



**HAL**  
open science

# Nanoparticules mimes des propriétés biologiques des GAGs : vers un inhibiteur sélectif de CXCL12

Lu Tang

► **To cite this version:**

Lu Tang. Nanoparticules mimes des propriétés biologiques des GAGs : vers un inhibiteur sélectif de CXCL12. Chimie organique. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS072 . tel-03027076

**HAL Id: tel-03027076**

**<https://theses.hal.science/tel-03027076>**

Submitted on 27 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.

NNT : 2015SACLS072

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N°571  
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes  
Spécialité de doctorat : Chimie

Par

**Mme Lu TANG**

Nanoparticules Mimes des Propriétés Biologiques des GAGs :  
Vers un Inhibiteur Sélectif de CXCL12

**Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 02 Novembre 2015 :**

**Composition du Jury :**

Président :

M. FISCHMEISTER Rodolphe      Directeur de Recherche (INSERM, Châtenay-Malabry)

Rapporteurs :

Mme. MULARD Laurence      Directeur de Recherche (Institut Pasteur, Paris)

Mme. TEXIER-NOGUES Isabelle      Directeur de Recherche (CEA, Grenoble)

Examineurs :

M. BONNAFFÉ David      Professeur (Université Paris-Sud, Orsay)

Mme. HOU-BROUTIN Yanxia      Chargée de Recherche (CNRS, CEA Grenoble)

Directeur de thèse :

Mme. LE NARVOR Christine      Chargée de Recherche (CNRS, Orsay)

Invitée :

Mme. LESIEUR Sylviane      Directeur de Recherche (CNRS, Châtenay-Malabry)



**Titre :** Nanoparticules mimes des propriétés biologiques de GAGs : vers un inhibiteur sélectif de CXCL12

**Mots clés :** Héparane Sulfate, mime, nanoparticule d'or, nanoparticule lipidique, glycochimie

**Résumé :** L'Héparane Sulfate (HS), un polysaccharide linéaire, module les activités biologiques de nombreuses protéines. Afin d'élucider les interactions entre l'HS et les protéines, la synthèse chimique d'HS est un outil précieux, mais elle peut être difficile. Notre équipe a montré que des mélanges combinatoires obtenus par auto-assemblage de différentes combinaisons de dérivés disaccharidiques (lactose et lactose persulfaté) sur surfaces planes d'or peuvent reconnaître spécifiquement certaines protéines se liant à l'HS, telles que les isoformes de la chimiokine CXCL12 ou IFN $\gamma$ . Avec ces dérivés, nous avons réalisé un auto-assemblage sur des

nanoparticules d'or. Mais à cause de la toxicité des nanoparticules d'or, nous avons aussi adapté cette méthode à des nanoparticules lipidiques. En utilisant les conditions qui ont déjà été améliorées pendant la synthèse des dérivés lactose et lactose persulfaté, nous avons préparé deux autres dérivés disaccharidiques plus proches de la structure réelle d'HS. Ces nouveaux dérivés sont utilisés pour réaliser des nanoparticules d'or et nanoparticules lipidiques afin de comparer les propriétés avec les lactose et lactose persulfaté. Les tests d'affinité avec différentes protéines sont en cours de réalisation.

**Title :** Nanoparticles mimicking the biological properties of GAGs: towards a selective inhibitor of CXCL12

**Keywords :** Heparan Sulfate, mimetic, gold nanoparticle, lipid nanoparticle, glycochemistry

**Abstract :** Heparan Sulfate (HS) is a linear polysaccharide that modulates the biological activities of numerous proteins. In order to elucidate the interaction between HS and proteins, the synthesis of HS is an invaluable tool, but the synthesis is sometimes difficult. Our group has demonstrated that the combinatorial mixtures obtained by self-assembly of different combinations of disaccharide derivatives (lactose and persulfated lactose) on gold plan surfaces could recognize specifically some HS binding proteins, such as the isoforms of the chemokine

CXCL12 or IFN $\gamma$ . Because of the toxicity of gold nanoparticles, we have also adapted this method to lipid nanoparticles. Using the conditions that have already improved during the synthesis of lactose and persulfated lactose derivatives, we have synthesized two other disaccharide derivatives, which were closer to the real structure of HS. These new derivatives were used to prepare the gold and lipid nanoparticles at the aim of comparing the properties with lactose and persulfated lactose. The tests of affinities with different proteins are in progress.



## Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier Pr. David BONNAFFÉ pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Méthodologie, Synthèse & Molécules Thérapeutiques. Je le remercie pour sa patience, ses encouragements et ses conseils non seulement sur ma thèse mais aussi sur ma future.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Dr. Christine LE NARVOR. Sa gentillesse et sa confiance m'ont permis de réaliser ce travail de recherche passionnant. J'apprécie beaucoup le temps qu'on a passé ensemble et qu'on a travaillé ensemble.

Je tiens à remercier Dr. Rodolphe FISCHMEISTER, Dr. Yanxia HOU-BROUTIN, Dr. Sylviane LESIEUR, Dr. Laurence MULARD et Dr. Isabelle TEXIER-NOGUES pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je souhaite remercier le Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et d'Innovation Thérapeutique (LERMIT) pour m'avoir financé pendant ces trois années.

Je remercie «ma famille en France» - tous les membres du laboratoire, que j'ai la chance de rencontrer et de rester ensemble avec: Aurélien (il est toujours prêt de répondre mes questions), Maryline (elle est toujours prêt à m'aider), Jérôme (il est très agréable), Sophie (elle est très chaleureuse et m'a donné beaucoup des conseils sur la vie en France), Wenqing (elle m'apporte toujours de bon humeur), Yunyu (il m'a aidé dans tous les aspects), Thomas (un beau garçon souriant), Maxime (Superman du labo), Marc (maitre du verre qui facilite beaucoup notre recherche), Floriant (un nouveau maitre du verre), un grand MERCI à Annie, Valentine, Vladimir, Stéphane, Bénédicte, Nadine, Philippe, Ludovic et Michelle.

Je remercie les services RMN et MS : Jean-Pierre, Amandine, Delphine et Tanya.

Mes remerciements vont également aux notre collaborateurs : Dr. Sylviane LESIEUR, Dr. Vincent FAIVRE, M. David CHAPRON, Dr. Christina Sizun, Dr. Yanxia HOU-BROUTIN, Dr. Yulia SERGEEVA, Mme. Sophie BRENET.

Enfin, mes remerciements les plus tendres vont vers mes amis, tous les membres de ma famille en Chine pour leur soutien permanent.

Surtout mon chéri Zhaoyu, je te remercie pour tout. Je t'aime !



# Sommaire

<b>Abréviations</b> .....	<b>4</b>
<b>Chapitre I : Introduction</b> .....	<b>7</b>
1. Généralités sur les Héparane Sulfate/Héparine .....	7
2. Mimes d'Héparane Sulfate/Héparine .....	9
2.1. Mimes polysaccharidiques.....	9
2.2. Mimes peptidiques .....	12
2.3. Polymères synthétiques .....	15
2.4. Une surface combinatoire comme mime d'HS/HP.....	21
2.5. Les nanoparticules métalliques.....	24
3. Composés amphiphiles: monomères et auto-assemblages .....	30
3.1. Les composés amphiphiles et leur auto-assemblage .....	30
3.2. Auto-assemblage de glycolipides.....	32
3.3. Auto-assemblage avec d'autres molécules que des lipides.....	36
4. Présentation du sujet de la thèse .....	40
<b>Chapitre II : Synthèse des composés à base de lactose</b> .....	<b>42</b>
1. Fonctionnalisation des disaccharides en vue de réaliser des auto-assemblages sur des surfaces d'or (planes et nanoparticules) .....	42
1.1. Le choix des composés.....	42
1.2. Rétro-synthèse .....	43
1.3. Préparation du bras pegylé en C11, composé 11.....	44
1.3.1. Préparation du composé 9 .....	44
1.3.2. Préparation du composé 10 .....	47
1.3.3. Activation de l'acide carboxylique pour obtenir le composé 11 .....	47
1.4. Préparation du 3-(3-aminopropylsulfonyl)propyl lactose, composé 16.....	50
1.4.1. Addition radicalaire allyle-thiol.....	50
1.4.2. Oxydation du thioether.....	51
1.4.3. Enlèvement du groupement carboxybenzyle (Cbz).....	52
1.5. Préparation du produit lactose-C11 par couplage entre le 3-(3-aminopropylsulfonyl)propyl lactose et le bras pégylé C11 .....	53
1.6. Préparation du produit lactose sulfaté-C11 .....	54
1.6.1. Sulfatation avant couplage.....	55

1.6.2. Sulfatation après le couplage .....	60
1.7. Préparation du disulfure lactose-C11 et disulfure lactose sulfaté-C11 .....	61
1.8. Conclusion.....	62
2. Synthèses des produits pour former les nanoparticules lipidiques .....	63
2.1. Choix de construction des composés .....	63
2.2. Rétro-synthèse .....	64
2.3. Préparation du bras cholestéryl.....	65
2.3.1. Préparation du bras cholestéryl sous forme d'acide carboxylique.....	65
2.3.2. L'activation de l'acide carboxylique du bras cholestéryl.....	68
2.4. Préparation du produit lactose-cholestéryl.....	69
2.5. Préparation du produit lactose sulfaté-cholestéryl .....	71
2.5.1. Sulfatation avant le couplage .....	71
2.5.2. Sulfatation après le couplage .....	72
2.6. Analyse RMN pour les produits cholestéryl.....	73
2.7. Conclusion.....	75
<b>Chapitre III : Application des conditions optimisées aux disaccharides utilisés dans la synthèse des fragments d'HS.....</b>	<b>76</b>
1. Rétro-synthèse des disaccharides composant les fragments d'HS.....	76
2. Préparation de la brique glucuronique (GlcUA) .....	78
2.1. Réaction thiol-ène pour introduire le groupement NHCbz.....	78
2.2. Réduction de l'azoture et acétylation de l'amine .....	78
2.3. Oxydation du thioéther en sulfone.....	79
2.4. Saponification.....	80
3. Préparation de la brique Iduronique (IdoUA).....	81
3.1. Réaction thiol-ène pour introduire le groupement NHCbz.....	81
3.2. Désacétylation de la position 6.....	82
3.3. Réduction du groupement $N_3$ en $NH_2$ .....	82
3.4. O- et N-Sulfatation.....	83
3.5. Saponification et oxydation.....	83
4. Préparation des composés disulfure GlcUA-C11 et IdoUA-C11.....	84
4.1. Préparation du produit GlcUA-C11 .....	84
4.2. Préparation du produit IdoUA-C11 .....	85
4.3. Enlèvement du groupement acétate et oxydation pour former les disulfures .....	87

5. Préparation des composés GlcUA-chol et IdoUA-chol .....	87
6. Conclusion .....	89
<b>Chapitre IV : Caractérisations physico-chimiques et discussion .....</b>	<b>90</b>
1. Méthodes de caractérisation des nanoparticules .....	90
2. Auto assemblage des dérivés lactose et lactose sulfaté sur les nanoparticules d'or .....	91
3. Autoassemblage des disaccharides fonctionnalisés par un résidu cholestéryl .....	92
3.1. Détermination de la CMC des composés dans le tampon .....	92
3.2. Distribution de diamètres hydrodynamiques moyens pour les nanoparticules lipidiques par diffusion dynamique de la lumière (DLS) .....	94
3.3. Caractérisation par cryo-TEM .....	95
4. Surfaces planes d'or formées en utilisant les dérivés des fragments d'HS .....	97
5. Conclusion .....	98
<b>Chapitre V : Conclusions et perspectives .....</b>	<b>99</b>
1. Conclusions .....	99
2. Perspectives .....	100
<b>Partie expérimentale .....</b>	<b>101</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>131</b>

## Abréviations

<b>Ac</b>	Acétyle
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFM</b>	“ <i>Atomic Force Microscopy</i> ” (Microscopie à force atomique)
<b>AIBN</b>	Azo- <i>bis</i> -isobutyronitrile
<b>All</b>	Allyle
<b>ATIII</b>	Antithrombine III
<b>AZT</b>	Azidothymidine
<b>BACE-1</b>	Béta sécrétase 1
<b>BAIB</b>	Bis(acétoxy)iodobenzène
<b>BB</b>	“ <i>Building Block</i> ” (Briques de base)
<b>Bn</b>	Benzyle
<b>Cbz</b>	Carboxybenzyle
<b>CCD</b>	“ <i>Coupled Charge Device</i> ” (Capteur à charges couplées)
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CEL</b>	“ <i>Continuous evolution landscape</i> ” (Paysage à évolution continue)
<b>CEP</b>	“ <i>Continuous evolution profile</i> ” (profil à évolution continue)
<b>CMC</b>	Concentration Micellaire Critique
<b>ConA</b>	Concanavaline A
<b>DCC</b>	Dicyclohexylcarbodiimide
<b>DLS</b>	“ <i>Dynamic Light Scattering</i> ” (Diffusion dynamique de la lumière)
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -diméthylformamide
<b>DMAP</b>	4-diméthylaminopyridine
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>ECL</b>	<i>Erythrina cristagalli</i> Lectine
<b>EDC</b>	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
<b>Et</b>	Éthyle
<b>FGFs</b>	“ <i>Fibroblast Growth Factor</i> ” (Facteurs de croissance des fibroblastes)
<b>Fuc</b>	Fucose
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acétyl-D-glucosamine
<b>GlcUA</b>	Acide D-glucuronique

<b>HEPES</b>	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
<b>HIP</b>	“ <i>Huntingtin - Interacting Protein</i> ”
<b>HP</b>	Héparine
<b>HS</b>	Héparane Sulfate
<b>HSBP</b>	“ <i>Heparan Sulfate Binding Protein</i> ”
<b>HSV</b>	“ <i>Herpes Simplex Virus</i> ”
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration Inhibitrice médiane
<b>IdoUA</b>	Acide L-iduronique
<b>IFN<sub>γ</sub></b>	Interféron gamma
<b>IgM</b>	Immunoglobuline M
<b>m-CPBA</b>	Acide métachloroperbenzoïque
<b>Me</b>	Méthyle
<b>MS</b>	“ <i>Mass Spectrometry</i> ” (Spectroscopie de masse)
<b>Nu</b>	Nucléophile
<b>P</b>	Paramètre d’empilement
<b>PAMAM</b>	Poly(amidoamine)
<b>PDC</b>	Dichromate de pyridinium
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PF4</b>	“ <i>Platelet Factor 4</i> ” (Facteur plaquettaire 4)
<b>pMB</b>	<i>para</i> Méthoxybenzyle
<b>Py</b>	Pyridine
<b>RANTES</b>	“ <i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i> ”
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SDF-1</b>	“ <i>Stromal cell-Derived Factor</i> ”
<b>SEM</b>	“ <i>Scanning Electronic Microscopy</i> ” (Microscopie électronique à balayage)
<b>S<sub>N</sub></b>	Substitution nucléophile
<b>SPR</b>	“ <i>Surface Plasmon Resonance</i> ” (Résonance plasmonique de surface)
<b>SPRi</b>	“ <i>Surface Plasmon Resonance imaging</i> ” (Imagerie par Résonance plasmonique de surface)
<b>STM</b>	“ <i>Scanning Tunnel Microscopy</i> ” (Microscope à effet tunnel)
<b>tBu</b>	<i>tert</i> Butyle
<b>TEMPO</b>	2,2,6,6-Tétraméthylpipéridin-1-oxyl
<b>T.A.</b>	Température ambiante
<b>TEM</b>	“ <i>Transmission Electronic Microscopy</i> ” (Microscopie en transmission)

<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>TLC</b>	“ <i>Thin layer chromatography</i> ” (CCM, voir ci-dessus)
<b>TMP</b>	2,2,6,6-Tétraméthylpipéridine
<b>TMS</b>	Triméthylsilane
<b>Ts</b>	Tosyle
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>UV-vis</b>	Spectroscopie ultraviolet-visible
<b>VEGF</b>	“ <i>Vascular Endothelium Growth Factor</i> ” (Facteur de croissance de l’endothélium vasculaire)
<b>VIH</b>	Virus de l’Immunodéficience Humaine
<b>XAS</b>	“ <i>X-ray Absorption Spectroscopy</i> ” (Spectrométrie d’absorption des rayons X)
<b>XPS</b>	“ <i>X-ray Photoemission Spectroscopy</i> ” (Spectrométrie photoélectronique X)
<b>XRD</b>	“ <i>X-Ray Diffraction</i> ” (Cristallographie par diffraction des rayons X)
<b>XRF</b>	“ <i>X-Ray Fluorescence</i> ” (Spectrométrie de fluorescence X)

# Chapitre I : Introduction

## 1. Généralités sur les Héparane Sulfate/Héparine

L'Héparane Sulfate (HS) et l'Héparine (HP) sont des polysaccharides linéaires qui appartiennent à la famille des Glycosaminoglycanes (GAG). Ils sont constitués par une unité répétitive d'un disaccharide qui comporte un acide uronique,  $\alpha$ -L-iduronique ( $\alpha$ -L-IdoUA) ou  $\beta$ -D-glucuronique ( $\beta$ -D-GlcUA), lié en position 4 d'une  $\alpha$ -D-glucosamine (Figure 1). Les disaccharides de répétition sont liés par une liaison  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4. La fonction amine du résidu glucosamine peut être acétylée, sulfatée ou plus rarement libre. Les hydroxyles en positions C-3, C-6 de l' $\alpha$ -D-glucosamine et C-2 de l'acide uronique peuvent être libres ou sulfatés. Toutes ces modifications font que les HS/HP sont des polysaccharides hautement hétérogènes. L'HS et l'HP peuvent se différencier par leur taux de sulfatation et la richesse en acide L-iduronique, mais surtout par leur lieu de production et de localisation. Les chaînes d'HP plus sulfatées et plus riches en acide L-iduronique sont produites exclusivement par les mastocytes et stockés dans leurs granules intracellulaires. Celles d'HS sont présentes en proportions variables à la surface des cellules de mammifères ainsi que dans la matrice extracellulaire,

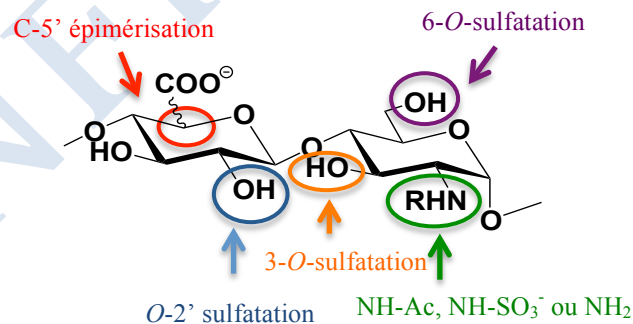


Figure 1. Unité répétitive des chaînes d'HS

La haute charge négative et les diversités structurales de ces polymères leur permettent de se lier, souvent de manière spécifique, à de nombreuses protéines comme : l'interféron- $\gamma$ , l'antithrombine III, les facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et toutes les chimiokines, dont CXCL12. Cette dernière est une cible particulièrement étudiée au laboratoire et dans le cadre d'un projet structurant du LabEx LERMIT.

CXCL12, appelée également SDF-1 (stromal derived factor 1), est une chimiokine qui a plusieurs isoformes dont les plus représentatives sont CXCL12 $\alpha$  et CXCL12 $\gamma$ . Deux récepteurs sont associés à CXCL12, CXCR4 et CXCR7. Le premier, CXCR4, est impliqué dans différents processus de signalisation,<sup>1,2</sup> ce qui ne semble pas être le cas pour CXCR7. Il a été suggéré que le couple CXCL12/CXCR4 joue un rôle dans diverses pathologies inflammatoires<sup>3</sup> comme l'allergie, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque, etc.... Par ailleurs, plusieurs études ont montré le rôle protumoral du couple CXCL12/CXCR4 et CXCL12/CXCR7 dans différents types de cancers. D'autre part, le récepteur CXCR4 est l'un des deux co-récepteurs majeurs utilisé par certaines souches de VIH pour infecter leurs cellules cibles (ces souches sont de ce fait appelées R4 tropiques). C'est pourquoi compte tenu de tous ces rôles, CXCL12 est une cible thérapeutique d'intérêt.

L'AMD 3100, présenté dans Figure 2, premier inhibiteur de l'axe CXCL12/CXCR4. Il est synthétisé par l'équipe de Fabbrizzi en 1987.<sup>4</sup> Il est prouvé de permettre d'inhiber le VIH par l'équipe de De Clercq en 1994.<sup>5</sup> Des études ont montré que l'AMD 3100 est un antagoniste du CXCR4.<sup>6</sup> Il peut se fixer sur CXCR4 et ainsi empêcher la fixation de CXCL12. Cependant, il est à l'origine de différents effets secondaires notamment cardiaques.

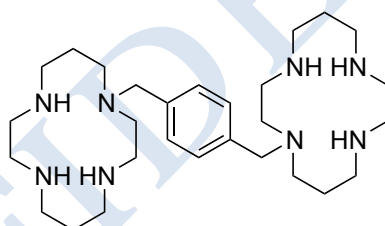


Figure 2. La structure d'AMD3100

Il existe d'autres molécules permettant d'inhiber l'interaction entre CXCL12 et ses récepteurs en inhibant la fixation de CXCL12 aux HS, notamment la chalcone<sup>47</sup> ou encore l'aptamère NOX-A-12.<sup>8</sup> Depuis plusieurs années, notre laboratoire est engagé dans différents programmes visant à identifier un inhibiteur sélectif de CXCL12. Dans ce but, plusieurs approches sont explorées : soit par la synthèse

(1) Yellowley, C. *BoneKey Rep* **2013**, 2.

(2) Teicher, B. A.; Fricker, S. P. *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 2927-2931.

(3) Karin, N. *Journal of Leukocyte Biology* **2010**, 88, 463-473.

(4) Pallavicini, P. S.; Perotti, A.; Poggi, A.; Seghi, B.; Fabbrizzi, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5139-5144.

(5) De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Witvrouw, M.; De Vreese, K.; Debyser, Z.; Rosenwirth, B.; Peichl, P.; Datema, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38, 668-674.

(6) Hendrix, C. W.; Flexner, C.; MacFarland, R. T.; Giandomenico, C.; Fuchs, E. J.; Redpath, E.; Bridger, G.; Henson, G. W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 1667-1673.

(7) Daubeuf, F.; Hachet-Haas, M.; Gizzi, P.; Gasparik, V.; Bonnet, D.; Utard, V.; Hibert, M.; Frossard, N.; Galzi, J.-L. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 11865-11876.

(8) Marasca, R.; Maffei, R. *Blood* **2014**, 123, 952-953.



de fragments d'HS, soit par la synthèse de mimes sulfatés de ces fragments.

## 2. Mimes d'Héparane Sulfate/Héparine

### 2.1. Mimes polysaccharidiques

Les HS/HP peuvent être obtenus par extraction des tissus animaux. En 1916, l'HP fut extraite pour la première fois du foie de chien sous le nom d'"héparphosphatide" et déjà caractérisée pour son activité anticoagulante et antithrombotique par un jeune étudiant en médecine Jay MacLean. Il a fallu attendre les années 1930 pour que Brinkhous et al démontrent que l'héparine était un anticoagulant indirect, nécessitant un cofacteur que l'on appela antithrombine III (AT-III). Depuis plus de 80 ans, l'HP, isolée des mastocytes de la muqueuse d'intestin de porc, a été utilisée comme un médicament anticoagulant. Mais l'utilisation d'HP naturelle est associée à des effets secondaires comme des thrombocytopénies<sup>9</sup> et des hémorragies.<sup>10</sup> De plus, la pureté de l'HP provenant d'animaux est difficile à contrôler. L'HP provenant de bovin n'est plus commercialisée à cause de possibles contaminations virales et des problèmes liés aux prions. On se rappelle aussi qu'en 2008, de l'HP produite en Chine avait été contaminée par du Chondroïtine Sulfate hypersulfaté chimiquement. Les analyses pratiquées à l'époque ne permettaient pas de détecter ce produit toxique, ce qui avait causé des centaines de morts dans le monde.<sup>11</sup> C'est pourquoi la préparation de fragments d'HS/HP et d'analogues via des méthodes chimiques et/ou des méthodes enzymatiques (ou chimioenzymatiques) est très importante. En effet, des produits purs et parfaitement caractérisés peuvent être obtenus par ces méthodes.

Un exemple bien réussi pour la synthèse chimique de fragment d'HS/HP est le fondaparinux **A** (Figure 3), préparé grâce aux efforts conjoints des équipes de P. Sinaÿ, de Sanofi-Synthélabo et d'Organon et capable d'activer spécifiquement l'AT-III.<sup>12,13</sup> Ce pentasaccharide a obtenu, sous le nom d'Arixtra<sup>®</sup> son autorisation de mise sur le marché en 2001 comme anticoagulant. Par rapport à l'HP naturel extrait, Arixtra n'a pas autant d'effets secondaires et il est 50% plus efficace pour éviter la thrombose. La synthèse de ce pentasaccharide a été effectuée plusieurs fois en utilisant des voies différentes.<sup>14</sup> Les synthèses réalisées sont longues et comportent des jeux de protection/déprotection ainsi que des étapes dont il faut contrôler la stéréosélectivité. Pour essayer de simplifier la synthèse, un autre pentasaccharide **B** (idraparinux), mime du composé **A**, a été préparé par van Boeckel et ses

(9) Kelton, J. G.; Warkentin, T. E. *Blood* **2008**, *112*, 2607-2616.

(10) Silver, D.; Kapsch, D. N.; Tsoi, E. K. *Annals of Surgery* **1983**, *198*, 301-306.

(11) Liu, H.; Zhang, Z.; Linhardt, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 313-321.

(12) Sinaÿ, P.; Jacquinet, J.-C.; Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Lederman, I.; Choay, J.; Torri, G. *Carbohydr. Res.* **1984**, *132*, C5-C9.

(13) Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Lederman, I.; Choay, J.; Sinaÿ, P.; Jacquinet, J.-C.; Torri, G. *Carbohydr. Res.* **1986**, *147*, 221-236.

(14) van Boeckel, C. A. A.; Petitou, M. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1993**, *32*, 1671-1690.

collègues.<sup>15,16</sup> Dans ce composé, les groupements *N*-sulfates sont remplacés par les groupements *O*-sulfates et les positions non sulfatées sont méthylées. Ce composé est beaucoup plus simple à préparer et possède une activité anticoagulante (anti facteur Xa) similaire au fondaparinux. Cela a prouvé que le remplacement du groupement *N*-sulfate par le groupement *O*-sulfate est une stratégie envisageable pour la synthèse de mimes d'HS/HP.

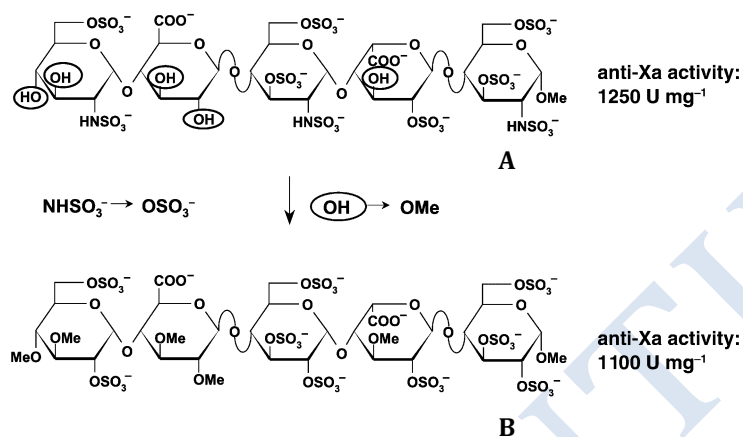


Figure 3. Le fragment pentasaccharidique d'HP et son mime

L'équipe de Wessel a montré que la réduction des fonctions carboxylates de l'héparine suivie par la sulfatation des fonctions hydroxyles primaires, permettait d'obtenir le "CRS-héparine" (Carboxyl Reduced Sulfated héparine). Cette modification chimique du polymère naturel abolit son activité anticoagulante alors que son activité antiproliférative est conservée.<sup>17</sup> En croisant ces résultats avec ceux obtenus par les équipes de van Boeckel et Petitou, ils ont synthétisé l'oligosaccharide **C** (Figure 4) dans lequel le disaccharide répétitif de l'HP est remplacé par du maltose.<sup>18</sup> Ce composé possède une activité antiproliférative comparable à l'héparine mais avec une faible activité anticoagulante, ce qui est important pour des applications thérapeutiques. Les oligosaccharides **D**, **E**, **F** (Figure 4) ont aussi été synthétisés.<sup>19</sup> Ils ont des structures relativement proches de celle du composé **C**, mais avec une unité  $\alpha$ -trehalose à l'extrémité réductrice. Tous ces oligosaccharides ont présenté une activité antiproliférative comparable à héparine mais avec une faible activité anticoagulante.<sup>20</sup>

(15) Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3118-3133.

(16) Westerduin, P.; Basten, J. E. M.; Broekhoven, M. A.; de Kimpe, V.; Kuijpers, W. H. A.; van Boeckel, C. A. A. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 331-333.

(17) Wessel, H. P.; Hosang, M.; Tschopp, T. B.; Weimann, B.-J. *Carbohydr. Res.* **1990**, *204*, 131-139.

(18) Wessel, H. P.; Minder, R.; Englert, G. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1995**, *14*, 1101-1115.

(19) Wessel, H. P.; Niggemann, J. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1995**, *14*, 1089-1100.

(20) Wessel, H. P.; Tschopp, T. B.; Hosang, M.; Iberg, N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 1419-1422.

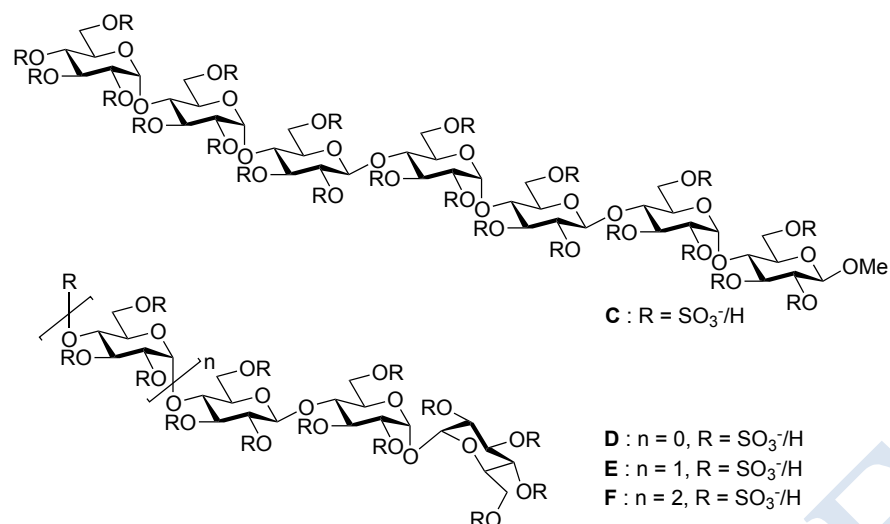


Figure 4. Des mimes d'HP à base de maltose

Les résultats décrits ci-dessus semblent montrer que le paramètre le plus important dans les interactions HS/HP-protéines est probablement les arrangements des charges négatives. De plus, les carboxylates et les *N*-sulfates peuvent parfois être remplacé par des *O*-sulfates. A partir de ce point de vue, différents mimes oligosaccharidiques d'HS ont été développés : cyclodextrine sulfatée, oligomannoside sulfaté, oligomaltoside sulfaté, etc. Quelques exemples seront présentés ci-dessous :

L'équipe de Kunita a synthétisé une série de dérivés de cyclodextrine sulfatée pour remplacer des composés polyanioniques comme le sulfate de dextrane ou de pentosane (HOE/BAY-946), connus pour avoir une activité anti-VIH *in vitro*.<sup>21</sup> En effet, l'utilisation thérapeutique du sulfate de dextrane ou de pentosane est limitée car ils présentent une mauvaise absorption orale, en raison de leur grande taille moléculaire et de leur caractère hydrophile, possèdent une courte demi-vie dans l'organisme, car ils sont rapidement métabolisés par les hydrolases présentes *in vivo*, et ont une activité anti-coagulante résiduelle. Cela a montré l'importance de rechercher des drogues potentielles parmi des molécules plus petites comme par exemple la cyclodextrine sulfatée. Parmi les dérivés de cyclodextrine sulfatée synthétisés par l'équipe de Kunita, la  $\beta$ -cyclodextrine sulfatée **G** (Figure 5) a présenté la meilleure activité anti-VIH et la plus faible activité anticoagulante.

(21) Moriya, T.; Saito, K.; Kurita, H.; Matsumoto, K.; Otake, T.; Mori, H.; Morimoto, M.; Ueba, N.; Kunita, N. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1674-1677.

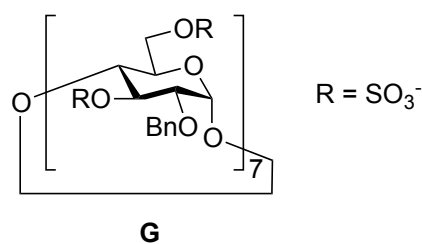


Figure 5. Une  $\beta$ -cyclodextrine sulfatée possédant une activité anti-VIH

Le PI-88 (Muparfostat<sup>®</sup>) est présenté comme un mime oligomannosidique d'HS/HP. C'est en fait un mélange d'oligomannosides sulfatés, qui possède des propriétés antitumorales et anti métastatiques, de par sa capacité à inhiber l'activité des héparanases, des sulfatases et des facteurs de croissance FGF-1, FGF-2 et VEGF.<sup>22</sup> Ce produit, actuellement en phase III d'essais cliniques,<sup>23</sup> a été obtenu dans l'équipe de Ferro par une sulfatation incomplète de fractions d'oligosaccharides phosphorylés obtenues par hydrolyse ménagée de phosphomannanes extraits de cultures de *Pichia holstii* (Figure 6).<sup>24</sup>

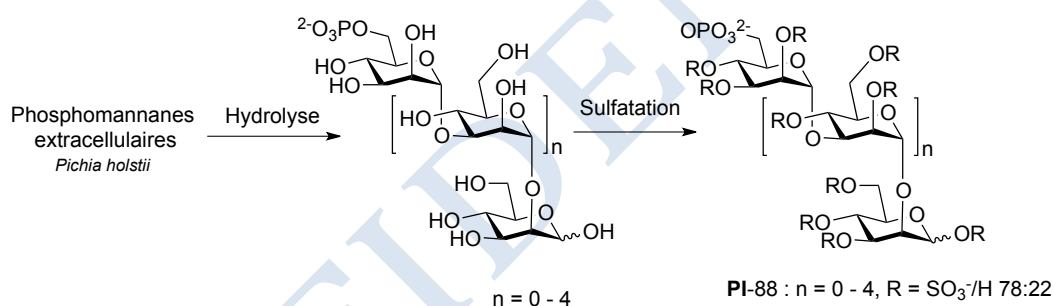


Figure 6. Préparation du PI-88

Le PG545, un oligomaltoside contenant une partie lipophile s'est montré très actif pour inhiber l'héparanase, une endo- $\beta$ -glucuronidase qui dégrade les chaînes d'héparane sulfate. Il est également en phase I comme molécule anti tumorale.<sup>25</sup>

## 2.2. Mimes peptidiques

A côté des composés polyanioniques comportant une structure oligosaccharidique, d'autres composés linéaires polyanioniques peuvent aussi servir comme mimes d'HS/HP. Les peptides sont des

(22) Cochran, S.; Li, C.; Fairweather, J. K.; Kett, W. C.; Coombe, D. R.; Ferro, V. J. *Med. Chem.* **2003**, *46*, 4601-4608.

(23) <https://www.med.stanford.edu/clinicaltrials/trials/NCT00568308>.

(24) Ferro, V.; Li, C.; Fewings, K.; Palermo, M. C.; Linhardt, R. J.; Toida, T. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 139-146.

(25) Ferro, V.; Liu, L.; Johnstone, K. D.; Wimmer, N.; Karoli, T.; Handley, P.; Rowley, J.; Dredge, K.; Li, C. P.; Hammond, E.; Davis, K.; Sarimaa, L.; Harenberg, J.; Bytheway, I. J. *Med. Chem.* **2012**, *55*, 3804-3813.

substances naturelles et peuvent facilement être synthétisés de façon à avoir une longueur de chaîne suffisante pour mimer le domaine d'interaction d'HS/HP. De plus, ils ont de nombreux groupements qui sont faciles à fonctionnaliser. Quelques exemples seront donnés ici.

Meldal et ses collègues ont préparé des peptides sulfatés et testé leurs interactions avec FGF-1.<sup>26</sup> Un décapeptide peut se lier aux FGFs (Figure 7) et peut inhiber la fixation de cette protéine à l'héparine à l'échelle du micromolaire.

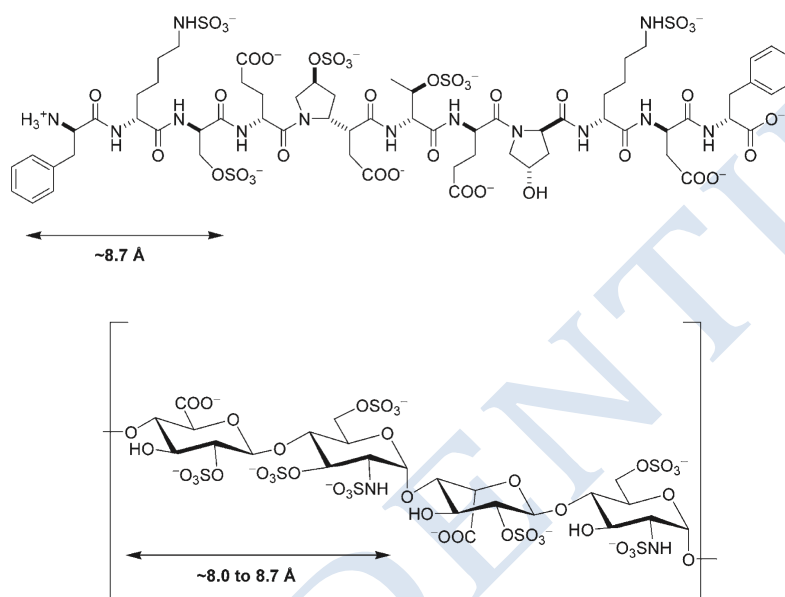


Figure 7. Différence de taille entre un fragment tetrasaccharidique d'HP et un mème peptidique<sup>26</sup>

L'équipe de Kiick a essayé de contrôler l'affinité et la sélectivité de mimes peptidiques d'HP en changeant les séquences des peptides.<sup>27</sup> Trois peptides ont été préparés et sont présentés dans le Tableau 1. Dans les séquences, la sérine, l'acide aspartique et la tyrosine sulfatés sont choisis pour mimer le groupement hydroxyde, carboxylate et sulfate des oligosaccharides. L'affinité des peptides sulfatés sont testés vis à vis de plusieurs protéines reconnaissant l'HP (ATIII, HIP, PF4, VEGF165). La Figure 8 montre les résultats mesurés par résonance plasmonique de surface (SPR). Parmi les trois peptides, le SP<sub>a</sub>, qui comporte 12 acides aminés, a la meilleure affinité avec les quatre protéines. Des peptides sulfatés avec une séquence courte peuvent bien mimer l'HP. En changeant les séquences des peptides, il est possible de changer l'affinité avec les différentes protéines et donc de gagner en spécificité.

(26) Vázquez-Campos, S.; St. Hilaire, P. M.; Damgaard, D.; Meldal, M. *QSAR & Combinatorial Science* **2005**, *24*, 923-942.

(27) Kim, S. H.; Kiick, K. L. *Peptides* **2007**, *28*, 2125-2136.

Peptide	Séquence
SP <sub>a</sub>	NH <sub>2</sub> -GGGG-SY <sub>SO<sub>3</sub></sub> DY <sub>SO<sub>3</sub></sub> GGGG-OH
SP <sub>b</sub>	NH <sub>2</sub> -GGGG-SY <sub>SO<sub>3</sub></sub> DY <sub>SO<sub>3</sub></sub> SY <sub>SO<sub>3</sub></sub> DY <sub>SO<sub>3</sub></sub> G-OH
SP <sub>c</sub>	NH <sub>2</sub> -GGGG-Y <sub>SO<sub>3</sub></sub> Y <sub>SO<sub>3</sub></sub> GGY <sub>SO<sub>3</sub></sub> DY <sub>SO<sub>3</sub></sub> G-OH

Tableau 1. Les peptides sulfatés testés par l'équipe de Kiick

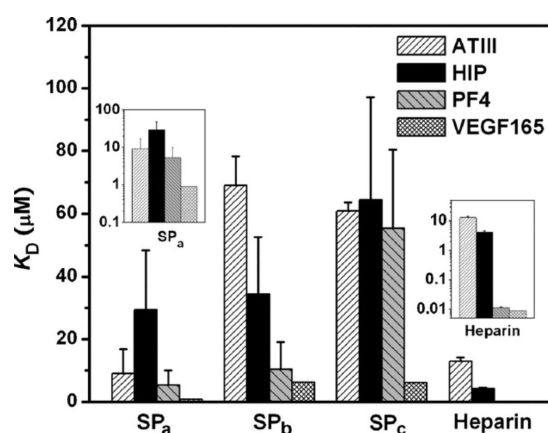


Figure 8. Les constantes de dissociation des mimes peptidiques et des protéines reconnaissant l'HP, mesurées par SPR<sup>27</sup>

En collaboration avec l'équipe du Dr H. Lortat-Jacob (IBS, Grenoble) et l'équipe du Dr F. Baleux (Institut Pasteur, Paris), notre laboratoire a préparé un glycoconjugué constitué d'un dodécasaccharide, couplé avec un mime fonctionnel de CD4 (mini CD4).<sup>28</sup> CD4 joue un rôle très important dans l'entrée du VIH. La glycoprotéine gp120, une protéine sur le VIH, se lie au récepteur CD4 dans une étape initiale.<sup>29</sup> Cela induit des changements conformationnels et permet l'entrée du VIH dans la cellule. En ajoutant ce glycoconjugué, l'interaction entre gp120 et CD4 est bloquée donc l'entrée du VIH est inhibée (Figure 9). La capacité d'inhiber l'entrée du VIH a été testée sur plusieurs souches et comparée à l'action de l'AZT, un médicament pour le traitement de l'infection par le VIH. Un autre type de composé a été ensuite préparé en remplaçant le dodécasaccharide par un décapeptide polyanionique. Il n'a pas perdu sa capacité d'inhiber l'entrée du VIH et une diminution des ED<sub>50</sub> pour les deux souches

(28) Baleux, F.; Loureiro-Morais, L.; Hersant, Y.; Clayette, P.; Arenzana-Seisdedos, F.; Bonnaffe, D.; Lortat-Jacob, H. *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 743-748.

(29) Dalgleish, A. G.; Beverley, P. C. L.; Clapham, P. R.; Crawford, D. H.; Greaves, M. F.; Weiss, R. A. *Nature* **1984**, *312*, 763-767.

par rapport au glycoconjugué a été observée (Figure 10).<sup>30</sup>

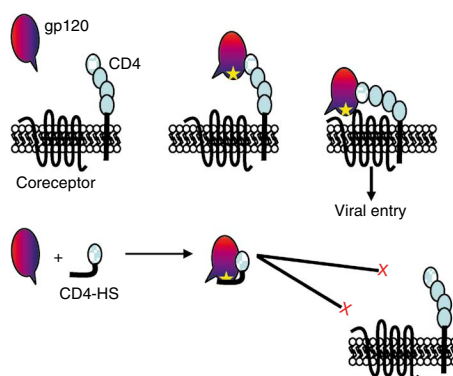


Figure 9. Le principe de l'entrée du VIH et l'inhibition par CD4-HS<sup>29</sup>

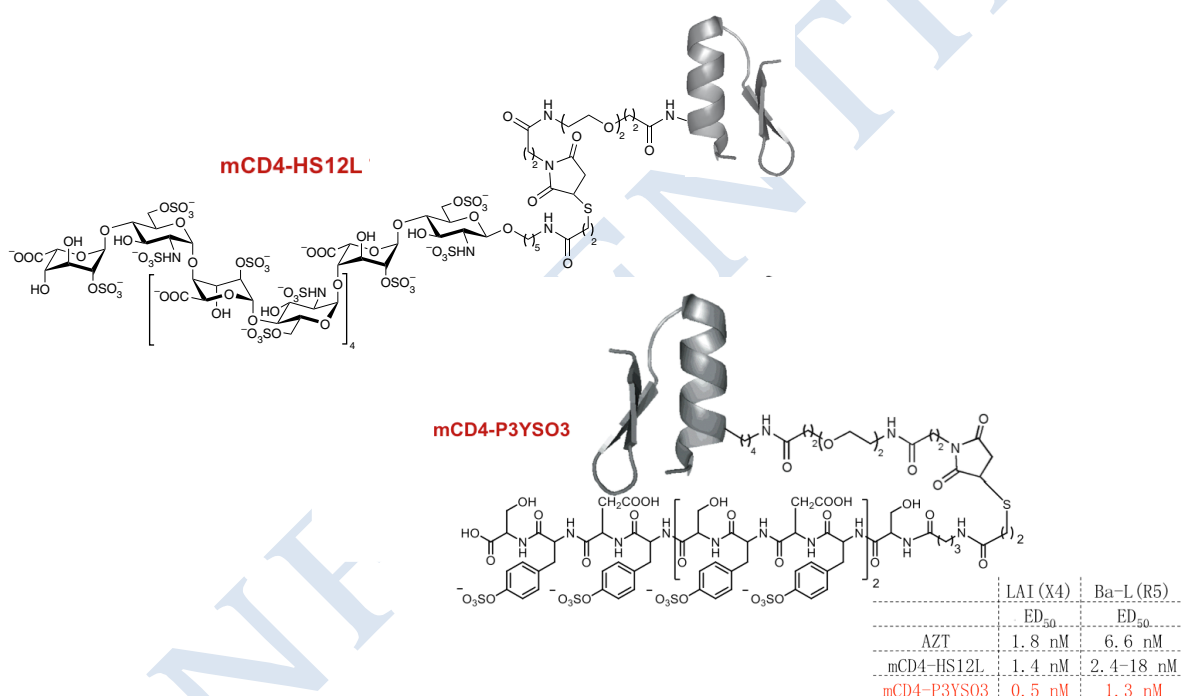


Figure 10. Le glycoconjugué CD4-HS et son mîme peptidique

### 2.3. Polymères synthétiques

L'interaction entre un sucre et une protéine est souvent très faible, par exemple, la constante de dissociation  $K_d \approx 10^{-3}$  à  $10^{-4}$  M.<sup>31</sup> Mais les interactions multivalentes entre sucre et protéine augmentent les affinités. Cet effet s'appelle « carbohydrate clustering effect ». <sup>32</sup> Les polymères peuvent être utilisés comme mîmes des oligosaccharides pour renforcer les interactions

(30) Connell, Bridgette J.; Baleux, F.; Coic, Y.-M.; Clayette, P.; Bonnaffé, D.; Lortat-Jacob, H. *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 131-139.

(31) Bertozzi, C. R.; Kiessling, Laura, L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.

(32) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.

sucres-protéines à cause de cet effet.<sup>33</sup> Plusieurs équipes ont cherché à mimer les chaînes d'HS/HP avec des polymères portant des sucres.

Chaikof et ses collègues utilisent des polymères modifiés par des disaccharides simples (lactose et lactose-persulfaté, présentés dans Figure 11) pour mimer l'HP.<sup>34</sup> Ils ont préparé 3 types de polymères : le premier comporte le monomère lactose persulfaté, le deuxième est un copolymère statistique avec le monomère lactose et l'acrylamide, le dernier est aussi un copolymère statistique mais avec le monomère lactose persulfaté et l'acrylamide. Dans la chaîne, l'acrylamide est un monomère non chargé qui va réguler la densité chargée du polymère. Les polymères non-sulfatés, avec différentes tailles et différents pourcentages d'acrylamide, n'ont pas d'activité anticoagulante mais les polymères sulfatés ont de bonne activité anticoagulante. Les copolymères avec l'acrylamide comme diluant ont plus d'activité anticoagulant que les polymères homogènes. Mais lorsque le pourcentage d'acrylamide augmente par rapport à celui du lactose sulfaté, l'activité anticoagulante diminue. On peut donc mimer l'HP avec des constructions intégrant un disaccharide très simple.

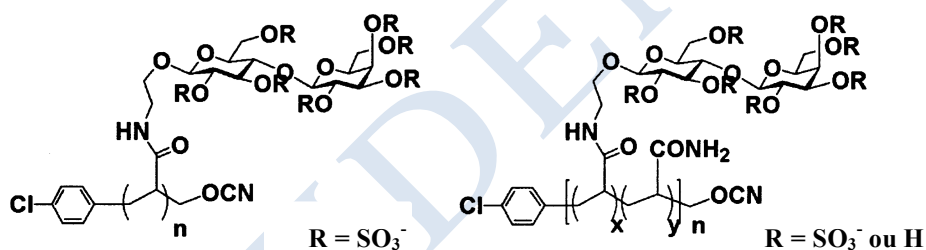


Figure 11. Polymères modifiés par du lactose et/ou lactose persulfaté<sup>34</sup>

L'HP est non seulement connu par sa capacité comme anticoagulant mais aussi comme anti-inflammatoire. Mais il n'est pas recommandé comme agent anti-inflammatoire dans la pratique clinique à cause de ses effets anticoagulants.<sup>35</sup> Pour pouvoir préparer des composés anti-inflammatoires mais pas anticoagulants seulement avec des disaccharides simples, Hsieh-Wilson et ses collègues ont utilisé des disaccharides d'HS.<sup>36</sup> Quatre polymères sont préparés avec différents disaccharides qui ont tous un résidu  $\alpha$ -L-iduronique et un résidu  $\alpha$ -D-glucosamine mais avec des groupements sulfates à différentes positions (Figure 12). La capacité de chaque glycopolymère à empêcher la chemokine RANTES (CCL5) à se lier à l'héparine a été mesurée et il a été montré que c'est le polymère **H**, dans lequel était inclus un composé trisulfaté, qui inhibe le plus cette interaction

(33) Kiessling, L. L.; Grim, J. C. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4476-4491.

(34) Sun, X.-L.; Grande, D.; Baskaran, S.; Hanson, S. R.; Chaikof, E. L. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1065-1070.

(35) Young, E. *Thrombosis Research*, *122*, 743-752.

(36) Sheng, G. J.; Oh, Y. I.; Chang, S.-K.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10898-10901.



quoiqu'avec une affinité moindre qu'une chaîne d'héparine de même longueur. Cela nous a montré qu'avec ce système, nous avons la possibilité de mimer l'interaction HP/protéine. Ils ont ensuite essayé de tester ces polymères pour leurs activités anticoagulantes. Ils ont observé qu'aucun polymère n'a cette activité. L'ajout d'un groupement sulfate sur la position 3 de l'unité glucosamine du polymère **H** permet d'avoir les activités anticoagulantes.<sup>37</sup> Ils ont montré que ces glycopolymères pouvaient avoir la propriété anti-inflammatoire mais pas la propriété anticoagulante en contrôlant le nombre et la position des groupements sulfate.

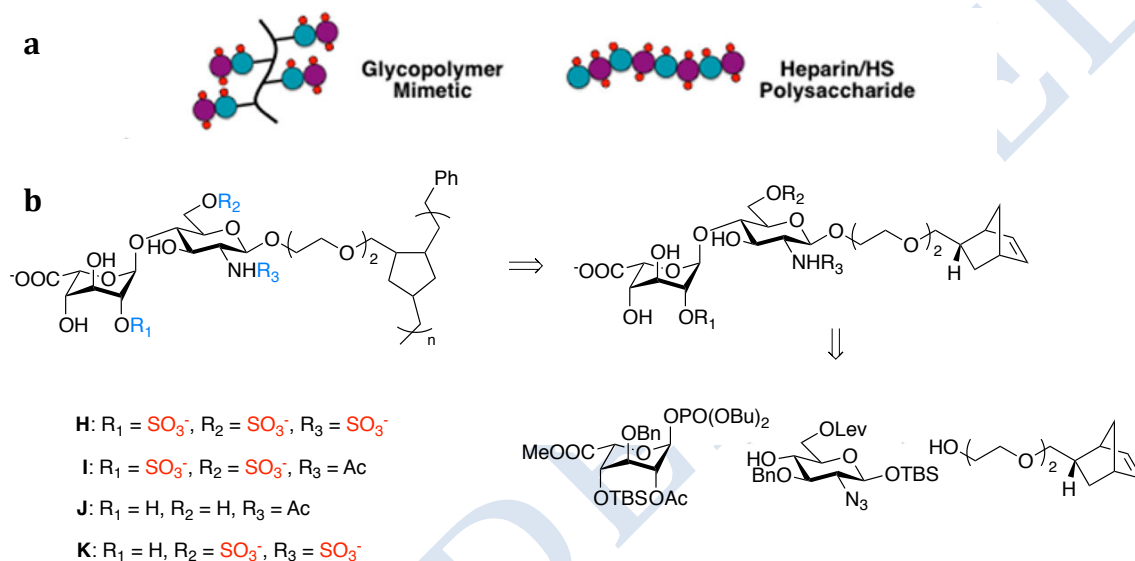


Figure 12. a) Mime d'HS/HP par polymère et b) Rétro-synthèse du polymère<sup>36</sup>

Bien que les polymères soient faciles à synthétiser, leurs propriétés physiques, masses moléculaires et degré de distribution ne sont pas toujours faciles à contrôler. Les dendrimères ont l'avantage d'être des macromolécules mono-disperses avec des structures bien définies. De plus, par rapport au composé linéaire, ils ont une conformation tridimensionnelle rigide, ce qui peut être important pour l'interaction sucre-protéine.<sup>38</sup> Cette conformation peut être bien contrôlée pendant la synthèse. Actuellement, les dendrimères sont populaires pour mimer les sucres. Certaines équipes les ont utilisés pour mimer les chaînes d'HP/HS.

Alban et ses collègues ont préparé des polyglycérols dendritiques avec différents degrés de polymérisation comme mime d'HP.<sup>39</sup> Les composés sont présentés dans la Figure 13. Mais les positions des groupements sulfates et carboxylates ne sont pas claires car ils n'ont pas de moyen de les

(37) Oh, Y. I.; Sheng, G. J.; Chang, S.-K.; Hsieh-Wilson, L. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11796-11799.

(38) Hatano, K.; Matsuoka, K.; Terunuma, D. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4574-4598.

(39) Türk, H.; Haag, R.; Alban, S. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 162-167.

identifier. Le degré de sulfatation et le nombre de groupement carboxylate ont été calculés par analyse élémentaire et titration. La capacité anticoagulante des composés a ensuite été analysée. Les polyglycérols modifiés par les groupements carboxylates et les polyglycérols non modifiés ne modifient pas le temps de coagulation alors que les composés sulfatés ont une influence sur ce temps, mais moins bonne que l'héparine. Le composé qui présente la meilleure activité a une masse moléculaire moyenne de 10500 g/mol. Quand la masse augmente, l'activité anticoagulante diminue peut être à cause de l'encombrement stérique qui peut exister au delà d'une certaine taille.

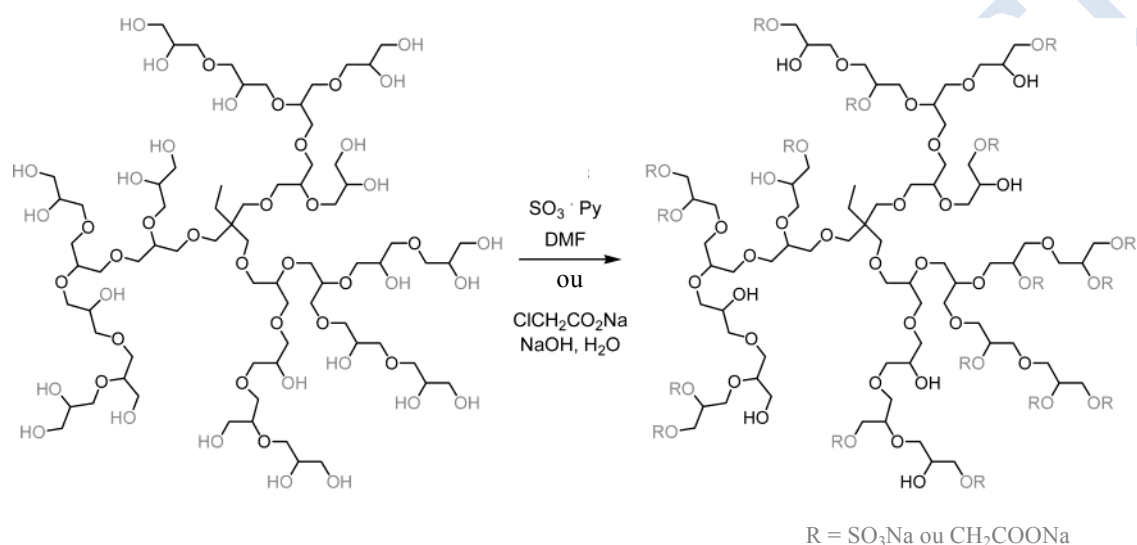


Figure 13. Les polyglycérol dendritiques sulfatés ou substitués par des carboxylates<sup>39</sup>

Le Poly(amidoamine) (PAMAM) est une classe de dendrimère très populaire aujourd'hui. Ce dendrimère est synthétisé par une approche divergente de synthèse progressive couche à couche (Figure 14). L'obtention de dendrimères se fait par une séquence itérative de deux réactions : une addition de type Michael entre l'éthylène diamine et un monomère, le méthacrylate de méthyle suivie par une aminolyse des esters méthyliques avec l'excès d'éthylène diamine.<sup>40</sup>

(40) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym J* **1985**, *17*, 117-132.

