3H, CH$_3$ OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.8, 170.2, 170.0; 169.5, 169.5 (C=O), 138.1, 137.9, 137.8, 137.5, 137.4 (C$_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 129.3, 129.2, 129.2, 128.8, 128.7, 128.7, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 126.2 (C$_{arom}$), 118.6 (C-c), 101.7 (C-H$_{benz}$), 99.0 (C-1^{gluc}), 98.3 (C-1^{idu}), 97.5 (C-1^{gluc}), 96.8 (C-1^{gluc}), 82.7 (C-5^{E}), 78.6 (C-3^{gluc}), 78.2 (C-3^{gluc}), 77.4, 75.9, 75.7 (C-4^{gluc}), 75.5, 75.4, 75.0 (O*C*H$_2$Ph), 74.1, 73.8 (O*C*H$_2$Ph), 73.6 (C-4^{idu}), 72.9 (C-4^{idu}), 70.2 (C-2^{idu}), 70.1 (C-5^{B}), 69.9, 69.5, 69.5 (C-5^{D}), 69.0 (C-a), 69.0 (C-2^{idu}), 68.7, 63.6, 63.5 (C-2^{gluc}), 63.3 (C-2^{gluc}), 63.0 (C-2^{gluc}), 62.4 (C-6), 61.9 (C-6), 52.1 (COO*C*H$_3$), 21.1 (C(O)*C*H$_3$), 21.0 (C(O)*C*H$_3$), 20.9 (C(O)*C*H$_3$) ; **HRMS** *m/z* (ESI) calculated for $C_{85}H_{95}N_9O_{29}Na$ [M*Na*+] : 1728.6128 found : 1728.6247.

<u>Compound 76$_2$: Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



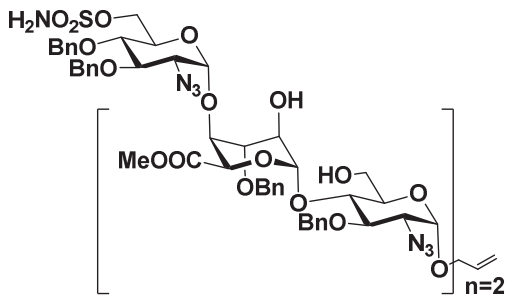
Compound **76₂** was prepared from Compound **75₂** (80 mg, 0.047 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of reductive opening. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 15 % Acetone/Toluene) afforded the desired compound as white solid (77 mg, 96 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.33 - 7.17 (m, 30H, ArH), 5.87 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.34 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.21 - 5.13 (m, 3H, H-cc, 1-H_{idu}), 4.92 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 4.89 – 4.82 (m, 4H, 1-H_{gluc}, 2-H_{idu}), 4.81 – 4.71 (m, 5H, OCH_2Ph), 4.68 – 4.62 (m, 5H, 5-HD, OCH_2Ph), 4.60 – 4.52 (m, 3H, 5-HB, OCH_2Ph), 4.33 (t, J = 10.5 Hz, 2H, 6-H), 4.21 – 4.09 (m, 3H, 6-H, H-a), 4.01 – 3.90 (m, 3H, H-a', 4-H_{idu}), 3.88 – 3.73 (m, 7H, 3-H_{idu}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.72 – 3.61 (m, 3H, 3-H_{gluc}, 6-H), 3.60 – 3.52 (m, 2H, 3-H_{gluc}, 6-H), 3.51 – 3.38 (m, 7H, COOMe, 5-H_{gluc}), 3.35 - 3.28 (m, 1H, 2-HA), 3.20 (dd, J = 10.0 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 2-H_{gluc}), 3.14 (dd, J = 10.0 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 2-H_{gluc}), 2.04 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.02 (s, 3H, CH_3 OAc), 1.99 (s, 3H, CH_3 OAc), 1.97 (s, 3H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.8, 170.8, 170.1, 169.9, 169.7, 169.5 (C=O), 138.1, 138.0, 137.8, 137.7, 137.5, 137.5 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 128.7, 128.7, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7 (C_{arom}), 118.5 (C-c), 98.2, (C-1^{idu}), 98.2 (C-1^{gluc}), 97.4 (C-2^{idu}), 96.8 (C-2^{idu}), 79.8, 78.6, 78.1 (C-3^{gluc}), 77.9 (C-5^{gluc}), 77.4, 75.9, 75.5 (O*C*H_2Ph), 75.4, 75.1, 75.0 (O*C*H_2Ph), 74.9 (O*C*H_2Ph), 74.1 (O*C*H_2Ph), 73.7, 73.5 (O*C*H_2Ph), 73.3, 72.8, 72.6, 70.1 (C-2^{gluc}), 69.8 (C-5^B), 69.4 (C-5^D), 68.9 (C-2^{gluc}, C-a), 63.5 (C-2^A), 63.4 (C-2^{gluc}), 63.2 (C-2^{gluc}), 62.4 (C-6), 61.9 (C-6), 61.5 (C-6), 52.2 (COO*C*H_3), 52.1 (COO*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3) ; **HRMS** *m/z* (ESI) calculated for $C_{85}H_{97}N_9O_{29}Na$ [M*Na*+] : 1730.6284 found : 1730.6321.

<u>Compound 77₂ : Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



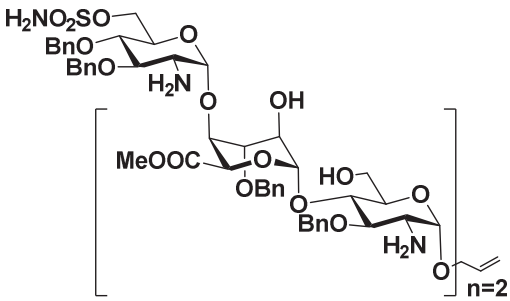
Compound **77₂** was prepared from Compound **76₂** (205 mg, 0.120 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of sulfamoylation. Purification by flash chromatography on silica gel (10 % - 30 % Ethyl acetate/Toluene) afforded compound as white solid (175 mg, 82 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.32 - 7.17 (m, 30H, ArH), 5.87 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.29 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.19 (dd, $J_{cc,b}$ = 10.0 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.11 (dd, J = 15.5 Hz, J = 3.0 Hz, 2H, 1-H_{idu}), 4.89 – 4.83 (m, 4H, 1-H_{gluc}, 2-H_{idu}), 4.82 – 4.78 (m, 3H, 2-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.77 – 4.71 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.69 – 4.61 (m, 6H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.60 – 4.53 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.31 (t, J = 11.5 Hz, 2H, 6-H), 4.26 – 4.17 (m, 2H, 6-H), 4.17 – 4.08 (m, 3H, 6-H, H-a), 4.02 – 3.89 (m, 4H, H-a', 4-H_{idu}, 5-H_{gluc}), 3.87 – 3.70 (m, 8H, 3-H_{idu}, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.59 (t, J = 9.0 Hz, 1H, 3-H_{gluc}), 3.50 – 3.36 (m, 7H, COOMe, 5-H_{gluc}), 3.35 - 3.29 (m, 1H, 2-HA), 3.21 (dd, J = 10.0 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 2-H_{gluc}), 3.16 (dd, J = 10.0 Hz, J = 3.5 Hz, 1H, 2-H_{gluc}), 2.08 – 1.94 (m, 12H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.8, 170.2, 170.0, 169.6, 169.4 (C=O), 138.1, 137.8, 137.7, 137.5, 137.4, 137.3 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 128.8, 128.8, 128.7, 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 127.8, 127.8, 127.7 (C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.4 (C-1^{gluc}), 98.4 (C-1^{idu}),98.2 (C-1^{idu}), 97.2 (C-1^{gluc}), 96.8 (C-1^{gluc}), 79.9, 79.9, 78.6, 78.3 (C-3^{gluc}), 78.2, 77.4 (C-5^{gluc}), 75.8, 75.5 (O*C*H_2Ph), 75.2 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 74.9, 74.7 (O*C*H_2Ph), 74.7, 74.7, 73.7, 73.6 (O*C*H_2Ph), 73.4 (O*C*H_2Ph), 73.4 (C-^{4gluc}), 73.4, 72.6, 72.6, 70.2, 69.9, 69.9, 69.4, 69.2 (C-5^{idu}), 69.2 (C-2^{idu}), 69.1 (C-5^{idu}), 69.0 (C-a), 68.9, 68.7 (C-2^{idu}), 63.6 (C-2^{gluc}), 63.4 (C-2^{gluc}), 63.3 (C-2^{gluc}), 62.4 (C-6), 62.0 (C-6), 52.4 (COO*C*H_3), 52.1 (COO*C*H_3), 29.9, 21.0 (C(O)*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{85}H_{98}N_{10}O_{31}SNa$ [M*Na*+] : 1809.6012 found : 1809.6117.

<u>Compound 78₂ : Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



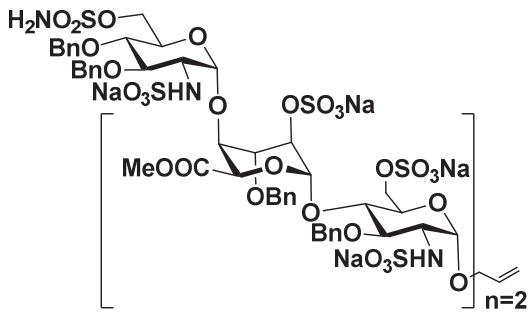
Compound **78₂** was prepared from compound **77₂** (110 mg, 0.062 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of deacetylation. Purification by flash chromatography on silica gel (20 % - 30 % Dichloromethane/Ethyl acetate + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as white solid (72 mg, 88 %); **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.43 - 7.15 (m, 30H, ArH), 5.97 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.40 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.32 – 5.26 (m, 2H, H-cc, 1-H_{idu}), 5.22 (s, 1H, 1-H_{idu}), 5.01 – 4.95 (m, 3H, 1-H_{gluc}), 4.93 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 5-H_{idu}), 4.77 – 4.81 (m, 3H, OCH_2Ph), 4.78 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 5-H_{idu}), 4.77 – 4.53 (m, 9H, OCH_2Ph), 4.32 – 4.27 (m, 1H, 6-H), 4.24 (dd, $J_{a,a'}$ = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 6.0 Hz, 1H, H-a), 4.18 (dd, J_{gem} = 11.5 Hz, $J_{6,5}$ = 5.0 Hz, 1H, 6-H), 4.10 (d, $J_{a'-b}$ = 6.0 Hz, 1H, H-a'), 4.08 – 4.04 (m, 2H, 6-H, 4-H_{idu}), 3.98 (t, J = 10.0 Hz, 1H, 4-H_{idu}), 3.93 – 3.71 (m, 12H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 2-H_{idu}, 3-H_{idu}, 6-H), 3.65 – 3,59 (m, 2H, 3-H_{gluc}), 3.57 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 2-H_{gluc}), 3.52 (s, 3H, COOMe), 3.50 – 3.40 (m, 4H, 2-H_{gluc}, 4-H_{gluc}), 3.35 (s, 3H, COOMe) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.2, 169.8 (C=O), 138.1, 137.8, 137.6, 137.4, 137.3, 137.2 ($C_{quat\ arom}$), 133.4 (C-b), 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.5, 127.3 (C_{arom}), 118.4 (C-c), 101.1 (C-1^{gluc}), 100.9 (C-1^{idu}), 96.9 (C-1^{idu}), 96.6 (C-1^{gluc}), 95.7 (C-1^{gluc}), 80.7, 79.3 (C-3^{gluc}), 78.7, 77.4, 77.4, 75.9 (O*C*H_2Ph), 75.1 (O*C*H_2Ph), 74.6 (O*C*H_2Ph), 74.2, 74.1, 74.0, 73.3, 72.9 (O*C*H_2Ph), 72.7 (O*C*H_2Ph), 72.7 (C-4^{idu}), 72.6, 72.5, 71.9, 70.3, 68.8 (C-a), 68.3 (C-5^{idu}), 67.8 (C-5^{idu}), 67.7, 67.0, 64.3 (C-2^{gluc}), 63.8 (C-2^{gluc}), 63.6 (C-2^{gluc}), 61.7 (C-6), 61.2 (C-6), 52.7 (COO*C*H_3), 52.3 (COO*C*H_3), 29.9; **HRMS** *m/z* (ESI) calculated for $C_{77}H_{90}N_{10}NaO_{27}S$ [M*Na*+] : 1641.5590 found : 1641.5636.

<u>Compound 79₂ : Allyl (2-amino-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



Compound **79₂** was prepared from compound **78₂** (63 mg, 39.51 µmol, 1.0 eq) according the general procedure of azide reduction. Purification by flash chromatography on silica gel (2 % - 4 % Methanol/Dichloromethane + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as white solid (57 mg, 93 %) ; **^{1}H NMR** (360 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.48 - 7.08 (m, 30H, ArH), 5.98 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.33 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.5 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.24 – 5.15 (m, 3H, H-cc, 1-H_{idu}), 5.01 (d, J = 4.5 Hz, 2H, 1-H_{gluc}), 4.94 – 4.82 (m, 3H, 1-H_{gluc}, 5-H_{idu}), 4.82 – 4.75 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.74 – 4.63 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.56 (d, J = 11.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.47 (d, J = 11.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.33 – 4.20 (m, 3H, 6-H, H-a), 4.11 – 4.05 (m, 2H, 4-H_{idu}), 4.01 (dd, J_{gem} = 13 Hz, $J_{a,b}$ = 6 Hz, 1H, H-a'), 3.96 – 3.89 (m, 3H, 3-$H_{idu,}$ 4-H_{gluc}), 3.85 – 3.77 (m, 4H, 2-H_{idu}, 4-H_{gluc}, 6-H), 3.62 – 3.42 (m, 11H, COOMe, 3-$H_{gluc,}$ 5-H_{gluc}), 3.83 - 3.73 (m, 3H, 2-H_{gluc}) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm) 168.8, 168.6 (C=O), 137.1, 137.0, 136.6, 136.6, 136.4 ($C_{quat\ arom}$), 132.5 (C-b), 126.7, 126.5, 126.4, 126.4, 126.0, 125.8, 125.6, 125.5 (C_{arom}), 114.6 (C-c), 99.5 (C-1^{idu}), 99.4 (C-1^{idu}), 96.5 (C-1^{gluc}), 96.1 (C-1^{gluc}), 95.9 (C-1^{gluc}), 80.7 (C-3^{gluc}), 80.0 (C-3^{gluc}), 79.5 (C-3^{gluc}), 79.3 (C-5^{gluc}), 76.3 (C-5^{gluc}), 73.7 (O*C*H_2Ph), 73.5 (O*C*H_2Ph), 73.3 (C-3^{idu}), 73.1 (O*C*H_2Ph), 73.0 (O*C*H_2Ph), 72.9 (O*C*H_2Ph), 72.8 (O*C*H_2Ph), 72.7 (C-4^{gluc}), 71.5 (C-5^{gluc}), 71.0 (C-3i^{du}), 70.8 (C-4^{idu}), 70.7 (O*C*H_2Ph), 68.7 (C-3^{idu}), 67.3, 67.0 (C-5^{idu}), 66.8 (C-5^{idu}), 66.4 (C-a), 66.0 (C-6), 58.7 (C-6), 58.3 (C-6), 53.8 (C-2^{gluc}), 53.7 (C-2^{gluc}), 49.8 (COO*C*H_3), 46.1 (COO*C*H_3); **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{77}H_{97}N_4O_{27}S$ [M*Na*+] : 1541.6055 found : 1541.6028.

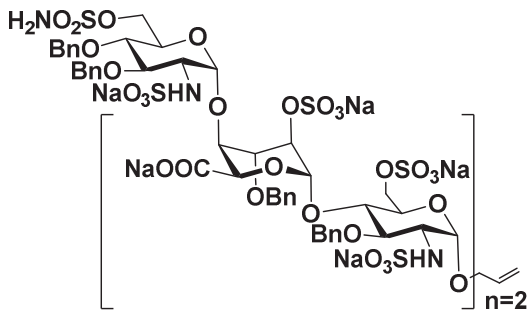
<u>Compound 80₂ : Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl heptasodium salt.</u>



Compound **80₂** was prepared from compound **79₂** (115 mg, 0.108 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of *N*, *O*-sulfonation. Purification afforded the compound as white solid (77 mg, 48 %). **^{1}H NMR** (360 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.56 – 7.24 (m, 30H, ArH), 6.04 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.44 – 5.36 (m, 2H, H-ct, 1-H_{idu}), 5.30 – 5.19 (m, 4H, H-cc, 1-H_{idu}, 1-H_{gluc}), 5.17 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 4.99 (d, J = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.93 – 4.86 (m, 3H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.84 – 4.74 (OCH_2Ph under HOD peak), 4.74 – 4.58 (m, 6H, OCH_2Ph), 4.58 –

4.55 (m, 1H, 2-H_{idu}), 4.52 – 4.47 (m, 2H, 2-H_{idu}, 3-H_{idu}), 4.43 (d, J = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.36 – 4.30 (m, 3H, 3-H_{idu}, 6-H), 4.29 – 4.15 (m, 6H, H-a, 3-H_{idu}, 4-H_{idu}, 6-H, OCH_2Ph), 4.14 – 4.04 (m, 3H, H-a', 4-H_{idu}, 6-H), 3.88 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 5-H_{gluc}), 3.84 – 3.78 (m, 2H, 3-$H_{gluc,}$ 4-H_{gluc}), 3.75 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 4-H_{gluc}), 3.71 – 3.54 (m, 3H, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.54 – 3.42 (m, 3H, 2-H_{gluc}, 3-H_{gluc}), 3.40 – 3.27 (m, 8H, 2-H_{gluc}, COOMe) ; **^{13}C NMR** from HSQC (360 MHz, D_2O) δ (ppm) 133.6 (C-b), 118.1 (C-c), 100.1 (C-1^{gluc}), 98.5 (C-1^{gluc}), 98.1 (C-1^{idu}), 97.7 (C-1^{idu}), 96.3 (C-1^{gluc}), 79.1 (C-3^{gluc} or C-4^{gluc}), 77.6 (C-4^{gluc}), 77.2 (C-3^{gluc}), 76.3 (C-3^{gluc}), 76.0 (C-3^{idu} or C-4^{idu}), 76.0 (O*C*H_2Ph), 75.9 (O*C*H_2Ph), 75.3 (O*C*H_2Ph), 74.6 (O*C*H_2Ph), 74.3 (O*C*H_2Ph), 74.2 (O*C*H_2Ph), 74.1 (C-4^{idu}), 74.0 (C-3^{gluc} or C-4^{gluc}), 73.6 (C-3^{idu}), 72.9 (C-3^{idu}), 72.6 (O*C*H_2Ph), 72.5 (C-4^{idu}), 71.6 (C-2^{idu}), 70.6 (C-2^{idu}), 69.8 (C-5^{gluc}), 68.8 (C-5^{gluc}), 68.7 (C-a), 67.3 (C-6), 67.3 (C-5^{idu}), 66.8 (C-6), 66.6 (C-5^{idu}), 65.9 (C-6), 58.2 (C-2^{gluc}), 57.8 (C-2^{gluc}), 57.4 (C-2^{gluc}), 52.4 (COO*C*H_3), 52.2 (COO*C*H_3) **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{77}H_{89}N_4Na_7O_{48}S_8$ [M-*2Na*]$^{2-/}$2 : 1104.0955, found : 1104.0893, [M-*3Na*]$^{3-/}$3 : 728.4006, found : 729.0664.

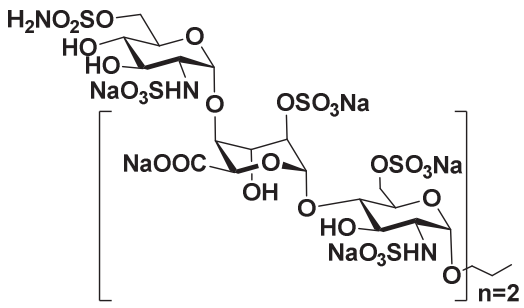
Compound 83_2 : Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl heptasodium salt.



Compound **83_2** was prepared from compound **80_2** (15 mg, 6.7 µmol, 1.0 eq) according the general procedure of saponification. Purification afforded the compound as white solid (9 mg, 60 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.57 – 7.232 (m, 30H, ArH), 6.03 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.52 – 5.44 (m, 2H, 1-H_{idu}), 5.40 (dd, $J_{cc,b}$ = 17.0 Hz, $J_{cc,ct}$ = 1.0 Hz, 1H, H-cc), 5.33 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 5.31 – 5.26 (m, 2H, H-cc, 1-H_{gluc}), 5.17 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 4.99 (d, J = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.93 – 4.83 (m, 4H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.84 – 4.74 (OCH_2Ph under HOD peak), 4.75 – 4.68 (m, 4H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.67 (d, J = 2.0 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.65 – 4.59 (m, 3H, 2-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.59 – 4.56 (m, 1H, OCH_2Ph), 4.48 – 4.35 (m, 6H, 6-H), 4.34 – 4.22 (m, 4H, H-a, 3-H_{idu}, 4-H_{idu}), 4.22 – 4.18 (m, 1H, 4-H_{idu}), 4.18 – 4.13 (m, 1H, 5-H_{gluc}), 4.12 – 4.06 (m, 3H, H-a, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 4.01 – 3.89 (m, 3H, 3-$H_{gluc,}$ 4-H_{gluc}), 3.76 (d, J = 10.5 Hz, 2H, 3-H_{gluc}), 3.64 (t, J = 9.5 Hz, 1H, 5-H_{gluc}), 3.48 – 3.36 (m, 3H, 2-H_{gluc}) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz,

D_2O) δ (ppm) 133.8 (C-b), 118.0 (C-c), 98.6 (C-1^{gluc}), 98.1 (C-1^{gluc}), 97.8 (C-1^{idu}), 97.1 (C-1^{idu}), 96.1 (C-1^{gluc}), 79.6 (C-3^{gluc} or C-4^{gluc}), 77.4 (C-3^{gluc}), 76.8 (C-3^{gluc}), 76.7 (C-5^{gluc}), 75.7 (O*C*H$_2$Ph), 75.7 (O*C*H$_2$Ph), 75.2 (O*C*H$_2$Ph), 75.2 (C-3^{gluc} or C-4^{gluc}), 75.2 (O*C*H$_2$Ph), 75.2 (C-4^{idu}), 75.2 (C-3^{idu}), 75.0 (C-4^{idu}), 74.9 (O*C*H$_2$Ph), 74.7 (O*C*H$_2$Ph), 74.5 (C-3^{idu}), 72.7 (O*C*H$_2$Ph), 72.7 (O*C*H$_2$Ph), 72.6 (C-3^{gluc} or C-4^{gluc}), 72.5 (C-2^{idu}), 72.2 (C-2^{idu}), 69.5 (C-5^{gluc}), 69.0 (C-5^{idu}), 68.7 (C-a), 68.7 (C-4^{gluc}), 68.7 (C-5^{gluc}), 68.2 (C-5^{idu}), 68.1 (C-6), 66.9 (C-6), 66.8 (C-6), 58.3 (C-2^{gluc}), 58.1 (C-2^{gluc}), 57.2 (C-2^{gluc}) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{75}H_{83}N_4Na_9O_{48}S_8$ [M-*2Na*]$^{2-/}$2 : 1112.0618, found : 1112.0554.

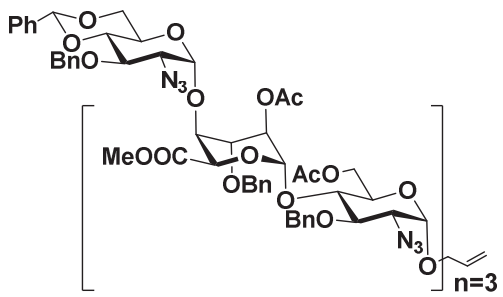
Compound 85$_2$: 1-Propyl (2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl heptasodium salt.



Compound **85$_2$** was prepared from compound **83$_2$** (6 mg, 2.64 µmol, 1.0 eq) according the general procedure of hydrogenolysis. Purification afforded the compound as white solid (1.73 mg, 35 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 5.45 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H$_{gluc}$), 5.42 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H$_{gluc}$), 5.27 – 5.22 (m, 2H, 1-H$_{idu}$), 5.16 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 1-H$_{gluc}$), 5.33 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H$_{gluc}$), 4.87 – 478 (Under HOD peak, 1H, 5-H$_{idu}$), 4.51 (dd, J_{gem} = 11.5 Hz, $J_{6,5}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 4.44 – 4.32 (m, 6H, 2-H$_{idu}$, 6-H), 4.31 – 4.23 (m, 2H, 3-H$_{idu}$, 6-H), 4.23 – 4.18 (m, 1H, 6-H), 4.15 – 4.01 (m, 5H, 4-H$_{idu}$, 5-H$_{gluc}$), 3.81 – 3.66 (m, 6H, H-a, 3-H$_{gluc}$, 4-H$_{gluc}$),3.58 – 3.50 (m, 2H H-a, 4-H$_{gluc}$), 3.34 – 3.23 (m, 3H, 2-H$_{gluc}$), 1.66 (sex, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-b), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-c) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 99.2 (C-1^{idu}), 99.1 (C-1^{idu}), 97.3 (C-1^{gluc}), 96.8 (C-1^{gluc}), 96.3, (C-1^{gluc}), 77.0 (C-4^{gluc}), 76.5 (C-2^{idu}), 76.2 (C-4^{idu}), 75.9 (C-4^{idu}), 75.8 (C-4^{gluc}), 75.5 (C-5^{idu}), 71.0 (C-3^{gluc}), 70.0 (C-a), 69.7 (C-5^{idu}), 69.6 (C-3^{gluc}), 69.5 (C-3^{idu}), 69.5 (C-5^{gluc}), 69.5 (C-3^{gluc}), 69.3 (C-4^{gluc}), 69.2 (C-5^{gluc}), 69.0 (C-5^{idu}), 68.8 (C-3^{idu}), 68.6 (C-5^{gluc}), 68.3 (C-6), 66.9 (C-6), 66.6 (C-6), 57.9 (C-2^{gluc}), 57.9 (C-2^{gluc}), 57.8 (C-2^{gluc}), 21.9 (C-b), 10.0 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{33}H_{49}N_4Na_9O_{48}S_8$ [M-*3Na+H*]$^{2-/}$2 : 831.9378, found : 831.9384.

Compound 75$_3$: Allyl (2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl

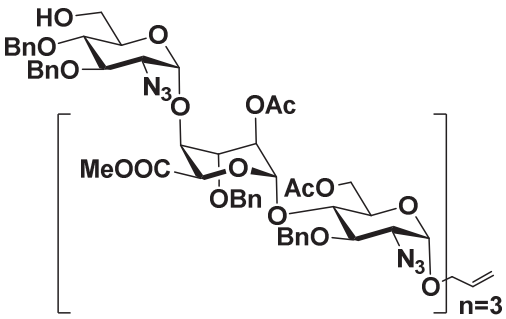
uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



Compound **75₃** was prepared from acceptor **74₃** (185 mg, 0.138 mmol, 1.0 eq) and donor **73** (215 mg, 0.179 mmol, 1.3 eq) according the general procedure of glycosylation. Purification by flash chromatography on silica gel (10 % - 30 % Ethyl acetate/Toluene) afforded the desired compound as white solid (281 mg, 87 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.46 - 7.25 (m, 40H, ArH), 5.87 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.53 (s, 1H, Hbenz), 5.34 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.0 Hz, 1H, H-ct), 5.29 – 5.20 (m, 4H, H-cc, 1-H_{idu}), 4.96 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H, 1-H_{gluc}), 4.93 – 4.88 (m, 6H, 1-H_{gluc}, 2-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.82 (t, *J* = 10.0 Hz, 3H OCH_2Ph), 4.75 – 4.69 (m, 8H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.68 – 4.62 (m, 3H, OCH_2Ph),4.58 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, 5-H_{idu}), 4.40 - 4.32 (m, 3H, 6-H), 4.26 – 4.15 (m, 5H, H-a, 6-H), 4.04 (dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H,H-a'), 4.01 – 3.96 (m, 3H, 4-H_{idu}), 3.94 – 3.90 (m, 3H, 3-H_{idu}), 3.90 – 3.76 (m, 10H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}) 3.65 (quint, *J* = 9.5 Hz, 4H, 3-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.54 – 3.46 (m, 9H, COOMe), 3.40 - 3.34 (m, 1H, 2-HA), 3.27 (sex, *J* = 4.0 Hz, 3H, 2-H_{gluc}), 2.10 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.08 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.06 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.04 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.01 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.00 (s, 3H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.8, 170.8, 170.1, 169.9, 169.9, 169.6, 169.5, 169.5 (C=O), 138.1, 137.8, 137.8, 137.8, 137.5, 137.5, 137.5, 137.4 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 129.3, 128.7, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.7, 126.2, (C_{arom}), 118.5 (C-c), 101.7 (C-H_{benz}), 99.0 (C-1^{gluc}), 98.2, (C-1^{idu}), 98.1 (C-1^{idu}),97.9 (C-1^{gluc}), 97.4 (C-1^{gluc}), 96.8 (C-1^{gluc}), 82.7 (C-5^{G}), 78.6, 78.2, 78.1 (C-3^{gluc}), 77.4, 75.9, 75.7, 75.5, 75.7 (C-3^{idu}), 75.1, 75.0 (O*C*H_2Ph), 74.9 (O*C*H_2Ph), 74.2 (O*C*H_2Ph), 73.8 (O*C*H_2Ph), 73.6 (C-4^{idu}), 73.3, 72.8 (C-4^{idu}), 70.4, 70.4, 70.3 (C-5^{idu}), 70.2 (C-5^{idu}), 69.9, 69.9, 69.5, 69.4 (C-5^{idu}), 69.1, 69.0 (C-a), 68.7 (C-2^{idu}), 63.5, 63.5 (C-2^{gluc}), 63.2, 63.1, 62.9 (C-2^{gluc}), 62.4 (C-6), 61.9 (C-6), 52.1 (COO*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{116}H_{130}N_{12}O_{41}Na$ [M*Na*+] : 2369.8349 found : 2369.8333.

