HAL
open science

Etude du système Myrosinase-Glucosinolate comme outil de bioconjugaison

Giuliano Cutolo

To cite this version:

Giuliano Cutolo. Etude du système Myrosinase-Glucosinolate comme outil de bioconjugaison. Autre. Université d'Orléans, 2018. Français. NNT : 2018ORLE2050 . tel-03907320

HAL Id: tel-03907320

https://theses.hal.science/tel-03907320

Submitted on 20 Dec 2022

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.

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :

Giuliano CUTOLO

soutenue le : **19 Décembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie Organique

Etude du système Myrosinase-Glucosinolate comme outil de bioconjugaison

THÈSE dirigée par :

M. Arnaud TATIBOUËT	Professeur, ICOA, Université d'Orléans
Mme Marie SCHULER	Maître de conférences, ICOA, Université d'Orléans Co-encadrante de thèse

RAPPORTEURS :

M. Sébastien GOUIN	Directeur de recherche-CNRS, Université de Nantes
M. Boris VAUZEILLES	Directeur de recherche-CNRS, Université Paris-Saclay

---

JURY

M. Sébastien GOUIN	Directeur de recherche, CNRS, Université de Nantes
Mme Thisbe K. LINDHORST	Professeur, Université de Kiel, Allemagne
Mme Reine NEHME	Maître de conférences-HDR, Université d'Orléans
M. Pierre-Yves RENARD	Professeur, COBRA, Université de Rouen
M. Olivier RENAUDET	Professeur, Université de Grenoble
Mme Marie SCHULER	Maître de conférences, Université d'Orléans
M. Arnaud TATIBOUËT	Professeur, Université d'Orléans
M. Boris VAUZEILLES	Directeur de recherche, CNRS, Université Paris-Saclay

"All models are wrong but some are useful"

George Box

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Chimie Organique et Analytique – ICOA d'Orléans, pour cela je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Olivier Martin et le Pr. Pascal Bonnet directeurs de l'ICOA de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je remercie sincèrement le Dr. Gouin et Dr. Vouzeilles qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse, et aussi le Pr. Renaudet, le Dr. Nehmé, le Pr. Renard, et le Pr. Lindhorst d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je suis sincèrement honoré que mon travail soit évalué par un panel de scientifiques si vaste, avec des domaines de compétences diversifiés.

Lors de cette thèse, j'ai travaillé sous la direction du Pr. Arnaud Tatibouët. Merci Arnaud de m'avoir accepté dans ton équipe, pour ton encadrement, pour tes idées innovantes, et merci de m'avoir donné une grande liberté scientifique pendant ces trois ans.
Je tiens à remercier le Dr. Marie Schuler, ma co-encadrante pour sa disponibilité et son encadrement au quotidien.
Merci à vous deux d'avoir corrigé une thèse en français écrite par un Italien.

Pendant ces trois ans, j'ai eu aussi l'opportunité de travailler avec plusieurs laboratoires externes. De ce fait je tiens à remercier le Pr. Pierre Yves Renard et son équipe : le Dr. Alexandre Haefele, le Dr. Cyrille Sabot et le Dr. Fredy Wilfried. J'ai réellement apprécié la qualité de nos échanges scientifiques réguliers tout au long de ces trois ans.

Speaking about collaborators which I appreciate, many thanks to Pr. T.K. Lindhorst of Kiel University in Germany. It was inspiring and motivating to work with you and I learned a lot from your way of working.
Of course, I thank the Dr. Guillaume Despras, the PhD students Franziska Reise and Jasna Brekalo for their collaboration and their hospitality.

Je remercie le Pr. Irina Zarafu de l'université de Bucarest en Roumanie, pour sa collaboration et pour sa bonne humeur lors de ses venues à l'ICOA.

Ces trois ans à l'ICOA m'ont donné la possibilité d'intéragir avec plusieurs personnes, d'un point de vue humain et scientifique. Lorsqu'on le souhaite, cet Institut donne accès à des savoirs faire dans plusieurs domaines scientifiques, en allant de la chimie organique et la biochimie à la chimie analytique.

Depuis ma première année, j'ai eu la possibilité de faire partie de l'équipe du Pr. Morin et du Dr. Reine Nehmé, je vous remercie de m'avoir appris à maîtriser l'électrophorèse capillaire. Je garderai de bons souvenirs de nos discussions scientifiques dans le Laboratoire de Chimie Analytique et de la disponibilité dont vous avez fait preuve.
Je tiens à remercier particulièrement Reine ; tu m'as beaucoup appris…
En collaborant avec toi sur plusieurs projets, tu as toujours été présente pour me supporter et appuyer mes initiatives. Merci à toi pour ces trois années.
Pour continuer avec l'équipe analytique, je remercie fortement le Dr. Bérengère Claude avec qui j'ai pu travailler et aussi discuter. Ta positivité et ta bonté m'ont beaucoup inspiré.

… J'avais presque oublié !!! un grand merci à Magic Amal (Amal Farhat), notre stagiaire M2 qui s'est dévouée complètement à l'électrophorèse et aux nanoparticules-glucosinolate.

Je remercie également le Dr. Agnès Chartier et Nathalie Percina non seulement pour les agréables conversations, mais aussi de la confiance que vous m'avez accordée en me laissant travailler en toute autonomie en LC-MS.

Un grand merci au Dr. Cyril Colas, notre expert de masse, avec qui j'ai pu avoir de nombreuses et longues discussions et surtout pour ses conseils avisés.

Durant ce projet de thèse, j'ai pu travailler avec le Pr. Richard Daniellou et le Dr. Pierre Lafite de l'équipe « Glycobio ». Je vous remercie pour votre disponibilité et aussi pour vos questions pointues lors des séminaires et à ce propos, je remercie aussi le Pr. Patrick Rollin et le Pr. Olivier Martin pour avoir constamment partagés leurs connaissances lors des réunions.

Je remercie énormément Mateja Senicar, tu as été extrêmement gentille et disponible lors de mes petits séjours en Glycobio ; sans toi et nos rigolades, je n'aurais pas pu imaginer des digestions enzymatiques !!!

Merci au Dr Landemarre et la néo-docteur Blanka Didak de l'entreprise GLYcoDiag, avec qui j'ai pu collaborer pour un des projets de cette thèse. Merci surtout à Blanka, mis à part la BSA et la Myrosinase nous avons pu partager des agréables moments !!!

Maintenant il est temps de remercier les collègues, et les amis que j'ai eu le plaisir de rencontrer tout au long de ces trois ans dans les laboratoires et dans les couloirs de l'ICOA, sur la passerelle et pendant les nombreuses soirées et journées barbecues.

Tout d'abord merci aux membres de mon Labo, le labo des étrangers ou Labo 1. Merci à Laura Vidal, Guillaume Taing (pour ses goûts musicaux), Françoise, à tous les stagiaires de passage et aux membres du Labo 1 brésiliens : Brunilda (Bruna) et Pr. Ronaldo Nascimiento.
…mais surtout un grand merci au Dr. Maria Augusta Da Graça Domingues, ma petite Maruzzella. Finalement nous avons passé ces trois ans ensemble, et je ne peux pas imaginer le Labo1 sans toi, merci pour ta grande amitié et ton support.

Un grand merci aux « anciens » de l'ICOA qui m'ont accueilli lors de ma première année de thèse. Merci à Doina, Maxime, Jo, Régis et ses milles blagues, Ben, Cam, Anthony, Romain, Baptiste, Fanny…
Je remercie les nombreux doctorants de ma promo Loic, Sylvain, Gregory, Floris, Soukaina (Souki-Souki), Khadija, Sonia, pour tous les échanges que nous avons eus.
Un grand merci à Cosmin, je sais que je peux toujours compter sur toi !!! Merci pour tout !!!
Merci aux plus « jeunes » Aga, Vincent, Mazarine, Thibault, Ghassan, Nhi, Juliana, Coralie, Souhila…
Merci aux post-docs Pierre Daligaux et Nicolas Chopin, nos conversations ont toujours été enrichissantes et amusantes.

A ne pas oublier, mes amis de la « modélisation » : Jade, Julien, Abdenour, Fabrice, Colin, Jose, Pascal, etc. Merci pour votre bonne humeur, pour les grandes rigolades, les soirées, etc. (soirées salsa avec Jade et Syntia) et merci d'avoir répondu à mes milles questions pendant mes démarches chémoinformatiques !!!

Maintenant il est temps de remercier le p'tit Ghazi… nous avons parcouru ces trois ans de thèse ensemble. Je vais sûrement me rappeler de toutes les fois où j'avais mes pensées dans la chimie, mais heureusement tu stressais à mes côtés et tu me rappelais toutes les échéances possibles, mi-thèse, impôts, début de rédaction… XD … A part ça, merci d'avoir été là au quotidien pour moi, pour ta bonne humeur et pour toutes les rigolades et les soirées de folie.

En parlant de Ghazi je me suis étrangement rappelé d'Oscar !!! mon pote depuis ma première année à Montpellier, merci pour ton amitié et toutes les aventures passées ensemble. Gracias a los otros latinos El Zuni, Chepe, Carlos, Tatiana, Fernando, Pedro etc.

Il est enfin temps de remercier Ma grande Célia, comme Ghazi tu as été présente du début jusqu'à la fin. Je me rappelle encore le bonheur que j'ai eu lorsque j'ai su que tu allais rester à Orléans pour ta troisième année et ne plus repartir à Rouen. Merci pour toutes les « contre pauses » que tu m'as accordées ☺ , pour ton écoute et tes conseils toujours réfléchis, merci d'avoir rempli l'ICOA.

Il est maintenant le temps de remercier ma famille en Italie :
Per questo lavoro di tesi vorrei ringraziare tutta la mia numerosa famiglia… in particolare grazie ai miei genitori per l'aiuto che mi avete sempre fornito, per avermi dato fiducia… per aver appoggiato tutte le mie scelte…per essermi « vicino » …grazie per il vostro amore.
… grazie a mio fratello Giuseppe per essere presente anche per me…
…grazie à mio zio Lello che fin da piccolo mi ha parlato di Chimica … grazie a mia zia Antonietta.
…grazie ai miei cugini Antonio e Antonella per il loro supporto e per le piacevoli conversationi ... grazie ai miei zii e le mie zie … grazie ai miei amici di data Giancarlo, Federico, Maria, Zack, Sara per la loro amicizia.

Je vais conclure par remercier ma moitié Christie, Amore Mio, la femme qui remplit et qui complète ma vie…
… merci d'avoir toujours été à mes côtés depuis désormais 5 ans et de m'avoir épaulé dans les moments difficiles.
A part mon doctorat, pendant ces trois dernières années nous avons vécu beaucoup de choses. Je pense un instant aux trajets Orléans-Toulouse, aux « weekend » très courts et à tous nos déménagements… Je te remercie d'avoir mis l'intérêt de notre couple devant tout, de m'avoir suivi ici à Orléans et d'avoir choisi de me suivre encore dans les prochaines étapes de notre vie.

Je ne te remercierai jamais assez d'avoir été forte lorsque moi je ne l'étais pas…

Je te remercie de faire partie de ma vie, d'être ma femme ... merci de m'aimer autant.

Je t'aime.

Liste des figures

Figure 1 : trois principales études de ce travail de thèse 19
Figure 2 : figure représentant l'abondance moyenne dans les protéines de certains acides aminés d'intérêt.[13] 24
Figure 3: Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy (LEAPT); RME : Receptor mediated endocytosis. 28
Figure 4 : chromatogrammes de spectrométrie de masse de la réaction de formation du GL amino **103 ;** Full Scan (en haut), SIM (en bas) **;** H_2O-MeOH ; 0.01% HCOOH ; de 2% MeOH à 100% en 11 min, 100% MeOH pendant 1 min ; RP-C18. 68
Figure 5 : chromatogramme (UV) de la réaction de formation du GL fluorescéine **107,** t : 6h **;** . 69
Figure 6 : équation bilan d'une réaction enzymatique 77
Figure 7 : courbe de la vitesse en fonction de la concentration de substrat 79
Figure 8: équations décrivant le k_{cat}. 80
Figure 9 : figure représentante une cristallographie du site actif de la myrosinase en presence d'un inhibiteur (carba-glucotropaeoline) ; PDB : 1w9d. 84
Figure 10 : représentation simplifiée d'un appareil d'électrophorèse capillaire 86
Figure 11 : représentation d'une séparation d'anions (A) cations (C) et neutres (N). 87
Figure 12 : réaction enzymatique pour l'analyse en électrophorèse capillaire 89
Figure 13 : courbes de Michaelis-Menten expérimentales pour rouge le GL **19** et bleu **95**. 91
Figure 14 : courbes cinétiques de la sinigrine avec premier et deuxième lot de myrosinase. 93
Figure 15 : courbe cinétique du glucosinolate **109.** 95
Figure 16 : courbe cinétique sinusoïdale. 96
Figure 17 : créneaux d'injection pour une réaction online. 98
Figure 18: comparaison des chromatogrammes avec la colonne RP-C18 (à gauche), Kinetex-F5 (à droite). 108
Figure 19: chromatogrammes obtenus avec la colonne Kinetex-F5. 109
Figure 20 : chromatogrammes du suivi cinétique. 111
Figure 21 : évolution de la réaction. 112
Figure 22 : cycle d'infection bactérienne (EB : elementary body, RB : reticulate body). [131] 119
Figure 23 : cycle de formation d'un biofilm. [132] 119
Figure 24 : A : photomicrographie électronique d'une bactérie d'E.coli et des fimbriae ; B : reconstruction 3-D de la tige représentant la base du pilus (hélice constituée du domaine FimA). [138] 121
Figure 25 : structure des fimbriae de Type 1 de l'E. coli. [140] 121
Figure 26 : valeurs d'IC_{50} et RIP. 128
Figure 27 : courbes dose-réponse Myrosinase libre (orange) et myrosinase supportée (bleu) 136
Figure 28 : valeurs de RIP pour les lectines ConA, FimH, BC2LA, Langerine et DC-SIGN 140
Figure 29 : dynamique moléculaire ConA-heptyl mannose isothiocyanate 143
Figure 30 : spectre de masse du mélange réactionnel (conditions entrée 3 du tableau précédent). 147
Figure 31: clichés obtenus par modélisation moléculaire d'un complexe myrosinase-GL heptyl mannoside **95** 149
Figure 32 : fonctionnalisation de NP et réaction de la myrosinase avec les NP-GLs 151

Figure 33 : électrophérogramme des nanoparticules commerciales ; AU : unité de mesure arbitraire. 153
Figure 34 : séparation de NP commerciales, NP-GLs et GL thiol. 154
Figure 35 : Etude de la linéarité de la réaction d'hydrolyse d'un GL par la myrosinase. A gauche- électrophérogrammes obtenus à des temps d'incubation croissants par analyse EC-UV (détection du GLs en excès) et par analyse EC-conductimétrie (détection du sulfate). A droite - suivi de la concentration de GLs et de sulfate en fonction du temps d'incubation ; AU : unité de mesure arbitraire ; Area : aire du pic correspondant proportionnelle à la concentration 155
Figure 36 : suivi de la réaction entre la myrosinase et les NP-GLs. 156
Figure 37 : image au microscope des cellules en contact avec le GL aromatique fluorescéine. 162

Liste des schémas

Schéma 1: hydrolyse d'un glucosinolate opéré par la myrosinase. 17
Schéma 2 : stratégies de bioconjugaison réalisables avec le Système MG 18
Schéma 3 : bioconjugaison régio- et chimio- sélective..... 29
Schéma 4 : structure générale d'un glucosinolate. 30
Schéma 5 : sous-produits d'hydrolyse d'un glucosinolate. 31
Schéma 6 : synthèse de GLs à partir d'acides thiohydroxamiques..... 37
Schéma 7 : schéma globale de rétrosynthèse et des voies d'accès à l'oxyde de nitrile..... 38
Schéma 8 : mécanisme de formation du chlorure d'hydroximoyle dans les conditions de Kulkarni. 39
Schéma 9 : mécanisme de formation de la fonction thiohydroximate à partir du chlorure d'hydroximoyle. 39
Schéma 10 : formation de l'oxyde de nitrile à partir de l'aldoxime. 40
Schéma 11: glucosinolates phényl mannosides synthétisés. 41
Schéma 12 : synthèse du GL phényl mannoside..... 42
Schéma 13 : rétrosynthèse des glucosinolates biphényles. 43
Schéma 14 : synthèse des précurseurs nitrovinyles. 44
Schéma 15 : double couplage pallado-catalysé one pot. 45
Schéma 16 : sous-produit de la réaction d'Henry. 46
Schéma 17 : synthèse des glucosinolates à partir des dérivés nitrovinyles. 47
Schéma 18: glucosinolates bifonctionels. 49
Schéma 19 : schéma de retrosynthese de la stratégie divergente. 50
Schéma 20 : stratégie divergente ; approche Kulkarni. 50
Schéma 21 : stratégie divergente ; voie de l'aldoxime. 51
Schéma 22 : glucosinolate naturel glucosinalbine. 52
Schéma 23 : stratégie linéaire..... 52
Schéma 24 : stratégie linéaire ; approche Kulkarni 53
Schéma 25 : couplage de Kulkarni du dérivé méta-nitrovinyle **73**. 53
Schéma 26 : stratégie linéaire, synthèse du thiohydroximate **60** ; voie de l'oxime. 54
Schéma 27 : stratégie linéaire, synthèse des GLs **47**, **48** et **50**. 55
Schéma 28 : synthèse du glucosinolate alcyne..... 56
Schéma 29 : rendements globaux. 56
Schéma 30 : test de CuAAC. 58
Schéma 31 : formation de la fonction nitrile. 60
Schéma 32 : réaction de cycloaddition entre deux GLs. 60
Schéma 33 : test de cycloadditions..... 60
Schéma 34 : structures de TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine), THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine), $(BimC_4)A_3$. 61
Schéma 35 : rétrosynthèse du GL heptyl mannoside. 62
Schéma 36 : synthèse du glucosinolate heptyl mannoside. 62
Schéma 37 : réaction de SPAAC. 64

Schéma 38 : réduction de Staudinger. 65
Schéma 39 : proposition de mécanisme de dégradation intramoléculaire. 65
Schéma 40 : synthèse du GLs phényl fluorescéine. 66
Schéma 41 : réactivité du GLs azido aliphatique. 66
Schéma 42 : réaction one pot et one pot séquentielle. 67
Schéma 43 : synthese de GL fluorescents par couplage peptidique. 69
Schéma 44 : Glucosinolates fluorescents et biotine. 70
Schéma 45 : réactivité du GL bromé. 70
Schéma 46 : rétrosynthèse GL Peg8. 71
Schéma 47 : synthèse du glucosinolate peg8. 72
Schéma 48 : espaceurs Peg commerciaux. 73
Schéma 49 : mécanisme d'hydrolyse d'un glucosinolate. 82
Schéma 50 : 2-fluoro-2-déoxyglucotropaeoline. 83
Schéma 51 : exemples de diversification structurelle de glucosinolates naturels. 85
Schéma 52 : réaction d'hydrolyse d'un glucosinolate par la myrosinase. 88
Schéma 53 : glucosinolates mannosidiques, sinigrine et glucomoringine. 90
Schéma 54 : glucosinolates orthogonaux 92
Schéma 55 : glucosinolates fluorescents. 94
Schéma 56 : glucosinolate biotinylé. 96
Schéma 57 : test de piégeage de l'isothiocyanate. 101
Schéma 58 : réaction model glucosinolate-acide aminé. 102
Schéma 59 : réaction entre un isothiocyanate commercial et la lysine 104
Schéma 60 : réaction entre le glucosinolate mannoside et la lysine. 104
Schéma 61 : cyclisation entre une propargylamine et un isothiocyanate. 105
Schéma 62: réaction avec différents glucosinolates. 106
Schéma 63 : réaction modèle avec la propargylamine. 110
Schéma 64 : exemplification de la réaction. 113
Schéma 65 : conformères de la thio-urée intermédiaire. 114
Schéma 66 : meilleurs antagonistes développés par le groupe d'Hultgren. [147] 123
Schéma 67 : exemples de trois glycoclusters multivalents. RIP : relative inhibitor potency based on MeMann IC_{50} ; RIP VC : valency corrected RIP ; Kd lig : Kd of the monovalent ligand ; RIP ^{a} = RIP based on mannose (RIP Mann = 0.96), RIP ^{a}HMan : RIP ^{a} heptyl mannoside.[131,] 124
Schéma 68 : Glycoprofiles 126
Schéma 69 : mannosides testés vis-à-vis de la bactéries E. coli. 127
Schéma 70 : réaction entre le GLs à fonction réactive et la BSA. 131
Schéma 71 : utilisation du système MG pour la synthèse de néoglycoprotéines. 133
Schéma 72 : glucomoringine. 135
Schéma 73 : réaction de fonctionnalisation de la BSA avec la myrosinase supportée. 137
Schéma 74 : formation du ligand biphényl mannose lysine. 138
Schéma 75: néoglycoprotéines avec 25 ligations moyennes du motif phénylmannose. 139
Schéma 76 : réaction de conjugaison entre la concanavaline A (ConA) et le glucosinolate heptylmannoside. 144

Schéma 77 : deux mécanismes possibles de ligation ConA-Heptylmannoside. 145
Schéma 78 : réaction tiol-ène avec d'un glucosinolate. 160
Schéma 79 : réaction de Vilarrasa d'un glucosinolate. 161
Schéma 80 : glucosinolates naturels (en haut) et GLs fluorescéine (en bas). 162
Schéma 81 : glucosinolate fluorescent PEG. 163
Schéma 82 : sonde GL à fluorescence turn-on. 164
Schéma 83 : sonde turn-on GL-SDB- mannose 165

Liste des tableaux

Tableau 1 : réactions de bioconjugaison sur les lysines. 25
Tableau 2 : optimisation du couplage de Suzuki. 45
Tableau 3 : optimisation des cycloadditions azido-alcyne. 59
Tableau 4 : comparaison K_m et V_{max} entre les réactions faites avec un 89
Tableau 5 : paramètres cinétiques. 91
Tableau 6 : premier lot de glucosinolates orthogonaux. 92
Tableau 7 : deuxième lot de glucosinolates orthogonaux 93
Tableau 8 : paramètres cinétiques des GLs fluorescents. 95
Tableau 9 : comparaison des modes on line off line. 99
Tableau 10 : rendements des piégeages. 101
Tableau 11: résultats de l'étude de réactivité glucosinolate- acide aminé. 103
Tableau 12 : rendements des réactions de cyclisation 106
Tableau 13 : optimisation de l'hydrolyse du glucosinolate par la myrosinase. 110
Tableau 14 : réaction MG avec la BSA 132
Tableau 15 : Optimisation de la réaction de fonctionnalisation de la BSA. 134
Tableau 16 : tests de fonctionnalisation avec la myrosinase supportée BSA- GL **20.** 137
Tableau 17 : valeurs d'IC_{50}, RIP 140
Tableau 18 : ligation sélective de la ConA. 146
Tableau 19 : BSA fonctionalisation with orthogonals GLs. 211
Tableau 20 : BSA functionalization with mannoside GL 20. 211
Tableau 21 : BSA functionalization with supported-Myrosinase and GL 20. 212
Tableau 22 : site selective ligation of the Con A with GL 95. 212

LISTE DES ABBREVIATIONS

Ac Acétate
AE Acétate d'éthyle
Ac2O Anhydride acétique
AIBN Azobisisobutyronitrile

BGE Background electrolyte
Bn Groupement benzyle
BSA Bovine serum albumine (albumine de sérum bovin)

CCM Chromatographie sur couche mince
ConA Concanavaline A
CRD Site de reconnaissance des sucres
CuAAC Cycloaddition 1,3-dipolaire entre azoture et alcyne catalysée par le cuivre

DCM Dichlorométhane
DIBAL-H Diisobutylaluminium hydride
DIBO Dibenzocyclooctyne
DMAP 4-Diméthylaminopyridine
DMF Diméthylformamide
DMSO Diméthylsulfoxyde