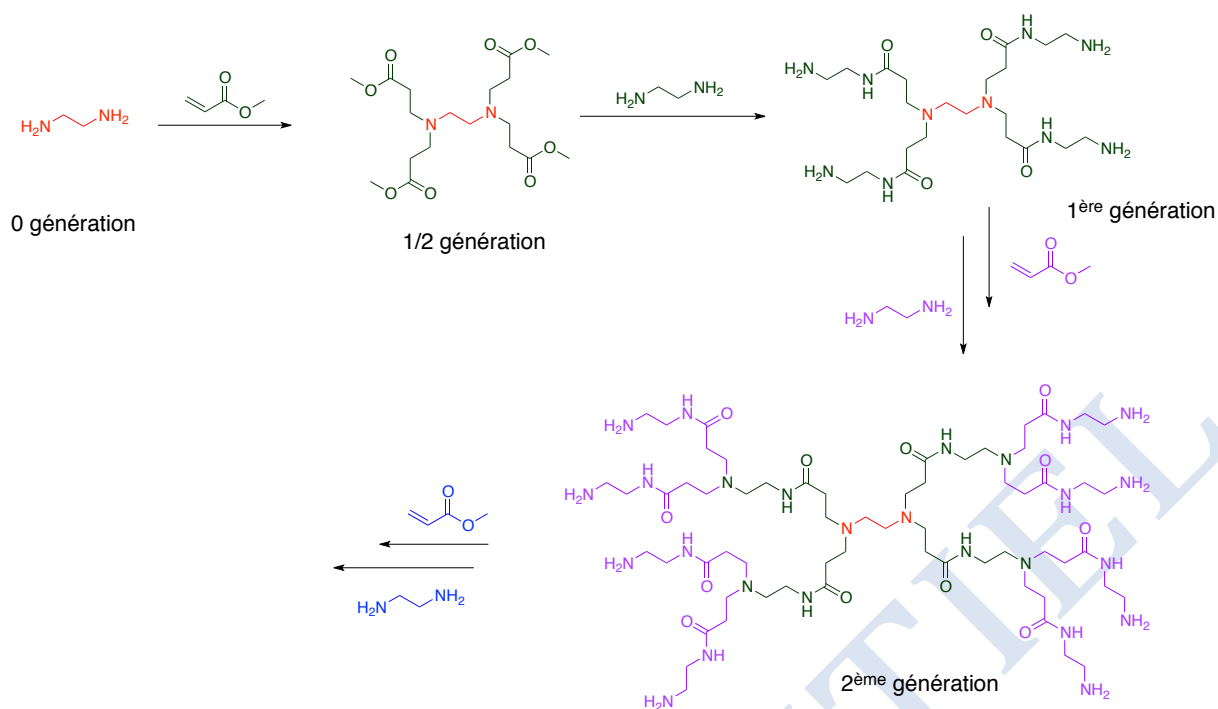


Figure 14. La synthèse divergente de PAMAM<sup>41</sup>

Shaunak et ses collègues ont préparé des dendrimères à base du polyamidoamine (PAMAM), qui a une génération 4.5, couplés avec  $\alpha$ -D-glucosamine ou 6-sulfaté- $\alpha$ -D-glucosamine.<sup>42</sup> Ils ont réussi à inhiber la prolifération des cellules endothéliales par inhibition de FGF-2. Seeberger et ses collègues ont aussi préparé des dendrimères, à base de PAMAM génération 3.5, avec différents fragments d'HP (Figure 15) pour étudier leurs interactions avec FGF-2.<sup>43</sup> Ils avaient par ailleurs montré que FGF-2 avait une bonne affinité avec un fragment hexasaccharidique.<sup>44</sup> Les dendrimères donnent de meilleurs résultats, c'est le dendrimère porteur de l'hexasaccharide qui inhibe le mieux FGF-2 et cela mille fois mieux que la molécule oligosaccharidique seule. Cela signifie que la présentation multivalente des oligosaccharides sur une plateforme appropriée amplifie leur affinité pour les HSBP.

(41) <http://www.dendritech.com/index.html>.

(42) Shaunak, S.; Thomas, S.; Gianasi, E.; Godwin, A.; Jones, E.; Teo, I.; Mireskandari, K.; Luthert, P.; Duncan, R.; Patterson, S.; Khaw, P.; Brocchini, S. *Nat Biotech* **2004**, *22*, 977-984.

(43) de Paz, J. L.; Noti, C.; Böhm, F.; Werner, S.; Seeberger, P. H. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 879-887.

(44) Noti, C.; de Paz, J. L.; Polito, L.; Seeberger, P. H. *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12*, 8664-8686.

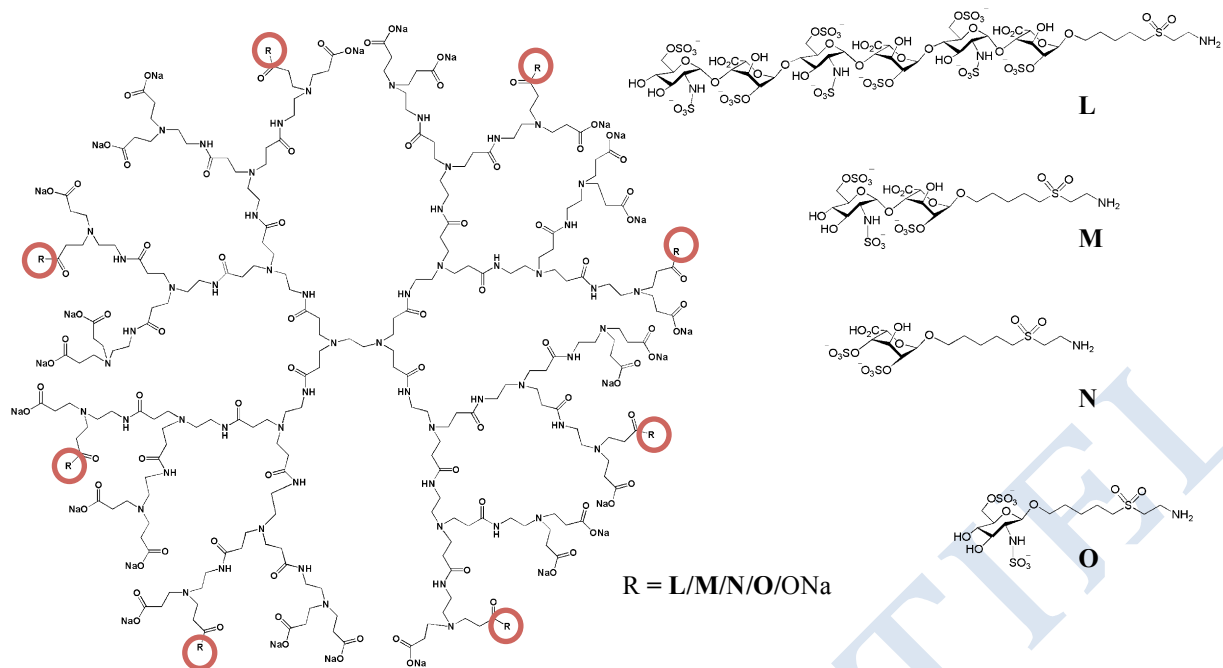


Figure 15. Les glycodendrimères et les fragments d'HP préparés<sup>43</sup>

Cependant ce type de dendrimères a un point faible, ils conduisent souvent à un mélange de composés car toutes les positions ne sont pas glycosylées. Le groupe de Turnbull a préparé des mimes tétravalents qu'ils ont couplés avec des fragments d'HS allant du mono au tétrasaccharide (Figure 16).<sup>45</sup> Le composé porteur du tétrasaccharide, GlcNAc6S-GlcA2S-GlcNAc6S-GlcA2S, et son dérivé *N*-sulfaté ont les meilleures capacités d'inhibition vis à vis de la bêta secrétase 1 (BACE-1), une enzyme impliquée dans la coupure de la protéine précurseur de l'amyloïde entraînant la formation de peptides responsables des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. Ce groupe avait auparavant synthétisé une chimiothèque de fragments d'HS, allant de l'hexa au dodécasaccharide, et testé sa capacité à inhiber BACE-1.<sup>46</sup> Le meilleur composé pour inhiber BACE-1, un dodécasaccharide, a une capacité d'inhibition similaire aux meilleurs tétramères. Mais les tétramères sont plus faciles à préparer et moins coûteux.

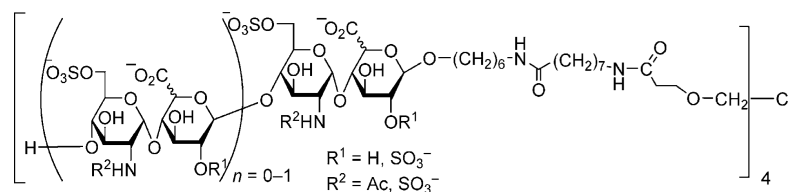


Figure 16. Mime d'HS par les tétramères<sup>45</sup>

(45) Tyler, P. C.; Guimond, S. E.; Turnbull, J. E.; Zubkova, O. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2718-2723.

(46) Schwörer, R.; Zubkova, O. V.; Turnbull, J. E.; Tyler, P. C. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 6817-6823.

## 2.4. Une surface combinatoire comme mime d'HS/HP

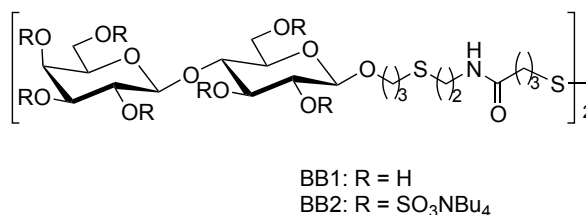


Figure 17. Les deux composés préparés pour construire les surfaces combinatoires

La plupart des équipes cherchent à mimer les chaînes d'HS/ HP. En collaboration avec Y. Hou et T. Livache au CEA à Grenoble, le Pr D. Bonnaffé et son équipe ont cherché à introduire une autre approche en recherchant à mimer non plus les composés mais les propriétés biologiques de ces molécules.<sup>47</sup> Par auto-assemblage de deux molécules de base, ici les disaccharides lactose et lactose sulfaté (Figure 17), appelées BB1 et BB2, en proportions contrôlées, il a été permis de générer des surfaces permettant de différencier certaines HSBPs. Ces deux molécules ont un groupe dithiol permettant leur auto-assemblage sur des surfaces d'or. Elles sont toutes les deux hydrophiles ; néanmoins, BB1 possède une charge neutre tandis que BB2 est négativement chargée. Onze proportions contrôlées ont été réalisées pour les tests. Les ratios [BB1]/([BB1]+[BB2]) utilisés sont 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100% de BB1. Une fois les mélanges effectués, les solutions sont déposées sous forme de plots circulaires sur un prisme de verre recouvert d'une fine couche d'or d'environ 45 nm, à l'aide d'un appareil piézoélectrique d'éjection de nanovolumes. L'auto-assemblage des BBs se déroule au cours d'une nuit entière, après laquelle la puce ainsi réalisée est prête à être utilisée.

Quatre protéines différents ont été testées CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\gamma$ , IFN $\gamma$  et *Erythrina cristagalli* lectine (ECL) (Figure 18). ECL est une lectine qui reconnaît spécifiquement le lactose neutre et qui joue un rôle de référence, quand les trois autres sont des protéines qui reconnaissent les chaînes d'HS.

(47) Hou, Y.; Genua, M.; Tada Batista, D.; Calemczuk, R.; Buhot, A.; Fornarelli, P.; Koubachi, J.; Bonnaffé, D.; Saesen, E.; Laguri, C.; Lortat-Jacob, H.; Livache, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10394-10398.

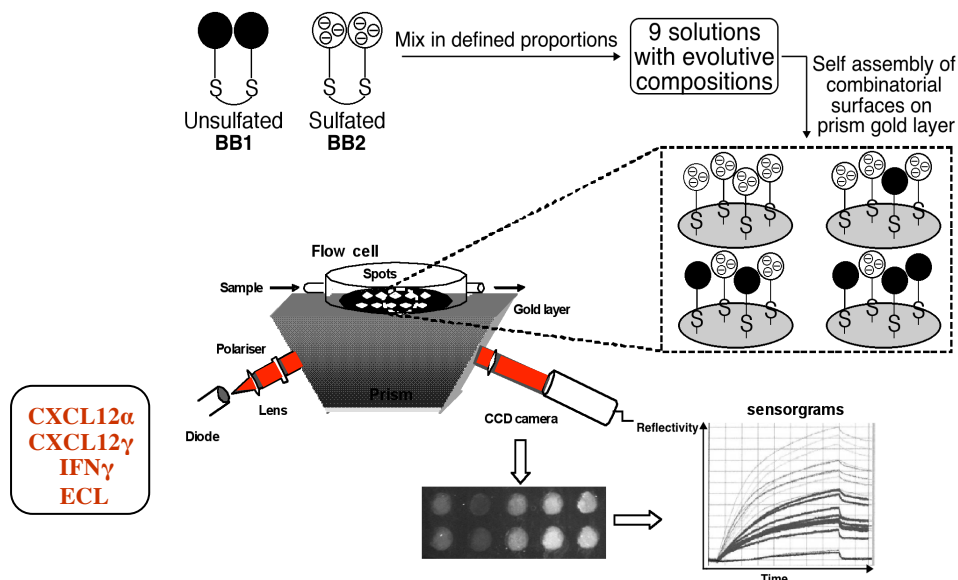


Figure 18. Les surfaces d'or combinatoires modifiées par des produits neutres ou sulfatés et leurs interactions avec des protéines détectées par SPRi

La détection de l'affinité est effectuée par technique de « Surface Plasmon Resonance imaging » (SPRi) qui permet de suivre en temps réel tout changement d'indice de réfraction ayant lieu près de la surface d'or. Cela veut dire qu'une perturbation provoquée par l'attachement de molécules sur l'un des mélanges est détectable en temps réel et sans besoin de marquage. Grâce à une caméra CCD, il est possible de suivre l'augmentation locale de masse à la surface due aux interactions entre les protéines et les mélanges de disaccharides *via* l'augmentation de l'intensité lumineuse réfléchie qu'elle provoque ; de telle manière que l'image globale du prisme permet de voir quels mélanges sont très réactifs et lesquels ne le sont pas. On obtient pour chaque plot, l'évolution du changement de réflectivité en fonction du temps, alors appelée «sensorgramme». Dans la Figure 19, est représenté un sensorgramme classique. Dans une première étape, les ligands sont accrochés sur la surface d'or et du tampon est injecté dans le système pour obtenir la ligne de base. Quand l'analyte, par exemple une protéine, est injecté, il y a fixation et donc changement de l'indice de réfractométrie. A la fin de l'injection de l'analyte, il y a dissociation entre le ligand et la protéine. Puis, la surface est régénérée en décrochant tout l'analyte pour pouvoir être réutilisée. Cette méthode d'analyse permet de calculer les vitesses d'association et de dissociation et d'en déduire les constantes d'affinité caractéristiques de l'interaction entre le ligand et l'analyte.

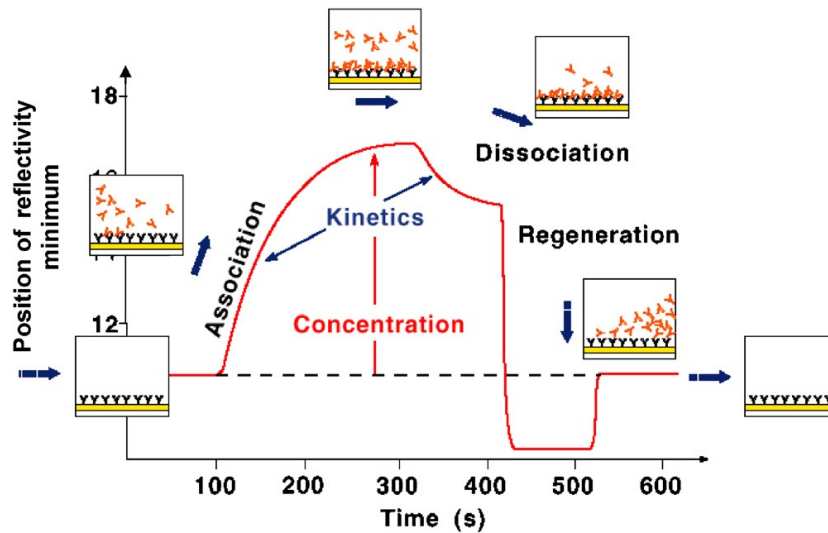


Figure 19. Schéma classique d'un sensorgramme<sup>48</sup>

Le fait que les mélanges des disaccharides BB1 et BB2 aient des compositions différentes mais que la différence entre deux mélanges successifs soit très faible a permis une représentation continue des données ; un axe représentant l'incrément de BB1%, un autre représentant le temps, et l'axe vertical correspondant à la réflectivité mesurée par plot. Ce type de représentation 3D (Figure 20) est appelé image d'évolution continue (CEL – *Continuous Evolution Landscape*) et est caractéristique de l'échantillon analysé.

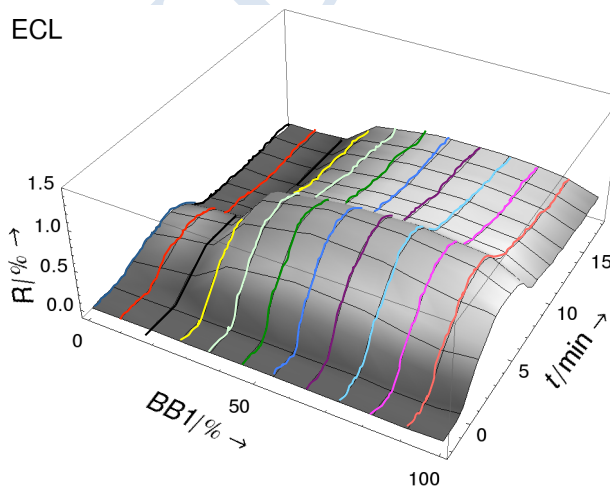


Figure 20. Image d'évolution continue pour l'étude d'interactions entre les mélanges disaccharidiques et ECL<sup>47</sup>

Une coupe de ce graphe à un temps donné permet d'obtenir un profil d'évolution continue (CEP - *Continuous Evolution Profile*) 2D, qui est un moyen facile pour évaluer l'affinité entre les mélanges

(48) Campbell, C. T.; Kim, G. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2380-2392.

disaccharidiques et les protéines (Figure 21).

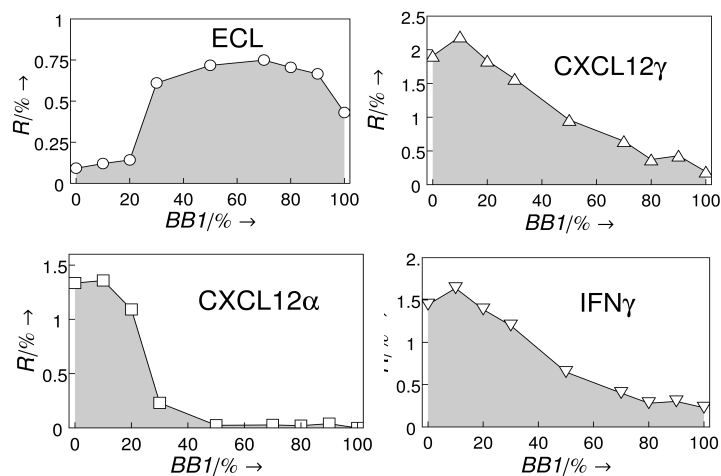


Figure 21. Profils d'évolution continue pour différentes protéines à la fin de l'injection<sup>47</sup>

Parmi les quatre protéines testées, la lectine ECL a un profil clairement différent des autres. Le maximum est atteint à 70% de BB1, ce qui est normal étant donné que ECL est une lectine spécifique du lactose. Par contre, les trois autres protéines, qui sont des HSBPs, montrent un maximum autour de 10 % de BB1. En considérant les profils, on note clairement une différence entre CXCL12 $\alpha$  et CXCL12 $\gamma$ /IFN $\gamma$ . Par contre, les conditions utilisées ici, ne suffisent pas à différencier CXCL12 $\gamma$  de l'IFN $\gamma$ .

Il y a d'autres façons de construire des auto-assemblages avec des molécules biologiques. Une des plus utilisées consiste à greffer les molécules sur une surface métallique pour former des bionanoparticules, l'autre est de créer des systèmes ressemblant aux membranes en utilisant des molécules amphiphiles qui vont s'auto-assembler pour former des micelles, des liposomes ou autres assemblages supramoléculaires.

## 2.5. Les nanoparticules métalliques

Un des plus grands challenges des nanomatériaux est leur application en biomédecine. Les nanomatériaux trouvent leur place dans ce domaine car, comme on peut le voir dans la Figure 22, leur taille est proche de celles des protéines. Donc utiliser les nanoparticules pour mimer les biomolécules semble très intéressant.<sup>49</sup> Dans le domaine des sucres, c'est le groupe de Penadés qui fut le premier au début des années 2000 à préparer des nanoparticules d'or glycosylées et donc appelées

(49) de la Fuente, J. M.; Penadés, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2006**, *1760*, 636-651.



glyconanoparticules.<sup>50,51,52</sup> Les glyconanoparticules ont été généralement préparées pour mieux comprendre les interactions sucre-sucre ou sucre-protéine.<sup>53</sup> Ce sont de bons modèles pour une présentation multivalente des sucres grâce à leur structure 3D.

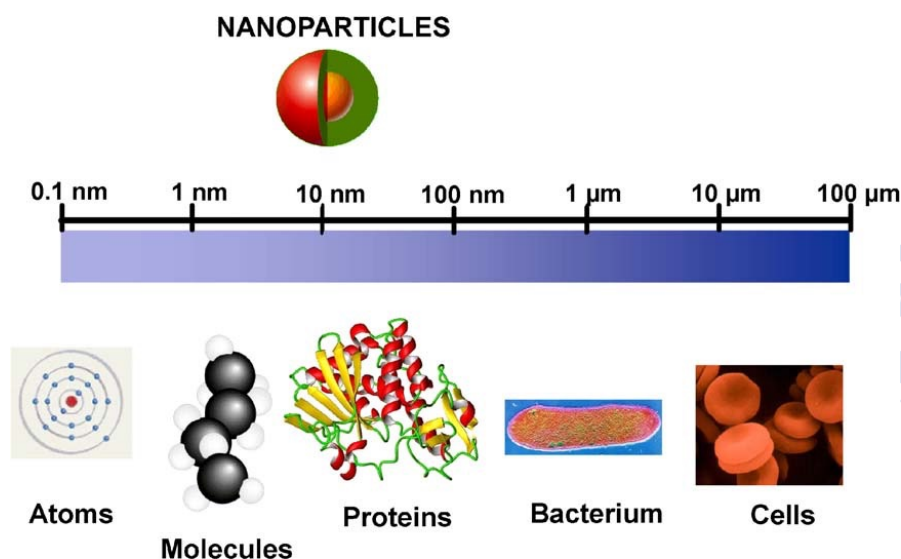


Figure 22. Comparaison entre la taille des nanoparticules et celle des objets biologiques<sup>49</sup>

Une approche, dite « directe », a été utilisée par le groupe de Penadés pour préparer des glyconanoparticules : cette méthode, développée par Brust et ses collègues pour synthétiser des nanoparticules d'or et les fonctionnaliser par auto-assemblage de thiols sur la surface d'or est très simple.<sup>54</sup> Dans cette méthode, les ions  $\text{Au}^{3+}$  sont transportés d'une phase aqueuse à une phase organique (toluène) à l'aide d'un catalyseur de transfert de phase (bromure de tétraoctylammonium), puis réduits par  $\text{NaBH}_4$  en présence d'un thiol ou d'un disulfure.

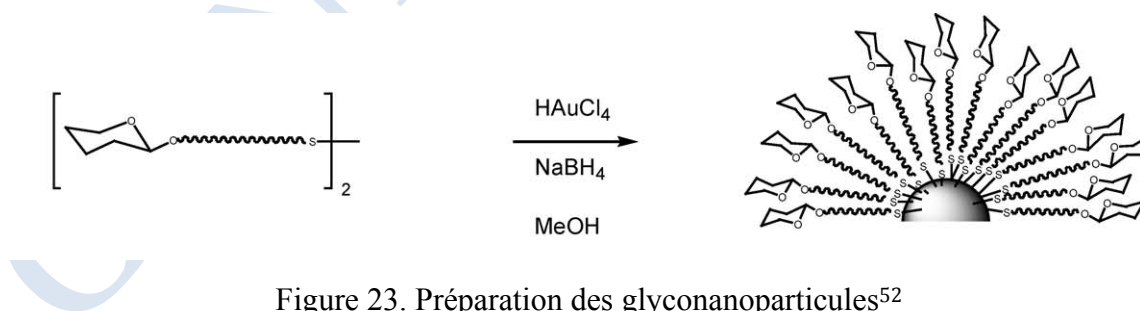


Figure 23. Préparation des glyconanoparticules<sup>52</sup>

(50) de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2257-2261.

(51) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernández, A.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909-1921.

(52) de la Fuente, J.; Penadés, S. *Glycoconj J* **2004**, *21*, 149-163.

(53) Rojo, J.; Díaz, V.; de la Fuente, J. M.; Segura, I.; Barrientos, A. G.; Riese, H. H.; Bernad, A.; Penadés, S. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 291-297.

(54) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801-802.

Pour préparer les premières glyconanoparticules solubles dans l'eau, le groupe de Penadés a remplacé le toluène par du méthanol (Figure 23). Utilisant cette méthode, ils ont réalisé la synthèse de différentes nanoparticules fonctionnalisées avec divers oligosaccharides comme : le tétrasaccharide  $Le^y$  ([Fuc- $\alpha$ -1-2] Gal $\beta$ 1-4[Fuc- $\alpha$ -1-3]-GlcNAc- $\beta$ ),<sup>55</sup> le trisaccharide  $Le^x$  (Gal- $\beta$ )1-4[Fuc- $\alpha$ -1-2]-GlcNAc- $\beta$ ),<sup>50</sup> les disaccharides lactose (Gal- $\beta$ -1-4-Glc- $\beta$ ) and maltose (Glc- $\alpha$ -1-4-Glc- $\beta$ ) ou le simple glucose.<sup>51</sup>

Ils ont aussi utilisé différents bras hydrophobes ou hydrophiles pour lier les sucres à la surface d'or. Les glyconanoparticules préparées ainsi sont solubles dans l'eau, stables en solution pendant plusieurs années et surtout petites (cœur d'or de moins de 2 nm). Cette petite taille permet notamment de les caractériser par RMN (au cours de ma thèse, notre consortium a en effet pu démontrer que la RMN de nanoparticules de taille plus importante > 10 nm conduisait à des signaux très larges et donc une très faible sensibilité).<sup>56</sup> Cette méthode permet également de réaliser en une étape des nanoparticules multifonctionnelles en mélangeant différents composés (sucres, peptides, marqueurs de fluorescence etc...). La densité de ligands sur la surface peut être également contrôlée. Par exemple, des nanoparticules avec un pourcentage de lactose variant de 5 à 30 % en surface ont été obtenues (Figure 24).

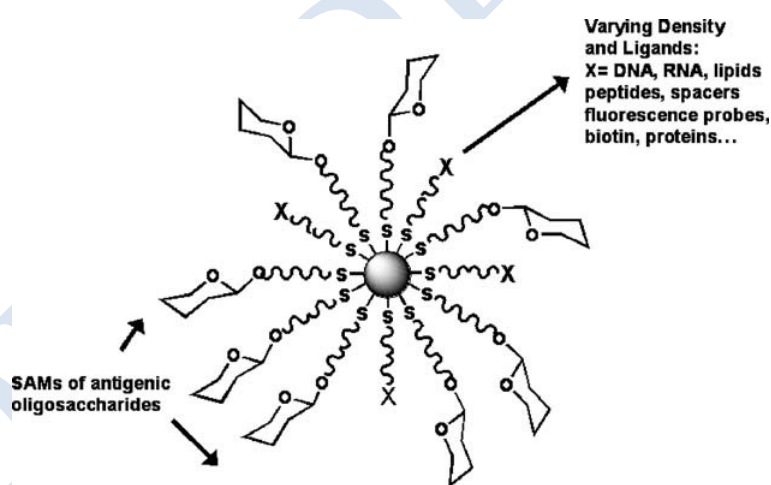


Figure 24. Quelques exemples des glyconanoparticules comportent différents ligands<sup>49</sup>

Ce groupe a également utilisé des glyconanoparticules fonctionnalisées avec des oligomannosides et des acides carboxyliques pour générer un vaccin contre le VIH. Ils ont montré que ces nanoparticules pouvaient générer une réponse immunitaire sans les protéines habituellement utilisées.<sup>57,58</sup>

(55) de Paz, J.-L.; Ojeda, R.; Barrientos, Á. G.; Penadés, S.; Martín-Lomas, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 149-158.

(56) Suzun, C. *résultats non publiés*.

(57) Martínez-Ávila, O.; Bedoya, L. M.; Marradi, M.; Clavel, C.; Alcami, J.; Penadés, S. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1806-1809.

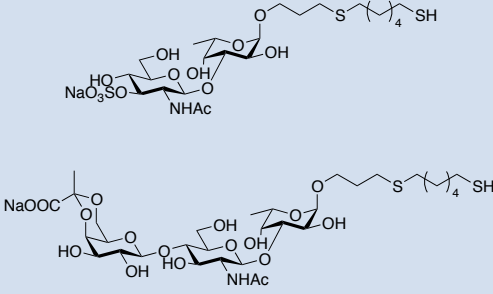
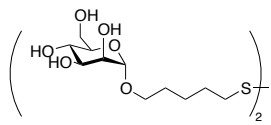
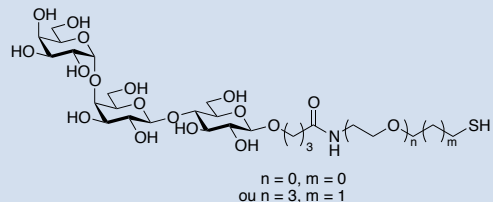
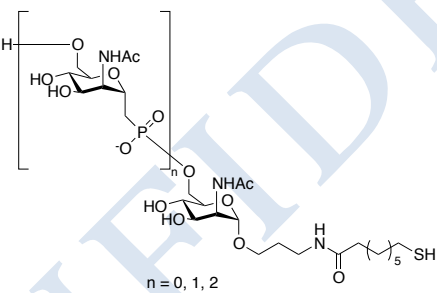
Glycoconjugué utilisé	Application	Références	
Disaccharide sulfaté et trisaccharide comportant un acétal d'acide pyruvique vient de l'éponge marine, <i>Microciona</i> <i>Prolifera</i>		Pour étudier les interactions sucre-sucre (avec des sucres extraits de <i>Microciona Prolifera</i> )	Carvalho de Souza <i>et al.</i> <small>错误! 未定义书签。</small> Santos <i>et al.</i> <small>错误! 未定义书签。</small>
Mannose		Reconnaissance de <i>Escherichia coli</i>	Lin <i>et al.</i> <small>错误! 未定义书签。</small>
Globotriose	 <p style="text-align: center;"> <math>n = 0, m = 0</math>  ou <math>n = 3, m = 1</math> </p>	Détection de la vérotoxine I	Chien <i>et al.</i> <small>错误! 未定义书签。</small>
Mannosaminides analogues des antigènes du type A <i>Neisseria</i> <i>Meningitidis</i>	 <p style="text-align: center;"> <math>n = 0, 1, 2</math> </p>	Fixation sur les Anticorps produits par <i>Neisseria Meningitidis</i>	Manca <i>et al.</i> <small>错误! 未定义书签。</small>

Tableau 2. Exemples de sucres greffés sur des glyconanoparticules d'or et utilisations

D'autres exemples de glyconanoparticules ont été préparées et utilisées dans différentes études (Tableau 2). Des nanoparticules fonctionnalisées par un disaccharide sulfaté ou un trisaccharide comportant un acétal d'acide pyruvique, tous deux extraits de l'éponge marine *Microciona Prolifera*, ont permis d'étudier les interactions sucre-sucre.<sup>59,60,61</sup> Le mannose a, quand à lui, été utilisé pour des

(58) Gianvincenzo, P. D.; Calvo, J.; Perez, S.; Álvarez, A.; Bedoya, L. M.; Alcamí, J.; Penadés, S. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 755-765.

(59) Carvalho de Souza, A.; Halkes, K. M.; Meeldijk, J. D.; Verkleij, A. J.; Vliegthart, J. F. G.; Kamerling, J. P. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 828-831.

(60) Carvalho de Souza, A.; Ganchev, D.; Snel, M. E.; van der Eerden, J. J. M.; Vliegthart, J. G.; Kamerling, J. *Glycoconj J* **2009**, *26*, 457-465.

(61) Santos, J. I.; Carvalho de Souza, A.; Cañada, F. J.; Martín-Santamaría, S.; Kamerling, J. P.; Jiménez-Barbero, J. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 511-519.

études de reconnaissance d'*Escherichia coli*.<sup>62</sup> Le trisaccharide globotriose, a été greffé puis utilisé pour la détection de la vérotoxine I, une toxine produite par *Escherichia coli*.<sup>63</sup> Enfin, des mannosaminides, analogues des antigènes du type A de *Neisseria Meningitidis*, ont été utilisés pour fixer les anticorps produits par ce pathogène.

Même s'il y a beaucoup d'exemples de glyconanoparticules d'or, peu de choses à notre connaissance ont été réalisées pour mimer des chaînes d'HS/HP. Un exemple est réalisé par l'équipe de Penadés.<sup>64</sup> Comme présenté dans la Figure 25, un composé sulfaté a été synthétisé puis auto-assemblé sur les surfaces de nanoparticules d'or en mélange avec un composé dérivé de glucose, qui joue le rôle de diluant, en différents pourcentages. Ces nanoparticules d'or anioniques sont là pour mimer l'HS sur les surfaces des cellules et réagir avec la boucle V3 de la gp120 et empêcher l'entrée du VIH dans la cellule. Le pourcentage de sulfate et la taille des nanoparticules sont des points importants pour cette inhibition. Ils ont montré que les nanoparticules qui ont 2 nm avec 50% de sulfate sont les meilleures.

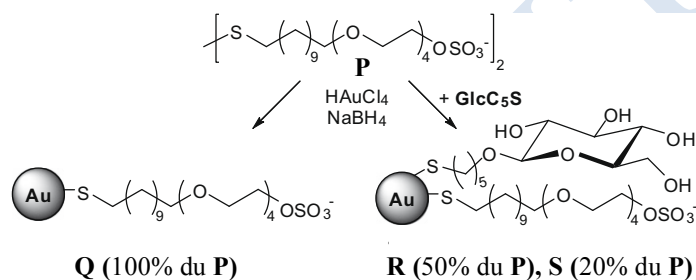


Figure 25. Des nanoparticules d'or sulfatées possèdent une activité anti-VIH<sup>65</sup>

L'équipe de Sarid a aussi utilisé des chaînes sulfatées pour fonctionnaliser les nanoparticules comme mimes d'HS. Ils ont préparé des nanoparticules d'or<sup>65</sup> et d'argent<sup>66</sup> recouvertes avec du 2-mercaptoéthane sulfonate afin d'inhiber l'entrée du virus de l'Herpès (HSV-1), comme présenté dans la Figure 26. Le virus de l'Herpès (HSV-1) est un agent pathogène, responsable d'une infection très contagieuse, courante et endémique dans le monde entier. Elle dure toute la vie et il n'y a pas de traitement curatif, bien qu'on puisse soulager les symptômes. Il est connu que le virus se lie aux chaînes d'HS surtout celles qui sont 3-O-sulfatées pour pénétrer dans les cellules.<sup>67</sup> L'équipe de Sarid a montré que l'HSV-1 est complètement bloqué en présence de 400 µg/mL de nanoparticules d'argent

(62) Lin, C.-C.; Yeh, Y.-C.; Yang, C.-Y.; Chen, C.-L.; Chen, G.-F.; Chen, C.-C.; Wu, Y.-C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3508-3509.

(63) Chien, Y.-Y.; Jan, M.-D.; Adak, A. K.; Tzeng, H.-C.; Lin, Y.-P.; Chen, Y.-J.; Wang, K.-T.; Chen, C.-T.; Chen, C.-C.; Lin, C.-C. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1100-1109.

(64) Di Gianvincenzo, P.; Marradi, M.; Martínez-Ávila, O. M.; Bedoya, L. M.; Alcamí, J.; Penadés, S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 2718-2721.

(65) Baram-Pinto, D.; Shukla, S.; Gedanken, A.; Sarid, R. *Small* **2010**, *6*, 1044-1050.

(66) Baram-Pinto, D.; Shukla, S.; Perkas, N.; Gedanken, A.; Sarid, R. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1497-1502.

(67) Reske, A.; Pollara, G.; Krummenacher, C.; Chain, B. M.; Katz, D. R. *Reviews in Medical Virology* **2007**, *17*, 205-215.

ou de nanoparticules d'or. Les nanoparticules d'or et d'argent peuvent se lier à l'HSV-1 en compétition avec les chaînes d'HS et donc bloquer l'entrée d'HSV-1.

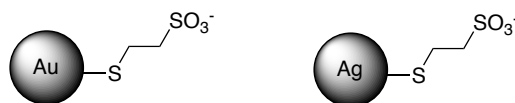


Figure 26. Les nanoparticules pour inhiber l'entrée du virus HSV-1

Non seulement les glyconanoparticules d'or et les nanoparticules d'argent sont préparées, en changeant les cœurs, d'autres types de glyconanoparticules ont été préparées, par exemple, des glyconanoparticules magnétiques et des quantum dots. Les exemples sont présentés dans le Tableau 3.

	Glycoconjugué	Cœurs	Application	Références
Mannose		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Glyconanoparticules magnétiques pour la détection d' <i>Escherichia coli</i>	El-Boubbou <i>et al.</i> <sup>68</sup>
Mannose		CdS	CdS-Quantum Dots pour la détection d' <i>Escherichia coli</i>	Mukhopadhyay <i>et al.</i> <sup>69</sup>
Mannose, galactose et galactosamine		CdSe/ZnS	CdSe/ZnS-Quantum Dots pour une utilisation <i>in vivo</i>	Kikkeri <i>et al.</i> <sup>70</sup>

Tableau 3. Exemples des glyconanoparticules magnétiques et des quantum dots

Même si les glyconanoparticules métalliques ont de grandes applications, il ne faut pas oublier leur toxicité. Actuellement, de nombreuses glyconanoparticules métalliques sont préparées en variant la

(69) El-Boubbou, K.; Gruden, C.; Huang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13392-13393.

(70) Mukhopadhyay, B.; Martins, M. B.; Karamanska, R.; Russell, D. A.; Field, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 886-889.

(71) Kikkeri, R.; Lepenies, B.; Adibekian, A.; Laurino, P.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2110-2112.

taille et les composés sur la surface. Mais très peu d'informations sur leur toxicité sont publiés. Les nanoparticules d'or peuvent s'accumuler dans le foie, la rate, les globules rouges, etc... La taille des nanoparticules d'or est le facteur le plus important pour leur toxicité. Des études *in vitro* montrent que les nanoparticules de 10 nm à 20 nm n'ont pas beaucoup d'influence sur la viabilité de la cellule endothéliale micro-vasculaire rétinienne.<sup>71</sup> Mais ce n'est pas suffisant pour prouver la non-toxicité car il n'y a pas d'évidence pour la non-génotoxicité. Par contre, les nanoparticules d'or de taille plus petites que 1.4 nm peuvent se lier à l'ADN et causer des mutations.<sup>72</sup> La toxicité des quantum dots n'a pas été beaucoup étudiée.<sup>73</sup> Mais Chan *et al.*<sup>74</sup> a montré que les quantum dots avec le cœur CdSe peuvent induire l'apoptose dans les blastocystes de souris, inhiber la prolifération cellulaire, retarder le développement du blastocyste et augmenter la possibilité de mort du blastocyste *in vitro* et *in vivo*. C'est à cause de la toxicité des glyconanoparticules métalliques, que l'utilisation des composés amphiphiles et plus particulièrement des glycolipides, que nous souhaitons développer dans ma thèse, peut être avantageuse.

### 3. Composés amphiphiles: monomères et auto-assemblages

#### 3.1. Les composés amphiphiles et leur auto-assemblage

Les composés amphiphiles ont une tête hydrophile et une queue hydrophobe (Figure 27). Ils peuvent être cationiques, anioniques, non-ioniques ou zwitterioniques selon les charges que la tête apporte. Ils montrent des propriétés physicochimiques intéressantes, comme la capacité à diminuer la tension de surface des liquides dans lesquels ils sont solubilisés où la facilité qu'ils montrent à former des solutions micellaires à faible concentration.

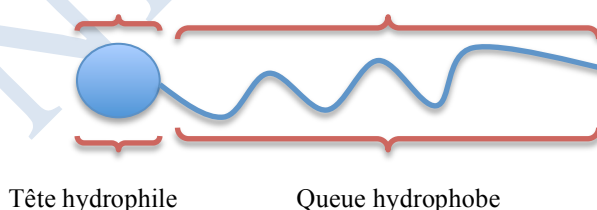


Figure 27. Représentation schématique d'une molécule amphiphile

Les auto-assemblages sont fortement dépendants des structures moléculaires, de la concentration du produit, de l'environnement de solvant et des interactions non-covalentes, par exemples, les liaisons

(72) Kim, G.-Y.; Shim, J.; Kang, M.-S.; Moon, S.-H. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *156*, 141-147.




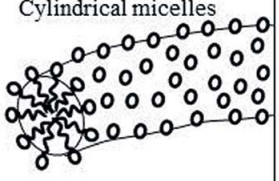

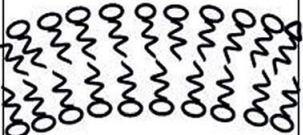

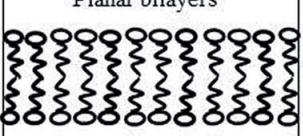
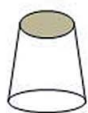
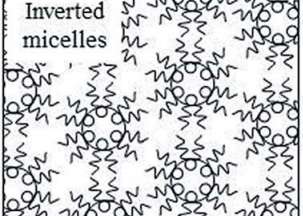
(73) Yah, C. S. *Biomedical Research* **2013**, *24*, 400-413.

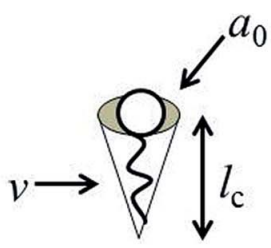
(74) Chou, L. Y. T.; Chan, W. C. W. *Nat Nano* **2012**, *7*, 416-417.

(75) Chan, W.-h.; Shiao, N.-h. *Acta Pharmacol Sin* **2008**, *29*, 259-266.



hydrogènes, les  $\pi$ - $\pi$  stacking, les interactions électrostatiques, etc...

Critical Packing Parameter ( $v/a_0l_c$ )	Critical Packing Shape	Structures Formed
$< 1/3$	 Cone	Spherical micelles 
$1/3 - 1/2$	 Truncated cone	Cylindrical micelles 
$1/2 - 1$	 Truncated cone	Flexible bilayers, vesicles 
$\sim 1$	 Cylinder	Planar bilayers 
$> 1$	 Inverted truncated cone or wedge	Inverted micelles 



$P = v/a_0l_c$

Figure 28. Relation entre le paramètre d'empilement et la structure des objets formés par auto-assemblage<sup>75</sup>

De manière générale, les composés amphiphiles en solution ont tendance à s'auto-assembler en structures complexes qui minimisent les interactions entre leurs domaines hydrophobes et l'eau. En fonction des structures des composés amphiphiles, les objets formés par auto-assemblage ont des formes et des tailles définies. L'équipe d'Israelachvili<sup>76</sup> a utilisé dès 1977 les paramètres géométriques de la structure amphiphile en les reliant à la courbure de l'interface pour prédire quel type d'auto-assemblage sera formé en solution. Pour ce faire, ils ont introduit la notion de paramètre

(77) Salim, M.; Minamikawa, H.; Sugimura, A.; Hashim, R. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1602-1618.

(76) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1977**, *470*, 185-201.

d'empilement P, qui se définit de la manière suivante :

$$P = v/a_0l_c$$

Dans cette formule :  $v$  est le volume effectif occupé par les chaînes,  $l_c$  est la longueur moyenne des chaînes et  $a_0$  est la surface occupée par les têtes polaires.  $v$ ,  $l_c$  et  $a_0$  peuvent être calculés ou mesurés. Grâce à ce paramètre, la structure des auto-assemblages peut être prédite (Figure 28). Plus la valeur de P est élevée, moins la surface doit être courbée pour accommoder le volume des queues hydrophobes. Quand le composé amphiphile possède une grande tête avec une queue courte et que la valeur de P est inférieure à 1/3, il a la tendance de former les micelles sphériques. Les micelles cylindriques sont préférées quand la queue est relativement courte et que la valeur de P est entre 1/3 et 1/2. Pour les composés qui ont une valeur de P entre 1/2 et 1, les bicouches flexibles ou les vésicules sont favorables. Quand la valeur de P est presque à 1, le composé a une petite tête hydrophile et une queue hydrophobe relativement grande, les bicouches planes sont préférées. Si la valeur de P est supérieure à 1, les micelles inverses sont favorables.

### 3.2. Auto-assemblage de glycolipides

Dans la nature, les composés amphiphiles sont souvent des lipides polaires, quelques exemples sont présentés dans la Figure 29. Leurs rôles sont très importants, par exemple : les sels biliaires permettent de solubiliser les composés hydrophobes dans le sang et les phospholipides sont des constituants indispensables des membranes cellulaires de par leur capacité à former des bicouches lipidiques.



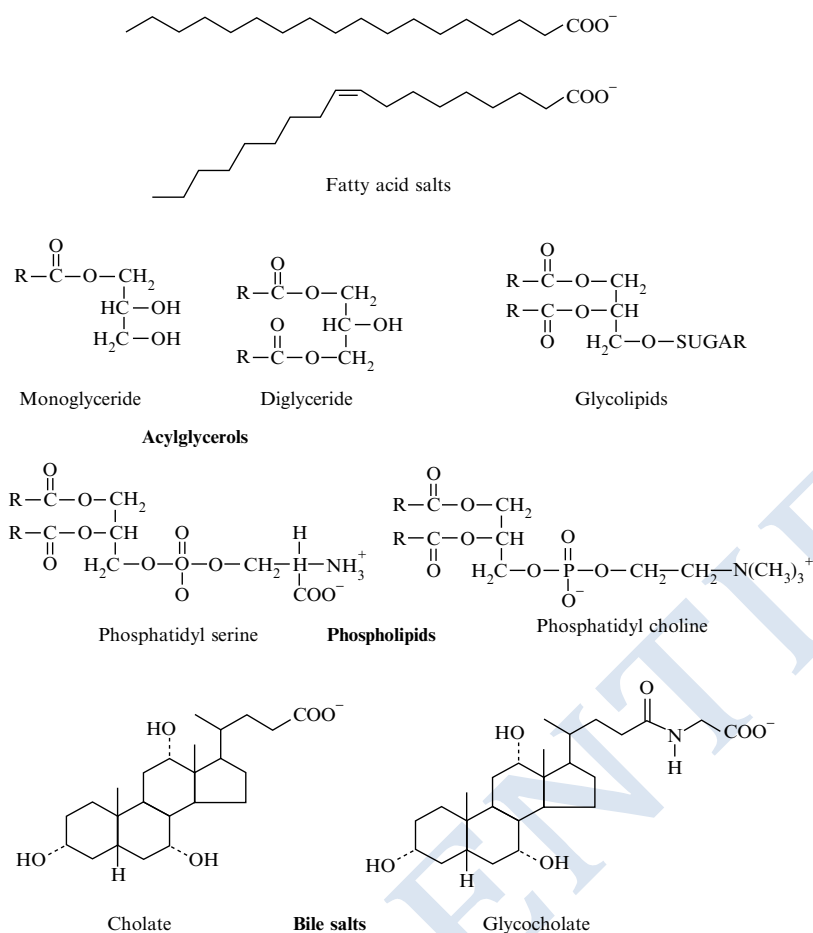


Figure 29. Exemples de lipides polaires<sup>77</sup>

Comme on l'a vu précédemment en fonction du rapport de taille entre partie hydrophile et hydrophobe, les auto-assemblages pourront donner des objets différents. Le plus souvent avec les lipides, on aura soit des micelles, soit des vésicules ou liposomes. Les structures des liposomes sont différentes de celles des micelles par leur taille, leur stabilité. Les tailles des micelles sont souvent inférieures à 100 nm<sup>78</sup> mais celles des liposomes sont souvent supérieures à 50 nm et peuvent atteindre à 5 µm.<sup>79</sup> Par ailleurs, alors que le centre d'une micelle est totalement hydrophobe (la micelle est remplie en son coeur par les chaînes du tensioactif), la double couche hydrophobe de l'assemblage liposomique délimite une cavité sphérique creuse remplie d'eau (Figure 30).

(78) Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and polymers in aqueous solution*, 2nd Edition; Wiley, 2002.

(79) Letchford, K.; Burt, H. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *65*, 259-269.

(80) Immordino, M. L.; Dosio, F.; Cattel, L. *International Journal of Nanomedicine* **2006**, *1*, 297-315.

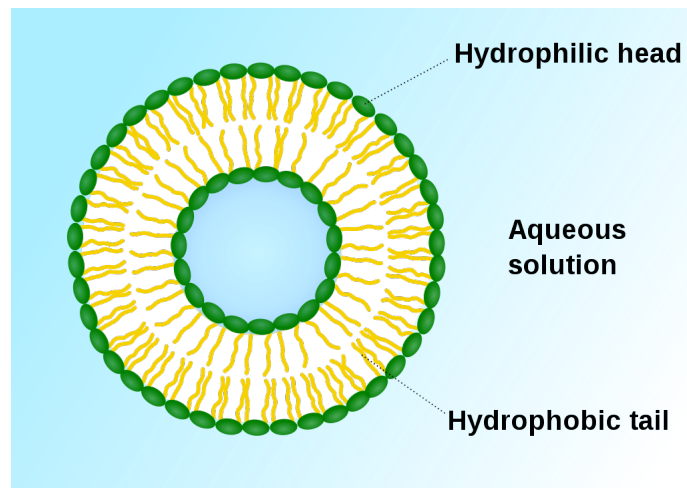


Figure 30. Schéma d'un liposome<sup>80</sup>

Comme pour les glyconanoparticules, Il est possible de préparer des glycomicelles ou des glycoliposomes. Ces objets peuvent servir à étudier les interactions sucre-sucre, mais aussi les interactions sucre protéines. Ils peuvent aussi permettre de délivrer des principes actifs de manière ciblée.

Dans les années 2000, ces objets ont été très étudiés et utilisés pour cibler des lectines appelées sélectines et notamment la sélectine endothéliale (E-sélectine), qui est présente sur les cellules endothéliales. Cette lectine a non seulement un rôle dans le processus d'inflammation, mais est aussi apparue intéressante comme cible dans certains cancers.<sup>81</sup> La plupart des objets synthétisés utilisaient le tétrasaccharide sialyl Lewis X, un épitope connu de cette lectine.

D'autres exemples d'utilisation de glycoliposomes sont présentés dans le Tableau 4. Les liposomes conjugués avec le trisaccharide 3'-sulfo-Lewis ont été utilisés pour cibler la sélectine plaquettaire (P-sélectine), exprimée sur les plaquettes activées.<sup>86-87</sup> Les liposomes couverts par des mannooses sont utilisés comme un adjuvant immunologique, car ils sont captés facilement par les macrophages péritonéaux, aussi les particules plus grosses ont des captations merveilleuses par les macrophages.<sup>88-89-90</sup> Des liposomes fonctionnalisés par le  $\beta$ -D-galactose ont, quand à eux, été utilisés pour étudier le mécanisme de l'entrée du VIH dans ces cellules ciblées.<sup>91</sup>

(81) <https://en.wikipedia.org/wiki/Liposome>.

(82) Jubeli, E.; Moine, L.; Vergnaud-Gauduchon, J.; Barratt, G. *Journal of Controlled Release* **2012**, *158*, 194-206.

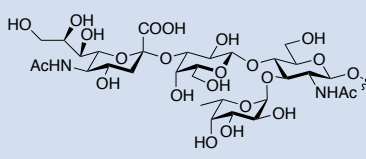
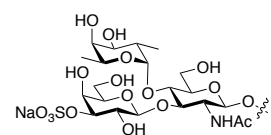
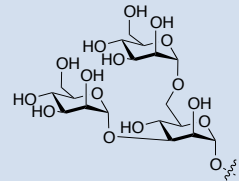
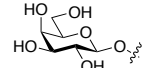
Glycoconjugué	Application	Références
Sialyl Lewis X (sLe <sup>x</sup> ) 	Ciblage d'inflammation <i>in vivo</i>	Tsuruta <i>et al.</i> <sup>82</sup> Hirai <i>et al.</i> <sup>83</sup> Zeisig <i>et al.</i> <sup>84</sup> Vodovozova <i>et al.</i> <sup>85</sup>
3'-sulfo-Lewis a (SuLe <sup>a</sup> ) 	Ciblage les récepteurs du sélectine plaquettaire	Yan <i>et al.</i> <sup>86</sup> Zhu <i>et al.</i> <sup>87</sup>
$\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 3)]-Man 	Un adjuvant immunologique	Sugimoto <i>et al.</i> <sup>88</sup> Ikehara <i>et al.</i> <sup>89</sup> Kojima <i>et al.</i> <sup>90</sup>
$\beta$ -galactose 	Etudier le mécanisme de l'entrée du VIH	Bhat <i>et al.</i> <sup>91</sup>

Tableau 4. Exemples de glycoliposomes

Les glycoliposomes comme les glyconanoparticules ont été utilisés dans de potentielles approches vaccinales. Le groupe de Boons a été pionnier dans ce domaine en décrivant, en 2005, la synthèse d'une construction constituée de trois composants : l'antigène tumoral Tn, le peptide YAF (stimulant certains lymphocytes) et le lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys (Figure 31).<sup>92</sup> De par sa construction, cette molécule va s'auto-organiser en liposome. Depuis des modifications ont été apportées et des résultats très encourageants ont été publiés.<sup>93</sup>

- (83) Tsuruta, W.; Tsurushima, H.; Yamamoto, T.; Suzuki, K.; Yamazaki, N.; Matsumura, A. *Biomaterials* **2009**, *30*, 118-125.
- (84) Hirai, M.; Minematsu, H.; Hiramatsu, Y.; Kitagawa, H.; Otani, T.; Iwashita, S.; Kudoh, T.; Chen, L.; Li, Y.; Okada, M.; Salomon, D. S.; Igarashi, K.; Chikuma, M.; Seno, M. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *391*, 274-283.
- (85) Zeisig, R.; Stahn, R.; Wenzel, K.; Behrens, D.; Fichtner, I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1660*, 31-40.
- (86) Vodovozova, E. L.; Moiseeva, E. V.; Grechko, G. K.; Gayenko, G. P.; Nifant'ev, N. E.; Bovin, N. V.; Molotkovsky, J. G. *European Journal of Cancer* **2000**, *36*, 942-949.
- (87) Yan, F.; Xue, J.; Zhu, J.; Marchant, R. E.; Guo, Z. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 90-96.
- (88) Zhu, J.; Xue, J.; Guo, Z.; Zhang, L.; Marchant, R. E. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1366-1369.
- (89) Sugimoto, M.; Ohishi, K.; Fukasawa, M.; Shikata, K.; Kawai, H.; Itakura, H.; Hatanaka, M.; Sakakibara, R.; Ishiguro, M.; Nakata, M.; Mizuochi, T. *FEBS Letters* **1995**, *363*, 53-56.
- (90) Ikehara, Y.; Niwa, T.; Biao, L.; Ikehara, S. K.; Ohashi, N.; Kobayashi, T.; Shimizu, Y.; Kojima, N.; Nakanishi, H. *Cancer Research* **2006**, *66*, 8740-8748.
- (91) Kojima, N.; Biao, L.; Nakayama, T.; Ishii, M.; Ikehara, Y.; Tsujimura, K. *Journal of Controlled Release* **2008**, *129*, 26-32.
- (92) Bhat, S.; Spitalnik, S. L.; Gonzalez-Scarano, F.; Silberberg, D. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 7131-7134.
- (93) Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G.-J. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6139-6142.
- (94) Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Buskas, T.; Boons, G.-J. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455-463.

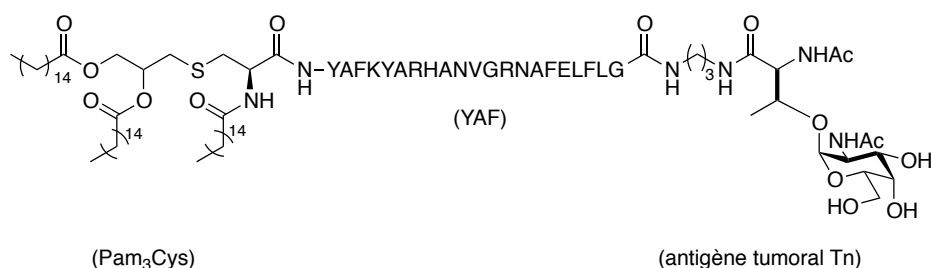


Figure 31. Glycolipide synthétisé par le groupe de Boons pour former des glycoliposomes

En 2009, l'équipe de Mulard a préparé des immunogènes contre *Shigella flexneri* sérotype 2a (SF2a), qui est le pathogène principal de la shigellose endémique dans les pays en développement.<sup>94</sup> Ils ont synthétisés des oligosaccharides, mimant le O-antigène (épitope B) de la lipopolysaccharide qui se présente sur la surface de bactérie (Figure 32). Ces oligosaccharides ont été conjugués à la surface de liposomes en présence d'un épitope "T-helper" et de bonnes réponses immunologiques ont pu être induites chez la souris.

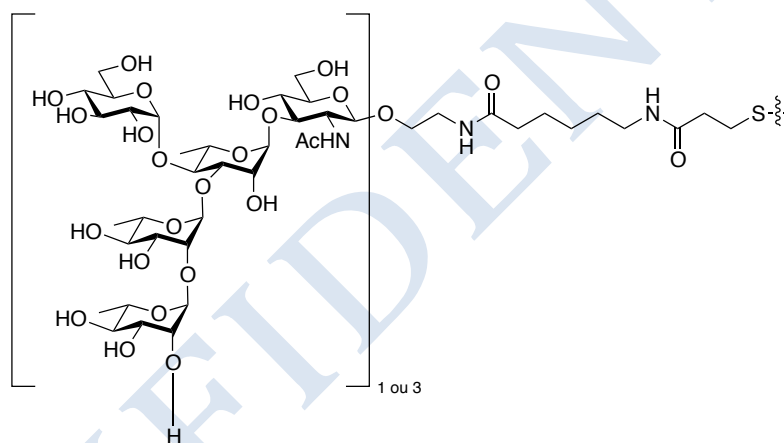


Figure 32. Structures oligosaccharidiques synthétisé par le groupe de Mulard en vue d'une conjugaison à la surface de liposomes

D'autres molécules que des lipides peuvent être utilisées pour faire de l'auto-assemblage. Quelques exemples sont donnés dans le paragraphe suivant.