Compound 76₃ : Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-

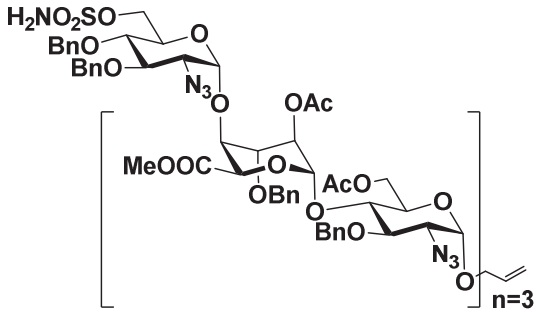
(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L -ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



Compound **76$_3$** was prepared from compound **75$_3$** (100 mg, 0.043 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of reductive opening. Purification by flash chromatography on silica gel (5% - 15 % Acetone/Toluene) afforded compound as white solid (86 mg, 86 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.34 - 7.25 (m, 40H, ArH), 5.93 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.34 (d, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, 1H, H-ct), 5.28 – 5.22 (m, 4H, H-cc, 1-H_{idu}), 4.99 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 4.96 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 4.94 – 4.89 (m, 5H, 1-H_{gluc}, 2-H_{idu}), 4.88 - 4.79 (m, 6H, OCH_2Ph), 4.73 – 4.68 (m, 7H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.67 – 4.60 (m, 5H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.58 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, 5-H_{idu}), 4.40 - 4.32 (m, 3H, 6-H), 4.25 – 4.16 (m, 4H, H-a, 6-H), 4.07 – 3.93 (m, 6H, H-a', 3-H_{idu}, 4-H_{idu}), 3.91 – 3.79 (m, 10H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.75 – 3.70 (m, 2H, 4-H_{gluc}, 6-H), 3.67 – 3.60 (m, 3H, 3-H_{gluc}, 6-H), 3.56 – 3.47 (m, 10H, 5-H_{gluc}, COOMe), 3.40 - 3.35 (m, 1H, 2-HA), 3.26 (dt, *J* = 10.0 Hz, *J* = 4.0 Hz, 2H, 2-H_{gluc}), 3.21 (dd, *J* = 10.5 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, 2-H_{gluc}), 2.10 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.08 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.07 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.04 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.03 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.01 (s, 3H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.8, 170.8, 170.2, 169.9, 169.7, 169.7, 169.5 (C=O), 138.0, 138.0, 137.8, 137.8, 137.7, 137.5, 137.5 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 128.7, 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.7 (C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.3 (C-1^{idu}), 98.2 (C-1^{idu}), 98.2 (C-1^{gluc}), 98.1, 97.8 (C-1^{gluc}), 97.4 (C-1^{gluc}), 96.7 (C-1^{gluc}), 79.8, 78.6, 78.1 (C-3^{gluc}), 77.8 (C-5^{gluc}), 77.4, 75.9, 75.7 (O*C*H_2Ph), 75.5 (O*C*H_2Ph), 75.1 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 74.2 (O*C*H_2Ph), 73.8, 73.6 (O*C*H_2Ph), 73.4, 73.3, 72.8, 72.6 (C-4^{gluc}), 70.4 (C-5^{idu}), 70.3 (C-2^{idu}), 70.2 (C-5^{idu}), 69.9, 69.8, 69.5 (C-5^{idu}), 69.4, 69.0 (C-a), 68.9 (C-2^{idu}), 63.5 (C-2^{A}), 63.4 (C-2^{gluc}), 63.1 (C-2^{gluc}), 63.1 (C-2^{gluc}), 62.3 (C-6), 61.9 (C-6), 61.5 (C-6), 52.2 (COO*C*H_3), 52.1 (COO*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{116}H_{132}N_{12}O_{41}Na$ [M*Na*+] : 2371.8505 found : 2371.8495.

Compound 77$_3$: Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl

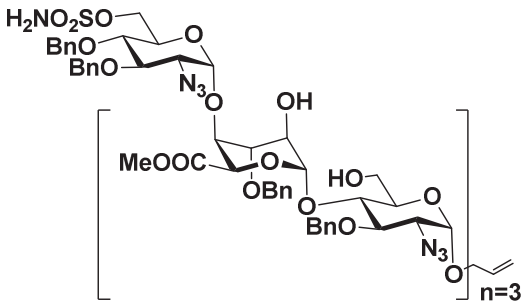
uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L -ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



Compound **77₃** was prepared from compound **76₃** (200 mg, 0.085 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of sulfamoylation. Purification by flash chromatography on silica gel (15 % - 30 % Ethyl acetate/Toluene) afforded the desired compound as white solid (164 mg, 80 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.35 - 7.26 (m, 40H, ArH), 5.93 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.34 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.26 – 5.23 (m, 2H, H-cc, 1-H_{idu}), 5.21 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-H_{idu}), 5.14 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-H_{idu}), 4.95 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 4.93 – 4.89 (m, 5H, 1-H_{gluc}, 2-H_{idu}), 4.88 - 4.84 (m, 3H, 2-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.82 – 4.78 (m, 7H, OCH_2Ph), 4.72 – 4.66 (m, 9H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.64 - 4.60 (m, 4H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.40 - 4.30 (m, 4H, 6-H), 4.28 – 4.24 (m, 1H, H-a), 4.22 – 4.14 (m, 5H, H-a', 6-H), 4.06 – 4.02 (m, 2H, 4-H_{idu}), 4.00 – 3.96 (m, 3H, 4-H_{idu}, 5-H_{gluc}), 3.92 – 3.84 (m, 8H, 3-H_{idu}, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc},), 3.82 – 3.76 (m, 4H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}), 3.66 – 3.61 (m, 2H, 3-H_{gluc}), 3.51 – 3.46 (m, 10H, 5-H_{gluc}, COOMe), 3.39 - 3.34 (m, 1H, 2-HA), 3.28 – 3.26 (m, 1H, 2-H_{gluc}), 3.26 – 3.20 (m, 2H, 2-H_{gluc}), 2.11 – 2.01 (m, 21H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.8, 170.2, 170.0, 170.0, 169.6, 169.6, 169.5 (C=O), 138.0, 137.8, 137.8, 137.7, 137.5, 137.5, 137.3 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 128.8, 128.8, 128.7, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 127.9, 127.9, 127.8 (C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.4 (C-1^{gluc}), 98.4 (C-1^{idu}), 98.2 (C-1^{idu}), 98.1 (C-1^{idu}), 97.7 (C-1^{gluc}), 97.3 (C-1^{gluc}), 96.8 (C-1^{gluc}), 79.9 (C-^{3gluc}), 78.6, 78.2 (C-3^{gluc}), 78.1 (C-^{3gluc}), 77.7 (C-5^{gluc}), 77.4, 75.9, 75.5 (O*C*H_2Ph), 75.5 (O*C*H_2Ph), 75.2, 75.1 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 74.9, 74.8 (O*C*H_2Ph), 74.7, 74.7, 74.0 (O*C*H_2Ph), 73.7 (O*C*H_2Ph), 73.7 (O*C*H_2Ph), 73.5 (O*C*H_2Ph), 73.0, 72.7 (C-4^{idu}), 70.2, 70.1 (C-5^{idu}), 69.9 (C-4^{gluc}), 69.9 (C-2^{idu}), 69.4 (C-2^{idu}), 69.4 (C-5^{idu}), 69.4 (C-5^{idu}), 69.3 (C-4^{gluc}), 68.9 (C-2^{idu}), 68.9 (C-a), 63.5 (C-2^{gluc}), 63.3 (C-2^{gluc}), 63.2 (C-2^{gluc}), 63.2 (C-2^{gluc}), 62.4 (C-6), 62.0 (C-6), 61.9 (C-6), 52.4 (COO*C*H_3), 52.1 (COO*C*H_3), 52.1 (COO*C*H_3), 21.1 (C(O)*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3); **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{116}H_{133}N_{13}O_{43}SNa$ [M*Na*+] : 2450.8233 found : 2450.8237.

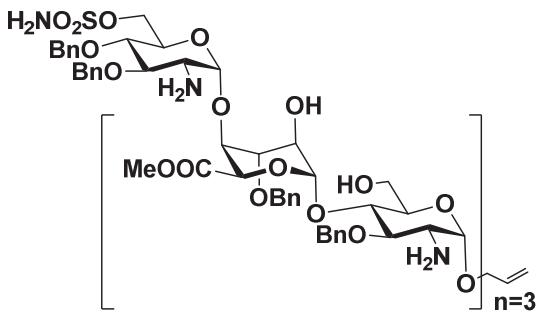
Compound 78₃ : Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-azido-3-*O*-

benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L -ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



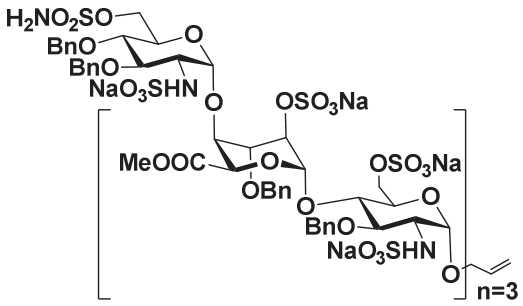
Compound **78₃** was prepared from compound **77₃** (85 mg, 34.99 µmol, 1.0 eq) according the general procedure of deacetylation. Purification by flash chromatography on silica gel (2 % - 5 % Methanol/Dichloromethane + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as white solid (69 mg, 91 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.35 - 7.14 (m, 40H, ArH), 5.89 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.30 (d, $J_{ct,b}$ = 17.5 Hz, 1H, H-ct), 5.23 – 5.18 (m, 2H, H-cc, 1-H_{idu}), 5.15 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, 1-H_{idu}), 4.91 – 4.85 (m, 5H, 1-H_{gluc}, 5-H_{idu}), 4.77 – 4.72 (m, 4H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.71 – 4.58 (m, 8H, OCH_2Ph), 4.56 – 4.45 (m, 6H, OCH_2Ph), 4.21 (d, *J* = 11 Hz, 1H, 6-H), 4.18 – 4.07 (m, 2H, 6-H, H-a), 4.02 – 3.96 (m, 3H, H-a', 4-H_{idu}), 3.93 – 3.87 (m, 2H, 3-H_{idu}, 4-H_{idu}), 3.85 – 3.70 (m, 12H, 2-H_{idu}, 3-H_{idu}, 3-H_{gluc}, 6-H), 3.70 – 3.61 (m, 7H, 5-H_{gluc}, 6-H), 3.56 – 3.50 (m, 3H, 2-H_{gluc}), 3.49 – 3.33 (m, 8H, 2-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, COOMe) , 3.30 (s, 3H, COOMe), 3.29 (s, 3H, COOMe) ; **^{13}C NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 138.0, 137.6, 137.6, 137.4, 137.3, 137.2, 137.0, 137.0 ($C_{quat\ arom}$), 133.2 (C-b), 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0 (C_{arom}), 118.2 (C-c), 101.0 (C-1^{idu}), 100.9 (C-1^{idu}), 100.8 (C-1^{idu}), 96.8 (C-^{1gluc}), 96.4 (C-1^{gluc}), 95.7 (C-1^{gluc}), 95.5 (C-1^{gluc}),80.5, 79.1 (C-4gluc), 78.5, 71.3 (C-4^{gluc}), 76.4, 75.8 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 74.4 (C-3idu), 74.4 (O*C*H_2Ph), 74.1, 73.0, 72.8 (C-4idu), 72.8 (O*C*H_2Ph), 72.6 (O*C*H_2Ph), 72.3 (C-4idu), 72.2 (C-4idu), 71.8, 70.2, 68.7 (C-6), 68.6 (C-a), 68.3 (C-5^{idu}), 67.9 (C-5^{gluc}), 67.8 (C-5^{gluc}), 67.8 (C-5^{idu}), 67.7 (C-5^{idu}), 67.1 (C-5^{gluc}), 67.0 (C-5gluc), 64.2 (C-2^{gluc}), 63.7 (C-2^{gluc}), 63.4 (C-2^{gluc}), 61.6 (C-6), 61.2 (C-6), 52.5 (COO*C*H_3), 52.1 (COO*C*H_3), 52.1 (COO*C*H_3); **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{104}H_{121}N_{13}NaO_{37}S$ [M*Na*+] : 2198.7599 found : 2198.7598.

Compound 79₃ : Allyl (2-amino-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L -ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



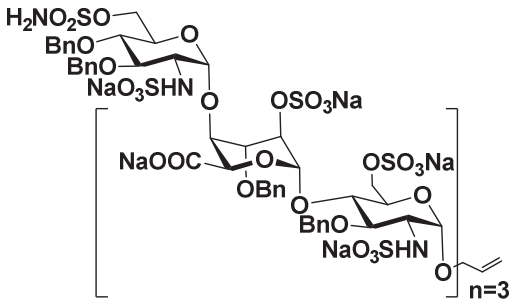
Compound **79$_3$** was prepared from compound **78$_3$** (43 mg, 19.75 µmol, 1.0 eq) according the general procedure of azide reduction. Purification by flash chromatography on silica gel (1 % - 4 % Methanol/Dichloromethane + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as white solid (37 mg, 90 %) ; **^{1}H NMR** (360 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.48 - 7.16 (m, 40H, ArH), 5.99 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.34 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.5 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.24 – 5.16 (m, 4H, H-cc, 1-H$_{idu}$), 5.05 – 5.00 (m, 3H, 1-H$_{gluc}$), 4.87 – 4.63 (m, 21H, 1-H$_{gluc}$, 5-H$_{idu}$, OCH$_2$Ph), 4.53 (d, J = 11.5 Hz, 1H, OCH$_2$Ph), 4.44 (dd, J = 11.5 Hz, J = 4.5 Hz 2H, OCH$_2$Ph), 4.32 – 4.21 (m, 3H, H-a, 6-H), 4.10 – 4.05 (m, 3H, 4-H$_{idu}$), 4.01 – 3.88 (m, 8H, H-a', 3-H$_{idu}$, 4-H$_{gluc}$), 3.85 – 3.77 (m, 7H, 2-H$_{idu}$, 6-H), 3.76 – 3.68 (m, 5H, 5-H$_{gluc}$, 6-H), 3.61 – 3.56 (m, 2H, 3-H$_{gluc}$) , 3.51 – 3.43 (m, 15H, 3-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$, COOMe), 2.86 – 2.75 (m, 4H, 2-H$_{gluc}$) ; **^{13}C NMR** from HSQC (360 MHz, MeOD) δ (ppm) 116.2 (C-c), 100.8 (C-1^{idu}), 97.6 (C-1^{gluc}), 96.9 (C-1^{gluc}), 96.7 (C-1^{gluc}), 81.6 (C-3^{gluc}), 80.9 (C-3^{gluc}), 80.3 (C-3^{gluc}), 75.0 (O*C*H$_2$Ph), 74.4 (O*C*H$_2$Ph), 74.4 (C-3^{idu}), 74.3 (O*C*H$_2$Ph), 74.2 (O*C*H$_2$Ph), 74.1 (O*C*H$_2$Ph), 74.1 (C-4^{gluc}), 72.8 (C-5^{gluc}), 72.3 (C-5^{gluc}), 72.1 (O*C*H$_2$Ph), 72.1 (O*C*H$_2$Ph), 71.9 (C-4^{idu}), 71.8 (C-4^{idu}), 70.0 (C-5^{gluc}), 68.6 (C-5^{idu}), 68.3 (C-5^{idu}), 67.8 (C-2^{idu}), 67.8 (C-a), 67.7 (C-2^{idu}), 67.3 (C-6) 59.9 (C-6), 59.7 (C-6), 55.0 (C-2^{gluc}), 51.2 (COO*C*H$_3$); **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{104}H_{129}N_5NaO_{37}S$ [M*Na*+] : 2094.7979 found : 2094.7906.

<u>Compound 80$_3$: Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L -ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl decasodium salt.</u>



Compound **80$_3$** was prepared from compound **79$_3$** (94 mg, 45.3 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of *N*, *O*-sulfonation. Purification afforded the compound as a white solid (53 mg, 38 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.65 - 7.23 (m, 40H, ArH), 6.09 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.50 – 5.39 (m, 3H, H-ct, 1-H_{idu}), 5.38 – 5.29 (m, 3H, H-cc, 1-H_{gluc}), 5.27 (s, 1H, 1-H_{idu}), 5.25 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 5.22 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 5.04 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.89 – 4.92 (m, 4H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.91 – 4.86 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.86 – 4.79 (Under HOD peak, 8H, OCH_2Ph), 4.73 – 4.64 (m, 3H, OCH_2Ph), 4.64 – 4.46 (m, 5H, 2-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.44 – 4.32 (m, 6H, H-a, 6-H, 3-H_{idu}), 4.31 – 4.23 (m, 5H, 3-H_{idu}, 4-H_{idu}), 4.23 – 4.09 (m, 6H, H-a', 6-H, 4-$H_{idu,}$ 5-H_{gluc}), 3.95 – 3.90 (m, 1H, 6-H), 3.87 – 3.79 (m, 3H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}), 3.75 – 3.64 (m, 3H, 4-H_{gluc}), 3.63 – 3.57 (m, 1H, 5-H_{gluc}), 3.57 – 3.50 (m, 3H, 2-H_{gluc}, 3-H_{gluc}), 3.49 – 3.43 (m, 2H, 2-H_{gluc}), 3.41 (s, 3H, COOMe), 3.40 – 3.27 (m, 7H, 2-H_{gluc}, COOMe) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 133.7 (C-b), 118.4 (C-c), 100.3 (C-1^{gluc}), 98.8 (C-1^{gluc}), 98.3 (C-1^{gluc}), 98.1 (C-1^{idu}), 97.9 (C-1^{idu}), 96.3 (C-1^{gluc}), 79.3, 77.8, 77.5 (C-3^{gluc}), 76.4 (C-5^{gluc}), 76.1 (C-3^{idu}), 75.9 (O*C*H_2Ph), 75.9 (O*C*H_2Ph), 74.5 (C-3^{idu}), 75.5 (O*C*H_2Ph), 74.8 (O*C*H_2Ph), 74.7 (O*C*H_2Ph), 74.4 (O*C*H_2Ph), 74.5 (O*C*H_2Ph), 74.4 (C-5^{gluc}), 74.2, 74.0 (C-5^{gluc}),73.8, 73.2, 73.1 (C-2^{idu}), 72.9 (O*C*H_2Ph), 72.8 (O*C*H_2Ph), 72.7 (O*C*H_2Ph), 72.6, 72.1 (C-2^{idu}), 71.2 (C-2^{idu}), 70.8 (C-2^{idu}), 70.0, 69.0 (C-6), 69.0 (C-6), 68.9 (C-6), 67.6 (C-5^{idu}), 67.5 (C-a), 67.1 (C-5^{idu}), 66.8, 67.8 (C-5^{idu}), 66.1, 66.0 (C-4^{idu}), 66.0 (C-4^{idu}), 65.9 (C-4^{idu}), 58.4 (C-2^{gluc}), 58.1 (C-2^{gluc}), 58.0 (C-2^{gluc}), 57.5 (C-2^{gluc}), 52.7 (COO*C*H_3), 52.5 (COO*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{104}H_{119}N_5Na_{10}O_{67}S_{11}$ [M-*4Na+H*]$^{4-/}$4 : 750.3115 (56) , found : 750.3157, [M-*3Na+H*]$^{3-/}$3 : 1008.0784 (56), found : 1008.0764.

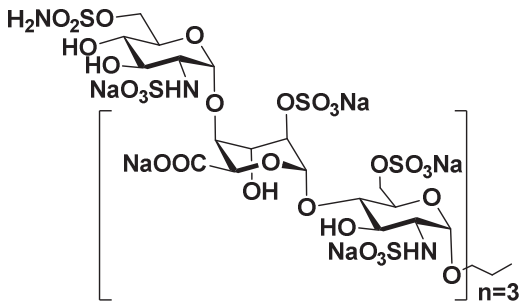
<u>Compound 83$_3$: Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L -ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl decasodium salt.</u>



Compound **83$_3$** was prepared from compound **80$_3$** (15 mg, 4.9 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of saponification. Purification afforded the compound as a white solid (9 mg, 60 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.64 - 7.25 (m, 40H, ArH), 6.04 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz,

$J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.55 – 5.46 (m, 2H, 1-H_{idu}), 5.45 – 5.37 (m, 2H, H-ct, 1-H_{idu}), 5.34 (s, 1H, 1-H_{gluc}), 5.31 – 5.25 (m, 3H, H-cc, 1-H_{gluc}), 5.17 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 5.10 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4,93 – 4.82 (m, 5H, OCH_2Ph), 4.81 – 4.75 (Under HOD peak, 3H, 5-H_{idu}), 4.74 – 4.67 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.66 – 4.61 (m, 3H, 2-H_{idu}), 4.66 – 4.61 (m, 3H, OCH_2Ph), 4.60 – 452 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.48 (d, *J* = 11.0 Hz, 3H, OCH_2Ph), 4.45 – 4.41 (m, 2H, 6-H), 4.41 – 4.36 (m, 3H, 6-H), 4.35 – 4.22 (m, 8H, 6-H, 3-H_{idu}, 4-H_{idu}), 4.20 (s(br), 1H, H-a), 4.15 – 4.05 (m, 5H, H-a', 6-H, 5-H_{gluc}), 4.04 – 3.84 (m, 5H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}), 3.79 – 3.68 (m, 3H, 3-H_{gluc}), 3.63 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H, 5-H_{gluc}), 3.47 – 3.38 (m, 4H, 2-H_{gluc}) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 133.7 (C-b), 118.0 (C-c), 98.3 (C-1^{gluc}), 98.2 (C-1^{gluc}), 98.0 (C-1^{gluc}), 97.7 (C-1^{idu}), 97.2 (C-1^{idu}), 96.1 (C-1^{gluc}), 79.6 (C-3^{gluc}), 77.5 (C-3^{gluc}), 76.9 (C-3^{gluc}), 76.9 (C-3^{gluc}), 76.6 (C-5^{gluc}), 75.7 (O*C*H_2Ph), 75.6 (O*C*H_2Ph), 75.1 (C-3^{idu}), 75.0 (C-4^{gluc}), 75.0 (C-a), 74.9 (O*C*H_2Ph), 74.9 (C-4^{idu}); 74.7 (C-3^{idu}), 74.7 (O*C*H_2Ph), 72.6 (O*C*H_2Ph), 72.6 (O*C*H_2Ph), 72.6 (C-2^{idu}), 72.5 (C-4^{gluc}), 72.4 (O*C*H_2Ph), 72.4 (C-2^{idu}), 72.3 (C-2^{idu}) 69.6 (C-5gluc), 68.8 (C-5^{idu}), 68.7 (C-6), 68.6 (C-6), 68.3 (C-6), 68.3 (C-5^{idu}), 68.2 (C-5^{idu}), 66.9 (C-6), 66.7 (C-6) 58.2 (C-2^{gluc}), 58.0 (C-2^{gluc}), 57.1 (C-2^{gluc}) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{101}H_{110}N_5Na_{13}O_{67}S_{11}$ [M-*6Na+3H*]$3^{-/}3$: 994.0628, found : 994.0584 (54), [M-*4Na+2H*]$2^{-/}2$: 1513.5798 , found : 1513.5666 (54).

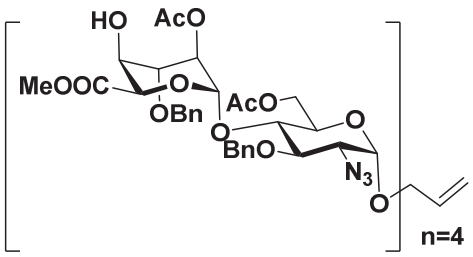
<u>Compound 85$_3$: 1-Propyl (2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L -ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl decasodium salt.</u>



Compound **85$_3$** was prepared from compound **83$_3$** (7 mg, 2.25 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of saponification. Purification afforded the compound as a white solid (2.73 mg, 55 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 5.48 – 5.48 (m, 3H, 1-H_{gluc}), 5.27 – 5.20 (m, 2H, 1-H_{idu}), 5.15 (d, *J*= 3.0 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 4.87 – 4.73 (Under HOD peak, 3H, 5-H_{idu}), 4.54 – 4.49 (m, 1H, 6-H), 4.46 – 4.40 (m, 3H, 6-H), 4.38 – 4.34 (m, 4H, 2-H_{idu}, 6-H), 4.32 – 4.17 (m, 6H,3-H_{idu}, 6-H), 4.15 – 4.10 (m, 3H, 4-H_{idu}), 4.10 – 4.00 (m, 4H, 5-H_{gluc}), 3.82 – 3.74 (m, 3H, 4-H_{gluc}), 3.73 – 3.65 (m, 5H, H-a, 3-H_{gluc}), 3.57 – 3.49 (m, 2H, H-a', 4-H_{gluc}), 3.34 – 3.21 (m, 4H, 2-H_{gluc}), 1.65 (sex, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-b), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-c) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 99.4 (C-1^{idu}), 99.2 (C-1^{idu}), 97.3

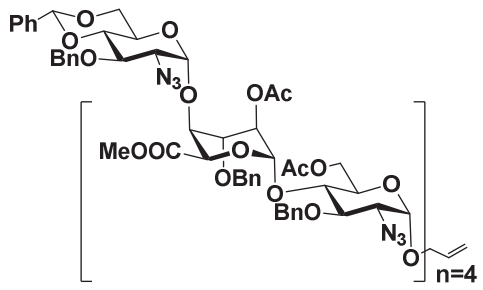
(C-1^{gluc}), 96.9 (C-1^{gluc}), 96.8, (C-1^{gluc}), 96.2, (C-1^{gluc}), 77.0 (C-4^{gluc}), 76.5 (C-2^{idu}), 75.9 (C-4^{idu}), 75.8 (C-2^{idu}), 75.7 (C-4^{gluc}), 75.6 (C-2^{idu}), 70.9 (C-3^{gluc}), 70.3 (C-a), 69.7 (C-5^{idu}), 69.6 (C-3^{gluc}), 69.4 (C-5^{gluc}), 69.3 (C-4^{gluc}), 69.3 (C-3^{idu}), 69.2 (C-5^{gluc}), 69.1 (C-3^{idu}), 68.9 (C-3^{idu}), 68.5 (C-5^{gluc}), 68.2 (C-5^{idu}), 68.1 (C-6), 66.8 (C-6), 66.3 (C-6), 66.3 (C-6), 58.0 (C-2^{gluc}), 57.9 (C-2^{gluc}), 57.8 (C-2^{gluc}), 21.8 (C-b), 9.8 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{45}H_{64}N_5Na_{13}O_{67}S_{11}$ [M-*3Na+H*]$^{2-/}$2 : 1164.3874, found : 1164.8848.

Compound 74$_4$: Allyl (methyl 3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-idopyranosyluronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



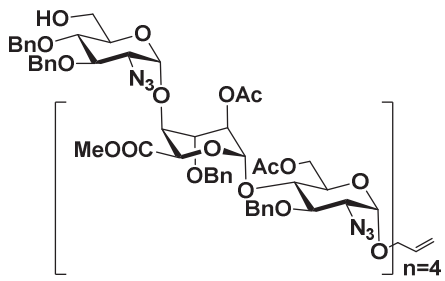
To a solution of compound **70** (662 mg, 0.242 mmol, 1.0 eq) in DCM (2.42 mL) was added trifluoroacetic acid (304 mg, 2.667 mmol, 11.0 eq). The mixture was left to stir during 2h at room temperature. The reaction was quenched with triethylamine and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 30 % Acetone/Toluene) afforded compound as white solid (593 mg, 93 %) whose ^{1}H and ^{13}C data were identical to those previously reported[184] ; **HRMS** (ESI) calculated for $C_{127}H_{146}N_{12}O_{49}Na$ [M*Na*+] : 2645.9194, found : 2645.9022.