EC Electrophorèse capillaire
EP Ethers de pétrole
Eq Equivalent
Et Ethyle

FITC Fluorescein isothiocyanate

Glc b-D-glucopyranose
Gln Glutamine
GL Glucosinolate
Glu Glutamate
HIA Hemagglutination inhibition assay
HOBt 1-hydroxybenzotriazole
HSA Human serum albumin
HRMS High resolution mass spectrometry
HPLC High pressure liquid chromatography

IC_{50} Concentration inhibitrice de 50 %
IR Infra-rouge

***K*d** Constante de dissociation
kDa kilo Dalton

LC-MS Liquid chromatography – Mass Spectrometry

MALDI Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation
Me Méthyle
Ms mésyle
MW : Micro-onde
Myr Myrosinase

NCS *N*-chlorosuccinimide
NHS *N*-hydroxysuccinimide
NGP Néoglycoprotéine
NP Nanoparticule

pdb Protein data bank
ppm Partie par million
Pyr Pyridine

RMN Résonance magnétique nucléaire
RuAAC Cycloaddition 1,3-dipolaire entre azoture et alcyne catalysée par le ruthénium

SM Spectrométrie de masse
SPR Surface Plasmon Resonance

ta Température ambiante
TBAF Fluorure de tétrabutylammonium
TBS Groupement *tert*-butyl diméthylsilyle
TBTA Tris-(benzyltriazolylméthyl)amine
TES Triethylsilane
TFA Acide trifluoroacétique
THF tétrahydrofurane
TMSOTf Trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle
Ts Tosyle

UV Ultra-violet

VIH Virus de l'immunodéficience humaine
VHC Virus hépatite

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 2
Liste des figures 5
Liste des schémas 6
Liste des tableaux 9
LISTE DES ABBREVIATIONS 10
TABLE DES MATIERES 11
Introduction générale 17
La bioconjugaison 21
I. Définition et applications 21
II. Les méthodes de bioconjugaison 22
Protéines et peptides 23
Le système Myrosinase-Glucosinolate 30
1. Introduction 30
2. Le rôle chez les plantes 32
3. Propriétés biologiques 32
L'approche MG en bioconjugaison. 33
Chapitre 1 Synthèse de glucosinolates bifonctionnels 37
I. Méthodes de synthèse des glucosinolates 37
II. Glucosinolates « Phényl-Mannosides » visant des lectines 41
1. Choix des molécules 41
2. Le glucosinolate « Phenylmannoside » 42
3. Les glucosinolates à « biphénylmannose » 43
III. Synthèse d'entités GLs à fonctions réactives 49
1. Stratégie divergente : 49
a. L'approche de Kulkarni 50
b. La voie de l'oxime 51
2. Les stratégies linéaires : 52
a. La voie de Kulkarni 53

b. La voie de l'oxime 54
IV. La réactivité des GLs à fonctions réactives : orthogonalité et compatibilité 57
1. La chimie Click 57
a. Les « Copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions » 58
b. Le glucosinolate « heptyl mannoside » 62
c. La SPAAC 63
2. Réactivité des glucosinolates portant une fonction azoture 64
a. La réduction de Staudinger 64
b. Formation de thiourée. 66
3. Le couplage peptidique 69
4. Le glucosinolate bromé 70
5. Développement d'un espaceur 71
V. Conclusions 73
Chapitre 2 Etude de la réaction myrosinase-glucosinolate (MG) 77
I. Les réactions enzymatiques 77
1. La découverte des enzymes 77
2. Le modèle cinétique de Michaelis-Menten 77
3. Les autres paramètres cinétiques 80
a. La constante catalytique k_{cat} 80
b. L'efficacité catalytique k_{cat}/K_m 80
c. Les unités d'enzyme 80
4. Le mécanisme de la catalyse enzymatique 81
5. La myrosinase 81
II. L'électrophorèse capillaire comme outil de suivi de la réaction enzymatique 85
1. Principe de séparation 86
2. Le suivi de la réaction MG 88
a. La méthode utilisée 88
b. Les essais enzymatiques off-line 88
III. Étude cinétique de glucosinolates non naturels 89
1. Les glucosinolates à « aglycone » mannosidique 90
2. Les glucosinolates portant une fonction orthogonale 92
3. Les glucosinolates fluorescents 94

4. Le glucosinolate biotinylé 96
5. Les essais enzymatiques on-line 98
IV. Formation et réactivité de l'isothiocyanate issu de la réaction enzymatique 100
1. Le couplage de l'isothiocyanate avec des thiols 100
2. La réactivité vis-à-vis des acides aminés nucléophiles. 102
3. Condensation de l'isothiocyanate avec des propargylamines 105
a. Compatibilité avec les glucosinolates 105
b. La chromatographie liquide haute performance – spectrométrie de masse (LC-MS) comme outils de suivi de la réaction. 107
c. L'amélioration de la cinétique d'hydrolyse grâce au suivi LC-MS 109
d. Exemplification 113
V. Conclusion 114
Chapitre 3 Le système MG en bioconjugaison 117
I. Les Lectines 117
1. Introduction 117
2. Rôle biologique 118
3. La bactérie Escherichia *coli* 119
a. La stratégie antiadhésive 120
b. Les fimbriae de type 1 120
4. La lectine FimH 122
a. Les antagonistes de FimH 123
b. La multivalence et les inhibiteurs multivalents 124
II. Activité biologique des GLs mannosidiques 125
1. Le Glycoprofile® 125
2. Les tests d'antiadhésion sur les bactéries d'*E. coli* 127
III. Synthèse de Néoglycoprotéines (NGPs) 130
1. Introduction 130
2. Néoglycoprotéines à partir de glucosinolates à fonctions orthogonales 131
3. Néoglycoprotéines à partir de glucosinolates mannosidiques 133
a. Optimisation de la bioconjugaison 133
b. La fonctionnalisation BSA-glucomoringine 135
c. La Myrosinase supportée 135

d. L'activité antiadhésive des néoglycoprotéines synthétisées 138
4. Conclusions 141
IV. Marquage sélectif de protéines - Site selective labeling 143
1. La réaction de marquage 144
2. Caractérisation de la protéine marquée 147
V. La fonctionnalisation de nanoparticules d'or 150
1. Nanoparticules d'or - Généralités 150
2. Les nanoparticules-glucosinolates (NP-GLs) 151
3. L'analyse des nanoparticules par électrophorèse capillaire 153
a. La double détection UV-conductimétrique 154
b. L'hydrolyse des NP-GLs 156
4. Conclusions 157
Conclusions et perspectives 159
Experimental Part 167
BIBLIOGRAPHIE 215

Introduction et étude bibliographique

Introduction générale

Le travail de recherche exposé dans cette thèse a pour objet l'étude et le développement d'un outil enzymatique permettant de réaliser des approches de bioconjugaison, la création d'une nouvelle connectivité entre une biomolécule et une autre entité. Pour ce faire, le tandem enzymatique Myrosinase-Glucosinolate (MG) a été choisi. La myrosinase est une enzyme présente dans le monde végétal et capable d'hydrolyser les glucosinolates (GLs), des métabolites secondaires présents chez les plantes. Ce couple enzyme substrat est présent dans l'ordre des Brassicales et participe au mécanisme de défense de ces plantes lors de différentes « agressions ». La mise en contact de la myrosinase (glucohydrolase EC: 3.2.1.147) avec un glucosinolate (130 molécules naturelles différentes) conduit à la formation d'un isothiocyanate par hydrolyse du GL.

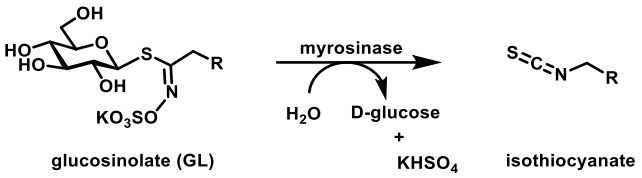


Schéma 1: hydrolyse d'un glucosinolate opéré par la myrosinase.

Cet isothiocyanate est une fonction chimique qui se prête à des réactions click largement utilisées dans le domaine de la bioconjugaison. C'est un électrophile fort qui réagit facilement avec les amines des lysines et avec les cystéines présentes sur les protéines.

Notre objectif est de combiner la réactivité issue du couple enzyme-substrat avec la possibilité d'une réactivité orthogonale et/ou d'une reconnaissance sélective.

Le Schéma 12 montre plusieurs exemples de stratégies possibles à l'aide du Système MG et de glucosinolates artificiels.

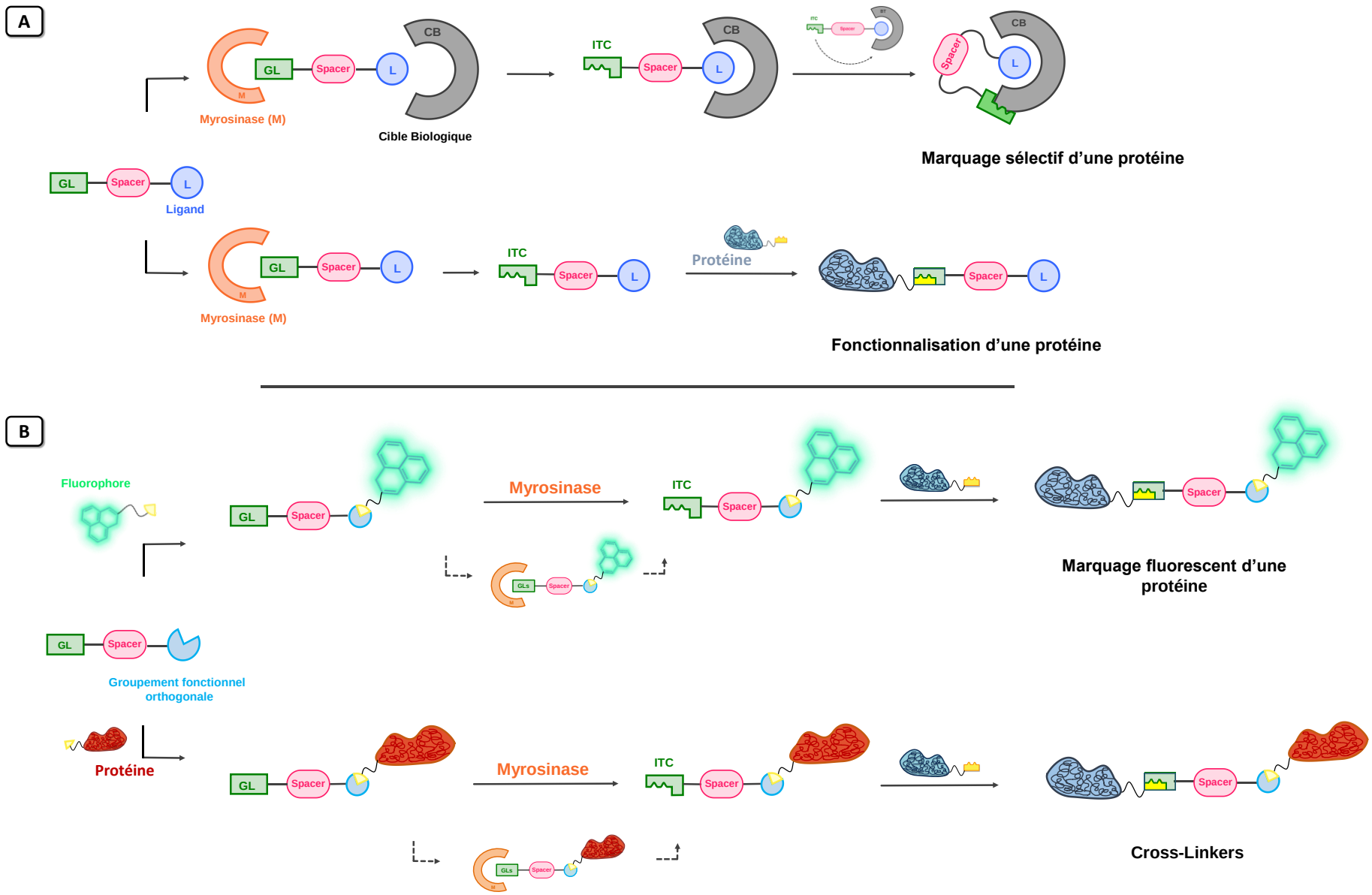


Schéma 2 : stratégies possibles de bioconjugaison avec le Système MG.

Dans la section A du Schéma 2, les approches avec des glucosinolates présentant un ligand d'une cible biologique bien précise sont présentées. Cela permettrait d'aboutir à un marquage sélectif de protéines (site selective labelling) à proximité du site de reconnaissance d'un récepteur, ou à la fonctionnalisation d'une protéine. Dans le cadre de ce travail, des lectines à mannose d'origine végétale et bactérienne ont été ciblées. De ce fait, le ligand correspond le plus souvent à une structure mannosidique.

Dans la section B, sont présentées deux autres applications du système MG envisageables avec des glucosinolates à fonction orthogonale. Ces derniers portent une deuxième fonctionnalité chimique susceptible de donner des réactions click. Cela pourrait servir dans une première approche à connecter un fluorophore sur le GL et ensuite réaliser des marquages fluorescents sur des protéines. Une deuxième possibilité serait de se servir de ces glucosinolates en tant que hetero-crosslinker. En effet ce type de molécule possède deux fonctions pouvant donner des réactions click, dont une (l'isothiocyanate) masqué par le glucosinolate. Cela permet de connecter deux protéines à l'aide de deux réactions orthogonales entre elles.

Afin de réaliser des stratégies de bioconjugaison en se servant de ce système enzymatique d'origine naturelle, trois études principales ont été menées (Figure 1).

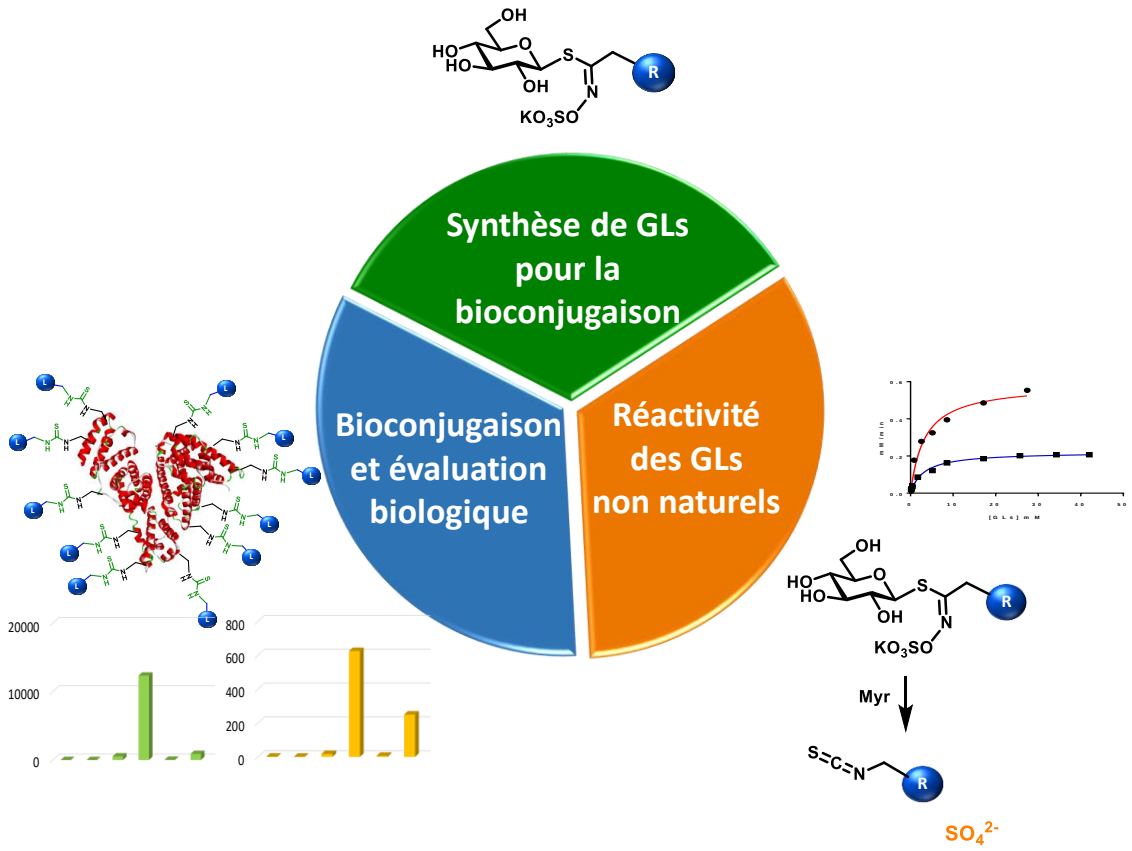


Figure 1 : trois principales études de ce travail de thèse.

Trois chapitres aborderont une par une les thématiques présentés dans la Figure 1 : dans le premier chapitre sera décrite la synthèse de glucosinolates artificiels possédant une deuxième fonctionnalité (réactive ou de reconnaissance (ligand)).
Le deuxième chapitre traitera de l'activité de ces substrats vis-à-vis de la myrosinase ainsi que de la réactivité de l'isothiocyanate en prévision des réactions de conjugaison.
Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, seront présentées les différentes approches de bioconjugaison réalisées, ainsi que les évaluations biologiques des glycoconjugués synthétisés.
Enfin des conclusions et des perspectives concernant les travaux réalisés seront détaillées.

Pour commencer, une étude bibliographique sur le domaine de la bioconjugaison et sur le système MG seront présentés.

La bioconjugaison

I. Définition et applications

La bioconjugaison est une branche de la chimie qui vise à la formation d'une liaison covalente entre une biomolécule et une deuxième entité. Cette dernière peut correspondre à une molécule organique, de grande ou petite taille, mais aussi à une macromolécule (naturelle ou non).
Ce domaine de la chimie est relativement récent, les premières bioconjugaisons sur des protéines ont été observées à partir de la deuxième moitié du 20eme siècle. L'arylation de l'insuline réalisée par Zahn et Meienhofer en 1958 en est un exemple. [1]

La bioconjugaison s'est développée parallèlement aux avancées scientifiques observées dans les domaines de la biologie, la biochimie et l'imagerie. En effet des techniques permettant de modifier des protéines étaient essentielles pour l'étude de systèmes biologiques complexes. A partir des années 1980 la bioconjugaison a commencé à avoir une évolution exponentielle (source Scifinder).

L'intérêt de la chimie de bioconjugaison est dû à son application dans la recherche et le développement médical, plus précisément, dans le domaine du diagnostic et de l'imagerie. De nos jours une multitude d'approches de conjugaison permettent de marquer des protéines avec des sondes (fluorescentes ou radioactives). Grace à cela il est possible de visualiser et d'étudier en profondeur des processus biochimiques encore inconnus et aussi de connaître la biodistribution de certaines macromolécules dans les organismes vivants. [2]

Ces techniques de couplage sur les protéines sont aussi extrêmement importantes dans plusieurs stratégies de libération contrôlée de médicaments (« Drug Delivery ») réalisées avec des protéines possédant une activité biologique d'intérêt. [3] En effet il est possible de conjuguer des molécules actives sur des anticorps afin de vectoriser des principes actifs anticancéreux. Cette classe de médicaments prend le nom de Antibody-Drug Conjugate (ADC). [4]
De ce fait la bioconjugaison trouve une grande application dans les domaines de la libération controlée de médicament et dans l'approche prodrogue des protéines-médicaments.
Ces approches sont extrêmement importantes car le plus souvent, des protéines possédant une activité biologique, sont caractérisées par une faible perméabilité et biodisponibilité, ce qui en fait de mauvais candidats médicaments administrables par voie orale. [5]

---

[1] V. H. Zahn, J. Meienhofer, *Makromol. Chem.* **1958**, *26*, 153–166.
[2] (a) H. M. O'Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488–494. (b) C. A. Royer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784. (c) M. Dumont, A. Lehner, B. Vauzeilles, J. Malassis, A. Marchant, K. Smyth, B. Linclau, A. Baron, J. M. Pons, C. T. Anderson, et al., *Plant J.* **2016**, *85*, 437–447.
[3] F. M. Veronese, P. Caliceti, in *Tumor Target. Cancer Ther.* (Ed.: M. Pagé), Humana Press, Totowa, NJ, **2002**, pp. 411–429.
[4] J. F. DiJoseph, *Blood* **2004**, *103*, 1807–1814.

[5] C. R. Middaugh, R. Pearlman, in *Nov. Ther. Mod. Biotechnol. Lab. Hum. Test.* (Eds.: D.L. Oxender, L.E. Post), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1999**, pp. 33–58.

L'insuline et l'hormone de croissance en sont un exemple, ces derniers sont depuis longtemps administrés par des injections sous-cutanées ou intramusculaires. Ces protéines-médicament sont actuellement l'objet d'approches de bioconjugaison, en vue d'améliorer leur biodisponibilité et leurs modes d'administration. [6]

Un autre exemple bien connu est la « PEGylation » de protéines, qui consiste en la conjugaison de chaines polymériques de polyéthylène glycol sur des protéines-médicaments. Cela confère une stabilité à la digestion enzymatique et une élimination rénale. [7]

La bioconjugaison est aussi un pilier de la synthèse des néoglycoprotéines. De nos jours plusieurs protocoles permettent de synthétiser des glycoprotéines modifiées. Des motifs mono ou poly-saccharidiques peuvent être couplés sur des protéines à l'aide de réactions de ligation. [8]

En général les stratégies de bioconjugaison sont employées aussi dans la préparation des micropuces (microarrays) pour des tests biologiques, [9] l'immobilisation d'enzymes [10] et autres protéines, l'industrie biopharmaceutique et encore d'autres applications basées sur l'utilisation de protéines comme matériaux. [11]

Il existe un grand nombre de protéines ayant des rôles et des structures souvent très variées. Cette diversité est telle que selon la protéine ciblée, différentes approches doivent être mise en place. De ce fait, le marquage sélectif d'un récepteur nécessite une approche de bioconjugaison différente par rapport à l'immobilisation de protéines sur des supports solides.
Ce contexte devient encore plus vaste en sachant que l'on cible aussi d'autres familles de biomolécules telles que les polysaccharides, les acides nucléiques et les lipides.
En raison de la diversité de composition et de rôle des biomolécules, des nombreuses techniques de bioconjugaison sont développées continuellement. [12]

II. Les méthodes de bioconjugaison

Plusieurs catégories de transformations chimiques font partie de cette grande famille de réactions applicables en bioconjugaison. Cependant une réaction de bioconjugaison ne doit en aucun cas compromettre l'intégrité de la biomolécule utilisée. Généralement des réactions dans l'eau, avec des activations thermiques qui ne dépassent pas 40°C sont privilégiées. Des réactifs plus violents utilisés classiquement dans la synthèse organique ne sont pas recommandés.

---

[6] (a) W. B. Geho, H. C. Geho, J. R. Lau, T. J. Gana, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2009**, *3*, 1451–1459. (b) Y. Shechter, M. Mironchik, A. Saul, E. Gershonov, L. Precido-Patt, K. Sasson, H. Tsubery, B. Mester, A. Kapitkovsky, S. Rubinraut, et al., *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 105–117.
[7] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1451–1458.
[8] D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163.
[9] J. Escorihuela, M.-J. Bañuls, S. Grijalvo, R. Eritja, R. Puchades, Á. Maquieira, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 618–627.
[10] T. Palai, A. Kumar, P. K. Bhattacharya, *Mater. Today Proc.* **2016**, *3*, 3568–3586.
[11] L. S. Witus, M. B. Francis, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 774–783.
[12] Hermanson,G.T., *Bioconjugate Techniques, Second Edition, (Academic Press 2008)*.

Idéalement une réaction de ligation doit aussi être caractérisée par une cinétique rapide, une stœchiométrie efficace, une faisabilité à des concentrations de l'ordre du µM, à des pH qui peuvent être supportés par les biomolécules ciblés. De plus, un bon réactif de bioconjugaison doit aussi être stable, avoir une bonne solubilité en milieu aqueux, et être peu toxique.