### 3.3. Auto-assemblage avec d'autres molécules que des lipides

Les auto-assemblages des composés amphiphiles glycosylés qui ont une partie hydrophobe, autre que les lipides, ont attiré l'attention des chimistes et des biologistes.<sup>95</sup>

(95) Said Hassane, F.; Phalipon, A.; Tanguy, M.; Guerreiro, C.; Bélot, F.; Frisch, B.; Mulard, L. A.; Schuber, F. *Vaccine* **2009**, *27*, 5419-5426.

(96) Boullanger, P. In *Glycoscience Synthesis of Substrate Analogs and Mimetics*; Driguez, H., Thiem, J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: 1998; Vol. 187, p 275-312.

L'équipe de Thoma<sup>96</sup> a préparé des nanoparticules auto-assemblées à partir des composés amphiphiles sous forme de dendrimère, avec un cœur hydrophobe (des cycles aromatiques) et des composés hydrophiles (sucres) à l'extérieur. Ces dendrimères vont de la génération 1 à la génération 6. Un exemple de génération 2, est présenté dans Figure 33. Les nanoparticules s'auto-assemblent grâce à des interactions de  $\pi$ - $\pi$  stacking. Le sucre à l'extérieur, appelé épitope  $\alpha$ Gal, un trisaccharide  $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc, est un antigène présent chez le cochon, mais absent chez l'homme, qui est responsable du rejet aigu observé lors des xénotransplantations.<sup>97</sup> Ces nanoparticules auto-assemblées et glycosylées avec l'épitope  $\alpha$ Gal permettent de piéger les anticorps- $\alpha$ Gal de type IgM et d'inhiber leur action *in vitro* et *in vivo*. Par rapport aux dendrimères tous seuls, les nanoparticules auto-assemblées sont beaucoup plus efficaces. L'  $IC_{50}$  pour le composé de 2<sup>ème</sup> génération est de 100  $\mu$ M mais l'  $IC_{50}$  pour la nanoparticule correspondant est de 0.025  $\mu$ M. De plus, les nanoparticules auto-assemblées et glycosylées avec le lactose ont été montrées inactives pour inhiber l'action des IgM anti- $\alpha$ Gal.

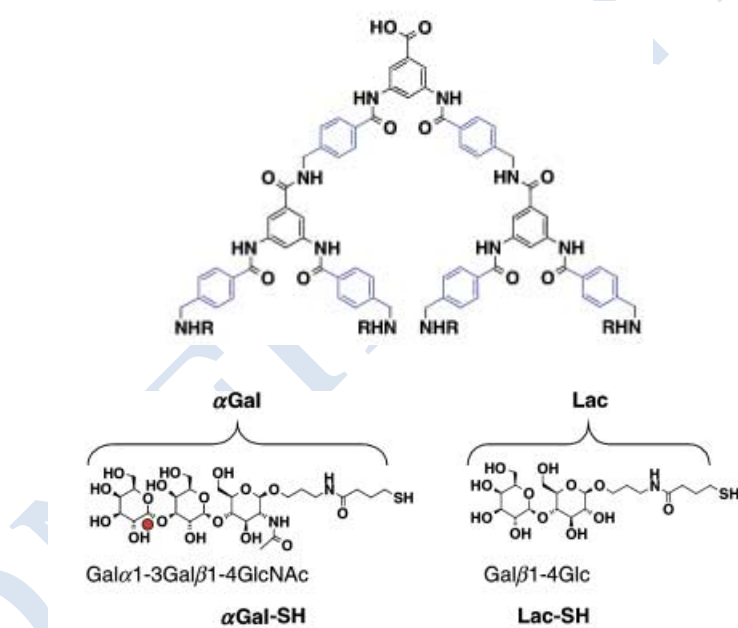


Figure 33. Composé amphiphile (glycodendrimer de 2<sup>ème</sup> génération) préparé par l'équipe de Thoma<sup>97</sup>

L'équipe de Lee a prouvé que l'architecture de la nanoparticule a un effet important sur l'interaction avec les biomolécules.<sup>98</sup> Ils ont préparé des "Rod-Coil", composés amphiphiles, dans lesquels la nature des parties lipidiques et polaires permet de contrôler le type d'auto-assemblage : vésicules, micelles sphériques ou micelles cylindriques (Figure 34). La partie "Rod" est un tétra(*p*-phenylène) ou

(97) Thoma, G.; Katopodis, A. G.; Voelcker, N.; Duthaler, R. O.; Streiff, M. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3195-3198.

(98) Sandrin, M.; McKenzie, I. F. C. *Immunological Reviews* **1994**, *141*, 169-190.

(99) Kim, B.-S.; Hong, D.-J.; Bae, J.; Lee, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16333-16337.

un di[tétra(*p*-phénylène)] et la partie “Coil” est constitué par une chaîne d'éthylène glycol de longueur variable liée à un  $\alpha$ -D-mannopyranoside ou un  $\beta$ -D-galactopyranoside. Les résultats montrent que les trois types de nanoparticules couplées avec le  $\alpha$ -D-mannopyranoside ont des bonnes affinités avec la Concanavaleine A (Con 1), lectine à affinité pour les motifs  $\alpha$ -D-mannosyle et  $\alpha$ -D-glucosyle mais la nanoparticule couplée avec le  $\beta$ -D-galactopyranoside ne s'associe pas avec la Con A. De plus, les micelles sphériques montrent une affinité plus grande que les vésicules ou les micelles cylindriques mais la raison de cette différence n'est pas encore claire. Cela a montré que non seulement le type de sucre sur les particules auto-assemblées est important, mais l'architecture de ces particules auto-assemblées a une influence pour la reconnaissance avec les protéines.

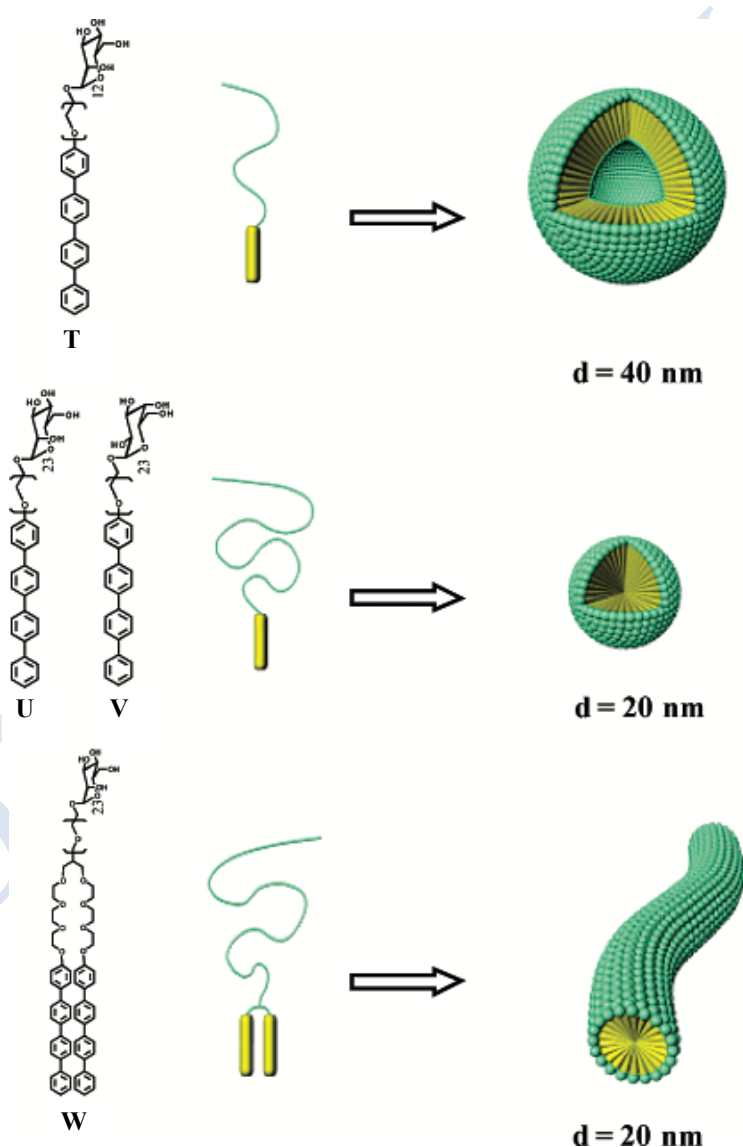


Figure 34. Les vésicules, micelles sphériques et micelles cylindriques auto-assemblés à partir des composés amphiphiles “Rod-Coil”<sup>99</sup>

La façon dont s'organisent les sucres sur les nanoparticules auto-assemblées est un point important pour la reconnaissance avec les protéines.<sup>99</sup> Deux différents glycopolymères amphiphiles ont été préparés comme présenté dans la Figure 35. Le premier a une long chaîne hydrophobe de poly(*tert*butyl acrylate) et une tête hydrophile qui comporte huit  $\alpha$ -D-glucose sous forme dendritique. L'autre est un copolymère à blocs qui comporte neuf  $\alpha$ -D-glucose sous forme linéaire. Après auto-assemblage des glycopolymères amphiphiles sous forme de micelle, les tests d'affinité avec la Con A a montré que les micelles formées par des glycopolymères comportant les  $\alpha$ -D-glucose sous forme dendritique reconnaissent mieux la Con A que les micelles formées par des glycopolymères comportant les  $\alpha$ -D-glucose sous forme linéaire.

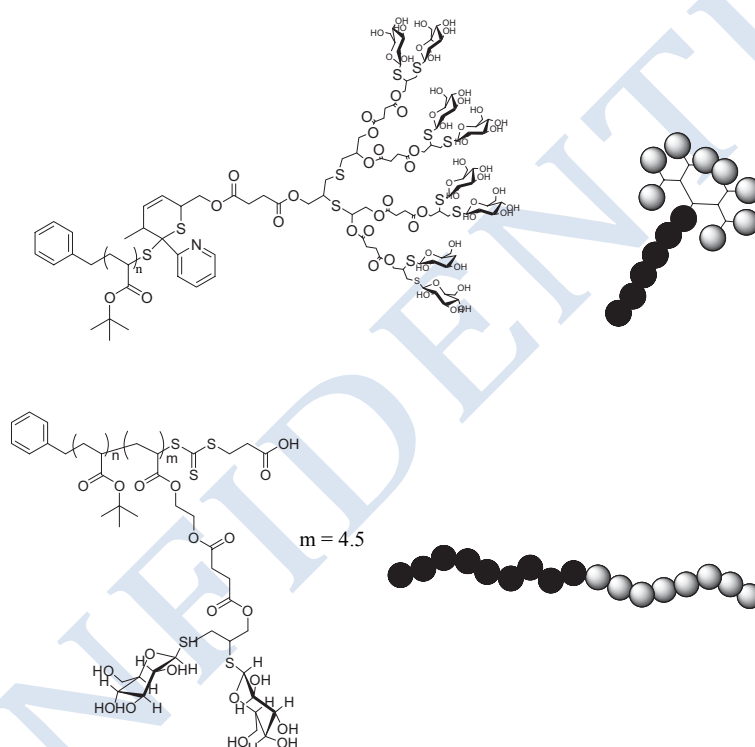


Figure 35. Glycopolymère dendritique et glycopolymère linéaire pour faire les micelles<sup>100</sup>

En conclusion, les glyconanoparticules auto-assemblées par des composés amphiphiles sont des outils efficaces et importants pour étudier les interactions sucre-protéine et sucre-sucres. L'architecture et la façon dont les sucres sont disposés sur les surfaces des glyconanoparticules influencent l'affinité entre les glyconanoparticules et les protéines.

(100) Kumar, J.; Bousquet, A.; Stenzel, M. H. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1620-1626.

## 4. Présentation du sujet de la thèse

Le sujet de la thèse a pour objectif de mimer les propriétés biologiques des HS en préparant, par auto-assemblage de mélanges de disaccharides fonctionnalisés, des surfaces combinatoires, capables d'interagir spécifiquement avec des HSBPs, notamment avec CXCL12. Les travaux réalisés pendant cette thèse s'appuient sur des résultats obtenus précédemment au laboratoire. Il avait été montré que des surfaces planes, obtenues par auto-assemblage de mélanges de dérivés fonctionnalisés de lactose et lactose sulfaté, pouvaient interagir avec des HSBPs et différencier CXCL12 $\gamma$  de CXCL12 $\alpha$ , mais ne permettait pas de différencier CXCL12 $\gamma$  et IFN $\gamma$ . Pour pouvoir reconnaître plus sélectivement les protéines reconnaissant les GAGs, nous allons remplacer les composés lactose et lactose sulfaté par des disaccharides plus proches des structures de fragments d'HS.

Mais avant, nous souhaitons voir si des surfaces sphériques ont les mêmes propriétés que des surfaces planes. Pour cela dans une première approche, nous avons voulu voir si l'auto-assemblage de disaccharides de type lactose et lactose sulfaté à la surface de nanoparticules d'or conduisait à des surfaces ayant les mêmes capacités de différenciation de différentes HSBPs. Puis, nous remplacerons l'or par une structure lipidique utilisable en thérapeutique humaine.

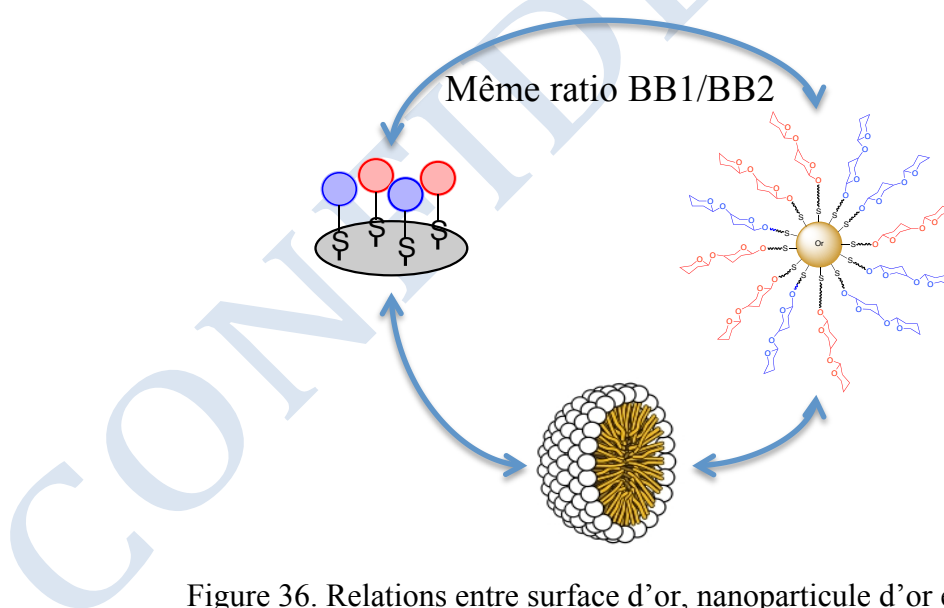


Figure 36. Relations entre surface d'or, nanoparticule d'or et micelle

La thèse sera divisée en trois chapitres :

La première partie du premier chapitre sera consacrée à la préparation des composés disaccharidiques lactose et lactose sulfaté qui seront utilisés pour les auto-assemblages soit sur les surfaces d'or soit sur les nanoparticules d'or. La seconde partie montrera la synthèse des composés nécessaires à la



réalisation des nanoparticules lipidiques.

Les méthodes mises au point dans le premier chapitre seront utilisées dans le second pour obtenir des composés disaccharidiques représentatifs de structures présentes dans les fragments d'HS. Le premier disaccharide comporte un acide D-glucuronique lié en  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 à une  $\alpha$ -D-glucosamine N-acétylée. Le deuxième disaccharide comporte un acide L-iduronique 2-O-sulfaté lié en  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 à une  $\alpha$ -D-glucosamine N-sulfatée et 6-O-sulfatée (Figure 37).



Figure 37. Les deux disaccharides fonctionnalisés, choisis pour leur représentativité de la diversité moléculaire des HS

Le dernier chapitre décrira quelques caractérisations des nanoparticules d'or et nanoparticules lipidiques, fonctionnalisés par les dérivés lactose et lactose sulfaté. Puis la préparation des surfaces combinatoires planes fonctionnalisées par les dérivés disaccharidiques des fragments d'HS sera discutée.

## Chapitre II : Synthèse des composés à base de lactose

### 1. Fonctionnalisation des disaccharides en vue de réaliser des auto-assemblages sur des surfaces d'or (planes et nanoparticules)

#### 1.1. Le choix des composés

Dans un premier temps, les glyconanoparticules d'or ont été réalisées par nos collègues de Grenoble en utilisant les mêmes molécules **1** et **2** de départ que celles utilisées pour les surfaces d'or dont les résultats ont été décrits chapitre I, paragraphe 2.4. (Figure 38). Bien que de nombreuses méthodes existent pour synthétiser les nanoparticules d'or, il a été décidé en première approche pour ce travail d'utiliser des solutions commerciales afin d'éviter les étapes de synthèse et de caractérisation des nanoparticules.

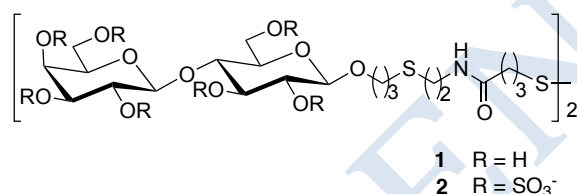


Figure 38. Premiers composés utilisés pour l'auto-assemblage sur les nanoparticules d'or

Malheureusement, après fonctionnalisation par les composés **1** et/ou **2**, les nanoparticules d'or obtenues se sont avérées instables (aggrégation). Il a donc été décidé de modifier les bras fonctionnalisant les molécules comme présentés dans la Figure 39 pour obtenir les composés **3** et **4**. Les interactions de van der Waals entre les longues chaînes alkyle devraient faciliter un auto-assemblage régulier sur la surface courbe des nanoparticules d'or.<sup>64</sup> La chaîne d'éthylène glycol confèrera hydrophilie et flexibilité entre la chaîne hydrophobe et la tête disaccharidique permettra d'éviter l'adsorption non spécifique des protéines sur l'auto-assemblage.<sup>100</sup>

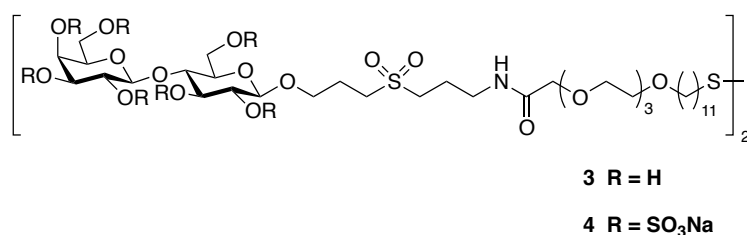


Figure 39. Composés à synthétiser pour l'auto-assemblage sur les nanoparticules d'or

(101) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.

## 1.2. Rétro-synthèse

Comme présenté dans la Figure 40, le composé disulfure **3** peut être obtenu à partir du composé **19** par désacétylation et oxydation *in situ* du thiol en disulfure.

Le composé **19** proviendra du couplage entre l'amine **18** et l'acide activé **11**.

Il y a trois stratégies pour former un amide :<sup>101</sup>

- ✧ L'acide activé est préparé et isolé dans une étape avant le couplage avec l'amine ;
- ✧ L'acide activé est préparé séparément et utilisé immédiatement sans purification pour le couplage avec l'amine ;
- ✧ L'acide est activé *in situ* en présence de l'amine.

Nous avons choisi la première stratégie dont on peut espérer qu'elle donne de meilleurs rendements de couplage, ce qui est important car la préparation des disaccharides d'HS demande de nombreuses étapes. Le composé **11** devra donc être suffisamment stable pour pouvoir être purifié et stocké.

L'acide carboxylique **10** peut être obtenu après déprotection du groupement *tert*butyl du composé **9** qui peut être lui même préparé par une addition radicalaire sur la double liaison du composé **8**. Le composé **8** quant à lui peut être préparé par alkylation du groupement alcool du composé **7**, lui même préparé à partir du triéthylène glycol (composé **5**) et du 11-bromoundec-1-ène (composé **6**).

L'amine **18** sera préparée, après hydrogénéolyse du groupement Cbz, introduit par une addition radicalaire « thiol-ène ». L'allyl lactose **15** sera obtenu à partir du lactose commercial par allylation de la position anomérique en utilisant une méthode développée récemment au laboratoire.

---

(102) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.

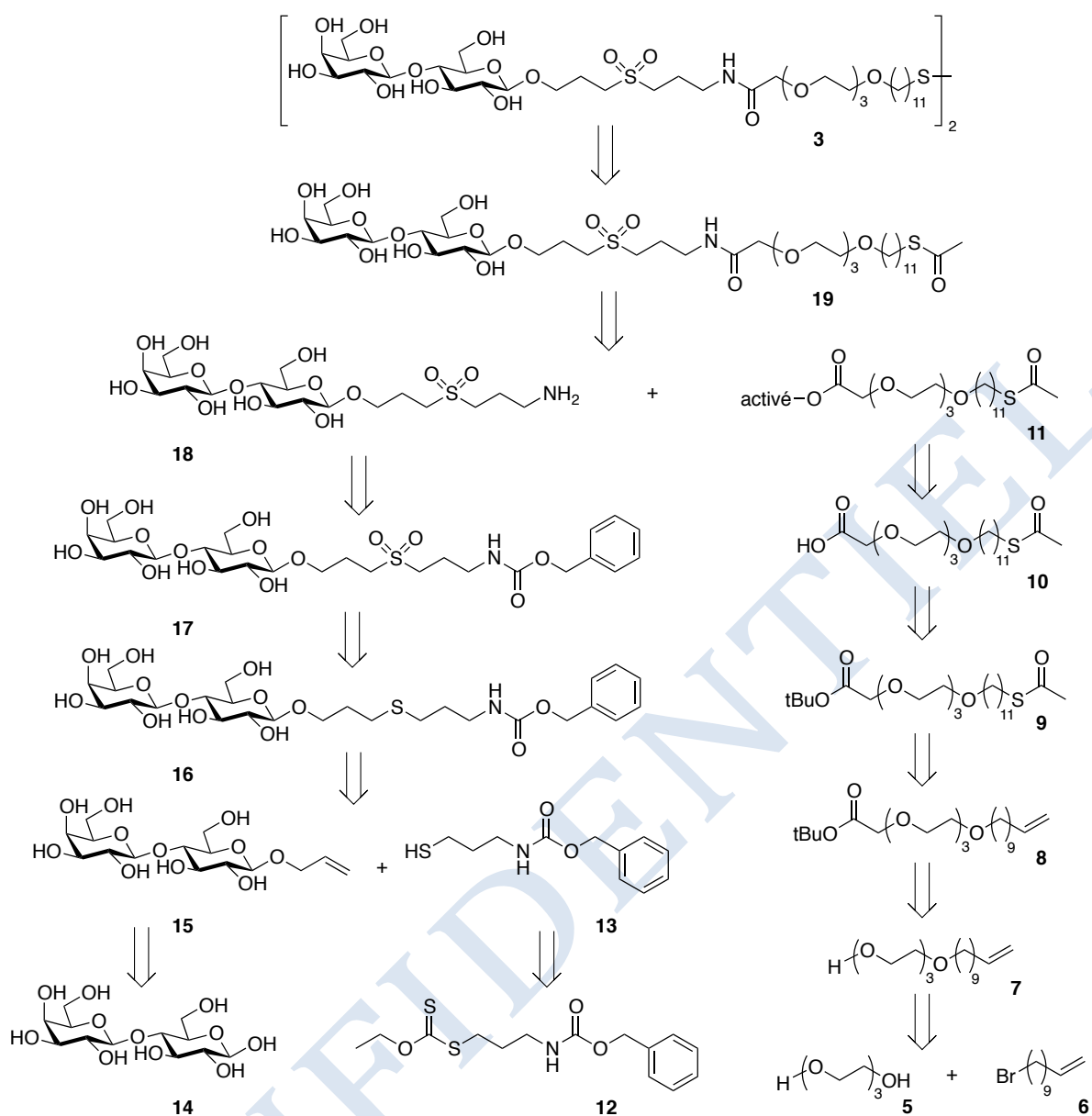


Figure 40. Retrosynthèse du produit lactose-C11 3

### 1.3. Préparation du bras pegylé en C11, composé 11

#### 1.3.1. Préparation du composé 9

La préparation du composé **9** est effectuée selon la publication de Lee *et al* et présentée dans le Schéma 1.<sup>102</sup> La première étape est la substitution nucléophile de l'atome de brome du 11-bromoundec-1-ène par l'alcoolate du triéthylène glycol. Ce dernier est mis en excès (4 équiv.) par rapport au NaH (1.1 équiv.) pour éviter une di-alkylation. La réaction est réalisée dans le THF et le

(103) Lee, J. K.; Kim, Y.-G.; Chi, Y. S.; Yun, W. S.; Choi, I. S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7665-7673.

milieu réactionnel est porté au reflux pendant une nuit. Le composé **7** est obtenu après une chromatographie gel de silice avec un rendement de 70%.

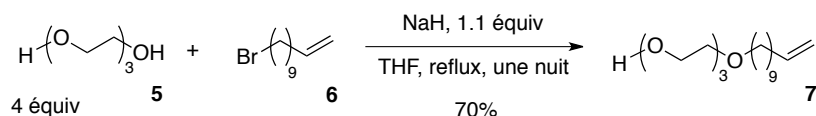


Schéma 1. Préparation du composé **7**.

L'étape suivante est une autre substitution nucléophile qui permet d'introduire le groupement fonctionnel acide carboxylique protégé sur l'alcool restant du triéthylène glycol. NaH (1.5 équiv.) est ajouté d'abord pour déprotonner l'alcool puis le *tert*butyl bromoacétate (2 équiv.) est ensuite ajouté. Après purification, le composé **8** est obtenu avec seulement 60% de rendement (Schéma 2). Ce rendement moyen est dû à l'enlèvement du groupement *tert*butyl en présence de NaH dans le DMF. Un mécanisme pour cette réaction secondaire a été proposé par Schmidt et est présenté dans le Schéma 3.<sup>103,104</sup> NaNMe<sub>2</sub>, formé in-situ par NaH et DMF, est présenté comme une base pour arracher le proton sur le *tert*butyl formant un carboxylate de sodium et de l'isobutylène. Les deux sous-produits, composés **21** (27%) et **22** (12%), que nous avons isolés sont présentés dans la Figure 41. Le sous-produit **21** peut être formé par la réaction entre le carboxylate, composé **20**, qui vient de la déprotection du *tert*butyl du composé **8**, et le *tert*butyl bromoacétate. Le sous-produit **22** peut être formé par la réaction entre le carboxylate, composé **20**, et le produit départ, composé **7**.

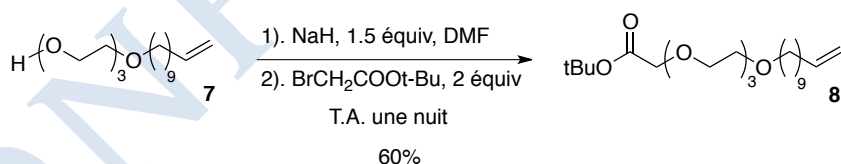


Schéma 2. Préparation du composé **8**

(104) Paul, S.; Schmidt, R. R. *Synlett* **2002**, *2002*, 1107-1108.

(105) Filali, E.; Lloyd-Jones, G. C.; Sale, D. A. *Synlett* **2009**, *2009*, 205-208.

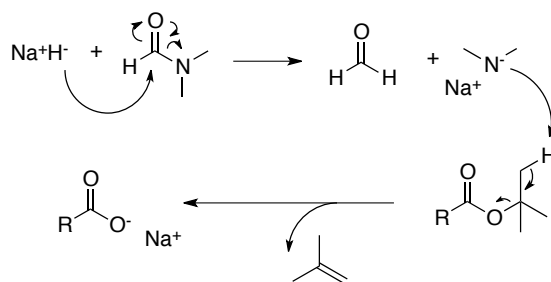


Schéma 3. Le mécanisme d'enlèvement du *tert*butyl en présence de NaH dans DMF

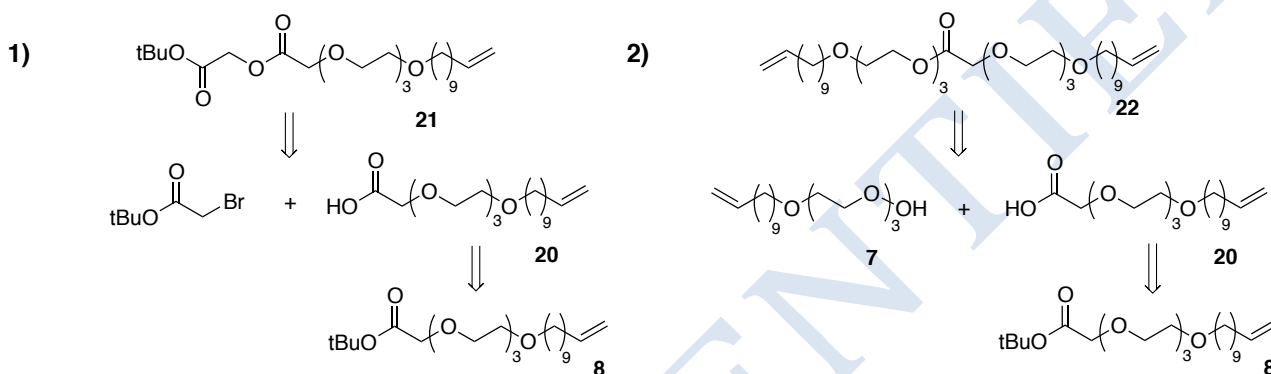


Figure 41. La formation des deux sous-produits pour préparer le composé **8**

Le groupement thioester est introduit par réaction radicalaire en présence de  $\text{CH}_3\text{COSH}$  (4 équiv.) avec 0.4 équiv. d'AIBN comme initiateur (Schéma 4). Cette réaction est réalisée dans le MeOH au reflux pendant une nuit et permet d'obtenir, après purification, le produit **9** avec un très bon rendement de 97%.

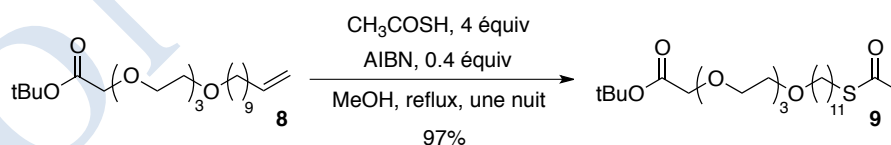


Schéma 4. Synthèse du bras begylé en C11 sous forme d'acide carboxylique protégé

### 1.3.2. Préparation du composé 10

L'enlèvement du groupement *tert*butyl peut être réalisé, entre autre, dans des conditions acides ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,<sup>105</sup>  $\text{H}_2\text{SO}_4$ <sup>106</sup> et  $\text{H}_3\text{PO}_4$ <sup>107</sup>) ou dans des conditions basiques ( $\text{KOH}$ )<sup>105</sup> ... Nous avons choisi de ne pas utiliser de conditions basiques car le groupement thioester est sensible à ces conditions. Donc, nous avons choisi plutôt les conditions acides en utilisant  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Comme présenté dans le Schéma 5, cette réaction est réalisée avec  $\text{CF}_3\text{COOH}$  à 40% dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à température ambiante pendant une nuit. A la fin de la réaction, le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est évaporé et le  $\text{CF}_3\text{COOH}$  est coévaporé avec du toluène. Après une chromatographie sur gel de silice, le produit **10** est obtenu avec un rendement de 85%.

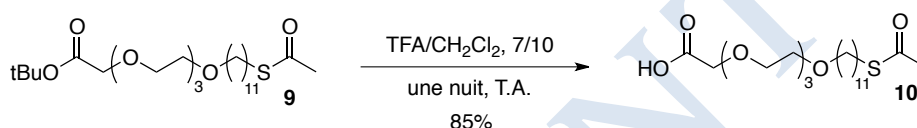


Schéma 5. Enlèvement du groupement *tert*butyle

### 1.3.3. Activation de l'acide carboxylique pour obtenir le composé 11

Comme nous en avons discuté au début de ce chapitre, nous voulons activer l'acide carboxylique présent sur le composé **10** sous une forme qui puisse être purifiée et stockée. Des exemples d'ester activés<sup>108</sup> sont présentés dans la Figure 42 et sont principalement de deux types :

✧ Les esters de phénols plus réactifs que les esters d'alcools sont souvent utilisés pour la réaction de couplage.<sup>109</sup> En effet, les phénates sont de meilleurs groupes partants que les alcoolates, et ce d'autant plus qu'ils sont porteurs de groupements électroattracteurs (nitro, fluoro, voire chloro). Les esters de *paranitro*phényle sont assez stables et souvent cristallins mais la formation d'amide est lente. En outre il n'est souvent pas très facile de se débarrasser du *paranitro*phénol libéré au cours de la réaction. Le problème est le même avec l'utilisation des esters de trichlorophényle faciles à synthétiser, mais l'élimination du trichlorophénol est également difficile. Les esters avec le groupement pentafluorophényle sont très réactifs et

(106) Strazzolini, P.; Dall'Arche, M. G.; Giumanini, A. G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9255-9258.

(107) Strazzolini, P.; Misuri, N.; Polese, P. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2075-2078.

(108) Li, B.; Berliner, M.; Buzon, R.; Chiu, C. K. F.; Colgan, S. T.; Kaneko, T.; Keene, N.; Kissel, W.; Le, T.; Leeman, K. R.; Marquez, B.; Morris, R.; Newell, L.; Wunderwald, S.; Witt, M.; Weaver, J.; Zhang, Z.; Zhang, Z. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9045-9050.

(109) Joullie, M. M.; Lassen, K. M. *Arkivoc* **2010**, *2010*, 189-250.

(110) Davis, A. P.; Walsh, J. J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4865-4868.

donnent rapidement l'amide avec peu de réactions secondaires.

✧ Les esters de composés comportant une fonction *N*-hydroxy, comme les esters de *N*-hydroxysuccinimide ou 3-hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine sont aussi très utilisés. La formation de ces esters est facile. Si l'amide désiré est soluble en solvant organique, le succinimide est le premier choix parce que le *N*-hydroxysuccinimide est hydrosoluble donc peut être facilement éliminé par lavage. Nous avons choisi d'utiliser le *N*-hydroxysuccinimide pour activer le composé acide carboxylique **10**, notre produit étant soluble dans les solvants organiques, ce choix devrait simplifier la purification.

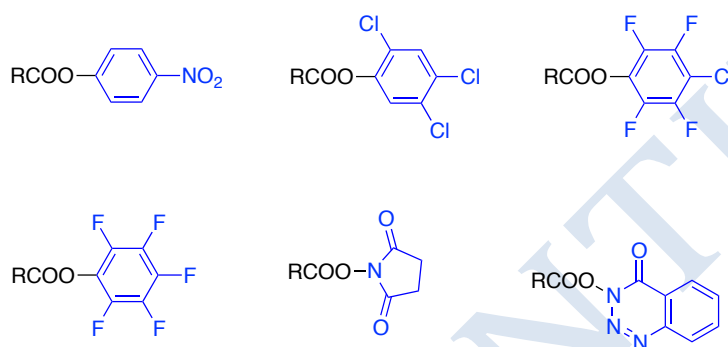


Figure 42. Exemples d'esters activés

Pour la préparation de l'ester activé, on utilise aussi souvent un agent de couplage de type carbodiimide. Le premier agent utilisé pour le couplage entre une amine et un acide carboxylique a été le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), introduit en 1955 par Sheehan *et al.*<sup>110</sup> Il est aussi beaucoup utilisé pour la préparation des esters activés. Le mécanisme de cette réaction est présenté dans la Figure 43. L'acide carboxylique et le DCC vont d'abord former une *O*-acylurée, composé très réactif. Après avoir arraché le proton sur l'acide carboxylique, l'alcool est attaqué et il y a formation de l'ester activé désiré. Il peut y avoir également formation d'un anhydride, qui est ensuite attaqué par l'alcool pour former l'ester activé. L'*O*-acylurée peut se réarranger en *N*-acylurée sous-produit non réactif de la réaction et donc non désiré.

(111) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.



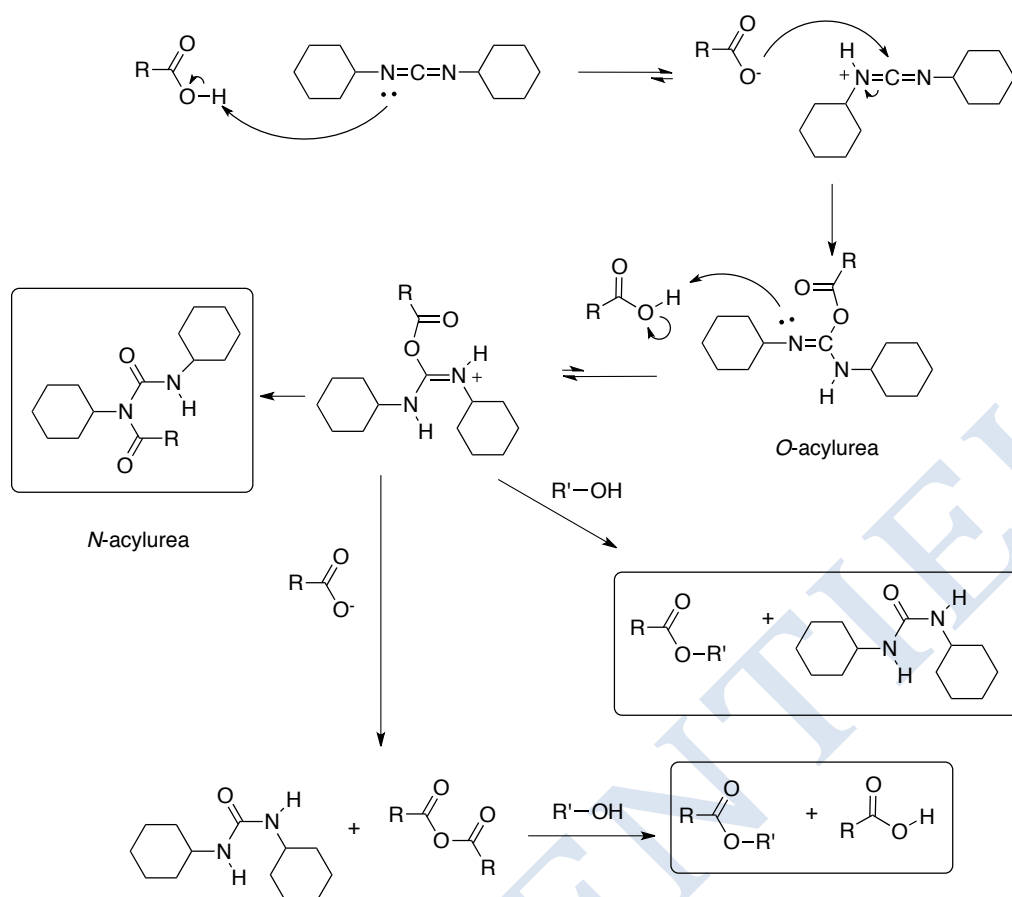


Figure 43. Mécanisme de l'activation d'un acide carboxylique par DCC

Par la suite, d'autres agents de couplage de type carbodiimide, dont des exemples sont présentés dans Figure 44, ont été développés. Parmi ces composés, EDC•HCl a l'avantage d'être un composé hydrosoluble. L'excès de EDC•HCl peut être enlevé par un simple lavage. Par contre, il y a toujours la possibilité de former le sous-produit *N*-acyluréa, qui lui ne peut pas être éliminé par un lavage.

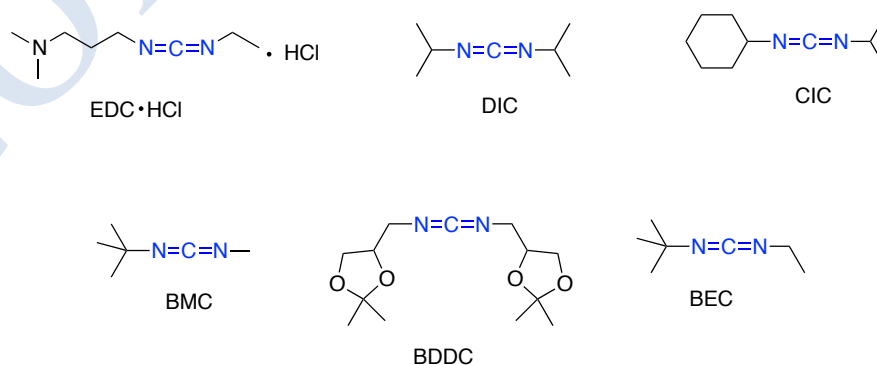


Figure 44. Exemples d'agents de couplage de type carbodiimide

L'activation a été réalisée avec 1.2 équiv. d'EDC•HCl et de *N*-hydroxysuccinimide dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, à

température ambiante pendant une nuit. Après un lavage par l'eau pour enlever l'excès de *N*-hydroxysuccinimide et d'EDC•HCl, le composé **11** a été obtenu avec 97 % de rendement (Schéma 6).

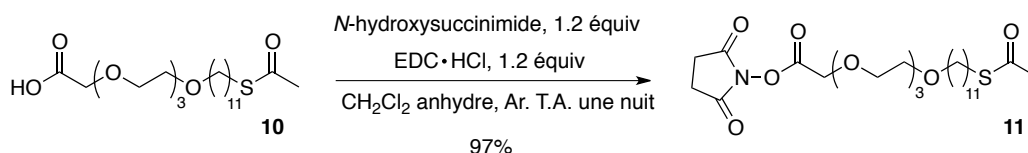


Schéma 6. Activation de l'acide carboxylique **10**

## 1.4. Préparation du 3-(3-aminopropylsulfonyl)propyl lactose, composé **16**

### 1.4.1. Addition radicalaire allyle-thiol

Le composé **16**, portant l'amine protégée, est introduit par une réaction radicalaire entre le *N*-benzyloxycarbonyl-(3-thiopropyl)amine, composé **13** synthétisé au laboratoire comme décrit<sup>111</sup> et le composé **15**,  $\beta$ -allyl-lactose. Ce dernier est préparé préalablement au laboratoire en une étape sans protection à partir du lactose commercial.<sup>112</sup> La synthèse de **15** est réalisée avec 9 équiv. de bromure d'allyle et 2 équiv. de soude comme base, à température ambiante pendant 20 heures. L'allyl-lactose est obtenu avec un rendement de 75% et un ratio  $\beta/\alpha$ , 80/20. Le  $\beta$ -allyle a été obtenu pur par deux recristallisations successives dans le méthanol. Par rapport aux autres méthodes d'allylation anomérique, la méthode développée au laboratoire est économe en produit chimique et en temps. Elle est applicable sur grande échelle et a déjà été appliquée à d'autres disaccharides, comme D-cellobiose, D-galactose, etc...

La réaction allyle-thiol avec  $\text{BET}_3$  comme initiateur et pyrocatechol comme co-réactif a été développée au sein du laboratoire.<sup>112</sup> Cette réaction est utilisée avantageusement par rapport aux réactions utilisant la lumière<sup>113</sup> ou des initiateurs radicalaires thermiques, comme l'AIBN,<sup>114</sup> ou des photoinitiateurs,<sup>115</sup> tout particulièrement lorsque la réaction doit être menée en solvant organique ou sur des substrats comportant des groupements photosensibles, notamment des groupements benzyles. Ces conditions ont également pu être appliquées à des composés solubles dans l'eau et comportant des groupements benzyles. Dans ce cas, la réaction est menée dans un mélange  $\text{H}_2\text{O/MeOH/THF}$  (2 :2 :1) avec 2 équiv.

(112) Povie, G.; Tran, A.-T.; Bonnaffé, D.; Habegger, J.; Hu, Z.; Le Narvor, C.; Renaud, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3894-3898.

(113) Liu, W., Université Paris-Sud, 2015.

(114) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* **1974**, *37*, 193-201.

(115) Walling, C.; Helmreich, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1144-1148.

(116) Dondoni, A.; Marra, A. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 573-586.

de thiol (composé **13**). Le triéthylborane et le pyrocatechol (2.4 équiv.) sont ajoutés en plusieurs fois jusqu'à la fin de la réaction. Le composé **16** est obtenu avec un très bon rendement de 98% sur une échelle de l'ordre du gramme (Schéma 7).

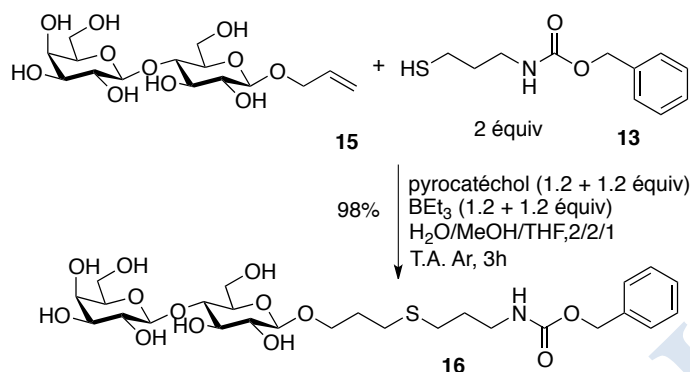


Schéma 7. Addition radicalaire pour la synthèse du composé **16**

#### 1.4.2. Oxydation du thioether

Des études réalisées au laboratoire<sup>116</sup> ayant montré que les réactions d'hydrogénolyse étaient totalement inhibées par la présence de fonction thioether, tous les composés obtenus après réaction thiol-ène sont systématiquement oxydés de façon à convertir les fonctions thioether en sulfone, car cette dernière est compatible avec l'étape d'hydrogénolyse.

L'oxydation du thioéther **16** en sulfone **17** est effectuée avec de l'oxone.<sup>117</sup> L'oxone est un mélange de sels : 2KHSO<sub>5</sub>•KHSO<sub>4</sub>•K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. C'est KHSO<sub>5</sub> qui joue le rôle d'oxydant. Deux équiv. d'oxone sont nécessaires pour assurer la formation de sulfone et pas seulement du sulfoxyde intermédiaire. L'oxone étant acide, le milieu est tamponné avec du K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Cette réaction marche proprement et le composé **17** est obtenu quantitativement après une chromatographie sur phase inverse C18 (Schéma 8).

(117) Lucas, R.; Hamza, D.; Lubineau, A.; Bonnaffé, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2004, 2107-2117.

(118) Trost, B. M.; Curran, D. P. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1287-1290.

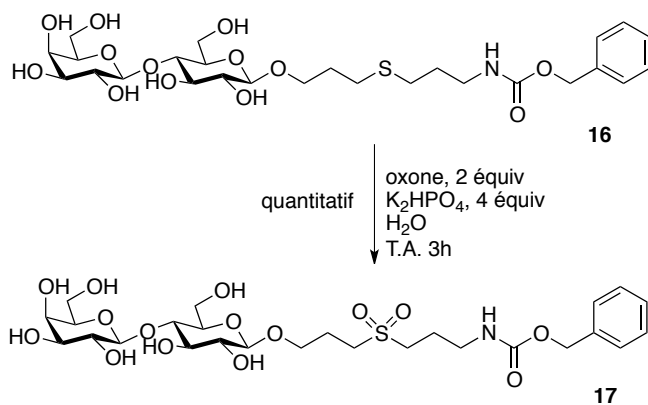


Schéma 8. Oxydation pour former le composé **17**

### 1.4.3. Enlèvement du groupement carboxybenzyle (Cbz)

Des études réalisées précédemment au laboratoire<sup>118</sup> ont montré que la liaison carbone-soufre de la fonction sulfone pouvait être réduite lors de l'hydrogénolyse et conduire à la formation de quantités plus ou moins importantes de  $\beta$ -D-lactoside de propyle. Pour éviter cette réaction parasite, il est important de réaliser les hydrogénolyses en maintenant le pH entre 6 et 7 à l'aide d'un tampon. Dans notre cas, nous avons choisi de tamponner la réaction avec de l'acétate de triéthylammonium car c'est un sel volatil facile à enlever par lyophilisation.

Les conditions développées au laboratoire pour l'hydrogénolyse des fragments de glycosaminoglycanes utilisent comme catalyseur du dihydroxyde de palladium sur charbon (20 wt.%, mouillé) à une concentration de 33 mg/mL. Nous avons commencé avec cette condition et un équivalent d'acétate de triéthylammonium par rapport au produit à hydrogéner dans un mélange de solvants tBuOH/H<sub>2</sub>O, 1/2. Le composé **18** pur et sous forme de sel d'acétate est obtenu avec un rendement de 72% par simple filtration et lyophilisation. Le modeste rendement est dû à la difficulté à désorber le produit du catalyseur, c'est pourquoi compte tenu de la facilité de la réaction (enlèvement seulement de Cbz), nous avons diminué la quantité de catalyseur jusqu'à 10% de masse par rapport au produit de départ (1mg/mL de catalyseur pour une concentration en produit de [15 mM]) et le produit a été obtenu quantitativement (Schéma 9).

(119) Macé, M.; Bonnaffé, D. *résultats non publiés*.

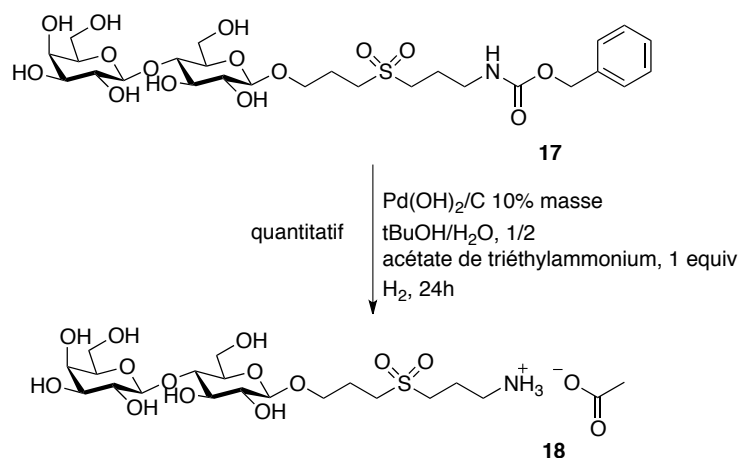


Schéma 9. Enlèvement du groupement Cbz pour obtenir le composé **18**

### 1.5. Préparation du produit lactose-C11 par couplage entre le 3-(3-aminopropylsulfonyl)propyl lactose et le bras pégylé C11

Un premier essai de couplage entre les composés **11** et **18** a été effectué dans du DMF à une concentration de 25 mM dans des conditions habituellement utilisées dans la littérature.<sup>119</sup> Le composé **11** est mis en excès car quoiqu'il ne soit pas beaucoup plus facile à synthétiser que le composé **18**, nous avons voulu nous placer dans des conditions qui pourront être utilisables pour d'autres oligosaccharides demandant un nombre d'étapes plus importante. La triéthylamine (1.2 équiv.) est ajoutée comme base. Le produit est obtenu avec un rendement de 51% (Tableau 5, entrée 1).

Ces conditions ne nous donnant pas un rendement satisfaisant, nous avons utilisé un mélange de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, qui avait été utilisé au laboratoire. En utilisant les mêmes conditions que la réaction dans le DMF, le produit **19** a été obtenu avec un rendement de 62% (Tableau 5, entrée 2). Le faible rendement peut donc s'expliquer par l'hydrolyse compétitive du composé **11** au cours de la réaction. En rajoutant 0.5 équiv. de composé **11** au bout de 17 heures et laissant réagir encore 6 heures (Tableau 2, entrée 3), le rendement est passé à 82%. Mais lorsque la réaction a été réalisée sur une plus grande quantité (100 mg au lieu de 25 mg), il a été très difficile de séparer le composé hydrolyse du **11** du produit final **19**. C'est pourquoi, nous avons décidé d'ajouter le composé **11** en deux fois (0.5 équiv, puis 0.7 équiv). Dans ces conditions il suffit de 1.2 équiv. d'ester activé pour convertir toute l'amine **18** et l'amide **19** est obtenu après une purification par chromatographie phase-inverse C18 avec un rendement de 95% et ce même en travaillant à l'échelle du gramme (Tableau 5, entrée 4).

(120) Liu, D.; Xie, Y.; Shao, H.; Jiang, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4406-4408.

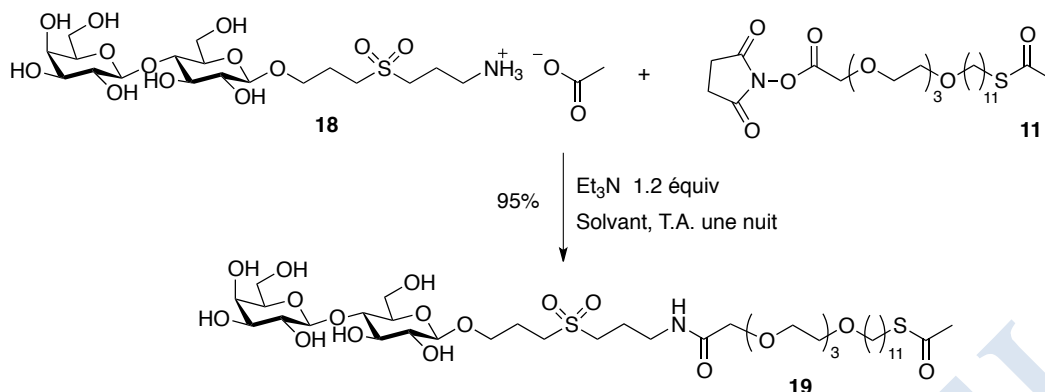


Schéma 10. Préparation du produit lactose-C11

Entrée	Solvant	Composé 11	rendement	Quantité
1	DMF	1.2 équiv	51%	25 mg
2	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O, 2/1	1.2 équiv	62%	25 mg
3	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O, 2/1	1.2 + 0.5 équiv	82%	25 mg
4	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O, 2/1	0.5 + 0.7 équiv	92%	25 mg
5	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O, 2/1	0.5 + 0.7 équiv	95%	1 g

Tableau 5. Synthèse du produit 19

## 1.6. Préparation du produit lactose sulfaté-C11

Pour fonctionnaliser les surfaces planes et les nanoparticules d'or, nous voulons préparer les composés sous forme de disulfure. Parce qu'il évite une étape de la déprotection par rapport aux composés sous forme de thioacétate, donc les fonctionnalisations sont plus reproductives. Mais pour comparer, nous voulons aussi préparer les composés lactose et lactose sulfaté sous forme de thioacétate. De plus, nous voulons tester les CMC des composés pour voir si ils ont la possibilité de former les micelles facilement.

La Préparation du composé persulfaté **23** peut être envisagée selon deux voies de synthèse. Comme présenté dans la Figure 45, le composé **23** pourrait être préparé par sulfatation du composé **19** ou par couplage entre le composé **24**, provenant de la sulfatation de **17**, et l'ester activé **11**. Généralement l'étape de sulfatation est mise à la fin de la stratégie de la synthèse car le groupement *O*-sulfate est pH sensible. Comme dans les disaccharides, fragments d'HS, que nous souhaitons utiliser, il y a des *N* et *O* sulfates, il est intéressant de tester le couplage entre les composés **24** et **11**.

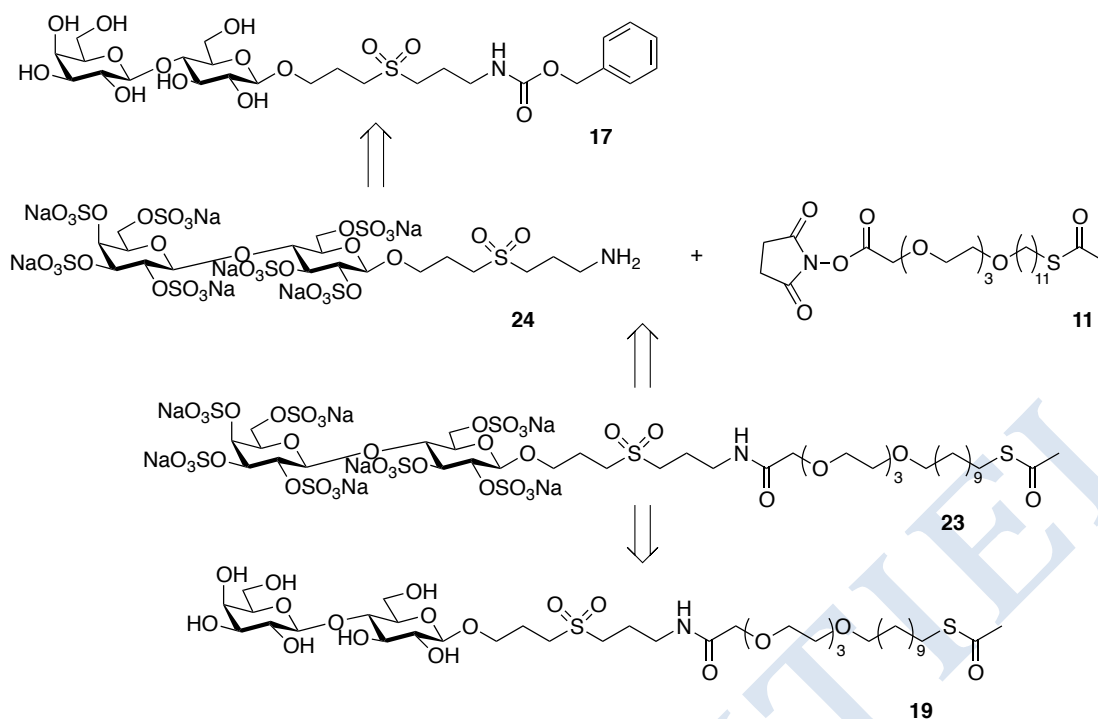


Figure 45. Voies d'obtention du composé **23**

### 1.6.1. Sulfatation avant couplage

La sulfatation pour préparer le composé **25** est effectuée sur le composé **17**, avant la déprotection du groupement Cbz (Schéma 11). En effet, la réaction sur le composé déprotégé **18** n'est pas envisageable car l'amine libre se sulfaterait plus rapidement que les hydroxyles.