Compound 75$_4$: Allyl (2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-idopyranosyluronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



Compound **75$_4$** was prepared from acceptor **74$_4$** (593 mg, 0.226 mmol, 1.0 eq) and donor **73** (163 mg, 0.294 mmol, 1.3 eq) according the general procedure of glycosylation. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 15 % Acetone/Toluene) afforded compound as white solid (499 mg, 74 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.41 – 7.21 (m, 50H, ArH), 5.87 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.48 (s, 1H, H benz), 5.29 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.25 – 5.15 (m, 5H, H-cc, 1-H_{idu}), 4.91 (d, J = 3.5 Hz, 3H, 1-HA, 1-H_{gluc}), 4.88 – 4.82 (m, 7H, 1-H_{gluc}, 2-H_{idu}, 5-H_{idu}), 4.76 (d, J = 10.0 Hz, 5H, OCH_2Ph), 4.69 – 4.57 (m, 13H, OCH_2Ph), 4.55 – 4.48 (m, 3H, 5-H_{idu}), 4.36 – 4.25 (m, 4H, 6-H), 4.20 – 4.07 (m, 6H, Ha, 6-H), 4.00 (dt, $J_{a',b}$ = 6.0 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ = 1.5 Hz, 1H, H-a'), 3.94 – 3.73 (m, 18 H, 3-H_{idu}, 4-H, 5-H_{gluc}), 3.59 (q, J =16.5 Hz, 6H, 3-H_{gluc}, 6-H), 3.48 – 3.40 (m, 12H, COOMe), 3.33 (dd, $J_{2,3}$ = 7.5 Hz, $J_{2,1}$ = 34.0 Hz, 1H, 2-HA), 3.26 – 3.18 (m, 4H, 2-H_{gluc}), 2.05 – 1.94 (m, 24H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.8, 170.2, 170.0, 169.9, 169.7, 169.6, 169.5 (C=O), 138.0, 137.8, 137.8, 137.6, 137.5, 137.5, 137.4 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 129.3, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.7, 126.2, (C_{arom}), 118.6 (C-c), 101.7 (C-H^{benz}), 99.0 (C-1^{gluc}), 98.2, 98.1 (C-1^{idu}), 97.4 (C-1^{gluc}), 96.8, 82.7, 78.6, 77.4, 75.9, 75.7 (OCH_2Ph), 75.7 (OCH_2Ph), 75.6 (OCH_2Ph), 75.5 (OCH_2Ph), 75.4 (OCH_2Ph), 75.2 (OCH_2Ph), 75.0 (OCH_2Ph), 75.0 (OCH_2Ph), 75.0 (OCH_2Ph), 74.3, 73.9, 73.6, 73.5, 73.3, 72.9, 70.7 (C-5^{idu}), 70.6 (C-5^{idu}), 70.4 (C-5^{idu}), 70.4 (C-5^{idu}), 70.4, 69.9, 69.8, 69.6, 69.4, 69.1 (C-a), 68.9, 68.7, 63.5 (C-2^{A}), 63.1 (C-2^{gluc}), 63.0 (C-2^{gluc}), 62.9 (C-2^{gluc}), 62.4 (C-6), 61.9 (C-6), 52.2 ($COOCH_3$), 29.9, 22.9 ($C(O)CH_3$), 21.1 ($C(O)CH_3$), 21.0 ($C(O)CH_3$), 21.0 ($C(O)CH_3$), 20.9 ($C(O)CH_3$), 20.9 ($C(O)CH_3$) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{147}H_{165}N_{15}O_{53}Na$ [M*Na*+] : 3011.0601, found : 3011.0569.

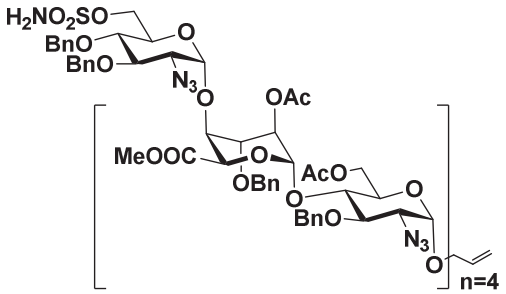
Compound 76$_4$: Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



To a solution of compound **75**$_4$ (487 mg, 0.163 mmol, 1.0 eq) in DCM (1.36 mL) were added Et_3SiH (25 mg, 0.179 mmol, 1.1 eq) and powdered 4-A molecular sieves (100 mg). The mixture was left to stir for 15 minutes and then cooled at -60 °C. $PhBCl_2$ (88 mg, 0.554 mmol, 3.4 eq) was added and the reaction mixture was left to stir during 1h at this temperature. The reaction was quenched at -60 °C with triethylamine, methanol and $NaHCO_3$. The mixture was diluted in diethyl ether, washed with a solution on NaOH [0.1 M], KH_2PO_4 (5 %) and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 10 % Acetone/Toluene) afforded the compound as white solid (433 mg, 87 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.30 – 7.21 (m, 50H, ArH), 5.87 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.29 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.24 – 5.15 (m, 5H, H-cc, 1-H_{idu}), 4.93 (dd, J = 9.5 Hz, J = 3.5 Hz, 3H, 1-H_{gluc}), 4.88 – 4.84 (m, 5H, OCH_2Ph), 4.81 – 4.72 (m, 8H, 1-H_{gluc}, 2-H_{idu}, 5-H_{idu}), 4.69 – 4.56 (m, 15H, OCH_2Ph), 4.52 – 4.48 (m, 2H, 5-H_{idu}), 4.36 – 4.24 (m, 4H, 6-H), 4.21 – 4.07 (m, 6H, Ha, 5-H), 4.00 (dt, $J_{a',b}$ = 6.0 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ = 1.5 Hz, 1H, Ha'), 3.97 – 3.66 (m, 21 H, 3-H_{idu}, 4-H, 5-H_{gluc}), 3.64 – 3.52 (m, 5H, 3-H_{gluc}, 6-H), 3.50 – 3.40 (m, 12H, COOMe), 3.32 (dd, $J_{2,3}$ = 7.5 Hz, $J_{2,1}$ = 3.0 Hz, 1H, 2-HA), 3.25 – 3.13 (m, 4H, 2-H_{gluc}), 2.05 – 1.94 (m, 24H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.8, 170.8, 170.2, 169.9, 169.7, 169.5 (C=O), 138.0, 137.8, 137.7, 137.6, 137.5, 137.5 ($C_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 128.7, 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9 (C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.3, 98.2, 98.2 (C-1^{idu}), 98.1 (C-1^{idu}), 98.0 (C-1^{gluc}), 97.9 (C-1^{gluc}), 97.4, 96.8 (C-1^{gluc}), 79.8, 78.6, 78.1 (C-3^{gluc}), 78.1 (C-3^{gluc}), 78.0 (C-3^{gluc}), 77.8, 77.4, 75.9, 75.7, 75.7, 75.5, 75.1 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 75.0 (O*C*H_2Ph), 74.3, 74.3 (O*C*H_2Ph), 74.2 (O*C*H_2Ph), 73.8 (O*C*H_2Ph), 73.6, 73.4, 73.3, 72.8, 72.6 (C-5^{idu}), 70.5 (C-5^{idu}), 70.4 (C-5^{idu}), 70.4 (C-2^{idu}), 69.9, 68.8, 69.8, 69.5 (C-2^{idu}), 69.4, 69.0 (C-a), 68.9 (C-2^{idu}), 63.5, 63.4 (C-2^{A}), 63.1 (C-2^{gluc}),63.1 (C-2^{idu}),63.0 (C-2^{idu}), 61.9 (C-6), 61.8, 61.5, 52.2 (COO*C*H_3), 52.2 (COO*C*H_3), 32.1, 29.9, 29.5, 22.9, 21.1 (C(O)*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 21.0 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 20.9 (C(O)*C*H_3), 14.3 ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{147}H_{167}N_{15}O_{53}Na$ [M*Na*+] : 3013.0726, found : 3013.0688.

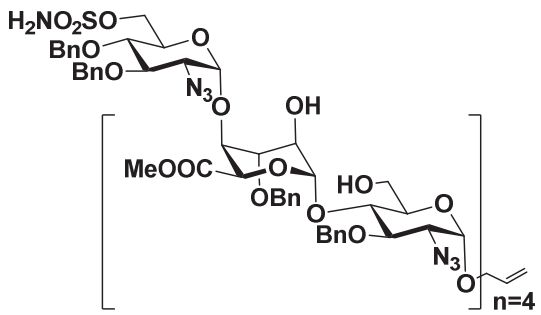
<u>Compound 77$_4$: Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl</u>

2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



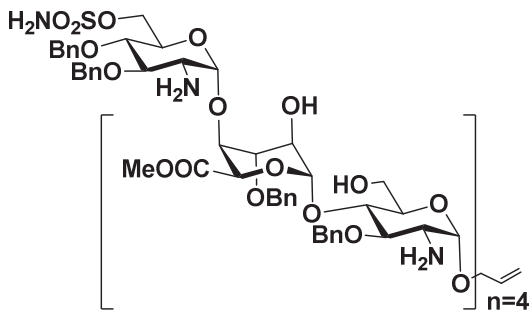
Compound **77$_4$** was prepared from compound **76$_4$** (433 mg, 0.145 mmol, 1.0 eq) according to the general procedure of sulfamoylation. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 15 % Acetone/Toluene) afforded the compound as white solid (331 mg, 75 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.32 – 7.20 (m, 50H, ArH), 5.87 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.29 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.23 – 5.16 (m, 4H, H-cc, 1-H$_{idu}$), 5.10 (d, *J* = 2.5 hz, 1H, 1-H$_{idu}$), 4.91 (d, *J* = 2 Hz, 2H, 1-H$_{gluc}$), 4.88 – 4.83 (m, 6H, 1-HA, 1-H$_{gluc}$, 2-H$_{idu}$), 4.80 – 4.73 (m, 9H, 2-H$_{idu}$, OCH_2Ph), 4.67 – 4.63 (m, 9H, OCH_2Ph), 4.61 – 4.53 (m, 6H, OCH_2Ph, 5-H$_{idu}$), 4.51 (d, *J* = 5 Hz, 1H, 5-H$_{idu}$), 4.30 (q, *J* = 11.5 Hz, 5H, 6-H), 4.21 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, Ha), 4.16 – 4.09 (m, 5H, 6-H), 4.01 – 3.96 (m, 2H, Ha', 3-H$_{idu}$ or 4-H$_{idu}$), 3.96 – 3.88 (m, 5 H, 3-H$_{idu}$, 4-H$_{idu}$), 3.88 – 3.71 (m, 16H, 3-H$_{idu}$, 3-H$_{gluc}$, 4-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$), 3.62 – 3.52 (m, 4H, 3-H$_{gluc}$), 3.47 – 3.39 (m, 14H, COOMe, 4-H$_{gluc}$), 3.33 (dd, $J_{2,3}$ = 7.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.0 Hz, 1H, 2-HA), 3.24 – 3.15 (m, 4H, 2-H$_{gluc}$), 2.05 – 1.95 (m, 24H, CH_3 OAc) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.9, 170.8, 170.2, 170.0, 169.9, 169.7, 169.6, 169.6 (C=O), 138.0, 137.8, 137.7, 137.7, 137.6, 137.5, 137.3 (C$_{quat\ arom}$), 133.3 (C-b), 128.8, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, (C$_{arom}$), 118.6 (C-c), 98.4 (C-1^{idu}), 98.2 (C-1^{idu}), 97.4 (C-1^{gluc}), 97.0 (C-1^{gluc}), 96.7 (C-1^{gluc}), 78.6 (C-3^{gluc}), 78.1 (C-3^{gluc}), 78.0 (C-3^{gluc}), 77.4 (C-4^{gluc}), 75.3, 75.0, 74.2, 74.1, 73.8, 73.7, 73.6, 73.2, 72.8, 70.5, 70.4, 70.2, 69.9, 69.8, 69.5, 69.4, 69.0 (C-a), 63.5 (C-2^{A}), 63.3 (C-2^{gluc}), 63.2 (C-2^{gluc}), 63.1 (C-2^{gluc}), 63.1 (C-2^{gluc}), 61.9 (C-6), 61.8 (C-6), 52.4 (COO*C*H$_3$), 52.2 (COO*C*H$_3$), 21.1 (C(O)*C*H$_3$), 21.0(C(O)*C*H$_3$), 20.9 (C(O)*C*H$_3$), 20.9 (C(O)*C*H$_3$), 20.8 (C(O)*C*H$_3$) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{147}H_{168}N_{16}O_{55}SNa$ [M*Na*+] : 3092.0552, found : 3092.0454.

Compound 78$_4$: Allyl (2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.



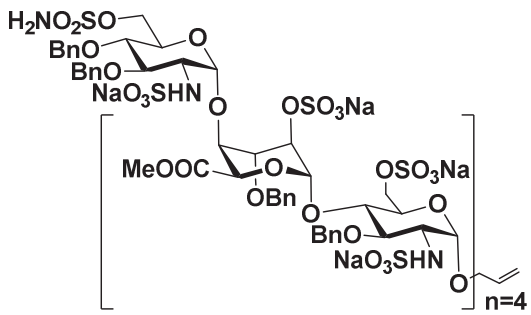
Compound **78**$_4$ was prepared from compound **77**$_4$ (331 mg, 0.108 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of deacetylation. Purification by flash chromatography on silica gel (1 % - 4 % Methanol/Dichloromethane + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as an oil (280 mg, 95 %).**^{1}H NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.94 – 7.66 (m, 50H, ArH), 6.46 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.93 – 5.80 (m, 2H, H-ct, 1-H_{idu}), 5.78 – 5.72 (m, 4H, H-cc, 1-H_{idu}), 5.60 – 5.60 (m, 4H, 1-H_{gluc}), 5.48 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-H_{gluc}), 5.38 (s, 1H, 5-H_{idu}), 5.35 – 5.23 (m, 9H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 5.22 – 5.10 (m, 9H, OCH_2Ph, 5-H_{idu}), 5.10 – 4.97 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.76 – 4.69 (H-a, 6-H under D_2O peak), 4.62 – 4.50 (m, 5H, H-a', 4-H_{idu}), 4.48 – 4.35 (m, 9H, 6-H, 3-H_{idu}), 4.34 – 4.30 (m, 2H, 6-H, 3-H_{gluc}), 4.30 – 4.22 (m, 8H, 6-H,), 4.22 – 4.15 (m, 4H, H-6, 2-H_{idu} or 5-H_{gluc}), 4.15 – 4.04 (m, 5 H, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 4.03 – 3.99 (m, 3H, 4-H_{gluc}), 3.98 – 3.92 (m, 6H, 2-H_{gluc}, COOMe), 3.89 – 3.82 (m, 11H, COOMe, 2-H_{gluc}) ; **^{13}C NMR from HSQC** (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 137.1 (C-b), 121.8 (C-c), 104.8 (C-1^{idu}), 104.7 (C-1^{idu}), 104.5 (C-1^{idu}), 100.6 (C-1^{gluc}), 100.4 (C-1^{gluc}), 100.0 (C-1^{gluc}), 99.8 (C-1^{gluc}), 84.1, 82.8 (C-5^{gluc}), 82.4 (C-3^{gluc}), 81.1 (C-4^{gluc}), 79.4 (O*C*H_2Ph), 78.8 (O*C*H_2Ph), 78.7 (O*C*H_2Ph), 78.7 (O*C*H_2Ph), 78.7 (O*C*H_2Ph), 78.7 (O*C*H_2Ph), 78.6 (C-3^{idu}), 78.6 (O*C*H_2Ph), 78.3 (C-3^{idu}), 78.1 (O*C*H_2Ph), 78.1 (C-3^{idu}), 77.3 (C-3^{idu}), 77.0 (O*C*H_2Ph), 76.6 (O*C*H_2Ph),76.4 (C-4^{gluc}), 76.2 (C-4^{idu}), 76.2 (C-4^{idu}), 75.7 (C-6), 73.9 (C-6), 72.6 (C-5^{idu}), 72.4 (C-5^{idu}), 72.3 (C-a), 72.3 (C-2^{idu}), 72.2 (C-2^{idu}), 72.0 (C-5^{idu}), 71.6 (C-6), 71.5 (C-2^{idu}), 67.7 (C-2^{gluc}), 67.4 (C-2^{gluc}), 67.2 (C-2^{gluc}), 64.5 (C-3^{gluc}), 64.0 (C-3^{gluc}), 56.0 (COO*C*H_3), 55.8 (COO*C*H_3), 55.7 (COO*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{131}H_{152}N_{16}Na_2O_{47}S$ [*M2Na*+/2] : 1389.4750, found : 1389.4736.

<u>Compound 79$_4$: Allyl (2-amino-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6sulfamoyl-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl.</u>



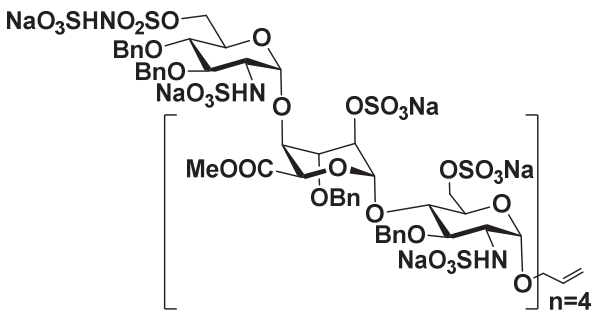
Compound **79$_4$** was prepared from compound **78$_4$** (280 mg, 0,102 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of azide reduction. Purification by flash chromatography on silica gel (1 % - 5 % Methanol/Dichloromethane + 0.1 % NEt_3) afforded the compound as an oil (240 mg, 90 %).**^{1}H NMR** (360 MHz, $CDCl_3$ + MeOD) δ (ppm) 7.33 – 7.09 (m, 50H, ArH), 5.84 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.34 – 5.17 (m, 2H, H-cc, H-ct), 5.16 – 5.10 (m, 4H, 1-H_{idu}), 4.96 – 4.88 (m, 4H, 1-H_{gluc}), 4.87 – 4.78 (m, 6H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.78 – 4.74 (m, 3H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph, 1-H_{gluc}), 4.73 – 4.66 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.67 – 4.61 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.61 – 4.58 (m, 1H, OCH_2Ph), 4.57 – 4.49 (m, 5H, OCH_2Ph), 4.40 – 4.28 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.23 – 4.17 (m, 2H, 6-H), 4.13 – 4.07 (m, 1H, H-a), 4.05 – 4.00 (m, 4H, 4-H_{idu}), (H-a, 3-H_{idu}, 4-H_{gluc} under MeOH peak), 4.76 – 4.72 (m, 4H, 6-H, 2-H_{idu}), 3.70 – 3.62 (m, 8H, 6-H, 2-H_{idu}), 3.60 – 3.55 (m, 1H, 5-H_{gluc}), 3.48 – 3.41 (m, 8H, 3-H_{gluc}, 5-H_{gluc}, COOMe), 3.41 – 3.30 (m, 8H, 3-H_{gluc}, 5-H_{gluc}, COOMe), 2.81 – 2.66 (m, 5H, 2-H_{gluc}) ; **^{13}C NMR** from HSQC (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 133.5 (C-b), 117.2 (C-c), 100.7 (C-1^{idu}), 97.8 (C-1^{gluc}), 96.5 (C-1^{gluc}), 96.3 (C-1^{gluc}), 81.8, 80.6, 77.4, 75.4 (O*C*H_2Ph), 74.8 (C-3^{idu} or C-4^{gluc}), 74.7 (O*C*H_2Ph), 74.6 (O*C*H_2Ph), 74.5 (O*C*H_2Ph), 72.5, 72.2 (O*C*H_2Ph), 72.2 (C-3^{idu} or C-4^{gluc}), 72.0, 71.4 (C-4^{idu}), 70.9 (C-4^{idu}), 69.9 (C-5^{gluc}), 68.8 (C-5^{idu}), 68.5 (C-5^{idu}), 68.1 (C-2^{idu}), 67.8 (C-2^{idu}), 67.8 (C-6), 60.2 (C-6), 60.0 (C-6), 55.8 (C-2^{gluc}), 51.7 (COO*C*H_3), 51.6 (COO*C*H_3), 51.6 (COO*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{131}H_{164}N_6O_{47}S2^+$ [M2$^+$/2] : 1303,0185, found : 1303, 0194.

<u>Compound 80$_4$: Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(methyl-3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato α-D-glucopyranosyl tridecasodium salt.</u>



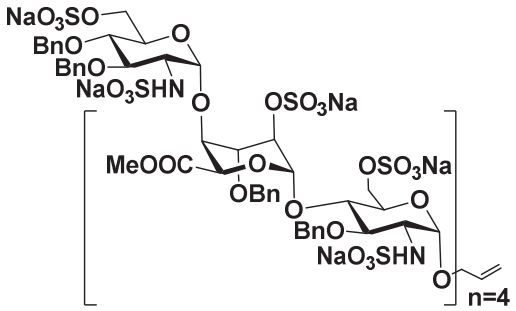
Compound **80$_4$** was prepared from compound **79$_4$** (240 mg, 0.092 mmol, 1.0 eq) according to the general procedure of *N*, *O*-sulfonation. Purification afforded the compound as a white solid (143 mg, 40 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.59 – 7.29 (m, 50H, ArH), 6,10 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.50 – 5.38 (m, 4H, H-cc, 1-H_{idu}), 5.35 – 5.31 (m, 3H, H-ct, 1-H_{gluc}), 5.30 – 5.26 (m, 2H, 1-H_{gluc}), 5.26 – 5.21 (m, 2H, 1-H_{gluc}), 5.04 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.99 – 4.94 (m, 4H, 5-H_{idu}), 4.93 – 4.84 (m, 5H, OCH_2Ph), (Under HOD peak, OCH_2Ph), 4.63 – 4.50 (m, 6H, OCH_2Ph, 2-H_{idu}), 4.42 – 4.32 (m, 8H, 3-H_{idu}, 6-H), 4.33 – 4.19 (m, 10H, OCH_2Ph, 6-H), 4.20 – 4.09 (m, 6H, H-a, 4-H_{idu}, 6-H), 4.94 (d, *J* = 11 Hz, 1H, 6-H), 3.92 – 3.73 (m, 6H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 4.73 – 3.63 (m, 4H, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.63 – 3.57 (m, 1H, 4-H_{gluc}), 3.58 – 3.48 (m, 5H, 2-H_{gluc}, 3-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.47 – 3.39 (m, 6H, 2-H_{gluc}, COOMe), 3.39 – 3.30 (m, 10H, 2-H_{gluc}, COOMe) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 118.4 (C-c), 100.3 (C-1^{gluc}), 98.7 (C-1^{gluc}), 98.4 (C-1^{gluc}), 98.2 (C-1^{idu}), 98.0 (C-1^{idu}), 96.4 (C-1^{gluc}), 79.3 (C-5^{gluc}), 77.8 (C-5^{gluc}), 77.5 (C-5^{gluc}), 76.4 (C-3^{gluc}), 76.1 (C-4^{idu}), 75.9 (O*C*H_2Ph), 75.6 (C-6), 75.6 (O*C*H_2Ph), 74.8 (O*C*H_2Ph), 74.5 (O*C*H_2Ph), 74.3 (C-4^{idu}), 74.3 (C-5^{gluc}), 74.1 (C-4^{idu}), 73.8 (C-3^{idu}), 73.2 (C-3^{idu}), 73.2 (C-2^{idu}), 72.8 (O*C*H_2Ph), 72.6 (C-3^{gluc}), 72.5 (C-3^{gluc}), 72.1 (C-2^{idu}), 71.3 (C-2^{idu}), 70.8 (C-2^{idu}), 70.0 (C-4^{gluc}), 69.0 (C-6), 67.6 (C-5^{idu}), 67.4 (C-a), 67.1 (C-5^{idu}), 66.8 (C-6), 66.8 (C-5^{idu}), 66.5 (C-5^{idu}), 58.4 (C-2^{gluc}), 58.0 (C-2^{gluc}), 57.6 (C-2^{gluc}), 52.7 (COO*C*H_3), 52.6 (COO*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{131}H_{149}N_6Na_{13}O_{86}S_{14}$ [M-*4Na*]$^{4-/}$4 : 959.5682 (70), found : 959.5660, [M-*5Na*]$^{5-/}$5 : 763.0567 (70), found : 763.0530.

Compound 81$_4$: Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-*O*-sulfamino sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato α-D-glucopyranosyl tetradecasodium salt.



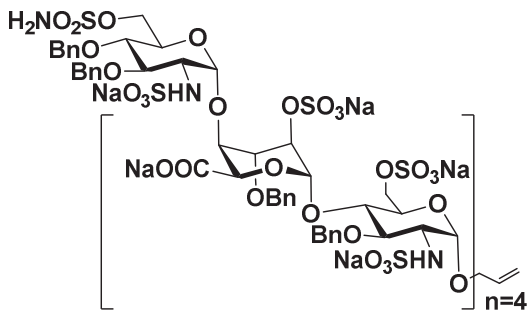
Compound **81$_4$** was prepared from compound **80$_4$** (240 mg, 0.092 mmol, 1.0 eq) according to the general procedure of *N*, *O*-sulfonation. Purification afforded the compound as a white solid (73 mg, 20 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.61 – 7.28 (m, 50H, ArH), 6,09 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.51 – 5.38 (m, 5H, H-cc, 1-H_{idu}), 5.36 – 5.28 (m, 3H, H-ct, 1-H_{gluc}), 5.27 – 5.19 (m, 3H, 1-H_{gluc}), 5.06 – 5.01 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.99 – 4.91 (m, 6H, 5-H_{idu}, OCH_2Ph), 4.89 – 4.85 (m, 4H, OCH_2Ph), (Under HOD peak, OCH_2Ph), 4.62 – 4.54 (m, 4H, 2-H_{idu}), 4.53 – 4.47 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.43 – 4.35 (m, 5H, 3-H_{idu}, 6-H), 4.33 – 4.20 (m, 9H, H-a, 6-H), 4.18 – 4.07 (m, 6H, H-a, 4-H_{idu}), 3.90 – 3.73 (m, 7H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 4.74 – 3.65 (m, 5H, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}, 5-H_{gluc}), 3.63 – 3.58 (m, 1H, 4-H_{gluc}), 3.55 – 3.48 (m, 4H, 2-H_{gluc}, 4-H_{gluc}), 3.48 – 3.31 (m, 14H, 2-H_{gluc}, COOMe) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 118.3 (C-c), 100.5 (C-1^{gluc}), 98.5 (C-1^{gluc}), 98.4 (C-1^{gluc}), 97.8 (C-1^{idu}), 97.8 (C-1^{idu}), 96.3 (C-1^{idu}), 79.2 (C-4^{gluc}), 77.7 (C-4^{gluc}), 77.3 (C-4^{gluc}), 76.5 (C-4^{gluc}), 76.0 (C-4^{idu}), 75.7 (O*C*H_2Ph), 75.6 (O*C*H_2Ph), 75.5 (O*C*H_2Ph), 75.5 (C-6), 74.7 (O*C*H_2Ph), 74.6 (O*C*H_2Ph), 74.6 (O*C*H_2Ph), 74.0 (C-3^{gluc}), 74.0 (C-4^{idu}), 74.0 (C-4^{idu}), 73.7 (C-3^{idu}), 73.1 (C-3^{idu}), 73.0 (C-2^{idu}), 72.7 (O*C*H_2Ph), 72.4 (C-3^{gluc}), 72.0 (C-2^{idu}), 71.2 (C-2^{idu}), 70.6 (C-2^{idu}), 69.9 (C-5^{gluc}), 69.3 (C-5^{gluc}), 69.0 (C-4^{idu}), 68.8 (C-a), 67.3 (C-5^{idu}), 67.0 (C-5^{idu}), 66.7 (C-5^{idu}), 66.7 (C-6), 65.9 (C-6), 65.7 (C-6), 58.1 (C-2^{gluc}), 57.9 (C-2^{gluc}), 57.4 (C-2^{gluc}), 52.6 (COO*C*H_3), 52.5 (COO*C*H_3), 52.3 (COO*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{131}H_{148}N_6Na_{14}O_{86}S_{15}$ [M-*3Na*]$^{3-/}$3 : 1321.0669 (70), found : 1321.0616, [M-*4Na*]$^{4-/}$4 : 985.0529 (70), found : 985.0520.

Compound 82$_4$: Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-*O*-sulfonato-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato α-D-glucopyranosyl tretradecasodium salt.