Les réactions dites de « chimie click » trouvent parfaitement leur place dans la conjugaison avec les biomolécules, car elles ne produisent par définition aucun sous-produit.

L'objet de ce projet de recherche est centré sur la réactivité Myrosinase-Glucosinolate et la fonction isothiocyanate comme agent de bioconjugaison, nous présentons ainsi la fonctionnalisation des protéines et peptides et plus spécifiquement des résidus amines.

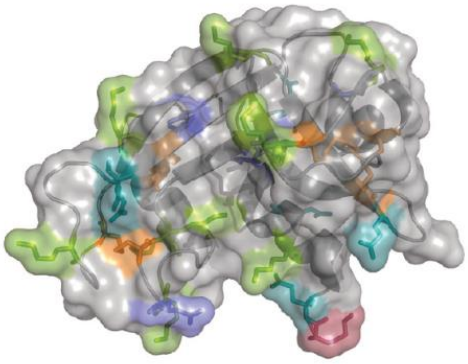
Protéines et peptides

Les protéines et les peptides sont des biopolymères dérivés des 21 α-L-aminoacides naturels. Trois stratégies de bioconjugaison peuvent être réalisées, en fonction de l'aminoacide ciblé : la fonctionnalisation sur la partie N-terminale, C-terminale ou sur l'une des chaines latérales des aminoacides endogènes de la chaine peptidique. La réalisation d'un couplage sur des acides aminés dépend essentiellement de l'accessibilité du résidu, du pKa, et de la réactivité intrinsèque de l'acide aminé.

Les approches ciblant les aminoacides N-terminaux [13] et ceux endogènes [14] sont les plus développées. Parmi les 21 aminoacides, les résidus lysine (Lys), cystéine (Cys) sont les plus ciblés en raison de leur nucléophilie exacerbée, pour leur fonction residuelle amine et thiol respectivement.

En moyenne, les lysines sont plus abondantes que les cystéines, 5.9% d'abondance pour les Lys comparée aux 1.9% pour les Cys (Figure 2); [15] de plus les fonctions thiols des cystéines sont rarement libres car la plupart sont impliquées dans des ponts disulfures.

[13] C. B. Rosen, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 697–705.
[14] O. Koniev, A. Wagner, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5495–5551.
[15] G. D. Fasman, *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Springer US, **1989**.



	Avg. pK_a	Avg. abundance
Lysine	10.5	5.9%
Cysteine	8.0	1.9%
Aspartic acid	3.5	5.3%
Glutamic acid	4.0	6.3%
N terminus	6–8	Unique

Figure 2 : figure représentant l'abondance moyenne dans les protéines de certains acides aminés d'intérêt.[13]

Approches ciblant les lysines

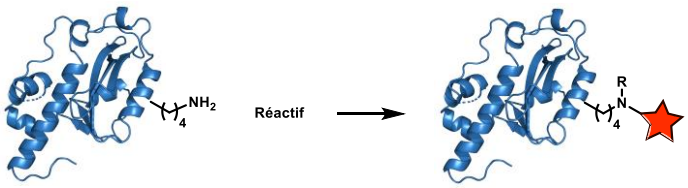
Les lysines sont les aminoacides nucléophiles les plus abondants et à la base des plus anciennes techniques de bioconjugaison. L'amine ε primaire est caractérisée par un pKa supérieur à 10, qui peut varier fortement selon son environnement. En effet, il a été démontré que la valeure du pKa peut diminuer jusqu'à 5 lorsque les lysines sont positionnées à l'intérieur de la protéine, [16] ou comme dans le cas de l'acétoacétate carboxylase, à proximité du site actif. [17]

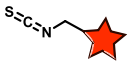
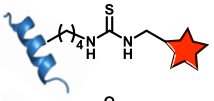
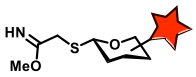
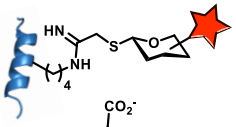
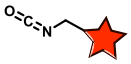
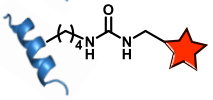
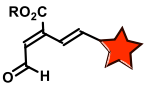
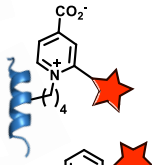
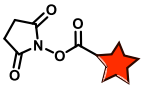
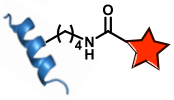
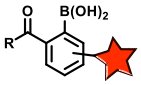
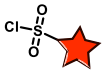
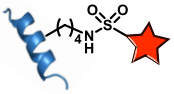
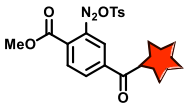
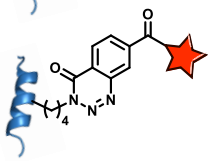
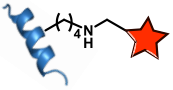
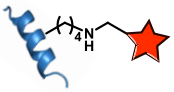
Le plus souvent les lysines sont protonées et donc exposées à la surface externe de la protéine et ainsi être facilement solvatées par les molécules d'eau. Bien que ce positionnement soit un avantage pour une meilleure accessibilité aux conjugaisons, le fait que la lysine soit protonée nécessite des pH généralement supérieurs à la neutralité pour réaliser une réaction. De ce fait lorsque des lysines à pKa 10 sont ciblés, le pH doit être compris entre 9 et 10. Par conséquent, à ces pH les amines–α terminales et les cystéines seront aussi susceptibles de réagir. [18]

Le Tableau 1 montre des exemples de ligations ciblant les lysines d'une protéine.

[16] D. G. Isom, C. A. Castañeda, B. R. Cannon, B. García-Moreno E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 5260–5265.
[17] F. H. Westheimer, D. E. Schmidt, *Biochemistry* **1971**, *10*, 1249–1253.
[18] *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions. Concepts and Applications. 2 Volumes. Edited by J. Rademann, W. Russ Algar, Philip Dawson, and Igor L. Medintz.*, **2018**.

Tableau 1 : réactions de bioconjugaison sur les lysines. [19]



Entrée	Réactif	Produit	Entrée	Réactif	Produit
1			7		
2			8		
3			9		
4			10		
5	$[Cp^*Ir(bipy)(H_2O)]SO_4NaHCO_2$ pH 7.4				
6	$NaBH_4CN$				

Les isothiocyanates

Historiquement les isothiocyanates font partis des premiers réactifs à avoir été utilisés dans des approches de bioconjugaison et plus précisément dans des réactions avec les lysines (entrée 1 Tableau 1). Les isothiocyanates sont plus stables comparé aux analogues oxygénés, les isocyanates (entrée 2), cela assure de plus faibles hydrolyses en milieu aqueux et donc des marquages d'une plus grande efficacité.

Bien que les isothiocyanates soient classés comme réactifs spécifiques pour les amines primaires, ils peuvent réagir aussi avec des résidus tyrosines et cystéines. [20] Cependant les adduits formés avec ces derniers ne sont pas stables, à la différence des thiourées formées par addition des amines.

La grande popularité des isothiocyanates en bioconjugaison peut être attribuée sans doute à l'utilisation d'isothiocyanates fluorescents dans le marquage de biomolécules. En 1958 les travaux publiés par Riggs et collaborateurs ont permis d'avoir accès à la synthèse de dérivés de fluorescéine et de rhodamine B

[19] (a) O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174–2195. (b) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
[20] D. Podhradský, Ľ. Drobnica, P. Kristian, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1977**, *42*, 384–389.

isothiocyanate. Ce même groupe s'est servi de ces réactifs isothiocyanates pour réaliser des marquages fluorescent d'anticorps. [21]

En 1942 Coons et coll. [22] avaient déjà synthétisés et utilisés des fluorophores isocyanates dans le même but, cependant en raison de l'instabilité des isocyanates, ces réactifs n'ont pas eu une utilisation importante dans le domaine de la bioconjugaison.

A partir de cette découverte, les isothiocyanates ont été largement utilisé en bioconjugaison, ce qui est prouvé par les milliers d'articles utilisant ce type de ligation.

Malgré l'abondance du résidu lysine sur les protéines, plusieurs méthodes de bioconjugaisons sélectives ont été réalisées avec des réactifs isothiocyanates. D'excellentes sélectivités ont été obtenues généralement avec une lysine marquée sur environ 30 disponibles et sur différentes protéines ciblés (cytochrome P450, actine). [23] Rana et Meares ont aussi montré qu'une ligation sélective de l'amine α terminale d'un anticorps monoclonal avec un réactif isothiocyanate-EDTA était possible. [24] La sélectivité de ces exemples de marquage peut être attribuée principalement aux différentes valeurs de pKa entre les lysines ainsi que par la différence d'accessibilité de ces résidus. Comme mentionné précédemment, les lysines peuvent avoir des valeurs de pKa compris entre 5 et 10 environ, de ce fait les résidus plus « acides » auront tendance à réagir plus facilement à des pH plus faibles par rapport aux lysines plus basiques ayant un pKa d'environ 10. Les isothiocyanates ont aussi été largement utilisées dans la préparation de néoglycoprotéines. Grace à la réactivité de cette fonction il est possible de greffer des oligosaccharides sur des protéines « neutres » comme la BSA et de créer *de novo* une glycoprotéine. [25]
Bien qu'ils soient très utilisés, ces agents de couplage présentent plusieurs inconvénients : leur toxicité, [26] leur faible solubilité en milieu aqueux et leur stabilité au stockage. De manière plus importante, les façons de synthétiser des isothiocyanates sont assez limités et peu sécuritaires. Les méthodes les plus récentes utilisent des produits extrêmement toxiques et peu faciles à manipuler tels que le disulfure de carbone. [27]

Esters activés du N-hydroxy succinimide (NHS)

Les esters activés du *N*-hydroxy succinimide (entrée 3, Tableau 1) représentent une alternative avantageuse pour le marquage des lysines. Ces composés sont aisément synthétisables à partir d'une fonction acide carboxylique facile à introduire sur des molécules organiques. Après couplage avec la lysine

---

[21] J. L. Riggs, R. J. Seiwald, J. H. Burckhalter, C. M. Downs, T. G. Metcalf, *Am. J. Pathol.* **1958**, *34*, 1081–1097.
[22] Coons A H, Creech H J, Jhones R N, Berliner G, *J Immunol.* **1942**, *45*, 159–70.
[23] (a) J. Tuls, L. Geren, F. Millett, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16421–16425. (b) L. D. Burtnick, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *791*, 57–62. (c) M. Miki, C. G. dos Remedios, J. A. Barden, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 339–345.
[24] T. M. Rana, C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 357–362.
[25] (a) C. Quétard, S. Bourgerie, N. Normand-Sdiqui, R. Mayer, G. Strecker, P. Midoux, A.-C. Roche, M. Monsigny, *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 268–276. (b) D. F. Smith, D. A. Zopf, V. Ginsburg, in *Methods Enzymol.*, Academic Press, **1978**, pp. 169–171. (c) S. Y. Wong, I. D. Manger, G. R. Guile, T. W. Rademacher, R. A. Dwek, *Biochem. J.* **1993**, *296*, 817–825.
[26] N. Masutomi, K. Toyoda, M. Shibutani, N. Niho, C. Uneyama, N. Takahashi, M. Hirose, *Toxicol. Pathol.* **2001**, *29*, 617–622.
[27] (a) H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensen, U. Boas, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117–3119. (b) R. Wong, S. J. Dolman, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3969–3971. (c) N. Sun, B. Li, J. Shao, W. Mo, B. Hu, Z. Shen, X. Hu, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 61–70.

ils forment une liaison amide qui est plus stable que la connexion de type thio-urée. Actuellement, la plupart des réactifs de bioconjugaison commerciaux ciblant les lysines utilisent la fonctionnalité NHS. [28]

Halogénures de sulfonyle

Les halogénures de sulfonyle sont des réactifs de ligation très utilisés, le chlorure de dansyle est probablement le plus connu par son utilisation pour les marquages fluorescents. L'inconvénient de cette famille de composés est leur instabilité et leur réactivité exacerbée qui leur permet de réagir aussi avec les histidines et les tyrosines.[18] Plus précisément pour certains fluorures de sulfonyle une spécificité est observée pour les fonctions phénol des tyrosines au point de réaliser des bioconjugaison spécifiques. [29]

Amination réductrice

Les entrées 5 et 6 présentent des couplages réalisés par amination réductrice de l'amine des lysines avec des aldéhydes. La bioconjugaison en présence de cyanoborohydrure de sodium a été largement utilisée notamment pour la synthèse de néoglycoprotéines [30] mais a été abandonnée en raison de la forte réactivité du réducteur en question, ainsi que la présence de traces de cyanure dues au réactif. Par la suite, Mc Farland et Francis ont développé une bioconjugaison par réduction en utilisant un catalyseur à base d'Iridium. Ces auteurs ont su se servir de cette méthode dans la PEGylation des lysosomes. [31]

Réactivité d'une fonction imidate

La réactivité d'un imidate avec une amine est aussi très populaire dans le domaine des néoglycoprotéines ; elle est nommée méthode IME pour l'IminomethoxyMEthyl thioglycosides. Les travaux de Davis *et al*. montrent d'élégantes applications de cette méthode permettant le greffage d'environ 20000 glycanes sur un adénovirus. [32] Ce même groupe s'est servi de cette réaction dans une approche de libération contrôlée d'une pro-drogue très originale.
La rhamnosidase a été glycosylée sélectivement grâce à la méthode de l'IME, ce qui a permis sa vectorisation in-vivo, suite à une reconnaissance sucre-lectine. Dans un deuxième temps, la prodrogue liée à un rhamnose est également vectorisée puis relarguée dans la cellule, par l'hydrolyse de la rhamnosidase. [33]

---

[28] J. S. Nanda, J. R. Lorsch, in *Methods Enzymol.* (Ed.: J. Lorsch), Academic Press, **2014**, pp. 87–94.
[29] (a) C. Gu, D. A. Shannon, T. Colby, Z. Wang, M. Shabab, S. Kumari, J. G. Villamor, C. J. McLaughlin, E. Weerapana, M. Kaiser, et al., *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 541–548. (b) E. C. Hett, H. Xu, K. F. Geoghegan, A. Gopalsamy, R. E. Kyne, C. A. Menard, A. Narayanan, M. D. Parikh, S. Liu, L. Roberts, et al., *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1094–1098
[30] (a) Q. Wang, Z. Guo, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 373–378. (b) Y. Pan, P. Chefalo, N. Nagy, C. Harding, Z. Guo, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 875–883
[31] J. M. McFarland, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490–13491.
[32] O. M. T. Pearce, K. D. Fisher, J. Humphries, L. W. Seymour, A. Smith, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1057–1061.
[33] M. A. Robinson, S. T. Charlton, P. Garnier, X. Wang, S. S. Davis, A. C. Perkins, M. Frier, R. Duncan, T. J. Savage, D. A. Wyatt, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 14527–14532.

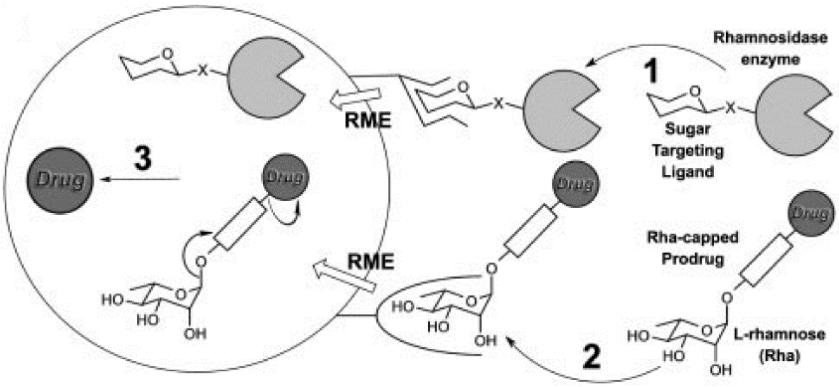


Figure 3: Thérapie prodrogue dirigée par la reconnaissance des lectines ;
Lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy (LEAPT); RME : Receptor mediated endocytosis.

Techniques de bioconjugaison plus récentes

Ces dernières années, les techniques de bioconjugaison ont évolué afin d'obtenir des réactions de plus en plus rapides et sélectives. Les réactions présentées dans le tableau 1 (entrées 8-10) en sont quelques exemples.

Les équipes japonaises de Fukase et Katsumura ont mis au point le couplage décrit dans l'entrée 8. Cet aldéhyde α,β,γ,δ-insaturé permet de réaliser des réactions péricycliques dite 6π-azaelectrocyclisation. Ces cyclisations sont caractérisées par une cinétique très accélérée, ce qui permet de réaliser des bioconjugaisons en seulement 10 minutes à température ambiante avec une concentration faible de l'ordre du 10 nM. [34]

En entrée 9, un dérivé de type formyl acide boronique mis au point par Gois et coll. [35] permet de marquer les lysines et les amines alpha terminales en formant une imine. Usuellement cette fonction imine n'est pas stable en milieu aqueux, cependant grâce à la liaison sur le bore il est possible d'avoir un complexe iminoboronate stable. La particularité de ce couplage est la réversibilité ; lorsque de la dopamine ou du fructose sont ajoutés dans le milieu, la formation d'esters boroniques comporte une fragilisation de la liaison avec l'imine. De ce fait l'iminoboronate peut s'hydrolyser. Cette réaction a permis des marquages de plusieurs protéines modèles y compris au sein de cellules cancéreuses. [36]

En entrée 10, un autre couplage efficace dans des temps courts allant de 30 min à 2 h, a été réalisé grâce à une cyclisation irréversible entre le diazonium-ester et l'amine primaire de la protéine. [37]

Bien qu'en général chaque protéine possède de nombreuses lysines, grâce à certains réactifs, il est possible d'obtenir de bonnes sélectivités de bioconjugaison.

---

[34] K. Tanaka, K. Fukase, S. Katsumura, *Chem. Rec.* **2010**, *10*, 119–139.
[35] P. M. S. D. Cal, J. B. Vicente, E. Pires, A. V. Coelho, L. F. Veiros, C. Cordeiro, P. M. P. Gois, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10299–10305.
[36] P. M. S. D. Cal, R. F. M. Frade, V. Chudasama, C. Cordeiro, S. Caddick, P. M. P. Gois, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5261–5263.
[37] S. Diethelm, M. A. Schafroth, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3908–3911.

Récemment les équipes de Jiménez-Osés et Bernardes ont présenté un travail remarquable de bioconjugaison régio- et chimio- sélective visant les lysines de cinq protéines natives. Diverses protéines ont été étudiées : l'albumine sérum humaine (HSA), deux biomarqueurs, un lysozyme et un anticorps (Schéma 3). [38] Un travail chemoinformatique leur a permis d'identifier un réactif de type sulfonyl acrylate (Schéma 3) permettant de marquer spécifiquement une seule lysine pour chacune des protéines susmentionnées.

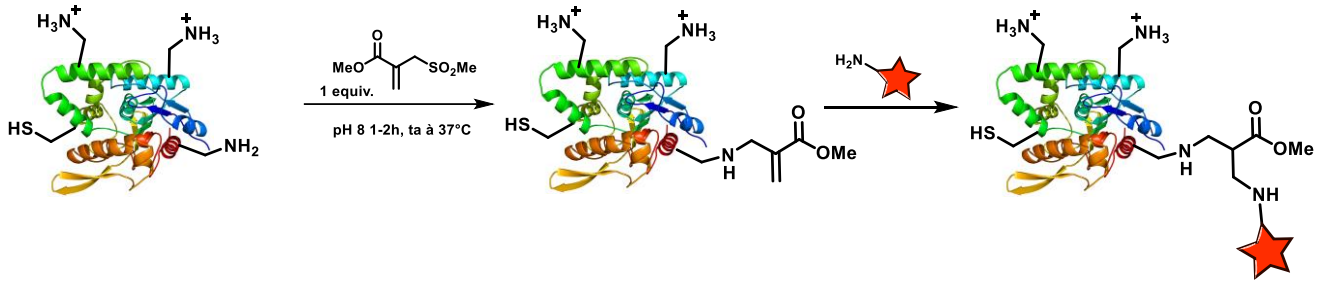


Schéma 3 : bioconjugaison régio- et chimio- sélective.

Par la suite le marquage sélectif se fait par addition d'une deuxième entité nucléophile de type amine qui peut réaliser une addition de Michael sur le dérivé α,β insaturé.

Les stratégies citées dans cette section peuvent seulement donner un aperçu d'une grande bibliothèque constituée d'une multitude de réactions de couplage. Par rapport aux premières techniques abordées, il est évident que de grandes améliorations de la sélectivité et de la cinétique ont été réalisées. Parallèlement à ce besoin d'une sélectivité plus pointue de la bioconjugaison, les couplages bioorthogonaux introduits par Carolyn Bertozzi ont épaulé le domaine. Cette dernière stratégie permet de réaliser une réaction avec des fonctions abiotiques, complètement orthogonales aux fonctionnalités présentes dans le monde du vivant, sur les aminoacides et les biomolécules. De ce fait, lors de ces réactions de couplage bioorthogonal, aucune réaction parasite n'intervient car les fonctionnalités mises en jeu sont normalement inertes avec les milieux biologiques.

Afin de réaliser cette approche de couplage bioorthogonal, il est indispensable de définir un marqueur chimique bioorthogonal (« bioorthogonal chemical reporter »), une fonctionnalité chimique complètement orthogonale aux systèmes biologiques, capable d'être internalisée vers les cibles biologiques en utilisant la biochimie cellulaire. [39] L'introduction de ce marqueur *in-vivo*, permet par la suite de réaliser des fonctionnalisations bioorthogonales. Un exemple frappant de cette approche est l'utilisation de la fonction azido qui peut être aisément incorporé dans les milieux biologiques, et par la suite donner des réactions de type Staudinger Bertozzi [40] ou avec des cyclooctynes contraintes, [41] ce qui permet de réaliser une bioconjugaison sélective *in vivo.*

---

[38] M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, A. Guerreiro, P. M. S. D. Cal, J. Bertoldo, M. Maneiro, E. Perkins, J. Howard, M. J. Deery, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4004–4017.
[39] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
[40] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
[41] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 16793–16797.

Le système Myrosinase-Glucosinolate

1. Introduction

Le système MG est un tandem enzymatique présent exclusivement dans les plantes de l'ordre des Brassicales. Cet ordre est constitué de 16 familles de plantes, toutes caractérisées par la présence du système MG.

Les glucosinolates (GL) sont des métabolites secondaires soufrés produits par les plantes appartenant à l'ordre des Brassicales. D'un point de vue structural un GL est caractérisé par trois parties. Un motif β-D-glucopyranose (en vert), une fonction thiohydroximate *O*-sulfaté de géometrie Z (en orange) et une chaine latérale trompeusement dite génine ou aglycone (en bleu). La diversification de ces molécules est apportée par les modifications de la chaine latérale. La biosynthèse de ces métabolites se fait à partir des acides aminés aromatiques et aliphatiques. [42]

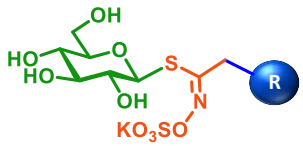


Schéma 4 : structure générale d'un glucosinolate.

Jusqu'en 2011, environ 132 glucosinolates appartenant à cet ordre de plante ont été détectés et/ou isolés et/ou caractérisés. [43] Parmi les familles de cet ordre, les *Brassicaceae* et les *Capparaceae* sont celles qui présentent la plus grande diversification de glucosinolates, en comptant respectivement 96 et 19 GLs différents. [44] Plus communément on retrouve des glucosinolates dans tous les végétaux de notre alimentation quotidienne appartenant à la famille des choux, des brocolis, des radis, des câpres, le wasabi, la moutarde, le raifort etc.

Dès le 18ème siècle, ce couple enzymatique avait déjà attiré l'attention des chercheurs qui ont essayé d'expliquer les propriétés olfactives et gustatives de l'huile de moutarde. En effet, la saveur de ces aliments provient principalement de l'action de la myrosinase, capable d'hydrolyser les glucosinolates. La formation des isothiocyanates, volatils, sont les principaux responsables du goût et de l'arôme typique des végétaux listés ci-dessus.