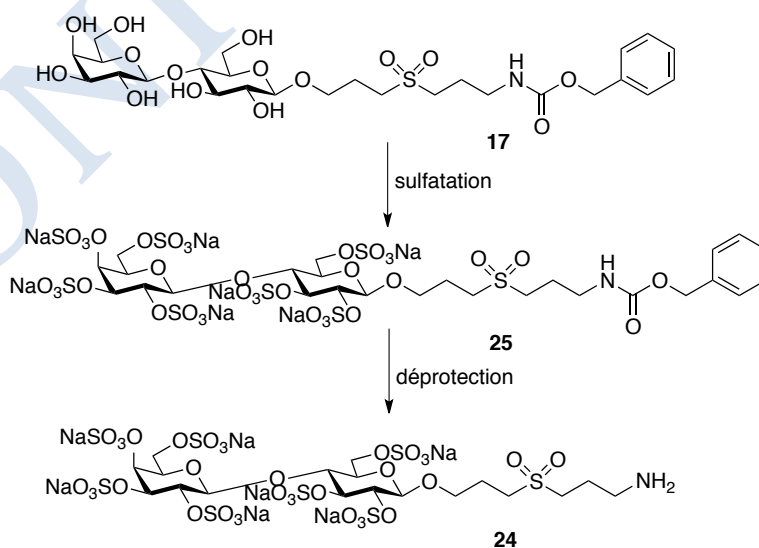


Schéma 11. Préparation du composé **25** par sulfatation du composé **17**

La sulfatation d'oligosaccharides est généralement réalisée en utilisant des complexes de Lewis de  $\text{SO}_3$ ,

comme  $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$ ,  $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ ,<sup>120</sup>  $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ <sup>121</sup> ou  $\text{DMF}\cdot\text{SO}_3$ ,<sup>122</sup> dans la pyridine ou le DMF à des températures d'environ 50 °C. Cette méthode utilise généralement de large excès de complexe et des temps de réaction souvent longs, jusqu'à plusieurs jours. Récemment, l'équipe de J-L de Paz a utilisé avec succès les micro-ondes pour sulfater des oligosaccharides, en particulier des fragments d'héparane sulfate.<sup>123</sup> Nous avons donc essayé les deux types de sulfatation : en chauffage classique (bain d'huile) ou micro-ondes. Les conditions sont présentées dans le Tableau 6. La voie A est effectuée avec 5 équiv. du complexe  $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$  par hydroxyle dans la pyridine en chauffant pendant 3 jours à 60 °C. Les mêmes conditions ont été utilisées pour la voie B mais en utilisant  $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$  dans le DMF. La voie C est réalisée aux micro-ondes avec 5 équiv. de  $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$  par hydroxyle dans la pyridine pendant 2 heures. Le mélange réactionnel est passé sur une colonne d'exclusion stérique (Sephadex LH 20) dans du méthanol. Après évaporation et passage sur colonne échangeuse d'ions (de type Bio-Rad  $\text{Na}^+$ ), le composé **25** est obtenu sous forme sel de sodium.

<b>Voie A</b>	1) $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$ , 5 équiv/OH, Pyridine, 60°C, 3 jours 2) Bio-Rad $\text{Na}^+$
<b>Voie B</b>	1) $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ , 5 équiv/OH, DMF, 60°C, 3 jours 2) Bio-Rad $\text{Na}^+$
<b>Voie C</b>	1) $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$ , 5 équiv/OH, Pyridine, 100°C, 2 h, micro-ondes 2) Bio-Rad $\text{Na}^+$

Tableau 6. Conditions testées pour sulfater le composé **17**.

Malheureusement quelques soient les conditions utilisées, le produit **25** a toujours été obtenu contaminé par un sous-produit qui sort en même temps lors de la chromatographie d'exclusion stérique. Dans la Figure 46, le spectre en noir montre deux pics n'appartenant pas au produit attendu. Le singulet à 5.2 ppm représente le  $\text{CH}_2$  du groupement Cbz et le triplet à 3.8 ppm représente le  $\text{CH}_2$  à côté du groupement  $\text{NHCbz}$ . Nous avons pensé que ce produit secondaire pourrait provenir d'une *N*-sulfatation de la fonction amide (produit **26**, Figure 47). Ceci a été confirmé par une analyse du mélange en spectroscopie de masse, Figure 48, qui a révélé qu'en plus du pic correspondant au produit majoritaire attendu **25** ( $m/z$  trouvé 1375.7801,  $m/z$  calculé 1375.7802  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), on pouvait observer un pic correspondant au produit secondaire **26** ( $m/z$  trouvé 1410.7705,  $m/z$  calculé 1410.7732

(121) Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7736-7737.

(122) Lee, J.-C.; Lu, X.-A.; Kulkarni, S. S.; Wen, Y.-S.; Hung, S.-C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 476-477.

(123) Bazin, H. G.; Polat, T.; Linhardt, R. J. *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 189-205.

(124) Maza, S.; Mar Kayser, M.; Macchione, G.; Lopez-Prados, J.; Angulo, J.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 3510-3525.



$[M-2Na+3H]^+$ .

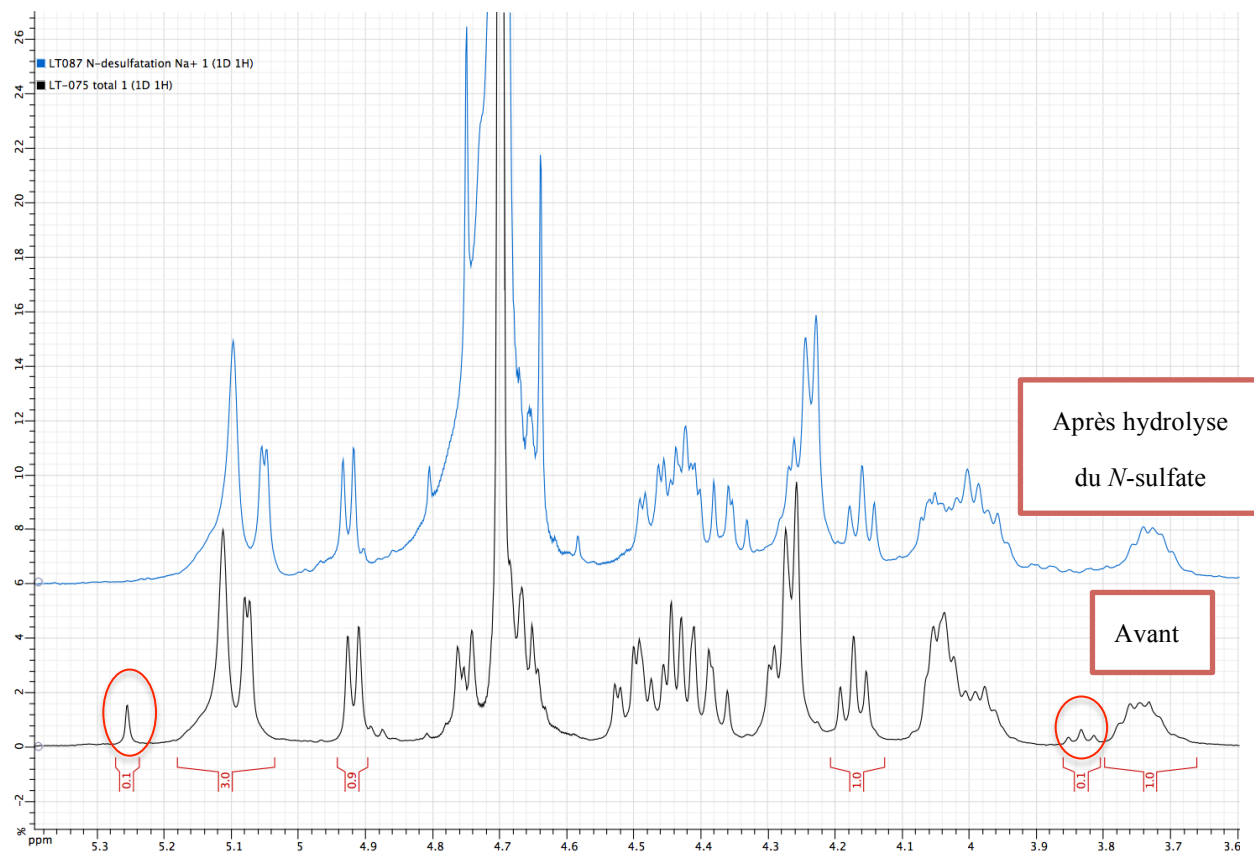


Figure 46. Les spectres du RMN  $^1\text{H}$  après et avant hydrolyse du *N*-sulfate

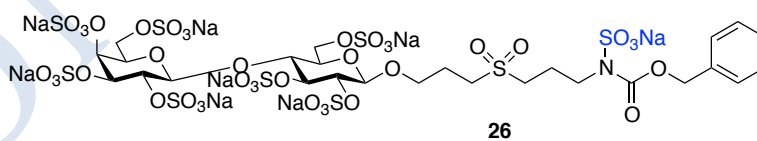


Figure 47. Le sous-produit, *N*-sulfaté, composé **26**

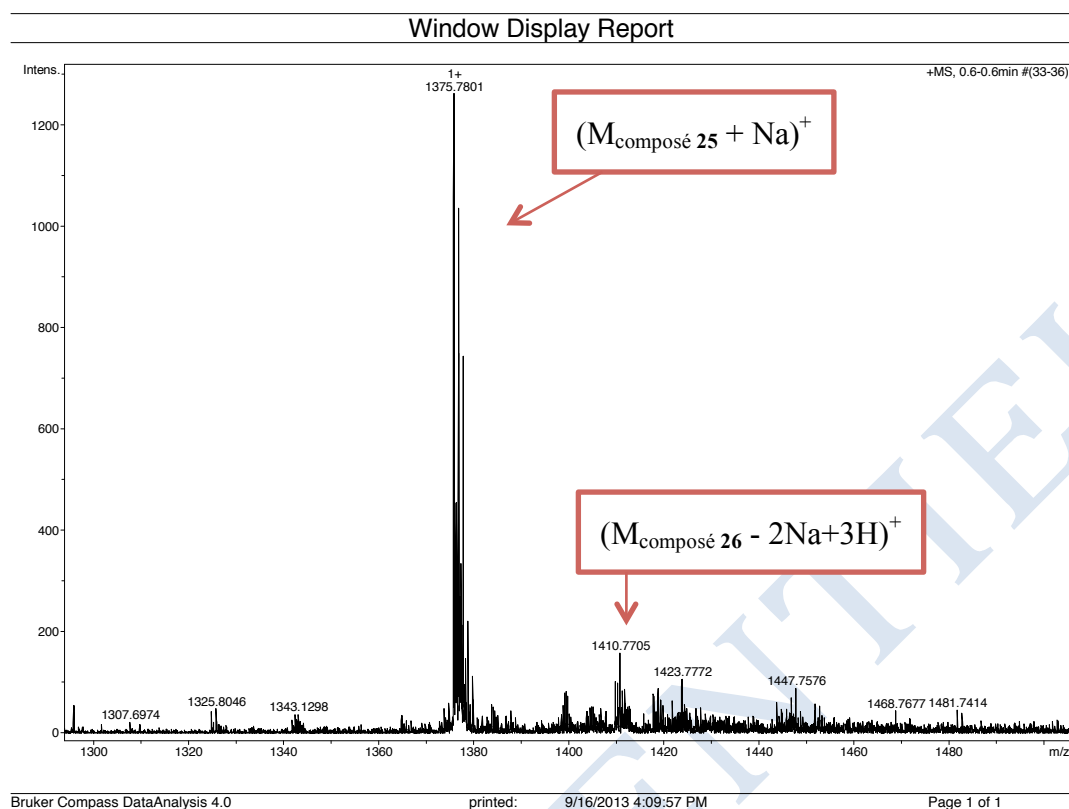


Figure 48. Spectre de masse du produit après sulfatation du composé **17**

Dans la littérature, il a été montré que l'on pouvait enlever un sulfate porté par une fonction amide par simple traitement en milieu acide, sans que les esters sulfuriques soient touchés.<sup>16</sup> Nous avons donc traité le mélange **25** + **26** par une solution aqueuse d'HCl 0.2 M à 0 °C pendant une nuit, ce qui a permis de convertir complètement le composé **26** en **25**. Ceci est particulièrement bien illustré par le spectre RMN <sup>1</sup>H du produit obtenu après hydrolyse acide dans lequel on peut constater la disparition des deux pics caractéristiques du produit parasite **26** (singulet à 5.2 ppm et triplet à 3.8 ppm, spectre en bleu dans la Figure 45). De plus, nous avons réalisé des analyses complémentaires par électrophorèse capillaire qui, de par la présence d'un chromophore UV (Cbz), est plus sensible que la RMN. La disparition totale du pic à 12 min dans l'électrophérogramme (Figure 49) confirme bien l'hydrolyse totale de la fonction *N*-sulfate de **26** et la pureté du produit **25**. Après ce traitement, on constate que les rendements pour les voies A et C sont similaires, de 80%-85% après sulfatation et *N*-désulfatation. Cependant la sulfatation avec les micro-ondes économise beaucoup de temps, ce qui présente un avantage non négligeable. En revanche, le rendement avec la voie B est très modeste, 60%.

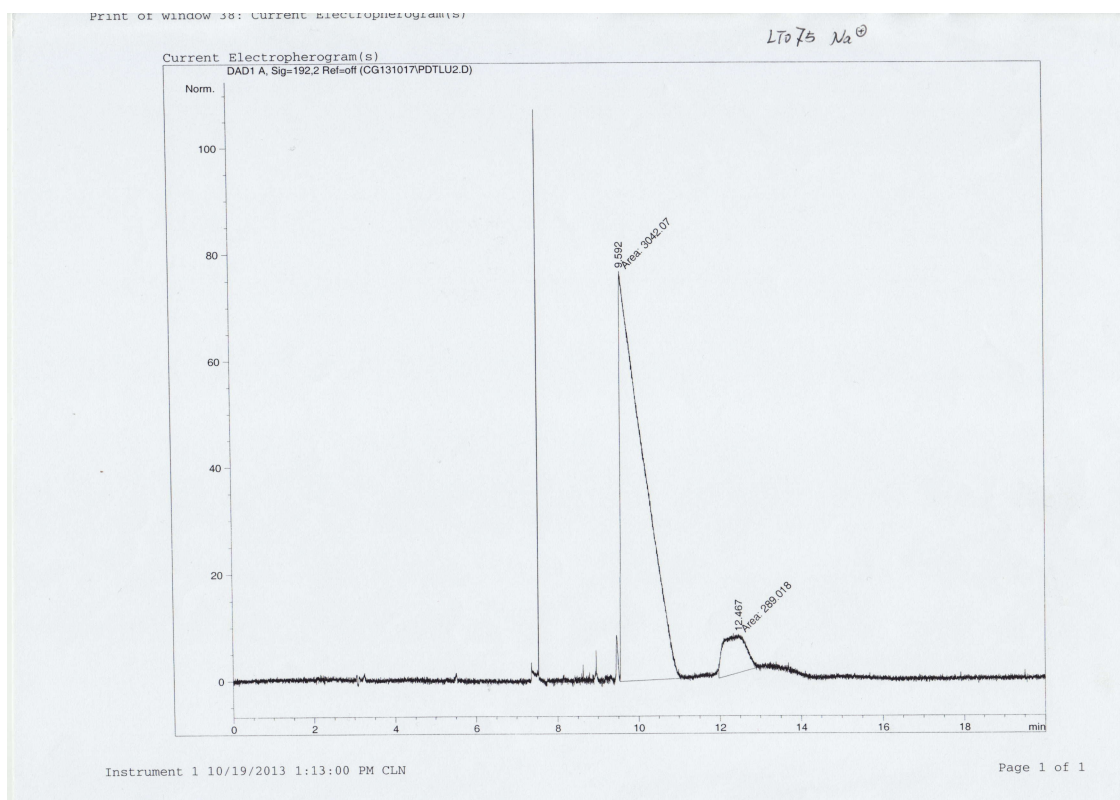


Figure 49. L'électrophérogramme du produit après sulfatation du composé **17**

L'enlèvement du groupement Cbz est effectué dans les mêmes conditions que pour le composé non-sulfaté : hydrogénolyse avec 10% (en masse) de dihydroxyde de palladium sur charbon (20 wt.%, mouillé) comme catalyseur, tBuOH/H<sub>2</sub>O 1/2 comme solvant et 1 équiv. d'acétate de triéthylammonium. Après filtration du catalyseur, évaporation et lyophilisation du solvant, le composé **24** sous forme de sel d'acide acétique est obtenu avec un rendement de 85% (Schéma 12).

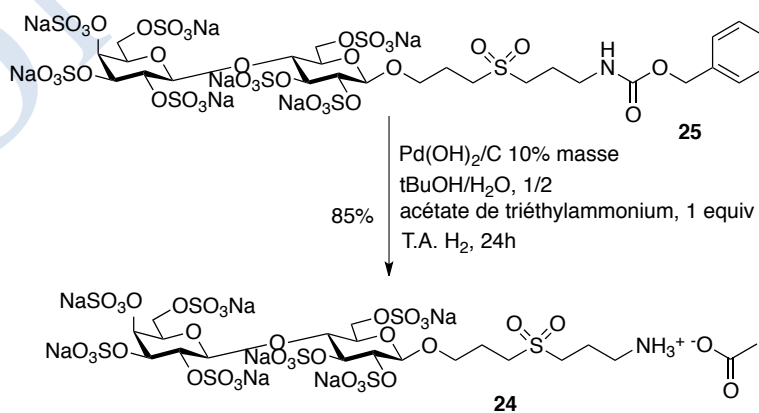


Schéma 12. Hydrogénolyse pour préparer le composé **24**

Le couplage est effectué de la même façon que le couplage de la formation du composé **19**. La réaction a été réalisée avec 1.2 équiv. de Et<sub>3</sub>N comme base et CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 2/1 comme solvant en rajoutant le composé **11** en deux fois : 0.5 équiv. et 0.7 équiv.. Mais le composé **23** est obtenu après une chromatographie phase-inverse C18 avec seulement 18% de rendement (Schéma 13). Nous avons observé beaucoup de produit de départ (74%) sur le spectre RMN <sup>1</sup>H du mélange brut réactionnel. En utilisant le DMF comme solvant, le rendement après purification était de 36 %. Aussi, nous avons décidé de sulfater le composé **19** pour préparer le composé **23**.

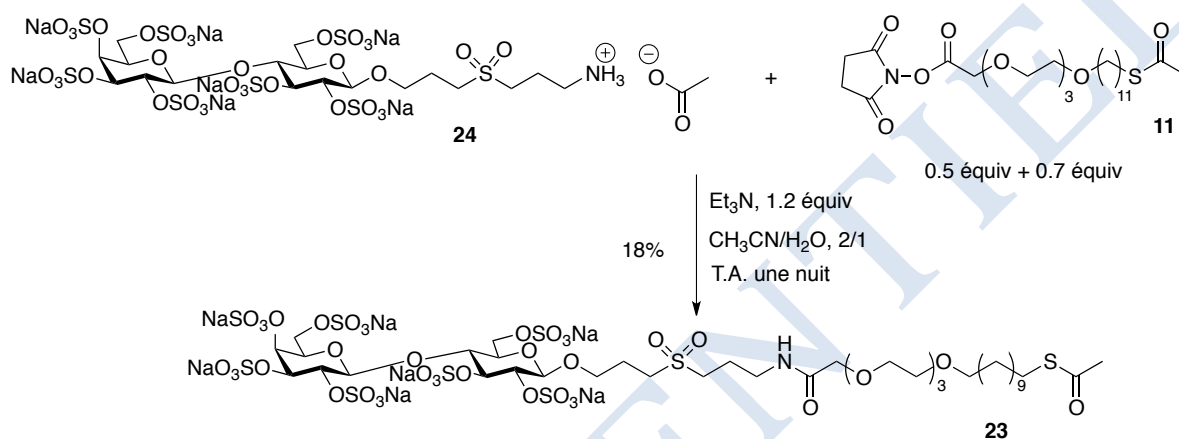


Schéma 13. Synthèse du composé **23** par couplage entre les composés **11** et **24**

### 1.6.2. Sulfatation après le couplage

Deux conditions ont été appliquées pour la sulfatation du composé **19** : soit chauffage micro-ondes, soit chauffage classique. Dans les deux cas, la pyridine, comme solvant, et 5 équiv. par hydroxyle du complexe Py•SO<sub>3</sub>, comme agent de sulfatation, ont été utilisés ([0.1 M] en composé **19**). Le produit est obtenu avec un très bon rendement de 98% pour la réaction effectuée avec les micro-ondes. En revanche, la réaction avec chauffage classique n'était pas complète après 3 jours à 60 °C. Sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H, nous avons observé de nombreux pics non identifiés, ce qui confirme que la sulfatation n'était pas complète. Nous avons donc relancé la réaction dans les mêmes conditions sur le mélange obtenu. Après 3 jours à 60 °C, purification et échange d'ions, le composé **19** a été obtenu avec un rendement de 88% (Schéma 14). De manière intéressante, nous n'avons pas observé de sous-produit *N*-sulfaté dans ces deux réactions. Ceci n'est pas surprenant car la fonction carbamate du composé **17** est plus nucléophile que la fonction amide du composé **19**, ce qui rend la *N*-sulfatation plus facile sur le composé **17**.

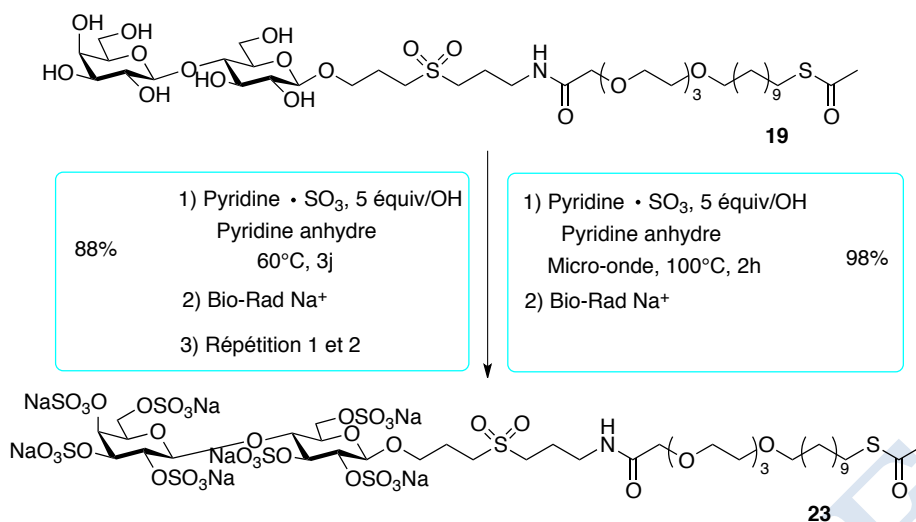


Schéma 14. Synthèse du composé **23** par sulfatation du composé **19**

## 1.7. Préparation du disulfure lactose-C11 et disulfure lactose sulfaté-C11

Nous avons utilisé une méthode décrite dans la littérature pour effectuer la désacétylation de la fonction thioacétate et la formation du disulfure **3** en une étape.<sup>124</sup> Le composé **19** est traité par une solution de méthanolate de sodium (2 équiv.) dans du méthanol sous argon. Il est difficile de suivre la réaction car sur plaque CCM, le composé **19** et son thiol correspondant migrent au même endroit. Mais la formation du thiol peut s'observer en utilisant le révélateur d'Ellman, spécifique des thiols. Après deux jours, le mélange réactionnel est mis à l'air afin de former le disulfure. Encore un jour de réaction, le composé **3** est obtenu avec un très bon rendement de 98% après neutralisation par la résine H<sup>+</sup> (Dowex H<sup>+</sup>), filtration et évaporation (Schéma 15).

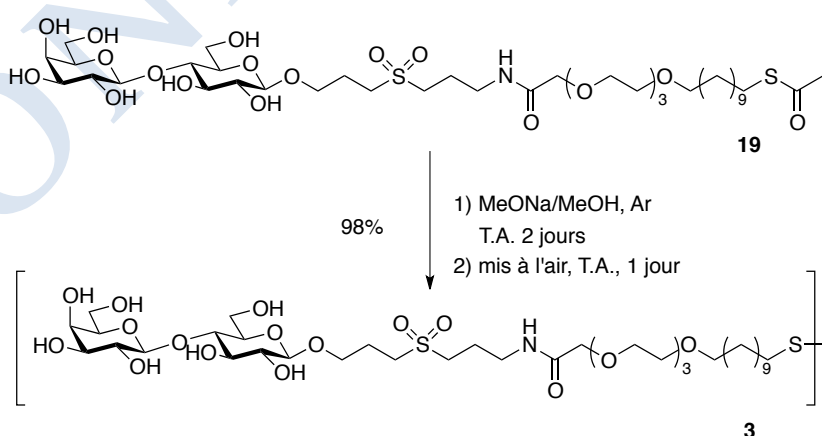


Schéma 15. Synthèse du disulfure lactose-C11

(125) Barrientos, Á. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernández, A.; Penadés, S. *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9*, 1909-1921.

La préparation du composé disulfure lactose sulfaté-C11 **4** a été réalisée par sulfatation du composé **3**. Nous avons d'abord essayé d'effectuer la sulfatation dans des conditions de chauffage classique. Les conditions utilisées étaient les mêmes que pour le composé **19** avec 5 équiv. par hydroxyle du complexe Py•SO<sub>3</sub> dans la pyridine à 60°C pendant 3 jours ([0.1 M] par composé **3**). Nous avons alors logiquement obtenu une sulfatation incomplète et donc un mélange de composés sulfatés. Le composé **4** est obtenu avec un rendement de 98% après avoir remis le mélange précédent dans les mêmes conditions de sulfatation. Une sulfatation avec les micro-ondes a également été réalisée avec 5 équiv. du complexe Py•SO<sub>3</sub> par hydroxyle dans la pyridine ([0.1 M] par composé **3**) à 100 ° C pendant deux heures et nous a donné après purification et échange le produit avec un rendement de 97% (Schéma 16). Cela confirme que le chauffage micro-ondes est plus efficace que le chauffage classique dans ces réactions de persulfatation.

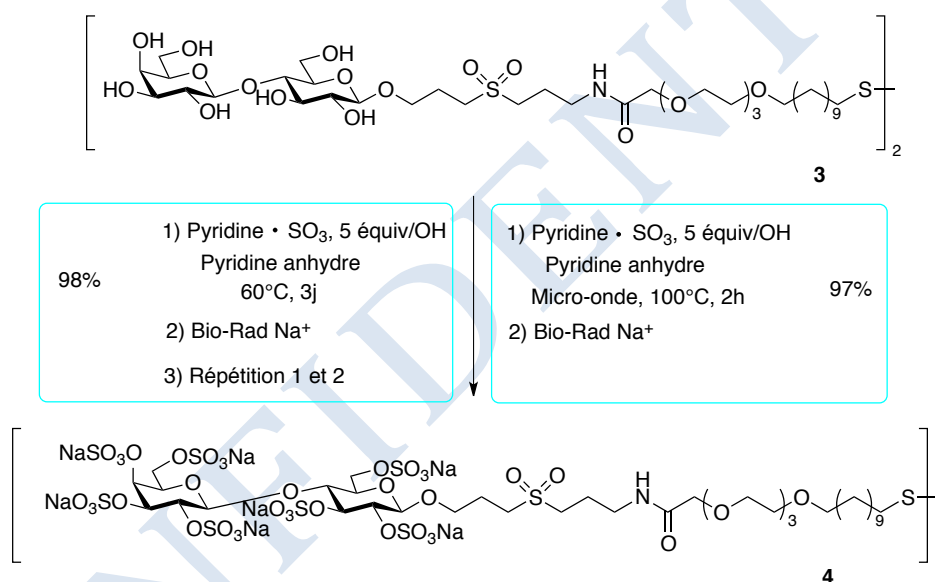


Schéma 16. Synthèse du disulfure lactose sulfaté-C11

## 1.8. Conclusion

Afin de mimer les propriétés biologiques des HS, nous avons préparé des produits sous forme thioacétate et disulfure pour fonctionnaliser les surfaces planes d'or et les nanoparticules d'or. Le composé lactose-C11 thioacétate **19** est synthétisé à l'échelle du gramme avec un rendement total de 31% en 9 étapes. Le composé lactose sulfaté-C11 thioacétate **23** est préparé par sulfatation du composé **19** avec un rendement de 98%. Le composé lactose-C11 disulfure, composé **3**, est synthétisé à partir du composé **19** en une étape avec un rendement de 98% et le composé lactose sulfaté-C11 disulfure, composé **4**, est préparé à partir du composé **3** avec un rendement de 98% en une étape.

## 2. Synthèses des produits pour former les nanoparticules lipidiques

### 2.1. Choix de construction des composés

Pour être plus proche des structures des nanoparticules d'or, les nanoparticules lipidiques que nous souhaitons préparer doivent être des micelles sphériques avec un paramètre d'empilement inférieur à 1/3. Donc, les composés amphiphiles doivent avoir une grande tête hydrophile liée avec une chaîne hydrophobe.

Le cholestérol est un produit naturel composé de quatre cycles qui lui donnent une structure plane et très rigide. Les composés amphiphiles possédant un groupement cholestéryl ont des CMC très faibles car la CMC pour le cholestérol pur est 25-40 nM.<sup>125</sup> Le cholestérol lié avec une chaîne d'éthylène glycol peut former des micelles en phase lamellaire, hexagonale, cubique ou sphérique selon la longueur de la chaîne d'éthylène glycol.<sup>126</sup> Si on rajoute une tête hydrophile comme un monosaccharide ou un disaccharide, ils ont plus de chance de former des micelles sphériques. Par exemple, Faivre *et al*<sup>127</sup> ont préparé un glucoside cholestéryl avec une chaîne de tétraéthylène glycol comme espaceur. Ils ont calculé le paramètre d'empilement. La région que chaque molécule occupe sur l'interface eau-air est de  $56 \text{ \AA}^2$ . Le volume  $v$  est de  $363.7 \text{ \AA}^3$  et la longueur  $l_c$  est  $17.9 \text{ \AA}$ . Donc le paramètre d'empilement calculé est 0.36 soit près de 1/3. Ce composé forme donc des micelles quasi-sphériques dans un environnement hydraté.

L'objectif de ce travail est de synthétiser les composés amphiphiles présentés dans la Figure 50 pour préparer des micelles afin de mimer les propriétés biologiques d'HS. Nous comparerons ensuite les propriétés biologiques obtenues avec ces composés à celles obtenues par auto-assemblage sur surfaces d'or planes et sur nanoparticules d'or. D'après les travaux de la littérature, on peut espérer que ces composés auront des CMC faibles (au dessous de 100 nM) et formeront des micelles sphériques.

---

(126) Haberland, M. E.; Reynolds, J. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1973**, *70*, 2313-2316.

(127) Folmer, B. M.; Svensson, M.; Holmberg, K.; Brown, W. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *213*, 112-120.

(128) Faivre, V.; Bardonnnet, P.-L.; Boullanger, P.; Amenitsch, H.; Ollivon, M.; Falson, F. *Langmuir* **2009**, *25*, 9424-9431.

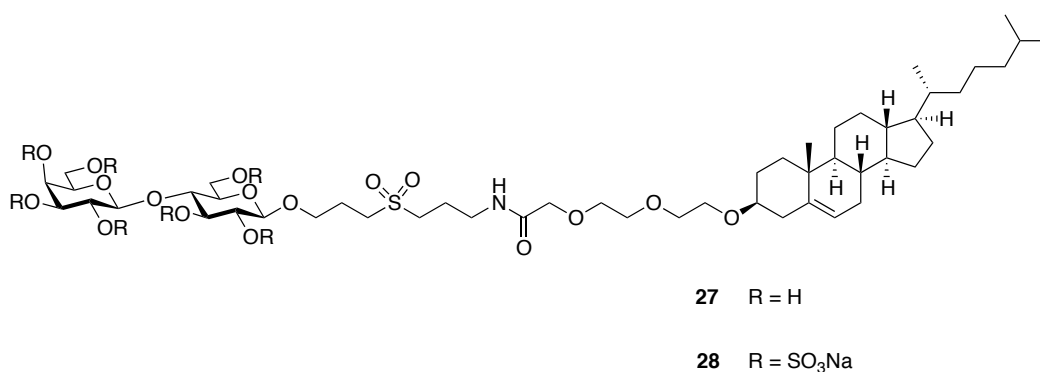


Figure 50. Composés amphiphiles envisagés qui devraient former des micelles

## 2.2. Rétro-synthèse

La préparation du produit lactose-cholestéryl **27** peut s'envisager suivant une stratégie similaire à la préparation du produit lactose-C11, **19**. L'amine **18** peut être couplée à un acide carboxylique activé dérivé du cholestérol. Pour ce faire, nous avons non seulement choisi d'utiliser le *N*-hydroxysuccinimide pour activer l'acide carboxylique comme décrit dans la partie précédente, mais de tester aussi une autre activation de l'acide sous forme de *paranitrophényle* (Figure 51).

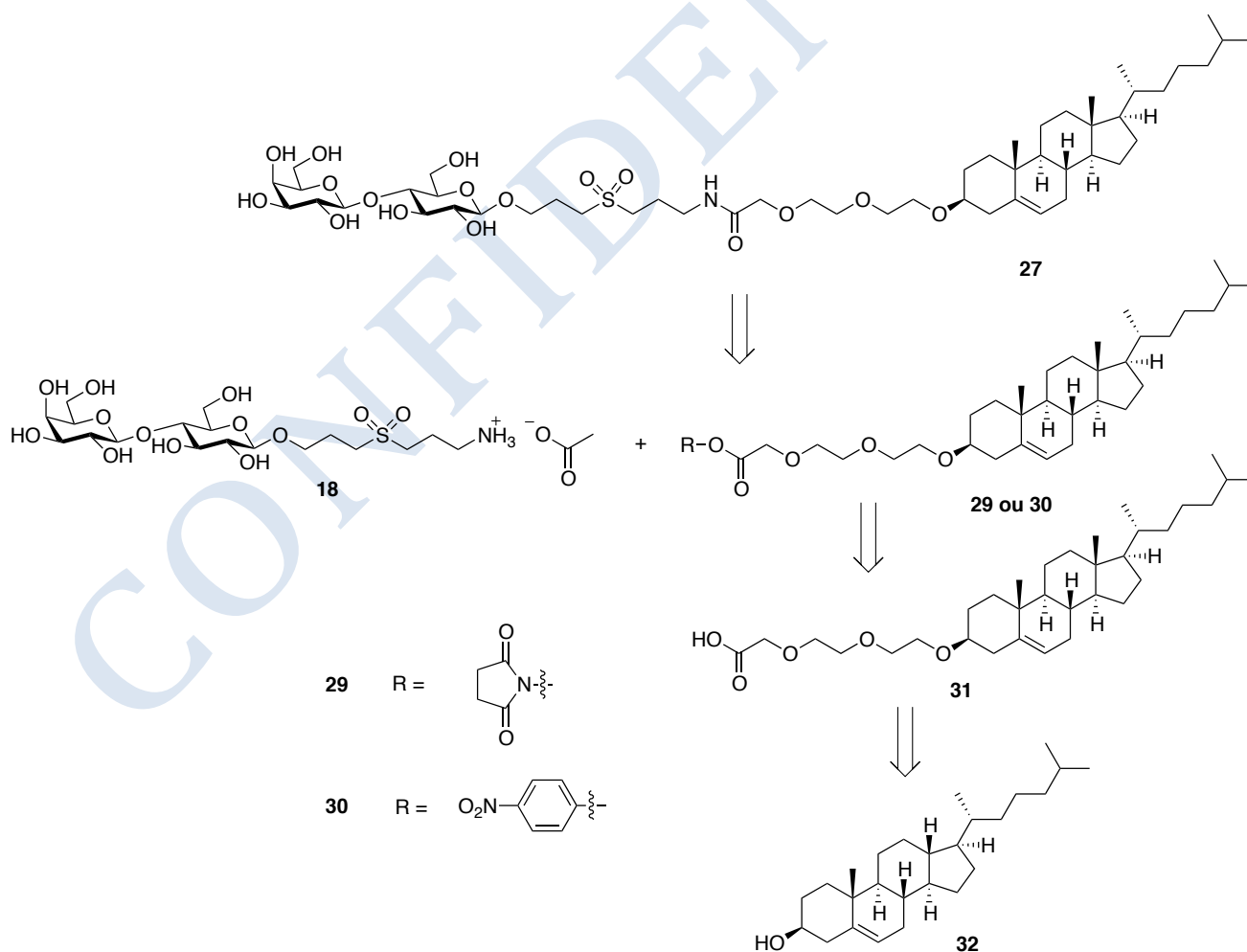


Figure 51. Schéma de rétro-synthèse du lactose-cholestéryl



## 2.3. Préparation du bras cholestéryl

### 2.3.1. Préparation du bras cholestéryl sous forme d'acide carboxylique

La préparation du bras est réalisée en suivant un protocole décrit.<sup>128</sup> La fonction hydroxyle du cholestérol **32** est tout d'abord activée sous forme de tosylate avec 1.2 équiv. du chlorure de tosylé dans le pyridine. Le composé **33** ainsi obtenu est ensuite traité avec 40 équiv. de triéthylène glycol dans le dioxane à reflux pendant une nuit. Le composé **34** est obtenu avec un rendement de 53% pour les deux étapes (Schéma 17).

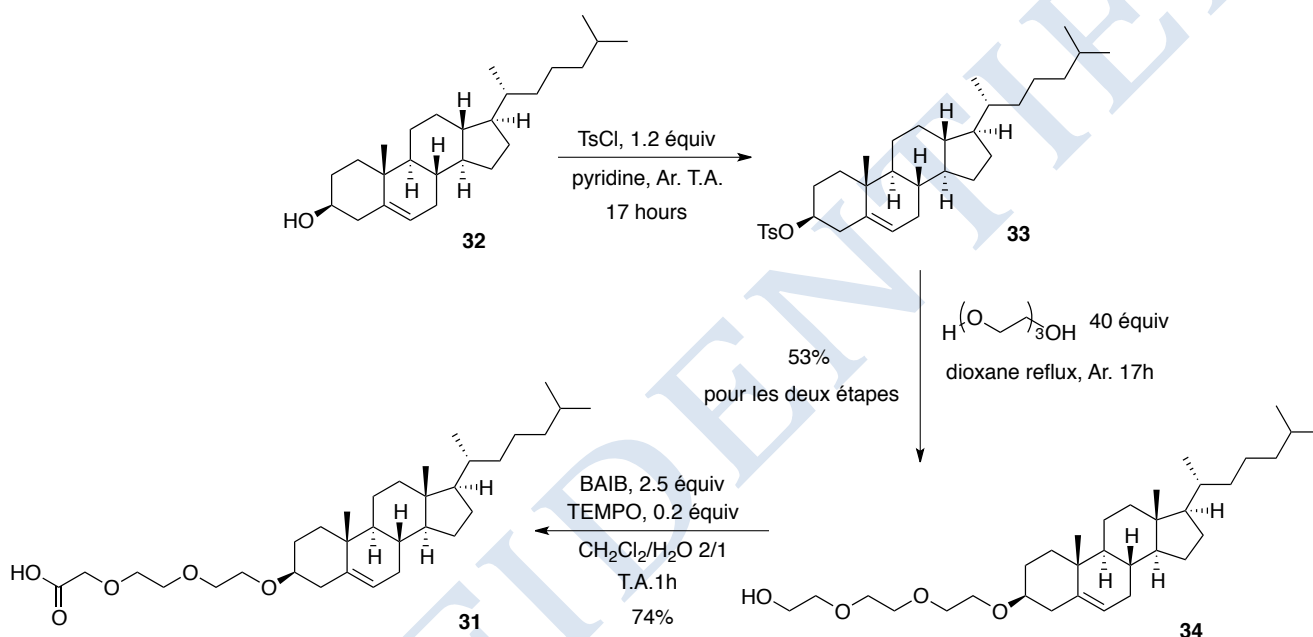


Schéma 17. Préparation du bras cholestéryl

Nous avons trouvé qu'il n'y a pas d'inversion de stéréochimie après la réaction de substitution nucléophile du composé **33** à **34**. Cela peut s'expliquer par la conformation du cholestérol, qui est présenté dans la Figure 52. Le groupement 3-hydroxyle est en position équatoriale et il est difficile de faire une  $S_N2$  car l'approche du nucléophile est bloquée par les deux protons 1,3-diaxiaux. Donc la réaction de type  $S_N1$  est plus facile que la  $S_N2$  à cette position. De plus, le carbocation formé est assez stable grâce à la double liaison en formant un cation homoallylique comme présenté dans la Figure 53. L'attaque du nucléophile peut se passer en position 3 pour former le produit cholestéryl 3 $\beta$ -dérivé (réarrangement *i*-stéroïde) ou en position 6 pour former le produit 6 $\beta$ -substitué-3 $\alpha$ ,5-cyclostéroïde (réarrangement retro-*i*-stéroïde).<sup>129</sup> Très peu d'attaque nucléophile se passe à la position 3 $\alpha$  ou 6 $\alpha$ .<sup>130</sup>

(129) Menger, F. M.; Azov, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6492-6493.

(130) Kosower, E. M.; Winstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4347-4354.

Nous avons eu seulement 53% de rendement pour les deux étapes à cause de la faible réactivité. Nous ne pouvons pas exclure le produit 6 $\beta$ -substitué-3 $\alpha$ ,5-cyclostéroïde mais par la présence et l'intégration de la double liaison sur la spectre RMN  $^1\text{H}$ , nous pouvons dire que le produit substitué en 3 est largement majoritaire.

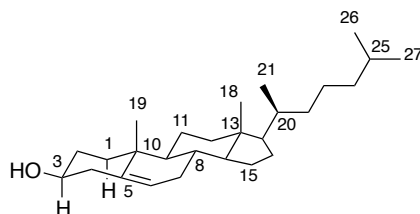


Figure 52. La conformation chaise du cholestérol

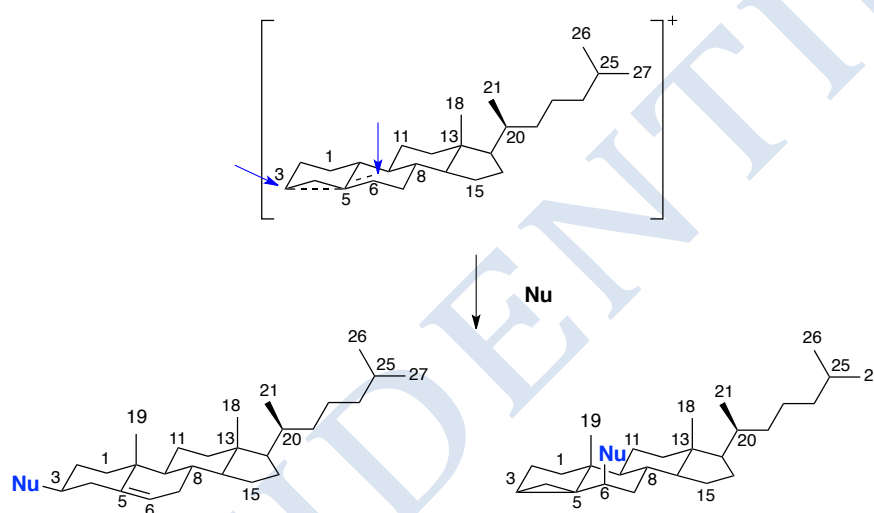


Figure 53. Le cation homoallylique, un intermédiaire dans  $\text{S}_{\text{N}}1$  du cholestérol et les deux produits

L'oxydation d'un alcool primaire en acide carboxylique peut être effectuée avec différents oxydants ( $\text{KMnO}_4$ , PDC,  $\text{RuO}_4$  etc...). Dans le protocole décrit pour obtenir le composé **31**,<sup>129</sup> les auteurs ont utilisé le réactif de Jones : une solution de trioxyde de chrome dans l'acide sulfurique concentré. Mais ce réactif est assez toxique et nous souhaitons utiliser un oxydant plus facile d'utilisation et éco-compatible.

En 1975, Cella et ses collègues ont montré qu'un alcool primaire peut être oxydé en acide carboxylique par de l'acide métachloroperbenzoïque (m-CPBA) en présence de 2,2,6,6-tétraméthylpiperidine (TMP) comme catalyseur.<sup>131</sup> En fait, le m-CPBA oxyde la fonction amine secondaire de la TMP pour conduire à un radical stable, le (2,2,6,6-tétraméthylpiperidin-1-yl)oxyl ou TEMPO, qui est le véritable

(131) Freiberg, L. A. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2476-2479.

(132) Cella, J. A.; Kelley, J. A.; Kenahan, E. F. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1860-1862.

agent oxydant. En 1997, l'équipe de Piancatelli a réalisé l'oxydation d'alcool primaire en présence du couple TEMPO/BAIB dans un mélange CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O. Piancatelli a également proposé le mécanisme d'oxydation (Figure 54). En présence d'acide, deux molécules de TEMPO se dismutent en ion oxoammonium et hydroxylamine. L'ion oxoammonium va oxyder l'alcool en aldéhyde en produisant une molécule d'hydroxylamine. Les deux molécules d'hydroxylamine sont ensuite réoxydées en TEMPO par le BAIB en produisant deux molécules d'acide acétique. Le sel d'oxoammonium n'oxyde pas l'aldéhyde en acide carboxylique dans des conditions anhydres. Mais en présence d'eau, l'aldéhyde va être en équilibre avec le diol géminale correspondant, qui pourra être oxydé par le sel d'oxoammonium et produire l'acide carboxylique.<sup>133</sup>

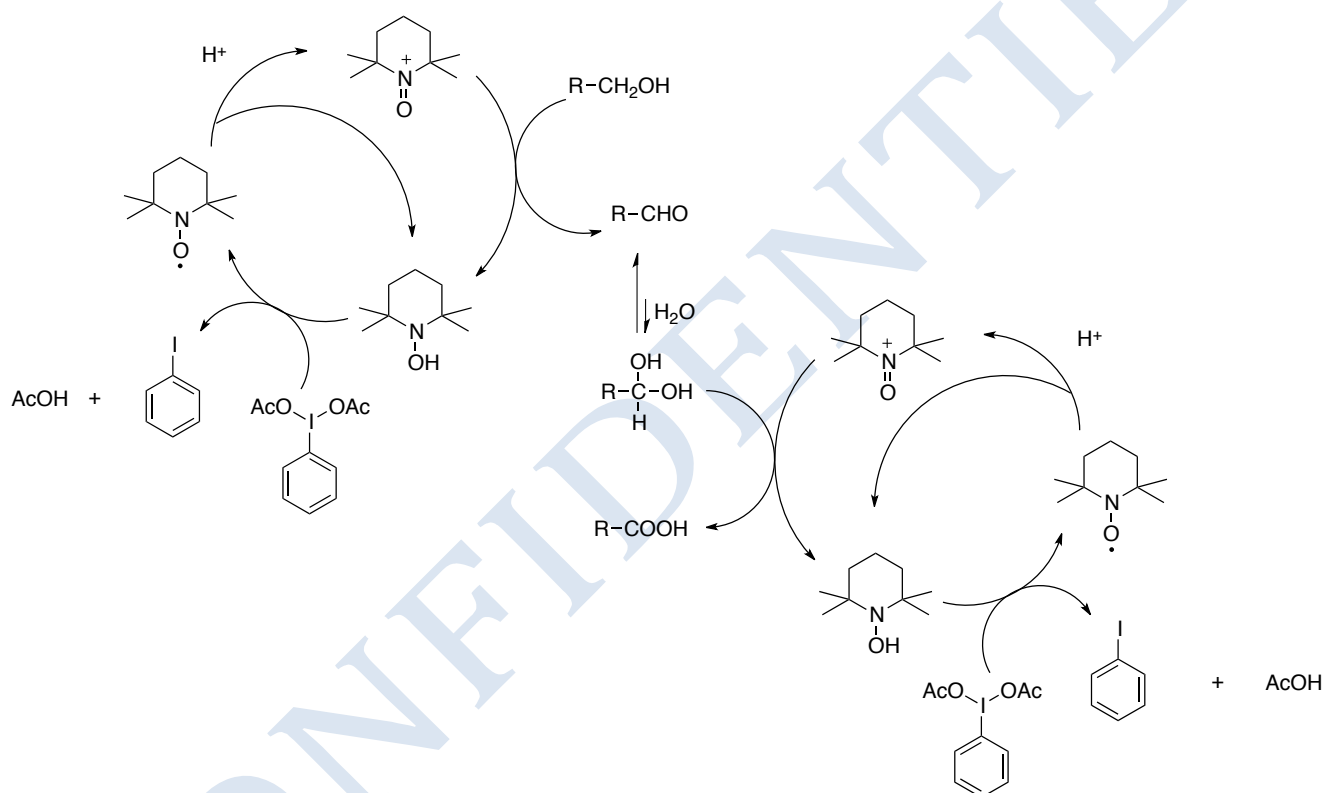


Figure 54. Le mécanisme de l'oxydation avec le système TEMPO et BAIB

En 1999, une oxydation en acide carboxylique de l'alcool primaire a été utilisée en utilisant le bis(acétoxy)iodobenzène (BAIB) en présence de TEMPO en quantité catalytique dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.<sup>134</sup> Depuis, ces conditions ont largement été utilisées dans tous les domaines, des petites molécules aux polymères.<sup>135, 136, 137</sup> En effet, un intérêt majeur de l'utilisation de TEMPO est

(133) Sen, V. D.; Golubev, V. A. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2009**, *22*, 138-143.

(134) Nooy, A. E. J. d.; Besemer, A. C.; Bekkum, H. v. *Synthesis* **1996**, *1996*, 1153-1176.

(135) De Mico, A.; Margarita, R.; Parlanti, L.; Vescovi, A.; Piancatelli, G. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6974-6977.

(136) van den Bos, L. J.; Litjens, R. E. J. N.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Org. Lett.* **2005**, *7*,

l'excellente chimiosélectivité dans l'oxydation des alcools primaires par rapport aux secondaires. De plus, en fonction des conditions de réactions il est possible d'arrêter l'oxydation à l'étape de l'aldéhyde. Comme présenté dans le Schéma 17, le composé **34** a été oxydé en présence de 2.5 équiv. de BAIB et 0.2 équiv. de TEMPO dans un mélange de solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O pendant 1 heure. Le composé **31** est ainsi obtenu après une chromatographie gel de silice avec un rendement de 74%.

### 2.3.2. L'activation de l'acide carboxylique du bras cholestéryl

L'activation sous forme succinimidyl est effectuée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour activer le composé **10**. La réaction est réalisée avec 1.2 équiv. de *N*-hydroxysuccinimide, 1.2 équiv. d'EDC•HCl et 1.2 équiv. de Et<sub>3</sub>N dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le composé **29** est obtenu après un lavage à l'eau pour enlever l'excès d'*N*-hydroxysuccinimide et d'EDC•HCl avec un rendement brut de 90% et sera utilisé ainsi dans la réaction suivante (Schéma 18).

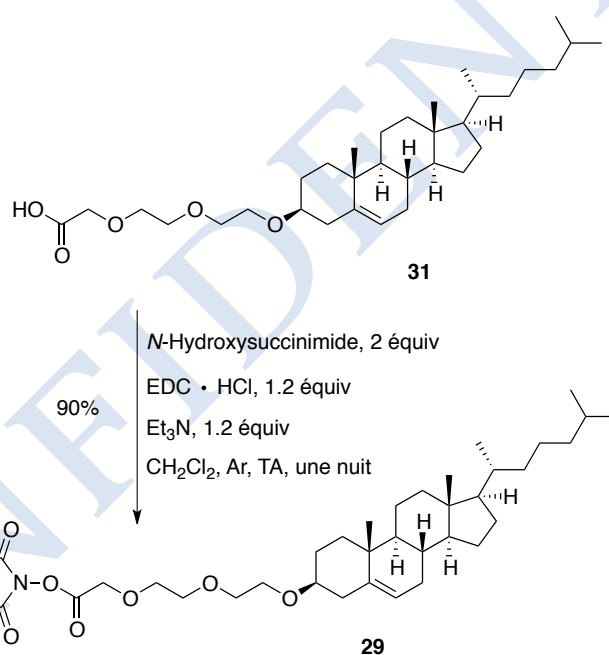


Schéma 18. L'activation de l'acide carboxylique du bras cholestéryl sous forme succinimidyl

L'activation de l'acide carboxylique a aussi été effectuée en mettant le groupement *p*-nitrophenyle. Suivant la publication de Mobashery,<sup>138</sup> 10 équiv. de *paranitrophenyle* trifluoroacetate sont utilisés pour cette réaction (Schéma 19). Nous avons essayé de purifier le mélange réactionnel par

2007-2010.

(137) Manabe, S.; Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9754-9755.

(138) Masson, C.; Scherman, D.; Bessodes, M. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, *39*, 4022-4024.

(139) Heseck, D.; Lee, M.; Morio, K.-i.; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2137-2146.

chromatographie sur gel de silice ou par chromatographie d'exclusion stérique. Mais malheureusement, nous n'avons pas pu isoler le produit **30** propre. Ce dernier est toujours obtenu contaminé par du *paranitrophenol*. Comme ce contaminant ne doit pas gêner dans la réaction avec une amine, un essai de couplage a quand même été réalisé avec ce composé contaminé (voir chapitre II, paragraphe 2.4.).

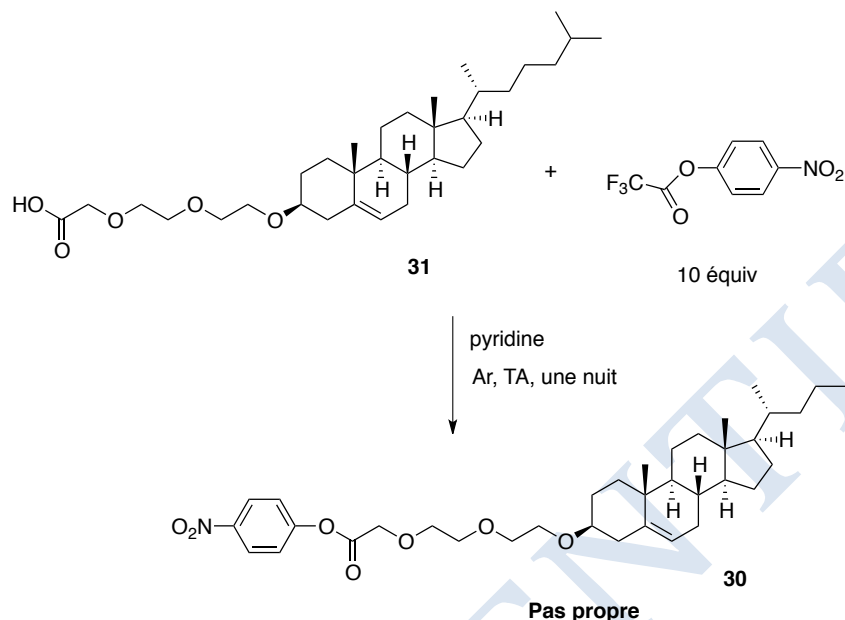
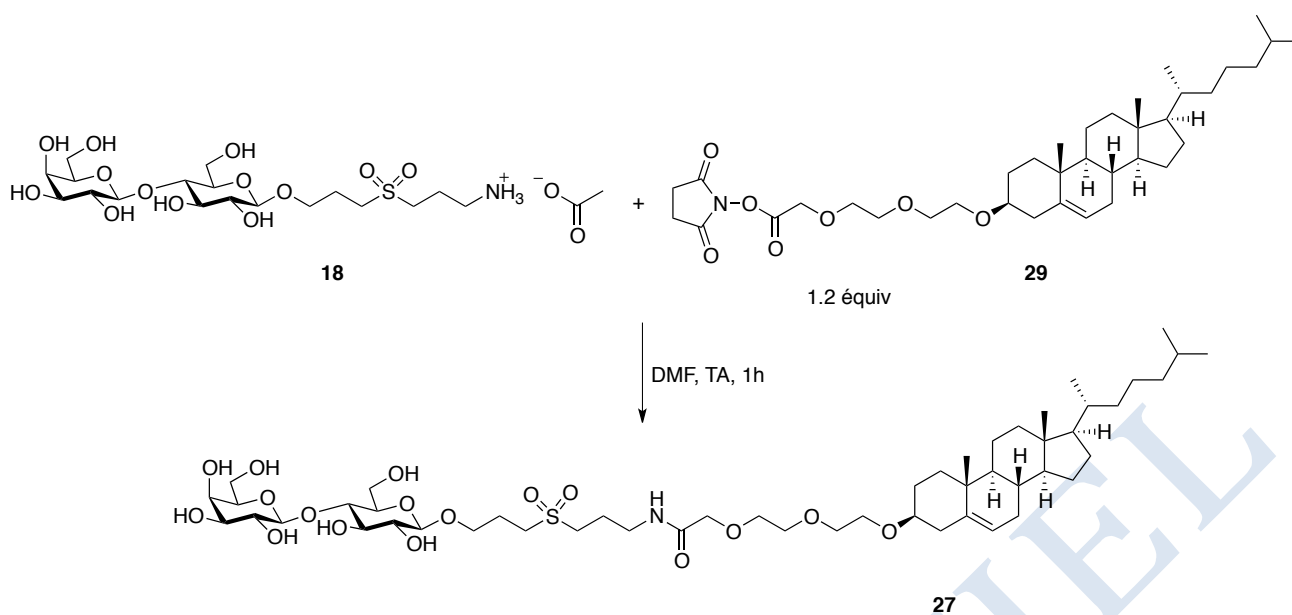


Schéma 19. L'activation de l'acide carboxylique du bras cholestéryl sous forme *paranitrophényl*

## 2.4. Préparation du produit lactose-cholestéryl

Le couplage entre l'amine **18** et l'acide carboxylique activé **29**, a d'abord été réalisé dans les conditions utilisées pour préparer le composé **19**. La réaction est effectuée avec 1.2 équiv. du composé **29** et 1.2 équiv. de Et<sub>3</sub>N dans un mélange de solvant CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 2/1. Ce mélange réactionnel n'étant pas homogène, nous avons choisi d'utiliser le DMF. Dans ce solvant, la réaction est terminée en une heure à température ambiante. Dans ce dernier cas, nous avons obtenu le composé **27** sans ajout de Et<sub>3</sub>N (Schéma 20).