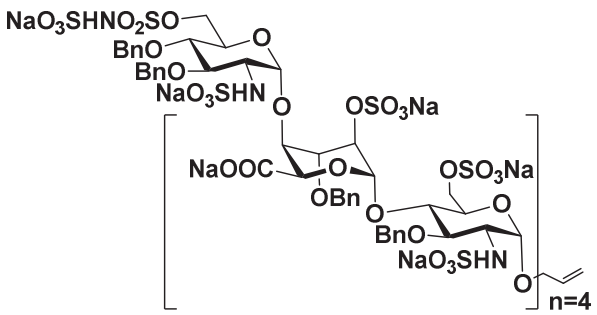
Compound **82$_4$** was prepared from compound **80$_4$** (240 mg, 0.092 mmol, 1.0 eq) according to the general procedure of *N*, *O*-sulfonation. Purification afforded the compound as a white solid (27 mg, 7 %). **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.60 – 7.29 (m, 50H, ArH), 6,09 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.50 – 5.37 (m, 5H, H-cc, 1-H$_{idu}$), 5.36 – 5.27 (m, 3H, H-ct, 1-H$_{gluc}$), 5.26 – 5.20 (m, 3H, 1-H$_{gluc}$), 5.06 – 5.00 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.99 – 4.90 (m, 6H, 5-H$_{idu}$, OCH_2Ph), 4.90 – 4.85 (m, 4H, OCH_2Ph), (Under HOD peak, OCH_2Ph), 4.63 – 4.53 (m, 4H, 2-H$_{idu}$), 4.53 – 4.48 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.44 – 4.37 (m, 5H, 3-H$_{idu}$, 6-H), 4.35 – 4.22 (m, 9H, H-a, 6-H), 4.17 – 4.08 (m, 6H, H-a, 4-H$_{idu}$), 3.91 – 3.74 (m, 7H, 3-H$_{gluc}$, 4-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$), 4.74 – 3.63 (m, 5H, 3-H$_{gluc}$, 4-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$), 3.62 – 3.57 (m, 1H, 4-H$_{gluc}$), 3.57 – 3.49 (m, 4H, 2-H$_{gluc}$, 4-H$_{gluc}$), 3.48 – 3.26 (m, 14H, 2-H$_{gluc}$, COOMe) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 118.3 (C-c), 100.5 (C-1^{gluc}), 98.5 (C-1^{gluc}), 98.4 (C-1^{gluc}), 97.8 (C-1^{idu}), 97.8 (C-1^{idu}), 96.3 (C-1^{idu}), 79.2 (C-4^{gluc}), 77.7 (C-4^{gluc}), 77.3 (C-4^{gluc}), 76.5 (C-4^{gluc}), 76.0 (C-4^{idu}), 75.7 (O*C*H$_2$Ph), 75.6 (O*C*H$_2$Ph), 75.5 (O*C*H$_2$Ph), 75.4 (C-6), 74.7 (O*C*H$_2$Ph), 74.6 (O*C*H$_2$Ph), 74.6 (O*C*H$_2$Ph), 74.0 (C-3^{gluc}), 74.0 (C-4^{idu}), 74.0 (C-4^{idu}), 73.7 (C-3^{idu}), 73.1 (C-3^{idu}), 73.0 (C-2^{idu}), 72.7 (O*C*H$_2$Ph), 72.4 (C-3^{gluc}), 72.0 (C-2^{idu}), 71.2 (C-2^{idu}), 70.6 (C-2^{idu}), 69.9 (C-5^{gluc}), 69.3 (C-5^{gluc}), 69.0 (C-4^{idu}), 68.8 (C-a), 67.3 (C-5^{idu}), 67.0 (C-5^{idu}), 66.7 (C-5^{idu}), 66.7 (C-6), 65.9 (C-6), 65.7 (C-6), 58.1 (C-2^{gluc}), 57.9 (C-2^{gluc}), 57.4 (C-2^{gluc}), 52.6 (COO*C*H$_3$), 52.5 (COO*C*H$_3$), 52.3 (COO*C*H$_3$) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{131}H_{147}N_6Na_{14}O_{87}S_{14}$ [M-*3Na*]$^{3-/}$3 : 1294.7427 (70), found : 1294.7366, [M-*4Na*]$^{4-/}$4 : 965.3097 (70), found : 965.3061.

Compound 83$_4$: Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato α-D-glucopyranosyl heptadecasodium salt.



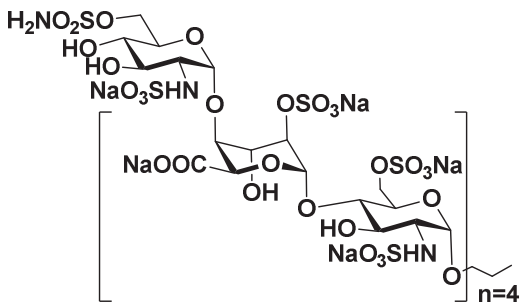
Compound **83$_4$** was prepared from compound **80$_4$** (75 mg, 19.1 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of saponification. Purification afforded the compound as a white solid (60 mg, 79 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.57 - 7.32 (m, 50H, ArH), 6.05 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.55 – 5.46 (m, 3H, 1-H$_{idu}$), 5.46 – 5.39 (m, 2H, H-ct, 1-H$_{idu}$), 5.36 – 5.27 (m, 5H, H-ct, 1-H$_{gluc}$), 5.19 (d, 1H, J = 3.0 Hz, 1-H$_{gluc}$), 5.10 (d, J = 11.0 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4,96 – 4.86 (m, 5H, OCH_2Ph), 4.81 – 4.75 (Under HOD peak, 5-H$_{idu}$), 4.73 – 4.68 (m, 4H, OCH_2Ph, 5-H$_{idu}$), 4.68 – 4.60 (m, 5H, OCH_2Ph, 2-H$_{idu}$), 4.59 – 4.53 (m, 4H, OCH_2Ph), 4.52 – 4.45 (m, 4H, H-a, 6-H), 4.45 – 4.47 (m, 7H, OCH_2Ph, 6-H), 4.36 – 4.25 (m, 10H, H-a', 6-H, 3-H$_{idu}$), 4.24 – 4.15 (m, 4H, 4-H$_{idu}$), 4.14 – 4.05 (m, 4H, 5-H$_{gluc}$), 4.01 – 3.88 (m, 7H, 3-H$_{gluc}$, 4-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$), 3.78 (t, J = 11 Hz, 1H, 3-H$_{gluc}$), 3.71 – 3.60 (m, 3H, 3-H$_{gluc}$), 3.40 – 3.40 (m, 5H, 2-H$_{gluc}$) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 118.0 (C-c), 98.3 (C-1^{gluc}), 98.2 (C-1^{gluc}), 98.0 (C-1^{gluc}), 97.5 (C-1^{idu}), 97.3 (C-1^{idu}), 97.3 (C-1^{idu}), 96.1 (C-1^{gluc}), 79.4 (C-3^{gluc}), 77.4 (C-3^{gluc}), 77.3 (C-3^{gluc}), 76.9 (C-3^{gluc}), 76.4 (C-3^{gluc}), 75.7 (O*C*H$_2$Ph), 75.5 (O*C*H$_2$Ph), 75.3 (O*C*H$_2$Ph), 75.1 (O*C*H$_2$Ph), 74.9 (C-4^{gluc}), 74.9 (C-4^{idu}), 74.6 (C-4^{idu}), 74.6 (O*C*H$_2$Ph), 72.3 (C-2^{idu}), 72.3 (C-4^{gluc}), 72.0 (C-2^{idu}), 71.6 (C-2^{idu}), 69.9 (C-5^{gluc}), 68.9 (C-5^{gluc}), 68.6 (C-6), 68.4 (C-5^{gluc}), 68.3 (C-5^{idu}), 68.1 (C-6), 68.1 (C-a), 67.8 (C-5^{idu}), 67.8 (C-5^{idu}), 67.6 (C-5^{idu}), 66.8 (C-6), 66.4 (C-6), 57.9 (C-2^{gluc}), 57.0 (C-2^{gluc}) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{127}H_{137}N_6Na_{17}O_{86}S_{14}$ [M-*6Na+H*]$^{5-/}$5 : 765.0334 (68), found : 765.0354, [M-*7Na+2H*]$^{5-/}$5 : 760.6370 (68), found : 760.6371.

<u>Compound 84$_4$: Allyl (3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6- sulfamino sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(3-*O*-benzyl-2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato α-D-glucopyranosyl octadecasodium salt.</u>



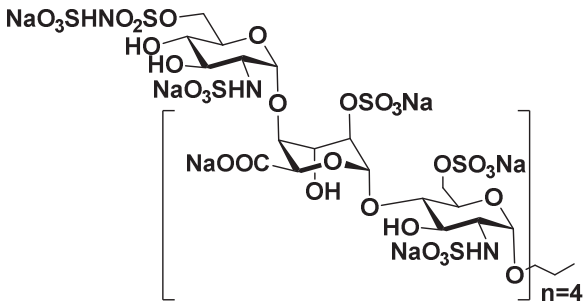
Compound **84$_4$** was prepared from compound **81$_4$** (72 mg, 17.9 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of saponification. Purification afforded the compound as a white solid (58 mg, 79 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.60 - 7.34 (m, 50H, ArH), 6.05 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.55 – 5.45 (m, 3H, 1-H$_{idu}$), 5.45 – 5.38 (m, 2H, H-ct, 1-H$_{idu}$), 5.37 – 5.26 (m, 5H, H-ct, 1-H$_{gluc}$), 5.18 (d, 1H, J = 3.0 Hz, 1-H$_{gluc}$), 5.08 (d, J = 10.5 Hz, 1H, OCH_2Ph), 4,95 – 4.86 (m, 5H, OCH_2Ph, 5-H$_{idu}$), 4.85 – 4.70 (Under HOD peak, 5-H$_{idu}$), 4.67 – 4.60 (m, 5H, OCH_2Ph, 2-H$_{idu}$), 4.57 – 4.53 (m, 2H, 6-H), 4.49 – 4.39 (m, 6H, 6-H), 4.34 – 4.26 (m, 8H, H-a, 3-H$_{idu}$, 4-H$_{idu}$, 6-H), 4.24 – 4.18 (m, 3H, 4-Hidu), 4.15 – 4.08 (m, 3H, H-a', 5-H$_{gluc}$), 4.08 – 3.88 (m, 8H, 4-H$_{gluc}$, 5-H$_{gluc}$), 3.88 – 3.83 (m, 1H, 3-H$_{gluc}$), 3.79 – 3.67 (m, 4H, 3-H$_{gluc}$), 3.51 – 3.38 (m, 5H, 2-H$_{gluc}$) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 133.6 (C-b), 118.1 (C-c), 98.4 (C-1^{gluc}), 98.1 (C-1^{gluc}), 98.0 (C-1^{gluc}), 97.5 (C-1^{idu}), 97.4 (C-1^{idu}), 97.2 (C-1^{idu}), 96.1 (C-1^{gluc}), 79.4 (C-3^{gluc}), 77.4 (C-3^{gluc}), 76.7 (C-3^{gluc}), 76.7 (C-3^{gluc}), 75.4 (O*C*H$_2$Ph), 75.4 (O*C*H$_2$Ph), 75.4 (C-6), 75.5 (O*C*H$_2$Ph), 75.3 (O*C*H$_2$Ph), 75.0 (O*C*H$_2$Ph), 74.9 (O*C*H$_2$Ph), 74.9 (C-3^{idu}), 74.9 (C-4^{gluc}), 74.7 (C-4^{idu}), 74.7 (O*C*H$_2$Ph), 74.6 (C-3^{idu}), 74.5 (O*C*H$_2$Ph), 74.3 (C-3^{idu}), 72.6 (O*C*H$_2$Ph), 72.4 (C-2^{idu}), 72.3 (C-4^{gluc}), 72.1 (C-2^{idu}), 71.7 (C-2^{idu}), 69.7 (C-5^{gluc}), 69.7 (C-5^{gluc}), 69.3 (C-5^{gluc}), 68.9 (C-5^{gluc}), 68.5 (C-a), 68.5 (C-5^{idu}), 67.9 (C-5^{idu}), 67.8 (C-5^{idu}), 66.8 (C-6), 66.4 (C-6), 66.3 (C-6), 57.9 (C-2^{gluc}), 57.0 (C-2^{gluc}) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{127}H_{136}N_6Na_{18}O_{89}S_{15}$ [M-*5Na+2H*]$^{3-/}$3 : 1317.0340 (68), found : 1317.0269.

<u>Compound 85$_4$: 1-Propyl (2-deoxy-6-sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato α-D-glucopyranosyl tridecasodium salt.</u>



Compound **85$_4$** was prepared from compound **83$_4$** (33 mg, 8.33 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of hydrogenolysis. Purification afforded the compound as a white solid (11 mg, 42 %) ; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 5.50 – 5.38 (m, 4H, 1-H_{gluc}), 5.27 – 5.21 (m, 4H, 1-H_{idu}), 5.15 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, 1-H_{gluc}), 4,89 – 4.82 (m, 3H, 5-H_{idu}), 4.81 – 4.74 (Under HOD peak, 5-H_{idu}), 4.55 – 4.59 (m, 1H, 6-H), 4.46 – 4.39 (m, 4H, H-6), 4.38 – 4.28 (m, 8H, 2-H_{idu}, H-6), 4.28 – 4.17 (m, 5H, 3-H_{idu}, 6-H), 4.15 – 4.09 (m, 4H, 4-H_{idu}), 4.09 – 4.01 (m, 5H, 5-H_{gluc}), 3.84 – 3.75 (m, 4H, 4-H_{gluc}), 3.73 – 3.64 (m, 6H, H-a, 3-H_{gluc}), 3.57 – 3.48 (m, 2H, H-a', 4-H_{gluc}) 3.33 – 3.22 (m, 5H, 2-H_{gluc}) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 99.2 (C-1^{idu}), 97.1 (C-1^{gluc}), 96.7 (C-1^{gluc}), 96.4 (C-1^{gluc}), 96.1 (C-1^{gluc}), 76.4 (C-4^{gluc}), 76.4 (C-2^{idu}), 75.8 (C-4^{idu}), 75.7 (C-4^{gluc}), 70.8 (C-3^{gluc}), 70.2 (C-a), 69.5 (C-3^{gluc}), 69.5 (C-5^{idu}), 69.3 (C-5^{idu}), 69.2 (C-4^{gluc}), 69.1 (C-5^{gluc}), 68.8 (C-5^{idu}), 68.6 (C-3^{idu}), 68.5 (C-5^{gluc}), 68.1 (C-6), 66.7 (C-6), 66.2 (C-6), 57.7 (C-2^{gluc}), 21.6 (C-b), 9.6 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{57}H_{79}N_6Na_{17}O_{86}S_{14}$ [M-*4Na+H*]$^{3-/}$3 : 990.8935 (63), found :990.8945, [M-*5Na+2H*]$^{4-/}$4 : 737.4228 (63), found : 737.4300.

<u>Compound 86$_4$: 1-Propyl (2-deoxy-6-sulfamino sulfamoyl-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-gluco pyranosyl)-(1-4)-*O*-(2-*O*-sulfonato-β-L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato α-D-glucopyranosyl tridecasodium salt.</u>

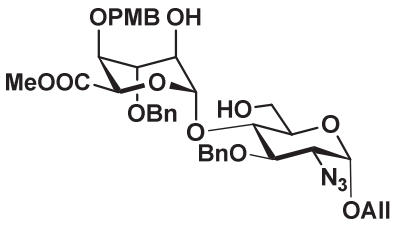


Compound **86$_4$** was prepared from compound **84$_4$** (32 mg, 7.87 µmol, 1.0 eq) according to the general procedure of hydrogenolysis. Purification afforded the compound as a white solid (13 mg, 51 %) ; **^{1}H**

NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 5.50 – 5.38 (m, 4H, 1-H_{gluc}), 5.28 – 5.19 (m, 4H, 1-H_{idu}), 5.16 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, 1-H_{gluc}), 4,85 (s (br), 3H, 5-H_{idu}), 4.82 – 4.71 (Under HOD peak, 5-H_{idu}), 4.51 – 4.40 (m, 4H, 6-H), 4.40 – 4.30 (m, 7H, 2-H_{idu}, H-6), 4.30 – 4.17 (m, 7H, 3-H_{idu}, 6-H), 4.16 – 4.09 (m, 4H, 4-H_{idu}), 4.07 – 3.93 (m, 5H, 5-H_{gluc}), 3.84 – 3.75 (m, 4H, 4-H_{gluc}), 3.74 – 3.63 (m, 7H, H-a, 3-H_{gluc}, 4-H_{gluc}), 3.55 – 3.47 (m, 1H, H-a') 3.35 – 3.23 (m, 5H, 2-H_{gluc}) ; **^{13}C NMR** from HSQC (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 99.3 (C-1^{idu}), 96.8 (C-1^{gluc}), 96.7 (C-1^{gluc}), 96.3 (C-1^{gluc}), 76.8 (C-4^{gluc}), 76.4 (C-2^{idu}), 75.9 (C-4^{idu}), 75.7 (C-2^{idu}), 75.7 (C-4^{gluc}), 70.3 (C-3^{gluc}), 70.2 (C-a), 69.9 (C-5^{gluc}), 69.5 (C-5^{idu}), 69.4 (C-3^{gluc}), 69.2 (C-5^{idu}), 69.1 (C-5^{gluc}), 69.0 (C-3^{idu}), 68.5 (C-5^{gluc}), 66.7 (C-6), 66.6 (C-6), 66.2 (C-6), 66.2 (C-6), 57.7 (C-2^{gluc}), 21.6 (C-b), 9.6 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* (%) calculated for $C_{57}H_{78}N_6Na_{18}O_{89}S_{15}$ [M-*3Na*]$^{3-/}$3 : 1032.2004 (68), found : 1032.2016.

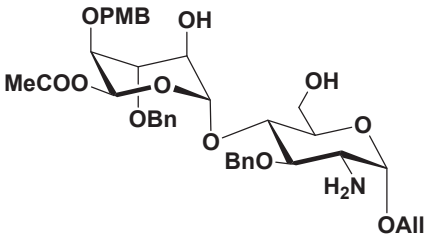
Compound from Chapter 3

Compound 87'$_1$: Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-α-L-idopyranosyluronate]-(1→4)-*O*-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl



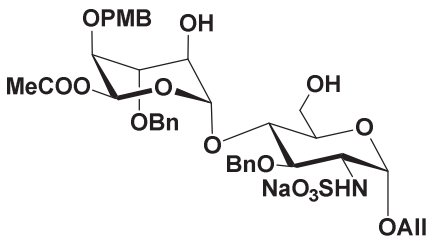
Compound **87'$_1$** was obtained from **53** (460 mg, 0.56 mmol, 1.0 eq) according to the general procedure of deacetylation. Purification by flash chromatography on silica gel (0 % - 20 % Acetone/Toluene) afford compound as white solid (306 mg, 74 %) whose ^{1}H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[189]

Compound 87$_1$: Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-α-L-idopyranosyluronate]-(1→4)-*O*-2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl



Compound **87$_1$** was prepared from compound **87'$_1$** (460 mg, 0.56 mmol, 1.0 eq) according the general procedure of deacetylation. Purification by flash chromatography on silica gel (0 % - 30 % Acetone/Toluene) afforded the compound as white solid (306 mg, 74 %). A portion of this compound (150 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq) was dissolved in methanol according the general procedure of azide reduction. Purification by flash chromatography on silica gel (2 % - 5 % Methanol/Dichloromethane + 0,1% Et_3N) afforded the compound as white solid (120 mg, 85 %) ; **^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD)** δ (ppm) 7.38 -7.08 (m, 10H, ArH), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 5.88 (ddt, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.25 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a} = J_{ct,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.13 (dq, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a} = J_{cc,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.04 (d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 1H, H-1$_{gluc}$), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 4.5 Hz, H-1$_{idu}$), 4.65 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.60 (d, *J*= 4.0 Hz, 1H, H-5$_{idu}$), 4.55 (d, *J*= 11.5 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.40 (d, *J*= 11.0 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.30 (d, *J*= 12.0 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.16 (d, *J*= 12.0 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.29 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.08 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, $J_{a,cc} = J_{a,ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a), 3.96 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.0 Hz, $J_{a',cc} = J_{a',ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a'), 3.73 (dd, $J_{6,6'}$ = 11.5 Hz, $J_{6,5}$= 2.0 Hz, 1H, H-6$_{gluc}$), 3.76-3.59 (m, 8 H, H-4$_{gluc}$, H-5$_{gluc}$, H-6'$_{gluc}$, H-2 $_{idu}$ H-3$_{idu}$, OMe), 3.54-3.44 (m, 2H, H-3$_{gluc}$, H-4$_{idu}$), 3.29 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, H-2 $_{gluc}$), 3.36 (s, 3H, OMe) ppm. **^{13}C NMR (400 MHz, CD_3OD)** δ (ppm) 171.7 (*C*=O), 161.1 (*C*-OMe *p*MBn), 139.4, 137.9 ($C_{quat\ arom}$), 135.5 (C-b), 131.0, 130.8, 129.4, 129.3, 128.8, 128.7, 128.5 (C_{arom}), 117.5 (C-c), 114.8 (C*m* pMBn), 102.3 (C-1^B), 99.5 (C-1^A), 82.9 (C-3^A), 77.6 (C-4^A or C-3^B), 77.2 (C-3^B or C-4^A), 76.9 (C-4^B), 75.8 (*C*H$_2$Ph), 74.3 (*C*H$_2$Ph), 73.8 (C-5^A), 73.5 (*C*H$_2$Ph), 71.1 (C-5^B), 71.0 (C-2^B), 69.3 (C-a), 61.7 (C-6^A), 57.8 (C-2^A), 55.3 (*C*H$_3$, *p*MBn), 52.4 (*C*H$_3$, COOMe) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{38}H_{48}NO_{12}$ ([M+H]$^+$): 710.3171, found 710.3151.

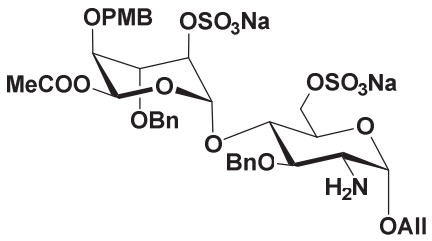
<u>Compound 88 : Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-α-L-idopyranosyluronate]-(1→4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl</u>



Compound **88** was obtained from the optimisation of the *N*,*O*-sulfonation reaction ; **^{1}H NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm)7.38 -7.08 (m, 10 H, *Ph*), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 5.88 (ddt, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.25 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a} = J_{ct,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.13 (dq, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a} = J_{cc,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.04 (d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 1H, H-1$_{gluc}$), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 4.5 Hz, H-1$_{idu}$), 4.65 (d, *J*=

10.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.60 (d, J= 4.0 Hz, 1H, H-5_{idu}), 4.55 (d, J= 11.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.40 (d, J= 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.30 (d, J= 12.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.16 (d, J= 12.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.29 (d, J= 10.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.08 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, $J_{a,cc}$ = $J_{a,ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a), 3.96 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.0 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a'), 3.73 (dd, $J_{6,6'}$ = 11.5 Hz, $J_{6,5}$= 2.0 Hz, 1H, H-6_{gluc}), 3.76-3.59 (m, 8 H, H-4_{gluc}, H-5_{gluc}, H-$6'_{gluc}$, H-2_{idu}, H-3_{idu}, OMe), 3.54-3.44 (m, 2H, H-3_{gluc}, H-4), 3.29 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, H-2^A), 3.36 (s, 3H, OMe) ; **^{13}C NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 171.1 (*C*=O), 159.1 (*C*-OMe*p*MBn), 137.5 ($C_{quat\ arom}$), 133.7 (C-b), 130.8, 129.0, 128.8, 128.7, 128.4, 128.2, 128.0 (C_{arom}), 118.2 (C-c), 114.0 (C*m* pMBn), 100.4 (C-1^B), 96.8 (C-1^A), 77.9 (C-3^A), 74.4 (C-4^A or C-3^B), 73.3 (C-3^B or C-4^A), 74.9 (*C*H_2Ph), 72.7 (*C*H_2Ph), 72.4 (C-4^B), 71.3 (*C*H_2Ph), 71.1 (C-5^A), 68.9 (*C*H_2Ph), 68.1 (C-5^B), 67.2 (C-2^B), 68.9 (C-a), 60.0 (C-6^A), 57.8 (C-2^A), 55.3 (*C*H_3, *p*MBn), 52.3 (*C*H_3, COOMe) **; HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{38}H_{46}NO_{15}S^-$ ([M-Na]$^-$): 788.2593, found 788.2596.

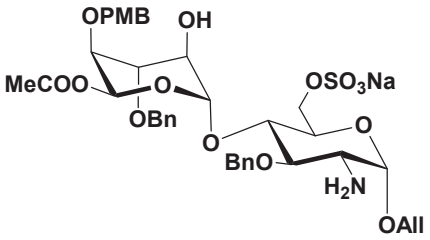
<u>Compound 89 : Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-*O*-sulfonato-α-L-idopyranosyl uronate]-(1→4)-*O*-2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl</u>



Compound **89** was obtained from the optimisation of the *N*,*O*-sulfonation reaction ; **^{1}H NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 7.31 - 6.99 (m, 10 H, ArH), 6.96 (d, J = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 6.81 (d, J = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 5.87 (ddt, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.26 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.16 (dq, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.07 (bs, 1H, H-1_{idu}), 4.99 (d, $J_{1,2}$ = 3.0 Hz, 1H, H-1_{gluc}), 4.60 (d, J= 10.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.59 (d, J= 2.5Hz, 1H, H-5_{idu}), 4.48 (d, J= 11.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.40 (d, J= 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.38-4.30 (m, 3H, H-2_{idu}, CH_2Ph), 4.19 (dd, $J_{6,6}$= 11.5 Hz, $J_{6,5}$= 2.0 Hz 1H, H-6_{gluc}), 4.16-4.08 (m, 3 H, H-$6'_{gluc}$, H-a, CH_2Ph), 4.00-3.97 (m, 1H, H-3_{idu}), 3.97-3.89 (m, 2H, H-a', H-5_{gluc}), 3.69 (t, 1H, $J_{4,3}$ = $J_{4,5}$ = 9.5 Hz, H-4_{gluc}), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.52 (t, 1H, $J_{3,2}$ = 10.0 Hz, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz, H-3_{gluc}), 3.43-3.39 (m, 1H, H-4_{idu}), 3.12 (s, 3H, OMe), 2.85 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, H-2_{gluc}) ; **^{13}C NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 171.11 (*C*=O),159.1 (*C*-OMe*p*MBn),137.4, 137.3 ($C_{quat\ arom}$),133.9 (C-b), 130.8, 131.0, 129.2, 128.8, 128.7, 128.6, 128.0, 127.8 (C_{arom}), 118.2 (C-c), 113.9 (C*m* pMBn), 97.9 (C-1^B), 96.9 (C-1^A), 80.0 (C-3^A), 74.9 (*C*H_2Ph), 73.3 (C-4^A), 72.2 (*C*H_2Ph), 70.8 (C-2^B), 70.6 (C-4^B), 70.4 (*C*H_2Ph), 70.2 (C-3^B), 69.9 (C-5^A), 68.6 (C-a), 67.5 (C-5^B), 66.3 (C-6^A), 55.3 (*C*H_3, *p*MBn), 54.4 (C-2^A), 52.3 (*C*H_3, COOMe) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{38}H_{45}NNaO_{18}S_2^-$ ([M-Na]$^-$):

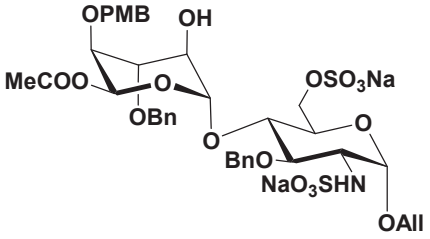
890.1981, found 890.1959, calcd. for $C_{38}H_{46}NO_{18}S_2^-$ ([M-Na]$^-$): 868.2161, found 868.2141, calcd for $C_{38}H_{45}NO_{18}S_2^{2-}$: ([M-2Na]$^{2-}$/2) 433.6044, found 433.6037.

Compound 90 : Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-α-L-idopyranosyl uronate]-(1→4)-*O*-2-amino-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl



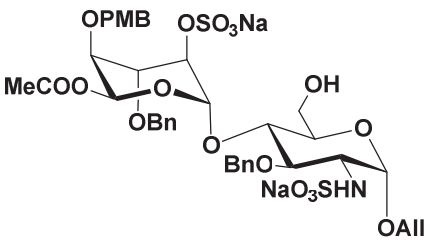
Compound **90** was obtained from the optimisation of the *N*,*O*-sulfonation reaction ; **^{1}H NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 7.35 -7.08 (m, 10 H, ArH), 7.04 (d, J = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 6.75 (d, J = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 5.88 (ddt, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.24 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a} = J_{ct,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.10 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 4.5 Hz, H-1$_{idu}$), 5.09 (dq, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a} = J_{cc,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 4.78 (d, J = 11.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.75 (d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 1H, H-1$_{gluc}$), 4.66 (d, J = 11.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.57 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H-5$_{idu}$), 4.53 (d, J = 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.45 (d, J = 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.39 (d, J = 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.28 (d, J = 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.19 (dd, $J_{6,6'}$= 11.5 Hz, $J_{6,5}$ = 2.0 Hz, 1H, H-6$_{gluc}$), 4.18-4.10 (m, 2H, H-a, H-6'$_{gluc}$), 3.92 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.0 Hz, $J_{a',cc} = J_{a',ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a'), 3.86-3.80 (m, 1H, H-5$_{gluc}$), 3.73 (t, 1H, $J_{3,2}= J_{3,4}$ = 5.0 Hz, H-3$_{idu}$), 3.71 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5}$ = 10.0 Hz, H-4$_{gluc}$), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.62 (t, 1H, $J_{2,1} = J_{2,3}$ = 4.5 Hz, H-2$_{idu}$), 3.61 (dd, 1H, $J_{4,3}$ = 5.0 Hz, $J_{4,5}$ = 4.0 Hz, H-4$_{idu}$), 3.49 (t, 1H, $J_{3,2} = J_{3,4}$ = 10.0 Hz, H-3$_{gluc}$), 3.35 (s, 3H, OMe), 2.75 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, H-2$_{gluc}$) ; **^{13}C NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 171.7 (*C*=O), 161.1 (*C*-OMe *p*MBn), 140.2, 139.7 (C$_{quat\ arom}$), 135.5 (C-b), 131.0, 129.4, 129.3, 129.2, 128.8, 128.6 (C $_{arom}$), 118.2 (C-c), 115.2 (C*m* pMBn), 102.7 (C-1^B), 98.7 (C-1^A), 82.2 (C-3^A), 77.7 (C-3^B), 77.3 (C-4^A), 76.6 (C-4^B), 75.7 (*C*H$_2$Ph), 74.2 (*C*H$_2$Ph), 73.8 (C-5^A), 73.5 (*C*H$_2$Ph), 71.3 (C-5^B), 70.4 (C-2^B), 69.6 (C-a), 67.4 (C-6^A), 56.3 (C-2^A), 55.5 (*C*H$_3$, *p*MBn), 52.4 (*C*H$_3$, COOMe) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{38}H_{46}NO_{15}S^-$ ([M-Na]$^-$): 788.2593, found 788.2579.