[42] (a) G. E. Ravilious, J. M. Jez, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1138. (b) T. Liu, X. Zhang, H. Yang, N. Agerbirk, Y. Qiu, H. Wang, D. Shen, J. Song, X. Li, *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*. (c) L. M. Jensen, B. A. Halkier, M. Burow, *Biol. Chem.* **2014**, *395*.
[43] N. Agerbirk, C. E. Olsen, *Phytochemistry* **2012**, *77*, 16–45.
[44] J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, P. Talalay, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5–51.

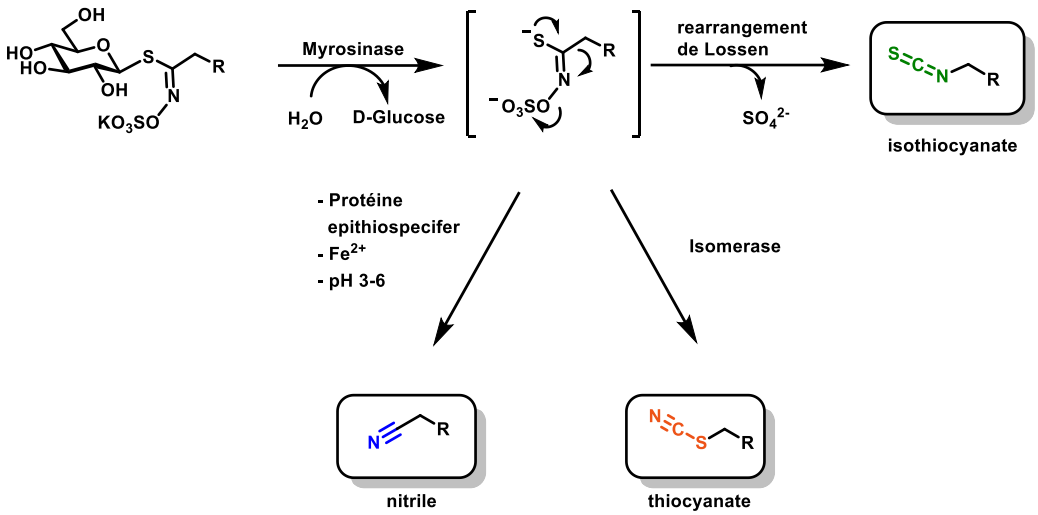


Schéma 5 : sous-produits d'hydrolyse d'un glucosinolate.

L'hydrolyse d'un glucosinolate se fait en deux temps, tout d'abord une unité glucose est ôtée par hydrolyse et conduit à un intermédiaire de type acide thiohydroxamique *O*-sulfaté. Ensuite ce dernier subit un réarrangement de Lossen qui conduit à la formation d'un isothiocyanate (Schéma 5). Comme le montre le Schéma 5, cette hydrolyse peut aussi générer d'autres sous-produits, issus de réarrangements différents. Lorsque l'hydrolyse se fait dans des conditions plus acides (pH 3-6), [45] en présence de protéines épithiospecifique [46] ou en présence d'ions ferriques (Fe^{2+}), [47] il est possible d'observer la formation de nitriles. Le type de sous-produit formé dépend beaucoup de la nature de la chaine aglycone, notamment les glucosinolates de type indoles génèrent plus facilement des nitriles.

L'hydrolyse des GLs peut donner des thiocyanates. Les études ont permis d'avancer l'hypothèse qu'une deuxième enzyme, une isomérase, est responsable de ce réarrangement, comme pour la formation des épithionitriles. [48] En 2011 Kuchernig *et al.* ont confirmé cette supposition en réalisant la caractérisation de la protéine responsable de la formation des thiocyanates. Cette protéine a été clonée et exprimée à partir de l'espèce *Brassicacea Thlaspi arvense*. [49]

[45] L. Latxague, C. Gardrat, J. L. Coustille, M. C. Viaud, P. Rollin, *J. Chromatogr. A* **1991**, *586*, 166–170.
[46] R. F. Mithen, M. Dekker, R. Verkerk, S. Rabot, I. T. Johnson, *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 967–984.
[47] G. R. Fenwick, R. K. Heaney, W. J. Mullin, C. H. VanEtten, *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, *18*, 123–201.
[48] M. Benn, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 197–210.
[49] J.-C. Kuchernig, A. Backenköhler, M. Lübbecke, M. Burow, U. Wittstock, *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1699–1709.

2. Le rôle chez les plantes

Hormis le goût typique conféré aux végétaux de la famille des B*rassicaceae*, ce système MG est en charge d'un mécanisme complexe de défense chez les plantes. En effet, par leur toxicité, les isothiocyanates sont utilisés en tant que repoussant de nombreux agresseurs potentiels, notamment certains insectes, mammifères, oiseaux, bactéries et champignons. [50]

A la différence de ces produits de dégradation, les GLs ne sont pas toxiques. De ce fait, ils peuvent être stockés dans tous les organes de la plante. Afin d'éviter une hydrolyse incontrôlée, la myrosinase est isolée dans des cellules (idioblastes) de la plante qui empêchent le contact de l'enzyme avec les autres métabolites. Lorsque la plante est attaquée par un être vivant ou par tout autre sorte de stress abiotique, les GLs sont rapidement mis en contact avec la myrosinase, afin de produire des molécules capables d'éloigner l'agresseur. De plus lorsque la plante subit un stress, biotique (causé par un organisme vivant) ou abiotique (facteurs environnementaux) la production de glucosinolates est modulée et augmentée. [51]

3. Propriétés biologiques

Il a été prouvé qu'une alimentation riche en légumes de l'ordre des Brassicales peut avoir un grand pouvoir préventif contre plusieurs cancers. [52] Ces propriétés sont issues du couple MG car en effet les isothiocyanates issus des GLs des *Brassicacées* ont le plus souvent des propriétés antibactériennes et anticancéreuses chez l'homme. [53] En effet certains isothiocyanates sont capables de moduler le cycle cellulaire des cellules cancéreuses ainsi que de favoriser l'apoptose cellulaire. [54]

Chez l'animal et encore plus pour le cochon, une forte alimentation en Brassicales peut induire la formation d'un goitre et d'autres dysfonctions de la glande thyroïde. [55] Cependant chez l'homme la consommation de ces légumes ne cause pas les mêmes désordres. [56]

---

[50] (a) S. Textor, J. Gershenzon, *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 149–170. (b) B. A. Halkier, J. Gershenzon, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 303–333.
[51] M. del Carmen Martínez-Ballesta, D. Moreno, M. Carvajal, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 11607–11625.
[52] A. F. A. Razis, A. Arumugam, N. Konsue, in *Fruit Veg. Phytochem.* (Ed.: E.M. Yahia), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2017**, pp. 199–210.
[53] S. Petrović, M. Drobac, L. Ušjak, V. Filipović, M. Milenković, M. Niketić, *Ind. Crops Prod.* **2017**, *109*, 398–403.
[54] B. Abbaoui, C. R. Lucas, K. M. Riedl, S. K. Clinton, A. Mortazavi, *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, 1800079.
[55] M. K. Tripathi, A. S. Mishra, *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *132*, 1–27.
[56] T. A. Shapiro, J. W. Fahey, A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, K. K. Stephenson, K. L. Wade, L. Ye, P. Talalay, *Nutr. Cancer* **2006**, *55*, 53–62.

L’approche MG en bioconjugaison.

Comme évoqué précédemment, les réactifs de bioconjugaison de type isothiocyanates ne sont pas stables, le plus souvent. Ils sont toxiques, peu solubles et difficiles à synthètiser et surtout à conserver.

A l’aide du système MG, il est possible d’imaginer la libération d’un isothiocyanate en utilisant les glucosinolates comme précurseurs. Ces derniers sont dotés d’une parfaite solubilité dans les milieux aqueux, d’une bonne stabilité (dans l’eau) et sont peu ou pas toxiques. De plus la réaction d’hydrolyse d’un glucosinolate est réalisée dans des conditions douces, avec une enzyme hautement spécifique pour ces thiosaccharides, en générant l’isothiocyanate pour la bioconjugaison et surtout des sous-produits inoffensifs : le glucose et le sulfate.

De ce fait, ce système enzymatique, d’origine naturelle, pourrait être envisagé en bioconjugaison afin de pallier certains aspects limitants de l’approche de l’isothiocyanate. Cette idée est le cœur du travail de thèse que je vais détailler :

- Par l’élaboration de glucosinolates artificiels et fonctionnalisés incorporant soit un ligand soit une fonction réactive. Après l’obtention de ces molécules, la réactivité des GLs possédant une fonction réactive sera présentée. Cela permettra de rendre plus aisée la synthèse d’entités moléculaires de type glucosinolate plus complexes.

- Par l’étude de la compatibilité chimique des GLs et leur capacité à former un isothiocyanate par action de la myrosinase. Cette étude se déroule en deux parties : une première étude cinétique réalisée par électrophorèse capillaire qui mène à l’obtention des constantes cinétiques pour chaque substrat étudié, afin d’en évaluer l’hydrolyse.
  Une deuxième partie se focalise sur l’identification des possibles nucléophiles susceptibles de se lier à l’isothiocyanate issu de cette réaction enzymatique, dans des conditions douces.

- Par l’étude du potentiel de ce couple enzyme-substrat en bioconjugaison. Tout d’abord sera présentée l’évaluation de l’activité biologique des GLs visant les lectines. Ensuite des approches de bioconjugaison telles que la synthèse de néoglycoprotéines et le marquage sélectif d’une lectine seront abordées. Pour conclure, la fonctionnalisation de nanoparticules d’or avec des GLs et l’étude de leur hydrolyse sera détaillée.

Chapitre 1

Synthèse de glucosinolates bifonctionnels

Chapitre 1 Synthèse de glucosinolates bifonctionnels

L'objectif du travail décrit dans ce chapitre est la synthèse de molécules portant une entité glucosinolate (GL) et une fonctionnalité biologique ou chimique. Dans le premier cas cette fonctionnalité est susceptible d'interagir avec des lectines, dans le second cas, la fonctionnalité est portée par des groupes réactifs.
L'étude simultanée de différentes approches a été réalisée afin d'identifier rapidement les méthodes capables de fournir une grande quantité de glucosinolate, dans certains cas jusqu'à l'échelle du gramme. Par la suite, un travail concernant la réactivité de l'entité GL avec ces fonctions orthogonales sera présentée, et permettra de découvrir les compatibilités chimiques.
La dernière partie de ce chapitre montre la synthèse de GLs plus complexes, rendu possible grâce à ces travaux préliminaires.

I. Méthodes de synthèse des glucosinolates

Différentes stratégies permettent d'accéder à des GLs naturels mais aussi artificiels. [57] Une première approche prévoit la réaction entre un acide thiohydroxamique (**3**) et un bromoglucose **2** (Schéma 6). [58]

Schéma 6 : synthèse de GLs à partir d'acides thiohydroxamiques.

En raison de la difficulté d'accéder aux acides thiohydroxamiques, cette stratégie n'a pas connu un grand succès.

L'approche la plus employée est basée sur un intermédiaire clé de type oxyde de nitrile (Schéma 7), électrophile très réactif qui se prête bien à des réactions d'additions nucléophiles, notamment avec des thiols tels que le thioglucose. L'avantage de cette approche est dû d'une part à la possibilité d'obtenir facilement une grande quantité de thioglucose (10 g), mais aussi, aux différentes méthodologies permettant de générer *in situ* les oxydes de nitriles à partir de plusieurs précurseurs (nitrovinyles, oximes, acides hydroxamiques …).

[57] P. Rollin, A. Tatibouët, *Comptes Rendus Chim.* **2011**, *14*, 194–210.
[58] M. G. Ettlinger, A. J. Lundeen, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1764–1765.

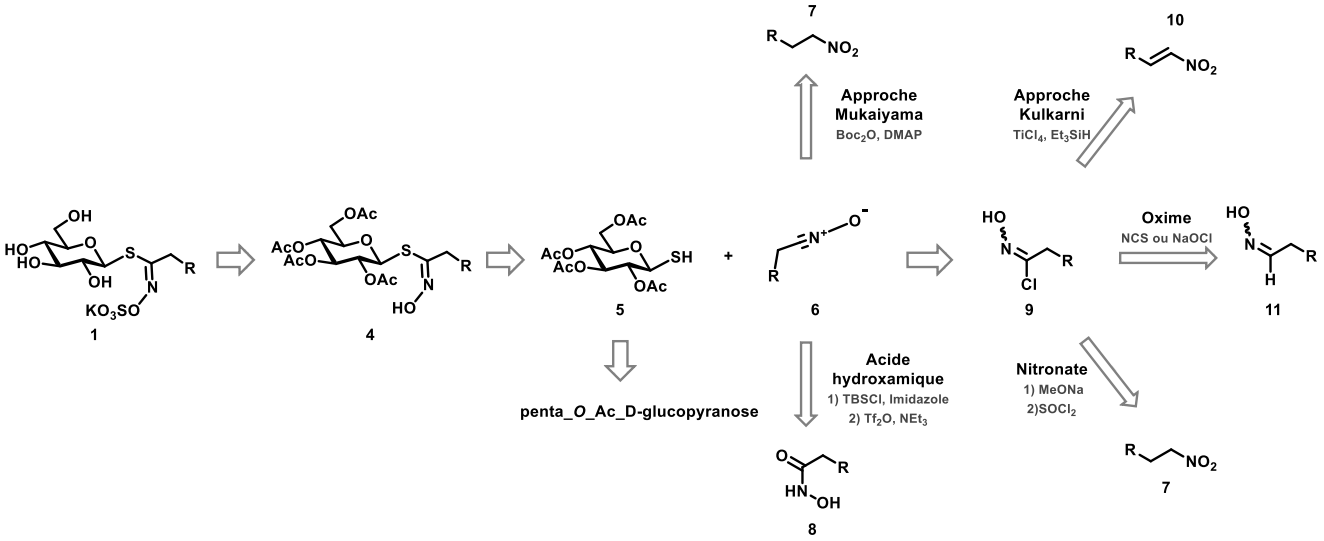


Schéma 7 : schéma globale de rétrosynthèse et des voies d'accès à l'oxyde de nitrile.

L'approche **Mukaiyama** [59] permet d'obtenir l'oxyde de nitrile **6** en partant de nitroalcanes, grâce à l'activation en présence d'un anhydride d'acide (Ac_2O ou Boc_2O) de tert-butyle et de DMAP.
La voie de **l'acide hydroxamique** se fait grâce à une activation de l'hydroxyle de l'acide **8** par l'anhydride triflique. Cette dernière approche développée au sein de notre équipe, a permis l'obtention de glucosinolates aliphatiques et aromatiques avec de bons rendements. [60]

La voie du **nitronate** permet d'obtenir des chlorures d'hydroximoyle en partant de nitroalcanes. Un traitement basique en présence de méthanolate de sodium est réalisé afin d'obtenir un nitronate intermédiaire, lequel, suite à une chloration nucléophile mené par le chlorure de thionile, permet d'aboutir au chlorure d'hydroximoyle. Cette réaction originairement mise au point par Jensen et Kajaer en 1971, [61] a aussi été utilisé récemment en 2018 par Rollin et *al.* dans la synthèse de ω-methylsulfanylalkyl glucosinolates. [62] Cependant, le nitronate étant une espèce très sensible et facilement dégradable à l'air et en présence d'eau, des rendements moyens (de l'ordre de 56% pour la formation du chlorure d'hydroximoyle) sont décrits dans la littérature. [63]

[59] Y. Basel, A. Hassner, *Synthesis* **1997**, *1997*, 309–312.
[60] D. Cerniauskaite, J. Rousseau, A. Sackus, P. Rollin, A. Tatibouët, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 2293–2300.
[61] Jensen, S.R., Kjaer, A., **1971**, *25*, 3891–3893.
[62] M. Mavratzotis, S. Cassel, S. Montaut, P. Rollin, *Molecules* **2018**, *23*, 786.
[63] Q. V. Vo, C. Trenerry, S. Rochfort, J. Wadeson, C. Leyton, A. B. Hughes, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5945–5954.

L'approche de **Kulkarni** [64] permet d'obtenir le thiohydroximate à l'aide de précurseurs de type nitrovinyles **10**, lesquels, après activation avec un acide de Lewis fort tel que le tetra chlorure de titane, et en présence de triéthylsilane, forment les chlorures d'hydroximoyle **9** (Schéma 8).

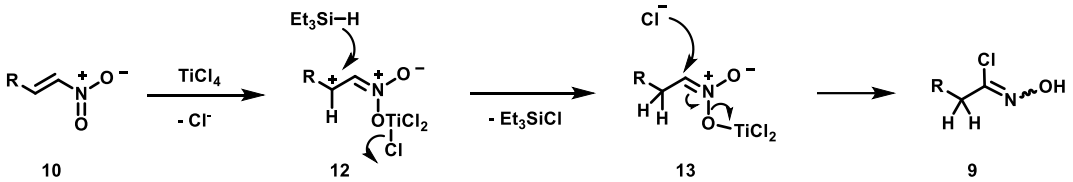


Schéma 8 : mécanisme de formation du chlorure d'hydroximoyle dans les conditions de Kulkarni.

Ensuite cet électrophile est traité avec une base ce qui favorise la formation de l'oxyde de nitrile **6**. La condensation rapide avec le thioglucose, permet ainsi la création de la fonction thiohydroximate **4** (Schéma 9). Concernant la nature de cette addition, étant donné qu'elle est accélérée par la présence d'un excès de base, il est probable que le thiolate attaque l'oxyde de nitrile. [65]

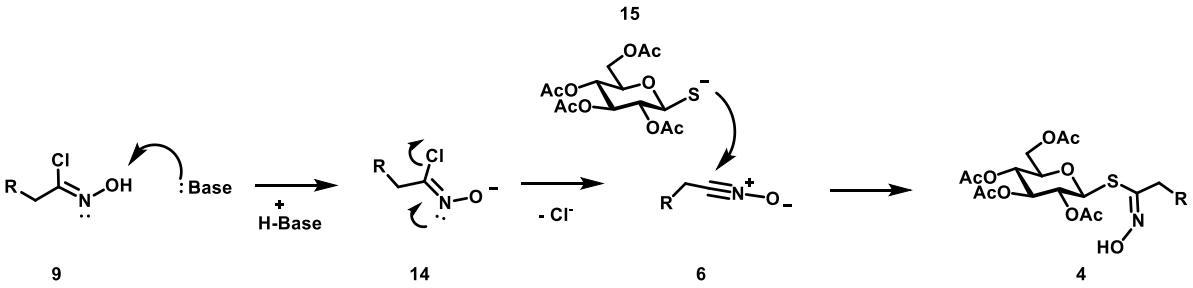


Schéma 9 : mécanisme de formation de la fonction thiohydroximate à partir du chlorure d'hydroximoyle.

Ce type de mécanisme cependant ne donne aucune indication relative à la stéréosélectivité de cette réaction qui mène à un seul stéréo-isomère (de géométrie Z). Il est toutefois possible de déduire la géométrie de ces substrats à travers des évidences pratiques.

Suite aux travaux réalisé par le groupe de M.H. Benn [66] basées sur l'activation du nitronate par des trialkyl silyls, les deux isomères E/Z ont été isolés et caractérisés. Cela a permis de pouvoir confronter le même type de thiohydroximate obtenu par la voie du chlorure d'hydroximoyle, en confirmant que cette approche donne accès uniquement à l'isomère Z.

De plus, les expériences de Waser *et al*. [67] montrent une structure cristallographique de la sinigrine, un glucosinolate naturel extrait des graines de moutarde noire ayant une géométrie Z. Etant donné que les autres glucosinolates synthétisés avec la voie du chlorure d'hydroximoyle sont aussi hydrolysés par la myrosinase, il est possible de conclure que la géométrie issue de ce type de réaction est de type Z.

---

[64] G. Kumaran, G. H. Kulkarni, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1516–1520.
[65] M. H. Benn, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 2393–2397.
[66] T. H. Keller, L. J. Yelland, M. H. Benn, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 437–440.
[67] J. Waser, W. H. Watson, *Nature* **1963**, *198*, 1297–1298.

La voie de l'**aldoxime** se base sur un précurseur de type aldoxime, lequel après oxydation en présence d'un agent simple tel que du dichlore, du *N*-chlorosuccinimide ou encore de l'hypochlorite de sodium (eau de javel), conduit au chlorure d'hydroximoyle [68] pour poursuivre vers la formation du thiohydroximate comme dans le cas précédent.

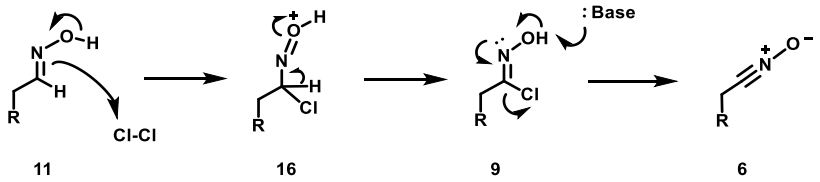


Schéma 10 : formation de l'oxyde de nitrile à partir de l'aldoxime. [69]

Souvent cette approche peut être considérée plus douce, comparée à l'approche de Kulkarni qui utilise un acide de Lewis fort. D'excellents rendements peuvent être obtenus en utilisant un oxydant peu coûteux et peu nocif. [70]
De plus, d'un point de vue synthétique (Schéma 10), il est facile d'accéder aux aldoximes dans des conditions assez douces en présence de carbonate de sodium et d'hydroxylamine dans un mélange eau-méthanol. [71]

Afin de pouvoir obtenir les GLs désirés de la façon la plus directe, mais aussi pour des raisons de compatibilité chimique avec la nature du substrat, la voie de Kulkarni et la voie de l'oxime ont été adoptées pour les synthèses qui seront détaillées au cours de ce chapitre.

[68] (a) C. Grundmann, J. M. Dean, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2809–2812. (b) Y.-H. Chiang, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2146–2155.
[69] *Organic Chemistry - Second Edition - Jonathan Clayden, Nick Greeves, Stuart Warren - Oxford University Press*.
[70] S. E. Cobb, K. F. Morgan, N. P. Botting, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1605–1607.
[71] S. Castellano, D. Kuck, M. Viviano, J. Yoo, F. López-Vallejo, P. Conti, L. Tamborini, A. Pinto, J. L. Medina-Franco, G. Sbardella, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7663–7677.

II. Glucosinolates « Phényl-Mannosides » visant des lectines [72]

1. Choix des molécules

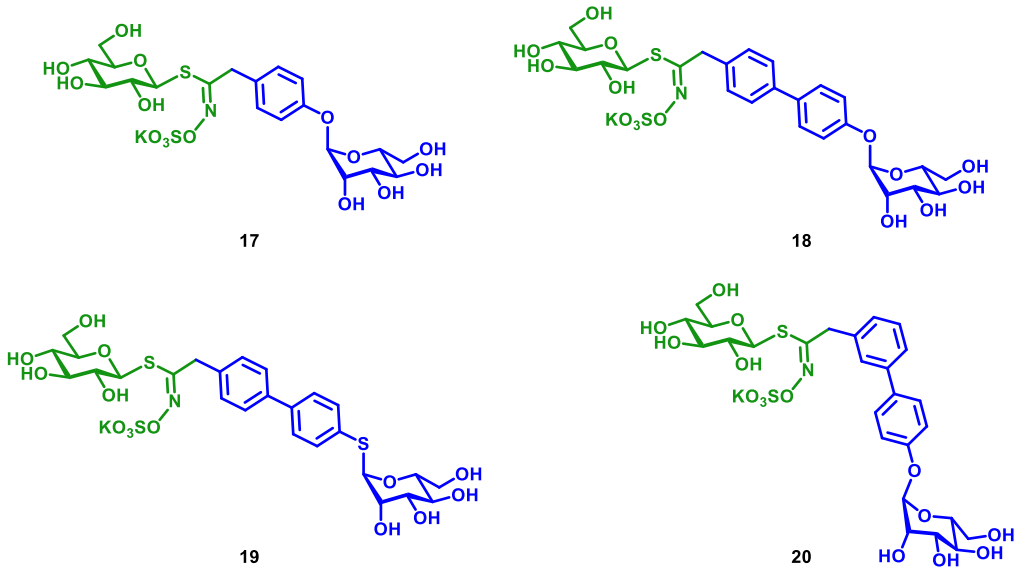


Schéma 11: glucosinolates phényl mannosides synthétisés.