Par contre, nous avons eu des problèmes pour purifier le composé **27** à cause de son caractère amphiphile. Dans un premier temps, nous avons voulu utiliser une chromatographie phase-inverse pour la purification. Mais le produit reste dans la colonne, car il n'est pas bien soluble dans la plupart des solvants organiques. Nous avons ensuite essayé de le purifier par chromatographie d'exclusion stérique avec une colonne Sephadex LH20 (débit 0.8 mL/min) dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1/1. Après 2 purifications successives, nous avons obtenu très peu de produit propre. La plupart du produit est contaminé par des sous produits. En diminuant le débit de la colonne d'exclusion stérique à 0.1 mL/min, nous avons pu obtenir le produit propre avec un rendement de 81%. Mais le grand désavantage de ce type de purification est la limite de la quantité que l'on peut déposer sur la colonne. Nous avons donc continué à chercher une méthode de purification plus adaptée. Nous avons essayé de faire une recristallisation dans de l'EtOH, mais sans succès. Nous avons essayé d'effectuer une purification par chromatographie sur gel de silice. Tout d'abord, en utilisant comme éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  avec 0.1% de  $\text{Et}_3\text{N}$ , nous avons récupéré seulement 38% de produit. Finalement, la meilleure solution a été de faire une extraction du produit avec de l'AcOEt pour éliminer le plus possible la *N*-hydroxysuccinimide, puis de faire une chromatographie sur gel de silice en utilisant un autre système d'éluant AcOEt/EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (8/3/0.5 à 8/3/1), suivie par une colonne d'exclusion stérique (Sephadex LH20) ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1/1) pour éliminer la silice dissoute dans le produit. Nous avons ainsi pu isoler le produit **27** pur avec un rendement de 64%.

Comme présenté dans le Schéma 21, l'essai du couplage entre l'amine **18** et l'acide carboxylique activé par *paranitrophényl* **30** (contaminé par du *paranitrophénole*) est effectué aussi dans le DMF à

température ambiante pendant 1 heure. Après une colonne d'exclusion stérique à un débit de 0.1 mL/min, le composé **27** est obtenu avec un rendement de 75% (purifié par la chromatographie d'exclusion sphérique). Comparé avec le rendement du couplage de 81% (purifié par la chromatographie d'exclusion sphérique) avec le composé succinimidyl **29**, il n'y a pas beaucoup de différence. C'est-à-dire que le *paranitrophénole* n'a pas d'influence sur le couplage.

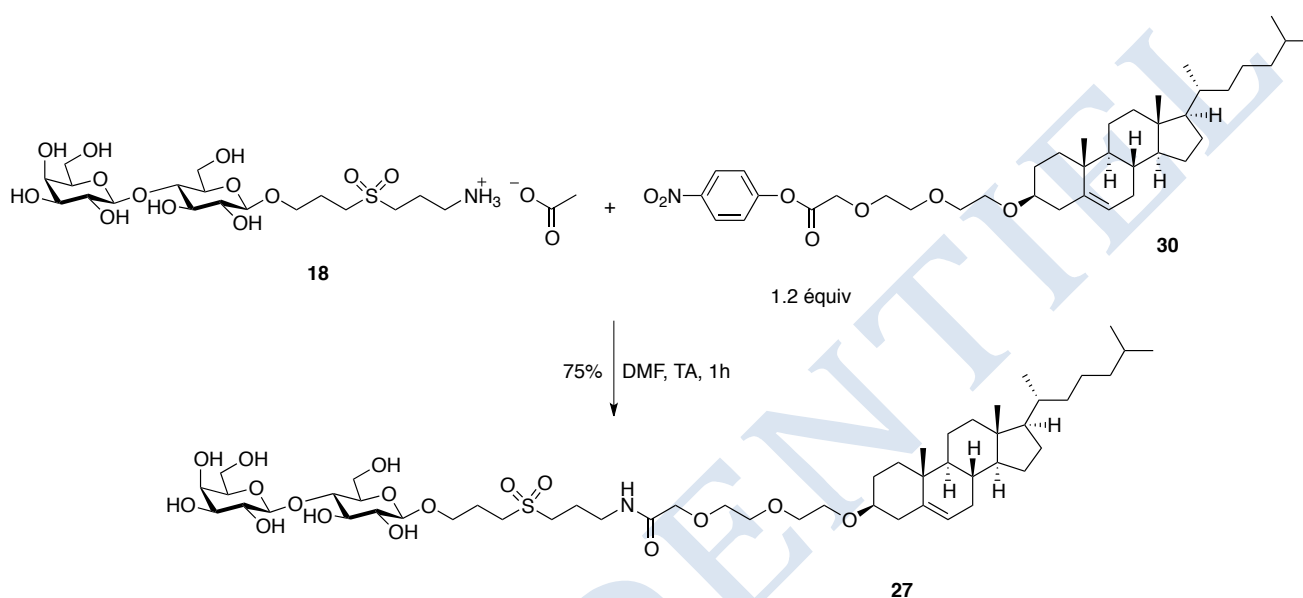


Schéma 21. Préparation du produit lactose-cholestéryl par le bras *paranitrophényle*

## 2.5. Préparation du produit lactose sulfaté-cholestéryl

Comme précédemment pour la préparation du produit lactose sulfaté-C11, la sulfatation peut être effectuée soit avant, soit après couplage.

### 2.5.1. Sulfatation avant le couplage

Le couplage entre le composé sulfaté **24** et le composé **29** est effectué dans les mêmes conditions que lors de la préparation du composé **23**. Par contre, le composé **24** sous forme sel de sodium n'est pas très soluble dans le DMF. Un échange sous forme tétrabutylammonium permet de solubiliser le composé et d'avoir un mélange réactionnel homogène. Mais cependant comme pour le composé **23**, le couplage entre le dérivé cholestéryl et le composé per-sulfaté n'a pas bien marché et seulement 35% du composé désiré **28** a été obtenu en récupérant beaucoup de produit départ (60%), présenté dans le Schéma 22. Nous avons donc opté pour la sulfatation après couplage.





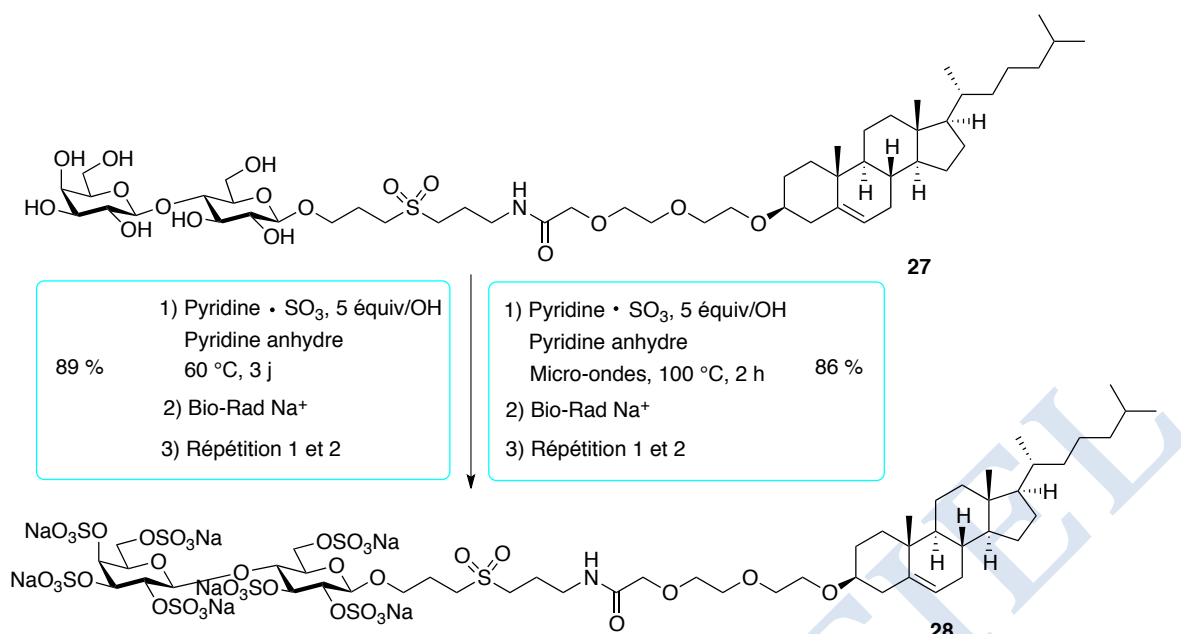


Schéma 23. Préparation du produit lactose sulfaté-cholestéryl par sulfatation après le couplage

## 2.6. Analyse RMN pour les produits cholestéryl

Le caractère amphiphile des composés **27** et **28** les rend peu solubles dans la plupart des solvants deutérés. Nous ne souhaitons pas utiliser le DMSO deutéré, même si les spectres RMN sont bien résolus pour les deux composés, car la récupération des produits ensuite est difficile. Avec les essais de purification précédents, on sait que le composé **27** est soluble dans un mélange de solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, donc nous avons essayé d'utiliser un mélange des solvants deutérés CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD pour faire les spectres RMN. Différents ratio ont été testés et c'est avec le mélange CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD, 25/75 que nous avons obtenu les meilleurs résultats. Les spectres RMN <sup>1</sup>H avec les différents ratios de solvants sont présentés dans la Figure 55.

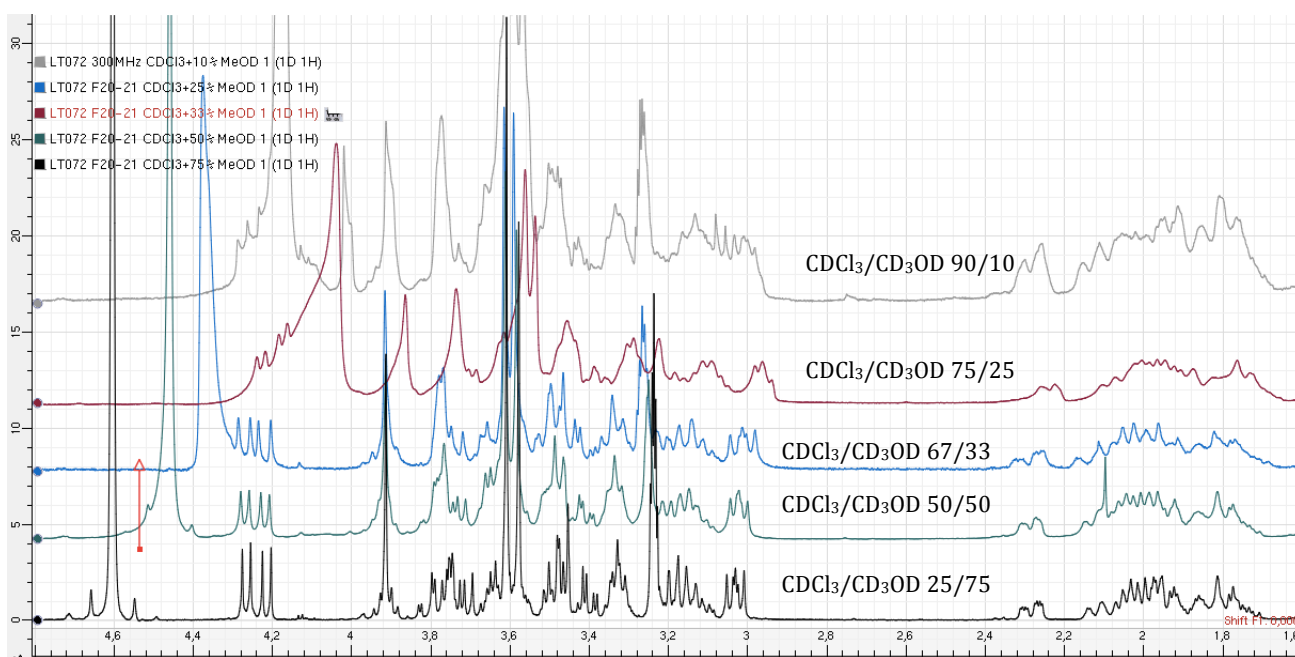


Figure 55. RMN  $^1\text{H}$  du produit lactose-cholestéryl en "solution" dans des mélanges  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  en différentes proportions

Le composé **28** semble soluble à l'œil nu dans  $\text{D}_2\text{O}$  mais le spectre RMN  $^1\text{H}$  n'est pas très bien résolu à température ambiante. Nous avons donc fait la RMN en chauffant. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  à différentes températures sont présentés dans la Figure 56. Plus la température est haute, mieux le spectre RMN  $^1\text{H}$  est résolu. Compte tenu du fait que le pic d'eau bouge avec le changement de la température, c'est le spectre à 315K qui apporte le plus d'informations.

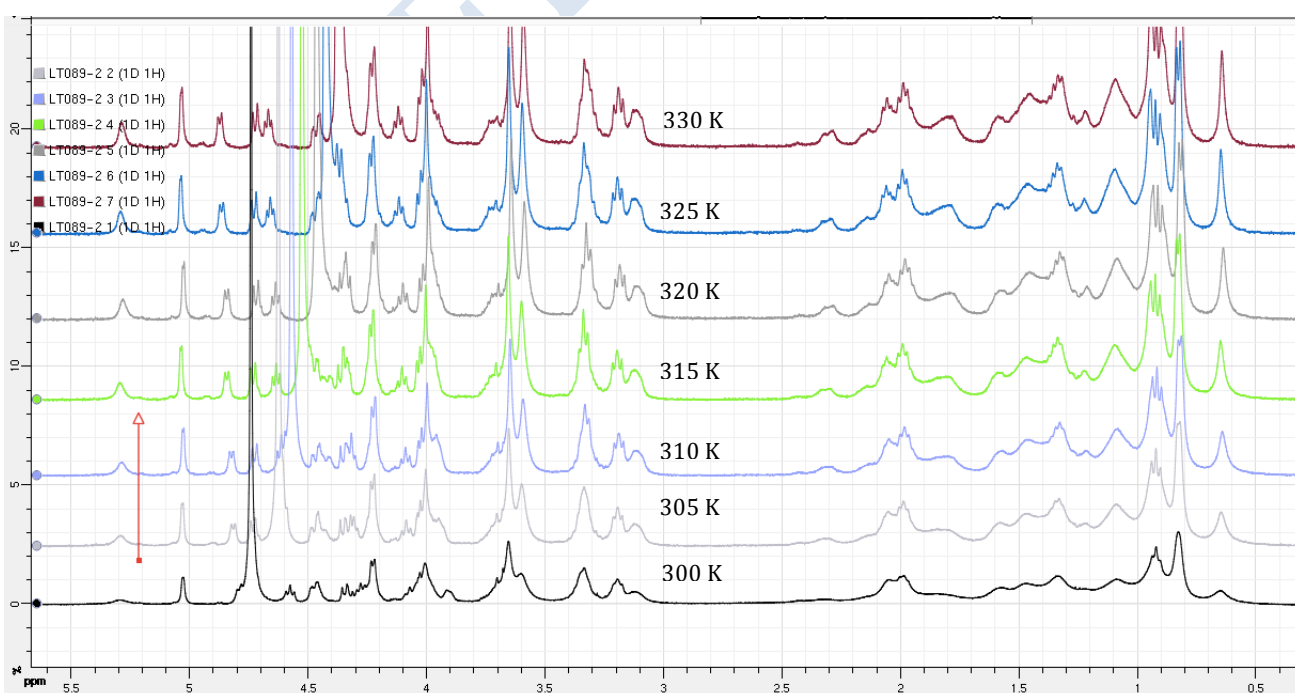


Figure 56. RMN  $^1\text{H}$  du produit lactose sulfaté-cholestéryl à différentes températures

## 2.7. Conclusion

Nous avons synthétisé les composés amphiphiles **27** et **28** pour préparer les nanoparticules lipidiques afin de comparer leurs propriétés d'auto-assemblage avec celles obtenues pour les nanoparticules d'or. Le composé **27** est obtenu en 8 étapes à partir de l'allyllactose et du cholestérol avec un rendement total de 28%. Le composé **28** est obtenu par sulfatation du composé **27** avec un rendement de 89%.

CONFIDENTIEL

## Chapitre III : Application des conditions optimisées aux disaccharides utilisés dans la synthèse des fragments d'HS

### 1. Rétro-synthèse des disaccharides composant les fragments d'HS

Depuis plusieurs années dans le cadre du Labex LERMIT, notre laboratoire cherche à identifier un ou des fragments d'HS qui reconnaîtront CXCL12 $\alpha$  sélectivement et avec une très bonne affinité. Pour ce faire, les synthèses des trois différentes briques disaccharidiques **36-38** ont été optimisées. Puis ces briques ont été préparées par un prestataire externe à l'échelle de plusieurs grammes.<sup>139</sup> Dans ces briques, les groupements acétates correspondent aux positions sulfatées dans les produits finaux et les groupements benzyles et *paramethoxybenzyle* aux hydroxyles qui seront libres. L'azoture peut être réduit et l'amine obtenue peut être acétylée ou sulfatée. Parmi les trois disaccharides, présentés dans la Figure 57, le composé **36** est celui qui aura le moins de groupements sulfates (0) et le composé **37** celui qui en aura le plus (2 *O*-sulfatés et 1 *N*-sulfaté). Dans la continuation des études menées avec les composés lactose et lactose sulfaté, les deux disaccharides **36** et **37** seront fonctionnalisés en vue de réaliser des auto-assemblages combinatoires sur les surfaces d'or planes, des nanoparticules d'or et des nanoparticules lipidiques. L'activité biologique des surfaces résultantes sera testée sur les protéines qui ne peuvent être différenciées par des surfaces combinatoires n'intégrant que les composés lactose et lactose sulfaté.

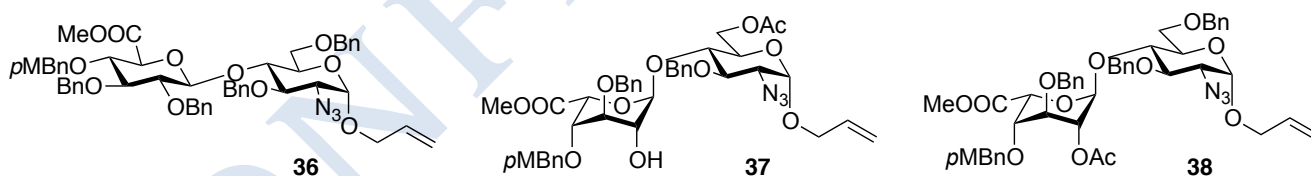


Figure 57. Briques protégées, intermédiaires dans les synthèses de fragments d'HS développées au laboratoire

Pour la fonctionnalisation des deux disaccharides **36** et **37**, nous souhaitons appliquer la même stratégie de synthèse que dans le chapitre précédent. La préparation du bras succinimide-OOC-PEG<sub>3</sub>-C<sub>11</sub>-SAC **11** et du bras succinimide-OOC-PEG<sub>2</sub>-cholesteryl **29** sont décrits dans le chapitre II. L'étape de couplage peut être réalisée avant l'enlèvement du benzyle ou après.

(140) Gavard, O.; Hersant, Y.; Alais, J.; Duverger, V.; Dilhas, A.; Bascou, A.; Bonnaffé, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003, 3603-3620.

L'avantage de réaliser le couplage avant toute déprotection est que le composé est plus hydrophobe donc la solubilité des composés est plus proche de celle des deux bras, le bras pegylé en C11 et le bras cholestéryl. Donc, le mélange réactionnel devrait être plus homogène qu'avec les produits déprotégés. Mais il y a un grand désavantage. L'enlèvement du groupement benzyle s'effectue par hydrogénolyse avec un catalyseur métallique. Les deux bras n'aiment pas ces conditions. Le premier comporte un groupement thioacétate et les composés soufrés sont connus pour empoisonner le catalyseur métallique.<sup>140</sup> Le second comporte une double liaison qui peut être sensible aux conditions d'hydrogénolyse.<sup>141</sup> Aussi, il nous a semblé beaucoup plus judicieux de mettre au point des voies de synthèses dans lesquelles le couplage est effectué après l'enlèvement des groupements benzyles. Dans cette optique : à partir du composé **36**, le composé **39** peut être obtenu par réaction thiol-ène, ce qui permet d'introduire le groupement NHCbz. La réduction de l'azoture et l'acétylation de l'amine ainsi formée, suivie de l'oxydation du thioéther en sulfone puis de la déprotection de l'ester devrait conduire à l'acide carboxylique **42** désiré (Figure 58).

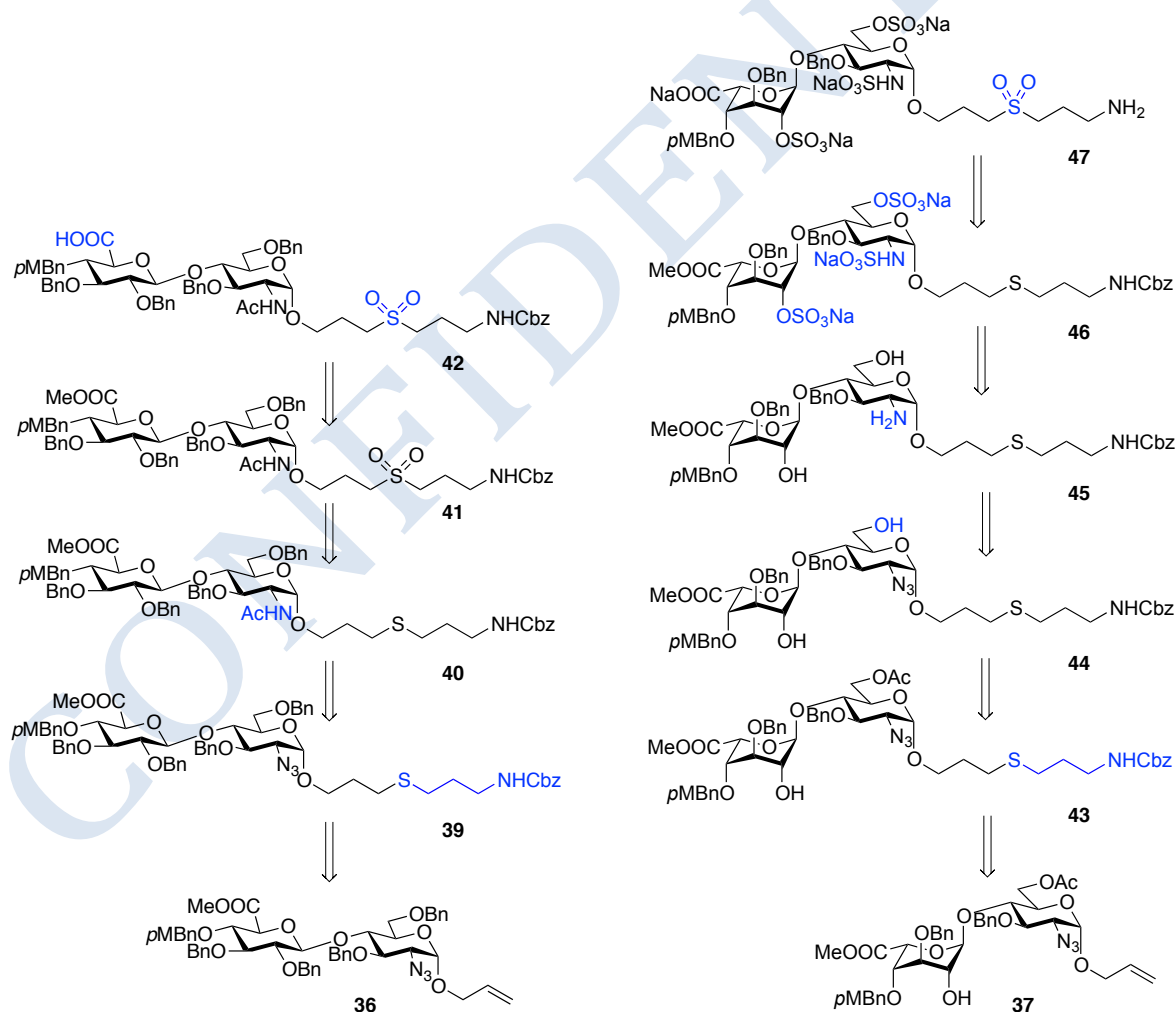


Figure 58. Retro-synthèse des disaccharides **42** et **47**

(141) Bartholomew, C. H. *Applied Catalysis A: General* **2001**, *212*, 17-60.

(142) Okamoto, K.; Akiyama, R.; Kobayashi, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2871-2873.

La même stratégie peut être utilisée pour préparer le composé **47**. Mais dans ce cas là, après réduction de l'azoture, l'amine est sulfatée en même temps que les hydroxydes libres obtenus après enlèvement de l'acétate (Figure 57).

## 2. Préparation de la brique glucuronique (GlcUA)

### 2.1. Réaction thiol-ène pour introduire le groupement NHCbz

Le couplage thiol-ène est effectué dans les conditions décrites dans la publication<sup>111</sup> en présence du disaccharide **36**, synthétisé par un prestataire de service, et du thiol **13** (2 équiv) avec 1.2 équiv. de catéchol, 1.2 équiv. de  $\text{BEt}_3$  dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La réaction a été faite à une concentration de 0.75 M en produit **36** et à l'échelle du gramme. Le composé **39** est obtenu avec un rendement de 85% après purification par chromatographie sur gel de silice (Schéma 24).

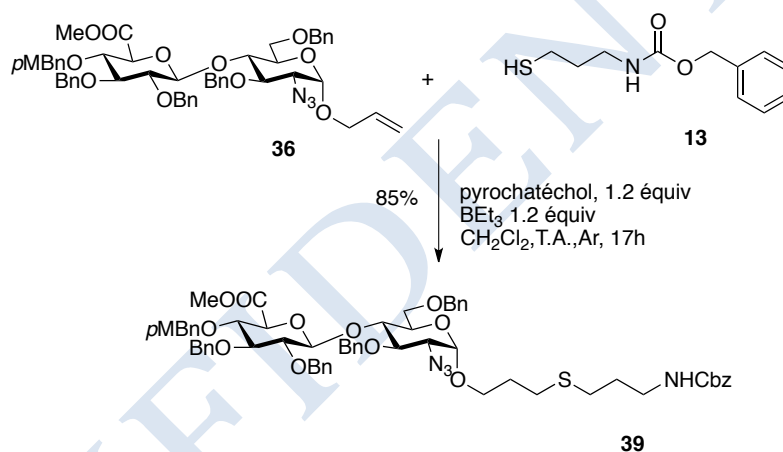


Schéma 24. Réaction thiol-ène sur le disaccharide **36**

### 2.2. Réduction de l'azoture et acétylation de l'amine

La réduction et l'acétylation du composé **39** est réalisée en une seule étape. Le groupement azoture est réduit par 20 équiv. de propane-1,2-dithiol en présence de 20 équiv. de  $\text{Et}_3\text{N}$  comme base dans du  $\text{MeOH}$ . Après 2 jours de réaction à l'abri de la lumière, le milieu réactionnel est concentré et l'amine est acétylée avec 35 équiv. d' $\text{Ac}_2\text{O}$  dans la pyridine. Le composé **40** est obtenu avec un rendement de 72% après une purification par chromatographie sur gel de silice (Schéma 25).

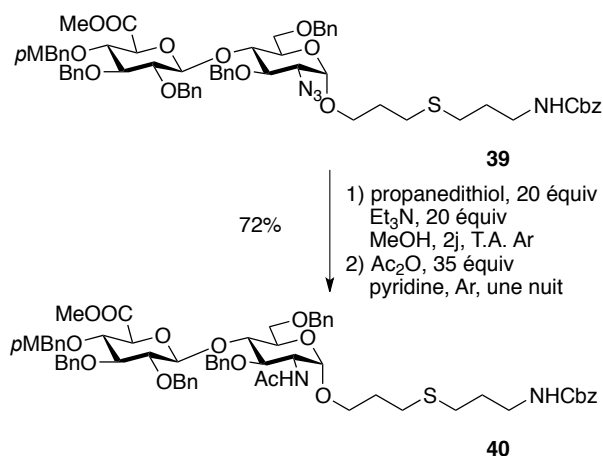


Schéma 25. Réduction du groupement N<sub>3</sub> et acétylation de l'amine sur le composé **39**

### 2.3. Oxydation du thioéther en sulfone

Nous avons tout d'abord pensé à faire l'oxydation et la saponification en même temps avec 115 équiv. de KOH et 345 équiv. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un mélange de solvants nBuOH/THF, 1/1 comme cela est fait au laboratoire sur des fragments plus longs. Cette réaction est réalisée au début à basse température (0°C) puis à température ambiante afin d'éviter une β-élimination. Mais, en utilisant ces conditions, aucun produit de saponification n'a été observé. De plus, dans ces conditions, l'oxydation du thioéther n'était pas complète. En effet, après une nuit à température ambiante, nous pouvons observer par CCM la sulfone, le sulfoxyde et même le thioéther de départ (Schéma 26). Même en chauffant jusqu'à 37°C, la réaction n'a pas évoluée. Nous avons donc décidé d'étudier les deux réactions séparément.

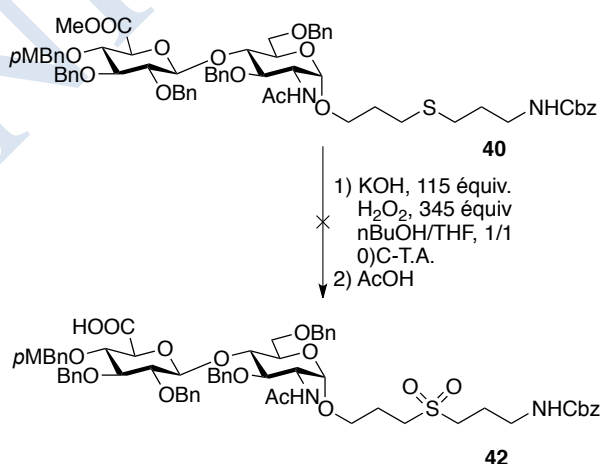


Schéma 26. Essai de réaction « one-pot » pour l'oxydation et la saponification du composé **40**

L'oxydation du thioéther **40** en composé sulfone **41** est réalisée avec des conditions un peu modifiées par rapport à celles utilisées pour l'oxydation du dérivé lactose. En effet, le composé **40** n'est pas

soluble dans l'eau, nous avons donc travaillé en transfert de phase dans un mélange biphasique H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le produit est dissout dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à une concentration de 75 mM, puis 0.1 équiv. de Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub> est ajouté comme agent de transfert de phase. Un mélange d'une solution de KHSO<sub>5</sub> (3 équiv.) qui est utilisé sous forme d'oxone et d'une solution aqueuse de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6 équiv.) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sert à neutraliser l'acidité de l'oxone et de l'hydrogénosulfate. Le composé **41** est obtenu avec un rendement de 91% après une purification par chromatographie sur gel de silice (Schéma 27).

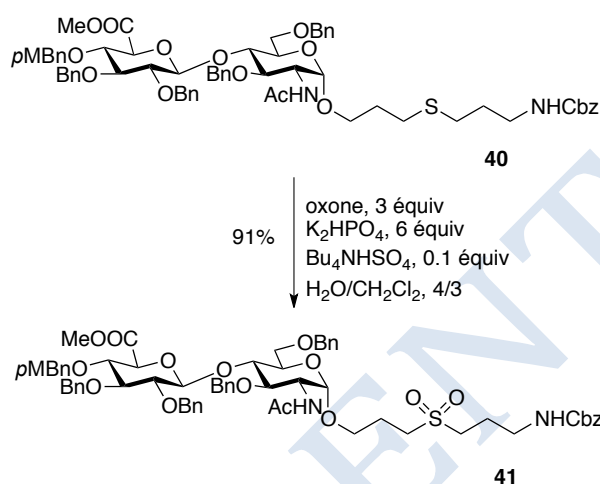


Schéma 27. Oxydation du thioether en sulfone pour le disaccharide **41**

## 2.4. Saponification

En 1984, Laganis et Chenard ont montré que les ions silanolate (R<sub>3</sub>SiO<sup>-</sup> et souvent TMSO<sup>-</sup>) peuvent être utilisés pour réaliser des réactions de transestérification en solvant organique. Les esters silylés formés s'hydrolysant lors du traitement, cette réaction correspond formellement à une saponification. Ainsi, les méthyles dans les esters méthyliques peuvent être enlevés par les silanolate avec de bons rendements.<sup>142</sup> Parmi les silanolate, le TMSONa et le TMSOK sont plus réactifs que le TMSOLi. De plus, comme le pK<sub>a</sub> du couple TMSOH/TMSO<sup>-</sup> dans l'eau est de 12.7, donc inférieur à celui de H<sub>2</sub>O/HO<sup>-</sup> de 15.7, TMSO<sup>-</sup> peut être plus considéré comme un équiv. de HOO<sup>-</sup> que de HO<sup>-</sup>. Il est aussi probable que TMSO<sup>-</sup>, comme HOO<sup>-</sup>, est plus mou que HO<sup>-</sup>. On peut donc penser que l'utilisation de TMSO<sup>-</sup> permettra d'éviter les réactions de β-élimination qui sont à craindre lors de saponification d'intermédiaires dans la synthèse de fragments d'HS synthétisés au laboratoire.

La TMSONa peut être préparé à partir de TMSOH (2 équiv.) dans de la soude [12M] (3.3 équiv.) à

(143) Laganis, E. D.; Chenard, B. L. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5831-5834.



0 °C. Le produit précipite dans la solution aqueuse et peut ensuite être extrait par de l'éther diéthylique.<sup>143</sup>

L'équipe de Codée a utilisé TMSO<sub>Na</sub> (2 équiv.) en synthèse d'oligosaccharides pour réaliser une ouverture de lactone.<sup>144</sup> En suivant les conditions décrites dans ce travail, le composé **41** est solubilisé dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre avec 2 équiv. de TMSO<sub>Na</sub>. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 17 heures. Après neutralisation du milieu par de l'acide acétique, le produit **42** est directement purifié par une chromatographie sur gel de silice et ainsi obtenu avec un rendement de 80%. Nous avons aussi récupéré un produit qui avait perdu le groupement Cbz, composé **48** (10%). La réaction a été faite également dans un mélange THF/*n*BuOH, 1/1 mais le rendement (86%) après purification est similaire (Schéma 28).

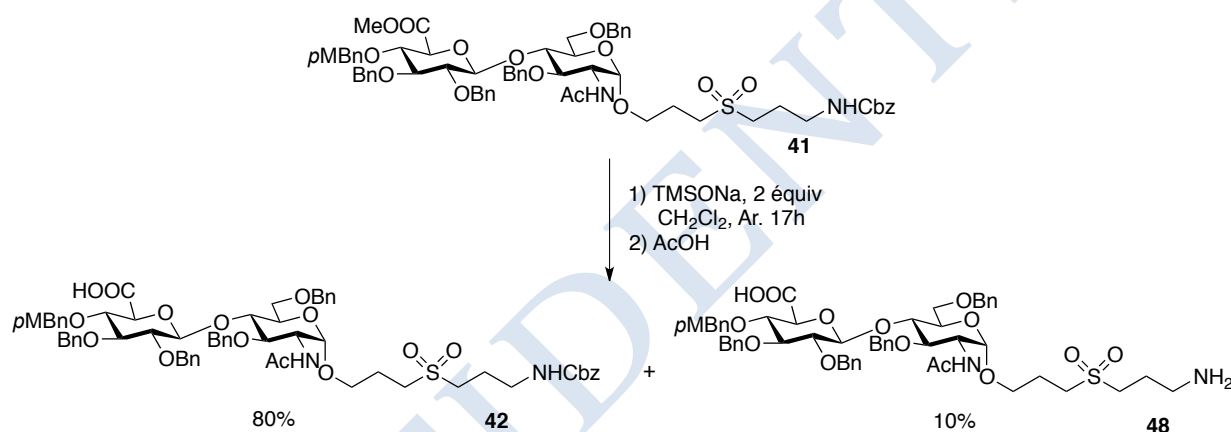


Schéma 28. Saponification du composé **41**

### 3. Préparation de la brique Iduronique (IdoUA)

#### 3.1. Réaction thiol-ène pour introduire le groupement NHCbz

La réaction thiol-ène est effectuée comme pour le disaccharide **36**. Le composé **43** est obtenu avec un rendement de 89% sur une échelle du gramme à partir du disaccharide **37**, synthétisé par un prestataire de service selon un mode opératoire du laboratoire,<sup>112</sup> après une purification par chromatographie sur gel de silice (Schéma 29).

(144) Sommer, L. H.; Pietrusza, E. W.; Whitmore, F. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 2282-2284.

(145) Christina, A. E.; van den Bos, L. J.; Overkleef, H. S.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. *C. J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1692-1706.

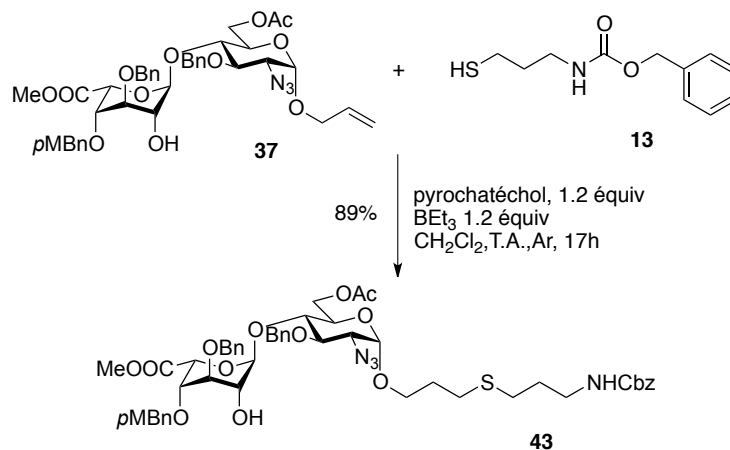


Schéma 29. Addition radicalaire thiol-ène pour obtenir le composé **43**

### 3.2. Désacétylation de la position 6

L'enlèvement du groupement acétate est réalisé par transestérification en milieu basique. Le composé **43** est traité avec 0.5 équiv. de  $K_2CO_3$  dans du MeOH anhydre à température ambiante pendant 1 heure. Après neutralisation par une résine  $H^+$ , le composé **44** est obtenu avec un rendement de 83% après une purification par chromatographie sur gel de silice (Schéma 30).

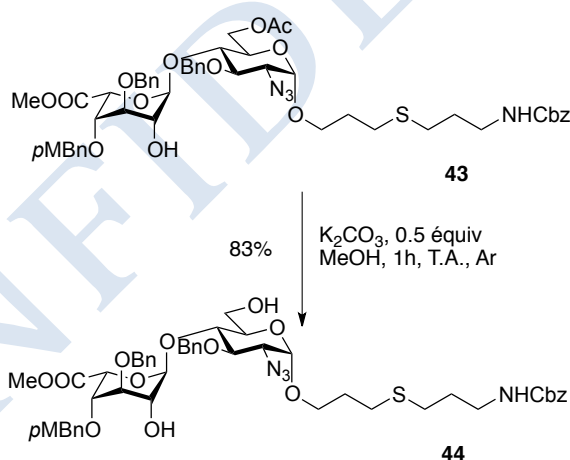


Schéma 30. Désacétylation de la position 6 du disaccharide **43**

### 3.3. Réduction du groupement $N_3$ en $NH_2$

La réduction du groupement azoture est effectuée comme pour le composé **39**. Le composé **44** est traité avec 20 équiv. de propane-1,3-dithiol en présence de 20 équiv. de  $Et_3N$  dans du MeOH pendant 2 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le composé **45** est obtenu avec un rendement de 82% après une purification chromatographie sur gel de silice (Schéma 31).

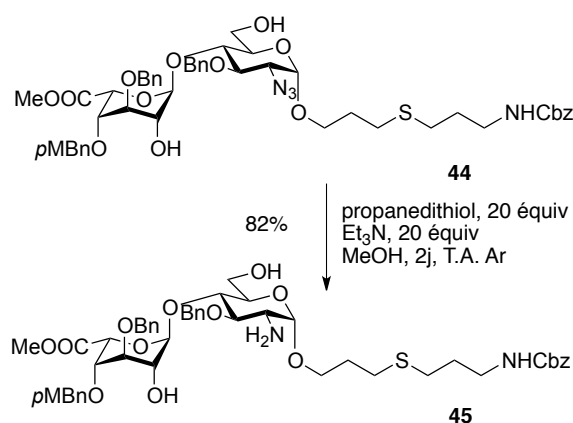


Schéma 31. Réduction du groupement N<sub>3</sub> en NH<sub>2</sub>

### 3.4. *O*- et *N*-Sulfatation

Les *O* et *N* sulfatations sont effectuées simultanément dans les conditions que nous avons utilisées pour le composé **19**. Le composé **45** est solubilisé dans de la pyridine anhydre puis le complexe Py•SO<sub>3</sub> est ajouté (5 équiv. par hydroxyle et amina). La réaction est d'abord laissée un jour à température ambiante avant d'être chauffée à 55°C pendant un autre jour. Après une purification chromatographique sur phase-inverse C18 et une colonne échange d'ions, le composé **46** est obtenu avec un rendement de 95% (Schéma 32).

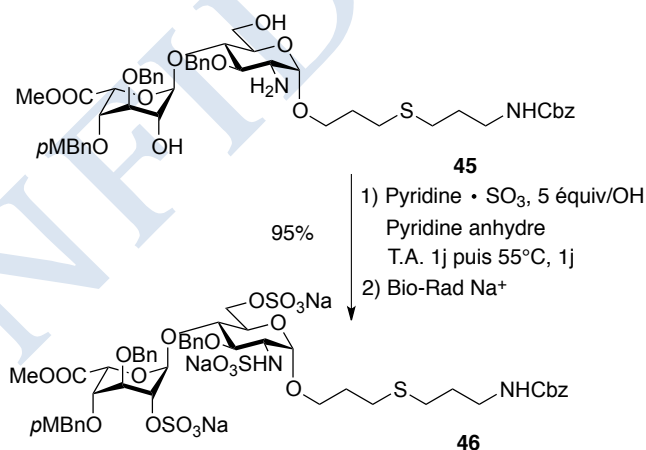


Schéma 32. *O*- et *N*-sulfatation du composé **45**

### 3.5. Saponification et oxydation

Comme pour la préparation du disaccharide **42**, nous avons essayé d'effectuer la saponification et l'oxydation « one-pot ». Le composé **46** est traité avec 50 équiv. de KOH et 150 équiv. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans H<sub>2</sub>O à une concentration de 0.2 M en composé **46**. Nous voulions chauffer la réaction à 37°C. Mais un problème de chauffage a fait que le milieu réactionnel a été chauffé jusqu'à 100°C pendant une nuit.

Dans ces conditions, nous avons réussi à enlever le groupement méthyle et à oxyder le groupement thioéther en sulfone en même temps. Le groupement Cbz, qui devait être enlevé dans l'étape suivante n'a pas résisté à un tel chauffage et donc à l'issue de cette réaction, nous avons obtenu le composé **47** avec un rendement de 61% après une purification chromatographie sur phase-inverse C18 et une colonne échange d'ions (Schéma 33).

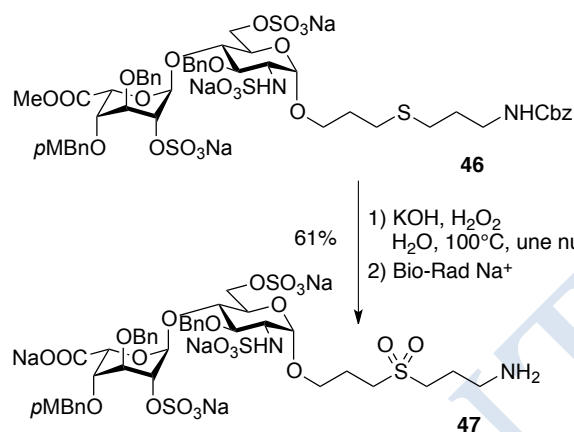


Schéma 33. Saponification, oxydation et déprotection de l'amine

## 4. Préparation des composés disulfure GlcUA-C11 et IdoUA-C11

### 4.1. Préparation du produit GlcUA-C11

L'optimisation de l'hydrogénolyse des oligosaccharides, fragments d'HS, avec le complexe d'hydroxyde de palladium comme catalyseur en présence de sulfone a montré qu'il était préférable de travailler à pH 6 pour éviter la coupure du bras.<sup>118</sup> Pour tamponner, du tampon phosphate de sodium est habituellement utilisé. L'inconvénient de ce tampon est qu'il n'est pas volatil et qu'une colonne d'exclusion stérique doit être réalisée après la réaction pour l'éliminer. Ici, suite aux résultats que nous avons obtenus pour l'enlèvement du groupement Cbz des composés **17** et **25** (Schéma 9 et 12), nous avons voulu tester l'utilisation d'acétate de triéthylammonium pour tamponner le milieu, car il est volatil et facile à enlever par lyophilisation.

D'abord, nous avons utilisé les conditions<sup>119</sup> d'hydrogénolyse développées au laboratoire pour les fragments d'HS en remplaçant juste le tampon phosphate par de l'acétate de triéthylammonium. La réaction est effectuée dans un mélange 1/2 de tBuOH et de tampon acétate de triéthylammonium 10 mM et en utilisant dihydroxyde de palladium supporté par charbon (20 wt.%, mouillé) (33mg/mL) comme catalyseur, la concentration en substrat étant de 4.5 mM. Il y a une impureté, provenant de la réduction d'acétonitrile, utilisé pour rincer le charbon que nous n'avons pas réussi à enlever par

chromatographie phase inverse C18 ou chromatographie d'exclusion stérique.

Mais comme dans le disaccharide **42**, il n'y a pas de groupement sensible au pH. Nous avons essayé les mêmes conditions en remplaçant le tampon par de l'eau. Puis le composé déprotégé est mis directement à réagir avec 1.2 équiv. de composé succinimidyl **11** (ajoutés en deux fois), dans les conditions précédemment décrites, (1.2 équiv de Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 2/1). Après une nuit de réaction, le composé **50** est obtenu après une purification chromatographie phase inverse C18 avec un rendement de 52% pour les deux étapes. Les deux étapes sont contrôlées par CCM. Il n'y a pas de sous-produit observé. La quantité de catalyseur, dihydroxyde de palladium sur charbon (20 wt.%, mouillé) est peut être supérieure à ce dont on a besoin dans notre cas et le produit s'accroche sur le charbon et ne peut pas être récupéré. Nous avons diminué la quantité de dihydroxyde de palladium sur charbon (20 wt.%, mouillé) et montré que le rendement pour les deux étapes peut alors atteindre 72% avec 5mg/mL de dihydroxyde de palladium sur charbon (20 wt.%, mouillé) (Schéma 34).

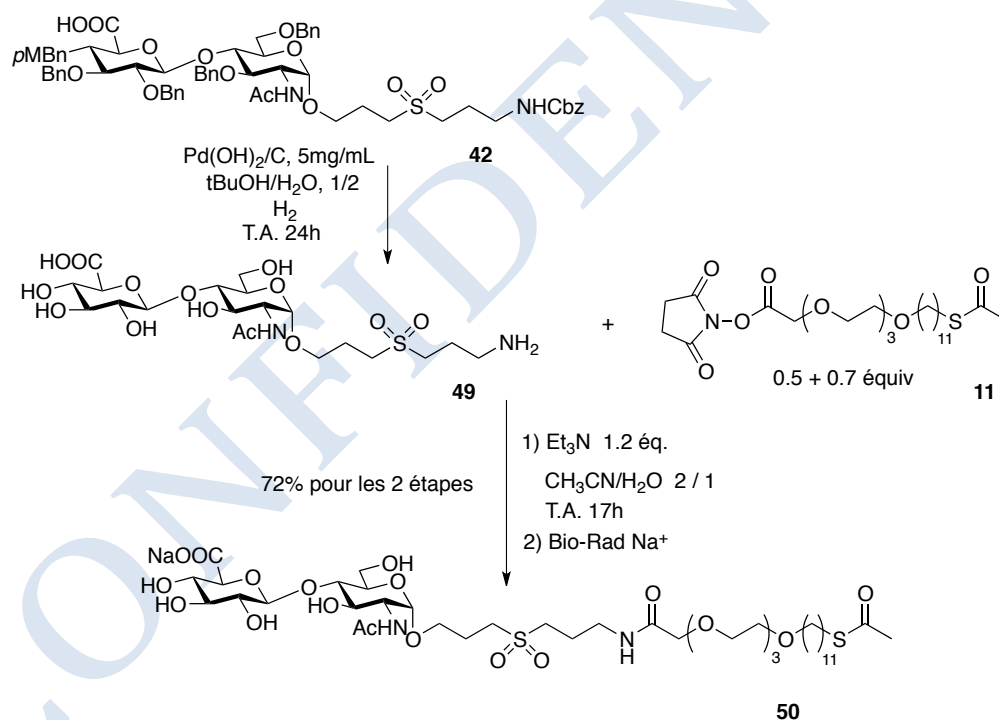


Schéma 34. Préparation du produit **50**

## 4.2. Préparation du produit IdoUA-C11

Le disaccharide **47** comporte deux groupements *O*-sulfate et un groupement *N*-sulfate. Comparé au *O*-sulfate, le *N*-sulfate est plus sensible au pH. Pour cela, nous avons voulu faire deux réactions en parallèle avec et sans tampon.

Les deux réactions d'hydrogénolyse sont réalisées avec 5 mg/mL de dihydroxyde de palladium sur charbon (20 wt.%, mouillé) dans un mélange de solvant, tBuOH/solution tampon phosphate ou eau, 1/2, à température ambiante sous dihydrogène. Après 24 heures, les suivis par CCM indiquent que les réactions sont finies. Les couplages sont ensuite lancés après une petite filtration pour bien enlever le charbon dans les conditions précédemment décrites et avec 1.2 équiv. Et<sub>3</sub>N pour la réaction sans tampon et 4 équiv. pour la réaction avec tampon phosphate, dans un mélange de solvant CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 2/1. Lors du couplage, pour garder le pH réactionnel qui est de 12, 4 équiv. de Et<sub>3</sub>N au lieu de 1.2 doivent être ajoutés dans la réaction en présence du tampon phosphate.

Après une chromatographie phase inverse C18 et un échange d'ions, le composé **52** est obtenu avec un rendement de 73% pour le couplage avec tampon et 80% pour le couplage sans tampon (Schéma 35). Comme aucun produit secondaire n'a été observé, les groupements *O*-sulfate et *N*-sulfate sont stables dans les conditions d'hydrogénolyse sans tampon, ce qui est très avantageux par rapport aux autres protocoles utilisés au laboratoire.

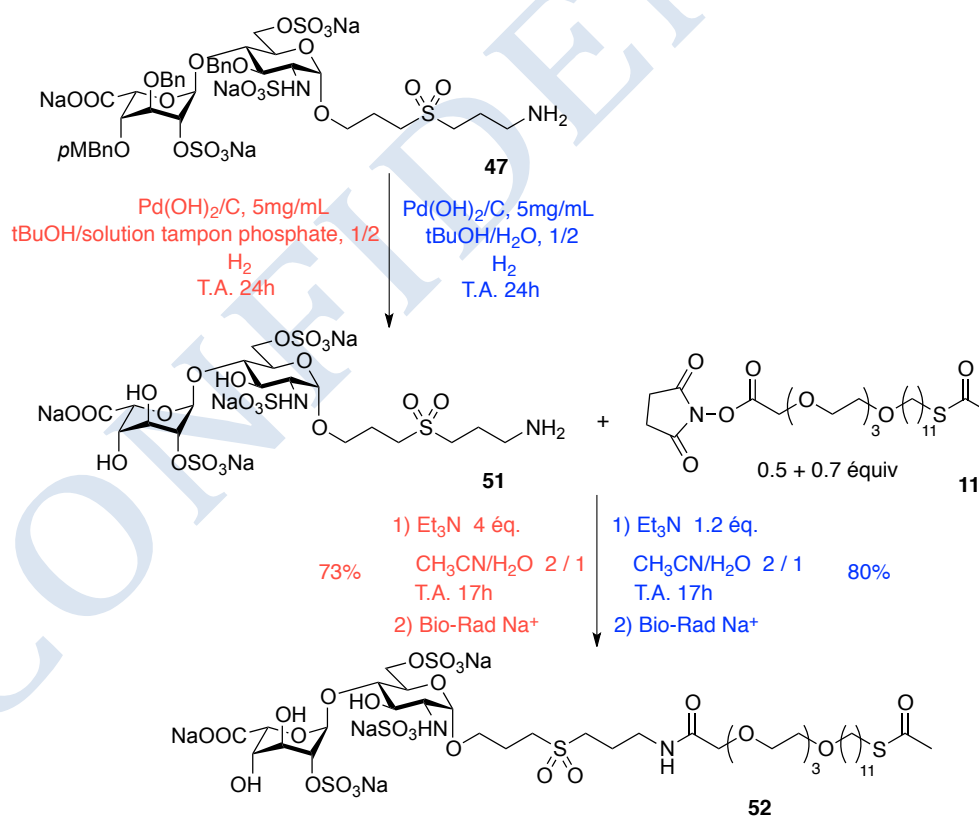


Schéma 35. Préparation du produit **52**

### 4.3. Enlèvement du groupement acétate et oxydation pour former les disulfures

Le démasquage de la fonction thiol et la formation du disulfure ont été réalisés « one-pot » dans les conditions développées pour le dérivé lactose **3**. Le composé **50** et le composé **52** ont donc été traités avec 2 équiv. de MeONa dans du MeOH sous argon pendant 1 jour. Ensuite, les mélanges réactionnels sont maintenus sous agitation et exposés à l'air pour permettre l'oxydation du thiol en disulfure. La réaction pour le dérivé glucuronique **50** est suivie par le CCM. Mais la réaction pour le dérivé iduronique **52** ne peut pas être suivie par cette méthode car le produit de départ et le produit final sont confondus sur CCM et CCM greffé avec C18. Malgré tout, le composé **53** est obtenu avec un rendement de 88% et le composé **54** avec un rendement de 80% après une chromatographie phase-inverse C18 (Schéma 36 et Schéma 37).

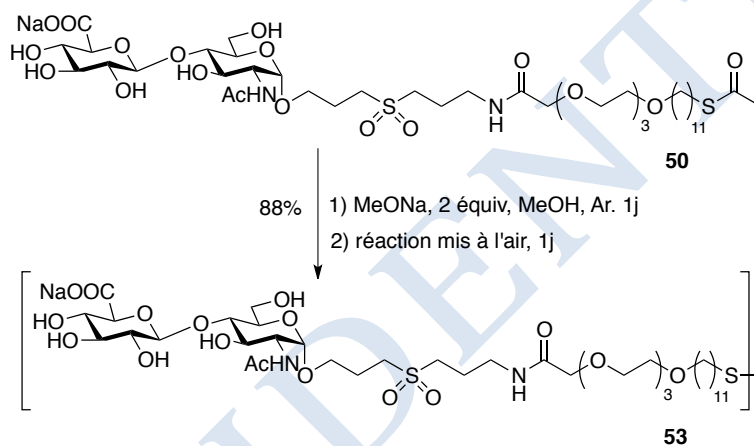


Schéma 36. Préparation du produit disulfure GlcUA-C11

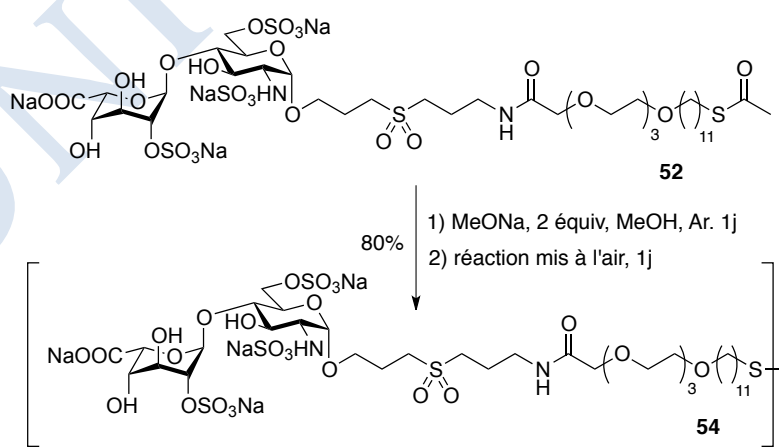


Schéma 37. Préparation du produit disulfure IdoUA-C11

## 5. Préparation des composés GlcUA-chol et IdoUA-chol

Les composés **55** et **56**, qui vont servir à préparer les nanoparticules lipidiques, sont obtenus par

couplage entre les composés aminés **49**, **51** et le composé cholestéryl **29**.

Après hydrogénolyse du composé **42** et **44**, les composés **49** et **51** sont filtrés par chromatographie en phase inverse C18 avant le couplage. Les couplages sont réalisés dans les mêmes conditions que celles développées pour le dérivé lactose, avec 1.2 équiv. du bras dans le DMF à température ambiante. Mais les réactions sont plus lentes que dans le cas du lactose, une nuit au lieu d'une heure.

Comme nous l'avons vu pour le dérivé lactose, la purification du composé **55** est un peu difficile. Nous avons d'abord essayé une colonne d'exclusion stérique (Sephadex LH20), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1/1, mais le produit désiré et le composé hydrolyse du composé **29** sont sortis en même temps. Avec une chromatographie phase inverse C18 nous avons perdu la moitié du produit. Au final, une chromatographie sur gel de silice avec comme éluant AcOEt/EtOH/H<sub>2</sub>O (8/3/0 à 8/3/2) nous a permis d'obtenir le produit sans contaminant. Une colonne d'exclusion stérique Sephadex LH20 est utilisée ensuite pour enlever la silice dissoute par l'éluant et contaminant le produit. Ce dernier ne contenant pas de groupement sulfate et étant peu soluble dans l'eau, ou tout solvant compatible avec un passage sur résine échangeuse de cations, il a été conservé sous forme acide (Schéma 38). Après ces traitements et purifications optimisés, le composé **55** est obtenu avec un rendement de 73%.