Compound 91 : Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-α-L-idopyranosyl uronate]-(1→4)-*O*-2-sulfoamino-3-*O*-benzyl-6-Sulfoamino-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl



Compound **91** was obtained from the optimisation of the *N*,*O*-sulfonation reaction ; **^{1}H NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 7.32 -7.11 (m, 10 H, *Ph*), 7.00 (d, 2 H, *J* = 8.5 Hz, 2 H, *Ph*-OMe), 6.82 (d, 2 H, *J* = 8.5 Hz, 2 H, *Ph*-OMe), 5.88 (ddt, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.25 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a} = J_{ct,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.13 (dq, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a} = J_{cc,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.03 (d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 1H, H-1^A), 4.88 (bs, 1H, H-1^B), 4.66 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.59 (d, *J*= 3.0 Hz, 1H, H-5^B), 4.58 (d, *J*= 11.0 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.43 (d, *J*= 11.0 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.31 (d, *J*= 11.0 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.30 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.17 (d, *J*= 12.0 Hz, 1H, C*H*$_2$Ph), 4.14 (dd, $J_{6,6'}$= 11.5 Hz, $J_{6,5}$ = 2.0 Hz, 1H, H-6^A), 4.09 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, $J_{a,cc} = J_{a,ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a), 4.07 (dd, $J_{6',6}$= 11.5 Hz, $J_{6',5}$ = 4.0 Hz, 1H, H-6'^{A}), 3.96 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 6.0 Hz, $J_{a,cc} = J_{a,ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a'), 3.89-3.84 (m, 1H, H-5^A), 3.69-3.66 (m, 5 H, H-2^B, H-3^B, OMe), 3.62 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5}$ = 9.5 Hz, H-4^A), 3.53-3.50 (m, 1 H, H-4^B), 3.49 (dd, 1H, $J_{3,2}$ = 10.0 Hz, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz, H-3^A), 3.31 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, H-2^A), 3.03 (s, 3H, OMe) ; **^{13}C NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) δ= 171.1 (*C*=O),159.1 (*C*-OMe *p*MBn), 137.5 ($C_{quat\ arom}$), 133.7 (C-b), 130.8, 129.0, 128.8, 128.7, 128.4, 128.2, 128.0 (C_{arom}), 118.3 (C-c), 114.0 (C*m* pMBn), 100.2 (C-1^B), 96.7 (C-1^A), 77.8 (C-3^A), 74.9 (C-4^A), 74.6 (*C*H$_2$Ph), 72.3 (C-2^B or C-3^B), 72.6 (*C*H$_2$Ph), 72.5 (C-4^B), 71.2 (*C*H$_2$Ph), 69.1 (C-5^A), 69.0 (C-a), 68.2 (C-5^B), 67.0 (C-3^B or C-2^B), 66.5 (C-6^A), 57.5 (C-2^A), 55.4 (*C*H$_3$, *p*MBn), 52.3 (*C*H$_3$, COOMe) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{38}H_{46}NO_{15}S^-$ ([M-Na]$^-$): 788.2593, found 788.2594.

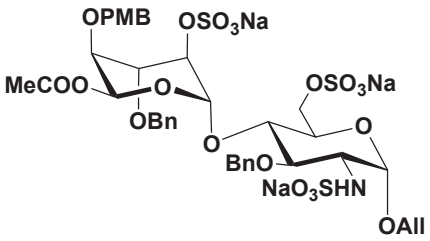
<u>Compound 92 : Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-*O*-sulfonato-α-L-idopyranosyl uronate]-(1→4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl</u>



Compound **92** was obtained from the optimisation of the *N*,*O*-sulfonation reaction ; **^{1}H NMR (400 MHz, D_2O)** δ= 7.38 -7.08 (m, 10 H, ArH), 6.98 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, *Ph*-OMe), 5.89 (ddt, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.26 (dq,

$J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a} = J_{ct,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.13 (dq, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a} = J_{cc,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.02 (d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 1H, H-1_{gluc}), 5.01 (bd, 1H, H-1_{idu}), 4.68 (d, *J*= 10.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.63 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-5_{idu}), 4.62 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.45 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.30 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.27 (bd, 1 H, H-2_{idu}), 4.24 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.11 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.09 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, $J_{a,cc} = J_{a,ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a), 3.94 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.0 Hz, $J_{a',cc} = J_{a',ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a'), 3.93-3.89 (m, 1 H, H-3_{idu}), 3.74-3.59 (m with s at δ = 3.69, 6 H, H-5_{gluc}, H-6_{gluc}, H-$6'_{gluc}$, CH_3), 3.63 (t, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5}$ = 9.0 Hz, H-4_{gluc}), 3.48 (dd, 1 H, $J_{3,2}$ = 10.0 Hz, $J_{3,4}$ = 9.0 Hz, H-3_{gluc}), 3.45-3.42 (m, 1 H, H-4_{idu}), 3.28 (dd, 1H, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, H-2_{gluc}), 3.00 (s, 3H, OMe) ; **^{13}C NMR (400 MHz, D_2O, HSQC)** 130.8, 128.9, 128.5, 128.1(C_{arom}), 118.3 (C-c), 114.0 (C*m* pMBn), 97.8 (C-1^B), 96.6 (C-1^A), 77.9 (C-3^A), 75.2 (*C*H_2Ph), 73.8 (C-4^A), 72.2 (*C*H_2Ph),), 71.2 (C-5^A), 72.5 (C-4^B), 70.4 (*C*H_2Ph), 70.5 (C-2^B), 70.1 (C-3^B), 68.9 (C-a), 67.0 (C-5^B), 59.8 (C-6^A), 57.8 (C-2^A), 55.3 (*C*H_3, *p*MBn), 52.3 (*C*H_3, COOMe) **;** **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{38}H_{45}NNaO_{18}S_2^-$ ([M-Na]$^-$): 890,1981, found 890.1963, calculated for $C_{38}H_{45}NO_{18}S_2^{2-}$([M-2Na]$^{2-}$): 433.6044, found 433.6053.

<u>Compound 93 : Allyl [methyl 3-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-*O*-sulfonato-α-L-idopyranosyl uronate]-(1→4)-*O*-3-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-sulfonato-α-D-glucopyranosyl</u>

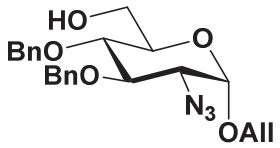


Compound **93** was obtained from the optimisation of the *N*,*O*-sulfonation reaction ; **^{1}H NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 7.31 -7.11 (m, 10H, ArH), 6.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, *Ph*-OMe), 5.87 (ddt, $J_{b,ct}$ = 17.0 Hz, $J_{b,cc}$ = 10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-b), 5.24 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a} = J_{ct,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.12 (dq, $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a} = J_{cc,a'} = J_{gem}$ = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.00 (bs, 1H, H-1_{idu}), 4.99 (d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 1H, H-1_{gluc}), 4.66 (d, *J*= 2.5 Hz, 1H, H-5_{idu}), 4.61 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.59 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.40 (d, *J*= 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.29 (bd, 1H, H-2_{idu}), 4.28 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.20 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.15 (dd, $J_{6,6'}$= 11.5 Hz, $J_{6,5}$ = 2.0 Hz, 1H, H-6_{gluc}), 4.09 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, $J_{a,cc} = J_{a,ct}$ =1.5 Hz, 1H, H-a), 4.08-4.03 (m, 2H, H-$6'_{gluc}$, CH_2Ph), 3.98-3.90 (m, 2H, H-3_{idu}, H-a'), 3.86 (m, 1H, H-5_{gluc}), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.62 (t, $J_{4,3} = J_{4,5}$ = 9.5 Hz, 1H, H-4_{gluc}), 3.44 (t, $J_{3,2}$ = 10.0 Hz, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz, 1H, H-3_{gluc}), 3.39-3.36 (m, 1H, H-4_{idu}), 3.28 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, H-2_{gluc}), 2.98 (s, 3H, OMe) ; **^{13}C NMR (400 MHz, D_2O)** δ (ppm) 171.11 (*C*=O), 159.1 (*C*-OMe *p*MBn), 137.4, 137.3

($C_{quat\ arom}$), 133.9 (C-b), 131.0, 129.3, 129.2, 129.0, 128.7, 128.6, 128.2 (C_{arom}), 118.6 (C-c), 114.2 (C*m* pMBn), 97.9 (C-1^B), 96.8 (C-1^A), 78.2 (C-3^A), 75.5 (CH_2Ph), 73.6 (C-4^A), 72.5 (CH_2Ph), 70.8 (CH_2Ph or C-4^B or C-2^B), 70.6 (C-4^B or C-2^B or CH_2Ph), 70.5 (C-2^B or CH_2Ph or C-4^B),70.1 (C-3^B), 69.4 (C-5^A), 69.3 (C-a), 67.5 (C-5^B), 66.7 (C-6^A), 58.0 (C-2^A), 55.6 (CH_3, *p*MBn), 52.5 (CH_3, COOMe)**;** **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{38}H_{44}NNa_2O_{21}S_3^-$ ([M-Na]$^-$) : 992,1369, found 992.1352, calculated for $C_{38}H_{44}NNaO_{21}S_3^{2-}$ ([M-2Na]$^{2-}$/2) : 484.5738, found 484.5714, calculated for $C_{38}H_{44}NO_{21}S_3^{3-}$: ([M-3Na]$^{3-}$/3) 315.3861, found 315.3855.

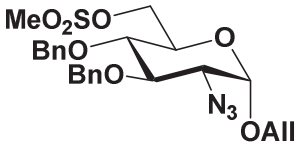
Compound from Chapter 4

Compound 97 : Allyl 2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl



To a solution of the compound **43** (500 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq) in DCM (10 mL) were added Et_3SiH (207 µL, 1.30 mmol, 1.1 eq) and powdered 4-A molecular sieves (260 mg). The mixture was left to stir for 15 minutes and then cooled at -60 °C. $PhBCl_2$ (536 µL, 4.09 mmol, 3.4 eq) was added and the reaction mixture was left to stir during 1h at this temperature. The reaction was quenched at -60 °C with triéthylamine (1 mL), methanol (1 mL) and $NaHCO_3$sat (1.75 mL). The mixture was diluted in diethyl ether, washed with a solution of NaOH [0.1 M], KH_2PO_4 (5 %) and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (10 % - 30 % ethyl acetate/Petroleum ether) afforded the compound **X** as oil (450 mg, 93 %) whose ^{1}H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[263]

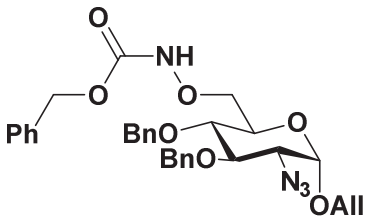
Compound 98 : Allyl 2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-*O*-mesyl-α-D-glucopyranosyl



To a solution of compound **99** (213 mg, 0.501 mmol, 1.0 eq) in DCM (835 µL) cooled at 0 °C was added NEt3 (154 µL, 1.102 mmol, 2.2 eq). Methanesulfonyl chloride (43 µL, 0.551 mmol, 1.1 eq) was added drop by drop and the mixture was left to stir during 1 h at 0 °C. The reaction was quenched with a solution of aqueous NH_4Cl (2 M) and extracted three times with diethyl ether. The combined organic

layers were washed with brine and dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 10 % Ethyl acetate/Toluene) afforded the compound as oil (185 mg, 73 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.35-7.19 (m, 10H, ArH), 5.85 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.5 Hz, $J_{b,cc}$ = 11.0 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.5 Hz, 1H, H-b), 5.27 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.18 (dd, , $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 4.89 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-H), 4.86-4.77 (m, 3H, CH_2Ph), 4.58 (d, J = 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.34-4.25 (m, 2H, 6-H), 4.13 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, $J_{a,cc}$ = $J_{a,ct}$ = 2.5 Hz, 1H, H-a), 4.03-3.93 (m, H-a', 3-H), 3.87 (dt, $J_{5,6}$ = 10.0 Hz, $J_{5,4}$ = 4.0 Hz, 1H, 5-H), 3.50 (t, J = 10 Hz, 1H, 4-H), 3.31 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, 2-H), 2.93 (s, 3H, CH_3) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 132.9 (C-b), 128.6, 128.5, 128.2, 128.0 (C_{arom}), 118.4 (C-c), 96.8 (C-1), 80.2 (C-3), 77.6 (C-4), 75,5 (O*C*H_2Ph), 75.3 (O*C*H_2Ph), 69.3 (C-5), 68.8 (C-a), 68.0 (C-6), 63.3 (C-2), 37,6 (*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{24}H_{29}N_3NaO_7S$ [M*Na*+] : 526.1618 found : 526.1601.

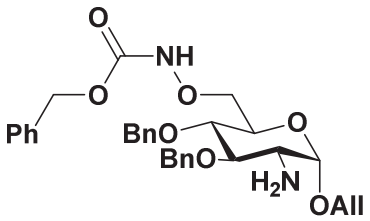
<u>Compound 99 : Allyl 2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-*O*-carbobenzoxyoxyamine-α-D-glucopyranosyl</u>



To a solution of compound **97** (63 mg, 0.125 mmol, 1.0 eq) in anhydrous DMF (835 µL) was added CbzNHOH (23 mg, 0.138 mmol, 1.1 eq). The solution was cooled at 0 °C and NaH (5 mg, 0.138 mmol, 1.1 eq) was added, the mixture was left to stir overnight at room temperature. The reaction was quenched with 1.5 mL of water at 0 °C, the solution was diluted with Ethyl acetate and the organic phase was extracted three times with diethyl ether. The combined organic layers were washed with brine and dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (20 % - 40 % Diethyl ether/Petroleum ether) afforded the compound as oil (20 mg, 29 %).**^{1}H NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.42 (s, 1H, NH), 7.31-7.20 (m, 15H, ArH), 5.83 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.5 Hz, $J_{b,cc}$ = 11.0 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.5 Hz, 1H, H-b), 5.26 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.15 (dd, , $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.08 (d, J = 2.0 Hz, 2H, CH_2Ph Cbz), 4.86 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 1-H), 4.82-4.76 (m, 3H, CH_2Ph), 4.67 (d, J = 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.14-4.05 (m, 2H, 6-H, H-a), 4.00-3.91 (m, 3H, 6-H, 3-H, H-a'), 3.81 (dt, $J_{5,6}$ = 10.0 Hz, $J_{5,4}$ = 5.0 Hz, 1H, 5-H), 3.57 (t, J = 10 Hz, 1H, 4-H), 3.29 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 4.0 Hz, 1H, 2-H) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 157.2 (C=O),138.0, 137.9, 135.6 ($C_{quat\ arom}$) 133.3 (C-b), 128.9, 128.7, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 128.1 (C_{arom}), 118.4 (C-c), 97.0 (C-1), 80.5 (C-3), 78.0 (C-4),

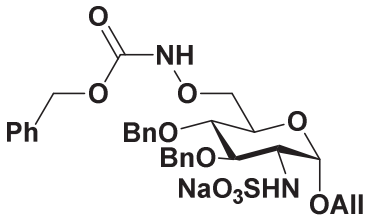
75,7 (O*C*H$_2$Ph), 75.3 (O*C*H$_2$Ph), 75.0 (C-6), 70.3 (C-5), 68.9 (C-a), 67.8 (O*C*H$_2$PH Cbz), 63.5 (C-2) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{31}H_{34}N_4NaO_7$ [M*Na*+] : 597.2320 found : 526.2290.

<u>Compound 100: Allyl 2-amino-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-*O*-carbobenzoxyoxyamine-α-D-glucopyranosyl</u>



Compound **100** was prepared from compound **98** (45 mg, 78.3 µmol, 1.0 eq) according the general procedure of azide reduction. Purification by flash chromatography on silica gel (0.5 % - 4 % Methanol/Dichloromethane + 0.1 % NEt$_3$) afforded the compound as oil (43 mg, quantitative yield) ; **^{1}H NMR** (360 MHz, CDCl$_3$) δ (ppm) 7.56 (s, 1H, NH), 7.30-7.19 (m, 15H, ArH), 5.81 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.5 Hz, $J_{b,cc}$ = 11.0 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.5 Hz, 1H, H-b), 5.19 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.10 (dq, , $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.0 Hz, 1H, H-cc), 5.10 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, CH$_2$Ph Cbz), 4.91 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH$_2$Ph), 4.81 (d, *J* = 3.5 Hz,1H, H-1), 4.77 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH$_2$Ph), 4.67 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, CH$_2$Ph), 4.12 (dd, J_{gem} = 10.0 Hz, $J_{6,5}$ = 4.5 Hz, 1H, H-6), 4.09 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.5 Hz, $J_{a,cc}$ = $J_{a,ct}$ = 2.5 Hz, 1H, H-a), 4.00 (dd, J_{gem} = 10.0 Hz, $J_{6',5}$ = 2.5 Hz, 1H, H-6'), 3.91 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.5 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ = 2.5 Hz, 1H, H-a'), 3.80 (dq, $J_{5,6}$ = $J_{5,6'}$ = 10.0 Hz, $J_{5,4}$ = 5.0 Hz, 1H, 5-H), 3.51 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H, 4-H, 3-H), 2.72 (dd, $J_{2,3}$ = 9.0 Hz, $J_{2,1}$ = 4.0 Hz, 1H, 2-H) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, CDCl$_3$) δ (ppm) 157.2 (C=O),138.6, 138.2, 135.8 ($C_{quat\ arom}$) 134.0 (C-b), 128.8, 128.7, 128.5, 128.3, 128.1, 128.1 (C_{arom}), 117.6 (C-c), 99.0 (C-1), 84.0 (C-3), 78.7 (C-4), 75,9 (O*C*H$_2$Ph), 75.3 (C-6), 75.0 (O*C*H$_2$Ph), 70.8 (C-5), 68.8 (C-a), 67.7 (O*C*H$_2$PH Cbz), 56.0 (C-2) **;** **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{31}H_{36}N_2NaO_7$ [M*Na*+] : 571.2415 found : 571.2397.

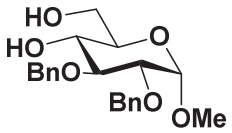
<u>Compound 101 : Allyl 3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-sulfoamino-6-*O*-carbobenzoxyoxyamine-α-D-glucopyranosyl</u>



Compound **100** (37 mg, 67.4 µmol, 1.0 eq) was diluted in MeOH (1,3 mL), Et$_3$N (94 µL, 674.4 µmol, 10 eq) and SO$_3$•Py were added successively. The reaction was left to stir 1 h at RT. Purification by

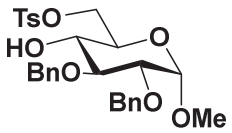
Sephadex LH-20 chromatography (CH_2Cl_2/MeOH (1:1)) followed by ion exchange on BioRad AG50W-8 200 sodium form afforded the compound as white solid (25 mg, 57%) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.36-7.07 (m, 15H, ArH), 5.90 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.5 Hz, $J_{b,cc}$ = 11.0 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.5 Hz, 1H, H-b), 5.21 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.12 (d, J = 3.5 Hz,1H, H-1), 5.06 (dq, , $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.0 Hz, 1H, H-cc), 5.03 – 5.00 (Under HOD peak, 3H, CH_2Ph), 4.99 (s, 1H, CH_2Ph), 4.68 (d, J = 11 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.91 (dd, J = 10.5 Hz, 2H, CH_2Ph), 4.12 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.5 Hz, $J_{a,cc}$ = $J_{a,ct}$ = 2.5 Hz, 1H, H-a), 4.00 – 3.89 (m, 3H, H-a, H-6), 3.71 (dt, $J_{5,6}$ = $J_{5,6'}$ = 10.0 Hz, $J_{5,4}$ = 5.0 Hz, 1H, 5-H), 3.51 (m, 1H, 4-H), 3.40 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 3-H), 3.38 (dd, $J_{2,3}$ = 9.0 Hz, $J_{2,1}$ = 4.0 Hz, 1H, 2-H) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm) 159.6 (C=O),140.5, 140.0, 137.8 ($C_{quat\ arom}$) 135.8 (C-b), 129.7, 129.4, 129.3, 129.3, 129.2, 128.8, 128.6 (C_{arom}), 117.8 (C-c), 98.7 (C-1), 82.4 (C-4), 79.3 (C-3), 76.9 (C-6), 76,5 (O*C*H_2Ph), 76.1 (O*C*H_2Ph), 70.9 (C-5), 70.1 (C-a), 68.1 (O*C*H_2PH Cbz), 59.7 (C-2) **; HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{31}H_{35}N_2NaO_{10}S$ [M-*Na*+] : 627.2018 found : 627.1993.

<u>Compound 104 : Methyl 2,3-di-*O*-benzyl-α-D-glucopyranosyl</u>



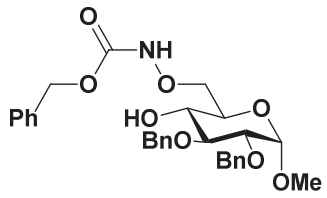
1-Methyl-2,3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranoside **103** (806 mg, 1.74 mmol, 1.0 eq) was diluted in a solution of acetic acid and water (8.3 mL, v/v : 4/1) and heated at 60 °C for 3 h. The solution was then co-evaporated three times with toluene. Purification by flash chromatography on silica gel (10 % - 30 % Acetone/Petroleum ether) afforded the compound as oil (630 mg, 97 %) whose ^{1}H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[264]

<u>Compound 105 : Methyl 2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-tosyl-α-D-glucopyranosyl</u>



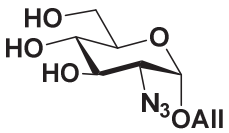
To a solution of compound **104** (630 mg, 1,68 mmol, 1.0 eq) in DCM (2.8 mL) cooled at 0 °C was added NEt3 (516 µL, 3,70 mmol, 2.2 eq). 4-Toluenesulfonyl chloride (353 mg, 1.85 mmol, 1.1 eq) was added drop by drop and the mixture was left to stir during 1 h at 0 °C. The reaction was quenched with a solution of aqueous NH_4Cl (2 M) and extracted three times with diethyl ether. The combined organic layers were washed with brine and dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (5 % - 20 % Ethyl acetate/Petroleum ether) afforded the compound as oil (707 mg, 80 %) whose ^{1}H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[265]

Compound 106 : Methyl 2,3-di-*O*-benzyl-6-*O*-carbobenzoxyoxyamine-α-D-glucopyranosyl



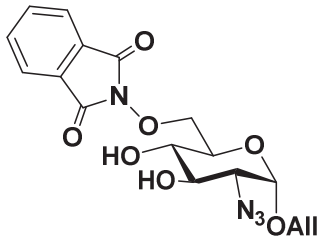
To a solution of compound **105** (92 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq) in anhydrous DMF (850 µL) was added CbzNHOH (145 mg, 0.87 mmol, 5.0 eq). The solution was cooled at 0 °C and NaH (35 mg, 0.87 mmol, 5.0 eq) was added, the mixture was left to stir overnight at room temperature. The reaction was quenched with 5 mL of water at 0 °C, the solution was diluted with Ethyl acetate and the organic phase was extracted three times with diethyl ether. The combined organic layers were washed with brine and dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated in vacuo. Purification by flash chromatography on silica gel (20 % - 40 % Diethyl ether/Petroleum ether) afforded the compound as oil (60 mg, 69 %).**^{1}H NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.39-7.24 (m, 15H, ArH), 5.15 (s, 2H, CH_2Ph), 5.08 (d, J = 11.0 Hz, 2H, CH_2Ph), 4.81 – 4.73 (m, 2H, CH_2Ph), 4.63 (d, J = 11.0 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.55 (d, J = 4.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 4.14 – 4.05 (m, 2H, 6-H), 3.83 – 3.61 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 3.47 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 4.0 Hz, 1H, 2-H), 3,35 (s, 3H, OMe) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 158.9 (C=O),140,3, 140,2, 139,5 ($C_{quat\ arom}$), 130.1, 130.0, 130.0, 129.9, 129.8, 129.6, 129.4, 129.2 (C_{arom}), 99.9 (C-1), 82.5 (C-3), 80.8 (C-2), 77.2 (C-6), 76.9 (O*C*H_2Ph), 74.8 (O*C*H_2Ph), 71.6, (C-4), 71.1 (C-5), 69.2 (O*C*H_2Ph), 56.8 (O*C*H_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{29}H_{33}NO_8$ [M*Na*+] : 546.2098 found 546.2086.

Compound 118 : Allyl 2-Azido-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl



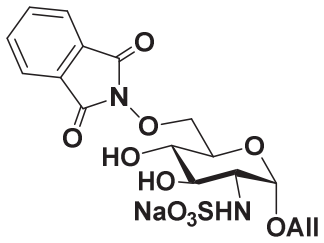
Dowex 50X8 200 H^+ (656 mg) was added to a solution of Allyl 2-azido-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-α-D-glucopyranoside **43** (500 mg, 1.50 mmol, 1.0 eq) in DCM (4.2 mL) and MeOH (17.8 mL). After 24 h stirring at 40 °C, the mixture was filtered, neutralised with solid $NaHCO_3$ and again filtered, and the resulting solution was concentrated. Purification by flash chromatography on silica gel (2 % - 18 % Methanol/Dichloromethane) afforded the compound as oil (319 mg, 87 %) whose ^{1}H and ^{13}C data were identical to those previously reported.[266]

Compound 112 : Allyl 2-Azido-2-deoxy-6-*O*-phtalimido-α-D-glucopyranosyl



To a solution of PPh_3 (921 mg, 3.51 mmol, 2.7 eq) in DMF (5 mL), was added DIAD (691 µL, 2.7 eq) at 0 °C. The solution was left to stir for 15 min and a mixture of compound **119** (319 mg, 1.30 mmol, 1.0 eq) and PhtNHOH (530 mg, 3.25 mmol, 2.5 eq) in DMF (8 mL) was added. The solution was left to stir overnight. The DMF was removed under vacuo and the PPh_3O was removed thank to a precipitation with $ZnCl_2$: The precipitate was diluted in EtOH (9 mL) and $ZnCl_2$ (1.4 g, 10,5 mmol, 3 eq) was added. A white solid was observed and filtered and the solution was concentrated. Purification by flash chromatography on silica gel (0 % - 3 % Methanol/Dichloromethane) afforded the compound as oil (326 mg, 64 %) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.85-7.76 (m, 4H, ArH), 5.94 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.5 Hz, $J_{b,cc}$ = 11.0 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.5 Hz, 1H, H-b), 5.34 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.17 (dd, , $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 4,95 – 4,79 (Under HOD peak, 1H, 1-H), 4.48 (dd, J_{gem} = 11.5 Hz, $J_{6,5}$ = 1.5 Hz, 1H, 6-H), 4.38 (dd, J_{gem} = 11,5 Hz, $J_{6',5}$ = 5.5 Hz, 1H, 6-H'), 4.31 (dd, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, 1H, H-a), 4.02 (dd, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.0 Hz, 1H, H-a'), 3.96 – 3.85 (m, 2H, 3-H, 5-H), 3.58 (t, J = 10.0 Hz, 1H, 4-H), 3.15 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 4.5 Hz, 1H, 2-H) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, MeOD) δ (ppm) 166.0, 164.9 (C=O), 136.0, 135.6 (C_{arom}) 135.2 (C-b), 130.6, 130.3 ($C_{arom\ quat}$), 124.5, 124.2 (C_{arom}), 117.7 (C-c), 98.8 (C-1), 78.5 (C-6), 72.7 (C-5), 72.5 (C-3), 71.8 (C-4), 69.8 (C-a), 64.3 (C-2) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{17}H_{18}N_4O_7$ [M*Na*+] : 413.1067 found : 413.1052.

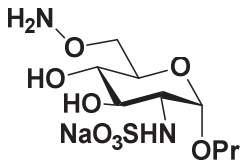
<u>Compound 113 : Allyl-2-deoxy-6-*O*-phtalimido-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl</u>



To a solution of compound **112** (55 mg, 0,141 mmol, 1.0 eq) in THF (3 mL) and water (540 µL) was added nBu_3P (71 µL, 0,282 mmol, 2.0 eq). The mixture was left to stir overnight. After completion of the reaction monitored by TLC (CH_2Cl_2/MeOH : 95/5), the complex SO_3•Me3N was added and left to stir for 1h. The solution was diluted in water, the aqueous phase was washed three times with ethyl acetate and lyophilised. Purification by Sephadex G15 chromatography followed by ion exchange on BioRad AG50W-8 200 sodium afforded the compound as a white solid (30 mg, 46 %) ; **^{1}H NMR** (300

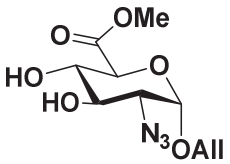
MHz, D_2O) δ (ppm) 7.88-7.82 (m, 4H, ArH), 5.94 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.5 Hz, $J_{b,cc}$ = 11.0 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.5 Hz, 1H, H-b), 6.04 (dd, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.40 (dd, , $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.28 (d, J = 10.5 Hz, 1H, H-ct), 5.17 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-H), 4.58 – 4.44 (m, 2H, 6-H), 4.31 (dd, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, 1H, H-a), 4.11 (dd, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.0 Hz, 1H, H-a'), 4.07 – 3.99 (m, 1H, 5-H), 3.71 – 3.61 (m, 2H, 3-H, 4-H), 3.32 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 4.5 Hz, 1H, 2-H) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, D_2O) δ (ppm) 165.3 (C=O), 135.3, (C_{arom}) 133.7 (C-b), 128.0, 123.7 ($C_{arom\ quat}$), 118.2 (C-c), 96.9 (C-1), 77.0 (C-6), 71.3 (C-3), 70.2 (C-5), 69.7 (C-4), 69.2 (C-a), 57.5 (C-2), 21.8 (C-b), 9.7 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{17}H_{19}N_2NaO_{10}S$ [M-Na^+] : 443.0766 found : 443.0747.