Les premiers GLs bifonctionnels ont été conçus de sorte à avoir une molécule à double fonctionnalité (Schéma 11) : glucosinolate (couleur verte), qui peut être hydrolysé par la myrosinase, et une partie ligand (couleur bleue) qui pourrait potentiellement interagir avec des lectines. La spécificité des lectines ciblées, pour les mannopyranosides a mené à la synthèse de ce type de GL-mannose. Afin d'améliorer et moduler l'affinité de ce ligand-GL vis-à-vis de la lectine bacterienne FimH, la synthèse de plusieurs substrats de type phényle et biphényle a été envisagée. Plus précisément, quatre glucosinolates ont été conçus portant un ligand de type phényl *para* α-mannopyranosyl **17**, biphényle *para* et méta α-mannopyranosyl **18** et **20** ainsi que *para* thiomannopyranosyl **19**.

Grâce aux dérivés bi phényles il est possible d'évaluer l'influence de la deuxième unité phényle, par rapport au premier GLs plus simple, et aussi l'importance de l'orientation du groupe GL sur le squelette du ligand *méta* ou *para*. En ce qui concerne le thiomannoside, hormis le challenge synthétique, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence de l'atome de soufre en position anomérique lors de l'interaction avec la lectine.

[72] G. Cutolo, F. Reise, M. Schuler, R. Nehmé, G. Despras, J. Brekalo, P. Morin, P.-Y. Renard, T. K. Lindhorst, A. Tatibouët, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4900–4913.

Le choix de la construction de l'unité biphényl mannose a été inspiré par des travaux du groupe de Ernst (2010) [73] et Hultgren (en 2010 et en 2012) [74]. Ces équipes ont pu démontrer l'intérêt de ce squelette aromatique dans l'amélioration des propriétés antagonistes des dérivés mannosidiques. Cela notamment pour la lectine bactérienne Fim-H de l'*E*.Coli.

2. Le glucosinolate « Phenylmannoside »

Dans un premier temps, la synthèse du phényle mannoside GL, déjà décrite par D.Gueyrard *et al.* [75] au sein de notre équipe, a été reproduite, afin de pouvoir obtenir une quantité plus abondante de GL (environ 100 mg), nécessaire pour tous les tests biologiques.

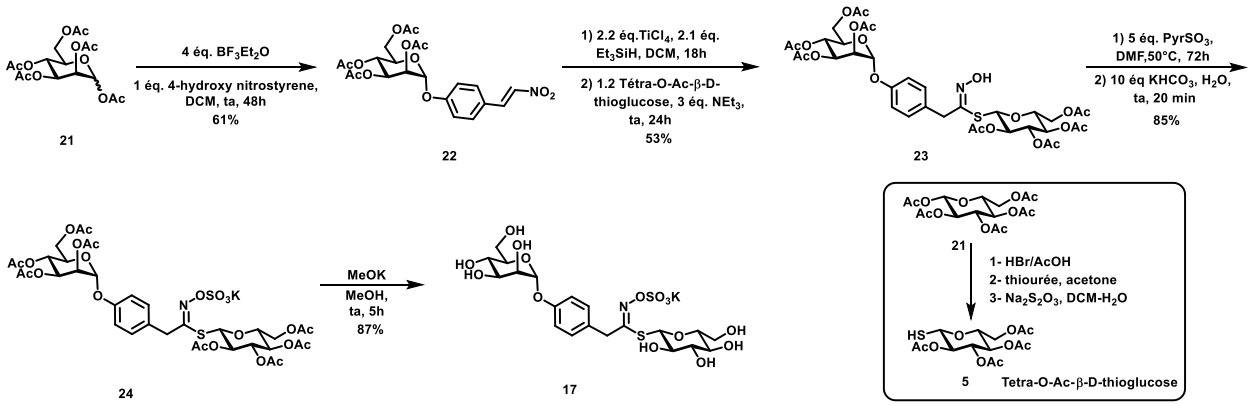


Schéma 12 : synthèse du GL phényl mannoside.

Grace à cette voie de synthèse il est possible d'obtenir le GL **17** en seulement 5 étapes (Schéma 12).
Le « thioglucose » utilisé est synthétisé en trois étapes en partant du glucopyranose peracétylé, via la formation de l'α-bromo glucopyranoside tétraacétylé, suivie de la formation d'un sel de thiouronium qui est hydrolysé en milieu réducteur avec du bisulfite de sodium.
En partant du mannose penta acétylé, une glycosylation en présence de 4-hydroxy nitrostyrène a permis d'obtenir le composé **22** avec un rendement correct de 61 %. Par la suite le couplage de Kulkarni permet d'obtenir le thiohydroximate **23**.
Une fois le thiohydroximate **23** obtenu, une sulfatation en présence de trioxyde de soufre pyridine dans le DMF suivie d'une désacétylation en présence de méthanolate de potassium permet d'obtenir le GL **17**. Le GL finale est purifié par colonne chromatographique phase inverse.

---

[73] T. Klein, D. Abgottspon, M. Wittwer, S. Rabbani, J. Herold, X. Jiang, S. Kleeb, C. Lüthi, M. Scharenberg, J. Bezençon, et al., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8627–8641.
[74] (a) Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, R. Obermann, W. Nolan, S. A. Wildman, D. Hobbs, T. Ellenberger, C. K. Cusumano, S. J. Hultgren, et al., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4779–4792. (b) Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, E. Chorell, J. M. Crowley, C. K. Cusumano, S. Campbell, J. P. Henderson, S. J. Hultgren, J. W. Janetka, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3945–3959.
[75] D. Gueyrard, R. Iori, A. Tatibouët, P. Rollin, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 3657–3664.

Lors de cette synthèse il a été possible d'incrémenter le rendement de la sulfatation d'environ 20% en comparaison des conditions décrites antérieurement. Ce résultat a pu être obtenu notamment en doublant les équivalents de $KHCO_3$ (de 5 à 10 éq.) nécessaire à l'hydrolyse du sel de pyridinium contre-cation de l'ion sulfate. En effet, si cette neutralisation n'est pas complète, il est possible que des traces du complexe pyridine trioxyde de soufre restent dans le milieu. En réagissant avec de l'eau, ces traces forment une quantité catalytique d'acide sulfurique, suffisante pour désulfater le produit de la réaction.
De plus, lorsque le $KHCO_3$ n'est pas en excès, il peut y avoir une hydrolyse incomplète du pyridinium de sulfate, thermiquement moins stable que le sel de potassium. Par conséquent le sel de pyridinium peut se dégrader facilement lorsque le mélange réactionnel est évaporé sous vide.

3. Les glucosinolates à « biphénylmannose »

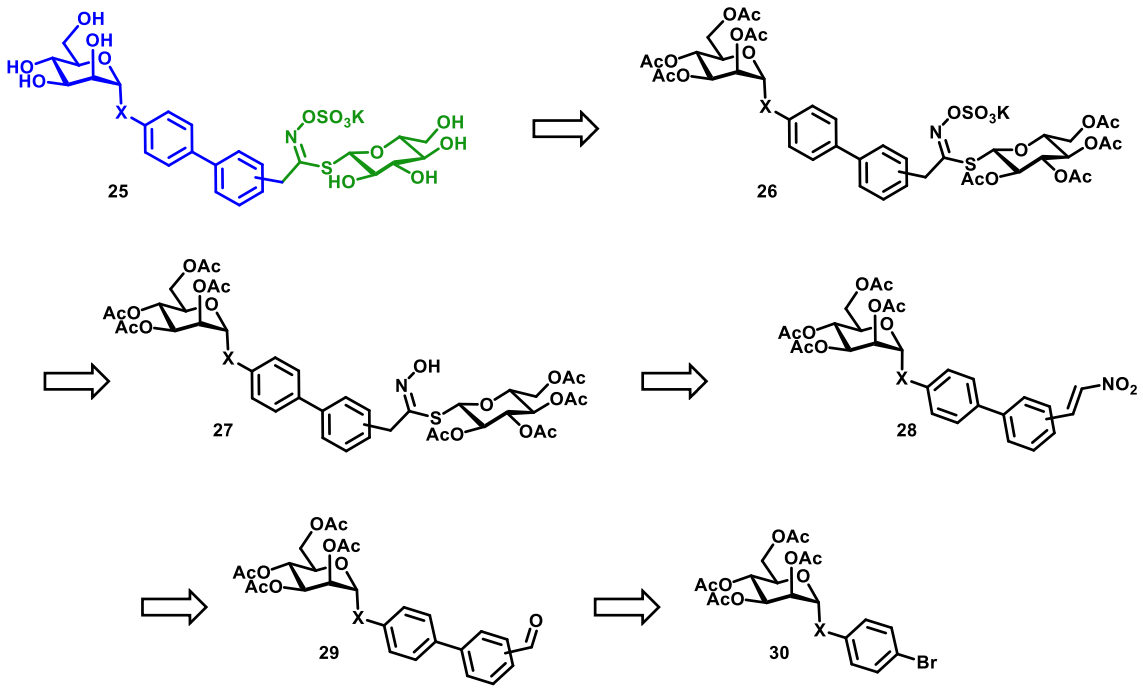
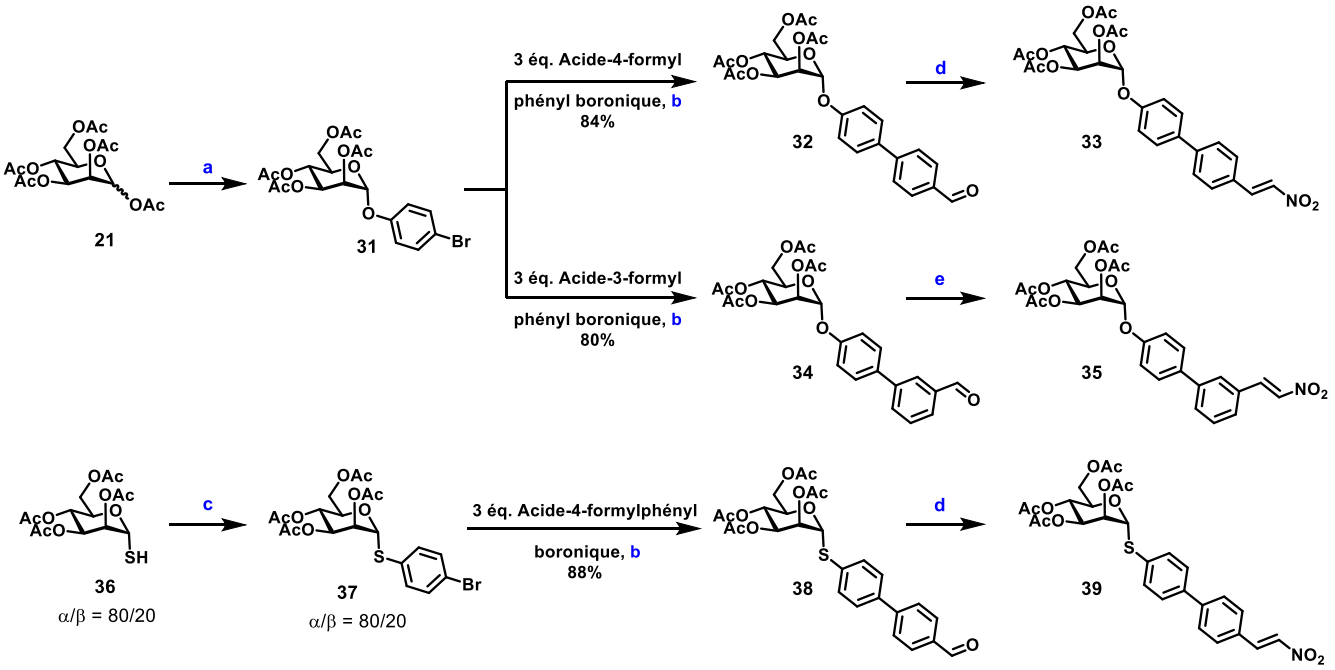


Schéma 13 : rétrosynthèse des glucosinolates biphényles.

Comme le Schéma 13 le montre, les GLs biphényl mannosides seront préparés par sulfatation et désacétylation des thiohydroximates intermédiaires (**27**).
Ces derniers sont obtenus à partir de thioglucose tetra acétylé et des composés nitrovinyles **28** dans les conditions de Kulkarni. La formation de la fonction nitrovinyle est faite à partir des aldéhydes **29**, par réaction de Henry.
La construction du motif biphényle aldéhyde est réalisé par couplage de Suzuki en partant du phényl mannoside **30**. Ce dernier est obtenu par glycosylation entre le mannose penta acétate et le bromophényle. Le thiophényl mannose a été obtenu par couplage pallado-catalysé entre le thiomannose tétra acétylé et le *para* bromo iodo phénol.

L'obtention des précurseurs nitrovinyles

En partant du mannopyranose peracétylé, une glycosylation a permis l'introduction de la fonction bromophényle, grâce à laquelle il a été possible de reproduire des couplages palladocatalysés de type Suzuki-Miyaura.



a : 1.5 éq.4-Bromophénol, 3 éq. $BF_3{\cdot}Et_2O$, DCM, reflux, **68%; b :** 0.1 éq $Pd(PPh_3)_4$, 3 éq. Cs_2CO_3, diox.-H_2O, 1h15, 80°C;
c : 3 éq. 1-bromo-4-iodobenzène 0.05 éq.$Pd(OAc)_2$, 0.025 éq. xantphos, 1 éq. Et_3N-dioxane, 1 h, 100 °C**, 87 %;**
d : CH_3NO_2, 1.1 éq. NH_4OAc, reflux, 2 h, **quant.; e :** CH_3NO_2, 1.1 éq. NH_4OAc, 50 °C, 24h, **72%**

Schéma 14 : synthèse des précurseurs nitrovinyles.

En reprenant les conditions décrites par Han *et al.* ,[74a] un faible rendement de 50% a été obtenu, lors du couplage avec l'acide 4-formylphenyle boronique, cela est probablement dû à la nature peu réactive du dérivé boronique de type aldéhyde, électroniquement désactivé par effet mésomère attracteur du groupement carbonyle. Différentes conditions ont été testée afin d'améliorer la conversion de la réaction, notamment en changeant la nature du solvant, la température et la durée de la réaction, cependant aucun effet positif n'a été observé (Tableau 2).

En effet lorsque on dépasse les 1h15 de réaction, les conditions basiques et aqueuses causent une dégradation du mannoside de départ et du biphénylmannoside formé. Cependant en utilisant 3 équivalents de base et d'acide boronique, il a été possible de réaliser ce couplage de Suzuki avec des rendements reproductibles de 85% jusqu'à l'échelle de 4 grammes de mannoside.

Tableau 2 : optimisation du couplage de Suzuki.

Entrée	Solvant	Durée	Eq. de boronique	Température	Rendement
1	Dioxane (anhydre)	3h30	1,5	ta	0%
2	THF	3h30	1.5	ta	0%
3	Dioxane (anhydre)	1h15	1.5	50 °C	50%
4[a]	Dioxane/H_2O (84/16)	2h	1.5	80 °C	52%
5	Dioxane (anhydre)	1h15	1.5	80 °C	50%
6	Dioxane (anhydre)	24h	1.5	80 °C	52%
7	Dioxane/H_2O (84/16)	1h15	3	80°C	84%

(a) conditions employées par Han et al.[74]

Avec ces conditions optimisées, le dérivé substitué en méta **34** a été synthétisé avec d'aussi bons rendements.

Plutôt que par glycosydation du mannose penta acétate avec le 4-bromo thiophénol, le mannoside **37** a été synthétisé en utilisant une méthode décrite par par Messaoudi *et al.*,[76] permettant d'obtenir une large gamme de thioglucosides.

Pour ce faire le thiomannose tetra acétate **36** a tout d'abord été synthétisé en trois étapes (pareillement au thioglucose). Cette procédure conduit à un mélange α/β 80/20 qui est difficile à séparer.
Par la suite une arylation en présence de 4-iodo bromo benzène, palladium acétate-Xantphos et triéthyl amine a permis l'obtention du mannoside **37**, avec un rendement de 87% sans épimérisation de la position anomérique.
Par la suite le couplage de Suzuki permet d'obtenir l'aldéhyde **38** avec un rendement de 88% comparable à la synthèse de l'analogue oxygéné.

Afin d'unifier les deux premières étapes pallado-catalysées, un double couplage one-pot séquentielle au palladium a été expérimenté.

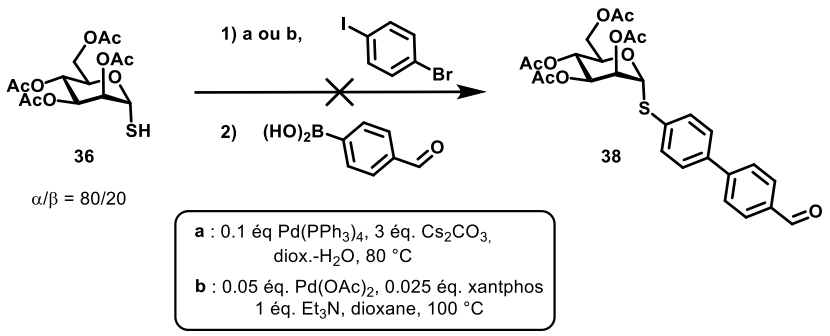


Schéma 15 : double couplage pallado-catalysé one pot.

Plusieurs conditions ont été testées en se basant sur le système catalytique décrit par Messaoudi *et al.*, et ensuite en s'inspirant de la réaction de Suzuki (Schéma 15). Au cours de ces essais seulement des traces de biphényle mannoside **38** ont été formées.

[76] A. Bruneau, M. Roche, A. Hamze, J.-D. Brion, M. Alami, S. Messaoudi, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 8375–8379.

L'obtention des produits voulus a pu être confirmée facilement par RMN ^{1}H, cela grâce aux pics caractéristiques du système biphényle para ou méta substitué et de l'aldéhyde.

Une fois les aldéhydes **32**, **34** et **38** obtenues, il a été possible de synthétiser les précurseurs nitrovinyles, en utilisant une version plus douce de la réaction de Henry-Lappin, [77] dans le nitrométhane au lieu de l'AcOH comme solvant. [75]
Dans un premier temps l'addition du nitrométhane sur l'aldéhyde est réalisé, ensuite une beta élimination permet la formation de la double liaison conjuguée avec le système aromatique. Les composés **33** et **35**, ont ainsi été obtenus avec un chauffage à 100°C avec d'excellents rendements, le brut réactionnel est d'une pureté suffisante pour poursuivre les différentes étapes.
Dans le cas du dérivé méta **35**, les mêmes conditions réactionnelles ont conduit au produit **40**. Ce résultat est probablement dû à une moins forte conjugaison de la double liaison en position méta et donc à une plus faible stabilité du dérivé nitrovinyle. Le produit issu d'une deuxième addition 1-4 du nitrométhane a été observé par spectrométrie de masse (Schéma 16).

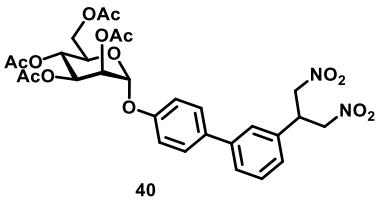


Schéma 16 : sous-produit de la réaction d'Henry.

Pour ce substrat il a fallu diminuer le chauffage à 50°C (plutôt que 100°C) et également augmenter la durée de la réaction jusqu'à 20h afin d'obtenir le produit désiré **35** avec un rendement de 70%.

La fonction nitrovinyle est facilement caractérisable par la RMN du proton, surtout en comparant avec l'aldéhyde de départ. En effet il est possible d'observer la disparition du pic du proton de l'aldéhyde à environ 10 ppm, au profit de l'apparition du système éthylénique à environ 7 ppm.

[77] C. B. Gairaud, G. R. Lappin, *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 1–3.

L'obtention des GLs

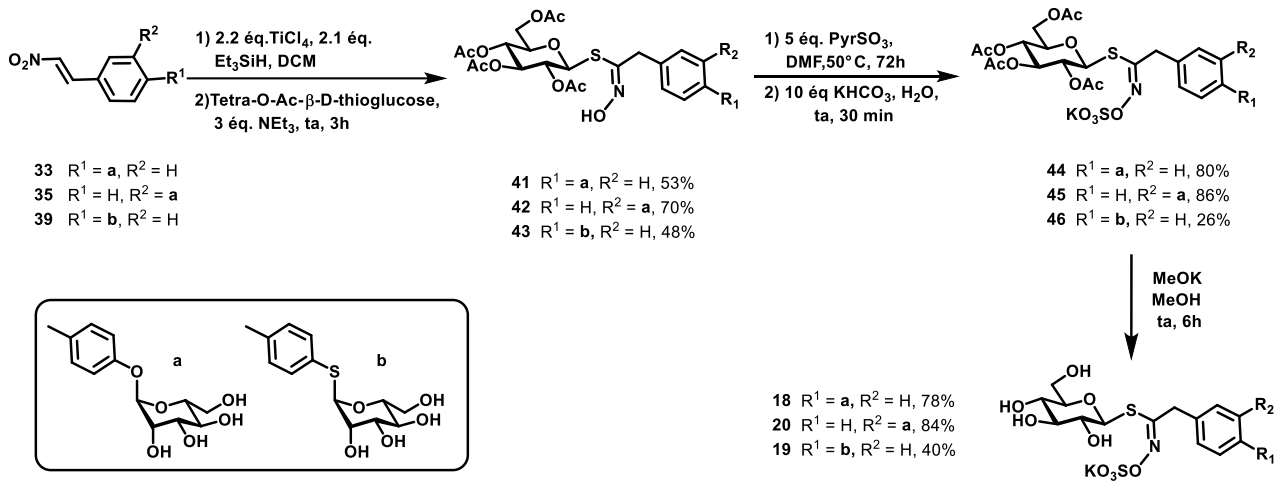


Schéma 17 : synthèse des glucosinolates à partir des dérivés nitrovinyles.

Comme dans le cas du composé phényl mannoside, les conditions du couplage de Kulkarni appliquées aux *para*-biphényl mannoside **33** et thiomannoside **39** ont conduit à un rendement moyen d'environ 50%.
Ce rendement moyen est probablement dû à une dégradation du produit de départ lors de la première étape du couplage de Kulkarni, en raison de l'utilisation d'un acide de Lewis fort.
Afin d'éviter ce phénomène, dans le cas du *méta*-biphényl mannoside **35**, les conditions utilisées ont été modifiées. L'addition du tétrachlorure de titane ($TiCl_4$) se fait à -15°C et la durée de la réaction de formation du chlorure d'hydroximoyle est réduite de 18h à 2h. Ces conditions ont permis d'augmenter le rendement à 70%. Néanmoins, cette réaction peut poser des problèmes de reproductivité en fonction de la qualité des réactifs et des solvants, et de la quantité à laquelle la réaction est conduite.

Les thiohydroximates **41** et **42** ont été sulfatés avec un complexe de trioxyde de soufre-pyridine en utilisant les conditions usuelles pour aboutir aux produits sulfatés **44** et **45** avec de bons rendements de 80% et 86% pour le dérivé *para* et *méta* respectivement.
Singulièrement, la sulfatation du substrat **43** a nécessité des temps réactionnels de 3 jours, sans amélioration d'un rendement médiocre de 26%.
La raison de ce comportement est probablement l'instabilité chimique de ce dérivé biphényl thiomannose, ce qui expliquerait une dégradation du composé au long de la réaction.
La sulfatation des thiohydroximates apporte un grand changement dans les propriétés de la molécule notamment en augmentant fortement la polarité et l'hydrophilie. Afin de pouvoir purifier ces produits, des mélanges de solvants tels qu'acétate d'éthyle-méthanol sont employés. Pour certaines structures même en utilisant ces mélanges très polaires, des grandes quantités de solvants sont nécessaires pour purifier plusieurs grammes de produit avec des colonnes en phase normale. Mis à part la RMN, ces molécules sulfatées sont facilement caractérisables par spectrométrie de masse (ESI). Plus précisément, en mode négatif il est possible de visualiser l'ion moléculaire chargé négativement dû à la perte du cation du sel de sulfate.