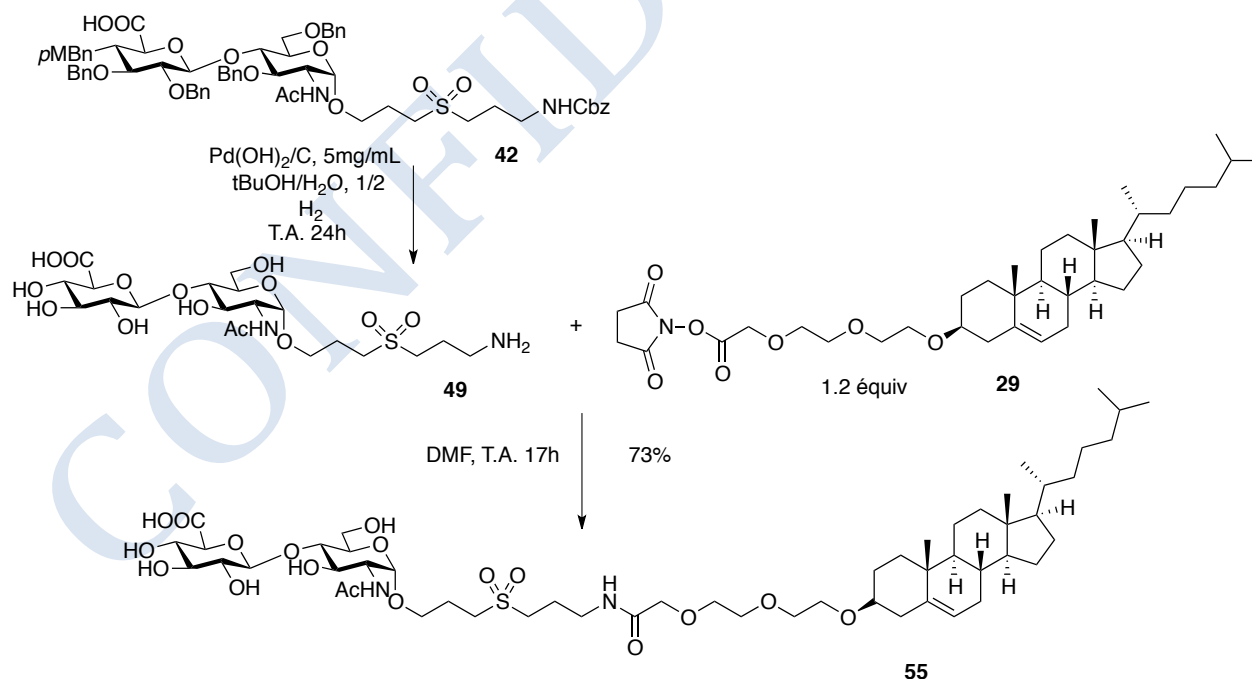


Schéma 38. Préparation du produit GlcUA-chol

La purification du composé **56** est beaucoup plus facile car il est soluble dans l'eau. Une purification



par chromatographie en phase inverse C18, suivie d'un échange d'ions permettant de l'isoler avec un rendement de 81% (Schéma 39).

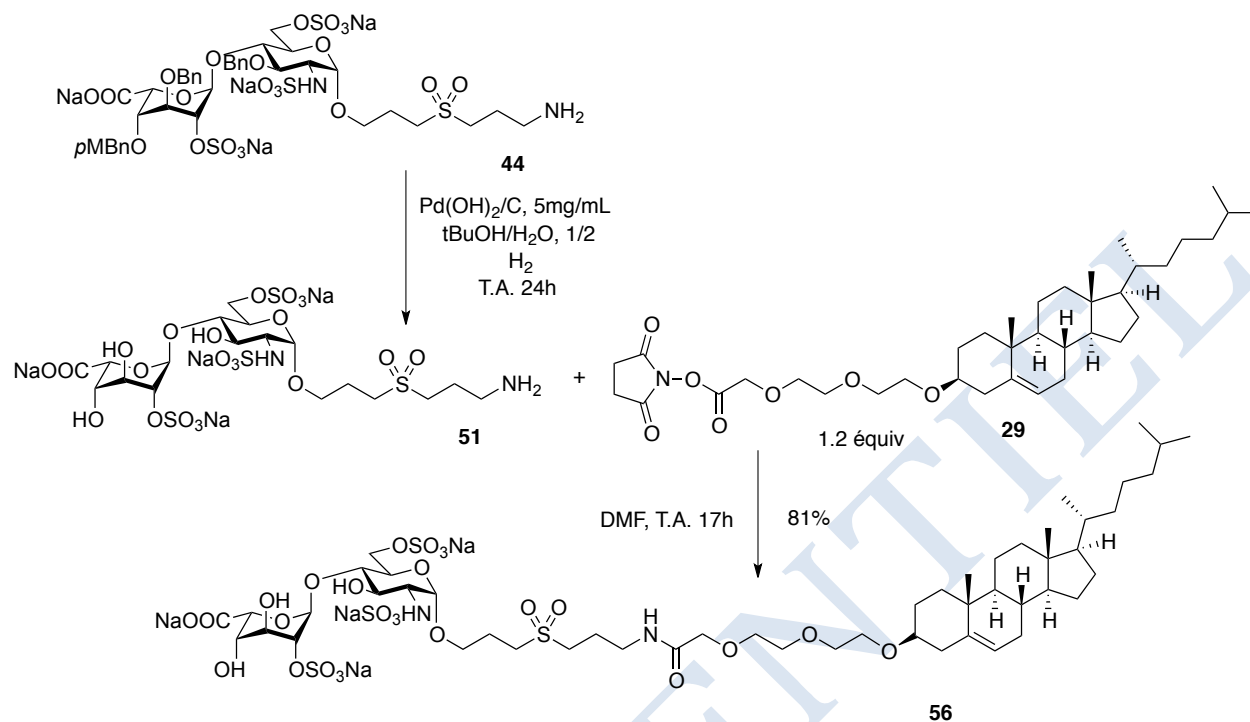


Schéma 39. Préparation du produit IdoUA-chol

## 6. Conclusion

Les conditions que nous avons développées sur le dérivé lactose (chapitre II) ont été appliquées avec succès sur les dérivés disaccharidiques **36** et **37** correspondant à des structures présentes dans les HS. À partir des composés **36** et **37**, préparés par un prestataire de service en suivant les protocoles optimisés au laboratoire, et les bras dont nous avons mis au point la synthèse (chapitre II), le composé disulfure GlcUA-C11, **52**, est obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 28%. Le composé disulfure IdoUA-C11, **54**, est obtenu en 8 étapes avec un rendement global de 22%. De même les dérivés **55** et **56**, comportant le bras cholestéryl, ont été obtenus en 7 étapes, tous deux avec des rendements globaux de 28%.

## Chapitre IV : Caractérisations physico-chimiques et discussion

### 1. Méthodes de caractérisation des nanoparticules

Les compositions, la taille, la forme/topologie des nanoparticules sont des points importants pour leurs propriétés physiques et biologiques. Les caractérisations physico-chimiques des nanoparticules sont donc indispensables pour leur étude. Beaucoup de méthodes ont été développées pour donner le maximum d'informations.

	Technique de caractérisation	Information fournir
Microscopie	AFM	Taille, morphologie, texture de surface, propriété électronique et mécanique
	STM	Composition élémentaire et moléculaire
	SEM	Surface, taille, morphologie, composition cristallographique
	TEM	Composition élémentaire, conductivité électronique
Techniques des rayons X	XAS, XRF, XPS, XRD	Composition élémentaire, cristallographique et de surface
Diffusion de la lumière	DLS	Taille des particules
Spectroscopie	UV-vis	Taille, agrégation, structure, surface, stabilisation

Tableau 7. Exemples de méthodes physio-chimiques utilisées pour la caractérisation des nanoparticules<sup>145</sup>

Le Tableau 7 montre des exemples de techniques utilisées pour la caractérisation des nanoparticules. Il y a quatre techniques de microscopie : microscopie à force atomique (AFM pour « *atomic force microscopy* »), microscopie à effet tunnel (STM pour « *scanning tunneling microscope* »), microscopie électronique à balayage (SEM pour « *scanning electron microscopy* ») et microscopie électronique en transmission (TEM pour « *transmission electron microscopy* »). Ce sont les techniques les plus utilisées car elles donnent des images des particules et surfaces et permettent d'obtenir des informations sur la taille, la morphologie et la composition des nanoobjets. Les techniques de rayons

(146) Lopez-Serrano, A.; Olivas, R. M.; Landaluze, J. S.; Camara, C. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 38-56.

X sont souvent utilisées en plus des techniques microscopiques pour avoir des informations sur la composition élémentaire des surfaces ou objets. On peut utiliser la spectrométrie d'absorption des rayons X (XAS pour « *X-ray absorption spectroscopy* »), la spectrométrie de fluorescence X (XRF pour « *X-ray fluorescence* »), la spectrométrie photoélectronique X (XPS pour « *X-ray photoelectron spectroscopy* ») et la cristallographie par diffraction des rayons X (XRD pour « *X-ray diffraction* »). La diffusion de la lumière (DLS pour « *dynamic light scattering* ») est la méthode la plus fréquemment utilisée pour permettre de connaître la taille des nanoparticules. La spectroscopie ultraviolet-visible (UV-vis pour « *ultraviolet-visible spectroscopy* ») peut être aussi utilisée pour savoir la stabilité des nano-objets.

## 2. Auto assemblage des dérivés lactose et lactose sulfaté sur les nanoparticules d'or

Les travaux sur les nanoparticules d'or sont en cours dans le groupe du Dr Yanxia Hou-BROUTIN et Dr Thierry Livache au CEA à Grenoble.<sup>146</sup> Les premières expériences ont été réalisées avec des nanoparticules d'or commerciales afin d'éviter les étapes de caractérisation et afin d'avoir une meilleure reproductibilité. Les nanoparticules d'un diamètre de 20 nm ont été choisies en premier et des essais de fonctionnalisation sont en cours.

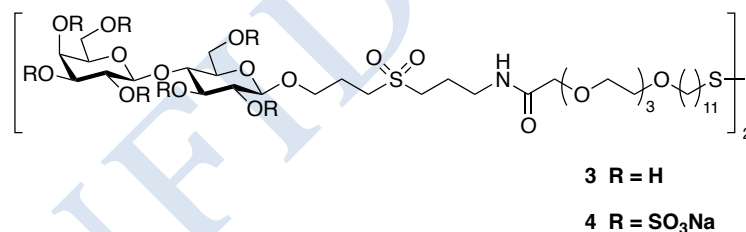


Figure 59. Composés utilisés pour fonctionnaliser les nanoparticules d'or

D'autre part, durant son stage de M1, réalisé dans l'équipe du Dr Christina Sizun à l'ICSN à Gif, Sheng Sheng a cherché à visualiser les sucres sur les nanoparticules par RMN, afin de déterminer la quantité de molécules fixées sur les nanoparticules. Malheureusement, la taille des nanoparticules semble trop grosse pour permettre leur étude en RMN. Une autre méthode de quantification, comme le dosage colorimétrique, devra être développée en parallèle.

(147) Genua, M., Université de Grenoble, 2013.

### 3. Autoassemblage des disaccharides fonctionnalisés par un résidu cholestéryl

Les préparations des nanoparticules lipidiques et leurs caractérisations sont effectuées par l'équipe du Dr Sylviane Lesieur et Dr. Vincent Faivre à Châtenay-Malabry. Nous voulons préparer deux séries de nanoparticules lipidiques : la première comporte un mélange des composés lactose-chol **27** et lactose sulfaté-chol **28** en différentes proportions, la deuxième comporte un mélange des composés GlcUA-chol **55** et IdoUA-chol **56** en différentes proportions. Les premières études ont été réalisées avec des proportions en **27/28** de 100/0, 50/50 et 0/100 ( $\text{mol L}^{-1}/\text{mol L}^{-1}$ ).

#### 3.1. Détermination de la CMC des composés dans le tampon

La CMC (Concentration Micellaire Critique) est la concentration en tensioactif dans un milieu à partir de laquelle les micelles se forment de façon spontanée. En dessous de celle-ci le tensioactif forme une couche en surface du liquide et le reste est dispersé dans la solution. C'est un paramètre important pour caractériser un tensioactif. La CMC peut être mesurée par le changement de tension de surface de l'interface liquide (eau) / air. Cette tension change avec la concentration du tensioactif (Figure 60). Une fois la CMC atteinte, la tension de surface est à son minimum et ne changera pas.

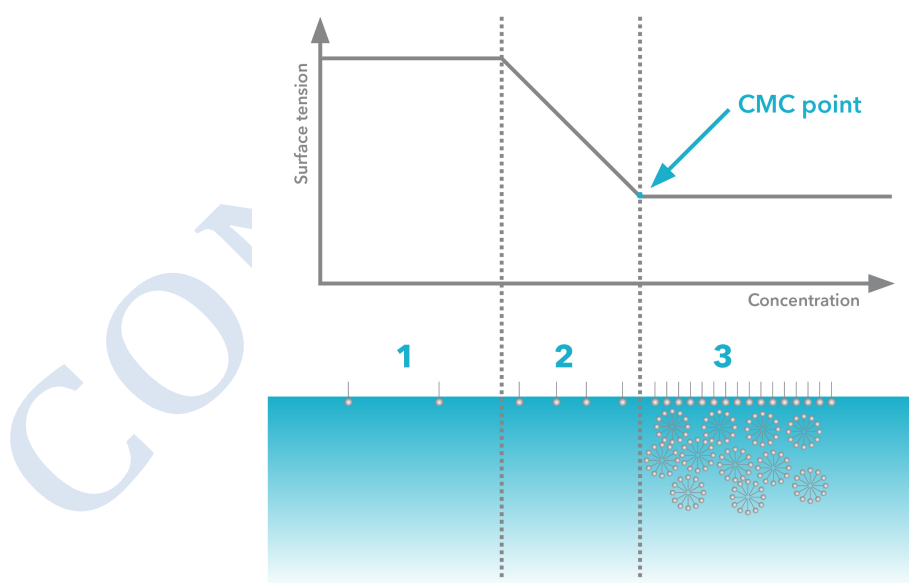


Figure 60. Changement de tension de surface avec la concentration du tensioactif <sup>147</sup>

La méthode de la goutte pendante est une des méthodes utilisées pour mesurer les tensions de surface à différentes concentrations des produits.

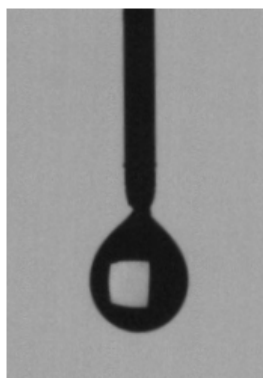


Figure 61. Exemple d'une goutte pendante

Cette méthode est basée sur la forme d'une goutte qui est en équilibre entre les effets de la tension de surface et les effets gravitationnels. C'est une méthode couramment utilisée qui présente l'avantage de ne nécessiter que très peu de produit. On forme au bout d'un tube capillaire une goutte à l'équilibre et on analyse sa forme à l'aide de logiciels de traitement d'image.

Les expériences ont été effectuées à 25°C dans le tampon aqueux HEPES (pH 7.4) 145 mM en NaCl. Les résultats sont montrés dans la Figure 62, les points rouges représentent le composé lactose sulfaté-chol et les points noirs représentent le composé lactose-chol. La CMC pour le lactose-chol est légèrement plus grande que le lactose sulfaté-chol. Parce que le lactose sulfaté-chol a une tête polaire

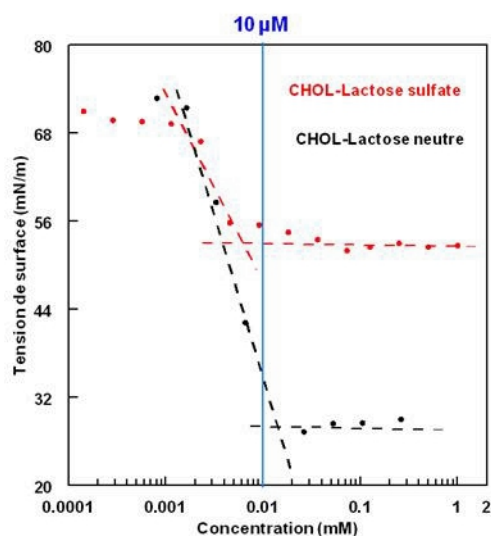


Figure 62. Détermination de la CMC par tension de surface

### **3.2. Distribution de diamètres hydrodynamiques moyens pour les nanoparticules lipidiques par diffusion dynamique de la lumière (DLS)**

Les distributions des diamètres hydrodynamiques moyens des nanoparticules sont mesurées par diffusion dynamique de la lumière. Lorsque la lumière d'un laser atteint les molécules, la lumière diffuse dans toutes les directions. A un angle donné, l'intensité de diffusion change avec le temps parce que les particules sont en train de bouger (mouvement Brownien). En détectant le changement de l'intensité de diffusion, la DLS permet de donner des informations sur la taille de la particule.

Les échantillons ont été préparés par deux méthodes. Pour les micelles comportant du composé pur, lactose-chol ou lactose sulfaté-chol, elles sont formées par solubilisation directe dans du tampon HEPES. Pour les micelles comportant des mélanges de composés, lactose-chol/lactose sulfaté-chol 50/50, elles sont formées à partir d'une injection du mélange, en solution dans le DMSO, dans le tampon HEPES. Les concentrations finales des échantillons sont de 1 mM.

Les résultats sont présentés dans la Figure 63. Les profils sont montrés par rapport à l'analyse en intensité diffusée des populations d'agrégats (en rouge) et par rapport à l'analyse en intensité pondérée par le volume des agrégats (en noir). Le dernier conduit à une distribution plus proche de celle du système réel car l'intensité diffusée dépend du carré du volume des particules. Les analyses sont basées en supposant que les nanoparticules sont homogènes et sphériques.

Pour les micelles formées par le lactose-chol, l'analyse en intensité montre 2 distributions de particules : la majorité des particules a des diamètres de l'ordre de 100 nm, les autres ont des diamètres de l'ordre de 10 nm. L'analyse en intensité pondérée par le volume montre des distributions inverse. La majorité des particules a des diamètres de l'ordre de 10 nm et un peu des particules ont des diamètres à l'ordre de 60 nm.

Pour les micelles formées par le lactose sulfaté-chol, l'analyse en intensité montre 2 distributions : la majorité est de l'ordre de 200 nm et la minorité de l'ordre de 10 nm. Mais l'analyse en intensité pondérée par le volume montre une seule distribution de l'ordre de 10 nm. Pour les micelles formées par un mélange des deux composés 50/50, deux distributions sont montrées par l'analyse d'intensité : la majorité est de l'ordre de 10 nm et la minorité est de l'ordre de 500 nm. Mais l'analyse en intensité pondérée par le volume montre une seule distribution de l'ordre de 10 nm.

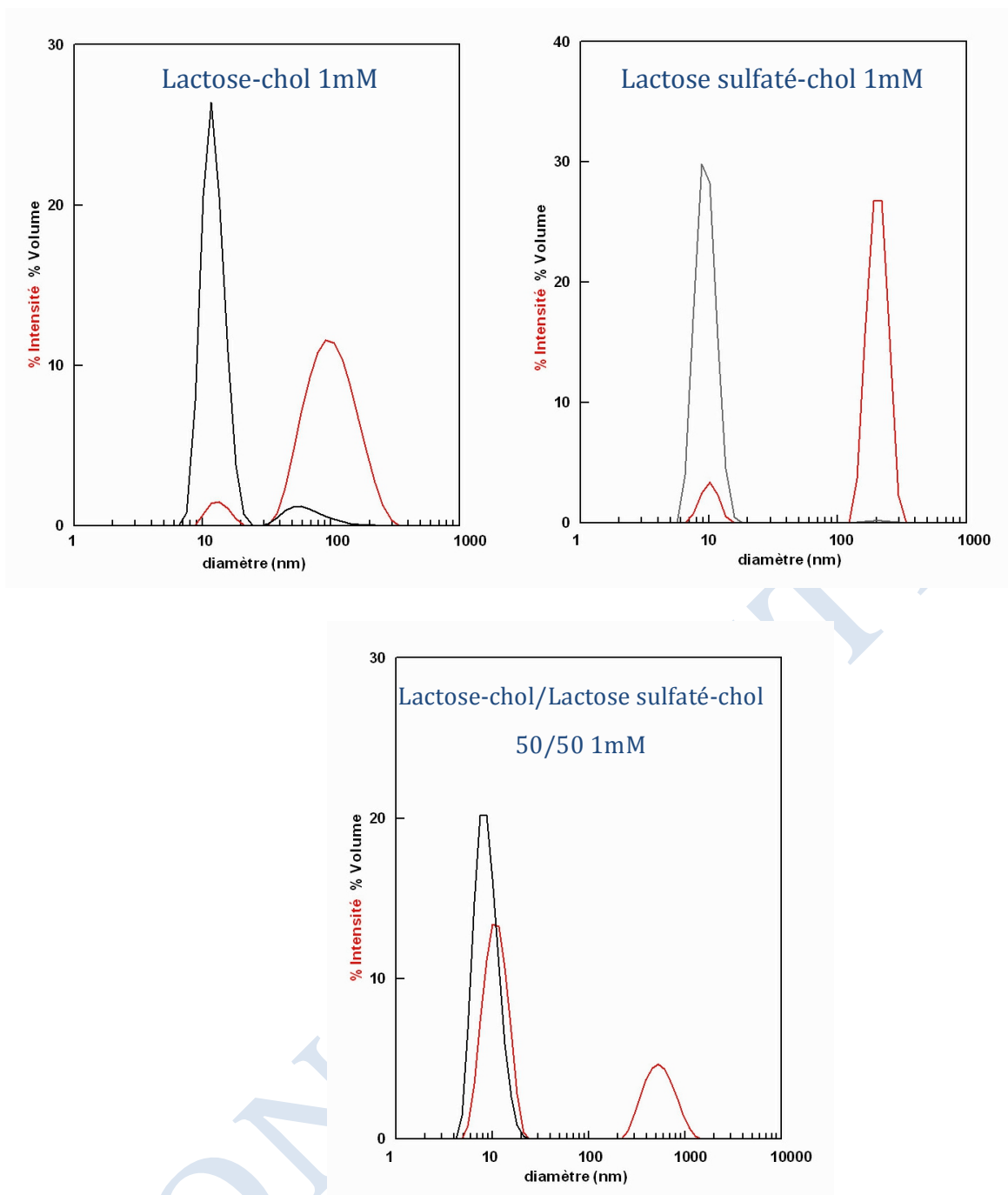


Figure 63. Distributions de diamètres hydrodynamiques moyens pour des micelles formés par lactose-chol/lactose sulfaté-chol 100/0, 0/100, 50/50 ( $\text{molL}^{-1}/\text{molL}^{-1}$ )

### 3.3. Caractérisation par cryo-TEM

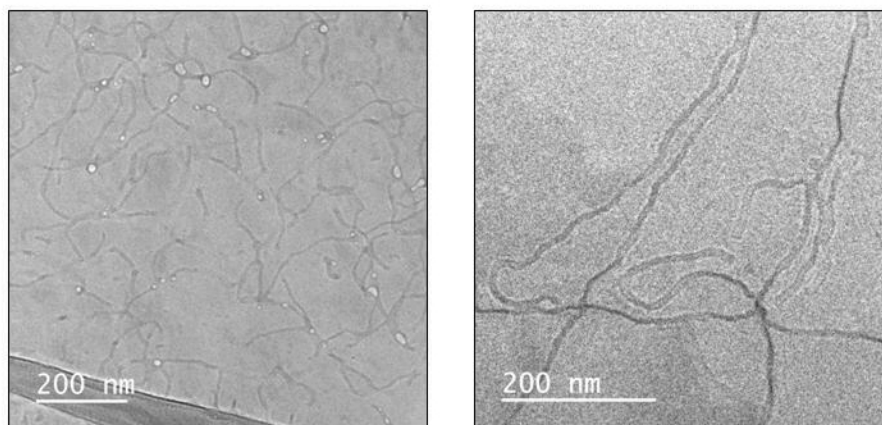
La microscopie électronique en transmission cryogénique (cryo-TEM) est un outil indispensable pour caractériser les nanoparticules lipidiques.<sup>148</sup> Par rapport aux autres microscopies, elle permet de donner des images après congélation. Dans ce cas là, les nanoparticules sont beaucoup moins

(149) Kuntsche, J.; Horst, J. C.; Bunjes, H. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *417*, 120-137.

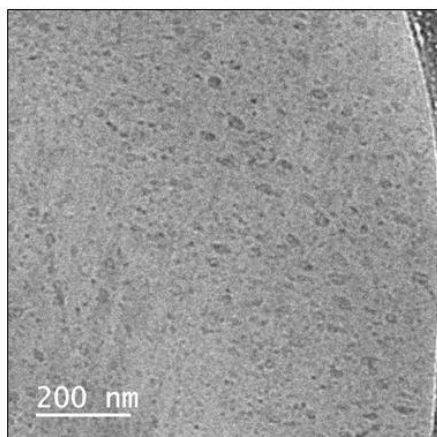
dynamique. Donc, elle peut fournir des informations sur leur(s) taille(s), la forme(s), structure(s) interne(s) des nanoparticules.

Des essais préliminaires ont été effectués pour les nanoparticules formées par les mélanges lactose-chol/lactose sulfaté-chol 100/0, 0/100, 50/50 ( $\text{molL}^{-1}/\text{molL}^{-1}$ ). Pour les nanoparticules formées par du composé pur, lactose-chol ou lactose sulfaté chol, les échantillons sont préparés par solubilisation dans du tampon aqueux HEPES (pH 7.4), 145 mM en NaCl. Pour les nanoparticules formées par un mélange, les deux composés sont pré-solubilisés dans du DMSO et la solution est injectée dans le tampon précédemment cité. Les résultats sont présentés dans la Figure 64. Les lactose-chols forment des micelles cylindriques. Ces résultats de DLS sont en accord avec les mesures effectuées en DLS où le diamètre mesuré correspond au diamètre du cylindre car les micelles ont plus tendance à se déplacer dans la direction longitudinale (mouvement plus favorable que dans la direction transversale) en cas des micelles cylindriques. En revanche, les clichés réalisés sur les solutions de lactose sulfaté-chol montrent que des agrégats de dimension inférieure à 100 nm se sont formés, les plus petits ne sont pas vraiment visibles. Le mélange 50/50 forme une majorité des micelles de dimension d'environ 10 nm.

Lactose-chol 2 mM



Lactose sulfaté-chol 2 mM





#### Lactose-chol/Lactose sulfaté-chol 50/50 2 mM

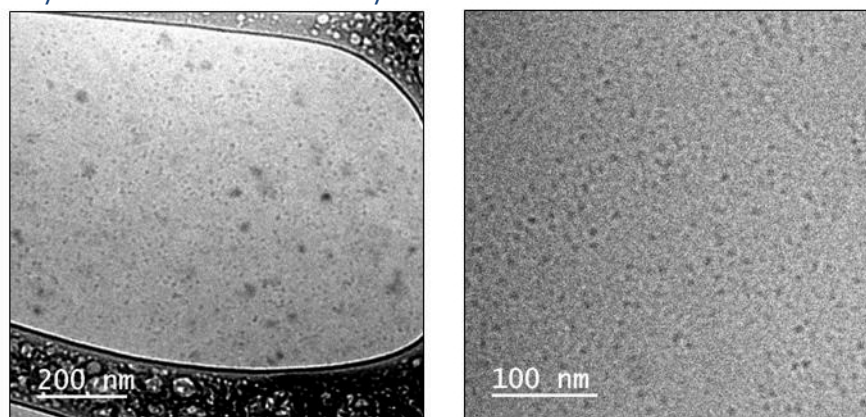


Figure 64. Images préliminaires en cryo-TEM préliminaires pour des nanoparticules formés par lactose-chol/lactose sulfaté-chol 100/0, 0/100, 50/50 ( $\text{molL}^{-1}/\text{molL}^{-1}$ )

## 4. Surfaces planes d'or formées en utilisant les dérivés des fragments d'HS

Des prismes SPRi ont été réalisés à Grenoble avec les composés disulfures, GlcUA-C11 **53** et IdoUA-C11 **54**, qui sont deux des 48 disaccharides de base des HS. Des mélanges de ces composés, avec des proportions allant de 0 à 100%, ont été auto-assemblés sur la surface d'or de prisme SPRi. Le pourcentage du GlcUA-C11 augmente à chaque fois de 10%, donc il y a 11 mélanges au total. Deux autres séries de mélange, lactose-C11 **3**/ IdoUA-C11 **54** (L/I) et GlcUA-C11 **53**/lactose sulfaté-C11 **4** (G/L), ont été déposés sur le même prisme. En comparaison, une série de mélanges avec les composés disulfure lactose-C11 **3**/ lactose sulfaté-C11 **4** (L/LS) a été spottée sur le même prisme comme référence par rapport aux expériences antérieures. Des études d'interactions ont été réalisées avec ce prisme en utilisant comme protéines : ECL, IFN $\gamma$ , CXCL12 $\alpha$  et CXCL12 $\gamma$  pour obtenir les profils d'évolution continue par SPRi. L'analyse des résultats est actuellement en cours.

	73 G/I					82 L/G				
46 G/I		I		19 L/I		73 L/G		L		
	G		37 L/I		91 L/G		28 L/G		64 L/LS	
28 G/I		91 L/I		82 L/I		19 L/G		L		LS
	19 G/I		46 L/I		I		55 L/G		37 L/LS	19 L/LS
82 G/I		73 L/I		64 L/I		64 L/G		28 L/LS		91 L/LS
	64 G/I		55 L/I		L		46 L/G		46 L/LS	
37 G/I		55 G/I		28 L/I		37 L/G		82 L/LS		55 L/LS
	91 G/I						G		73 L/LS	

Figure 65. Les différents mélanges sur le même prisme

## 5. Conclusion

Les dérivés lactose et lactose sulfaté sous forme de disulfure et sous forme de cholestéryl ont été utilisés pour préparer des nanoparticules d'or et lipidiques. Les caractérisations ont été effectuées par RMN, DLS et cryo-TEM. Des tests d'affinités ont été effectués et leur analyse est en cours. En fonction des résultats, les dérivés intégrant des fragments d'HS seront utilisés pour préparer des nanoparticules d'or et lipidiques.

CONFIDENTIEL

## Chapitre V : Conclusions et perspectives

### 1. Conclusions

Afin de mimer les propriétés biologiques d'HS, nous avons synthétisé des composés pour fonctionnaliser des surfaces planes d'or, des nanoparticules d'or et des nanoparticules lipidiques.

Dans un premier temps, quatre composés, présentés dans la Figure 66, qui comportent lactose ou lactose sulfatés ont été préparés. Les surfaces planes d'or et les nanoparticules d'or ont été préparées avec les composés **3** et **4** par auto-assemblage du thiol sur les surfaces d'or. Les nanoparticules lipidiques sont préparés avec les composés **27** et **28**.

Les synthèses ont été améliorées non seulement pour les quatre composés dérivés du lactose, mais aussi pour préparer les composés qui comportent les fragments d'HS, présentés dans la Figure 67.

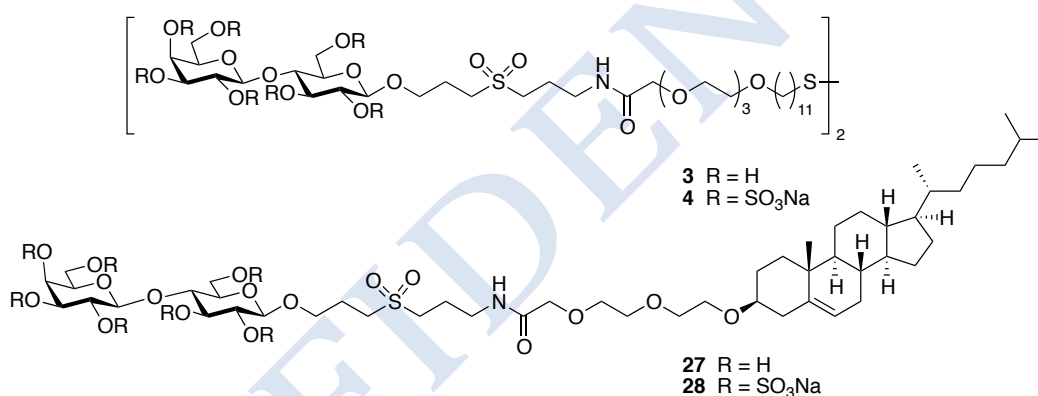


Figure 66. Les composés synthétisés d'abord comme des modèles

La même stratégie a été utilisée pour synthétiser tous les composés qui contiennent une étape de couplage entre une amine et un acide carboxylique activé. Le composé **3** est obtenu avec un rendement total de 31% en 9 étapes et le composé **4** est obtenu par une sulfatation sur le composé **3** avec un rendement de 98%.

Les conditions améliorées sont appliquées sur les composés fragments d'HS. À partir des composés préalablement synthétisés au laboratoire et les bras préalablement préparés pour synthétiser les composés dérivés du lactose, le composé **53** est obtenu en 8 étapes avec un rendement de 28%, le composé **54** est obtenu en 8 étapes avec un rendement de 22%. De même les dérivés **55** et **56**, comportant le bras cholestéryl, ont été obtenus en 7 étapes, tous deux avec des rendements globaux de 28%.

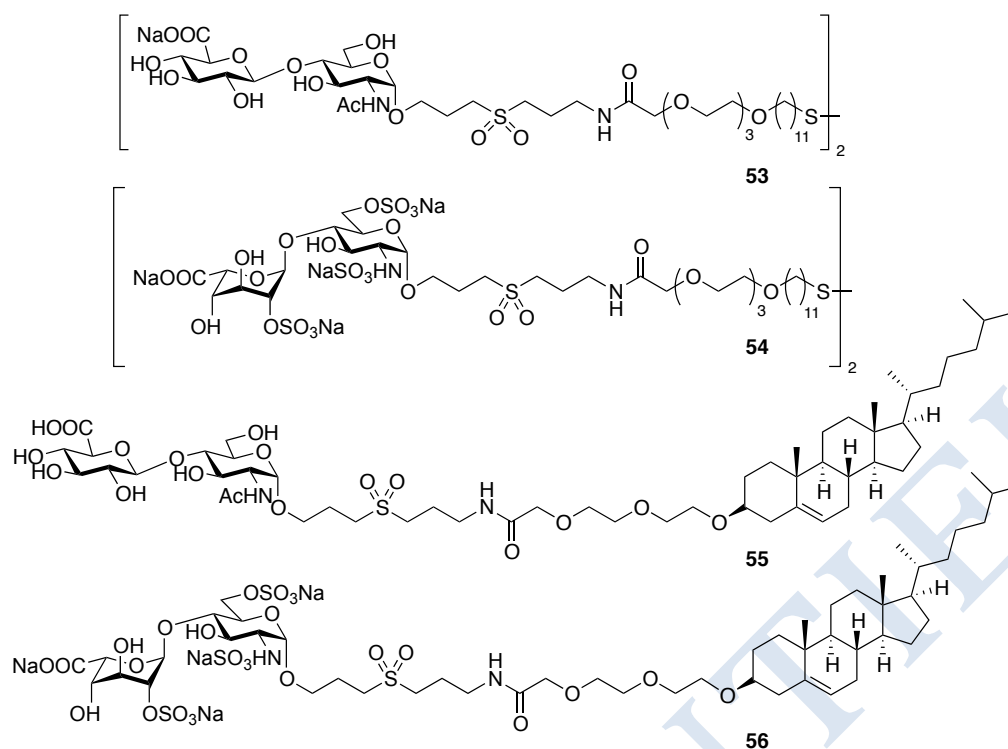


Figure 67. Les composés synthétisés qui comportent les fragments d'HS

1. Les composés disulfures ont été envoyés à l'équipe de L. Livache et Y. Hou-Broutin à CEA-Grenoble pour construire les surfaces combinatoires d'or et les nanoparticules d'or. Avec une prolongation de la chaîne, la stabilité des nanoparticules d'or est bien renforcée par rapport aux nanoparticules d'or fonctionnalisés avec les composés **1** et **2**. Les études d'interaction avec différentes protéines sont en cours.
2. Les composés cholestéryls ont servi à préparer les nanoparticules lipidiques dans l'équipe de S. Lesieur. La CMC du composé **27**, et du mélange du composé **27/28** (5/5) est assez basse dans le tampon aqueux HEPES. Les résultats de DLS et cryo-TEM ont montré que le lactose-chol **3** forme des micelles cylindriques, le lactose sulfaté-chol **4** forme des agrégats de dimension inférieure à 100 nm, le mélange 50/50 forme des micelles de dimension presque égales à 10 nm.

## 2. Perspectives

1. Les surfaces combinatoires d'or ainsi que les nanoparticules d'or seront préparées avec les composés **53** et **54** et testées sur CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\gamma$  et IFN $\gamma$ .
2. L'affinité pour CXCL12 $\alpha$  et CXCL12 $\gamma$  des nanoparticules lipidiques formées par le composé **27** et **28** et des nanoparticules lipidiques préparées avec le composé **55** et **56** seront comparées.
3. Ces nanoparticules lipidiques seront utilisées dans les tests cellulaires de « *wound healing* ».

# Partie expérimentale

## General

All moisture-sensitive reactions were performed under an argon atmosphere using over-dried glassware. Evaporations were performed under reduced pressure. All anhydrous solvents were dried by filtration on activated alumina column or over standard drying agents and freshly distilled prior to use. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 (15 - 40  $\mu\text{m}$ ). Reversed-phase chromatography was performed on LiChroprep® RP-18 (25-40  $\mu\text{m}$ ) (MERCK).

Reactions were monitored by TLC on glass Silica Gel 60 F254 plates with detection UV at 254 nm and by charring with 5 % ethanolic  $\text{H}_2\text{SO}_4$  or by reaction with Ellman's reagent (samples with thiol group). Size-exclusion chromatography was performed on Sephadex LH-20 (Pharmacia), using MeOH or  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 1/1 as eluent.

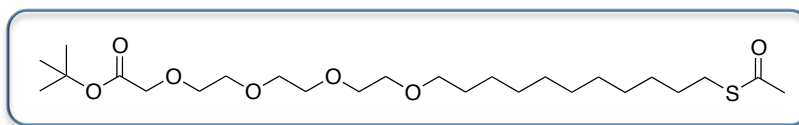
$^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at room temperature (except indicated) in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  or  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  on a Bruker Avance 250 ( $^1\text{H}$ : 250.13 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 62.89 MHz), 300 ( $^1\text{H}$ : 300.13 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 75.47 MHz), 360 ( $^1\text{H}$ : 360.13 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 90.55 MHz) or 400 ( $^1\text{H}$ : 400.13 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.61 MHz) or a Bruker Avance II 400 ( $^1\text{H}$ : 400.13 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.61). Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million relative to  $\text{Me}_4\text{Si}$  for  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta = 0.00$  ppm) and to the residual solvent peak used as an internal standard for  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta = 77.0$  ppm) for samples with  $\text{CDCl}_3$  or  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ . Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million relative to acetone for  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta = 2.22$  ppm) and for  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta = 30.89$  ppm) for samples with  $\text{D}_2\text{O}$ .

The following abbreviations were used to describe the multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), 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.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were run using a proton-decoupled pulse sequence.

HRMS analyses were recorded in positive or negative modes on a Bruker Micro ToF Q spectrometer using electrospray ionization.

Optical rotations were measured on Perkin Elmer 341 Polarimeter (c in g / 100 mL)

**Compound 9: *tert*-butyl 25-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-24-thiahexacosan-1-oate**



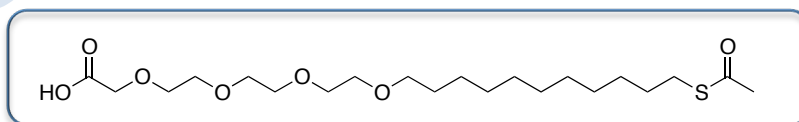
To a degassed MeOH solution (67 mL) of compound **8** (7.0 g, 16.8 mmol) was added thioacetic acid (4.6 mL, 67.3 mmol, 4 equiv), and then AIBN (1.1 g, 6.7 mmol, 0.4 equiv) under atmosphere of argon. The reaction mixture was stirred in reflux overnight. After being stirred in reflux overnight, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (1 L), washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> (1 L), dried with MgSO<sub>4</sub>. After filtration and concentration in vacuo, the compound **9** (8.0 g, 16.3 mmol, 97%) was obtained by flash chromatography (toluene/acetone: 99/1 to 90/10). TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5): R<sub>f</sub> = 0.56.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz CDCl<sub>3</sub>:** 3.97 (s, 2H, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu), 3.51-3.68 (m, 12H, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu), 3.39 (t, *J*<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub> = 7.0 Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.80 (t, *J*<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub> = 7.5 Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COS), 1.50 (m, 4H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1.42 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.20 (m, 14H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz CDCl<sub>3</sub>:** 196.09 (tBuOCOCH<sub>2</sub>), 169.78 (CH<sub>3</sub>COS), 81.60 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCOCH<sub>2</sub>), 77.23, 71.65, 70.86, 70.77, 70.75, 70.72, 70.19, 69.19 (CH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu), 30.75, 29.77, 29.67, 29.62, 29.59, 29.57, 29.27, 29.23, 28.94, 26.22 (SCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 28.25 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCOCH<sub>2</sub>) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>7</sub>S<sup>+</sup>: 515.3018, found: 515.2997 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Compound 10: 25-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-24-thiahexacosan-1-oic acid**



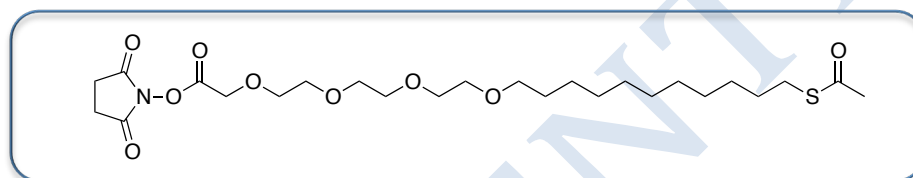
To a solution of compound **9** (505 mg, 1.0 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), was added trifluoroacetic acid (14 mL, 82.5 mmol, 82.5 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature during 3 hours. After concentration in *vacuo* and coevaporation 4 times with toluene, flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 98/2 to 90/10) gave product **10** (337 mg, 85%). TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5): R<sub>f</sub> = 0.16.

**RMN  $^1\text{H}$  400MHz  $\text{CDCl}_3$ :** 4.12 (s, 2H,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.55-3.73 (m, 12H,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.42 (t,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.82 (t,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 1.54 (m, 4H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.22 (m, 14H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  100MHz  $\text{CDCl}_3$ :** 196.3 ( $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 172.6 ( $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 71.8 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 71.6, 70.8, 70.63, 70.60, 70.5, 70.3 ( $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 69.2 ( $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 30.8 ( $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 29.7, 29.64, 29.61, 29.3, 29.27, 29.0, 26.2 ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{SCOCH}_3$ ) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI $^-$  HR-MS)** m/z calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{S}^-$ : 435.2416, found 435.2410  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

**Compound 11: 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 25-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-24-thiahexacosan-1-oate**



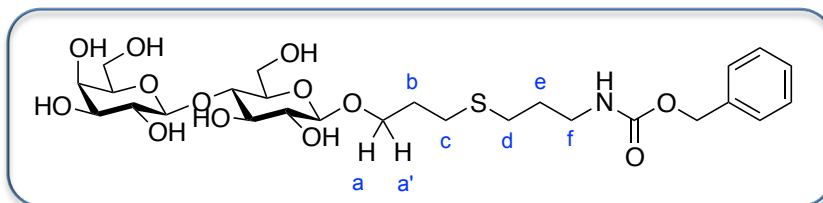
To a solution of compound **10** (285 mg, 0.65 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.8 mL), was added N-hydroxysuccinimide (84 mg, 0.76mmol, 1.2 equiv) and EDC $\cdot$ HCl (151 mg, 0.77 mmol, 1.2 equiv). The reaction mixture was stirred at 0  $^\circ\text{C}$  during 30 min then room temperature during 22 hours under atmosphere of argon. The reaction mixture was diluted with 50 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and then washed with a saturated aqueous solution of NaCl (50 mL  $\times$  4), dried with  $\text{MgSO}_4$ , evaporated in *vacuo* to give the compound **11** (340 mg, 97%). TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95/5):  $R_f = 0.54$ .

**RMN  $^1\text{H}$  400MHz  $\text{CDCl}_3$ :** 1.20 (m, 14H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.49 (m, 4H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.25 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 2.79 (m, 6H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.38 (t, 2H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.0$  Hz,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.36-3.74 (m, 12H,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COON}$ ), 4.49 (s, 2H,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COON}$ ) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  100MHz  $\text{CDCl}_3$ :** 196.06( $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 168.86( $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 166.10 ( $\text{OCH}_2\text{COON}$ ), 71.61, 71.46, 70.77, 70.74, 70.68, 70.66, 70.16 ( $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COON}$ ), 66.64 ( $\text{OCH}_2\text{COON}$ ), 30.72 ( $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 29.74, 29.64, 29.59, 29.55, 29.54, 29.25, 29.19, 28.90, 26.18 ( $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{SCOCH}_3$ ), 25.70 ( $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI $^+$  HR-MS)** m/z calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NNaO}_9\text{S}^+$ : 556.2556, found 556.2563  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Compound 16: 3-[(3-benzyloxycarbonylamino)propylthio]propyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside**



To a solution of compound **15** (100 mg, 0.26 mmol) and compound **13** (118 mg, 0.52 mmol, 2 equiv) in a mixture of deoxygenate H<sub>2</sub>O (1.0 mL), deoxygenate MeOH (1.0 mL) and anhydrous THF (0.24 mL), were added pyrocatechol (35 mg, 0.31 mmol, 1.2 equiv) and BEt<sub>3</sub> (a solution of THF, 1 mol/L, 0.3 mL, 1.2 equiv). After stirring at room temperature during 6 hours, the reaction mixture was diluted with water (50 mL) and then extracted 3 times with a mixture of EtOAc/Et<sub>2</sub>O (1/1). The crude product was obtained after concentrated in *vacuo* and lyophilization. Reversed-phase C-18 silica gel chromatography (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O: 20/80 to 35/65) gave compound **16** (157 mg, 0.25 mmol, 98%) as white powder. TLC (isopropanol/EtOAc/H<sub>2</sub>O, 3/3/1): R<sub>f</sub> = 0.67.

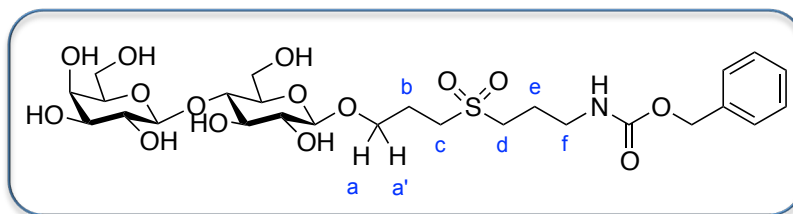
**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 7.44-7.27 (m, 5H, H<sub>arom</sub>), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub> of Cbz), 4.40 (d,  $J_{H1,H2}$  = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.39 (d,  $J_{H1',H2'}$  = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 3.97-3.85 (m, 2H, H-a and H-6a), 3.87 (d,  $J_{H4',3'}$  = 3.5 Hz, 1H, H-4'), 3.80-3.45 (m, 9H, H-3, H-4, H-5, H-6b, H-3', H-5', H-6' and H-a') 3.49 (1H, dd,  $J_{2',3'}$  = 10.0 Hz,  $J_{2',1'}$  = 7.0 Hz, H-2'), 3.25 (m, 1H, H-2), 3.15 (t,  $J_{f,e}$  = 6.5 Hz, 2H, H-f), 2.57 (t,  $J_{c,b}$  or  $J_{d,e}$  = 7.5 Hz, 2H, H-c or H-d), 2.50 (t,  $J_{d,e}$  or  $J_{c,b}$  = 7.5 Hz, 2H, H-d or H-c), 1.82 (2H, tt,  $J_{b,a}$  =  $J_{b,c}$  or  $J_{e,d}$  =  $J_{e,f}$  = 7.0 Hz, H-b or H-e), 1.70 (2H, tt,  $J_{e,d}$  =  $J_{e,f}$  or  $J_{b,a}$  =  $J_{b,c}$  = 7.0 Hz, H-e or H-b) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz D<sub>2</sub>O:** 157.9 (NHCOO), 136.4 (C of Cbz), 128.6, 128.2, 127.7 (CH of Cbz), 102.9 (C-1), 102.2 (C-1'), 78.4 (C-3), 75.3 (C-5'), 74.7 (C-5), 74.4 (C-4'), 72.8 (C-2), 72.5 (C-3'), 70.9 (C-2'), 68.7 (C-4), 68.5 (C-a), 66.7 (CH<sub>2</sub> of Cbz), 61.0 (C-6'), 60.1 (C-6), 39.9 (C-f), 31.1, 28.9, 27.5 (C-b, C-c, C-d and C-e) ppm.

**Elemental analysis** calculated for C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>13</sub>S: C, 51.39; H, 6.80; N, 2.30; O, 34.23; S, 5.28. Found: C, 50.87; H, 6.65; N, 2.41; O, 34.46; S, 5.61.

**Compound 17: 3-[(3-benzyloxycarbonylamino)propylsulfonyl]propyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside**





To a solution of compound **16** (100 mg, 165  $\mu\text{mol}$ ) in water (1.37 mL), was added a mixture of oxone (0.3 mol/L, 1.10 mL, 2 equiv) and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.8 mol/L, 825  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature during 3 hours and, then  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (87 mg, 350  $\mu\text{mol}$ ) was added to neutralize the excess oxone. A C-18 reversed-phase silica gel chromatography ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ : 0/100 to 45/55) gave the compound **17** (105 mg, quantitative) as a white solid. TLC (isopropanol/EtOAc/ $\text{H}_2\text{O}$ , 3/3/1):  $R_f = 0.25$ .

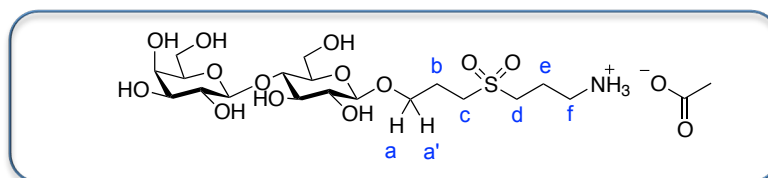
**RMN  $^1\text{H}$  360MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 7.47-7.38 (m, 5H, Ph), 5.11 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{ph}$ ), 4.47 (d,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1), 4.44 (d,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.03-3.95 (m, 2H, H-6a and H-a), 3.92 (1H, d,  $J_{4',3'} = 3.5$  Hz, H-4'), 3.89-3.74 (m, 4H, H-6b, H-6 and H-a'), 3.70 (t,  $J_{5',6'} = 4.0$  Hz, H-5'), 3.66 (dd,  $J_{3',2'} = 10.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.5$  Hz, H-3'), 3.65-3.64 (m, 2H, H-3 and H-4), 3.60-3.56 (m, 1H, H-5), 3.54 (dd,  $J_{2',3'} = 10$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, H-2'), 3.32 (t,  $J_{d,e} = 7.5$  Hz, H-d), 3.32 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2) 3.21 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-f), 2.11-1.94 (4H, m, H-b and H-e) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  90MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 158.2 (NHCOO), 136.5 (C of Cbz), 128.8, 128.4, 127.6 (CH of Cbz), 102.9 (C-1), 102.1 (C-1'), 78.4 (C-3), 75.3 (C-5'), 74.7 (C-5), 74.3 (C-4), 72.8 (C-2), 72.5 (C-3'), 70.9 (C-2'), 68.5 (C-4'), 67.9 (C-a), 66.9 ( $\text{CH}_2$  of Cbz), 61.0 (C-6'), 60.1 (C-6), 49.4, 48.9 (C-c and C-d), 38.7 (C-f), 21.7, 21.6 (C-b and C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)**  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NNaO}_{15}\text{S}^+$ : 662.2095, found 662.2084  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Elemental analysis** calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_{15}\text{S}$ : C, 48.82; H, 6.46; N, 2.19; O, 37.52; S, 5.01. Found: C, 48.49; H, 6.35; N, 2.12; O, 37.85; S, 5.19.

**Compound 18: 3-[(3-ammonium)propylsulfonyl]propyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside acetate salt**



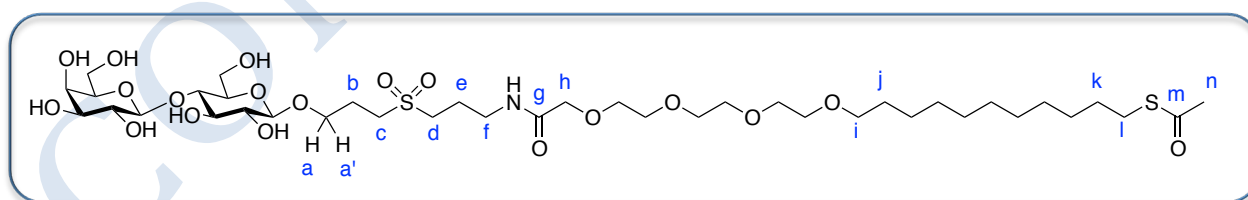
To a solution of compound **17** (1.08 g, 1.70 mmol) in water (76 mL), was added triethylammonium acetate buffer (1 M, 1.70 mmol, 1.70 mL), Pd(OH)<sub>2</sub>/C (108 mg) and tBuOH (39 mL). After degassing, the reaction mixture was stirred during 24 hours. The mixture was filtered through a celite pad and rinsed by H<sub>2</sub>O. After concentration in *vacuo* and lyophilization, compound **18** (941 mg, 1.70 mmol, quantitative) was obtained as a white powder. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.5): R<sub>f</sub> = 0.27.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 4.50 (d,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1), 4.45 (d,  $J_{1',2'} = 7.5$  Hz, 1H, H-1'), 4.04 (dt,  $J_{a,a'} = 10.0$  Hz,  $J_{a,b} = 5.5$  Hz, 1H, H-a), 3.98 (dd,  $J_{6a,6b} = 12.5$  Hz,  $J_{6a,5} = 2.0$  Hz, 1H, H-6a), 3.93 (d,  $J_{4',3'} = 3.5$  Hz, 1H, H-4'), 3.83 (dt,  $J_{a',a} = 10.0$  Hz,  $J_{a',b} = 5.5$  Hz, 1H, H-a'), 3.81 (dd,  $J_{6b,6a} = 12.5$  Hz,  $J_{6b,5} = 4.0$  Hz, 1H, H-6b), 3.75 (d,  $J_{6',5'} = 6$  Hz, 2H, H-6'), 3.71 (m, 1H, H-5'), 3.67 (dd,  $J_{3',2'} = 9.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.5$  Hz, 1H, H-3'), 3.66 (dd,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 8.0$  Hz, 1H, H-3), 3.65 (dd,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 8.0$  Hz, H-4), 3.64-3.58 (m, 1H, H-5), 3.54 (1H, dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, H-2'), 3.42 (t,  $J_{c,b}$  or  $J_{d,e} = 7.5$  Hz, 2H, H-c or H-d), 3.39 (t,  $J_{d,e}$  or  $J_{c,b} = 7.5$  Hz, 2H, H-d or H-c) 3.36-3.30 (m, 1H, H-2), 3.15 (t,  $J_{f,e} = 8.0$  Hz, 2H, H-f), 2.24-2.11 (m, 4H, He and Hb), 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz D<sub>2</sub>O:** 183.1 (CH<sub>3</sub>COO), 104.6 (C-1), 103.8 (C-1'), 80.1 (C-3), 77.1 (C-5'), 76.5 (C-5), 76.1 (C-4), 74.5 (C-2), 74.3 (C-3'), 72.7 (C-2'), 70.3 (C-4'), 69.6 (C-a), 62.7 (C-6'), 61.8 (C-6), 50.9, 50.8 (C-c and C-d), 39.7 (C-f), 25.0 (CH<sub>3</sub>COO), 23.4 (C-b), 21.5 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>NNaO<sub>13</sub>S<sup>+</sup>: 528.1727, found 528.1707 [M-AcCOOH+Na]<sup>+</sup>; C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>13</sub>S: 506.1907, found 506.1888 [M-AcCOOH+H]<sup>+</sup>.

**Compound 19: {3-[3-(25-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)]propylsulfonyl}propyl β-D-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside**



To a solution of compound **18** (1.000 g, 1.99 mmol) in water (25 mL), was added a solution of compound **11** (534mg, 1.00 mmol, 0.5 equiv) in CH<sub>3</sub>CN (21 mL) and Et<sub>3</sub>N (335 μmol, 2.39 mmol, 1.2 equiv). After 2 hours, compound **11** (742 mg, 1.39 mmol, 0.7 equiv) in CH<sub>3</sub>CN (29 mL) was added again. The reaction mixture was stirred at room temperature for another 2 hours. The CH<sub>3</sub>CN was evaporated in *vacuo*. A C-18 reversed-phase silica gel chromatography (CH<sub>3</sub>CN /H<sub>2</sub>O: 0/100 to 45/55) gave compound **19** (1.747g, 95%) (CH<sub>3</sub>CN /H<sub>2</sub>O: 0/100 to 45/55) as white powder. TLC

(isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.5): R<sub>f</sub> = 0.69.