<u>Compound 95 : Propyl-2-deoxy-6-*O*-aminooxy-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl</u>



To a solution of compound **113** (30 mg, 0,068 mmol, 1.0 eq) in water (1.7 mL) was added NH_2NH_2 (64 %) (51 µL, 0.680 mmol, 10.0 eq). The mixture was left to stir overnight. Purification by Sephadex G15 chromatography afforded the compound as a white solid (18 mg of compound with impurities). **^{1}H NMR** (300 MHz, D_2O) δ (ppm) 5.02 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 1-H), 4.01 – 3.85 (m, 2H, 6-H), 3.85 – 3.77 (m, 1H, 5-H), 3.67 – 3.56 (m, 2H, H-a, 3-H), 3.51 – 3.38 (m, 2H, H-a', 4-H), 3.28 – 3.16 (m, 1H, 2-H) ; **^{13}C NMR** (360 MHz, D_2O) δ (ppm) 97.0 (C-1), 74.2 (C-6), 71.2 (C-3), 70.2 (C-a), 69.9 (C-4), 69.5 (C-5), 57.5 (C-2), 21.8 (C-b), 9.7 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{19}H_{18}N_2NaO_8S$ [M-Na^+] : 315.0868 found : 315.0863.

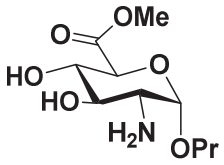
<u>Compound 117 : Allyl (methyl 2-Azido-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl iduronate)</u>



To a stirred solution of **119** (107 mg, 0.44 mmol, 1.0 eq) in CH_2Cl_2/H_2O (v/v = 2/1, 4 mL), was added TEMPO (20 mg, 0.13 mmol, 0.3 eq) and BAIB (352 mg, 1.09 mmol, 2.5 eq). The raction was stirred at room temperature for 2 h before addition of sat. $NaHCO_3$ (1.5 mL) and EtOAc (1.5 mL). After 1 h, the aqueous layer was washed three times with EtOAc and lyophilised to give the intermediate product, which was directly applied to the next reaction without purification. The product was dissolved in DMF (3.4 mL) and MeI was added (82 µL, 1.31 mmol, 3.0 eq). The solution was left to stir for 24 h and quenched by MeOH. The solvant was removed under vaccuo. Purification by flash

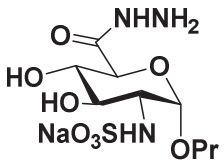
chromatography on silica gel (2 % - 8 % Methanol/Dichloromethane) afforded the compound as yellowish oil (74 mg, 62%) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, MeOD) δ (ppm) 5.95 (dddd, $J_{b,ct}$ = 17.5 Hz, $J_{b,cc}$ = 11.0 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ = 5.5 Hz, 1H, H-b), 5.36 (dq, $J_{ct,b}$ = 17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.22 (dq, , $J_{cc,b}$ = 10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} = 1.5 Hz, 1H, H-cc), 4,98 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 1-H), 4.22 (dd, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, 1H, H-a), 4.10 (d, J = 14.5 Hz, 1H, 5-H), 4.06 (dd, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 5.0 Hz, 1H, H-a'), 3.86 (dd, J = 9,5 Hz, J = 1,5 Hz ; 1H, 3-H), 3.59 (dd, J = 9,5 Hz, J = 1,0 Hz, 1H, 4-H), 3.20 (dd, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 4.0 Hz, 1H, 2-H); **^{13}C NMR** (360 MHz, MeOD) δ (ppm) 170.2 (C=O), 133.4 (C-b), 116.5 (C-c), 97.7 (C-1), 72.2 (C-4), 71.7 (C-5), 70.7 (C-3), 68.5 (C-a), 62.7 (C-2), 51.5 (OCH_3) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{10}H_{15}N_3O_6$ [M*Na*$^+$] : 296.0859 found : 296.0850.

<u>Compound 119 : Propyl (methyl-2amino-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl iduronate)</u>



Compound **120** (52 mg, 0,19 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (4.8 mL). Palladium on Barium Sulfate (139 mg) was added and the solution was degassed and stirred for 2 h under hydrogen (1atm), filtered under celite and evaporation of the solvant under vaccuo afforded the compound as yellowish oil (47 mg, quant) ; **^{1}H NMR** (300 MHz, D_2O) δ (ppm) 4,85 – 4,71 (Under HOD peak, 1H, 1-H), 4.04 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 3.73 (s, 3H, COOMe), 3.67 – 3.59 (m, 1H, H-a), 3.51 – 3.40 (m, 2H, 3-H, 4-H), 3.40 – 3.35 (m, 1H, H-a'), 2.60 (dd, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, $J_{2,1}$ = 4.0 Hz, 1H, 2-H), 1.61 (sex, J = 7.0 Hz, 2H, H-b), 0.93 (t, J = 9.0 Hz, 3H, H-c) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, D_2O) δ (ppm) 172.0 (C=O), 100.9 (C-1), 75.6 (C-4), 73.6 (C-3), 73.5 (C-5), 71.2 (C-a), 57.0 (C-2), 52.8 (OCH_3), 23.8 (C(b), 11.1 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_{10}H_{19}NO_6$ [M*Na*$^+$] : 272.1110 found : 272.1100.

<u>Compound 96 : Allyl (methyl-2-deoxy-6-hydrazide-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl iduronate)</u>



Compound **119** (12 mg, 0,048 mmol, 1.0 eq) was dissolved in THF (1 mL) and H_2O (185 µL). $Me_3N{\bullet}SO_3$ (8 mg, 0,058 mmol, 1.2 eq) was added and the solution was left to stirr for 1 h. After completion of the reaction, 36 µL of $NH_2NH_2.H_2O$ (64 %) was added and left to stir overnight at room temperature. Purification by Sephadex G25 chromatography followed by ion exchange on BioRad AG50W-8 200 sodium afforded the compound as a white solid (5 mg, 31 %) ; **^{1}H NMR** (360 MHz,

D_2O) δ (ppm) 5.18 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.07 – 4.01 (m, 1H, 5-H), 3.69 – 3.58 (m, 3H, 3-H, 4-H, H-a), 3.53 – 3.43 (m, 1H, H-a'), 3.31 – 3.24 (m, 1H, 2-H), 1.62 (sex, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-b), 0.91 (t, *J* = 9.0 Hz, 3H, H-c) ; **^{13}C NMR** (300 MHz, D_2O) δ (ppm) 169.7 (C=O), 97.7 (C-1), 71.8 (C-4 or C-3), 71.0 (C-3 or C-4), 70.7 (C-a), 70.6 (C-5), 57.5 (C-2), 22.0 (C(b), 9.9 (C-c) ; **HRMS** (ESI) *m/z* calculated for $C_9H_{18}N_3O_8S$ [M-*Na*] : 328.0816 found : 328.0820.

Bibliogaphie

(1) Barbeyron, T.; Brillet-Guéguen, L.; Carré, W.; Carrière, C.; Caron, C.; Czjzek, M.; Hoebeke, M.; Michel, G. Matching the Diversity of Sulfated Biomolecules: Creation of a Classification Database for Sulfatases Reflecting Their Substrate Specificity. *PLoS One* **2016**, *11* (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164846.

(2) Obaya, A. J. Molecular Cloning and Initial Characterization of Three Novel Human Sulfatases. *Gene* **2006**, *372*, 110–117. https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.12.023.

(3) Sardiello, M.; Annunziata, I.; Roma, G.; Ballabio, A. Sulfatases and Sulfatase Modifying Factors: An Exclusive and Promiscuous Relationship. *Hum Mol Genet* **2005**, *14* (21), 3203–3217. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi351.

(4) Stein, C.; Hille, A.; Seidel, J.; Rijnbout, S.; Waheed, A.; Schmidt, B.; Geuze, H.; von Figura, K. Cloning and Expression of Human Steroid-Sulfatase. Membrane Topology, Glycosylation, and Subcellular Distribution in BHK-21 Cells. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (23), 13865–13872.

(5) Peters, C.; Schmidt, B.; Rommerskirch, W.; Rupp, K.; Zühlsdorf, M.; Vingron, M.; Meyer, H. E.; Pohlmann, R.; von Figura, K. Phylogenetic Conservation of Arylsulfatases. CDNA Cloning and Expression of Human Arylsulfatase B. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (6), 3374–3381.

(6) Anson, D. S.; Taylor, J. A.; Bielicki, J.; Harper, G. S.; Peters, C.; Gibson, G. J.; Hopwood, J. J. Correction of Human Mucopolysaccharidosis Type-VI Fibroblasts with Recombinant N-Acetylgalactosamine-4-Sulphatase. *Biochem J* **1992**, *284* (Pt 3), 789–794.

(7) Franco, B.; Meroni, G.; Parenti, G.; Levilliers, J.; Bernard, L.; Gebbia, M.; Cox, L.; Maroteaux, P.; Sheffield, L.; Rappold, G. A.; Andria, G.; Petit, C.; Ballabio, A. A Cluster of Sulfatase Genes on Xp22.3: Mutations in Chondrodysplasia Punctata (CDPX) and Implications for Warfarin Embryopathy. *Cell* **1995**, *81* (1), 15–25. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90367-4.

(8) Puca, A. A.; Zollo, M.; Repetto, M.; Andolfi, G.; Guffanti, A.; Simon, G.; Ballabio, A.; Franco, B. Identification by Shotgun Sequencing, Genomic Organization, and Functional Analysis of a Fourth Arylsulfatase Gene (ARSF) from the Xp22.3 Region. *Genomics* **1997**, *42* (2), 192–199. https://doi.org/10.1006/geno.1997.4716.

(9) Ferrante, P.; Messali, S.; Meroni, G.; Ballabio, A. Molecular and Biochemical Characterisation of a Novel Sulphatase Gene: Arylsulfatase G (ARSG). *Eur J Hum Genet* **2002**, *10* (12), 813–818. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200887.

(10) Kowalewski, B.; Lamanna, W. C.; Lawrence, R.; Damme, M.; Stroobants, S.; Padva, M.; Kalus, I.; Frese, M.-A.; Lübke, T.; Lüllmann-Rauch, R.; D'Hooge, R.; Esko, J. D.; Dierks, T. Arylsulfatase G Inactivation Causes Loss of Heparan Sulfate 3-O-Sulfatase Activity and Mucopolysaccharidosis in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (26), 10310–10315. https://doi.org/10.1073/pnas.1202071109.

(11) Buono, M.; Cosma, M. P. Sulfatase Activities towards the Regulation of Cell Metabolism and Signaling in Mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67* (5), 769–780. https://doi.org/10.1007/s00018-009-0203-3.

(12) Dhamale, O. P.; Lawrence, R.; Wiegmann, E. M.; Shah, B. A.; Al-Mafraji, K.; Lamanna, W. C.; Lübke, T.; Dierks, T.; Boons, G.-J.; Esko, J. D. Arylsulfatase K Is the Lysosomal 2-Sulfoglucuronate Sulfatase. *ACS Chem Biol* **2017**, *12* (2), 367–373. https://doi.org/10.1021/acschembio.6b01033.

(13) Tomatsu, S.; Fukuda, S.; Masue, M.; Sukegawa, K.; Fukao, T.; Yamagishi, A.; Hori, T.; Iwata, H.; Ogawa, T.; Nakashima, Y. Morquio Disease: Isolation, Characterization and Expression of Full-Length CDNA for Human N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *181* (2), 677–683. https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91244-7.

(14) Scott, H. S.; Blanch, L.; Guo, X. H.; Freeman, C.; Orsborn, A.; Baker, E.; Sutherland, G. R.; Morris, C. P.; Hopwood, J. J. Cloning of the Sulphamidase Gene and Identification of Mutations in Sanfilippo A Syndrome. *Nat. Genet.* **1995**, *11* (4), 465–467. https://doi.org/10.1038/ng1295-465.

(15) Freeman, C.; Hopwood, J. J. Glucuronate-2-Sulphatase Activity in Cultured Human Skin Fibroblast Homogenates. *Biochem J* **1991**, *279* (Pt 2), 399–405.
(16) Bielicki, J.; Hopwood, J. J.; Melville, E. L.; Anson, D. S. Recombinant Human Sulphamidase: Expression, Amplification, Purification and Characterization. *Biochem J* **1998**, *329* (Pt 1), 145–150.
(17) Morimoto-Tomita, M.; Uchimura, K.; Werb, Z.; Hemmerich, S.; Rosen, S. D. Cloning and Characterization of Two Extracellular Heparin-Degrading Endosulfatases in Mice and Humans. *J Biol Chem* **2002**, *277* (51), 49175–49185. https://doi.org/10.1074/jbc.M205131200.
(18) Ghosh, D. Three-Dimensional Structures of Sulfatases. *Meth. Enzymol.* **2005**, *400*, 273–293. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00016-9.
(19) Bond, C. S.; Clements, P. R.; Ashby, S. J.; Collyer, C. A.; Harrop, S. J.; Hopwood, J. J.; Guss, J. M. Structure of a Human Lysosomal Sulfatase. *Structure* **1997**, *5* (2), 277–289. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00185-8.
(20) Diez-Roux, G.; Ballabio, A. Sulfatases and Human Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2005**, *6* (1), 355–379. https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162334.
(21) Miech, C.; Dierks, T.; Selmer, T.; Figura, K. von; Schmidt, B. Arylsulfatase from Klebsiella Pneumoniae Carries a Formylglycine Generated from a Serine. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (9), 4835–4837. https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.4835.
(22) Ghosh, D. Human Sulfatases: A Structural Perspective to Catalysis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64* (15), 2013–2022. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7175-y.
(23) Demydchuk, M.; Hill, C. H.; Zhou, A.; Bunkóczi, G.; Stein, P. E.; Marchesan, D.; Deane, J. E.; Read, R. J. Insights into Hunter Syndrome from the Structure of Iduronate-2-Sulfatase. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15786. https://doi.org/10.1038/ncomms15786.
(24) Schmidt, B.; Selmer, T.; Ingendoh, A.; Figurat, K. von. A Novel Amino Acid Modification in Sulfatases That Is Defective in Multiple Sulfatase Deficiency. *Cell* **1995**, *82* (2), 271–278. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90314-3.
(25) Knaust, A.; Schmidt, B.; Dierks, T.; von Bülow, R.; von Figura, K. Residues Critical for Formylglycine Formation and/or Catalytic Activity of Arylsulfatase A. *Biochemistry* **1998**, *37* (40), 13941–13946. https://doi.org/10.1021/bi9810205.
(26) Dierks, T.; Lecca, M. R.; Schlotterhose, P.; Schmidt, B.; von Figura, K. Sequence Determinants Directing Conversion of Cysteine to Formylglycine in Eukaryotic Sulfatases. *EMBO J.* **1999**, *18* (8), 2084–2091. https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2084.
(27) Hanson, S. R.; Best, M. D.; Wong, C.-H. Sulfatases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (43), 5736–5763. https://doi.org/10.1002/anie.200300632.
(28) Preusser-Kunze, A.; Mariappan, M.; Schmidt, B.; Gande, S. L.; Mutenda, K.; Wenzel, D.; von Figura, K.; Dierks, T. Molecular Characterization of the Human Calpha-Formylglycine-Generating Enzyme. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (15), 14900–14910. https://doi.org/10.1074/jbc.M413383200.
(29) Dierks, T.; Schmidt, B.; von Figura, K. Conversion of Cysteine to Formylglycine: A Protein Modification in the Endoplasmic Reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (22), 11963–11968.
(30) Bojarová, P.; Williams, S. J. Sulfotransferases, Sulfatases and Formylglycine-Generating Enzymes: A Sulfation Fascination. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12* (5), 573–581. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.018.
(31) Appel, M. J.; Meier, K. K.; Lafrance-Vanasse, J.; Lim, H.; Tsai, C.-L.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Tainer, J. A.; Solomon, E. I.; Bertozzi, C. R. Formylglycine-Generating Enzyme Binds Substrate Directly at a Mononuclear Cu(I) Center to Initiate O2 Activation. *PNAS* **2019**, *116* (12), 5370–5375. https://doi.org/10.1073/pnas.1818274116.
(32) Boltes, I.; Czapinska, H.; Kahnert, A.; von Bülow, R.; Dierks, T.; Schmidt, B.; von Figura, K.; Kertesz, M. A.; Usón, I. 1.3 A Structure of Arylsulfatase from Pseudomonas Aeruginosa Establishes the Catalytic Mechanism of Sulfate Ester Cleavage in the Sulfatase Family. *Structure* **2001**, *9* (6), 483–491. https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00609-8.

(33) Waldow, A.; Schmidt, B.; Dierks, T.; Bülow, R. von; Figura, K. von. Amino Acid Residues Forming the Active Site of Arylsulfatase A ROLE IN CATALYTIC ACTIVITY AND SUBSTRATE BINDING. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (18), 12284–12288. https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12284.

(34) Uhlhorn-Dierks, G.; Kolter, T.; Sandhoff, K. How Does Nature Cleave Sulfuric Acid Esters? A Novel Posttranslational Modification of Sulfatases. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (18), 2453–2455. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19981002)37:18<2453::AID-ANIE2453>3.0.CO;2-N.

(35) Williams, S. J.; Denehy, E.; Krenske, E. H. Experimental and Theoretical Insights into the Mechanisms of Sulfate and Sulfamate Ester Hydrolysis and the End Products of Type I Sulfatase Inactivation by Aryl Sulfamates. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (5), 1995–2005. https://doi.org/10.1021/jo4026513.

(36) Lukatela, G.; Krauss, N.; Theis, K.; Selmer, T.; Gieselmann, V.; von Figura, K.; Saenger, W. Crystal Structure of Human Arylsulfatase A: The Aldehyde Function and the Metal Ion at the Active Site Suggest a Novel Mechanism for Sulfate Ester Hydrolysis,. *Biochemistry* **1998**, *37* (11), 3654–3664. https://doi.org/10.1021/bi9714924.

(37) Cleland, W. W.; Hengge, A. C. Enzymatic Mechanisms of Phosphate and Sulfate Transfer. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (8), 3252–3278. https://doi.org/10.1021/cr050287o.

(38) Chai, C. L. L.; Hepburn, T. W.; Lowe, G. Synthesis of Phenyl [(R)16O,17O,18O]Sulphate and the Stereochemical Course of a Sulphuryl Transfer Reaction. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, No. 19, 1403–1405. https://doi.org/10.1039/C39910001403.

(39) Hoff, R. H.; Larsen, P.; Hengge, A. C. Isotope Effects and Medium Effects on Sulfuryl Transfer Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (38), 9338–9344. https://doi.org/10.1021/ja0163974.

(40) Dhoot, G. K.; Gustafsson, M. K.; Ai, X.; Sun, W.; Standiford, D. M.; Emerson, C. P. Regulation of Wnt Signaling and Embryo Patterning by an Extracellular Sulfatase. *Science* **2001**, *293* (5535), 1663–1666. https://doi.org/10.1126/science.293.5535.1663.

(41) Ohto, T.; Uchida, H.; Yamazaki, H.; Keino-Masu, K.; Matsui, A.; Masu, M. Identification of a Novel Nonlysosomal Sulphatase Expressed in the Floor Plate, Choroid Plexus and Cartilage. *Genes Cells* **2002**, *7* (2), 173–185. https://doi.org/10.1046/j.1356-9597.2001.00502.x.

(42) Braquart-Varnier, C.; Danesin, C.; Clouscard-Martinato, C.; Agius, E.; Escalas, N.; Benazeraf, B.; Ai, X.; Emerson, C.; Cochard, P.; Soula, C. A Subtractive Approach to Characterize Genes with Regionalized Expression in the Gliogenic Ventral Neuroepithelium: Identification of Chick Sulfatase 1 as a New Oligodendrocyte Lineage Gene. *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *25* (4), 612–628. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.11.013.

(43) Freeman, S. D.; Moore, W. M.; Guiral, E. C.; Holme, A. D.; Turnbull, J. E.; Pownall, M. E. Extracellular Regulation of Developmental Cell Signaling by XtSulf1. *Dev. Biol.* **2008**, *320* (2), 436–445. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.05.554.

(44) Winterbottom, E. F.; Pownall, M. E. Complementary Expression of HSPG 6-O-Endosulfatases and 6-O-Sulfotransferase in the Hindbrain of Xenopus Laevis. *Gene Expr. Patterns* **2009**, *9* (3), 166–172. https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.11.003.

(45) Gorsi, B.; Whelan, S.; Stringer, S. E. Dynamic Expression Patterns of 6-O Endosulfatases during Zebrafish Development Suggest a Subfunctionalisation Event for Sulf2. *Dev. Dyn.* **2010**, *239* (12), 3312–3323. https://doi.org/10.1002/dvdy.22456.

(46) Fujita, K.; Takechi, E.; Sakamoto, N.; Sumiyoshi, N.; Izumi, S.; Miyamoto, T.; Matsuura, S.; Tsurugaya, T.; Akasaka, K.; Yamamoto, T. HpSulf, a Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatase, Is Involved in the Regulation of VEGF Signaling during Sea Urchin Development. *Mech. Dev.* **2010**, *127* (3–4), 235–245. https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.12.001.

(47) Wojcinski, A.; Nakato, H.; Soula, C.; Glise, B. DSulfatase-1 Fine-Tunes Hedgehog Patterning Activity through a Novel Regulatory Feedback Loop. *Dev. Biol.* **2011**, *358* (1), 168–180. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.07.027.

(48) Uchimura, K.; Morimoto-Tomita, M.; Rosen, S. D. Measuring the Activities of the Sulfs: Two Novel Heparin/Heparan Sulfate Endosulfatases. In *Methods in Enzymology*; Glycomics; Academic Press, 2006; Vol. 416, pp 243–253. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)16015-2.

(49) Tang, R.; Rosen, S. D. Functional Consequences of the Subdomain Organization of the Sulfs. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (32), 21505–21514. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.028472.
(50) Ai, X.; Do, A.-T.; Kusche-Gullberg, M.; Lindahl, U.; Lu, K.; Emerson, C. P. Substrate Specificity and Domain Functions of Extracellular Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases, QSulf1 and QSulf2. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (8), 4969–4976. https://doi.org/10.1074/jbc.M511902200.
(51) Seffouh, I.; Przybylski, C.; Seffouh, A.; El Masri, R.; Vivès, R. R.; Gonnet, F.; Daniel, R. Mass Spectrometry Analysis of the Human Endosulfatase Hsulf-2. *Biochemistry and Biophysics Reports* **2019**, *18*, 100617. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.01.010.
(52) Frese, M.-A.; Milz, F.; Dick, M.; Lamanna, W. C.; Dierks, T. Characterization of the Human Sulfatase Sulf1 and Its High Affinity Heparin/Heparan Sulfate Interaction Domain. *J Biol Chem* **2009**, *284* (41), 28033–28044. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035808.
(53) Sarrazin, S.; Lamanna, W. C.; Esko, J. D. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3* (7). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952.
(54) Lindahl, U.; Couchman, J.; Kimata, K.; Esko, J. D. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), 2015.
(55) Whitelock, J. M.; Iozzo, R. V. Heparan Sulfate: A Complex Polymer Charged with Biological Activity. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (7), 2745–2764. https://doi.org/10.1021/cr010213m.
(56) Murphy, K. J.; Merry, C. L. R.; Lyon, M.; Thompson, J. E.; Roberts, I. S.; Gallagher, J. T. A New Model for the Domain Structure of Heparan Sulfate Based on the Novel Specificity of K5 Lyase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (26), 27239–27245. https://doi.org/10.1074/jbc.M401774200.
(57) Esko, J. D.; Lindahl, U. Molecular Diversity of Heparan Sulfate. *J Clin Invest* **2001**, *108* (2), 169–173.
(58) Lindahl, U.; Kusche-Gullberg, M.; Kjellen, L. Regulated Diversity of Heparan Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (39), 24979–24982. https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.24979.
(59) Li, J.-P.; Kusche-Gullberg, M. Chapter Six - Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Jeon, K. W., Ed.; International Review of Cell and Molecular Biology; Academic Press, 2016; Vol. 325, pp 215–273. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.02.009.
(60) Kusche-Gullberg, M.; Kjellén, L. Sulfotransferases in Glycosaminoglycan Biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, *13* (5), 605–611. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.08.002.
(61) Gallagher, J. T. Heparan Sulfate: Growth Control with a Restricted Sequence Menu. *Journal of Clinical Investigation* **2001**, *108* (3), 357–361. https://doi.org/10.1172/JCI13713.
(62) Maccarana, M.; Sakura, Y.; Tawada, A.; Yoshida, K.; Lindahl, U. Domain Structure of Heparan Sulfates from Bovine Organs. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (30), 17804–17810. https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17804.
(63) Esko, J. D.; Selleck, S. B. Order Out of Chaos: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate. *Annual Review of Biochemistry* **2002**, *71* (1), 435–471. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458.
(64) Rosen, S. D.; Lemjabbar-Alaoui, H. SULF-2: AN EXTRACELLULAR MODULATOR OF CELL SIGNALING AND A CANCER TARGET CANDIDATE. *Expert Opin Ther Targets* **2010**, *14* (9), 935–949. https://doi.org/10.1517/14728222.2010.504718.
(65) Vives, R. R.; Seffouh, A.; Lortat-Jacob, H. Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *3*. https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00331.
(66) Xu, D.; Esko, J. D. Demystifying Heparan Sulfate–Protein Interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83* (1), 129–157. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035314.

(67) Ori, A.; Wilkinson, M. C.; Fernig, D. G. The Heparanome and Regulation of Cell Function: Structures, Functions and Challenges. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 4309–4338. https://doi.org/10.2741/3007.
(68) Faller, B.; Mely, Y.; Gerard, D.; Bieth, J. G. Heparin-Induced Conformational Change and Activation of Mucus Proteinase Inhibitor. *Biochemistry* **1992**, *31* (35), 8285–8290. https://doi.org/10.1021/bi00150a023.
(69) Olson, S. T.; Halvorson, H. R.; Björk, I. Quantitative Characterization of the Thrombin-Heparin Interaction. Discrimination between Specific and Nonspecific Binding Models. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (10), 6342–6352.
(70) Friedrich, U.; Blom, A. M.; Dahlbäck, B.; Villoutreix, B. O. Structural and Energetic Characteristics of the Heparin-Binding Site in Antithrombotic Protein C. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (26), 24122–24128. https://doi.org/10.1074/jbc.M011567200.
(71) Thompson, L. D.; Pantoliano, M. W.; Springer, B. A. Energetic Characterization of the Basic Fibroblast Growth Factor-Heparin Interaction: Identification of the Heparin Binding Domain. *Biochemistry* **1994**, *33* (13), 3831–3840. https://doi.org/10.1021/bi00179a006.
(72) Duchesne, L.; Octeau, V.; Bearon, R. N.; Beckett, A.; Prior, I. A.; Lounis, B.; Fernig, D. G. Transport of Fibroblast Growth Factor 2 in the Pericellular Matrix Is Controlled by the Spatial Distribution of Its Binding Sites in Heparan Sulfate. *PLOS Biology* **2012**, *10* (7), e1001361. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001361.
(73) Bishop, J. R.; Schuksz, M.; Esko, J. D. Heparan Sulphate Proteoglycans Fine-Tune Mammalian Physiology. *Nature* **2007**, *446* (7139), 1030–1037. https://doi.org/10.1038/nature05817.
(74) Nizet, V.; Varki, A.; Aebi, M. *Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.037.
(75) Esko, J. D.; Prestegard, J. H.; Linhardt, R. J. *Proteins That Bind Sulfated Glycosaminoglycans*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.038.
(76) Cagno, V.; Tseligka, E. D.; Jones, S. T.; Tapparel, C. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses* **2019**, *11* (7). https://doi.org/10.3390/v11070596.
(77) One Hundred Years of Positional Information. *Trends in Genetics* **1996**, *12* (9), 359–364. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(96)80019-9.
(78) Yan, D.; Lin, X. Shaping Morphogen Gradients by Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2009**, *1* (3). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002493.
(79) Yun, Y.-R.; Won, J. E.; Jeon, E.; Lee, S.; Kang, W.; Jo, H.; Jang, J.-H.; Shin, U. S.; Kim, H.-W. Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *J Tissue Eng* **2010**, *2010*. https://doi.org/10.4061/2010/218142.
(80) Ori, A.; Free, P.; Courty, J.; Wilkinson, M. C.; Fernig, D. G. Identification of Heparin-Binding Sites in Proteins by Selective Labeling. *Mol. Cell Proteomics* **2009**, *8* (10), 2256–2265. https://doi.org/10.1074/mcp.M900031-MCP200.
(81) Rahmoune, H.; Chen, H. L.; Gallagher, J. T.; Rudland, P. S.; Fernig, D. G. Interaction of Heparan Sulfate from Mammary Cells with Acidic Fibroblast Growth Factor (FGF) and Basic FGF. Regulation of the Activity of Basic FGF by High and Low Affinity Binding Sites in Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (13), 7303–7310. https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7303.
(82) Pempe, E. H.; Burch, T. C.; Law, C. J.; Liu, J. Substrate Specificity of 6-O-Endosulfatase (Sulf-2) and Its Implications in Synthesizing Anticoagulant Heparan Sulfate. *Glycobiology* **2012**, *22* (10), 1353–1362. https://doi.org/10.1093/glycob/cws092.
(83) Lamanna, W. C.; Frese, M.-A.; Balleininger, M.; Dierks, T. Sulf Loss Influences N-, 2-O-, and 6-O-Sulfation of Multiple Heparan Sulfate Proteoglycans and Modulates Fibroblast Growth Factor Signaling. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (41), 27724–27735. https://doi.org/10.1074/jbc.M802130200.
(84) Staples, G. O.; Shi, X.; Zaia, J. Glycomics Analysis of Mammalian Heparan Sulfates Modified by the Human Extracellular Sulfatase HSulf2. *PLOS ONE* **2011**, *6* (2), e16689. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016689.