La dernière étape consiste dans la désacétylation des unités mannose et glucose, pour aboutir au glucosinolate. Cette réaction, inspirée des conditions de Zemplén, se fait en présence d'une quantité catalytique de méthanolate de potassium, suffisant à déprotéger tous les alcools de la molécule en quelques heures (4 à 5h). Dans le cas des glucosinolates, aucune neutralisation du méthanolate n'est réalisée avant de purifier le composé, cela afin d'éviter de perdre le sel de potassium suite à un éventuel échange de cation pendant la neutralisation. Cela peut expliquer des rendements légèrement plus faibles pour les composés **18** et **20** comparés aux autres protocoles ou le méthanolate est neutralisé. Cette différence est plus marquée pour le dérivé thiomannose **19**.

Afin d'obtenir les produits avec un excellent niveau de pureté, des analyses chromatographiques en phase inverse C-18 sont réalisées. Ce type de séparation permet d'éliminer tous les sous-produits organiques, mais aussi les traces de sels inorganiques utilisés lors des étapes précédentes, tels que le sulfate de potassium. Cela est une étape importante car la présence de ces sels, pourrait gêner le bon déroulement des études cinétiques et biologiques menés sur les composés.
Grâce à cette approche il a été possible d'obtenir rapidement de grandes quantités de GLs, environ 100 mg pour le dérivé soufré **19** environ 200 mg pour le dérivé *para* **18** et jusqu'à 700 mg pour le dérivé *méta* **20** avec d'excellentes puretés mesurées par RMN et HPLC.

En conclusion, la synthèse de ces substrats non naturels avec la méthode de Kulkarni a permis d'explorer cette approche sur ces dérivés biphényls mannosides jamais étudiés auparavant. Aussi, grâce à ce travail il a été possible de mettre au point des conditions permettant de préparer des quantités de glucosinolates dépassant les 100 mg, une quantité classiquement obtenus en littérature.

III. Synthèse d'entités GLs à fonctions réactives

Parallèlement à la synthèse des GLs décrits précédemment, une seconde famille de GL comportant une deuxième fonction réactive a été conçu.

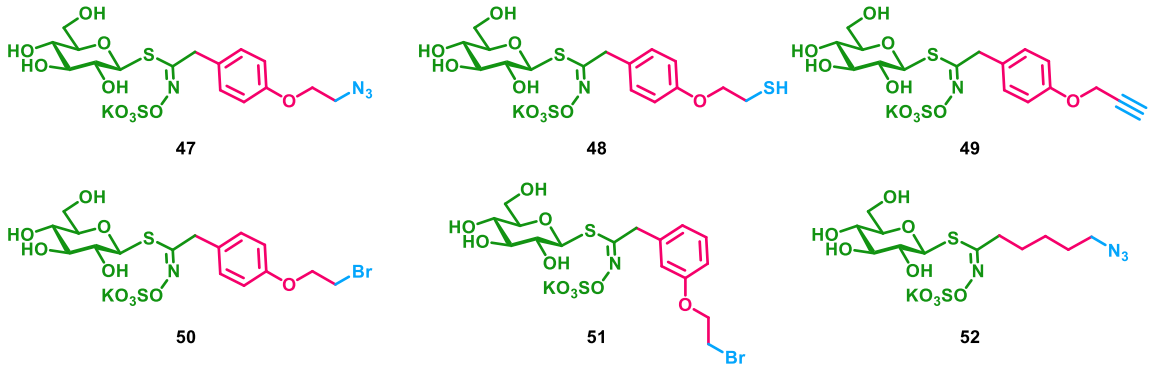


Schéma 18: glucosinolates bifonctionels.

Ce type de GLs porte des fonctions classiques dans les réactions de couplage et de bioconjugaison, comme un groupe alcynyle, azido ou thiol qui se prêtent notamment à des réactions click, ou un groupement brome sur lequel il est possible d'effectuer des réactions de substitution nucléophile.

Grâce à ces fonctionnalités orthogonales, ces GLs pourraient être employés pour la synthèse de structures moléculaires plus complexes, mais aussi pour de la bioconjugaison avec des protéines.

Pour préparer ces glucosinolates, plusieurs stratégies de synthèse ont été mise en œuvre, en s'appuyant sur les approches de Kulkarni et celle par l'aldoxime. Chaque approche a été étudiée selon deux stratégies de synthèse divergente et linéaire.

1. Stratégie divergente :

En appliquant cette stratégie (Schéma 19) il serait possible d'obtenir un intermédiaire clé de type thiohydroximate phénol (**54**). Grace à cette espèce il serait possible d'alkyler sélectivement ce phénol avec différents électrophiles, en obtenant ainsi une diversification structurale rapide, en partant d'un seul intermédiaire de synthèse. L'utilisation d'un groupement protecteur est nécessaire afin de pouvoir obtenir la molécule **53**.

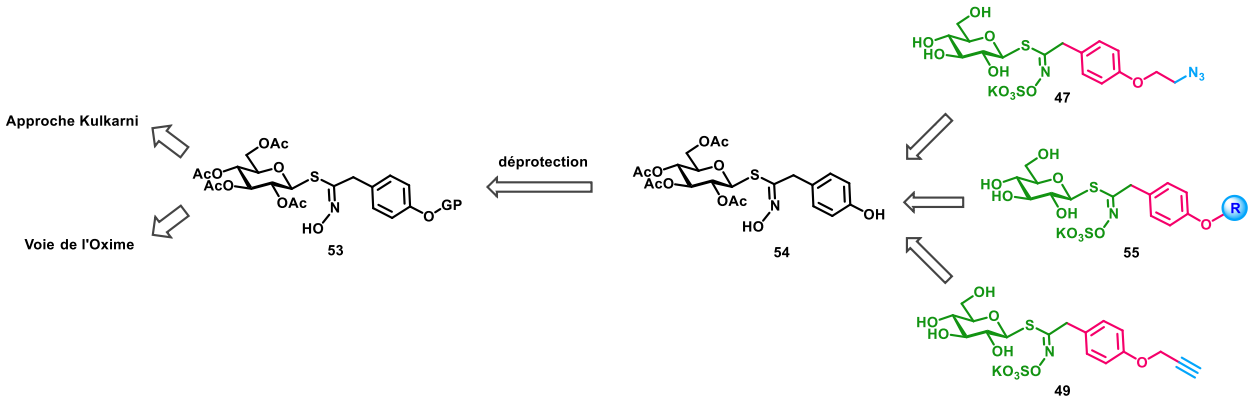


Schéma 19 : schéma de retrosynthese de la stratégie divergente.

a. L'approche de Kulkarni

La première difficulté rencontrée dans cette suite réactionnelle est le choix du groupement protecteur du phénol qui doit être à la fois stable aux conditions de Kulkarni, mais aussi orthogonal aux groupements acétyles du glucose. En respectant ces critères, le groupe tert-butyle diméthyle silyle (TBS) et le groupement benzyle ont été explorés, cependant aucun des deux ne nous a permis d'obtenir le thiohydroximate attendu lors de l'application des conditions de Kulkarni pour le couplage avec le thioglucose.

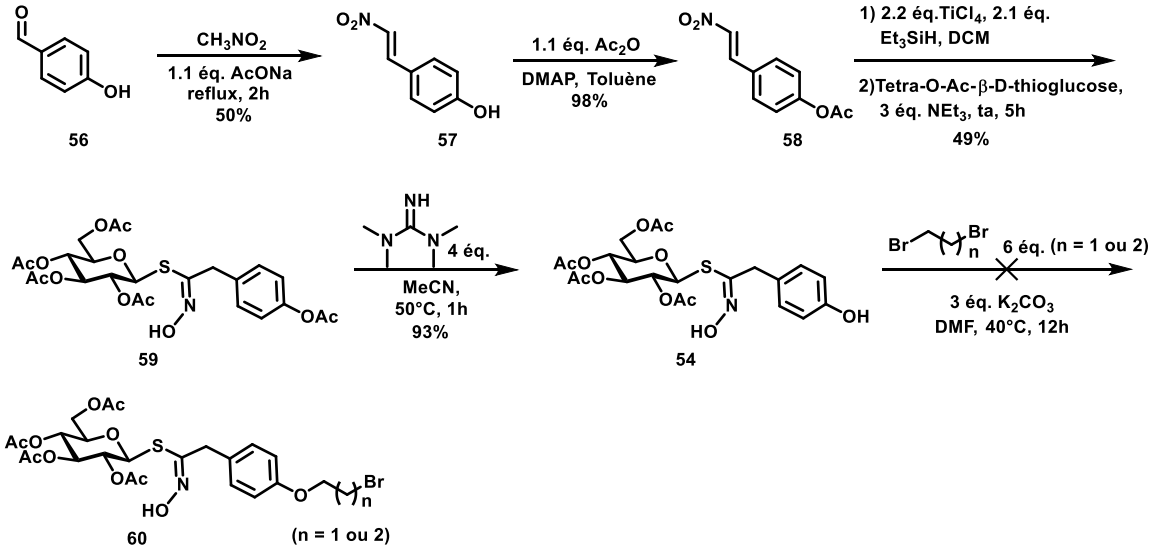


Schéma 20 : stratégie divergente ; approche Kulkarni.

Le groupe acétate a alors été utilisé (Schéma 20). Cette protection sur le phénol [78] a été suffisamment résistante lors du couplage avec le thioglucose, dans les conditions de Kulkarni pour conduire au thiohydroximate **59** avec 49% de rendement. La déprotection sélective a été réalisée de manière efficace en utilisant le tetraméthyl guanidinium et conduit au phénol **54** avec un très bon rendement de 93%. [79]
Les essais d'alkylation sélective du phénol en présence de 1,2-dibromo éthane et du 1,3-dibromo propane n'ont pas mené au résultat espéré. En effet plusieurs produits d'alkylation ont été formés (température ambiante ou à 40 °C), cela avec une conversion très faible du phénol de départ.

b. La voie de l'oxime

Parallèlement à la voie de Kulkarni, la stratégie divergente a été explorée en utilisant l'approche par l'aldoxime.

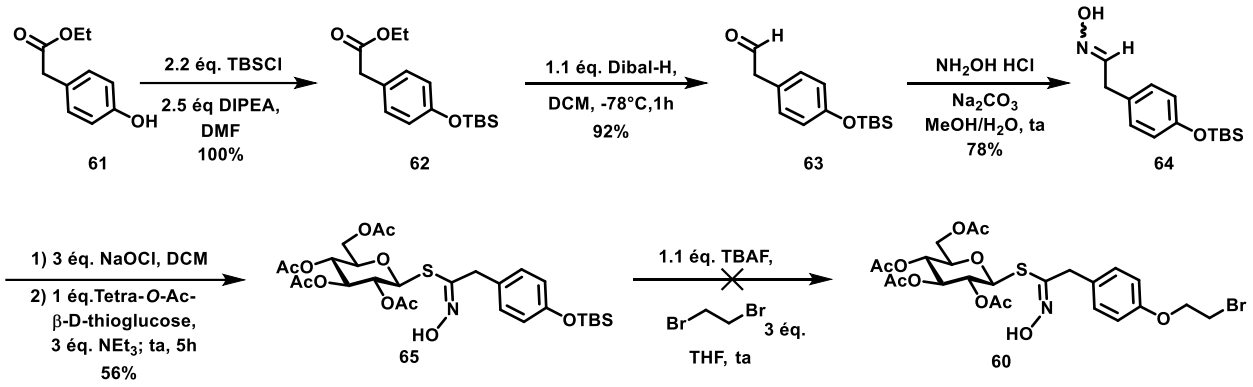


Schéma 21 : stratégie divergente ; voie de l'aldoxime.

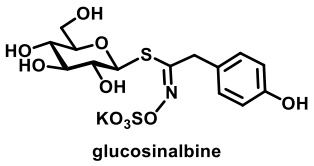
Dans ce cas, le TBS a été rapidement identifié comme étant le meilleur groupement protecteur adapté aux conditions oxydantes de la voie de l'oxime. En partant de l'éthyl-(4-hydroxiphényl) acétate commerciale **61** il est possible obtenir le composé protégé avec un rendement quantitatif. [80] Ensuite la réduction de l'ester en aldéhyde [81] et la formation de l'oxime [71] se font avec de bon rendement de 92% et 78% respectivement. Le couplage avec le thioglucose se fait avec un rendement correct de 56%. Après l'échec de l'alkylation réalisé dans la synthèse précédente, dans ce cas une déprotection-alkylation one pot a été essayé. De cette façon le phénolate intermédiaire peut directement réagir avec le dibromo éthane.
Bien que la déprotection avec le fluorure de tétra *n*-butylammonium (TBAF) se fait avec une conversion totale, [82] aucune alkylation n'a été observée.

---

[78] Z. Liu, Q. Ma, Y. Liu, Q. Wang, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 236–239.
[79] K. Oyama, T. Kondo, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 209–212.
[80] K. Tadpetch, *Phytochem. Lett.* **2015**, *v. 11*, 5–110.
[81] M.-Y. Huang, L. Chen, R. Li, X. Jia, R. Hong, *Chin. J. Chem.* **2014**, *32*, 715–720.
[82] J. Hoshino, E.-J. Park, T. P. Kondratyuk, L. Marler, J. M. Pezzuto, R. B. van Breemen, S. Mo, Y. Li, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5033–5043.

L'impossibilité d'alkyler le phénol est due principalement à la présence de l'hydroxyle du thiohydroximate qui entre en compétition avec le phénol.

Bien que cette approche ne soit pas concluante, les intermédiaires **59** et **65** sont de bons précurseurs de la glucosinalbine (Schéma 22).



glucosinalbine

66

Schéma 22 : glucosinolate naturel glucosinalbine.

2. Les stratégies linéaires :

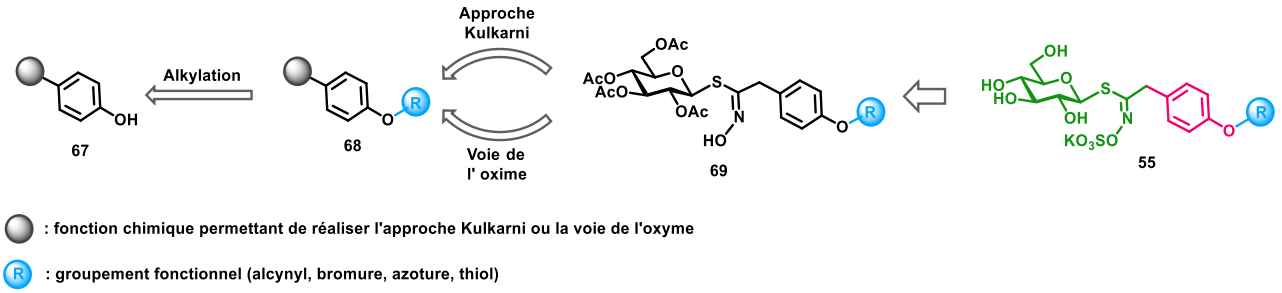


Schéma 23 : stratégie linéaire

Pour faire face à la difficulté de l'étape d'alkylation, mais aussi aux deux étapes supplémentaires de protection et déprotection du phénol, une alkylation préalable d'un intermédiaire a été envisagé. Bien évidemment cette approche de synthèse linéaire limite, en quelque sorte, une rapide diversification moléculaire de la série de GLs en partant du même intermédiaire de synthèse. Les deux approches de synthèse, conditions de Kulkarni sur un nitrovinyle et oxydation d'un aldoxime, ont également été explorées pour aboutir à la fonction thiohydroximate intermédiaire.

a. La voie de Kulkarni

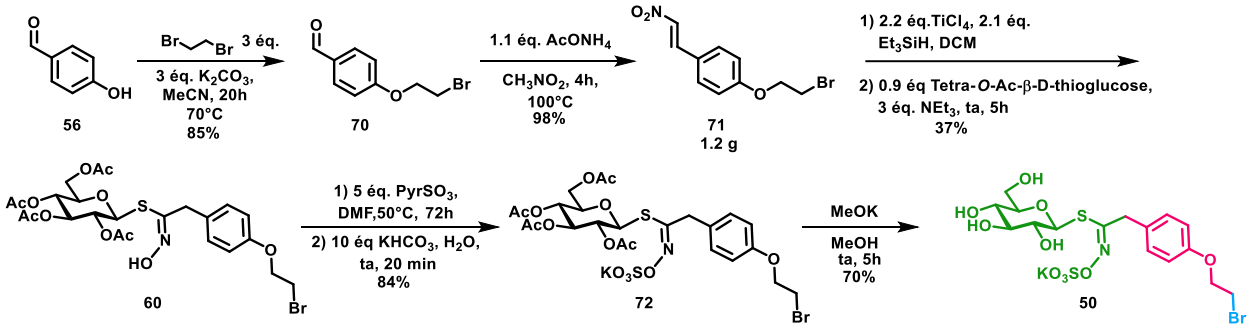


Schéma 24 : stratégie linéaire ; approche Kulkarni

L'alkylation du phénol **56** a permis d'obtenir l'aldéhyde **70** avec des rendements compris entre 50% et 85%, ensuite en appliquant la réaction d'Henry la fonction nitrovinyle (**71**) a été obtenue avec un excellent rendement de 98%.

Le couplage de Kulkarni réalisé avec 1.2 g de dérivé nitrovinyles donne le thiohydroximate **60** avec un rendement faible de 37%. Par la suite les étapes de sulfatation et de désacétylation se déroulent avec des bons rendements.

En optimisant la réaction de Kulkarni pour l'analogue *méta* **73** un rendement de 90% a été constaté, lorsque les quantités de produits engagés ne dépassent pas le gramme.

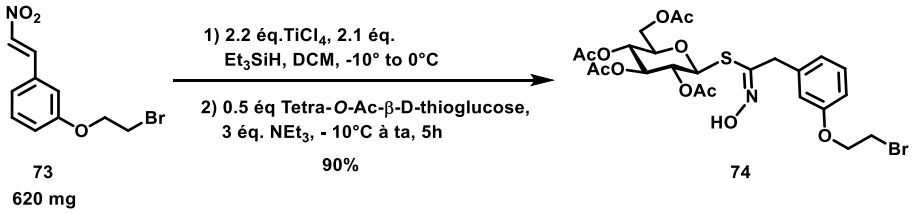


*Schéma 25 : couplage de Kulkarni du dérivé méta-nitrovinyle **73**.*

En reproduisant ce couplage pour les différents GLs, il a été remarqué que la réaction de Kulkarni est très « substrat dépendant ». En effet, en utilisant des nitrovinyles substitués en position méta, la réaction se fait avec de meilleures conversions, aussi dans le cas du biphényl mannoside GLs *méta* substitué **20**.

De plus, les températures d'ajouts des réactifs jouent un rôle fondamental dans le bon déroulement de ce couplage. Notamment, des additions faites entre -15 et -10°C aident à préserver les intermédiaires réactionnels, et assurer un meilleur taux de conversion.

b. La voie de l'oxime

Cette approche linéaire a aussi donné un résultat positif en passant par la voie de l'oxime.

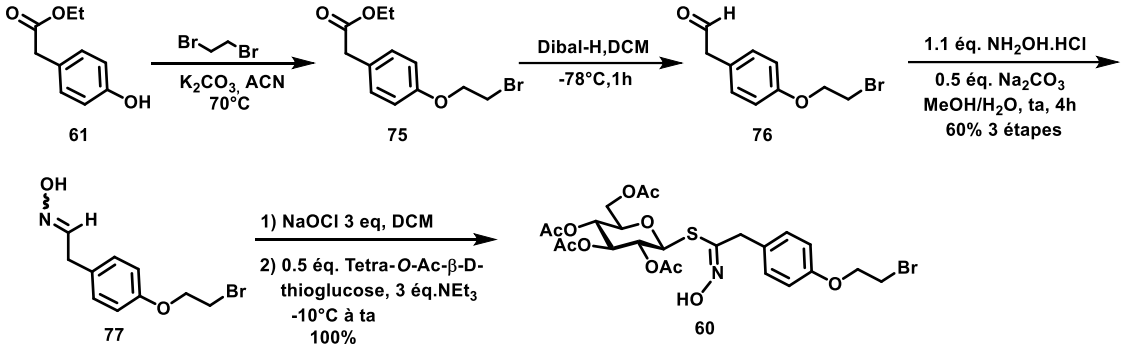


*Schéma 26 : stratégie linéaire, synthèse du thiohydroximate **60** ; voie de l'oxime.*

En testant cette approche, il a été possible d'obtenir avec de bons rendements les glucosinolates désirés (Schéma 26).
Les trois premières étapes conduisant à l'aldoxime **77**, ont été optimisées afin d'améliorer les conversions des réactions et d'éviter les purifications par colonne chromatographique. Cela permet de produire rapidement jusqu'à 7g d'oxime.
Pour le couplage avec le thioglucose, le nombre d'équivalents d'oxime joue un rôle important car l'oxyde de nitrile peut facilement conduire à plusieurs sous-produits de cycloaddition. De ce fait, en augmentant les quantités d'oxime jusqu'à 2 équivalents par rapport au thioglucose il a été possible d'atteindre un rendement quantitatif. De plus, le thiohydroximate **60**, peut être purifié par une simple trituration dans le méthanol à chaud.

Par la suite, la substitution nucléophile du dérivé bromé permet d'accéder à différentes fonctionnalités telle que l'azide et le thiol (Schéma 27). L'introduction de la fonction azoture à permis d'obtenir le composé **79** avec un bon rendement de 100%.
Contrairement à l'azoture, la substitution nucléophile avec le thioacétate de potassium doit impérativement se faire à température ambiante afin d'éviter des dégradations. Cette réaction se fait avec une conversion moyenne, ce qui comporte une purification par colonne chromatographique très difficile (réalisé avec un mélange toluène-acétone), indispensable à séparer le réactif de départ du composé **78.**

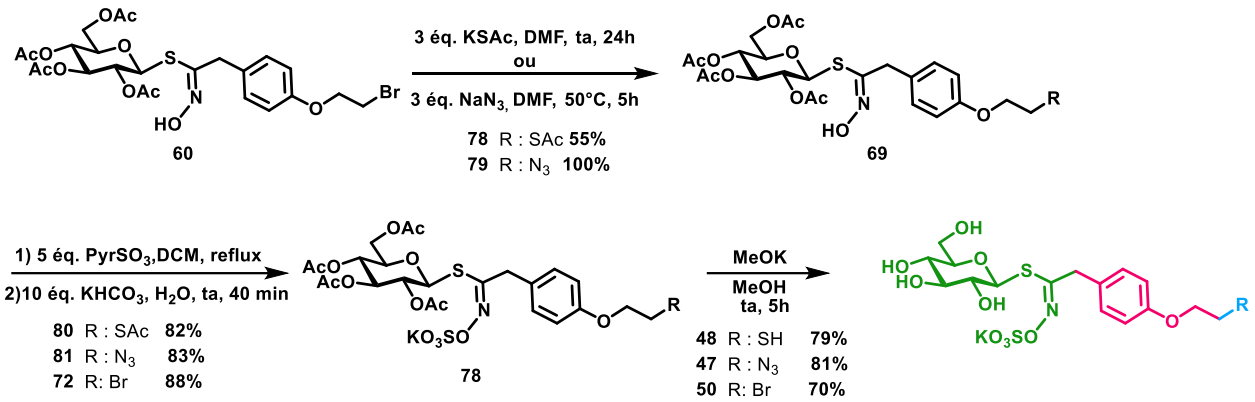


*Schéma 27 : stratégie linéaire, synthèse des GLs **47**, **48** et **50**.*

Un travail d'amélioration de la réaction de sulfatation a été réalisé afin de permettre une réaction plus rapide conduisant à de meilleurs rendements.
Des tentatives d'accélération de la cinétique de sulfatation de l'hydroxyle ont été réalisées en activant la réaction par chauffage aux microondes, ainsi qu'en changeant la nature du complexe de trioxyde de soufre utilisé ($NEt_3{\cdot}SO_3$, $NMe_3{\cdot}SO_3$). Malgré cela, les conditions les plus fiables restent le chauffage thermique, en utilisant le complexe classique avec la pyridine.
Nous avons constaté qu'en utilisant le dichlorométhane plutôt que le DMF, des cinétiques légèrement plus rapides ont été obtenues, et surtout la dégradation du produit sulfaté dû à l'évaporation du DMF sont évités. Cela apporte une grande amélioration du rendement et du temps nécessaire au traitement de la réaction, encore plus, lorsque la sulfatation est réalisée sur des quantités de produit de départ plus importantes (environ 6 g).