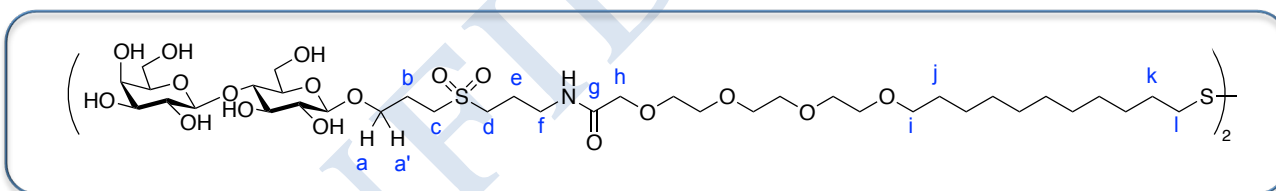
**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 4.48 (d,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1), 4.45 (d,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.07 (s, 2H, H-h), 4.05-4.00 (m, 1H, H-a), 3.98 (dd,  $J_{6a,6b} = 12.5$  Hz,  $J_{6a,5} = 2.0$  Hz, 1H, H-6a), 3.93 (d,  $J_{4',3'} = 3.5$  Hz, 1H, H-4'), 3.84-3.76 (m, 4H, H-a', H-6b, H-6'), 3.74-3.60 (m, 17H, H-5', H-3', H-3, H-4', H-5 and H<sub>PEG</sub>), 3.55 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2'), 3.47 (t,  $J_{i,j} = 6.5$  Hz, 2H, H-i), 3.41 (t,  $J_{f,e} = 6.5$  Hz, 2H, H-f), 3.35 (t,  $J_{c,b} = 6.5$  Hz, 2H, H-c), 3.35-3.31 (m, 1H, H-2), 3.25 (t,  $J_{d,e} = 8.0$  Hz, 2H, H-d), 2.86 (t,  $J_{l,k} = 7.5$  Hz, 2H, H-l), 2.32 (s, 3H, SCOC<sub>H</sub><sub>3</sub>), 2.17-2.09 (m, 2H, H-b), 2.09-2.01 (m, 2H, H-e), 1.58-1.53 (m, 4H, H-j and H-k), 1.31 (bs, 14H, (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz D<sub>2</sub>O:** 197.0 (C-m), 173.8 (C-g), 104.6 (C-1'), 103.8 (C-1), 80.1 (C-3), 77.0 (C-5'), 76.4 (C-5), 76.0 (C-4), 74.4 (C-2), 74.2 (C-3'), 72.7 (C-i), 72.6 (C-2') 72.1, 71.6-70.3 (C<sub>PEG</sub>), 70.2 (C-4'), 69.5 (C-a), 62.6 (C-6'), 61.8 (C-6), 51.3 (C-c), 50.9 (C-d), 38.9 (C-f), 31.9 (C-n), 31.4-31.0, 30.53, 30.49, 27.7 ((CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>), 23.5 (C-b), 23.0 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>39</sub>H<sub>73</sub>NNaO<sub>19</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>: 946.4116, found 946.4108 [M+Na]<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -0.8 (C = 0.01 g/mL, H<sub>2</sub>O).

**Compound 3: 24,24'-dithiobis {3-[3-(3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)] propylsulfonyl}propyl β-D-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside**



To a solution of compound **19** (500 mg, 0.541mmol) in MeOH (4.3 mL), was added a solution of MeONa in MeOH (1.08 mL, 1 mol/L). The reaction mixture was stirred at room temperature first under atmosphere of argon during 2 days then under atmosphere of air during 1 day. The solution was neutralized with Dowex H<sup>+</sup>, filtered and concentrated *in vacuo* to give compound **3** (460 mg, 98%) as a white powder. TLC (isopropanol/EtOAc/H<sub>2</sub>O, 3/3/1.5): R<sub>f</sub> = 0.21.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 4.48 (d,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1), 4.45 (d,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.07 (s, 2H, H-h), 4.05-4.00 (m, 1H, H-a), 3.98 (dd,  $J_{6a,6b} = 12.5$  Hz,  $J_{6a,5} = 2.0$  Hz, 1H, H-6a), 3.93 (d,  $J_{4',3'} = 3.5$  Hz, 1H, H-4'), 3.84-3.76 (m, 4H, H-a', H-6b and H-6'), 3.74-3.60 (m, 17H, H-5', H-3', H-3, H-4', H-5 and H<sub>PEG</sub>), 3.55 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2'), 3.47 (t,  $J_{i,j} = 6.5$  Hz, 2H, H-i), 3.41 (t,  $J_{f,e} = 6.5$  Hz, 2H, H-f), 3.35 (t,  $J_{c,b} = 6.5$  Hz, 2H, H-c), 3.35-3.31 (m, 1H, H-2), 3.25 (t,  $J_{d,e} = 8.0$  Hz, 2H, H-d), 2.66 (t,  $J_{l,k} = 7.0$  Hz, 2H, H-l), 2.17-2.09 (m, 2H, H-b), 2.09-2.01 (m, 2H, H-e), 1.66 (bs, 2H,

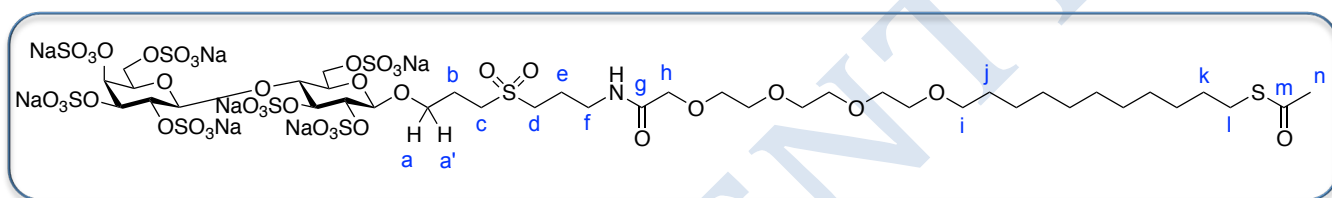
H-k), 1.54 (bs, 2H, H-j), 1.29 (bs, 14H, (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz D<sub>2</sub>O:** 173.8 (C-g), 104.6 (C-1'), 103.8 (C-1), 80.2 (C-3), 77.0 (C-5'), 76.4 (C-5), 76.0 (C-4), 74.4 (C-2), 74.2 (C-3'), 72.7 (C-i), 72.6 (C-2'), 72.1, 71.6-71.3 (C<sub>PEG</sub>), 70.2 (C-4'), 69.5 (C-a), 62.6 (C-6'), 61.8 (C-6), 51.3 (C-c), 50.9 (C-d), 40.6 (C-l) 38.9 (C-f), 31.6-30.9, 30.3, 27.8 ((CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>), 23.5 (C-b), 23.0 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>-</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>74</sub>H<sub>139</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>36</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup>: 1759.7990, found 1759.8107 [M-H]<sup>-</sup>

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -2.2 (C = 0.01 g/mL, H<sub>2</sub>O).

**Compound 23: Persulfated {3-[3-(3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)]propylsulfonyl} propyl β-D-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside**



A: Py•SO<sub>3</sub> complex (724 mg, 4.55 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound **19** (120 mg, 0.130 mmol) in anhydride pyridine (1 mL). The reaction mixture was stirred at 60 °C during 3 days. The reaction was cooled to 0°C and quenched by addition of Et<sub>3</sub>N (0.92 mL, 1.5 equivalents/Py•SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.92 mL, 5 equivalents/Py•SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure and purified by column of Sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion exchange column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was concentrated and lyophilized. The spectrum <sup>1</sup>H NMR indicated that the sulfation was incomplete. The compound **23** (188 mg, 88%) fully sulfated was obtained after repeating all the procedures.

B: Py•SO<sub>3</sub> (301 mg, 1.89 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound **19** (50 mg, 54 μmol) in anhydride pyridine (2 mL). The reaction mixture was heated by microwave at 100 °C during 2 hours. The reaction was cooled to 0°C and quenched by the addition of Et<sub>3</sub>N (0.92 mL, 1.5 equivalents/Py•SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.92 mL, 5 equivalents/Py•SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion change column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was concentrated and lyophilized to give compound **23** (87 mg, 98%) as a white powder.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 5.10 (d, J<sub>4',3'</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4'), 4.94 (d, J<sub>1,2</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1), 4.78 (d,

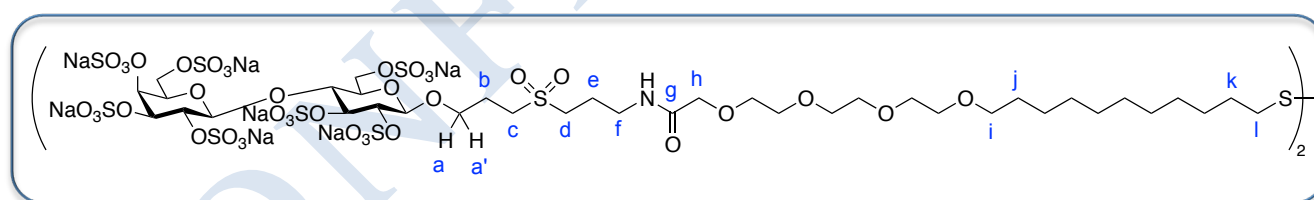
$J_{1',2'} = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.68 (dd,  $J_{3,4} = 7.0$  Hz,  $J_{3,2} = 5.5$  Hz, 1H, H-3), 4.53 (dd,  $J_{3',2'} = 10.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.0$  Hz, 1H, H-3'), 4.47 (dd,  $J_{6a,6b} = 11.0$  Hz,  $J_{6a,5} = 4.0$  Hz, 1H, H-6a), 4.42 (dd,  $J_{2,1} = 6.0$  Hz,  $J_{2,3} = 5.5$  Hz, 1H, H-2), 4.40 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2'), 4.29 (dd,  $J_{6b,6a} = 11.0$  Hz,  $J_{6b,5} = 4.0$  Hz, 1H, H-6b), 4.28 (d,  $J_{6',5'} = 6.0$  Hz, 2H, H-6'), 4.19 (t,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 7.0$  Hz, 1H, H-4), 4.11-4.05 (m, 2H, H-5 and H-5'), 4.08 (s, 2H, H-h), 4.03 (dd,  $J_{a,a'} = 10.0$  Hz,  $J_{a',b} = 6.0$  Hz, 1H, H-a), 3.79 (dd,  $J_{a',a} = 10.0$  Hz,  $J_{a',b} = 6.0$  Hz, 1H, H-a'), 3.76-3.62 (m, 12H, H<sub>PEG</sub>), 3.53 (t,  $J_{i,j} = 6.5$  Hz, 2H, H-i), 3.46-3.37 (m, 4H, H-c and H-f), 3.28 (t,  $J_{d,e} = 8.0$  Hz, 2H, H-d), 2.89 (t,  $J_{l,k} = 7.5$  Hz, 2H, H-l), 2.36 (s, 3H, SCOC $\underline{\text{H}}_3$ ), 2.19-2.01 (m, 4H, H-b and H-e), 1.58 (tt,  $J_{j,k} = J_{j\text{CH}_2} = 7.0$  Hz, 2H, H-j), 1.58 (tt,  $J_{k,l} = J_{k\text{CH}_2} = 7.0$  Hz, 2H, H-k), 1.42-1.25 (bs, 14H, (CH $_2$ ) $_7$ ) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  90MHz D $_2\text{O}$ :** 202.0 (C-m), 173.2 (C-g), 101.6 (C-1'), 100.3 (C-1), 78.3 (C-3), 77.8 (C-2), 76.4 (C-3'), 76.0 (C-2'), 75.8 (C-4'), 75.6 (C-4), 74.3 (C-5 or C-5'), 72.5 (C-5' or C-5), 71.7 (C-i), 71.3, 71.0, 70.4-70.1, 69.9 (C-h and C<sub>PEG</sub>), 68.2 (C-a), 67.5 (C-6), 67.0 (C-6'), 50.2 (C-d), 50.0 (C-c), 38.0 (C-f), 30.8 (SCOC $\underline{\text{H}}_3$ ), 30.4 (C-l), 29.7, 29.6-29.3, 29.1, 28.7 26.0 (CH $_2$ ) $_7$ , 22.2 (C-b), 21.7 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI $^-$  HR-MS)** m/z calculated for C $_{39}$ H $_{66}$ NNa $_5$ O $_{40}$ S $_9$  $^{2-}$ : 795.5068, found 795.5186 ([M-2Na] $^{2-}$ /2).

$[\alpha]_D^{20} = -7.8$  (C = 0.01 g/mL, H $_2$ O).

**Compound 4: Persulfated 32,32'-dithiobis {3-[3-(3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)]propylsulfonyl}propyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside**



A: Py•SO $_3$  complex (321 mg, 2.02 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound 3 (50 mg, 28.9  $\mu$ mol) in anhydride pyridine (289  $\mu$ L). The reaction mixture was stirred at 60  $^{\circ}$ C during 3 days. The reaction was cooled to 0 $^{\circ}$ C and quenched by the addition of Et $_3$ N (0.41 mL, 1.5 equivalents/Py•SO $_3$ ) and MeOH (0.41 mL, 5 equivalents/Py•SO $_3$ ). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion change column (BioRad AG 50W-X8 200, Na $^+$ ). The filtrate was concentrated and lyophilized. The spectrum  $^1\text{H}$  NMR indicated that the sulfation was incomplete. The compound 4 (103 mg, quantitative) fully sulfated was obtained after repeating all the procedures.

B: Py•SO<sub>3</sub> complex (321 mg, 2.02 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound **3** (50 mg, 54 μmol) in anhydride pyridine (2 mL). The reaction mixture was heated by microwave at 100 °C during 2 hours. The reaction was cooled to 0°C and quenched by the addition of Et<sub>3</sub>N (0.41 mL, 1.5 equivalents/ pyridine•SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.41 mL, 5 equivalents/ pyridine•SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion change column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was concentrated and lyophilized to give compound **4** (102 mg, 97%) as a white powder.

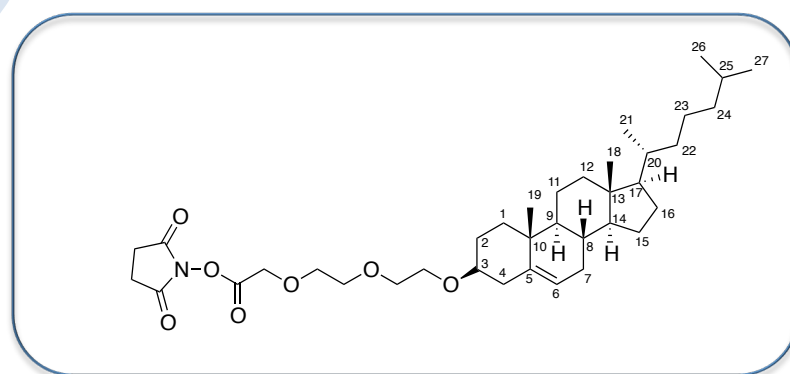
**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 5.10 (d,  $J_{4',3'} = 3.0$  Hz, 1H, H-4'), 4.93 (d,  $J_{1,2} = 6.0$  Hz, 1H, H-1), 4.78 (d,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 4.66 (dd,  $J_{3,4} = 7.0$  Hz,  $J_{3,2} = 5.5$  Hz, 1H, H-3), 4.53 (dd,  $J_{3',2'} = 10.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.0$  Hz, 1H, H-3'), 4.44 (dd,  $J_{6a,6b} = 13.0$  Hz,  $J_{6a,5} = 4.0$  Hz, 1H, H-6a), 4.40 (dd,  $J_{2,1} = 6.0$  Hz,  $J_{2,3} = 5.5$  Hz, 1H, H-2), 4.39 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2'), 4.29 (dd,  $J_{6b,6a} = 13.0$  Hz,  $J_{6b,5} = 4.0$  Hz, 1H, H-6b), 4.28 (d,  $J_{6',5'} = 6.0$  Hz, 2H, H6'), 4.18 (t,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 7.0$  Hz, 1H, H-4), 4.12-3.99 (m, 3H, H-5, H-5' and H-a), 4.09 (s, 2H, H-h), 3.79 (dd,  $J_{a,a'} = 10.0$  Hz,  $J_{a,b} = 5.0$  Hz, 1H, H-a), 3.77-3.61 (m, 12H, H<sub>PEG</sub>), 3.54 (t,  $J_{ij} = 6.5$  Hz, 2H, H-i), 3.46-3.37 (m, 4H, H-c and H-f), 3.28 (t,  $J_{d,e} = 8.0$  Hz, 2H, H-d), 2.76 (t,  $J_{l,k} = 7.0$  Hz, 2H, H-l), 2.18-2.01 (m, 4H, H-b and H-e), 1.70 (tt,  $J_{k,l} = J_{k,CH_2} = 7.0$  Hz, 2H, H-k), 1.58 (tt,  $J_{j,i} = J_{j,CH_2} = 7.0$  Hz, 2H, H-j), 1.47-1.23 (bs, 14H, (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz D<sub>2</sub>O:** 173.2 (C-g), 101.7 (C-1'), 100.4 (C-1), 78.3 (C-3), 77.9 (C-2), 76.5 (C-3'), 76.1 (C-2'), 75.9 (C-4'), 75.7 (C-4), 74.3 (C-5 or C-5'), 72.6 (C-5' or C-5), 71.8 (C-i), 71.1, 71.0, 70.5-70.3, 70.0 (C-h and 6 C<sub>PEG</sub>), 68.4 (C-a), 67.5 (C-6), 67.1 (C-6'), 50.3 (C-d), 50.1 (C-c), 39.6 (C-l), 38.1 (C-f), 30.0-29.4, 29.3, 28.7 26.2 (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>, 22.3 (C-b), 21.7 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI HR-MS)** m/z calculated for C<sub>74</sub>H<sub>126</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>10</sub>O<sub>78</sub>S<sub>18</sub><sup>4-</sup>: 773.9976, found 774.0105 ([M-4Na]<sup>4-</sup>/4); C<sub>74</sub>H<sub>126</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>11</sub>O<sub>78</sub>S<sub>18</sub><sup>3-</sup>: 1039.6600, found 1039.6655 ([M-3Na]<sup>3-</sup>/3).

$[\alpha]_D^{20} = -5.5$  (C = 0.01 g/mL, H<sub>2</sub>O).

**Compound 29: 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 8-(cholest-5-en-3β-yloxy)-3,6-dioxaoctan-1-oate**



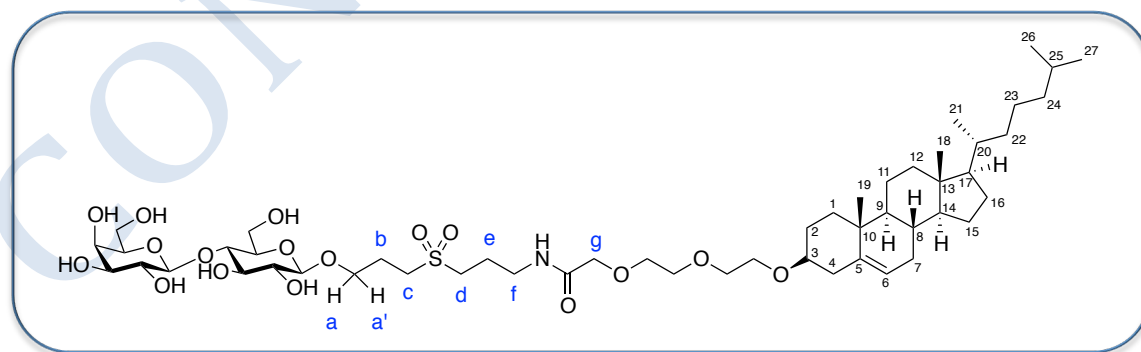
To a solution of compound **31** (500 mg, 0.939 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9.4 mL) was added N-hydroxysuccinimide (209 mg, 1.878 mmol, 2 equiv) and EDC·HCl (215 mg, 1.127 mmol, 1.2 equiv). The reaction mixture was stirred at 0 °C during 30 min then at room temperature during 22 hours under atmosphere of argon. The reaction mixture was diluted with 90 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and then washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> (100 mL × 3), H<sub>2</sub>O (100 mL × 1), saturated aqueous solution of NaCl (100 mL × 1), dried with MgSO<sub>4</sub>, evaporated *in vacuo* to give the compound **29** (530 mg, 90%) as yellow oil. TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10): R<sub>f</sub> = 0.82.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz CDCl<sub>3</sub>:** 5.29-5.23 (m, 1H, chol-H6), 4.46 (s, 2H, OCOCH<sub>2</sub>O), 3.75-3.48 (m, 8H, H<sub>PEG</sub>), 3.16-3.05 (m, 1H, chol-H3), 2.78 (s, 4H, NCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.35-0.82 (m, 28H, H of cholesteryl), 0.92 (s, 3H, chol-H19), 0.84 (d, J<sub>21,22</sub> = 6.5 Hz, 3H, chol-H21), 0.80 (d, J<sub>27,25</sub> = 6.5 Hz, 3H, chol-H27), 0.79 (d, J<sub>26,25</sub> = 6.5 Hz, 3H, chol-H26), 0.60 (s, 3H, H18) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz CDCl<sub>3</sub>:** 169.0 (NCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 166.2 (OCOCH<sub>2</sub>O), 140.9 (chol-C5), 121.7 (chol-C6), 79.7 (chol-C3), 71.5, 71.1, 70.3, 67.2 (C<sub>PEG</sub>) 66.7 (OCOCH<sub>2</sub>O), 56.9 (chol-C17), 56.4 (chol-C14), 50.4 (chol-C9), 42.5 (chol-H13), 40.0 (chol-C24), 39.7 (chol-C12), 39.2 (chol-C4), 37.4 (chol-C1), 37.0 (chol-C10), 36.4 (chol-C22), 35.9 (chol-C20), 32.10 (chol-C7), 32.06 (chol-C8), 28.5, 28.4 (chol-C2 and chol-C16), 28.1 (chol-C25), 24.4 (chol-C15), 24.0 (chol-C23), 23.0, 22.7 (chol-C26 and chol-C27), 21.2 (chol-C11), 19.5 (chol-C19), 18.9 (chol-C21), 12.0 (chol-C18) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>37</sub>H<sub>59</sub>NNaO<sub>7</sub><sup>+</sup>: 652.4189, found 652.4181 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Compound 27: {3-[3-[8-(cholest-5-en-3β-yloxy)-3,6-dioxaoctylamido]}propylsulfonyl}propyl β-D-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside**



To a solution (1.2 mL) of compound **18** (43 mg, 0.068 mmol, 1.1 equiv) in DMF (1.2 mL), was added compound **29** (35mg, 0.062 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature. After 1 hour, the reaction mixture was evaporated *in vacuo* and sephadex LH20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 50/50) gave compound **27** (50 mg, 80%). TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.25): R<sub>f</sub> = 0.46.



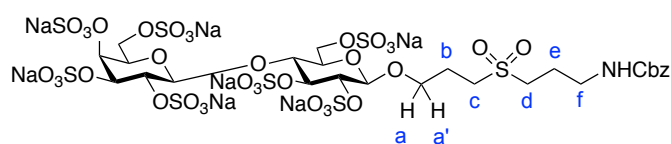
**RMN  $^1\text{H}$  360MHz 25%  $\text{CDCl}_3$  + 75%  $\text{CD}_3\text{OD}$ :** 5.29-5.24 (1H, m, chol-H6), 4.27 (d,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1), 4.22 (d,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 3.92 (s, 2H, chol-H-g), 3.97-3.86 (m, 1H, H-a), 3.81 (dd,  $J_{6a,6b} = 12.5$  Hz,  $H_{6a,5} = 3.0$  Hz, 1H, H-6a), 3.76 (dd,  $J_{4',3'} = 3.5$  Hz, 1H, H-4'), 3.68-3.62 (m, 2H, H-a' and H-6b), 3.69-3.53 (m, 11H, H-6', H-5',  $\text{CH}_2$  of PEG), 3.51 (dd,  $J_{3',2'} = 7.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.5$  Hz, 1H, H-3'), 3.49-3.44 (m, 3H, H-3, H-4 and H-5), 3.40 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2'), 3.37-3.08 (m, 6H, H-2, chol-H3, H-c and H-f), 3.03 (m, 2H, H-d), 2.09-1.89 (m, 4H, H-b and H-c), 2.32-0.69 (m, 28H, H of cholesteryl), 0.93 (s, 3H, chol-H19), 0.84 (d,  $J_{21,20} = 6.5$  Hz, 3H, chol-H21), 0.78 (d,  $J_{27,25} = 6.5$  Hz, 3H, chol-H27), 0.78 (d,  $J_{26,25} = 6.5$  Hz, 3H, chol-H26), 0.61 (s, 3H, chol-H18) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  90MHz 25%  $\text{CDCl}_3$  + 75%  $\text{CD}_3\text{OD}$ :** 171.1 ( $\text{NHCOO}$ ), 140.1 (chol-C5), 121.3 (chol-C6), 103.4 (C-1'), 102.5 (C-1), 79.4 (chol-C3), 79.3 (C-4), 77.4 (C-5'), 75.3 (C-5''), 74.7 (C-3'), 74.6 (C-2), 73.1 (C-3), 72.9 (C-2'), 70.8 (chol-C3), 70.4, 70.3 ( $\text{C}_{\text{PEG}}$ ), 69.7 (C-g), 68.6 (C-4'), 67.0 (C-a), 66.6 ( $\text{C}_{\text{PEG}}$ ), 60.9 (C-6'), 60.6 (C-6), 56.4 (chol-C17), 55.8 (chol-C14), 49.9 (chol-C9), 49.8 (C-d), 49.2 (C-c), 41.9 (chol-C13), 39.4 (chol-C24), 39.0 (chol-C12), 38.5 (chol-C4), 36.9 (C-f), 36.7 (chol-C1), 36.3 (chol-C10), 35.7 (chol-C22), 35.3 (chol-20), 31.5 (cholC7), 31.4 (chol-C8), 27.8, 27.7 (chol-C2 and chol-C16), 27.5 (chol-C25), 23.7 (chol-C15), 23.3 (chol-C23), 22.1, 21.9, 21.72, 21.69 (C-b, C-e, chol-C26 and chol-C27) 20.6 (chol-C11), 18.6 (chol-C19), 18.0 (chol-C21), 11.1 (chol-C18) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for  $\text{C}_{51}\text{H}_{89}\text{NNaO}_{17}\text{S}^+$ : 1042.5749, found 1042.5729  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15.8$  (C = 0.01 g/mL, DMSO).

**Compound 25: Persulfated [3-(3-benzyloxycarbonylamino)propylsulfonyl]propyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside**



A:Py•SO<sub>3</sub> complex (436 mg, 2.75 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound 17 (50 mg, 78.2  $\mu\text{mol}$ ) in pyridine (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 60 °C during 3 days. The reaction was cooled to 0°C and quenched by the addition of Et<sub>3</sub>N (0.55 mL, 1.5 equivalents/ Py•SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.55 mL, 5 equivalents/ Py•SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH).



The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion change column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was concentrated and lyophilized. The spectrum of NMR H<sup>1</sup> of the product that was obtained indicated the presence of N-sulfate (10%) undesired that the sulfation was not complete. The product fully sulfated was obtained after repeating all the procedures.

B Py•SO<sub>3</sub> complex (436 mg, 2.74 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound **17** (50 mg, 78 μmol) in pyridine (2 mL). The reaction mixture was heated by microwave at 100 °C during 2 hours. The reaction was cooled to 0°C and quenched by the addition of Et<sub>3</sub>N (0.56 mL, 1.5 equivalents/ Py•SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.56 mL, 5 equivalents/Py•SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated. The spectrum of NMR H<sup>1</sup> of the product that was obtained indicated the presence of *N*-sulfate (10%) undesired and that the sulfation was not complete. The product fully sulfated was obtained after procedure A.

C: Py•SO<sub>3</sub> complex (436 mg, 2.75 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound **17** (50 mg, 78.2 μmol) in pyridine (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 60 °C during 3 days. The reaction was cooled to 0°C and quenched by the addition of Et<sub>3</sub>N (0.55 mL, 1.5 equivalents/ Py•SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.55 mL, 5 equivalents/ Py•SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion change column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was concentrated and lyophilized. The spectrum of NMR H<sup>1</sup> of the product that was obtained indicated the presence of N-sulfate (10%) undesired and that the sulfation was not complete. The product fully sulfated was obtained after repeating all the procedures.

The mixture of product *N*-sulfated and non-*N*-sulfated was treated with [0.2 M] HCl at 0°C overnight. After neutralization using triethylammonium acetate buffer, a C-18 reversed-phase silica gel chromatography followed by ion exchange column (Bio-Rad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>) gave compound **25** (81%) as a white solid.

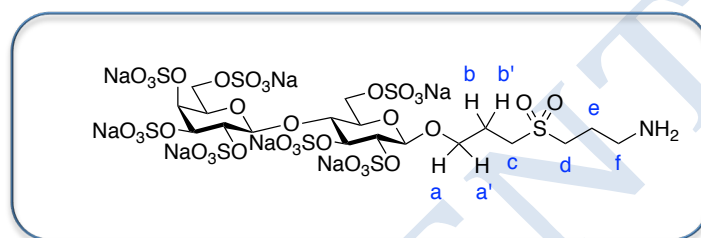
**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 7.52-7.35 (m, 5H, C<sub>arom</sub>), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub> of Cbz), 5.09 (d,  $J_{4',3'} = 3.5$  Hz, 1H, H-4'), 4.94 (d,  $J_{1,2} = 6.0$  Hz, 1H, H-1), 4.68 (dd,  $J_{3,4} = 7.0$  Hz,  $J_{3,2} = 6.0$  Hz, 1H, H-3), 4.52 (dd,  $J_{3',2'} = 10.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.0$  Hz, 1H, H-3'), 4.47 (dd,  $J_{6a,6b} = 10.0$  Hz,  $J_{6a,5} = 6.5$  Hz, 1H, H-6a), 4.44 (t,  $J_{2,1} = J_{2,3} = 6.0$  Hz, 1H, H-2), 4.40 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2'), 4.32-4.24 (m, 1H, H-6b), 4.28 (d,  $J_{6',5'} = 6.0$  Hz, 2H, H-6'), 4.19 (t,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 7.0$  Hz, 1H, H-4), 4.10-3.97 (m, 3H,

H-a, H-5 and H-5'), 3.81-3.71 (m, 1H, H-a'), 3.44-3.17 (m, 6H, H-c, H-d and H-f), 2.11-1.95 (m, 4H, H-b and H-e) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  90MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 129.1, 128.6, 127.9 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 101.2 (C-1'), 99.7 (C-1), 77.9 (C-3), 77.4 (C-2), 76.0 (C-3'), 75.6 (C-2'), 75.4 (C-4'), 75.2 (C-4), 73.6 (C-5 or C-5'), 72.1 (C-5' or C-5), 67.7 (C-a), 67.1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  and C-6), 66.6 (C-6'), 49.6 (C-d), 49.4 (C-c), 39.0 (C-f), 21.9 (C-b or C-e), 21.8 (C-e or C-b) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{NNa}_8\text{O}_{36}\text{S}_8^+$ : 1375.7808, found 1375.7801  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Compound 24: Persulfated 3-(3-amino-propylsulfonyl)propyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside**



To a solution of compound **25** (54 mg, 40  $\mu\text{mol}$ ) in water (1.8 mL), was added triethylammonium acetate buffer (1 mol/L, 40  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (20 % on charcoal, 4 mg) and tBuOH (0.9 mL). After degassing, the reaction mixture was stirred during 24 hours under  $\text{H}_2$ . The mixture was filtered through a celite pad and rinsed by  $\text{H}_2\text{O}$ . After concentration in vacuo and lyophilization, the residue was desalted on a steric exclusion chromatography Biogel column with triethylammonium bicarbonate buffer [20mM]. After lyophilisation and exchange, compound **24** was obtained with 93 % yield (45 mg).

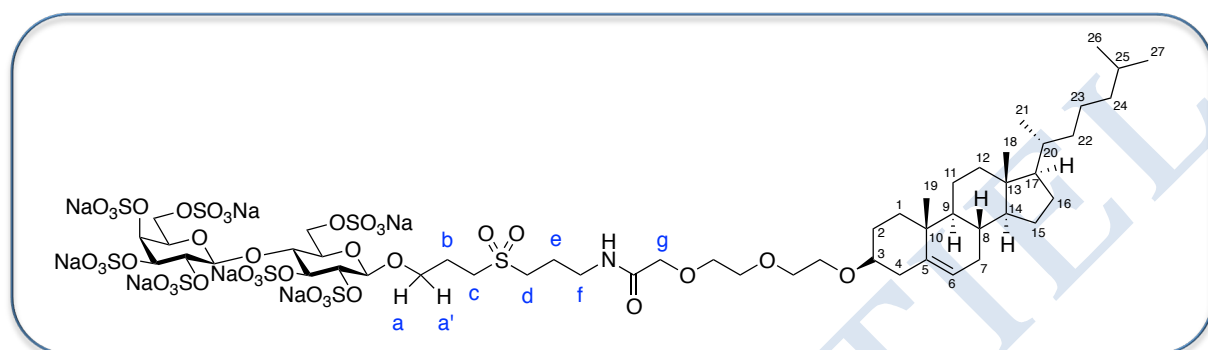
**RMN  $^1\text{H}$  360MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 5.10 (d,  $J_{4',3'} = 3$  Hz, 1H, H-4'), 5.07 (d,  $J_{1,2} = 5.5$  Hz, 1H, H-1), 4.79 (d,  $J_{1',2'} = 7.5$  Hz, 1H, H-1'), 4.73 (t,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 6.0$  Hz, 1H, H-3), 4.53 (dd,  $J_{3',2'} = 10.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.0$  Hz, 1H, H-3'), 4.51 (m, 1H, H-6a), 4.42 (dd,  $J_{2,3} = 6.0$  Hz,  $J_{2,1} = 5.5$  Hz, 1H, H-2), 4.39 (dd,  $J_{2',3'} = 10.0$  Hz,  $J_{2',1'} = 8.0$  Hz, 1H, H-2'), 4.33-4.18 (m, 5H, H-6a, H-6', H-5 and H-5'), 4.10 (t,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 6.0$  Hz, 1H, H-4), 4.04-3.95 (ddd,  $J_{a,a'} = 10$  Hz,  $J_{a,b} = 7.0$  Hz,  $J_{a,b'} = 4.0$  Hz, 1H, H-a), 3.87-3.78 (ddd,  $J_{a',a} = 10$  Hz,  $J_{a',b} = 7.0$  Hz,  $J_{a',b'} = 4.0$  Hz, 1H, H-a'), 3.54-3.37 (m, 2H, H-c), 3.40 (t,  $J_{d,e} = 8.0$  Hz, 2H, H-d), 3.21 (t,  $J_{f,e} = 8.0$  Hz, 2H, H-f), 2.32-2.02 (m, 4H, H-b and H-e) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  90MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 101.3 (C-1'), 98.8 (C-1), 78.0 (C-3), 77.6 (C-2), 75.9 (C-3'), 75.6 (C-2'), 75.4 (C-4'), 75.1 (C-4), 74.6 (C-5 or C-5'), 72.2 (C-5' or C-5), 67.5 (C-a), 67.1 (C-6), 66.7 (C-6'), 49.2 (C-c and C-d), 38.3 (C-f), 22.0 (C-b), 20.1 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NNa}_8\text{O}_{34}\text{S}_8^+$ : 1241.7440, found

1241.7415 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Compound 28: Persulfated {3-{3-[8-(cholest-5-en-3 $\beta$ -yloxy)-3,6-dioxaoctylamidol]propylsulfonyl}propyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside**



A: Py $\cdot$ SO<sub>3</sub> complex (523 mg, 3.29 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound **27** (95 mg, 94  $\mu$ mol) in pyridine (1.0 mL). The reaction mixture was stirred at 60 °C during 2 days. The reaction was cooled to 0°C and quenched by the addition of Et<sub>3</sub>N (0.68 mL, 1.5 equivalents/ Py $\cdot$ SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.68 mL, 5 equivalents/ Py $\cdot$ SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion exchange column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was concentrated and lyophilized. The spectrum <sup>1</sup>H NMR indicated that the sulfation was incomplete. The compound **28** (145 mg, 89%) fully sulfated was obtained after repeating all the procedures. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.25): R<sub>f</sub> = 0.30.

B: Py $\cdot$ SO<sub>3</sub> complex (275 mg, 1.73 mmol, 5 equivalents/OH) was added to a solution of compound **27** (50 mg, 50  $\mu$ mol) in pyridine (2 mL). The reaction mixture was heated by microwave at 100 °C during 2 hours. The reaction was cooled to 0°C and quenched by the addition of Et<sub>3</sub>N (0.22 mL, 1.5 equivalents/ Py $\cdot$ SO<sub>3</sub>) and MeOH (0.22 mL, 5 equivalents/ Py $\cdot$ SO<sub>3</sub>). The resulting mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a column of sephadex LH20 (MeOH). The appropriate fractions were collected, concentrated and the residue was passed through an ion change column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was concentrated and lyophilized. The product (74 mg, 86%) fully sulfated was obtained as white powder. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.5): R<sub>f</sub> = 0.30.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz (D<sub>2</sub>O 325K):** 5.36 (bs, 1H, H-6), 5.09 (d, *J*<sub>4',3'</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-4'), 4.91 (d, *J*<sub>1,2</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1), 4.78 (d, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1'), 4.71 (t, *J*<sub>3,2</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-3), 4.53 (dd,

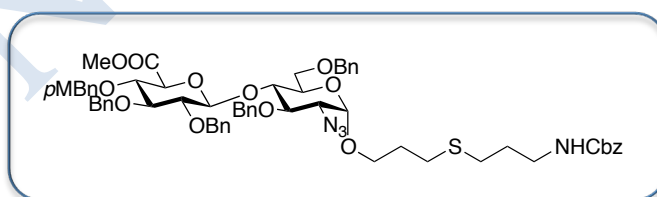
$J_{3',2'} = 10.0$  Hz,  $J_{3',4'} = 2.5$  Hz, 1H, H-3'), 4.50-4.38 (m, 3H, H-6a, H-2 and H-2'), 4.33-4.26 (m, 1H, H-6b), 4.28 (s, 2H, H-g), 4.17 (t,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 7.0$  Hz, 1H, H-4), 4.11-3.99 (m, 5H, H-6', H-5, H-5' and H-a), 3.83-3.74 (m, 1H, H-a'), 3.74-3.60 (m, 8H, CH<sub>2</sub> of PEG), 3.43-3.31 (m, 4H, H-c and H-f), 3.25 (t,  $J_{d,e} = 7.5$  Hz, 2H, H-d), 3.20 (bs, 1H, chol-H3), 2.36 (m, 1H, chol-H4a), 2.26-0.77 (m, 28 H, H of cholesteryl), 2.12 (tt,  $J_{b,a} = J_{b,c} = 7.0$  Hz, 2H, H-b), 2.05 (tt,  $J_{e,d} = J_{e,f} = 7.5$  Hz, 2H, H-e), 1.01 (s, 3H, chol-H19), 0.95 (d,  $J_{21,20} = 6.0$  Hz, 3H, chol-H21), 0.89 (d,  $J_{26,25} = J_{27,25} = 6.5$  Hz, 6H, chol-26 = chol-27), 0.71 (s, 3H, chol-H18) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz (D<sub>2</sub>O):** 171.3 (NHCO), 139.9 (chol-C5), 120.6 (chol-C6), 100.1 (C-1'), 99.1 (C-1), 78.8 (chol-C3), 76.6 (C-3), 76.2 (C-2), 74.9 (C-3'), 74.5 (C-4'), 74.3 (C-2'), 74.1 (C-4), 72.6 (C-5), 71.0 (C-5'), 69.5 (C<sub>PEG</sub>), 69.1 (C-6'), 68.8 (C<sub>PEG</sub>), 68.7 (C<sub>PEG</sub>), 66.9 (C-a), 65.9 (C<sub>PEG</sub>), 65.8 (C<sub>PEG</sub>), 65.6 (C-6), 55.9 (chol-C17), 55.5 (chol-C14), 49.3 (chol-C9), 48.8 (C-d), 48.6 (C-c), 41.4 (chol-C13), 39.0 (chol-C24), 38.6 (chol-C12), 37.7 (chol-C4), 36.5 (C-f), 36.3 (chol-C1) 35.7 (chol-C10), 35.4 (chol-C22), 35.0 (chol-C20), 30.9 (chol-C7 and chol-C8), 27.4, 27.0 (chol-C2 and chol-C16) 26.8 (chol-C25), 23.4 (chol-C15), 23.2 (chol-C23), 21.8, 21.6, 20.6 (C-b, C-e, chol-C26 and chol-C27), 20.1 (chol-C11), 18.1 (chol-C19), 17.9 (chol-C21), 10.9 (chol-C18) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>51</sub>H<sub>82</sub>NNa<sub>8</sub>O<sub>38</sub>S<sub>8</sub><sup>+</sup>: 1756.1462, found 1756.1422 [M+Na]<sup>+</sup>; C<sub>51</sub>H<sub>82</sub>NNa<sub>9</sub>O<sub>38</sub>S<sub>8</sub><sup>2+</sup>: 889.5680, found 889.5674 ([M+2Na]<sup>2+</sup>/2).

$[\alpha]_D^{20} = -11.8$  (C = 0.01 g/mL, H<sub>2</sub>O).

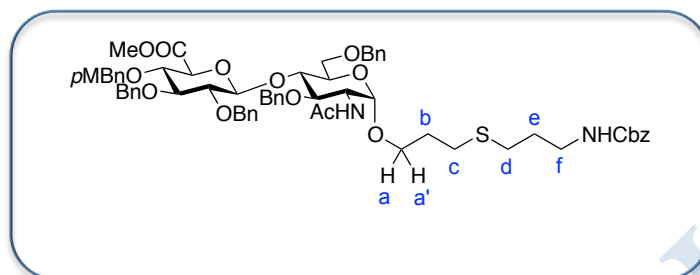
**Compound 39: 3-[(3-benzyloxycarbonylamino)propylthio]propyl (methyl 2,3-di-O-benzyl-4-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→4)-2-azoture-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranoside**



To an anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution (728 μL) of compound **36** (500 mg, 546 μmol) was added compound **13** (246 mg, 1.092 mmol), pyrocatechol (72 mg, 655 μmol, 1.2 equiv), and a THF solution of triethylborane (655 μmol, 1M, 655 μL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours under atmosphere of argon. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was evaporated in vacuo. The compound **39** (528 mg, 461 μmol, 85%) was obtained by flash chromatography (EP/AE: 9/1 to 5/5). TLC (Petroleum ether/EtOAc, 70/30): R<sub>f</sub> = 0.26.

NMR analyses are identical with regard to those described by Gavard *et al.*<sup>139</sup>

**Compound 40: 3-[(3-benzyloxycarbonylamino)propylthio]propyl (methyl 2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-(4-methoxybenzyl)-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranoside**



To a MeOH solution (10 mL) of compound **39** (1.7 g, 1.49 mmol) was added 1,3-propanedithiol (3 mL, 29.8 mmol, 20 equiv), Et<sub>3</sub>N (4.2 mL, 29.8 mmol, 20 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 days under argon atmosphere. After evaporation of MeOH, pyridine (8 mL) and Ac<sub>2</sub>O (4 mL, 36.2 mmol, 24 equiv) were added at 0°C. Then it was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere. The reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and laved with an aqueous solution of NaOH (0.1 M), H<sub>2</sub>O, an aqueous solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1 M), H<sub>2</sub>O, and an aqueous solution of CuSO<sub>4</sub> (15%). After filtration on celite to remove the precipitates and emulsion formed in the two phases, the organic phase was laved with H<sub>2</sub>O and dried on MgSO<sub>4</sub>. After filtration and concentration in vacuo, the compound **40** (1.3 g, 1.07 mmol, 72%) was obtained by a flash chromatography (EP/AE: 5/5 to 2/8). TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10): R<sub>f</sub> = 0.65.

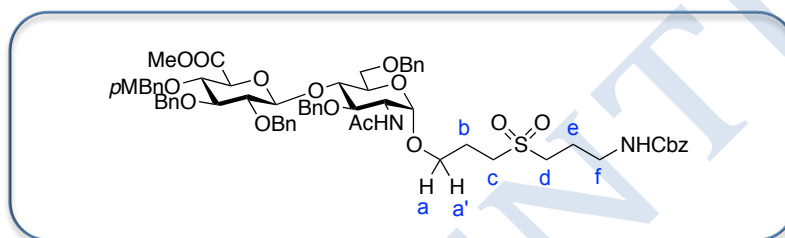
**RMN <sup>1</sup>H 300MHz (CDCl<sub>3</sub>):** 7.32-7.14 (m, 25H, Ph), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ph), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ph), 5.28 (d, *J*<sub>NH,2</sub> = 8.5 Hz, 1H, NHCOMe), 5.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub> of Cbz), 4.88 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.81 (m, 1H, H-1), 4.77 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.59 (d, *J* = 11.5, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.54 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.49 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.42 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.38 (d, *J*<sub>1',2'</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 4.31 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.09 (ddd, *J*<sub>2,3</sub> = 10.5 Hz, *J*<sub>2,NH</sub> = 8.5 Hz, *J*<sub>2,1</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.99 (t, *J*<sub>4,3</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 3.82 (dd, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.0 Hz, *J*<sub>6a,5</sub> = 3.0 Hz, 1H, H6a), 3.75-3.60 (m, 3H, H-3', H-5' and H-a), 3.70 (s, 3H, PhOMe), 3.61-3.42 (m, 3H, H-3, H-5 and H6b), 3.48 (s, 3H, COOMe), 3.42-3.29 (m, 3H, H-2', H-4' and Ha'), 3.24 (dt, *J*<sub>f,NH</sub> = *J*<sub>f,e</sub> = 6.5 Hz, 2H, H-f), 2.92 (t, *J*<sub>c,b</sub> or *J*<sub>d,e</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-c or H-d), 2.89 (t, *J*<sub>d,e</sub> or *J*<sub>c,b</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-d or H-c), 2.08-1.86 (m, 4H, H-b and H-e), 1.71 (s, 3H, NHCOMe) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz (CDCl<sub>3</sub>):** 169.9 (NHCOCH<sub>3</sub>), 168.9 (COOCH<sub>3</sub>), 159.4 (PhOMe), 156.5 (COO of Cbz), 139.3, 138.5, 138.3, 138.1, 136.6, 130.2, 129.6, 128.6, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5

(Ph), 113.9 (PhOMe), 103.1 (C-1'), 97.4 (C-1), 84.0 (C-4'), 82.3 (C-2'), 79.4 (C-3'), 77.6, 77.4 (C-3 and C-4), 74.3 (C-5'), 71.0 (C-5), 67.7 (C-6), 66.8 (CH<sub>2</sub> of Cbz), 66.4 (C-a), 55.4 (PhOMe), 52.4, 52.1 (C-2 and COOMe), 40.1 (C-f), 29.7, 29.4, 29.1, 29.0 (C-b, C-c, C-d and C-e), 23.4 (NHCOMe) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>65</sub>H<sub>76</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>15</sub>S<sup>+</sup>: 1179.4864, found 1179.4880 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Compound 41: 3-[(3-benzyloxycarbonylamino)propylsulfonyl]propyl (methyl 2,3-di-O-benzyl-4-O-(4-methoxybenzyl)-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→4)-2-acetamino-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-α-D-glucopyranoside**



The compound **40** (300 mg, 259 μmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.45 mL). A solution of oxone ([0.3 M] of KHSO<sub>5</sub>) (2.60 mL) and a solution of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [0.8 M] (1.95 mL) were added. Then a phase transfer catalyst (9 mg, 0.1 equivalent) was added. The reaction was stirred room temperature. After 3 hours the reaction was quenched by an aqueous solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [0.1 M] (23.4 mL, 9 equivalents). The reaction mixture was diluted with 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and then laved with a saturated aqueous solution of NaCl (100 mL × 3), dried with MgSO<sub>4</sub>. After filtration and evaporation, the compound **41** (280 mg, 236 μmol, 91%) was obtained after purification by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 97/3) as white foam. TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90/10): R<sub>f</sub> = 0.60.

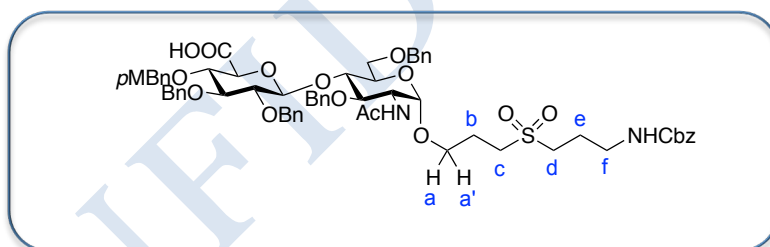
**RMN <sup>1</sup>H 360MHz (CDCl<sub>3</sub>):** 7.32-7.15 (m, 25H, Ph), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, PhOMe), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, PhOMe), 5.46 (d, *J*<sub>NH,2</sub> = 8.5 Hz, 1H, NH COCH<sub>3</sub>), 5.08-5.01 (m, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub> of Cbz), 4.84 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 (d, *J*<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, 1H, H-1), 4.77 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.59 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.51 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.49 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.46 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.37 (d, *J*<sub>1',2'</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 4.31 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.05 (ddd, *J*<sub>2,3</sub> = 10.0 Hz, *J*<sub>2,NH</sub> = 8.5 Hz, *J*<sub>2,1</sub> = 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.96 (t, *J*<sub>4,3</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-4), 3.79 (dd, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.0 Hz, *J*<sub>6a,5</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-6a), 3.75-3.60 (m, 3H, H-3', H-5' and H-a), 3.70 (s, 3H, PhOMe), 3.63 (t, *J*<sub>3,2</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-3), 3.48 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.50-3.30 (5H, m, H-5, H-2', H-4', H-6b, and H-a'), 3.24 (2H, dt, *J*<sub>f,NH</sub> = *J*<sub>f,e</sub> = 6.5 Hz, H-f), 2.92 (t, *J*<sub>c,b</sub> or *J*<sub>d,e</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-c or H-d),

2.89 (t,  $J_{d,e}$  or  $J_{c,b}$  = 7.5 Hz, 2H, H-d or H-c), 2.08-1.86 (m, 4H, H-b and H-e), 1.71 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ ) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  90MHz ( $\text{CDCl}_3$ ):** 170.2 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 169.0 ( $\text{COOCH}_3$ ), 159.5 ( $\text{PhOMe}$ ), 139.3, 138.6, 138.5, 138.2 136.5, 130.3, 129.7, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (Ph), 113.9 ( $\text{PhOMe}$ ), 103.2 (C-1'), 97.5 (C-1), 84.2 (C-4'), 82.4 (C-2'), 79.5 (C-3'), 77.5 (C-4 or C-3), 77.2 (C-3 or C-4), 75.7, 75.3, 74.7 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  and  $\text{CH}_2\text{PhOMe}$ ), 74.5 (C-5'), 73.6, 73.5 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  and  $\text{CH}_2\text{PhOMe}$ ), 71.4 (C-5), 67.9 (C-6), 67.1 ( $\text{CH}_2$  of Cbz), 65.7 (C-a), 55.5 ( $\text{PhOMe}$ ), 52.4 (C-2 and  $\text{COOCH}_3$ ), 50.5 (C-c or C-d), 50.4 (C-d or C-c), 39.4 (C-f), 23.3 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 22.9 (C-b or C-e), 22.5 (C-e or C-b) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for  $\text{C}_{65}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{NaO}_{17}\text{S}^+$ : 1211.4762, found 1211.4769  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ;  $\text{C}_{65}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{S}^+$ : 1189.4943, found 1189.4940  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Compound 42: 3-[(3-benzyloxycarbonylamino)propylsulfonyl]propyl (2,3-di-O-benzyl-4-O-(4-methoxybenzyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamino-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside**



The compound **41** (50 mg, 42  $\mu\text{mol}$ ), was dissolved in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) under an atmosphere of argon. Sodium trimethylsilanolate (9,4 mg, 84  $\mu\text{mol}$ , 2.0 equivalents) was added. The mixture was stirred for one night and quenched by AcOH (12  $\mu\text{mol}$ , 5 equivalents). The solvent was evaporated in vacuo. The compound **42** (40 mg, 34  $\mu\text{mol}$ , 80%) was obtained after a purification of reversed-phase chromatography ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ : 0/100 to 60/40). TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 90/10):  $R_f$  = 0.54.

**RMN  $^1\text{H}$  360MHz ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):** 7.41-7.18 (m, 27H, Ph), 6.81 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, PhOMe), 5.09 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.05 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  of Cbz), 4.78 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 4.74 (d,  $J_{1,2}$  = 4.0 Hz, 1H, H-1), 4.70 (d,  $J$  = 11.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.66 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.62 (d,  $J$  = 10.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.55 (d,  $J$  = 12.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.55 (d,  $J_{1,2'}$  = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 4.54 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.37 (d,  $J$  = 12.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.10 (dd,  $J_{2,3}$  = 10.8 Hz,  $J_{2,1}$  = 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.96 (t,

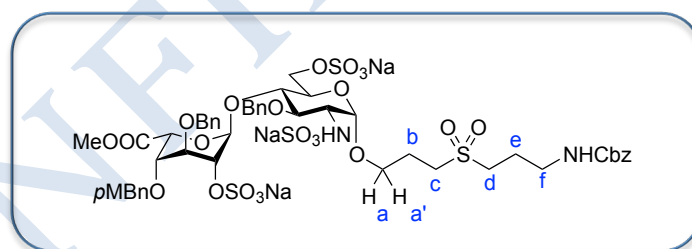


$J_{4,3} = J_{4,5} = 9.0$  Hz, 1H, H-4), 3.91 (dd,  $J_{6a,6b} = 10.5$  Hz,  $J_{6a,5} = 3.5$  Hz, 1H, H-6a), 3.82-3.70 (m, 5H, H-a, H-3, H-3', H-5 and H-5'), 3.74 (s, 3H, PhOMe), 3.55 (dd,  $J_{6b,6a} = 10.5$  Hz,  $J_{6b,5} = 1.5$  Hz, 1H, H-6b), 3.53-3.47 (m, 1H, H-a'), 3.46 (t,  $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8.5$  Hz, 1H, H-4'), 3.38 (dd,  $J_{2',3'} = 8.5$  Hz,  $J_{2',1'} = 7.5$  Hz, 1H, H-2'), 3.22 (t,  $J_{d,e} = 6.5$  Hz, 2H, H-d), 3.19 (t,  $J_{c,b} = 6.5$  Hz, 2H, H-c), 3.09-3.01 (m, 2H, H-f), 2.08 (tt,  $J_{b,a} = J_{b,c} = 7.0$  Hz, 2H, H-b), 1.95 (tt,  $J_{e,d} = J_{e,f} = 7.0$  Hz, 2H, H-e), 1.87 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90MHz (CD<sub>3</sub>OD):** 171.8 (NHCOCH<sub>3</sub>), 159.4 (Ph), 139.3, 138.7, 138.5, 138.0, 130.5, 129.4, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.2, 127.1, 126.9 (Ph), 113.2 (PhOMe), 127.8 (C-1'), 97.4 (C-1), 83.7 (C-4') 82.2 (C-2'), 80.0 (C-3'), 78.4 (C-3), 77.4 (C-4), 76.1 (C-5'), 75.0, 74.6, 73.9, 73.7, 73.0 (CH<sub>2</sub>Ph and CH<sub>2</sub>PhOMe), 70.9 (C-5), 67.7 (C-6), 66.1 (CH<sub>2</sub> of Cbz), 65.6 (C-a), 54.3 (PhOMe), 52.5 (C-2), 49.9 (C-f), 49.3 (C-c), 38.9 (C-d), 22.2 (C-e), 21.9 (C-b), 21.4 (NHCOCH<sub>3</sub>) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>-</sup> HR-MS):** m/z calculated for C<sub>64</sub>H<sub>73</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>17</sub>S<sup>-</sup>: 1173.4630, found 1173.4595 [M-H]<sup>-</sup>.

**Compound 46: 3-[(3-benzyloxycarbonylamino)propylsulfonyl]propyl (methyl 3-O-benzyl-4-O-(4-methoxybenzyl)-2-O-sulfonato-β-L-idopyranosyluronate)-(1→4)-3-O-benzyl-2-sulfoamino-6-O-sulfonato-2-deoxy-α-D-glucopyranoside trisodium salt**



To an anhydrous MeOH solution (9.4 mL) of compound **43** (1.5 g, 1.50 mmol) was added activated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (104 mg, 750 μmol, 0.5 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour under argon atmosphere. The deacetylated compound **44** (1.2 g, 1.25 mmol, 83%) was obtained after a flash chromatography (EP/AE: 5/5).

To an anhydrous MeOH solution (3 mL) of the deacetylated compound **44** (439 mg, 457 μmol) was added propanedithiol (917 μL, 9.14 mmol, 20 equiv) and Et<sub>3</sub>N (1.27 mL, 9.14 mmol, 20 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 days under argon and dark atmosphere. The reduced product, compound **45** (349 mg, 375 μmol, 82%) was obtained after a flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH: 98/2 to 90/10).

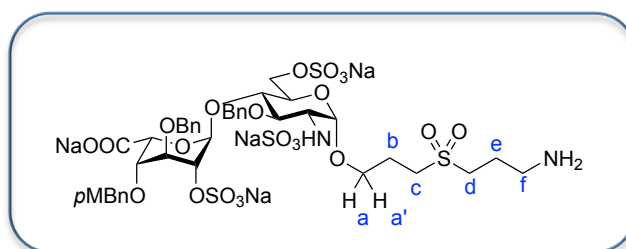


The compound **45** (349 mg, 373  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in anhydrous pyridine (11.3 mL) and a complex of pyridine $\cdot\text{SO}_3$  (890 mg, 5.595 mmol, 5 equivalents/OH) was added. The reaction mixture was stirred at 55  $^\circ\text{C}$  during 2 days. The reaction was quenched by the addition of  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.6 mL, 2 equivalents/pyridine $\cdot\text{SO}_3$ ) and  $\text{H}_2\text{O}$  (14.4 mL). The mixture was stirred at room temperature during 1 hour, evaporated under reduced pressure, purified by a phase-reversed chromatography of C18 (MeOH/triethylammonium acetate buffer (5 mM, pH 7.0) : 30/70 to 40/60). After lyophilization 3 times, the product was passed through an ion change column (BioRad AG 50W-X8 200,  $\text{Na}^+$ ). The compound **46** (438 mg, 353  $\mu\text{mol}$ , 95%) was obtained after lyophilization as a white powder.