(85) Seffouh, A.; Milz, F.; Przybylski, C.; Laguri, C.; Oosterhof, A.; Bourcier, S.; Sadir, R.; Dutkowski, E.; Daniel, R.; van Kuppevelt, T. H.; Dierks, T.; Lortat-Jacob, H.; Vivès, R. R. HSulf Sulfatases Catalyze Processive and Oriented 6- *O* -Desulfation of Heparan Sulfate That Differentially Regulates Fibroblast Growth Factor Activity. *The FASEB Journal* **2013**, *27* (6), 2431–2439. https://doi.org/10.1096/fj.12-226373.

(86) Milz, F.; Harder, A.; Neuhaus, P.; Breitkreuz-Korff, O.; Walhorn, V.; Lübke, T.; Anselmetti, D.; Dierks, T. Cooperation of Binding Sites at the Hydrophilic Domain of Cell-Surface Sulfatase Sulf1 Allows for Dynamic Interaction of the Enzyme with Its Substrate Heparan Sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830* (11), 5287–5298. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.014.

(87) Seffouh, A.; El Masri, R.; Makshakova, O.; Gout, E.; Hassoun, Z. el O.; Andrieu, J.; Lortat-Jacob, H.; Vivès, R. R. Expression and Purification of Recombinant Extracellular Sulfatase HSulf-2 Allows Deciphering of Enzyme Sub-Domain Coordinated Role for the Binding and 6-O-Desulfation of Heparan Sulfate. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76* (9), 1807–1819. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03027-2.

(88) Holst, C. R.; Bou-Reslan, H.; Gore, B. B.; Wong, K.; Grant, D.; Chalasani, S.; Carano, R. A.; Frantz, G. D.; Tessier-Lavigne, M.; Bolon, B.; French, D. M.; Ashkenazi, A. Secreted Sulfatases Sulf1 and Sulf2 Have Overlapping yet Essential Roles in Mouse Neonatal Survival. *PLOS ONE* **2007**, *2* (6), e575. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000575.

(89) Lum, D. H.; Tan, J.; Rosen, S. D.; Werb, Z. Gene Trap Disruption of the Mouse Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatase Gene, Sulf2. *Mol Cell Biol* **2007**, *27* (2), 678–688. https://doi.org/10.1128/MCB.01279-06.

(90) Lamanna, W. C.; Baldwin, R. J.; Padva, M.; Kalus, I.; ten Dam, G.; van Kuppevelt, T. H.; Gallagher, J. T.; von Figura, K.; Dierks, T.; Merry, C. L. R. Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases: Discrete in Vivo Activities and Functional Co-Operativity. *Biochem J* **2006**, *400* (1), 63–73. https://doi.org/10.1042/BJ20060848.

(91) Ai, X.; Do, A.-T.; Lozynska, O.; Kusche-Gullberg, M.; Lindahl, U.; Emerson, C. P. QSulf1 Remodels the 6-O Sulfation States of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans to Promote Wnt Signaling. *J. Cell Biol.* **2003**, *162* (2), 341–351. https://doi.org/10.1083/jcb.200212083.

(92) Brickman, Y. G.; Ford, M. D.; Gallagher, J. T.; Nurcombe, V.; Bartlett, P. F.; Turnbull, J. E. Structural Modification of Fibroblast Growth Factor-Binding Heparan Sulfate at a Determinative Stage of Neural Development. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (8), 4350–4359. https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4350.

(93) Allen, B. L.; Rapraeger, A. C. Spatial and Temporal Expression of Heparan Sulfate in Mouse Development Regulates FGF and FGF Receptor Assembly. *J Cell Biol* **2003**, *163* (3), 637–648. https://doi.org/10.1083/jcb.200307053.

(94) Safaiyan, F.; Lindahl, U.; Salmivirta, M. Selective Reduction of 6-O-Sulfation in Heparan Sulfate from Transformed Mammary Epithelial Cells. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *252* (3), 576–582. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520576.x.

(95) Jayson, G. C.; Lyon, M.; Paraskeva, C.; Turnbull, J. E.; Deakin, J. A.; Gallagher, J. T. Heparan Sulfate Undergoes Specific Structural Changes during the Progression from Human Colon Adenoma to Carcinoma in Vitro. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (1), 51–57. https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.51.

(96) Bruinsma, I. B.; te Riet, L.; Gevers, T.; ten Dam, G. B.; van Kuppevelt, T. H.; David, G.; Küsters, B.; de Waal, R. M. W.; Verbeek, M. M. Sulfation of Heparan Sulfate Associated with Amyloid-Beta Plaques in Patients with Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol.* **2010**, *119* (2), 211–220. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0577-1.

(97) Hosono-Fukao, T.; Ohtake-Niimi, S.; Hoshino, H.; Britschgi, M.; Akatsu, H.; Hossain, M. M.; Nishitsuji, K.; van Kuppevelt, T. H.; Kimata, K.; Michikawa, M.; Wyss-Coray, T.; Uchimura, K. Heparan Sulfate Subdomains That Are Degraded by Sulf Accumulate in Cerebral Amyloid ß Plaques of Alzheimer's Disease: Evidence from Mouse Models and Patients. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180* (5), 2056–2067. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.015.

(98) Alhasan, A. A.; Spielhofer, J.; Kusche-Gullberg, M.; Kirby, J. A.; Ali, S. Role of 6-O-Sulfated Heparan Sulfate in Chronic Renal Fibrosis. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (29), 20295–20306. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.554691.

(99) Wang, L.; Brown, J. R.; Varki, A.; Esko, J. D. Heparin's Anti-Inflammatory Effects Require Glucosamine 6-*O*-Sulfation and Are Mediated by Blockade of L- and P-Selectins. *J Clin Invest* **2002**, *110* (1), 127–136. https://doi.org/10.1172/JCI14996.

(100) Reine, T. M.; Kusche-Gullberg, M.; Feta, A.; Jenssen, T.; Kolset, S. O. Heparan Sulfate Expression Is Affected by Inflammatory Stimuli in Primary Human Endothelial Cells. *Glycoconj. J.* **2012**, *29* (1), 67–76. https://doi.org/10.1007/s10719-011-9365-y.

(101) Wijnhoven, T. J. M.; Lensen, J. F. M.; Rops, A. L. W. M. M.; van der Vlag, J.; Kolset, S. O.; Bangstad, H.-J.; Pfeffer, P.; van den Hoven, M. J. W.; Berden, J. H. M.; van den Heuvel, L. P. W. J.; van Kuppevelt, T. H. Aberrant Heparan Sulfate Profile in the Human Diabetic Kidney Offers New Clues for Therapeutic Glycomimetics. *American Journal of Kidney Diseases* **2006**, *48* (2), 250–261. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.05.003.

(102) Hassing, H. C.; Mooij, H.; Guo, S.; Monia, B. P.; Chen, K.; Kulik, W.; Dallinga-Thie, G. M.; Nieuwdorp, M.; Stroes, E. S. G.; Williams, K. J. Inhibition of Hepatic Sulfatase-2 in Vivo: A Novel Strategy to Correct Diabetic Dyslipidemia. *Hepatology* **2012**, *55* (6), 1746–1753. https://doi.org/10.1002/hep.25580.

(103) Lai, J.; Chien, J.; Staub, J.; Avula, R.; Greene, E. L.; Matthews, T. A.; Smith, D. I.; Kaufmann, S. H.; Roberts, L. R.; Shridhar, V. Loss of HSulf-1 Up-Regulates Heparin-Binding Growth Factor Signaling in Cancer. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (25), 23107–23117. https://doi.org/10.1074/jbc.M302203200.

(104) Lemjabbar-Alaoui, H.; van Zante, A.; Singer, M. S.; Xue, Q.; Wang, Y.-Q.; Tsay, D.; He, B.; Jablons, D. M.; Rosen, S. D. Sulf-2, a Heparan Sulfate Endosulfatase, Promotes Human Lung Carcinogenesis. *Oncogene* **2010**, *29* (5), 635–646. https://doi.org/10.1038/onc.2009.365.

(105) Tátrai, P.; Egedi, K.; Somorácz, A.; van Kuppevelt, T. H.; Ten Dam, G.; Lyon, M.; Deakin, J. A.; Kiss, A.; Schaff, Z.; Kovalszky, I. Quantitative and Qualitative Alterations of Heparan Sulfate in Fibrogenic Liver Diseases and Hepatocellular Cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **2010**, *58* (5), 429–441. https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955161.

(106) Singer, M. S.; Phillips, J. J.; Lemjabbar-Alaoui, H.; Wang, Y. Q.; Wu, J.; Goldman, R.; Rosen, S. D. SULF2, a Heparan Sulfate Endosulfatase, Is Present in the Blood of Healthy Individuals and Increases in Cirrhosis. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *440*, 72–78. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.038.

(107) Lai, J.-P.; Sandhu, D. S.; Shire, A. M.; Roberts, L. R. The Tumor Suppressor Function of Human Sulfatase 1 (SULF1) in Carcinogenesis. *J Gastrointest Cancer* **2008**, *39* (1–4), 149–158. https://doi.org/10.1007/s12029-009-9058-y.

(108) Staub, J.; Chien, J.; Pan, Y.; Qian, X.; Narita, K.; Aletti, G.; Scheerer, M.; Roberts, L. R.; Molina, J.; Shridhar, V. Epigenetic Silencing of HSulf-1 in Ovarian Cancer:Implications in Chemoresistance. *Oncogene* **2007**, *26* (34), 4969–4978. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210300.

(109) Khurana, A.; Jung-Beom, D.; He, X.; Kim, S.-H.; Busby, R. C.; Lorenzon, L.; Villa, M.; Baldi, A.; Molina, J.; Goetz, M. P.; Shridhar, V. Matrix Detachment and Proteasomal Inhibitors Diminish Sulf-2 Expression in Breast Cancer Cell Lines and Mouse Xenografts. *Clin Exp Metastasis* **2013**, *30* (4), 407–415. https://doi.org/10.1007/s10585-012-9546-5.

(110) Lai, J.-P.; Sandhu, D. S.; Yu, C.; Han, T.; Moser, C. D.; Jackson, K. K.; Guerrero, R. B.; Aderca, I.; Isomoto, H.; Garrity-Park, M. M.; Zou, H.; Shire, A. M.; Nagorney, D. M.; Sanderson, S. O.; Adjei, A. A.; Lee, J.-S.; Thorgeirsson, S. S.; Roberts, L. R. Sulfatase 2 Up-Regulates Glypican 3, Promotes Fibroblast Growth Factor Signaling, and Decreases Survival in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **2008**, *47* (4), 1211–1222. https://doi.org/10.1002/hep.22202.

(111) Floyd, R. A.; Chandru, H. K.; He, T.; Towner, R. Anti-Cancer Activity of Nitrones and Observations on Mechanism of Action. *Anticancer Agents Med Chem* **2011**, *11* (4), 373–379.

(112) Zheng, X.; Gai, X.; Han, S.; Moser, C. D.; Hu, C.; Shire, A. M.; Floyd, R. A.; Roberts, L. R. The Human Sulfatase 2 Inhibitor 2,4-Disulfonylphenyl-Tert-Butylnitrone (OKN-007) Has an Antitumor Effect in Hepatocellular Carcinoma Mediated via Suppression of TGFB1/SMAD2 and Hedgehog/GLI1 Signaling. *Genes Chromosomes Cancer* **2013**, *52* (3), 225–236. https://doi.org/10.1002/gcc.22022.

(113) Khachigian, L. M.; Parish, C. R. Phosphomannopentaose Sulfate (PI-88): Heparan Sulfate Mimetic with Clinical Potential in Multiple Vascular Pathologies. *Cardiovascular Drug Reviews* **2004**, *22* (1), 1–6. https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2004.tb00127.x.
(114) Ferro, V.; Dredge, K.; Liu, L.; Hammond, E.; Bytheway, I.; Li, C.; Johnstone, K.; Karoli, T.; Davis, K.; Copeman, E.; Gautam, A. PI-88 and Novel Heparan Sulfate Mimetics Inhibit Angiogenesis. *Semin. Thromb. Hemost.* **2007**, *33* (5), 557–568. https://doi.org/10.1055/s-2007-982088.
(115) Raman, K.; Kuberan, B. Chemical Tumor Biology of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Curr Chem Biol* **2010**, *4* (1), 20–31. https://doi.org/10.2174/187231310790226206.
(116) Hossain, M. M.; Hosono-Fukao, T.; Tang, R.; Sugaya, N.; van Kuppevelt, T. H.; Jenniskens, G. J.; Kimata, K.; Rosen, S. D.; Uchimura, K. Direct Detection of HSulf-1 and HSulf-2 Activities on Extracellular Heparan Sulfate and Their Inhibition by PI-88. *Glycobiology* **2010**, *20* (2), 175–186. https://doi.org/10.1093/glycob/cwp159.
(117) Howarth, N. M.; Cooper, G.; Purohit, A.; Duncan, L.; Reed, M. J.; Potter, B. V. Phosphonates and Thiophosphonates as Sulfate Surrogates: Synthesis of Estrone 3-Methylthiophosphonate, a Potent Inhibitor of Estrone Sulfatase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1993**, *3* (2), 313–318. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80900-8.
(118) Duncan, L.; Purohit, A.; Howarth, N. M.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J. Inhibition of Estrone Sulfatase Activity by Estrone-3-Methylthiophosphonate: A Potential Therapeutic Agent in Breast Cancer. *Cancer Res* **1993**, *53* (2), 298–303.
(119) Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. Estrone Sulfamates: Potent Inhibitors of Estrone Sulfatase with Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (2), 219–221. https://doi.org/10.1021/jm00028a002.
(120) Bloch, A.; Coutsogeorgopoulos, C. Inhibition of Protein Synthesis by 5'-Sulfamoyladenosine. *Biochemistry* **1971**, *10* (24), 4394–4398. https://doi.org/10.1021/bi00800a007.
(121) Klein, E.; Burgess, G. H.; Bloch, A.; Milgrom, H.; Holtermann, O. A. The Effects of Nucleoside Analogs on Cutaneous Neoplasms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *255*, 216–224. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29227.x.
(122) Elger, W.; Schwarz, S.; Hedden, A.; Reddersen, G.; Schneider, B. Sulfamates of Various Estrogens Are Prodrugs with Increased Systemic and Reduced Hepatic Estrogenicity at Oral Application. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1995**, *55* (3), 395–403. https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00214-6.
(123) El-Gamal, M. I.; Semreen, M. H.; Foster, P. A.; Potter, B. V. L. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Arylamide Derivatives Possessing Sulfonate or Sulfamate Moieties as Steroid Sulfatase Enzyme Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24* (12), 2762–2767. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.040.
(124) Moi, D.; Foster, P. A.; Rimmer, L. G.; Jaffri, A.; Deplano, A.; Balboni, G.; Onnis, V.; Potter, B. V. L. Synthesis and in Vitro Evaluation of Piperazinyl-Ureido Sulfamates as Steroid Sulfatase Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *182*, 111614. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111614.
(125) Woo, L. W. L.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. Active Site Directed Inhibition of Estrone Sulfatase by Nonsteroidal Coumarin Sulfamates. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (7), 1349–1351. https://doi.org/10.1021/jm950931z.
(126) Purohit, A.; Fusi, L.; Brosens, J.; Woo, L. W. L.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J. Inhibition of Steroid Sulphatase Activity in Endometriotic Implants by 667 COUMATE: A Potential New Therapy. *Hum Reprod* **2008**, *23* (2), 290–297. https://doi.org/10.1093/humrep/dem308.
(127) Potter, B. V. L. SULFATION PATHWAYS: Steroid Sulphatase Inhibition via Aryl Sulphamates: Clinical Progress, Mechanism and Future Prospects. *Journal of Molecular Endocrinology* **2018**, *61* (2), T233–T252. https://doi.org/10.1530/JME-18-0045.
(128) Coombes, R. C.; Cardoso, F.; Isambert, N.; Lesimple, T.; Soulié, P.; Peraire, C.; Fohanno, V.; Kornowski, A.; Ali, T.; Schmid, P. A Phase I Dose Escalation Study to Determine the Optimal Biological Dose of Irosustat, an Oral Steroid Sulfatase Inhibitor, in Postmenopausal Women with Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *140* (1), 73–82. https://doi.org/10.1007/s10549-013-2597-8.

(129) Palmieri, C.; Stein, R. C.; Liu, X.; Hudson, E.; Nicholas, H.; Sasano, H.; Guestini, F.; Holcombe, C.; Barrett, S.; Kenny, L.; Reed, S.; Lim, A.; Hayward, L.; Howell, S.; Coombes, R. C.; IRIStrial participants. IRIS Study: A Phase II Study of the Steroid Sulfatase Inhibitor Irosustat When Added to an Aromatase Inhibitor in ER-Positive Breast Cancer Patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *165* (2), 343–353. https://doi.org/10.1007/s10549-017-4328-z.

(130) Hanson, S. R.; Whalen, L. J.; Wong, C.-H. Synthesis and Evaluation of General Mechanism-Based Inhibitors of Sulfatases Based on (Difluoro)Methyl Phenyl Sulfate and Cyclic Phenyl Sulfamate Motifs. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (24), 8386–8395. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.002.

(131) Schelwies, M.; Brinson, D.; Otsuki, S.; Hong, Y.-H.; Lotz, M. K.; Wong, C.-H.; Hanson, S. R. Glucosamine-6-Sulfamate Analogues of Heparan Sulfate as Inhibitors of Endosulfatases. *ChemBioChem* **2010**, *11* (17), 2393–2397. https://doi.org/10.1002/cbic.201000401.

(132) Chiu, L.-T.; Sabbavarapu, N. M.; Lin, W.-C.; Fan, C.-Y.; Wu, C.-C.; Cheng, T.-J. R.; Wong, C.-H.; Hung, S.-C. A Trisaccharide Sulfate and Its Sulfonamide as Effective Substrate and Inhibitor of Human Endo-O-Sulfatase-1. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**. https://doi.org/10.1021/jacs.0c00005.

(133) Reuillon, T.; Alhasan, S. F.; Beale, G. S.; Bertoli, A.; Brennan, A.; Cano, C.; Reeves, H. L.; Newell, D. R.; Golding, B. T.; Miller, D. C.; Griffin, R. J. Design and Synthesis of Biphenyl and Biphenyl Ether Inhibitors of Sulfatases. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (4), 2821–2826. https://doi.org/10.1039/C5SC03612G.

(134) Bojarová, P.; Denehy, E.; Walker, I.; Loft, K.; Souza, D. P. D.; Woo, L. W. L.; Potter, B. V. L.; McConville, M. J.; Williams, S. J. Direct Evidence for ArO□S Bond Cleavage upon Inactivation of Pseudomonas Aeruginosa Arylsulfatase by Aryl Sulfamates. *ChemBioChem* **2008**, *9* (4), 613–623. https://doi.org/10.1002/cbic.200700579.

(135) Chari, R. V. J.; Miller, M. L.; Widdison, W. C. Antibody-Drug Conjugates: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53* (15), 3796–3827. https://doi.org/10.1002/anie.201307628.

(136) Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* **2008**, *320* (5876), 664–667. https://doi.org/10.1126/science.1155106.

(137) Fee, C. J. Size Comparison between Proteins PEGylated with Branched and Linear Poly(Ethylene Glycol) Molecules. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *98* (4), 725–731. https://doi.org/10.1002/bit.21482.

(138) Agarwal, P.; Beahm, B. J.; Shieh, P.; Bertozzi, C. R. Systemic Fluorescence Imaging of Zebrafish Glycans with Bioorthogonal Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54* (39), 11504–11510. https://doi.org/10.1002/anie.201504249.

(139) Sklarz, B. Organic Chemistry of Periodates. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1967**, *21* (1), 3–28. https://doi.org/10.1039/QR9672100003.

(140) Spears, R. J.; Fascione, M. A. Site-Selective Incorporation and Ligation of Protein Aldehydes. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (32), 7622–7638. https://doi.org/10.1039/C6OB00778C.

(141) Barlow, C. B.; Guthrie, R. D.; Prior, A. M. Periodate Oxidation of Amino-Sugars. *Chem. Commun. (London)* **1966**, No. 9, 268–269. https://doi.org/10.1039/C19660000268.

(142) Witus, L. S.; Moore, T.; Thuronyi, B. W.; Esser-Kahn, A. P.; Scheck, R. A.; Iavarone, A. T.; Francis, M. B. Identification of Highly Reactive Sequences For PLP-Mediated Bioconjugation Using a Combinatorial Peptide Library. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (47), 16812–16817. https://doi.org/10.1021/ja105429n.

(143) Witus, L.; Francis, M. Site-Specific Protein Bioconjugation via a Pyridoxal 5′-Phosphate-Mediated N-Terminal Transamination Reaction. *Curr Protoc Chem Biol* **2010**, *2* (2), 125–134. https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch100018.

(144) Gilmore, J. M.; Scheck, R. A.; Esser-Kahn, A. P.; Joshi, N. S.; Francis, M. B. N-Terminal Protein Modification through a Biomimetic Transamination Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (32), 5307–5311. https://doi.org/10.1002/anie.200600368.

(145) Gauchet, C.; Labadie, G. R.; Poulter, C. D. Regio- and Chemoselective Covalent Immobilization of Proteins through Unnatural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (29), 9274–9275. https://doi.org/10.1021/ja061131o.
(146) Nguyen, U. T. T.; Cramer, J.; Gomis, J.; Reents, R.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Goody, R. S.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. Exploiting the Substrate Tolerance of Farnesyltransferase for Site-Selective Protein Derivatization. *Chembiochem* **2007**, *8* (4), 408–423. https://doi.org/10.1002/cbic.200600440.
(147) Rashidian, M.; Dozier, J. K.; Lenevich, S.; Distefano, M. D. Selective Labeling of Polypeptides Using Protein Farnesyltransferase via Rapid Oxime Ligation. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (47), 8998–9000. https://doi.org/10.1039/C0CC03305G.
(148) Rashidian, M.; Song, J. M.; Pricer, R. E.; Distefano, M. D. Chemoenzymatic Reversible Immobilization and Labeling of Proteins without Prior Purification. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (20), 8455–8467. https://doi.org/10.1021/ja211308s.
(149) Schumacher, D.; Helma, J.; Mann, F. A.; Pichler, G.; Natale, F.; Krause, E.; Cardoso, M. C.; Hackenberger, C. P. R.; Leonhardt, H. Versatile and Efficient Site-Specific Protein Functionalization by Tubulin Tyrosine Ligase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54* (46), 13787–13791. https://doi.org/10.1002/anie.201505456.
(150) Rush, J. S.; Bertozzi, C. R. New Aldehyde Tag Sequences Identified by Screening Formylglycine Generating Enzymes in Vitro and in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (37), 12240–12241. https://doi.org/10.1021/ja804530w.
(151) Carrico, I. S.; Carlson, B. L.; Bertozzi, C. R. Introducing Genetically Encoded Aldehydes into Proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (6), 321–322. https://doi.org/10.1038/nchembio878.
(152) Appel, M. J.; Bertozzi, C. R. Formylglycine, a Post-Translationally Generated Residue with Unique Catalytic Capabilities and Biotechnology Applications. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (1), 72–84. https://doi.org/10.1021/cb500897w.
(153) Grove, T. L.; Lee, K.-H.; St. Clair, J.; Krebs, C.; Booker, S. J. In Vitro Characterization of AtsB, a Radical SAM Formylglycine-Generating Enzyme That Contains Three [4Fe-4S] Clusters. *Biochemistry* **2008**, *47* (28), 7523–7538. https://doi.org/10.1021/bi8004297.
(154) Benjdia, A.; Subramanian, S.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Johnson, M. K.; Berteau, O. Anaerobic Sulfatase-Maturating Enzymes, First Dual Substrate Radical S-Adenosylmethionine Enzymes. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (26), 17815–17826. https://doi.org/10.1074/jbc.M710074200.
(155) Krüger, T.; Weiland, S.; Boschanski, M.; Sinha, P. K.; Falck, G.; Müller, K. M.; Dierks, T.; Sewald, N. Conversion of Serine-Type Aldehyde Tags by the Radical SAM Protein AtsB from Methanosarcina Mazei. *ChemBioChem* **2019**, *20* (16), 2074–2078. https://doi.org/10.1002/cbic.201900322.
(156) Krüger, T.; Weiland, S.; Falck, G.; Gerlach, M.; Boschanski, M.; Alam, S.; Müller, K. M.; Dierks, T.; Sewald, N. Two-Fold Bioorthogonal Derivatization by Different Formylglycine-Generating Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (24), 7245–7249. https://doi.org/10.1002/anie.201803183.
(157) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090.
(158) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (39), 7523–7526. https://doi.org/10.1002/anie.200802651.
(159) Agarwal, P.; Kudirka, R.; Albers, A. E.; Barfield, R. M.; de Hart, G. W.; Drake, P. M.; Jones, L. C.; Rabuka, D. Hydrazino-Pictet-Spengler Ligation as a Biocompatible Method for the Generation of Stable Protein Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (6), 846–851. https://doi.org/10.1021/bc400042a.
(160) Agarwal, P.; Weijden, J. van der; Sletten, E. M.; Rabuka, D.; Bertozzi, C. R. A Pictet-Spengler Ligation for Protein Chemical Modification. *PNAS* **2013**, *110* (1), 46–51. https://doi.org/10.1073/pnas.1213186110.
(161) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide−Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. https://doi.org/10.1021/ja044996f.

(162) Ning, X.; Temming, R. P.; Dommerholt, J.; Guo, J.; Ania, D. B.; Debets, M. F.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; van Delft, F. L. Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne–Nitrone Cycloaddition. *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49* (17), 3065–3068. https://doi.org/10.1002/anie.201000408.

(163) Colombo, M.; Sommaruga, S.; Mazzucchelli, S.; Polito, L.; Verderio, P.; Galeffi, P.; Corsi, F.; Tortora, P.; Prosperi, D. Site-Specific Conjugation of ScFvs Antibodies to Nanoparticles by Bioorthogonal Strain-Promoted Alkyne–Nitrone Cycloaddition. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (2), 496–499. https://doi.org/10.1002/anie.201106775.

(164) DeAngelis, P. L.; Liu, J.; Linhardt, R. J. Chemoenzymatic Synthesis of Glycosaminoglycans: Re-Creating, Re-Modeling and Re-Designing Nature's Longest or Most Complex Carbohydrate Chains. *Glycobiology* **2013**, *23* (7), 764–777. https://doi.org/10.1093/glycob/cwt016.

(165) Chappell, E. P.; Liu, J. Use of Biosynthetic Enzymes in Heparin and Heparan Sulfate Synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (16), 4786–4792. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.053.

(166) Liu, J.; Linhardt, R. J. Chemoenzymatic Synthesis of Heparan Sulfate and Heparin. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (12), 1676–1685. https://doi.org/10.1039/C4NP00076E.

(167) Endo, M.; Kakizaki, I. Synthesis of Neoproteoglycans Using the Transglycosylation Reaction as a Reverse Reaction of Endo-Glycosidases. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **2012**, *88* (7), 327–344. https://doi.org/10.2183/pjab.88.327.

(168) Zhang, X.; Lin, L.; Huang, H.; Linhardt, R. J. Chemoenzymatic Synthesis of Glycosaminoglycans. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53* (2), 335–346. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00420.

(169) Lu, W.; Zong, C.; Chopra, P.; Pepi, L. E.; Xu, Y.; Amster, I. J.; Liu, J.; Boons, G.-J. Controlled Chemoenzymatic Synthesis of Heparan Sulfate Oligosaccharides. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (19), 5340–5344. https://doi.org/10.1002/anie.201800387.

(170) Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Cliff, M. J.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. Making the Longest Sugars: A Chemical Synthesis of Heparin-Related [4]n Oligosaccharides from 16-Mer to 40-Mer. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (11), 6158–6164. https://doi.org/10.1039/C5SC02091C.