Bien qu'il ait été possible d'identifier des conditions améliorées pour la sulfatation, une cinétique plus lente a été observée pour le thiohydroximate thioacétate **80**. Afin d'obtenir un bon rendement de 80% la réaction nécessite une durée de 3 jours alors que les autres analogues donnent un rendement similaire en 18h.

Pour ce qui concerne le GLs alcyne, la première alkylation a été réalisée avec du bromure de propargyle, par la suite, toutes les autres étapes ont été réalisées dans les mêmes conditions utilisées préalablement.

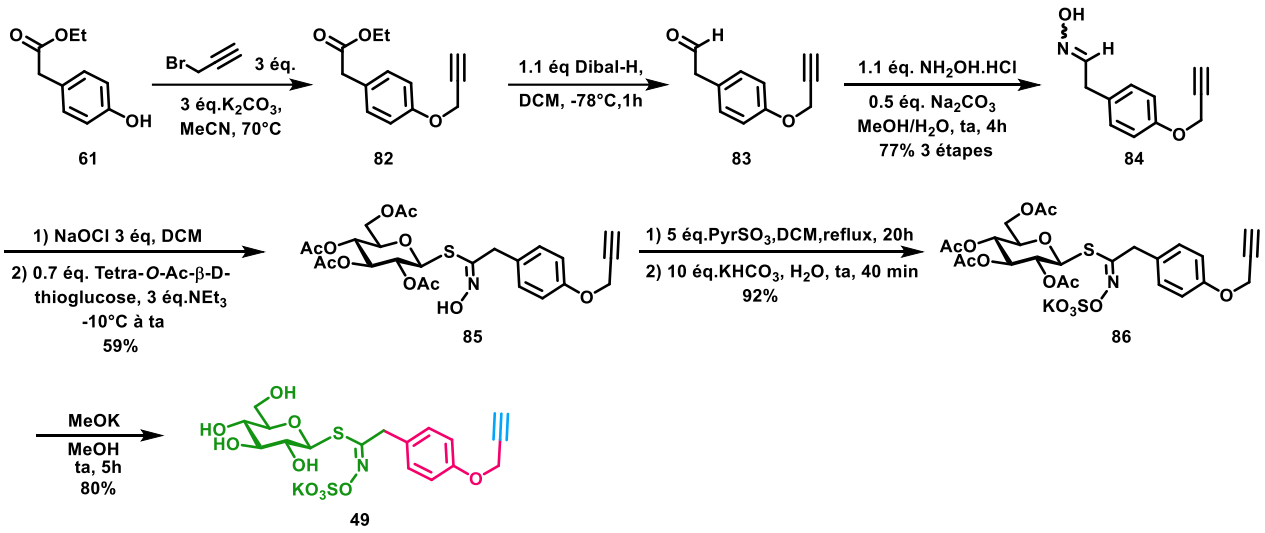


Schéma 28 : synthèse du glucosinolate alcyne.

Tout au long de cette voie de synthèse de bons rendements ont été constatés, notamment pour l'étape de sulfatation réalisée avec 92% de rendement.

Dans le cadre de ce travail, à l'exception du dérivé méta bromé, tous les autres GLs ont été obtenus en utilisant la voie de l'oxime.

La voie de l'oxime a été préférée à l'approche Kulkarni pour plusieurs raisons. Tout d'abord, d'un point de vue pratique le couplage de l'oxime est une réaction plus facile à mettre en œuvre par rapport à la réaction de Kulkarni. Cela est encore plus évident lorsque les quantités de réactifs engagées dans ces réactions dépassent les 5 g.
De plus les couplages de l'oxime ont globalement donné de meilleurs résultats et une très bonne reproductibilité par rapport à la réaction de Kulkarni. Cette réaction en effet est substrat dépendant et n'est pas bien exploitable pour des réactions à grand échelle.

En conclusion, grâce à ce travail il a été possible d'identifier la meilleure approche permettant d'accéder pour la première fois à des glucosinolates possédant des fonctions intéressantes pour leur réactivité en bioconjugaison et chimie click.

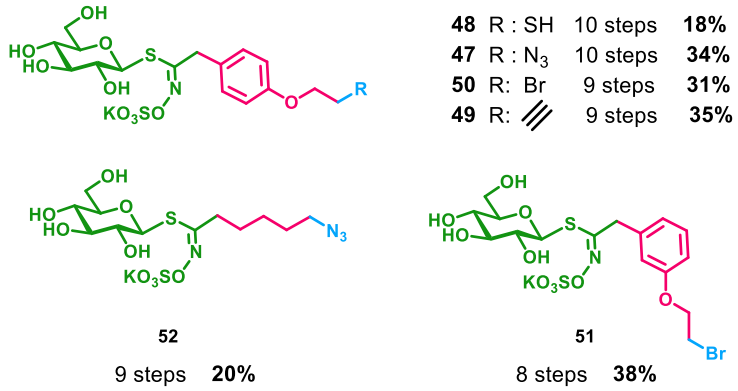


Schéma 29 : rendements globaux.

Il est possible de choisir une des deux approches en fonctions de l'accessibilité des produits de départ, et la quantité de glucosinolate désirée avec de bons rendements globaux, en tenant compte aussi la synthèse du thioglucose (Schéma 29).

IV. La réactivité des GLs à fonctions réactives : orthogonalité et compatibilité

Des tests de réactivité des glucosinolates orthogonaux ont été réalisés afin d'étudier la compatibilité de la fonction glucosinolate vis-à-vis de réactions classiques en chimie click, mais aussi des réactions simples qui peuvent être réalisées sur la chaine latérale du glucosinolate.

L'importance de cette étude est que jusqu'à présent, aucun glucosinolate possédant des fonctions orthogonales n'a été synthétisé ni impliqué dans ce type de réactions. De ce fait, aucune donnée n'est présente dans la littérature. De plus, le choix des conditions réactionnelles est difficile à cause de la polarité exacerbée de ces dérivés, par la présence de 4 groupements hydroxyles libres, et de la fonction thiohydroximate sulfatée. Dans cette partie, différentes réactivités seront abordées, selon la famille de réaction (Click : CuAAC, SPAAC…), ou selon la fonction portée par le glucosinolate (GL bromé et GL azido).

1. La chimie Click

La chimie Click est un regroupement de transformations chimiques caractérisée par plusieurs qualités : la modularité, l'application à une grande diversité moléculaire, d'excellentes conversions, notamment dues à une importante baisse de l'enthalpie de réactions souvent exothermiques, des réactifs faciles à éliminer et à manipuler.

Selon cette classification réalisée par K.B. Sharpless et collaborateurs, [83] de nombreuses réactions font partie de cette famille : les cycloadditions 1, 3 dipolaires et Diels-Alder, substitutions nucléophiles menant à l'ouverture d'époxydes ou d'aziridines, la formation de thiourée, urée, amides etc...
Généralement le terme Click sous-entend une réaction chimioselective qui se fait avec une bonne conversion, réalisable en milieux aqueux, sur des substrats complexes, et en présence d'autres fonctions chimiques non protégées.
Connaissant l'intérêt de ces réactions dans de nombreux domaines comme la chemobiologie, nous avons abordé l'étude des fonctions alcyne et azide portés par les glucosinolates précédemment préparés.

[83] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.

a. Les « Copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions »

La cycloaddition catalysée par le cuivre (CuAAC) représente une des réactions fondamentales de la chimie click, elle est très utilisée dans le domaine de la bioconjugaison, car elle est une méthode fiable pour connecter des biomolécules entre elles. [84] Ce type de réaction a aussi trouvé un grand développement en chimie médicinale car elle permet d'obtenir une grande diversification structurale en partant d'un simple « scaffold » moléculaire. [85]
En utilisant les glucosinolates alcynyl (**49**) et azido (**47**), des premiers tests de CuAAC ont été réalisés en utilisant des partenaire modèles, du sulfate de cuivre II comme catalyseur et en présence d'ascorbate de sodium (AscNa) dans l'eau (Schéma 30).

Afin de déterminer les meilleures conditions avec le glucosinolate **49**, différents essais ont été réalisés. Des mélanges binaires et ternaires de solvants organiques ont été employés pour favoriser la solubilisation du second partenaire de la réaction. Différentes températures aillant jusqu'à 50°C ont été testées. Cependant, aucune de ces modifications n'ont permis d'aboutir aux produits désirés.

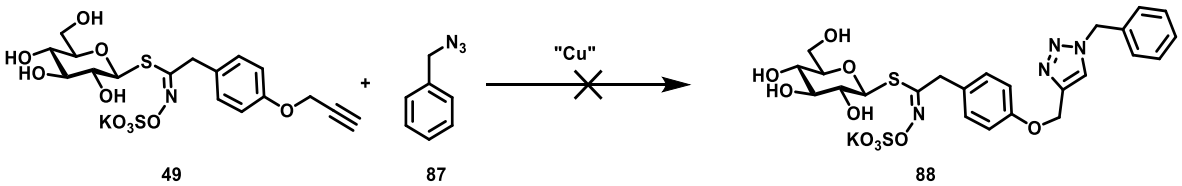


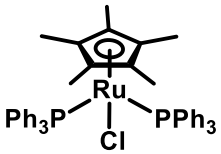
Schéma 30 : test de CuAAC.

[84] C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075–1101.
[85] G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278–308.

Tableau 3 : optimisation des cycloadditions azido-alcyne.

Entrée	Catalyse	Solvant	Température	Durée	Résultat
1	$Cu(OAc)_2$- AscNa	H_2O	ta	24h	dégradation
2	$Cu(OAc)_2$- AscNa	H_2O	40°C	24h	
3	$Cu(OAc)_2$- AscNa	*t*BuOH-DMSO-H_2O (4-2-1)	40°C	24h	
4	$CuSO_4$-AscNa	DMF-H_2O (1-1)	50°C	24h	
5	CuI-NEt_3	DMF-H_2O (1-1)	50°C	24h	
6	Cp*RuCl(PPh_3)$_2$[a]	*t*BuOH-H_2O (2-1)	50°C	24h	
7	-	*t*BuOH-DMSO-H_2O (4-2-1)	50°C	24h	Aucune réaction
8	-	DMF-H_2O (1-1)	50°C	24h	
9	-	*t*BuOH-DMSO-H_2O (4-2-1)	110°C MO	15 min	

[a] Cp*RuCl(PPh_3)$_2$:



Le ruthénium a alors été testé, ce métal, à la différence du cuivre aurait donné le produit de cycloaddition 1-5, [86] cependant une même dégradation a été observée.

En excluant toute présence de métal, la cycloaddition de Huisgen a été essayée à 50°C par chauffage classique pendant un jour et à 110°C par chauffage aux microondes pendant des créneaux de 15 min. En utilisant ces conditions, aucune transformation n'est observée.

En effet pendant ces essais, il a été constaté que suite à la cycloaddition, une dégradation de la partie glycosidique se produit. Cette réaction secondaire est due à la présence du cuivre, lequel active la fonction thiohydroximate sulfatée, et permet un réarrangement capable d'éliminer le glucose, le sulfate et de former un nitrile (**89**). La formation de ce sous-produit a été confirmé par RMN du proton et par spectrométrie de masse (ESI^+ ; $[M+H]^+$ = 305.11)

[86] B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.

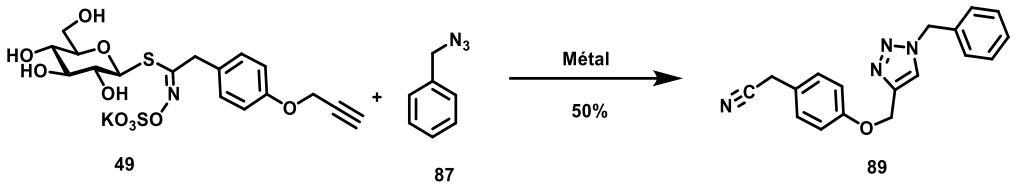


Schéma 31 : formation de la fonction nitrile.

Suite à l'identification de ce sous-produit il a été jugé important de réduire les durées réactionnelles afin d'empêcher cette réaction secondaire qui a lieu lorsque les réactions durent 24h.

La CuAAC entre les deux GLs a été essayée afin d'avoir deux produits parfaitement solubles dans un milieu aqueux. Cependant, malgré des durées de réaction plus courtes (2h, 4h, et 6h) le produit attendu n'a pas été observé et detecté par spectrometrie de masse.

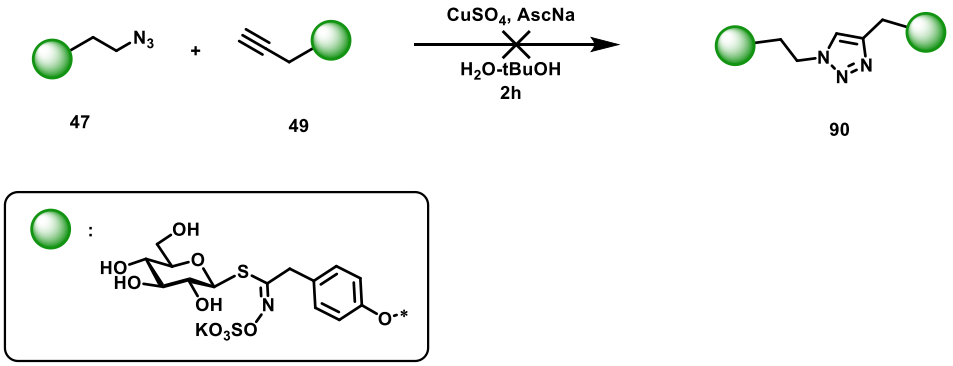


Schéma 32 : réaction de cycloaddition entre deux GLs.

Le même suivi a été réalisé pour les réactions entre le GL azido **47** et l'1-octine **91** et entre le GL alcynyle **49** et l'azidobenzyle **93** (Schéma 33). Pour cette dernière réaction, des traces du produit de cycloadditions ont été détecté après 2h, cependant après purification aucun produit a pu être récupéré.

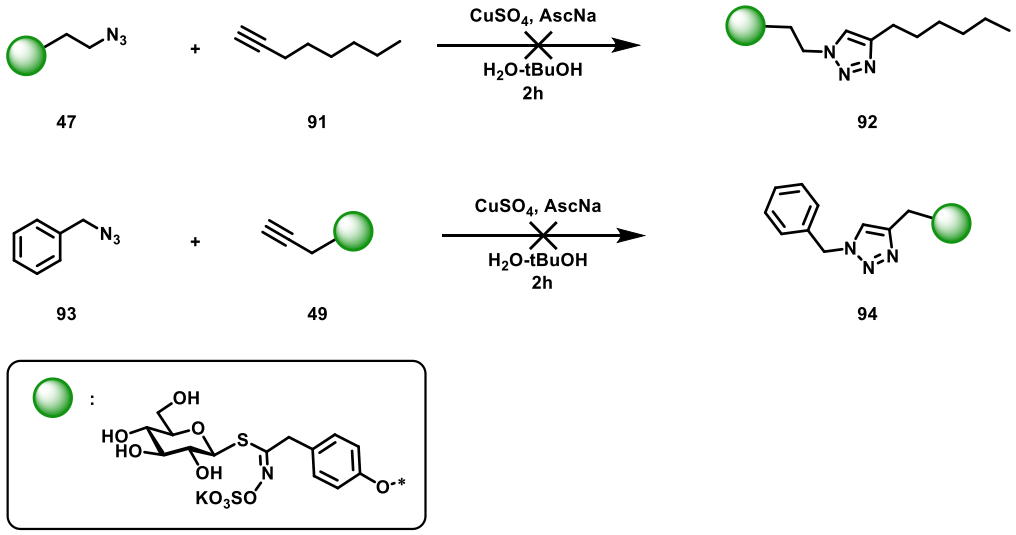


Schéma 33 : test de cycloadditions.

Aussi, trois différents ligands du cuivre ont été testés : le TBTA, $(BimC_3A)_4$ et le THPTA (Schéma 34). Ces complexants du cuivre ont la propriété d'accélérer la catalyse, [87] mais aussi de stabiliser le cuivre, [88] de plus, grâce à leur encombrement stérique ils pourraient probablement empêcher une dégradation de la fonction thiohydroximate sulfatée, stériquement encombrée par le glucose et le phényle.

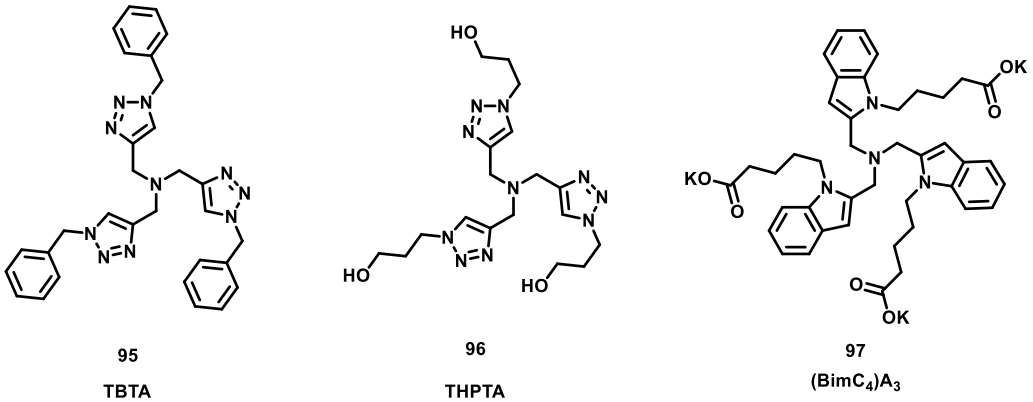


Schéma 34 : structures de TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine), THPTA (Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine), $(BimC_4)A_3$.

Aucun de ces trois ligands n'a apporté d'amélioration à la CuAAC pour les substrats de type glucosinolate. Après des purifications des mélanges réactionnels par chromatographie en phase inverse C-18, seules des traces de glucosinolate de départ en présence de ligand ont été obtenues.

Ces réactions ont été réalisées sur des quantités faibles de glucosinolate d'environ 20-30 mg, en raison du nombre de tests effectués et du travail nécessaire pour synthétiser le GL finale. Après purification des réactions des faibles quantités de produit ont été récupérées, ce qui a rendu compliqué les analyses RMN. Cependant il était toujours facile de confirmer l'absence du triazole issu de la cycloaddition, par le déplacement chimique caractéristique du proton aux alentours de 7.7 ppm.

Au vu de l'incompatibilité du thiohydroximate sulfaté avec la catalyse métallique pour des cycloadditions, les conditions de CuAAc ont été appliqués à un précurseur synthétique, le desulfo-glucosinolate acétylé. Cette fois le produit de click a pu être obtenu avec un rendement satisfaisant de 65%. De plus, cette réaction a été utilisé pour l'obtention d'un glucosinolate heptyl mannoside dont la synthèse est décrite ci-après.

[87] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, S. Gardinier, Y.-H. Lim, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12696–12704.
[88] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.

b. Le glucosinolate « heptyl mannoside »

Afin d'obtenir un glucosinolate ciblant les lectines, et possédant un espaceur suffisant pour séparer le groupe glucosinolate de la partie ligand, le glucosinolate heptylmannoside (Schéma 35) a été ciblé.

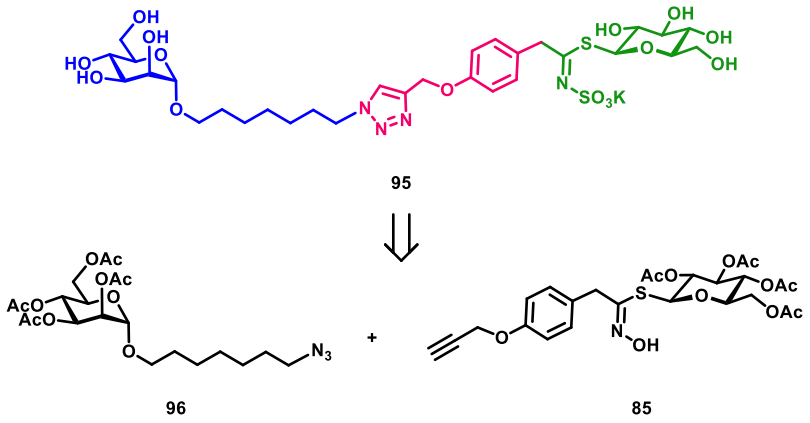


Schéma 35 : rétrosynthèse du GL heptyl mannoside.

D'après les résultats obtenus avec les tests de CuAAC, il semblait évident que la réaction click devait se faire sur le composé acétylé non sulfaté. Pour cette raison, nous avons envisagé de coupler le thiohydroximate alcyne **85** avec l'azido-heptyl mannoside **96**. Le GL final **95** sera obtenu suite aux réactions de sulfatation et désacétylation.

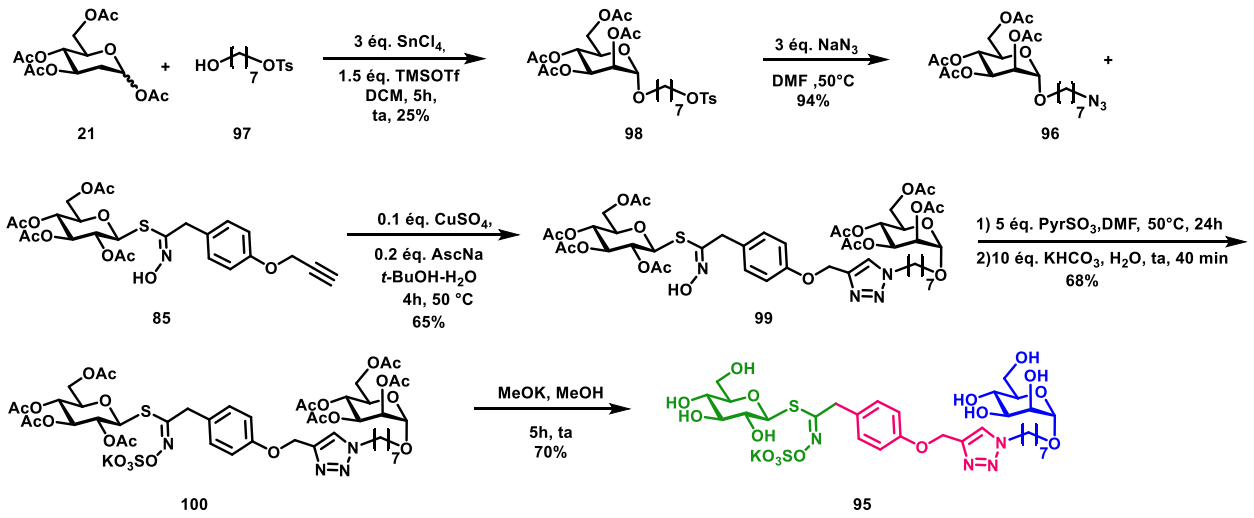


Schéma 36 : synthèse du glucosinolate heptyl mannoside.