**RMN  $^1\text{H}$  400MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 7.25-7.02 (m, 15H, Ph), 6.95 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, PhOMe), 6.81 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, PhOMe), 5.04 (brs, 1H, H-1'), 4.94 (d,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, 1H, H-1), 4.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub> of Cbz), 4.70 (d,  $J_{5,4'} = 1.5$  Hz, 1H, H-5'), 4.60 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.51 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.36-4.29 (m, 1H, H-2'), 4.33 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.32 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>PhOMe), 4.21-4.05 (4H, CH<sub>2</sub>PhOMe, CH<sub>2</sub>Ph, H6a and H6b), 3.96 (brs, 1H, H-3'), 3.94-3.85 (m, 1H, H-5), 3.72-3.64 (m, 1H, H-a), 3.67 (s, 3H, PhOMe), 3.63 (t,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4), 3.44 (t,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3), 3.43-3.37 (m, 2H, H-4' and H-a'), 3.27 (dd,  $J_{2,3} = 10$  Hz,  $J_{2,1} = 3.0$  Hz, 1H, H-2), 3.00 (m, 5H, COOMe and H-f), 2.56 (t,  $J_{b,c} = 6.0$  Hz, 2H, H-c), 2.39 (t,  $J_{d,e} = 7.0$  Hz, 2H, H-d), 1.85-1.69 (m, 2H, H-b), 1,61 (tt,  $J_{e,d} = J_{e,f} = 7.0$  Hz, 2H, H-e) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** (C=O), 130.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.3, 127.9, 127.5 (Carom), 113.9 (Carom pMBn), 97.6 (C-1'), 97.1 (C-1), 78.0 (C-3), 75.2 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.3 (C-4), 71.8 (CH<sub>2</sub>Ph), 70.2 (C-2'), 70.0 (CH<sub>2</sub>PhOMe), 69.6 (C-4'), 69.2 (C-5), 67.2 (C-a), 67.1 (C-5'), 66.6 (C-6), 57.7 (C-2), 55.3 (CH<sub>2</sub>PhOMe), 28.9 (C-e), 28.8 (C-c), 28.6 (C-d), 28.3 (C-b) ppm.

**Compound 47: 3-[(3-amino)propylsulfonyl]propyl (sodium 3-O-benzyl-4-O-(4-methoxybenzyl)-2-O-sulfonato- $\beta$ -L-idopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 4)-3-O-benzyl-2-sulfoamino-6-O-sulfonato-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside trisodium salt**



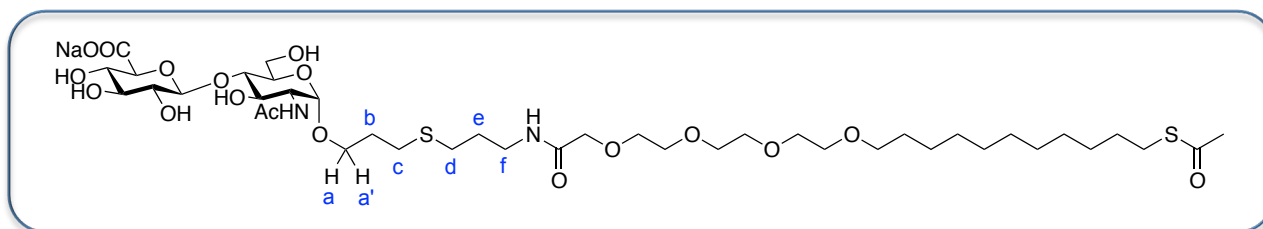
In an aqueous solution (6.1 mL) of compound **46** (1.1g, 887  $\mu\text{mol}$ ) was added an aqueous solution of

KOH (256  $\mu\text{L}$ , 6 M, 1.50 mmol, 50 equiv) and an aqueous solution of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (394  $\mu\text{L}$ , 11.4 M, 4.5 mmol, 150 equiv). The reaction mixture should be heated at  $37^\circ\text{C}$  overnight. But the thermometer was not well placed. It was heated at  $100^\circ\text{C}$  then neutralized with an aqueous solution of  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (3mL, 6 M). The crud product was purified first by a reversed-phase chromatography [MeOH/triethylamine acetate buffer (5 mM, pH 7): 0/100 to 40/60] witch didn't work very well. Then it was repurified by a reversed-phase chromatography [MeOH/triethylamine acetate buffer (5 mM, pH 7): 0/100 to 16/84]. After lyophilization for 5 times, the residue was passed through an ion-changed column Bio-Rad  $\text{Na}^+$ . The filtrate was lyophilized and the compound **47** (620 mg, 540  $\mu\text{mol}$ , 61%) was obtained as white powder. TLC (isopropanol/ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ , 6/3/0.25):  $R_f = 0.47$ .

**RMN  $^1\text{H}$  400MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 7.46-7.09 (m, 15H, Ph), 7.21 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, PhOMe), 6.93 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, PhOMe), 5.25 (brs, 1H, H-1'), 5.08 (d,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, 1H, H-1), 4.97 (s, 2H, CH<sub>2</sub> of Cbz), 4.75 (brs, 1H, H-5'), 4.73 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.58 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.53 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.46 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.34 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.46-4.42 (m, 1H, H-2'), 4.42 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.35 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.33-4.29 (m, 1H, H-5), 3.99-3.88 (m, 3H, H-4, H-3' and H4'), 3.87-3.74 (m, 3H, H-6a, H-6b and H-a), 3.77 (s, 3H, PhOMe), 3.62 (dd,  $J_{3,2} = 10.0$  Hz,  $J_{3,4} = 8.0$  Hz, 1H, H-3'), 3.59-3.52 (m, 1H H-a'), 3.35 (dd,  $J_{2,3} = 10.0$  Hz,  $J_{2,1} = 3.5$  Hz, 1H, H-2), 3.32-3.08 (m, 6H, H-c, H-d and H-f), 2.15-1.98 (m, 2H, H-b), 1.94 (tt,  $J_{e,d} = J_{e,f} = 7.0$  Hz, H-e) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz  $\text{D}_2\text{O}$ :** 158.7 (C=O or C-OMe of *p*MBn), 158.2 (C-OMe of *p*MBn or C=O), 137.2, 137.1, 130.6, 129.9, 129.2, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 127.7 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 114.0 ( $\text{C}_{\text{arom}}$  of *p*MBn), 97.9 (C-1'), 97.2 (C-1), 76.6 (C-3), 74.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 74.5 (C-4), 73.1 (C-4'), 72.0, 71.9 (C-5 and CH<sub>2</sub>Ph), 71.7 (CH<sub>2</sub>Ph), 71.3 (C-2'), 69.2 (C-3'), 68.6 (C-5'), 66.9 (C-6 and CH<sub>2</sub> of Cbz), 65.8 (C-a), 57.2 (C-2), 55.4 (PhOMe), 49.6 (C-d), 49.2 (C-c), 38.8 (C-f), 21.7 (C-e), 21.4 (C-b) ppm.

**Compound 50:** {3-[3-(25-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)]propylsulfo}propyl (sodium  $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetylamino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside



To an aqueous solution (6.3 mL) of compound **42** (50 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) was added  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (50 mg)

and tBuOH (3.15 mL). The H<sub>2</sub> was imported to the reaction flask after removing the O<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred during 24 hours and the catalyst was then removed over celite and washed by a mixed solution (100 mL) of CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (20/80). After concentration in vacuo and lyophilization, the product was purified by a reversed-phase chromatography (CH<sub>3</sub>CN/aqueous solution of triethylammonium acetate [20 mM]: 0/100—10/90). The deprotected product, compound **49** was obtained after concentration in vacuo and lyophilization 3 times.

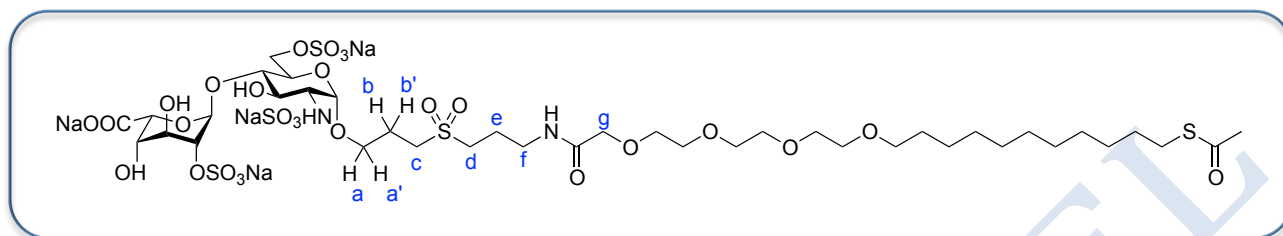
To an aqueous solution (560 μmol) of the compound **49** was added a DMF solution (475 μmol) of compound **11** (11.3 mg, 21.25 μmol, 0.5 equiv) and Et<sub>3</sub>N (7.1 μmol, 51 μmol, 1.2 equiv). After 30 min, a DMF solution (665 μmol) of product **3** (15.9 mg, 29.75 μmol, 0.7 equiv) was added again and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The DMF was removed in vacuo. The product was purified by a phase-reversed chromatography (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O: 100/0 to 60/40). After concentration in vacuo and lyophilization 3 times, the residue was passed through an ion-exchanged column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was lyophilized and the product (32mg, 31 μmol, 72%) was obtained as a white powder. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.25): R<sub>f</sub> = 0.60.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 4.87 (d, *J*<sub>1,2</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-1), 4.53 (d, *J*<sub>1',2'</sub> = 8.0Hz, 1H, H-1'), 4.06 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>O), 3.92 (dd, *J*<sub>2,3</sub> = 11.0 Hz, *J*<sub>2,1</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-2), 3.92-3.85 (m, 3H, H-4, H-6a and H-6b), 3.85-3.55 (m, 18H, H-3, H-4', H-5, H-a, H-a' and NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>), 3.52 (t, *J*<sub>3',2'</sub> = *J*<sub>3',4'</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-3'), 3.51 (d, *J*<sub>5',4'</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5'), 3.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.40 (t, *J*<sub>f,e</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-f), 3.37 (dd, *J*<sub>2,3</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>2,1</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.33 (t, *J*<sub>c,b</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-c), 3.25 (t, *J*<sub>d,e</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-d), 2.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.33 (s, 3H, SCOCH<sub>3</sub>) 2.17-1.98 (m, 4H, H-b and H-e), 2.04 (s, 3H, SCOCH<sub>3</sub>), 1.63-1.51 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.41-1.24 (m, 14H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90 MHz D<sub>2</sub>O:** 197.2 (SCOCH<sub>3</sub>), 176.1 (COONa), 174.7 (NHCOCH<sub>3</sub>), 173.0 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 103.0 (C-1'), 97.3 (C-1), 79.8 (C-3), 76.3 (C-4'), 76.0 (C-5'), 73.6 (C-2'), 72.3 (C-3'), 71.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 71.3 (C-5), 71.1, 70.55, 70.50, 70.46, 70.42, 70.3, 70.2, 70.1 (NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>), 70.1 (C-4), 66.3 (C-a), 60.5 (C-6), 54.0 (C-2), 50.4 (C-d), 50.0 (C-c), 38.0 (C-f), 30.9 (SCOCH<sub>3</sub>), 30.3, 30.26, 30.20, 30.1, 30.03, 29.99, 29.95, 29.94, 29.82 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 29.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 29.5, 26.6 ((OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 22.6 (NHCOCH<sub>3</sub>), 22.2, 22.0 (C-b and C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>-</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>41</sub>H<sub>73</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup>: 977.4204, found 977.4166 [M-Na]<sup>-</sup>.

**Compound 52:** {3[3-(25-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)]propylsulfo}propyl (sodium 2-O-sulfonato-β-L-idopyranosyluronate)-(1→4)-2-sulfoamino-6-O-sulfonato-2-deoxy-α-D-glucopyranoside trisodium salt



Pd(OH)<sub>2</sub>/C (50 mg) was added to a solution of compound **47** (50 mg, 43.6 μmol) in H<sub>2</sub>O (6.5 mL) and tBuOH (3.2 mL). The H<sub>2</sub> was imported to the reaction flask after removing the O<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred during 24 hours and the catalyst was then removed over celite. The deprotected product, compound **51** was filtered on a reversed-phase chromatography (CH<sub>3</sub>CN /triethylammonium acetate buffer (20 mM, pH 7.0)). After evaporation in vacuo and lyophilization 3 times, the deprotected product was dissolved in H<sub>2</sub>O (573 μL). Et<sub>3</sub>N (7.3 μL, 52.3 μmol, 1.2 equiv) and a solution of compound **11** (11.6 mg, 21.8 μmol, 0.5 equiv) in CH<sub>3</sub>CN (487 μL) were added. After 30 min, a solution of compound **11** (16.3 mg, 30.5 μmol, 0.7 equiv) in CH<sub>3</sub>CN (683 μL) was added again. The reaction was stirred overnight at room temperature. The CH<sub>3</sub>CN was removed in vacuo. The product was purified by a phase-reversed chromatography (CH<sub>3</sub>CN /triethylammonium acetate buffer (20 mM, pH 7.0): 100/0 to 60/40). After concentration in vacuo and lyophilization 3 times, the residue was passed through an ion-changed column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was lyophilized and the compound **52** (55 mg, 35 μmol, 80%) was obtained as a white powder. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.25): R<sub>f</sub> = 0.33.

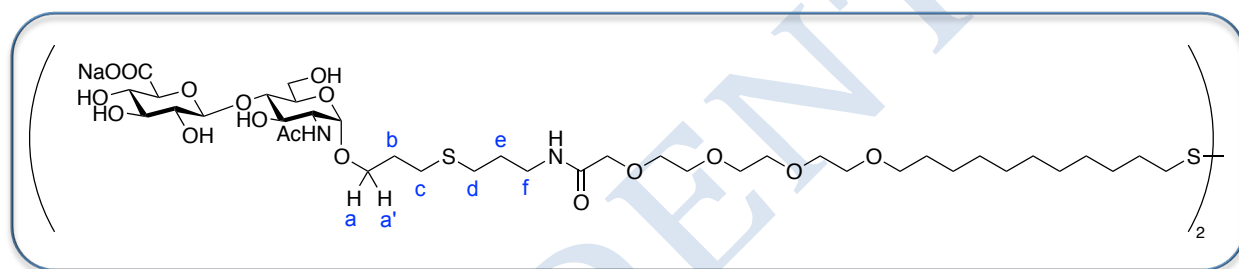
**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 5.15 (brs, 1H, H-1'), 5.14 (d, *J*<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.82 (d, *J*<sub>5',4'</sub> = 2.5 Hz, 2H, H-5'), 4.36-4.23 (m, 3H, H-2', H-6a and H-6b), 4.08 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>O), 4.06 (brt, *J*<sub>3',2'</sub> = *J*<sub>3',4'</sub> = 4.0 Hz, 1H, H-3'), 4.03-3.95 (m, 2H, H-4 and H-4'), 3.87 (dt, *J*<sub>a,a'</sub> = 12.0 Hz, *J*<sub>a,b</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-a), 3.77-3.58 (m, 15H, NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>, H-3, H-5 and H-a'), 3.51 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.41 (t, *J*<sub>f,e</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-f), 3.39 (t, *J*<sub>c,b</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-c), 3.28 (dd, *J*<sub>2,3</sub> = 10.5 Hz, *J*<sub>2,1</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.28 (t, *J*<sub>d,e</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-d), 2.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.36 (s, 3H, SCOC<sub>3</sub>H<sub>3</sub>), 2.14 (dt, *J*<sub>b,b'</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>b,a</sub> = *J*<sub>b,c</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-b = H-b'), 2.06 (tt, *J*<sub>e,d</sub> = *J*<sub>d,f</sub> = 7.5 Hz, 2H, H-e), 1.57 (tt, *J*<sub>11</sub> = *J*<sub>12</sub> = 7.0 Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.41-1.20 (m, 14H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90 MHz D<sub>2</sub>O:** 176.1 (COONa), 173.0 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 99.9 (C-1'), 97.7 (C-1), 78.2 (C-3),

75.2 (C-2'), 71.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 71.0 (NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>), 70.6 (C-5), 70.4, 70.3, 70.20, 70.23 (NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>), 70.0 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 69.8 (C-4), 69.7 (C-3'), 69.6 (C-5'), 69.4 (C-4'), 67.4 (C-6), 66.7 (C-a), 58.4 (C-2), 50.3 (C-c), 50.1 (C-d), 38.0 (C-f), 30.85 (SCOCH<sub>3</sub>) 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.65, 29.62, 29.5, (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 29.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 26.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.9 (C-b), 21.7 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>-</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>39</sub>H<sub>68</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>28</sub>S<sub>5</sub><sup>2-</sup> : 609.1184, found 609.1189 ([M-2Na]<sup>2-</sup>/2); for C<sub>39</sub>H<sub>69</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>28</sub>S<sub>5</sub><sup>2-</sup> : 598.1275, found 598.1282 ([M-3Na+H]<sup>2-</sup>/2); for C<sub>39</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>28</sub>S<sub>5</sub><sup>2-</sup> : 587.1365, found 587.1381 ([M-4Na+2H]<sup>2-</sup>/2).

**Compound 53: 32,32'-dithiobis {3-[3-(3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)]propylsulfopropyl (sodium β-D-glucopyranosyluronate)-(1→4)-2-acetylamino-2-deoxy- α-D-glucopyranoside**



A solution of compound **50** (75 mg, 69 μmol) in anhydrous MeOH (555 μmol) was added a solution of MeONa in anhydrous MeOH (1M, 129 μmol, 2 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature first under atmosphere of argon overnight and then under atmosphere of air during 2 days before neutralized by Dowex H<sup>+</sup>. The compound was purified by a a phase-reversed chromatography (CH<sub>3</sub>CN /triethylammonium acetate buffer (20 mM, pH 7.0): 100/0 to 75/35). After concentration in vacuo and lyophilization, the residue was passed through an ion-changed column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The compound **53** (59 mg, 61 μmol, 89 %) was obtained as a white powder. TLC (isopropanol/EtOAc/H<sub>2</sub>O, 3/3/1): R<sub>f</sub> = 0.17.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz D<sub>2</sub>O:** 4.87 (d,  $J_{1,2} = 3.0$  Hz, 1H, H-1), 4.53 (d,  $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, 1H, H-1'), 4.06 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>O), 3.94 (dd,  $J_{2,3} = 11.0$  Hz,  $J_{2,1} = 3.0$  Hz, 1H, H-2), 3.92-3.85 (m, 3H, H-4, H-6a and H-6b), 3.85-3.75 (m, 3H, H-4', H-5 and H-a), 3.75-3.56 (m, 16H, NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>, H-3 and H-a'), 3.52 (t,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 8.5$  Hz, 1H, H-3'), 3.53 (d,  $J_{5',4'} = 10.0$  Hz, 1H, H-5'), 3.48 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.41 (t,  $J_{f,e} = 7.0$  Hz, 2H, H-f), 3.37 (dd,  $J_{2,3} = 8.0$  Hz,  $J_{2,1} = 3.5$  Hz, 1H, H-2), 3.33 (t,  $J_{c,b} = 7.0$  Hz, 2H, H-c), 3.25 (t,  $J_{d,e} = 7.5$  Hz, 2H, H-d), 2.71 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.17-2.08 (m, 2H, H-b), 2.08-1.99 (m, 2H, H-e), 2.04 (s, 3H, SCOCH<sub>3</sub>), 1.71 (tt,  $J_{CH_2CH_2} = J_{CH_2CH_2} = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.59 (tt,  $J_{CH_2CH_2} = J_{CH_2CH_2} = 7.0$

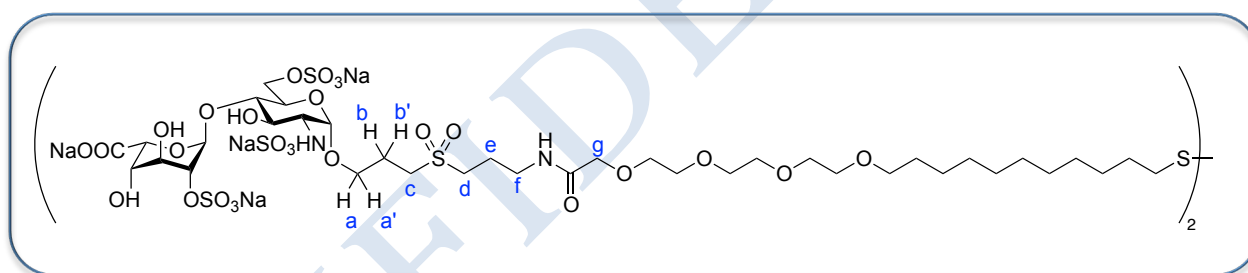
Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.48-1.25 (m, 14H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90 MHz D<sub>2</sub>O:** 175.9 (COONa), 174.7 (NHCOCH<sub>3</sub>), 172.9 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 103.0 (C-1'), 97.3 (C-1), 79.8 (C-3), 76.2 (C-4'), 76.0 (C-5'), 73.6 (C-2'), 72.3 (C-3'), 71.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 71.1 (C-5), 71.1, 70.57, 70.52, 70.45, 70.37 (NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>), 70.1 (C-4), 66.4 (C-a), 60.5 (C-6), 54.0 (C-2), 50.4 (C-d), 50.0 (C-c), 39.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). 38.0 (C-f), 30.5, 30.37, 30.35, 30.3, 30.2, 30.13, 30.06, 30.0, 29.9, 29.3 26.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 22.6 (NHCOCH<sub>3</sub>), 22.2 (C-b), 22.0 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI HR-MS)** m/z calculated for C<sub>78</sub>H<sub>140</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>38</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup>: 1891.7932, found 1891.7869 [M-Na]<sup>-</sup>; for C<sub>78</sub>H<sub>141</sub>N<sub>4</sub>O<sub>38</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup>: 1869.8112, found 1869.8049 [M-2Na+H]<sup>-</sup>; for C<sub>78</sub>H<sub>140</sub>N<sub>4</sub>O<sub>38</sub>S<sub>4</sub><sup>2-</sup>: 934.4020, found 934.4046 ([M-2Ma]<sup>2-</sup>/2).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +30.4 (C = 0.01 g/mL, H<sub>2</sub>O).

**Compound 54: 24,24'-dithiobis {3-[3-(3,6,9,12-tetraoxa-24-thiohexacosylamido)]propylsulfo} propyl (sodium 2-O-sulfonato-β-L-idopyranosyluronate)-(1→4)-2-sulfoamino-6-O-sulfonato-2-deoxy-α-D-glucopyranoside hexasodium salt**



The compound **52** (40 mg, 31.6 μmol) was passed through an ion-exchanged column (BioRad AG 50W-X8 200, tBuNH<sup>+</sup>). After lyophilization, a solution of the residue in anhydrous MeOH (1.200 mL) was prepared and a solution of MeONa in MeOH (1M, 63 μmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature first under atmosphere of argon overnight and then under atmosphere of air during 2 days. An aqueous solution of NaOH (500 μmol, 50mM) was added. After stirred during 1 day, the reaction mixture was neutralized by Dowex H<sup>+</sup>. After concentration in vacuo and lyophilization, the compound was purified by a phase-reversed chromatography (CH<sub>3</sub>CN /triethylammonium acetate buffer (20 mM, pH 7.0): 100/0 to 70/30). After evaporation and lyophilization, the residue was passed through an ion-exchanged column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The compound **54** (31 mg, 25 μmol, 80 %) was obtained as white a powder. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.25): R<sub>f</sub> = 0.20.

**RMN <sup>1</sup>H 400MHz D<sub>2</sub>O:** 5.16 (brs, 1H, H-1'), 5.13 (d, J<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.81 (d, J<sub>5',4'</sub> = 2.0 Hz, 1H, H-5'), 4.35-4.24 (m, 3H, H-2', H-6), 4.07 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>O), 4.06 (brt, J<sub>3',2'</sub> = J<sub>3',4'</sub> = 3.5 Hz,



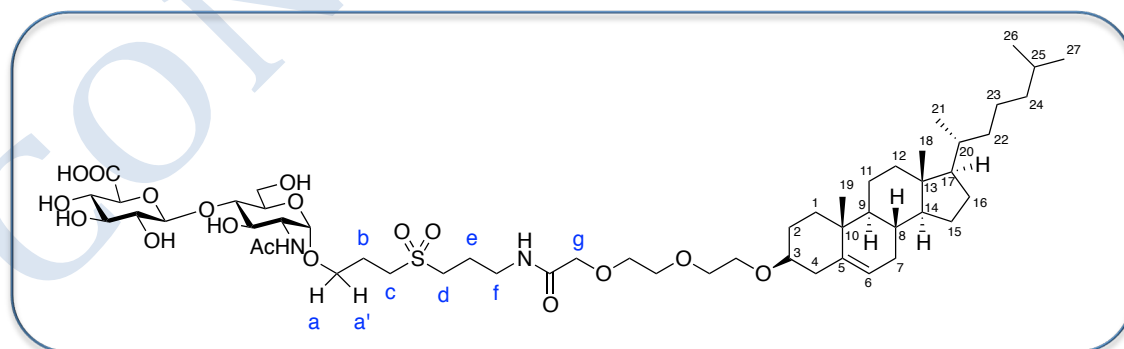
1H, H-3'), 4.03-3.95 (m, 2H, H-4 and H-4'), 3.87 (dt,  $J_{a,a'} = 12.0$  Hz,  $J_{a,b} = 6.0$  Hz, 1H, H-a), 3.80-3.58 (m, 15H, NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>, H-3, H-5 and H-a'), 3.50 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.40 (t,  $J_{f,e} = 7.0$  Hz, 2H, H-f), 3.37 (t,  $J_{c,b} = 7.5$  Hz, 2H, H-c), 3.29 (dd,  $J_{2,3} = 10.5$  Hz,  $J_{2,1} = 3.5$  Hz, 1H, H-2), 3.27 (t,  $J_{d,e} = 7.5$  Hz, 2H, H-d), 2.74 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.14 (dtt,  $J_{b,b'} = 5.0$  Hz,  $J_{b,a} = J_{b,c} = 7.0$  Hz, 2H, H-b = H-b'), 2.05 (tt,  $J_{e,d} = J_{e,f} = 7.5$  Hz, 2H, H-e), 1.71 (tt,  $J_{CH_2CH_2} = J_{CH_2CH_2} = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.58 (tt,  $J_{CH_2CH_2} = J_{CH_2CH_2} = 7.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.48-1.27 (m, 14H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 100 MHz D<sub>2</sub>O:** 176.1 (COONa), 173.0 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 99.9 (C-1'), 97.7 (C-1), 78.3 (C-3), 75.2 (C-2'), 71.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 71.7 (NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>), 70.6 (C-5), 70.43, 70.40, 70.36, 70.33, 70.30 (NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>), 70.1 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 69.9 (C-4), 69.86 (C-3'), 69.6 (C-5'), 69.4 (C-4'), 67.4 (C-6), 66.7 (C-a), 58.4 (C-2), 50.4 (C-c), 50.2 (C-d), 39.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 38.0 (C-f), 30.9, 30.1, 30.02, 30.00, 29.8, 29.69, 29.64, 28.9, 26.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.9 (C-b), 21.7 (C-e) ppm.

**Mass spectroscopy (ESI HR-MS)** m/z calculated for C<sub>74</sub>H<sub>130</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>6</sub>O<sub>54</sub>S<sub>10</sub><sup>2-</sup>: 1198.2077, found 1198.2017 ([M-2Na]<sup>2-</sup>/2).

$[\alpha]_D^{20} = +22.3$  (C = 0.01 g/mL, H<sub>2</sub>O).

**Compound 55: {3-{3-[8-(cholest-5-en-3 $\beta$ -yloxy)-3,6-dioxaoctylamido]}propylsulfonyl}propyl ( $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetylamino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside**



To an aqueous solution (17.3 mL) of compound **42** (137.0 mg, 116.5  $\mu$ mol) was added Pd(OH)<sub>2</sub>/C (137 mg) and tBuOH (8.6 mL). The H<sub>2</sub> was imported to the reaction flask after removing the O<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred during 24 hours and the catalyst was then removed over celite and washed by a mixed solution (100 mL) of CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (20/80). After concentration in vacuo and lyophilization,

the product was purified by a reversed-phase chromatography (CH<sub>3</sub>CN/aqueous solution of triethylammonium acetate [20 mM]: 0/100—10/90). The deprotected product, compound **49** was obtained after concentration in vacuo and lyophilization 3 times.

Compound **29** (40mg, 63.5 μmol, 0.5 equiv) in DMF (1.05 mL) was added to the compound **49** (71 mg, 127.0 μmol). After 30 min, compound **29** (56 mg, 88.9 μmol, 0.7 equiv) in DMF (1.48 mL) was added again. The reaction was stirred overnight at room temperature. Then DMF was removed under vacuo. Flash silica chromatography (EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O: 8/3/0.5 to 8/3/2) followed by elution from a column of sephadex LH20 (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1/1) gave the compound **55** (104 mg, 88.5 μmol, 73%) as a white powder. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.25): R<sub>f</sub> = 0.55.

**RMN <sup>1</sup>H 360MHz 25% CDCl<sub>3</sub> + 75% CD<sub>3</sub>OD:** 5.29-5.23 (m, 1H, chol-H6), 4.73 (d,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, 1H, H-1), 4.39 (d,  $J_{1',2'} = 8.0$  Hz, 1H, H-1'), 3.92 (s, 2H, H-g), 3.87 (dd,  $J_{2,3} = 10.5$ ,  $J_{2,1} = 3.5$  Hz, 1H, H-2), 3.87-3.80 (m, 1H, H-6a), 3.78-3.70 (m, 3H, H-3, H-6b and H-a), 3.66 (t,  $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8.0$  Hz, 1H, H4'), 3.63-3.55 (m, 10H, H-5, H-5' and H<sub>PEG</sub>), 3.48-3.42 (m, 1H, H-a'), 3.39 (t,  $J_{3',2'} = J_{3',4'} = 8.0$  Hz, 1H, H-3'), 3.33 (t,  $J_{f,e} = 7.0$  Hz, 2H, H-f), 3.26-3.23 (m, 1H, H-2'), 3.16-3.11 (m, 1H, chol-H3) 3.13 (t,  $J_{c,b} = 7.5$  Hz, 2H, H-c), 3.04 (t,  $J_{d,e} = 7.5$  Hz, 2H, H-d), 2.33-2.24 (m, 1H, chol-H4a), 2.16-2.08 (m, 1H, chol-H4b), 2.08-0.89 (m, 28 H, H of cholesteryl), 2.04-1.93 (m, 4H, H-b and H-e), 1.92 (s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H, chol-H19), 0.84 (d,  $J_{21,20} = 6.5$  Hz, 3H, chol-H21), 0.783 (d,  $J_{26,25}$  or  $J_{27,25} = 6.5$  Hz, 3H, chol-H26 or chol-H27), 0.779 (d, 3H,  $J_{27,25}$  or  $J_{26,25} = 6.5$  Hz, chol-H27 or chol-H26), 0.61 (s, 3H, chol-H18) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 90 MHz 25% CDCl<sub>3</sub> + 75% CD<sub>3</sub>OD:** 174.3 (C=O), 173.4 (NHCOCH<sub>3</sub>), 172.6 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 141.5 (chol-C5), 122.7 (chol-C6), 104.0 (C-1'), 98.2 (C-1), 80.7 (chol-C3), 80.5 (C-5'), 77.2 (C-3'), 75.1 (C-4'), 74.1 (C-2'), 72.8 (C-4), 72.2 (C-5), 71.7, 71.6, 71.1, 71.0 (C-g and C<sub>PEG</sub>) 70.8 (C-3), 68.0 (C<sub>PEG</sub>), 66.7 (C-a), 61.4 (C-6), 57.8 (chol-C17), 57.2 (chol-C14), 54.8 (C-2), 51.3 (chol-C9), 51.2 (C-d), 50.6 (C-c), 43.2 (chol-C13), 40.8 (chol-C24), 40.4 (chol-C12), 39.9 (chol-C4), 38.3 (C-f), 38.1 (chol-C1), 37.7 (chol-C10), 37.1 (chol-C22), 36.8 (chol-C20), 32.9 (chol-C7), 32.8 (chol-C8), 29.2, 29.1 (chol-C2 and chol-C16), 28.9 (chol-C25), 25.1 (chol-C15), 24.7 (chol-C23), 23.3, 23.1, 23.0, 22.9 (C-b, C-e, chol-C26 and chol-C27), 22.0 (chol-C11), 19.9 (chol-C19), 19.3 (chol-C21), 12.4 (chol-C18) ppm.

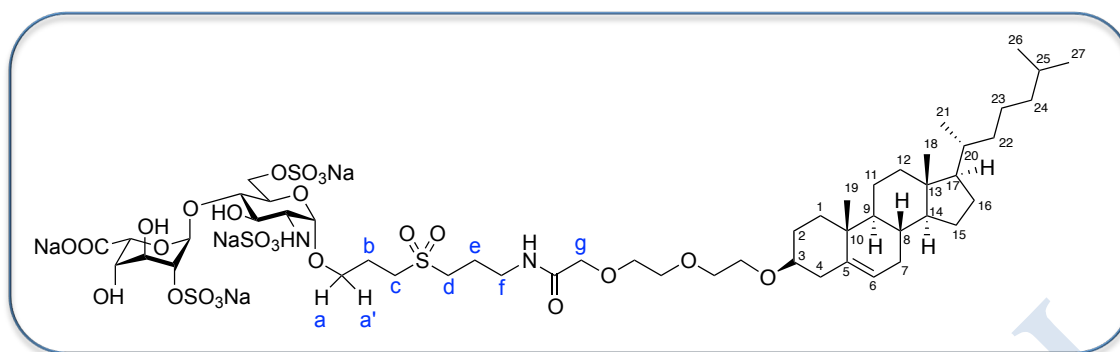
**Mass spectroscopy (ESI<sup>+</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>53</sub>H<sub>90</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>18</sub>S<sup>+</sup>: 1097.5807, found 1097.5791 ([M+Na]<sup>+</sup>).

$[\alpha]_D^{20} = +15.0$  (C = 0.01 g/mL, DMSO).

**Compound 56:** {3-{3-[8-(cholest-5-en-3β-yloxy)-3,6-dioxaoctylamido]}propylsulfonyl}propyl (sodium 2-O-sulfonato-β-L-idopyranosyluronate)-(1→4)-2-sulfoamino-6-O-sulfonato-2-deoxy-



## $\alpha$ -D-glucopyranoside trisodium salt



Pd(OH)<sub>2</sub>/C (97 mg) was added to a solution of compound **44** (97 mg, 85  $\mu$ mol) in H<sub>2</sub>O (12.6 mL) and tBuOH (6.3 mL). The H<sub>2</sub> was imported to the reaction flask after removing the O<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred during 24 hours and the catalyst was then removed over celite. The deprotected product, compound **51** was filtered on a reversed-phase chromatography (CH<sub>3</sub>CN /triethylammonium acetate buffer (20 mM, pH 7.0)). Compound **29** (27 mg, 43  $\mu$ mol, 0.5 equiv) in DMF (0.72 mL) was added to compound **51** (100 mg, 86 $\mu$ mol). After 30 min, compound **29** (38 mg, 60  $\mu$ mol, 0.7 equiv) in DMF (1.00 mL) was added again. The reaction was stirred overnight at room temperature. The DMF was removed under vacuo. The product was purified by a phase-reversed chromatography of C18 (CH<sub>3</sub>CN /triethylammonium acetate buffer (20 mM, pH 7.0) : 0/100 to 45/55). After concentration in vacuo and lyophilization 3 times, the residue was passed through an ion changed column (BioRad AG 50W-X8 200, Na<sup>+</sup>). The filtrate was lyophilized and the compound **56** (94 mg, 69  $\mu$ mol , 81%) was obtained as a white powder. TLC (isopropanol/NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 6/3/0.25): R<sub>f</sub> = 0.26.

**RMN <sup>1</sup>H 400MHz D<sub>2</sub>O (315 K):** 5.35 (brs, 1H, chol-H6, ), 5.20 (brs, 1H, H-1'), 5.13 (d,  $J_{1,2}$  = 3.5 Hz, 1H, H-1), 4.89 (brs, 1H, H-5'), 4.34-4.24 (m, 3H, H-2' and H-6), 4.09 (t,  $J_{3,2'}$  =  $J_{3,4'}$  = 3.5 Hz, 1H, H-3'), 4.06 (s, 2H, NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>), 4.02 (dd,  $J_{4,3'}$  = 3.5,  $J_{4,5'}$  = 2.5 Hz, 1H, H-4'), 4.00-3.94 (m, 1H, H-5), 3.87 (dt,  $J_{a,a'}$  = 10.0,  $J_{a,b}$  = 6.0 Hz, 1H, H-a), 3.77-3.68 (m, 6H, H-3, H-4 and NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>), 3.68-3.59 (m, 5H, H-a' and NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>), 3.40 (t,  $J_{f,e}$  = 7.0 Hz, 2H, H-f), 3.36 (t,  $J_{b,c}$  = 7.5 Hz, 2H, Hc), 3.30 (dd,  $J_{2,3}$  = 10.0,  $J_{2,1}$  = 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.26 (t,  $J_{d,e}$  = 7.5 Hz, 2H, H-d), 3.19 (brs, 1H, chol-H3), 2.41-2.31 (m, 1H, chol-4a), 2.19-0.83 (m, 18H, H of cholesteryl), 2.14 (tt,  $J_{b,a}$  =  $J_{b,c}$  = 6.5 Hz, 2H, H-b), 2.05 (tt,  $J_{e,d}$  =  $J_{e,f}$  = 7.5 Hz, H-e), 1.01 (s, 3H, chol-H19), 0.95 (brs, 3H, chol-H21), 0.88 (d,  $J_{26,25}$  =  $J_{27,25}$  = 6.5 Hz, chol-H26 = chol-H27), 0.71 (s, 3H, chol-H18) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C 100 MHz D<sub>2</sub>O (315 K):** 175.5 (COONa), 172.9 (NHCOCH<sub>2</sub>O), 141.5 (chol-C5), 121.6 (chol-C6), 99.9 (C-1'), 97.8 (C-1), 80.3 (chol-C3), 78.3 (C-3), 75.0 (C-2'), 71.2 (NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>), 70.7 (C-4), 70.38, 70.33

(NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> and NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> or NHCOCH<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>), 69.7 (C-3'), 69.6 (C-4'), 69.4 (C-5), 67.4 (C-6), 66.8 (C-a), 58.5 (C-2), 50.5 (C-d), 50.3 (C-c), 43.0 (C-f), 38.1, 37.3, 30.9, 32.6, 28.5, 23.4, 23.3, 23.2, 22.0, 21.8, 19.8, 19.6, 12.6 ppm.

**Mass spectroscopy (ESI<sup>-</sup> HR-MS)** m/z calculated for C<sub>51</sub>H<sub>87</sub>N<sub>2</sub>O<sub>26</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup>: 1271.4435, found 1271.4429 ([M-4Na+3H]<sup>-</sup>), for C<sub>51</sub>H<sub>86</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>26</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup>: 1293.4255, found 1293.4247 ([M-3Na+2H]<sup>-</sup>), for C<sub>51</sub>H<sub>86</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>26</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup> : 1309.3994, found 1309.3914 ([M-4Na+2H+1K]<sup>-</sup>), for C<sub>51</sub>H<sub>85</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>26</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup> : 1315.4074, found 1315.4067 ([M-2Na+1H]<sup>-</sup>), for C<sub>51</sub>H<sub>85</sub>KN<sub>2</sub>NaO<sub>26</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup> : 1331.3814, found 1331.3747 ([M-2Na+1H+1K]<sup>-</sup>), for C<sub>51</sub>H<sub>84</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>26</sub>S<sub>4</sub><sup>-</sup> : 1337.3888, found 1337.3864 ([M-2Na+1H]<sup>-</sup>).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +15.4 (C = 0.01 g/mL, H<sub>2</sub>O).

CONFIDENTIAL

## Références bibliographiques

- (1) Yellowley, C. *BoneKEy Rep* **2013**, *2*.
- (2) Teicher, B. A.; Fricker, S. P. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2927-2931.
- (3) Karin, N. *Journal of Leukocyte Biology* **2010**, *88*, 463-473.
- (4) Pallavicini, P. S.; Perotti, A.; Poggi, A.; Seghi, B.; Fabbri, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5139-5144.
- (5) De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Witvrouw, M.; De Vreese, K.; Debyser, Z.; Rosenwirth, B.; Peichl, P.; Datema, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 668-674.
- (6) Hendrix, C. W.; Flexner, C.; MacFarland, R. T.; Giandomenico, C.; Fuchs, E. J.; Redpath, E.; Bridger, G.; Henson, G. W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1667-1673.
- (7) Daubeuf, F.; Hachet-Haas, M.; Gizzi, P.; Gasparik, V.; Bonnet, D.; Utard, V.; Hibert, M.; Frossard, N.; Galzi, J.-L. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 11865-11876.
- (8) Marasca, R.; Maffei, R. *Blood* **2014**, *123*, 952-953.
- (9) Kelton, J. G.; Warkentin, T. E. *Blood* **2008**, *112*, 2607-2616.
- (10) Silver, D.; Kapsch, D. N.; Tsoi, E. K. *Annals of Surgery* **1983**, *198*, 301-306.
- (11) Liu, H.; Zhang, Z.; Linhardt, R. J. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 313-321.
- (12) Sinaÿ, P.; Jacquinet, J.-C.; Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Lederman, I.; Choay, J.; Torri, G. *Carbohydr. Res.* **1984**, *132*, C5-C9.
- (13) Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Lederman, I.; Choay, J.; Sinaÿ, P.; Jacquinet, J.-C.; Torri, G. *Carbohydr. Res.* **1986**, *147*, 221-236.
- (14) van Boeckel, C. A. A.; Petitou, M. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1993**, *32*, 1671-1690.
- (15) Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3118-3133.
- (16) Westerduin, P.; Basten, J. E. M.; Broekhoven, M. A.; de Kimpe, V.; Kuijpers, W. H. A.; van Boeckel, C. A. A. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35*, 331-333.
- (17) Wessel, H. P.; Hosang, M.; Tschopp, T. B.; Weimann, B.-J. *Carbohydr. Res.* **1990**, *204*, 131-139.
- (18) Wessel, H. P.; Minder, R.; Englert, G. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1995**, *14*, 1101-1115.
- (19) Wessel, H. P.; Niggemann, J. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **1995**, *14*, 1089-1100.
- (20) Wessel, H. P.; Tschopp, T. B.; Hosang, M.; Iberg, N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 1419-1422.
- (21) Moriya, T.; Saito, K.; Kurita, H.; Matsumoto, K.; Otake, T.; Mori, H.; Morimoto, M.; Ueba, N.;

- Kunita, N. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1674-1677.
- (22) Cochran, S.; Li, C.; Fairweather, J. K.; Kett, W. C.; Coombe, D. R.; Ferro, V. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4601-4608.
- (23) <https://www.med.stanford.edu/clinicaltrials/trials/NCT00568308>.
- (24) Ferro, V.; Li, C.; Fewings, K.; Palermo, M. C.; Linhardt, R. J.; Toida, T. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 139-146.
- (25) Ferro, V.; Liu, L.; Johnstone, K. D.; Wimmer, N.; Karoli, T.; Handley, P.; Rowley, J.; Dredge, K.; Li, C. P.; Hammond, E.; Davis, K.; Sarimaa, L.; Harenberg, J.; Bytheway, I. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3804-3813.
- (26) Vázquez-Campos, S.; St. Hilaire, P. M.; Damgaard, D.; Meldal, M. *QSAR & Combinatorial Science* **2005**, *24*, 923-942.
- (27) Kim, S. H.; Kiick, K. L. *Peptides* **2007**, *28*, 2125-2136.
- (28) Baleux, F.; Loureiro-Morais, L.; Hersant, Y.; Clayette, P.; Arenzana-Seisdedos, F.; Bonnaffe, D.; Lortat-Jacob, H. *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 743-748.
- (29) Dalglish, A. G.; Beverley, P. C. L.; Clapham, P. R.; Crawford, D. H.; Greaves, M. F.; Weiss, R. A. *Nature* **1984**, *312*, 763-767.
- (30) Connell, Bridgette J.; Baleux, F.; Coic, Y.-M.; Clayette, P.; Bonnaffé, D.; Lortat-Jacob, H. *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 131-139.
- (31) Bertozzi, C. R.; Kiessling, Laura, L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.
- (32) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327.
- (33) Kiessling, L. L.; Grim, J. C. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4476-4491.
- (34) Sun, X.-L.; Grande, D.; Baskaran, S.; Hanson, S. R.; Chaikof, E. L. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1065-1070.
- (35) Young, E. *Thrombosis Research*, *122*, 743-752.
- (36) Sheng, G. J.; Oh, Y. I.; Chang, S.-K.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10898-10901.
- (37) Oh, Y. I.; Sheng, G. J.; Chang, S.-K.; Hsieh-Wilson, L. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11796-11799.
- (38) Hatano, K.; Matsuoka, K.; Terunuma, D. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 4574-4598.
- (39) Türk, H.; Haag, R.; Alban, S. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 162-167.
- (40) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym J* **1985**, *17*, 117-132.
- (41) <http://www.dendritech.com/index.html>.
- (42) Shaunak, S.; Thomas, S.; Gianasi, E.; Godwin, A.; Jones, E.; Teo, I.; Mireskandari, K.;

- Luthert, P.; Duncan, R.; Patterson, S.; Khaw, P.; Brocchini, S. *Nat Biotech* **2004**, *22*, 977-984.
- (43) de Paz, J. L.; Noti, C.; Böhm, F.; Werner, S.; Seeberger, P. H. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 879-887.
- (44) Noti, C.; de Paz, J. L.; Polito, L.; Seeberger, P. H. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12*, 8664-8686.
- (45) Tyler, P. C.; Guimond, S. E.; Turnbull, J. E.; Zubkova, O. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2718-2723.
- (46) Schwörer, R.; Zubkova, O. V.; Turnbull, J. E.; Tyler, P. C. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 6817-6823.
- (47) Hou, Y.; Genua, M.; Tada Batista, D.; Calemczuk, R.; Buhot, A.; Fornarelli, P.; Koubachi, J.; Bonnaffé, D.; Saesen, E.; Laguri, C.; Lortat-Jacob, H.; Livache, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10394-10398.
- (48) Campbell, C. T.; Kim, G. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2380-2392.
- (49) de la Fuente, J. M.; Penadés, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2006**, *1760*, 636-651.
- (50) de la Fuente, J. M.; Barrientos, A. G.; Rojas, T. C.; Rojo, J.; Cañada, J.; Fernández, A.; Penadés, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2257-2261.
- (51) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernández, A.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1909-1921.
- (52) de la Fuente, J.; Penadés, S. *Glycoconj J* **2004**, *21*, 149-163.
- (53) Rojo, J.; Díaz, V.; de la Fuente, J. M.; Segura, I.; Barrientos, A. G.; Riese, H. H.; Bernad, A.; Penadés, S. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 291-297.
- (54) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801-802.
- (55) de Paz, J.-L.; Ojeda, R.; Barrientos, Á. G.; Penadés, S.; Martín-Lomas, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 149-158.
- (56) Suzun, C. *résultats non publiés*.
- (57) Martínez-Ávila, O.; Bedoya, L. M.; Marradi, M.; Clavel, C.; Alcamí, J.; Penadés, S. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1806-1809.
- (58) Gianvincenzo, P. D.; Calvo, J.; Perez, S.; Álvarez, A.; Bedoya, L. M.; Alcamí, J.; Penadés, S. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 755-765.
- (59) Carvalho de Souza, A.; Halkes, K. M.; Meeldijk, J. D.; Verkleij, A. J.; Vliegthart, J. F. G.; Kamerling, J. P. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 828-831.
- (60) Carvalho de Souza, A.; Ganchev, D.; Snel, M. E.; van der Eerden, J. J. M.; Vliegthart, J. G.;

- Kamerling, J. *Glycoconj J* **2009**, *26*, 457-465.
- (61) Santos, J. I.; Carvalho de Souza, A.; Cañada, F. J.; Martín-Santamaría, S.; Kamerling, J. P.; Jiménez-Barbero, J. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 511-519.
- (62) Lin, C.-C.; Yeh, Y.-C.; Yang, C.-Y.; Chen, C.-L.; Chen, G.-F.; Chen, C.-C.; Wu, Y.-C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3508-3509.
- (63) Chien, Y.-Y.; Jan, M.-D.; Adak, A. K.; Tzeng, H.-C.; Lin, Y.-P.; Chen, Y.-J.; Wang, K.-T.; Chen, C.-T.; Chen, C.-C.; Lin, C.-C. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1100-1109.
- (64) Manea, F.; Bindoli, C.; Fallarini, S.; Lombardi, G.; Polito, L.; Lay, L.; Bonomi, R.; Mancin, F.; Scrimin, P. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4348-4352.
- (65) Di Gianvincenzo, P.; Marradi, M.; Martínez-Ávila, O. M.; Bedoya, L. M.; Alcamí, J.; Penadés, S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 2718-2721.
- (66) Baram-Pinto, D.; Shukla, S.; Gedanken, A.; Sarid, R. *Small* **2010**, *6*, 1044-1050.
- (67) Baram-Pinto, D.; Shukla, S.; Perkas, N.; Gedanken, A.; Sarid, R. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1497-1502.
- (68) Reske, A.; Pollara, G.; Krummenacher, C.; Chain, B. M.; Katz, D. R. *Reviews in Medical Virology* **2007**, *17*, 205-215.
- (69) El-Boubbou, K.; Gruden, C.; Huang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13392-13393.
- (70) Mukhopadhyay, B.; Martins, M. B.; Karamanska, R.; Russell, D. A.; Field, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 886-889.
- (71) Kikkeri, R.; Lepenies, B.; Adibekian, A.; Laurino, P.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2110-2112.
- (72) Kim, G.-Y.; Shim, J.; Kang, M.-S.; Moon, S.-H. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, *156*, 141-147.
- (73) Yah, C. S. *Biomedical Research* **2013**, *24*, 400-413.
- (74) Chou, L. Y. T.; Chan, W. C. W. *Nat Nano* **2012**, *7*, 416-417.
- (75) Chan, W.-h.; Shiao, N.-h. *Acta Pharmacol Sin* **2008**, *29*, 259-266.
- (76) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1977**, *470*, 185-201.
- (77) Salim, M.; Minamikawa, H.; Sugimura, A.; Hashim, R. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1602-1618.
- (78) Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and polymers in aqueous solution, 2nd Edition*; Wiley, 2002.
- (79) Letchford, K.; Burt, H. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *65*, 259-269.

- (80) Immordino, M. L.; Dosio, F.; Cattel, L. *International Journal of Nanomedicine* **2006**, *1*, 297-315.
- (81) <https://en.wikipedia.org/wiki/Liposome>.
- (82) Jubeli, E.; Moine, L.; Vergnaud-Gauduchon, J.; Barratt, G. *Journal of Controlled Release* **2012**, *158*, 194-206.
- (83) Tsuruta, W.; Tsurushima, H.; Yamamoto, T.; Suzuki, K.; Yamazaki, N.; Matsumura, A. *Biomaterials* **2009**, *30*, 118-125.
- (84) Hirai, M.; Minematsu, H.; Hiramatsu, Y.; Kitagawa, H.; Otani, T.; Iwashita, S.; Kudoh, T.; Chen, L.; Li, Y.; Okada, M.; Salomon, D. S.; Igarashi, K.; Chikuma, M.; Seno, M. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *391*, 274-283.
- (85) Zeisig, R.; Stahn, R.; Wenzel, K.; Behrens, D.; Fichtner, I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1660*, 31-40.
- (86) Vodovozova, E. L.; Moiseeva, E. V.; Grechko, G. K.; Gayenko, G. P.; Nifant'ev, N. E.; Bovin, N. V.; Molotkovsky, J. G. *European Journal of Cancer* **2000**, *36*, 942-949.
- (87) Yan, F.; Xue, J.; Zhu, J.; Marchant, R. E.; Guo, Z. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 90-96.
- (88) Zhu, J.; Xue, J.; Guo, Z.; Zhang, L.; Marchant, R. E. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1366-1369.
- (89) Sugimoto, M.; Ohishi, K.; Fukasawa, M.; Shikata, K.; Kawai, H.; Itakura, H.; Hatanaka, M.; Sakakibara, R.; Ishiguro, M.; Nakata, M.; Mizuochi, T. *FEBS Letters* **1995**, *363*, 53-56.
- (90) Ikehara, Y.; Niwa, T.; Biao, L.; Ikehara, S. K.; Ohashi, N.; Kobayashi, T.; Shimizu, Y.; Kojima, N.; Nakanishi, H. *Cancer Research* **2006**, *66*, 8740-8748.
- (91) Kojima, N.; Biao, L.; Nakayama, T.; Ishii, M.; Ikehara, Y.; Tsujimura, K. *Journal of Controlled Release* **2008**, *129*, 26-32.
- (92) Bhat, S.; Spitalnik, S. L.; Gonzalez-Scarano, F.; Silberberg, D. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 7131-7134.
- (93) Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G.-J. *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6139-6142.
- (94) Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Buskas, T.; Boons, G.-J. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455-463.
- (95) Said Hassane, F.; Phalipon, A.; Tanguy, M.; Guerreiro, C.; B lot, F.; Frisch, B.; Mulard, L. A.; Schuber, F. *Vaccine* **2009**, *27*, 5419-5426.
- (96) Boullanger, P. In *Glycoscience Synthesis of Substrate Analogs and Mimetics*; Driguez, H., Thiem, J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: 1998; Vol. 187, p 275-312.
- (97) Thoma, G.; Katopodis, A. G.; Voelcker, N.; Duthaler, R. O.; Streiff, M. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3195-3198.
- (98) Sandrin, M.; McKenzie, I. F. C. *Immunological Reviews* **1994**, *141*, 169-190.



- (99) Kim, B.-S.; Hong, D.-J.; Bae, J.; Lee, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16333-16337.
- (100) Kumar, J.; Bousquet, A.; Stenzel, M. H. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1620-1626.
- (101) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.
- (102) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- (103) Lee, J. K.; Kim, Y.-G.; Chi, Y. S.; Yun, W. S.; Choi, I. S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7665-7673.
- (104) Paul, S.; Schmidt, R. R. *Synlett* **2002**, *2002*, 1107-1108.
- (105) Filali, E.; Lloyd-Jones, G. C.; Sale, D. A. *Synlett* **2009**, *2009*, 205-208.
- (106) Strazzolini, P.; Dall'Arche, M. G.; Giumanini, A. G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9255-9258.
- (107) Strazzolini, P.; Misuri, N.; Polese, P. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2075-2078.
- (108) Li, B.; Berliner, M.; Buzon, R.; Chiu, C. K. F.; Colgan, S. T.; Kaneko, T.; Keene, N.; Kissel, W.; Le, T.; Leeman, K. R.; Marquez, B.; Morris, R.; Newell, L.; Wunderwald, S.; Witt, M.; Weaver, J.; Zhang, Z.; Zhang, Z. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9045-9050.
- (109) Joullie, M. M.; Lassen, K. M. *Arkivoc* **2010**, *2010*, 189-250.
- (110) Davis, A. P.; Walsh, J. J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4865-4868.
- (111) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- (112) Povie, G.; Tran, A.-T.; Bonnaffé, D.; Habegger, J.; Hu, Z.; Le Narvor, C.; Renaud, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3894-3898.
- (113) Liu, W., Université Paris-Sud, 2015.
- (114) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* **1974**, *37*, 193-201.
- (115) Walling, C.; Helmreich, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1144-1148.
- (116) Dondoni, A.; Marra, A. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 573-586.
- (117) Lucas, R.; Hamza, D.; Lubineau, A.; Bonnaffé, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 2107-2117.
- (118) Trost, B. M.; Curran, D. P. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1287-1290.
- (119) Macé, M.; Bonnaffé, D. *résultats non publiés*.
- (120) Liu, D.; Xie, Y.; Shao, H.; Jiang, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4406-4408.
- (121) Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7736-7737.
- (122) Lee, J.-C.; Lu, X.-A.; Kulkarni, S. S.; Wen, Y.-S.; Hung, S.-C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 476-477.
- (123) Bazin, H. G.; Polat, T.; Linhardt, R. J. *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 189-205.
- (124) Maza, S.; Mar Kayser, M.; Macchione, G.; Lopez-Prados, J.; Angulo, J.; de Paz, J. L.; Nieto, P. *M. Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 3510-3525.
- (125) Barrientos, Á. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernández, A.; Penadés, S. *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9*, 1909-1921.



- (126) Haberland, M. E.; Reynolds, J. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1973**, *70*, 2313-2316.
- (127) Folmer, B. M.; Svensson, M.; Holmberg, K.; Brown, W. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *213*, 112-120.
- (128) Faivre, V.; Bardonnet, P.-L.; Boullanger, P.; Amenitsch, H.; Ollivon, M.; Falson, F. *Langmuir* **2009**, *25*, 9424-9431.
- (129) Menger, F. M.; Azov, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6492-6493.
- (130) Kosower, E. M.; Winstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4347-4354.
- (131) Freiberg, L. A. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2476-2479.
- (132) Cella, J. A.; Kelley, J. A.; Kenehan, E. F. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1860-1862.
- (133) Sen, V. D.; Golubev, V. A. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2009**, *22*, 138-143.
- (134) Nooy, A. E. J. d.; Besemer, A. C.; Bekkum, H. v. *Synthesis* **1996**, 1996, 1153-1176.
- (135) De Mico, A.; Margarita, R.; Parlanti, L.; Vescovi, A.; Piancatelli, G. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6974-6977.
- (136) van den Bos, L. J.; Litjens, R. E. J. N.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2007-2010.
- (137) Manabe, S.; Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9754-9755.
- (138) Masson, C.; Scherman, D.; Bessodes, M. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, *39*, 4022-4024.
- (139) Heseck, D.; Lee, M.; Morio, K.-i.; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2137-2146.
- (140) Gavard, O.; Hersant, Y.; Alais, J.; Duverger, V.; Dilhas, A.; Bascou, A.; Bonnaffé, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 3603-3620.
- (141) Bartholomew, C. H. *Applied Catalysis A: General* **2001**, *212*, 17-60.
- (142) Okamoto, K.; Akiyama, R.; Kobayashi, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2871-2873.
- (143) Laganis, E. D.; Chenard, B. L. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5831-5834.
- (144) Sommer, L. H.; Pietrusza, E. W.; Whitmore, F. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 2282-2284.
- (145) Christina, A. E.; van den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1692-1706.
- (146) Lopez-Serrano, A.; Olivas, R. M.; Landaluze, J. S.; Camara, C. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 38-56.
- (147) Genua, M., Université de Grenoble, 2013.
- (148) <http://www.biolinscientific.com>.
- (149) Kuntsche, J.; Horst, J. C.; Bunjes, H. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *417*, 120-137.

CONFIDENTIEL