(171) Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. First Gram-Scale Synthesis of a Heparin-Related Dodecasaccharide. *Org. Lett.* **2013**, *15* (1), 88–91. https://doi.org/10.1021/ol303112y.

(172) Jeanneret, R. A.; Dalton, C. E.; Gardiner, J. M. Synthesis of Heparan Sulfate- and Dermatan Sulfate-Related Oligosaccharides via Iterative Chemoselective Glycosylation Exploiting Conformationally Disarmed [2.2.2] l-Iduronic Lactone Thioglycosides. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (23), 15063–15078. https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01594.

(173) Hansen, S. U.; Dalton, C. E.; Baráth, M.; Kwan, G.; Raftery, J.; Jayson, G. C.; Miller, G. J.; Gardiner, J. M. Synthesis of L-Iduronic Acid Derivatives via [3.2.1] and [2.2.2] l-Iduronic Lactones from Bulk Glucose-Derived Cyanohydrin Hydrolysis: A Reversible Conformationally Switched Superdisarmed/Rearmed Lactone Route to Heparin Disaccharides. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (8), 3777–3789. https://doi.org/10.1021/jo502776f.

(174) Pawar, N. J.; Wang, L.; Higo, T.; Bhattacharya, C.; Kancharla, P. K.; Zhang, F.; Baryal, K.; Huo, C.-X.; Liu, J.; Linhardt, R. J.; Huang, X.; Hsieh-Wilson, L. C. Expedient Synthesis of Core Disaccharide Building Blocks from Natural Polysaccharides for Heparan Sulfate Oligosaccharide Assembly. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (51), 18577–18583. https://doi.org/10.1002/anie.201908805.

(175) Zhang, Z.; Ollmann, I. R.; Ye, X.-S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C.-H. Programmable One-Pot Oligosaccharide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (4), 734–753. https://doi.org/10.1021/ja982232s.

(176) Cheng, C.-W.; Zhou, Y.; Pan, W.-H.; Dey, S.; Wu, C.-Y.; Hsu, W.-L.; Wong, C.-H. Hierarchical and Programmable One-Pot Synthesis of Oligosaccharides. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07618-8.

(177) Dey, S.; Wong, C.-H. Programmable One-Pot Synthesis of Heparin Pentasaccharides Enabling Access to Regiodefined Sulfate Derivatives. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (32), 6685–6691. https://doi.org/10.1039/C8SC01743C.
(178) Lee, J.-C.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. Programmable Reactivity-Based One-Pot Oligosaccharide Synthesis. *Nat Protoc* **2006**, *1* (6), 3143–3152. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.489.
(179) Hsu, C.-H.; Hung, S.-C.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Toward Automated Oligosaccharide Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (50), 11872–11923. https://doi.org/10.1002/anie.201100125.
(180) Polat, T.; Wong, C.-H. Anomeric Reactivity-Based One-Pot Synthesis of Heparin-Like Oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (42), 12795–12800. https://doi.org/10.1021/ja073098r.
(181) Hu, Y.-P.; Zhong, Y.-Q.; Chen, Z.-G.; Chen, C.-Y.; Shi, Z.; Zulueta, M. M. L.; Ku, C.-C.; Lee, P.-Y.; Wang, C.-C.; Hung, S.-C. Divergent Synthesis of 48 Heparan Sulfate-Based Disaccharides and Probing the Specific Sugar–Fibroblast Growth Factor-1 Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (51), 20722–20727. https://doi.org/10.1021/ja3090065.
(182) Bonnaffé, D. Bioactive Synthetic Heparan Sulfate and Heparin Derivatives: From Long Fragments Mimetics to Chimeras. *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14* (1), 59–73. https://doi.org/10.1016/j.crci.2010.06.002.
(183) Sarrazin, S.; Bonnaffé, D.; Lubineau, A.; Lortat-Jacob, H. Heparan Sulfate Mimicry: A Synthetic Glycoconjugate That Recognizes the Heparin Binding Domain of Interferon-Gamma Inhibits the Cytokine Activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (45), 37558–37564. https://doi.org/10.1074/jbc.M507729200.
(184) Baleux, F.; Loureiro-Morais, L.; Hersant, Y.; Clayette, P.; Arenzana-Seisdedos, F.; Bonnaffé, D.; Lortat-Jacob, H. A Synthetic CD4–Heparan Sulfate Glycoconjugate Inhibits CCR5 and CXCR4 HIV-1 Attachment and Entry. *Nat Chem Biol* **2009**, *5* (10), 743–748. https://doi.org/10.1038/nchembio.207.
(185) Hamza, D.; Lucas, R.; Feizi, T.; Chai, W.; Bonnaffé, D.; Lubineau, A. First Synthesis of Heparan Sulfate Tetrasaccharides Containing Both N-Acetylated and N-Unsubstituted Glucosamine—Search for Putative 10E4 Epitopes. *ChemBioChem* **2006**, *7* (12), 1856–1858. https://doi.org/10.1002/cbic.200600356.
(186) Gavard, O.; Hersant, Y.; Alais, J.; Duverger, V.; Dilhas, A.; Bascou, A.; Bonnaffé, D. Efficient Preparation of Three Building Blocks for the Synthesis of Heparan Sulfate Fragments: Towards the Combinatorial Synthesis of Oligosaccharides from Hypervariable Regions. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003* (18), 3603–3620. https://doi.org/10.1002/ejoc.200300254.
(187) Vasella, A.; Witzig, C.; Husi, R. Glycosylidene Carbenes. Part 4. Synthesis of Spirocyclopropanes from Acetamidoglycosylidene-Derived Diazirines. *Helvetica Chimica Acta* **1991**, *74* (6), 1362–1372. https://doi.org/10.1002/hlca.19910740625.
(188) Lubineau, A.; Gavard, O.; Alais, J.; Bonnaffé, D. New Accesses to L-Iduronyl Synthons. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (3), 307–311. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02080-8.
(189) Dilhas, A.; Bonnaffé, D. PhBCl2 Promoted Reductive Opening of 2′,4′-O-p-Methoxybenzylidene: New Regioselective Differentiation of Position 2′ and 4′ of α-l-Iduronyl Moieties in Disaccharide Building Blocks. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45* (18), 3643–3645. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.03.046.
(190) Povie, G.; Tran, A.-T.; Bonnaffé, D.; Habegger, J.; Hu, Z.; Le Narvor, C.; Renaud, P. Repairing the Thiol-Ene Coupling Reaction. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (15), 3894–3898. https://doi.org/10.1002/anie.201309984.
(191) Mukaiyama, T.; Narasaka, K.; Furusato, M. Convenient Synthesis of 1,4-Diketones. Application to the Synthesis of Dihydrojasmone. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (24), 8641–8642. https://doi.org/10.1021/ja00779a091.
(192) Yu, B.; Tao, H. Glycosyl Trifluoroacetimidates. Part 1: Preparation and Application as New Glycosyl Donors. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42* (12), 2405–2407. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00157-5.

(193) Larsen, K.; Olsen, C. E.; Motawia, M. S. Acid-Catalysed Rearrangement of Glycosyl Trichloroacetimidates: A Novel Route to Glycosylamines. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (2), 383–387. https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.019.
(194) Lubineau, A.; Lortat-Jacob, H.; Gavard, O.; Sarrazin, S.; Bonnaffé, D. Synthesis of Tailor-Made Glycoconjugate Mimetics of Heparan Sulfate That Bind IFN-γ in the Nanomolar Range. *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10* (17), 4265–4282. https://doi.org/10.1002/chem.200306063.
(195) Duus, J. Ø.; Gotfredsen, C. H.; Bock, K. Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (12), 4589–4614. https://doi.org/10.1021/cr990302n.
(196) Sakagami, M.; Hamana, H. A Selective Ring Opening Reaction of 4,6-O-Benzylidene Acetals in Carbohydrates Using Trialkylsilane Derivatives. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (29), 5547–5551. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00877-7.
(197) J. Garegg, P.; Hultberg, H.; Wallin, S. A Novel, Reductive Ring-Opening of Carbohydrate Benzylidene Acetals. *Carbohydrate Research* **1982**, *108* (1), 97–101. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81894-7.
(198) DeNinno, M. P.; Etienne, J. B.; Duplantier, K. C. A Method for the Selective Reduction of Carbohydrate 4,6-O-Benzylidene Acetals. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36* (5), 669–672. https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)02348-F.
(199) Appel, R.; Berger, G. Hydrazinsulfonsäure-Amide, I. Über Das Hydrazodisulfamid. *Chemische Berichte* **1958**, *91* (6), 1339–1341. https://doi.org/10.1002/cber.19580910633.
(200) Okada, M.; Iwashita, S.; Koizumi, N. Efficient General Method for Sulfamoylation of a Hydroxyl Group. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (36), 7047–7051. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01130-8.
(201) Bayley, H.; Standring, D. N.; Knowles, J. R. Propane-1,3-Dithiol: A Selective Reagent for the Efficient Reduction of Alkyl and Aryl Azides to Amines. *Tetrahedron Letters* **1978**, *19* (39), 3633–3634. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95015-4.
(202) Lovrić, M.; Cepanec, I.; Litvić, M.; Bartolinčić, A.; Vinković, V. Scope and Limitations of Sodium and Potassium Trimethylsilanolate as Reagents for Conversion of Esters to Carboxylic Acids. *Croatica Chemica Acta* **2007**, *80* (1), 109–115.
(203) Sheng, G. J.; Oh, Y. I.; Chang, S.-K.; Hsieh-Wilson, L. C. Tunable Heparan Sulfate Mimetics for Modulating Chemokine Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (30), 10898–10901. https://doi.org/10.1021/ja4027727.
(204) Bürglová, K.; Hlaváč, J. Application of Trimethylsilanolate Alkali Salts in Organic Synthesis. *Synthesis* **2018**, *50* (06), 1199–1208. https://doi.org/10.1055/s-0037-1609202.
(205) Sherman, W. R.; Stanfield, E. F. Measurement of the Arylsulphatase of Patella Vulgata with 4-Methylumbelliferone Sulphate. *Biochem J* **1967**, *102* (3), 905–909.
(206) Mj, Z.-G.; Ka, H.; K, N.; Mn, T.; Kl, B. Integration of Hepatic Drug Transporters and Phase II Metabolizing Enzymes: Mechanisms of Hepatic Excretion of Sulfate, Glucuronide, and Glutathione Metabolites. *Eur J Pharm Sci* **2006**, *27* (5), 447–486. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.12.007.
(207) Olson, S. T.; Björk, I.; Bock, S. C. Identification of Critical Molecular Interactions Mediating Heparin Activation of Antithrombin: Implications for the Design of Improved Heparin Anticoagulants. *Trends in Cardiovascular Medicine* **2002**, *12* (5), 198–205. https://doi.org/10.1016/S1050-1738(02)00160-3.
(208) Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A. A Synthetic Antithrombin III Binding Pentasaccharide Is Now a Drug! What Comes Next? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43* (24), 3118–3133. https://doi.org/10.1002/anie.200300640.
(209) Shukla, D.; Liu, J.; Blaiklock, P.; Shworak, N. W.; Bai, X.; Esko, J. D.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J.; Rosenberg, R. D.; Spear, P. G. A Novel Role for 3-O-Sulfated Heparan Sulfate in Herpes Simplex Virus 1 Entry. *Cell* **1999**, *99* (1), 13–22. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80058-6.
(210) Campaigne, E. Sulfonation and Related Reactions. By E. E. Gilbert. Interscience Publishers, Inc., 605 3rd Ave., New York, N. Y., 1965. Xi + 529 Pp. 15.5 × 23.5 Cm. Price $16.50.

Journal of Pharmaceutical Sciences **1966**, *55* (8), 864–864. https://doi.org/10.1002/jps.2600550829.
(211) Deno, N. C.; Newman, M. S. Mechanism of Sulfation of Alcohols1,2. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72* (9), 3852–3856. https://doi.org/10.1021/ja01165a005.
(212) Gilbert, E. E. The Reactions of Sulfur Trioxide, and Its Adducts, with Organic Compounds. *Chem. Rev.* **1962**, *62* (6), 549–589. https://doi.org/10.1021/cr60220a003.
(213) Al-Horani, R. A.; Desai, U. R. Chemical Sulfation of Small Molecules - Advances and Challenges. *Tetrahedron* **2010**, *66* (16), 2907–2918. https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.02.015.
(214) Mumma, R. O. Preparation of Sulfate Esters. *Lipids* **1966**, *1* (3), 221–223. https://doi.org/10.1007/BF02531876.
(215) Hoiberg, C. P.; Mumma, R. O. Preparation of Sulfate Esters. Reactions of Various Alcohols, Phenols, Amines, Mercaptans, and Oximes with Sulfuric Acid and Dicyclohexylcarbodiimide. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (15), 4273–4278. https://doi.org/10.1021/ja01043a041.
(216) Dusza, J. P.; Joseph, J. P.; Bernstein, S. The Preparation of Estradiol-17β Sulfates with Triethylamine-Sulfur Trioxide. *Steroids* **1985**, *45* (3), 303–315. https://doi.org/10.1016/0039-128X(85)90079-0.
(217) Kitagawa, K.; Aida, C.; Fujiwara, H.; Yagami, T.; Futaki, S.; Kogire, M.; Ida, J.; Inoue, K. Facile Solid-Phase Synthesis of Sulfated Tyrosine-Containing Peptides: Total Synthesis of Human Big Gastrin-II and Cholecystokinin (CCK)-391,2. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (1), 1–10. https://doi.org/10.1021/jo000895y.
(218) Lee, J.-C.; Lu, X.-A.; Kulkarni, S. S.; Wen, Y.-S.; Hung, S.-C. Synthesis of Heparin Oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (2), 476–477. https://doi.org/10.1021/ja038244h.
(219) Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C. A Chondroitin Sulfate Small Molecule That Stimulates Neuronal Growth. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (25), 7736–7737. https://doi.org/10.1021/ja0484045.
(220) Young, T.; Kiessling, L. L. A Strategy for the Synthesis of Sulfated Peptides. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (18), 3449–3451. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020916)41:18<3449::AID-ANIE3449>3.0.CO;2-U.
(221) Sobel, A. E.; Drekter, I. J.; Natelson, S. Estimation of Small Amounts of Cholesterol as the Pyridine Cholesteryl Sulfate. *J. Biol. Chem.* **1936**, *115* (2), 381–390.
(222) Sobel, A. E.; Spoerri, P. E. Steryl Sulfates. I. Preparation and Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63* (5), 1259–1261. https://doi.org/10.1021/ja01850a030.
(223) Dusza, J. P.; Joseph, J. P.; Bernstein, S. Steroid Conjugates IV. The Preparation of Steroid Sulfates with Triethylamine-Sulfur Trioxide. *Steroids* **1968**, *12* (1), 49–61. https://doi.org/10.1016/S0039-128X(68)80079-0.
(224) Joseph, J. P.; Dusza, J. P.; Cantrall, E. W.; Bernstein, S. Steroid Conjugates. V.1 The Synthesis of a Suifoglucuronide Derivative of Estriol. *Steroids* **1969**, *14* (5), 591–601. https://doi.org/10.1016/S0039-128X(69)80049-8.
(225) Krylov, V. B.; Ustyuzhanina, N. E.; Grachev, A. A.; Nifantiev, N. E. Efficient Acid-Promoted per-O-Sulfation of Organic Polyols. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (41), 5877–5879. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.07.135.
(226) Kuszmann, J.; Medgyes, G.; Boros, S. Synthesis of 2,5-Anhydro-(β-d-Glucopyranosyluronate)- and (α-l-Idopyranosyluronate)-d-Mannitol Hexa-O-Sulfonate Hepta Sodium Salt. *Carbohydrate Research* **2004**, *339* (8), 1569–1579. https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.03.006.
(227) Xu, P.; Laval, S.; Guo, Z.; Yu, B. Microwave-Assisted Simultaneous O,N-Sulfonation in the Synthesis of Heparin-like Oligosaccharides. *Org. Chem. Front.* **2015**, *3* (1), 103–109. https://doi.org/10.1039/C5QO00320B.
(228) Dulaney, S. B.; Xu, Y.; Wang, P.; Tiruchinapally, G.; Wang, Z.; Kathawa, J.; El-Dakdouki, M. H.; Yang, B.; Liu, J.; Huang, X. Divergent Synthesis of Heparan Sulfate Oligosaccharides. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (24), 12265–12279. https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02172.
(229) de Paz, J. L.; Noti, C.; Seeberger, P. H. Microarrays of Synthetic Heparin Oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (9), 2766–2767. https://doi.org/10.1021/ja057584v.

(230) Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Asong, J.; Leach, F. E.; Amster, I. J.; Venot, A.; Turnbull, J. E.; Boons, G.-J. Modular Synthesis of Heparan Sulfate Oligosaccharides for Structure−Activity Relationship Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17394–17405. https://doi.org/10.1021/ja907358k.

(231) Maza, S.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M. Microwave-Assisted Sulfonation of Heparin Oligosaccharides. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52* (3), 441–443. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.11.094.

(232) Nagasawa, K.; Inoue, Y. Solvolytic Desulfation of 2-Deoxy-2-Sulfoamino-D-Glucose and D-Glucose 6-Sulfate. *Carbohydrate Research* **1974**, *36* (2), 265–271. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83047-5.

(233) Sieh, D. H.; Dunham, J. M. Determination of Active Sulfur Trioxide in Sulfur Trioxide-Pyridine and Sulfur Trioxide-Trimethylamine Complexes. *Anal. Chem.* **1982**, *54* (7), 1216–1217. https://doi.org/10.1021/ac00244a051.

(234) Ogamo, A.; Metori, A.; Uchiyama, H.; Nagasawa, K. Reactivity toward Chemical Sulfation of Hydroxyl Groups of Heparin. *Carbohydrate Research* **1989**, *193*, 165–172. https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)85116-X.

(235) Rabuka, D.; Rush, J. S.; deHart, G. W.; Wu, P.; Bertozzi, C. R. Site-Specific Chemical Protein Conjugation Using Genetically Encoded Aldehyde Tags. *Nat Protoc* **2012**, *7* (6), 1052–1067. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.045.

(236) Hoffman, K.; Enders, D. Novel Sulfur Containing Electrophiles in Asymmetric Organocatalysis, Publikationsserver der RWTH Aachen University, Aachen, 2008.

(237) Cheng, S.; Yu, S. Enantioselective Synthesis of 3-Substituted 1,2-Oxazinanes via Organocatalytic Intramolecular Aza-Michael Addition. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (43), 8607–8610. https://doi.org/10.1039/C4OB01646G.

(238) Hevey, R.; Morland, A.; Ling, C.-C. A Scalable Approach to Obtaining Orthogonally Protected β-d-Idopyranosides. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (16), 6760–6772. https://doi.org/10.1021/jo300764k.

(239) Ghosh, S.; Nishat, S.; Andreana, P. R. Synthesis of an Aminooxy Derivative of the Tetrasaccharide Repeating Unit of Streptococcus Dysgalactiae 2023 Polysaccharide for a PS A1 Conjugate Vaccine. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (11), 4475–4484. https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00195.

(240) Ghosh, S.; Andreana, P. R. Synthesis of an Aminooxy Derivative of the Trisaccharide Globotriose Gb3. *J Carbohydr Chem* **2014**, *33* (7–8), 381–394. https://doi.org/10.1080/07328303.2014.925913.

(241) Renaudet, O.; Dumy, P. Expedient Synthesis of Aminooxylated-Carbohydrates for Chemoselective Access of Glycoconjugates. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42* (43), 7575–7578. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01614-8.

(242) Khomutov, A. R.; Vepsäläinen, J. J.; Shvetsov, A. S.; Hyvönen, T.; Keinänen, T. A.; Pustobaev, V. N.; Eloranta, T. O.; Khomutov, R. M. Synthesis of Oxyamine Analogues of Polyamines. *Tetrahedron* **1996**, *52* (43), 13751–13766. https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00836-8.

(243) Ge, Y.; Wu, X.; Zhang, D.; Hu, L. 3-Aminoxypropionate-Based Linker System for Cyclization Activation in Prodrug Design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (3), 941–944. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.097.

(244) Improved Preparation of a Key Oxyamine Intermediate for Relebactam: Rate Enhancement of Benzyl Ether Hydrogenolysis with DABCO | Organic Process Research & Development https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.oprd.7b00381 (accessed Feb 14, 2020).

(245) Ram, S.; Spicer, L. D. Rapid Debenzylation of N-Benzylamino Derivatives to Amino-Derivatives Using Ammonium Formate as Catalytic Hydrogen Transfer Agent. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28* (5), 515–516. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)95769-1.

(246) Makowski, M.; Rzeszotarska, B.; Smelka, L.; Kubica, Z. Synthesis of Peptides with α,β-Dehydroamino Acids, III. Debenzyloxycarbonylation and Detrifluoroacetylation of Dehydroalanine and Dehydrophenylalanine Peptides. *Liebigs Annalen der Chemie* **1985**, *1985* (7), 1457–1464. https://doi.org/10.1002/jlac.198519850716.

(247) Niemietz, M.; Perkams, L.; Hoffman, J.; Eller, S.; Unverzagt, C. Selective Oxidative Debenzylation of Mono- and Oligosaccharides in the Presence of Azides. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (37), 10485–10487. https://doi.org/10.1039/C1CC13884G.
(248) Cao, S.; Tropper, F. D.; Roy, R. Stereoselective Phase Transfer Catalyzed Syntheses of Glycosyloxysuccinimides and Their Transformations into Glycoprobes. *Tetrahedron* **1995**, *51* (24), 6679–6686. https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00325-3.
(249) Gong, Y.; Peyrat, S.; Sun, H.; Xie, J. Synthesis of Nucleoside Aminooxy Acids. *Tetrahedron* **2011**, *67* (37), 7114–7120. https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.06.105.
(250) Marcaurelle, L. A.; Shin, Y.; Goon, S.; Bertozzi, C. R. Synthesis of Oxime-Linked Mucin Mimics Containing the Tumor-Related TN and Sialyl TN Antigens. *Org. Lett.* **2001**, *3* (23), 3691–3694. https://doi.org/10.1021/ol0166247.
(251) Besset, C.; Chambert, S.; Queneau, Y.; Kerverdo, S.; Rolland, H.; Guilbot, J. Reactivity of Melezitose and Raffinose under Mitsunobu Reaction Conditions. *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (5), 929–935. https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.041.
(252) Batesky, D. C.; Goldfogel, M. J.; Weix, D. J. Removal of Triphenylphosphine Oxide by Precipitation with Zinc Chloride in Polar Solvents. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (19), 9931–9936. https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00459.
(253) Astleford, B.; Weigel, L. O. Scope of Phthalimido Chemistry I. Extension of Utility by Conversion to the Opcb Protecting Group. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32* (28), 3301–3304. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)92691-1.
(254) Menges, N.; Balci, M. Catalyst-Free Hydrogenation of Alkenes and Alkynes with Hydrazine in the Presence of Oxygen. *Synlett* **2014**, *25* (05), 671–676. https://doi.org/10.1055/s-0033-1340554.
(255) Haller, M.; Boons, G.-J. Towards a Modular Approach for Heparin Synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, No. 8, 814–822. https://doi.org/10.1039/B009845K.
(256) Hu, Y.-P.; Lin, S.-Y.; Huang, C.-Y.; Zulueta, M. M. L.; Liu, J.-Y.; Chang, W.; Hung, S.-C. Synthesis of 3- O -Sulfonated Heparan Sulfate Octasaccharides That Inhibit the Herpes Simplex Virus Type 1 Host–Cell Interaction. *Nature Chemistry* **2011**, *3* (7), 557–563. https://doi.org/10.1038/nchem.1073.
(257) van den Bos, L. J.; Codée, J. D. C.; van der Toorn, J. C.; Boltje, T. J.; van Boom, J. H.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. Thioglycuronides: Synthesis and Application in the Assembly of Acidic Oligosaccharides. *Org. Lett.* **2004**, *6* (13), 2165–2168. https://doi.org/10.1021/ol049380+.
(258) Dilhas, A.; Lucas, R.; Loureiro-Morais, L.; Hersant, Y.; Bonnaffé, D. Mixture Synthesis and "Charge Tagging" Based Demixing: An Efficient Strategy for the Preparation of Heparan Sulfate Libraries. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10* (2), 166–169. https://doi.org/10.1021/cc8000019.
(259) Bavikar, S. N.; Salunke, D. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Thierry, J.; Dodd, R. H. Pd-Catalyzed One-Pot Chemoselective Hydrogenation Protocol for the Preparation of Carboxamides Directly from Azides. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51* (29), 3815–3819. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.05.066.
(260) Navidpour, L.; Lu, W.; Taylor, S. D. Synthesis of α-Fluorosulfonate and α-Fluorosulfonamide Analogues of a Sulfated Carbohydrate. *Org. Lett.* **2006**, *8* (24), 5617–5620. https://doi.org/10.1021/ol062357z.
(261) Liu, Y.; Ahmed, V.; Hill, B.; Taylor, S. D. Synthesis of a Non-Hydrolyzable Estrone Sulfate Analogue Bearing the Difluoromethanesulfonamide Group and Its Evaluation as a Steroid Sulfatase Inhibitor. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (18), 3329–3335. https://doi.org/10.1039/B508852F.
(262) Lapierre, J.; Ahmed, V.; Chen, M.-J.; Ispahany, M.; Guillemette, J. G.; Taylor, S. D. The Difluoromethylene Group as a Replacement for the Labile Oxygen in Steroid Sulfates: A New Approach to Steroid Sulfatase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14* (1), 151–155. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.09.089.
(263) Rembold, H.; Schmidt, R. R. Synthesis of Kdo-α-Glycosides of Lipid A Derivatives. *Carbohydrate Research* **1993**, *246* (1), 137–159. https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84029-6.

(264) Tiwari, P.; Misra, A. K. Synthesis of a Pentasaccharide Repeating Unit of the Extracellular Polysaccharide Produced by Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus 291. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2007**, *26* (4), 239–248. https://doi.org/10.1080/07328300701410676.

(265) Toshima, H.; Sato, H.; Ichihara, A. Total Synthesis of (2S,3R,5S)-(−)-2,3-Dihydroxytetradecan-5-Olide, a New Biologically Active δ-Lactone Produced by Seiridium Unicorne. *Tetrahedron* **1999**, *55* (9), 2581–2590. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00056-3.

(266) Neumann, J.; Thiem, J. Synthesis of Amino-Bridged Oligosaccharide Mimetics. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010* (5), 900–908. https://doi.org/10.1002/ejoc.200901106.

ECOLE DOCTORALE N°571
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystème (2MIB)

Titre : Synthèses d'inhibiteurs d'endosulfatases humaines : Vers de nouveaux outils thérapeutiques contre le cancer et les maladies inflammatoires.

Mots clés : Synthèse organique – glycosciences – interface chimie-biologie – diversité moléculaire

Résumé : Les endosulfatases 1 et 2 sont des enzymes appartenant à la famille des sulfatases et qui catalysent la 6-*O*-désulfatation des chaînes d'Héparane sulfate (HS), des polysaccharides sulfatés de la famille des glycosaminoglycanes. Les HS se lient à de nombreuses protéines de signalement telles que des chimiokines, cytokines, facteurs de croissance … via leur degré de sulfatation. En désulfatant les chaînes d'HS, les endosulfatases jouent donc un rôle crucial dans la régulation de ces signalement et dans les processus biologique de l'organisme. L'expression de l'endosulfatase humaine 2 (HSulf2) est surexprimée ou dérégulée dans de nombreux cancers (sein, ovaire, pancréas, poumons…) et représente donc une cible thérapeutique intéressante.

Dans l'optique d'obtenir des inhibiteurs spécifiques d'HSulf2, quatre oligosaccharides de longueurs différentes mimant les chaînes d'Héparane Sulfate et comportant comme fonction inhibitrice un sulfamate, ont été synthétisés. Une étape clé de la synthèse, la réaction de *N*, *O*-sulfonation a du être optimisée. L'activité inhibitrice de ces quatre composés vis-à-vis d'HSulf2 a ensuite été testée.

Afin d'élargir le choix d'inhibiteurs potentiels d'HSulf2, des monosaccharides portant des fonctions hydroxylamine et hydrazine ont été synthétisés.

Title: Design and synthesis of Human endosulfatase inhibitors: towards new therapeutic tools against cancer and inflammatory diseases.

Keywords : Organic synthesis – glycosciences – chemical biology – molecular diversity

Abstract: Endosulfatases 1 and 2 belong to the sulfatase family and are enzymes that catalyse the 6-*O*-desulfation of Heparan Sulfate (HS), a polysaccharide highly sulfated belonging to the glycosaminoglycan family. HS chains interact with numerous signalling proteins including chimiokines, cytokines, growth factors … through their sulfation pattern. By desulfating the HS chains, the endosulfatases play a key role in the signalling regulation and in the organism's biological process. The human endosulfatase 2 (HSulf2) is over expressed in many cancers (breast, ovarian, pancreas, lungs …) and represents thus an interesting therapeutic target.

To obtain specific HSulf2 inhibitors, four oligosaccharides with different lengths, mimicking the HS chains with a sulfamoyl function were synthesised. To do so, a key step was optimised, the *N*, *O*-sulfonation. Then, the four molecules were tested to assess their capacity to inhibit HSulf2.

To broaden the choice of potential HSulf2 inhibitors, monosaccharides with hydroxylamine and hydrazine function were synthesised.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France