La première réaction de cette voie de synthèse a été la préparation du 7-tosyloxyheptan-1-ol **97** en partant de l'heptane-1,7-diol avec un rendement de 95 %. [89] Par la suite, une glycosylation du mannopyranose peracétylé par cet alcool est réalisée en présence de tétrachlorure d'étain et de triflate de triméthylsilyle. Cette réaction s'est déroulée avec un rendement faible de 25%. L'utilisation du BF_3 diéthylétherate comme acide de Lewis conduit au même rendement. Néanmoins, il a été possible d'obtenir une quantité suffisante du tosyloxyheptyl mannopyranoside pour pouvoir effectuer la substitution nucléophile avec l'azoture de sodium, pour donner le produit **96** avec 94% de rendement.

Grace aux conditions de CuAAC, l'azido heptyl mannoside **96** a été couplé avec le thiohydroximate alcynyle **85** afin de former la nouvelle fonction triazole qui relie les deux unités saccharidiques. Cette réaction se fait dans un mélange *t*-butanol- H_2O, ce qui permet une parfaite solubilisation de toutes les espèces impliquées dans la réaction. Un chauffage à 50 °C permet une totale conversion après 4 heures, avec un rendement satisfaisant de 68%.

Par la suite, après sulfatation et désacétylation, le glucosinolate **95** a été obtenu après 3 purifications sur colonne chromatographique en phase inverse. Ces trois purifications ont été nécessaires afin d'éliminer les traces de sous-produit tel que l'isomère minoritaire de cycloaddition 1,5 issu de l'étape de cycloaddition qui n'avait pas été détecté avant l'étape de désacétylation. La présence de cet isomère est détectable par RMN du proton et par LC-MS.

c. La SPAAC

La « strain-promoted alkyne-azide cycloaddition » aussi connue en tant que « copper free click chemistry » est une catégorie de réactions bioorthogonale très répandue en bioconjugaison initialement développée par Carolyn Bertozzi. [90] Le succès de ces réactions est dû à la grande efficacité de cette cycloaddition entre un azoture et un alcyne cyclique contraint, en absence de cuivre. Pour ces raisons, cette réaction est utilisable *in vivo* dans des cultures cellulaires, mais aussi dans des organismes vivants telles que les « zebra fish » [91] ou aussi des souris. [92]

Dans le cas des glucosinolates, pour lesquels la présence de cuivre est problématique, cette cycloaddition réalisée avec le di benzocyclooctyne **101** (DIBO) se fait avec une conversion de 100% et un rendement de 93%.

---

[89] N. Maezaki, M. Izumi, S. Yuyama, H. Sawamoto, C. Iwata, T. Tanaka, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7927–7945.
[90] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
[91] P. Agarwal, B. J. Beahm, P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11504–11510.
[92] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1821–1826.

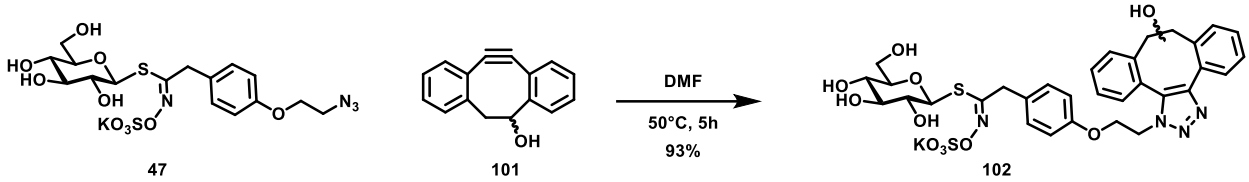


Schéma 37 : réaction de SPAAC.

Etant donné que le DIBO utilisé était en mélange d'isomères, cette réaction donne origine à 4 diastéréoisomères, cela, en plus de la mauvaise solubilité du GL **102** (dans le DMSO, D_2O et MeOD) expliquerait la complexité et la mauvaise résolution du spectre RMN de ce composé.

2. Réactivité des glucosinolates portant une fonction azoture

Mis à part les tests de cycloadditions catalysées par du cuivre, l'azido-glucosinolate pourrait être compatible avec d'autres réactions telles que la réduction de Staudinger et les conditions de couplages peptidiques.

a. La réduction de Staudinger

La réduction de Staudinger permet d'accéder à des amines, à partir de dérivés azido, en présence de phosphine et d'eau. Suite à l'attaque de la phosphine sur l'azide et la perte d'une molécule de diazote, il est possible d'obtenir le dérivé phosphazène ou aza-ylure. [93] Cette espèce, étant très réactive peut être hydrolysée pour former l'amine primaire et l'oxyde de triphényl phosphine.

Mis à part la possibilité de synthétiser des amines glucosinolates avec cette méthode douce, dans les dernières années, la réduction de Staudinger a aussi été modifiée afin d'être utilisée dans le domaine de la bioconjugaison. C'est le cas de la « ligation » de Staudinger-Bertozzi, [94] laquelle en utilisant des phosphines modifiées, réalise des conjugaisons *in vivo* et chez l'animal, [95] en respectant pleinement les critères de bioorthogonalité.

Dans le cadre de ce projet, il était intéressant d'appliquer la réduction de Staudinger aux substrats glucosinolates comme outil de synthèse de nouveaux GLs et pour une application en bioconjugaison.

[93] W. Q. Tian, Y. A. Wang, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4299–4308.
[94] (a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010. (b) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
[95] P. Hu, T. Feng, C.-C. Yeung, C.-K. Koo, K.-C. Lau, M. H. W. Lam, *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22*, 11537–11542.

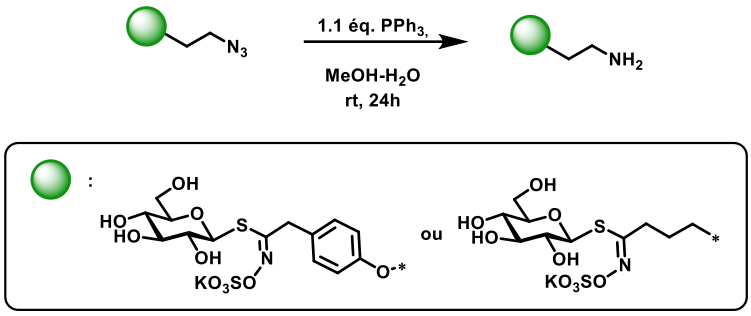


Schéma 38 : réduction de Staudinger.

En utilisant simplement la triphénylphosphine, dans le méthanol ou le THF en présence d'eau, il a été possible de réduire la fonction azido en amine primaire avec un rendement quantitatif. Afin de récupérer ce produit extrêmement polaire, une extraction à l'eau ultrapure peut être réalisée ; de cette façon l'oxyde de triphénylphosphine formé est éliminé dans les lavages avec le solvant organique tel que l'acétate d'éthyle.

Afin de simplifier encore plus les traitements de cette réaction, de la triphényl phosphine supportée sur résine a été employée, cependant aucune réaction n'a été observée. Plusieurs études montrent que souvent l'utilisation de triphényl phosphine supportée peut affecter la réussite d'une réaction.[96] Cela est probablement due à une réactivité moins importante de la triphényl phosphine supportée sur la matrice de polystyrène.

A cause de la nucléophilie de l'amine, et de la réactivité de la fonction thiohydroximate sulfaté, ce dérivé amine n'est pas très stable, pour cette raison il est préférable d'engager directement le produit dans les étapes de synthèse qui suivent.

Dans les mêmes conditions réactionnelles, le glucosinolate azido-aliphatique a montré une instabilité encore plus importante lors de la réduction. Cela confirme encore plus l'hypothèse initiale, en effet la chaine aliphatique permettrait une attaque nucléophile intramoléculaire, responsable de l'élimination d'une molécule de thioglucose, ce qui explique la rapidité de la dégradation de ce composé.

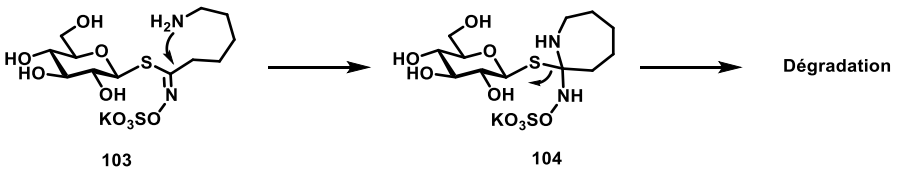


Schéma 39 : proposition de mécanisme de dégradation intramoléculaire.

[96] M. Guinó, K. K. (Mimi) Hii, *Chem Soc Rev* **2007**, *36*, 608–617.

b. Formation de thiourée.

En se servant des conditions pour la réduction de Staudinger mises au point pour le glucosinolate amine, la conjugaison des deux substrats aliphatique et aromatique avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC) a été possible.

La réaction d'addition du glucosinolate amine aromatique sur l'isothiocyanate se fait sans nécessiter d'ajouter une base, à température ambiante dans le DMF, avec un rendement de 66% après deux purifications par colonne chromatographique en phase inverse.

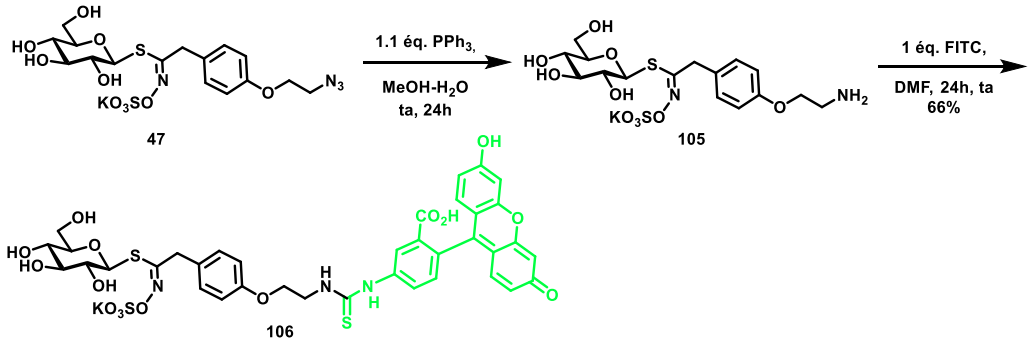


Schéma 40 : synthèse du GLs phényl fluorescéine.

Pour ce qui concerne l'analogue aliphatique, il a été indispensable de mettre au point d'autres conditions réactionnelles afin d'obtenir le glucosinolate espéré, car la même méthode utilisée pour le glucosinolate aromatique n'a pas permis d'obtenir le composé.

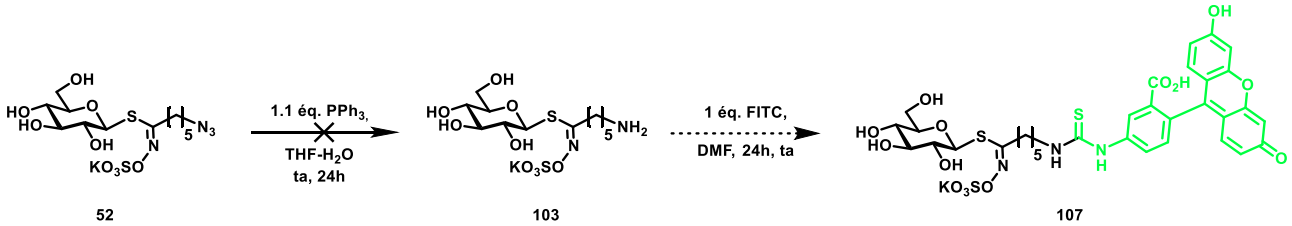


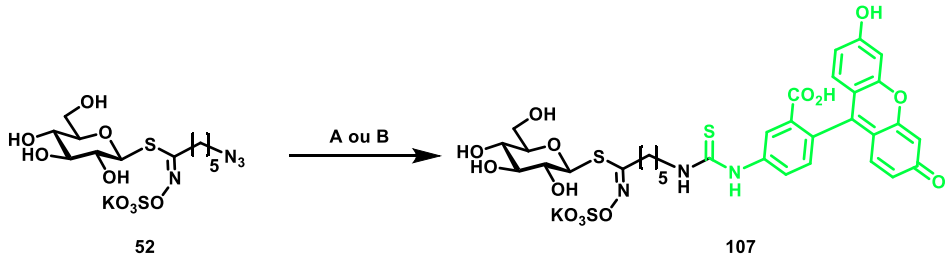
Schéma 41 : réactivité du GLs azido aliphatique.

Deux tests ont été mené sans succès : un premier avec une base telle que la triéthylamine (1éq.) et dans un autre cas en utilisant un tampon à pH 9, ce pH pouvant favoriser l'attaque de l'amine sur l'isothiocyanate.

Constatant le problème de réactivité probablement dû à la stabilité de l'amine, d'autres stratégies ont été explorées.

La réaction « one pot » et « one pot séquentielle »

Tout d'abord une réaction one pot a été réalisée, de cette façon l'amine formée *in situ* peut être piégée directement avec l'isothiocyanate et ainsi éviter d'éventuelle dégradation.



A : 1.1 éq. PPh3, THF-H2O, 1 éq. FITC,ta, 24h **Dégradation**

B : 1) 1.1 éq. PPh3, THF-H2O, 50°C, 5h
2) 1 éq. FITC DMF, ta, 20h **56%**

Schéma 42 : réaction one pot et one pot séquentielle.

Cependant en réalisant une réaction en présence de l'azido-glucosinolate, de la triphényl phosphine et de la fluorescéine isothiocyanate, dans un mélange THF-H_2O, après 24h de réaction à température ambiante, le produit désiré n'a pas été observé (conditions **A** Schéma 42). Probablement, la cinétique de réduction de Staudinger est trop lente pour permettre une réaction satisfaisante avec la fluorescéine avant qu'elle ne se dégrade.

En même temps, une réaction one pot séquentielle a été conçue. Pour ce faire, tout d'abord la réaction de réduction a été accélérée en chauffant à 50°C pendant 5h, ensuite une fois la conversion totale atteinte, une solution de fluorescéine isothiocyanate dans le DMF a été ajoutée. Après environ 20h à température ambiante, le glucosinolate aliphatique fluorescéine a été obtenu avec un rendement de 56%.

L'optimisation de la séparation par chromatographie liquide

La difficulté de cette optimisation a été l'impossibilité de suivre ces transformations classiquement avec des CCM ou aussi par HPLC, tout d'abord à cause de la polarité exacerbée de l'amino-glucosinolate et aussi de la faible détection par UV-visible de cette molécule. Une optimisation de la séparation par LC-MS a été mise en place, afin d'identifier l'intermédiaire de cette réaction et donc d'observer sa formation et sa disparition.

Toute tentative de séparation des molécules avec une colonne phase inverse C-18 (Waters X Terra Shield RP18) ou avec une colonne penta fluoro phényle (Phenomenex Kinetex F5) a échoué.

A cause de sa grande polarité, le composé a été élué systématiquement dans le pic du volume mort de la colonne, de même lorsque des modifications des gradients de séparation ont été réalisées. L'ajout d'acide formique dans les éluants de type H_2O-MeOH n'améliore pas la rétention. De même, la préparation de l'échantillon en utilisant de l'acétate d'ammonium n'a pas donné de bon résultat.

L'optimisation de la détection de masse

Avec une méthode d'ionisation en mode négatif classique (ESI - ElectronSpray Ionisation ; Full-Scan 200-1200 Da) il n'a pas été possible de détecter ni le GL azoture **52**, ni l'intermédiaire GL amino **103.**

Cependant en optimisant le mode de détection de masse, il a été possible de détecter la présence de ces deux GLs. Pour ce faire, plutôt que d'utiliser le mode dit « Full Scan » qui permet de détecter des ions compris dans un intervalle de masse plus large, du single ion monitoring (SIM) a été utilisé. Cela dans le but d'avoir une plus grande sensibilité de détection vis-à-vis de cette espèce moléculaire qui ne donne pas une bonne réponse à l'ionisation. L'efficacité du SIM est dûe au fait que le détecteur cible un intervalle de masse très restreint qui correspond à la masse de l'analyte en question plus ou moins un Da.

La Figure 4 montre en haut les chromatogrammes issus d'une détection par spectrométrie de masse (TIC - Total Ion Chromatogram) réalisée avec la méthode Full Scan (en haut), et avec la méthode SIM (en bas). Il est possible de remarquer que pour le même échantillon, seulement la méthode SIM a permis de détecter le GL amino **103** élué à environ 0.7 min.

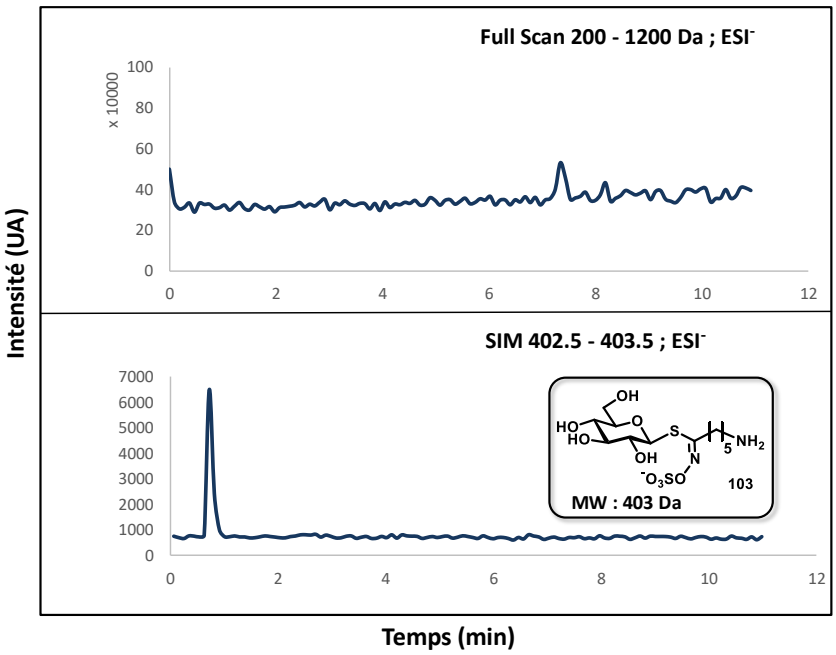


*Figure 4 : chromatogrammes de « Total Ion Current » de la réaction de formation du GL amino **103 ;** Full Scan (en haut), SIM (en bas) **;** H_2O-MeOH ; 0.01% HCOOH ; de 2% MeOH à 100% en 11 min, 100% MeOH pendant 1 min ; RP-C18.*

Un travail d'optimisation de la méthode Full Scan a été nécessaire aussi pour détecter la fluorescéine isothiocyanate et le GL-fluorescéine **107**. La Figure 5 montre le chromatogramme UV de la réaction entre le GL amino **103** et la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Schéma 42, cond. B, deuxième étape).

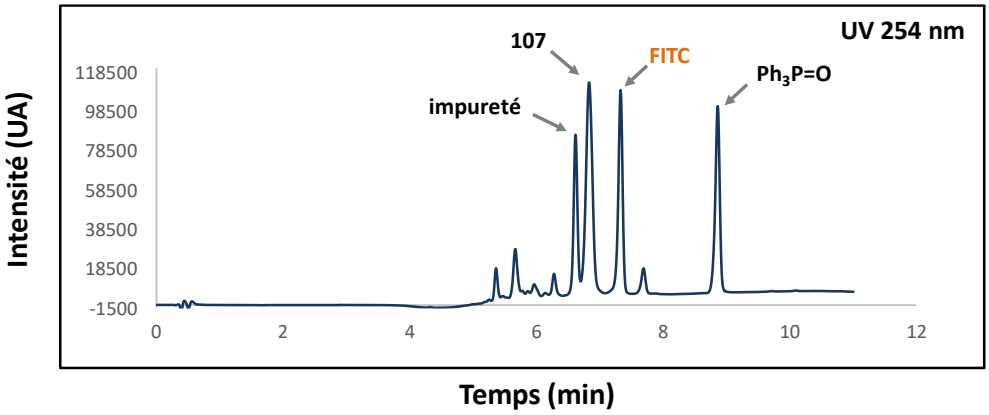


*Figure 5 : chromatogramme (UV) de la réaction de formation du GL fluorescéine **107**, t : 6h ; H_2O-MeOH ; 0.01% HCOOH ; de 2% MeOH à 100% en 11 min, 100% MeOH pendant 1 min ; RP-C18.*

En conclusion, grâce à ce travail de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse, il a été possible d'avoir une vision plus claire de la réaction en question, et ainsi de pouvoir élaborer un protocole alternatif qui puisse assurer la formation du produit avec un rendement de 56%.

3. Le couplage peptidique

Précédemment il a déjà été évoqué que grâce à la fonction azido de ces GLs il serait possible de réaliser des couplages peptidiques afin de connecter le squelette GLs à d'autres entités moléculaires. Le couplage peptidique permet de former une liaison amide très stable, et surtout peut être réalisé avec plusieurs partenaires acides commercialement accessibles.

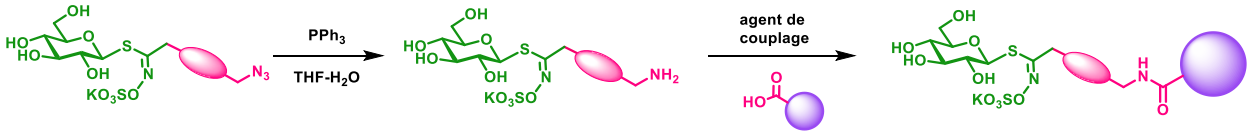


Schéma 43 : synthese de GL fluorescents par couplage peptidique.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Professeur P-Y Renard, le Dr. Wilfried Fredy a pu synthétiser plusieurs glucosinolates complexes à partir du glucosinolate azido-aromatique.

En utilisant tout d'abord la réduction de Staudinger et ensuite un couplage peptidique et un couplage avec un N hydroxysuccinimide ester biotine, il a été possible d'obtenir un GL sulphorhodamine, un GL cyanine 5, et un GL biotine. Le couplage peptidique des deux glucosinolates fluorescents a été réalisé en utilisant du PyBop, et DIPEA. Les rendements obtenus varient entre 40 et 60 %.

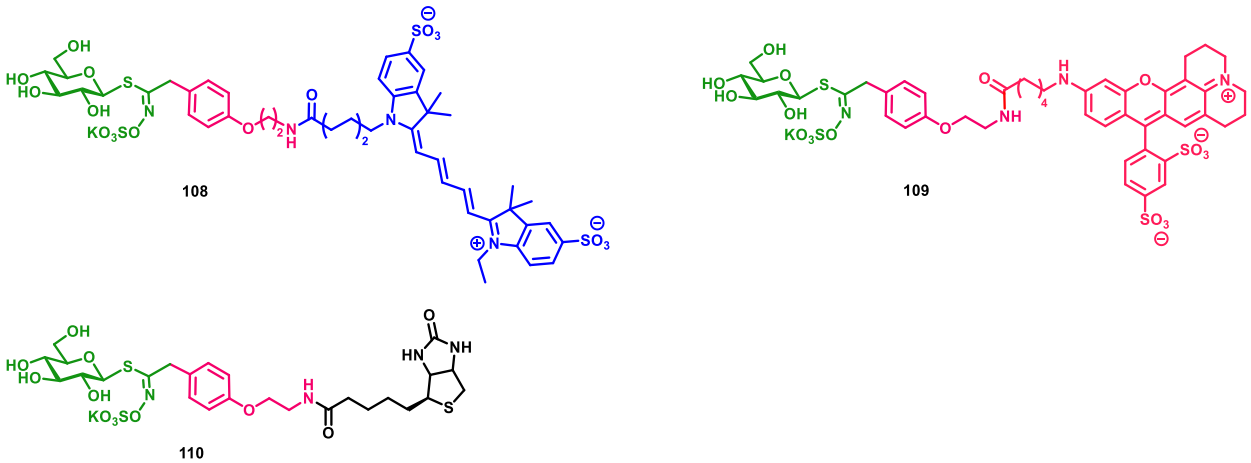


Schéma 44 : Glucosinolates fluorescents et biotine.

Ces glucosinolates fluorescents ont été employé pour réaliser des tags fluorescents d'une protéine modèle en utilisant le système myrosinase-glucosinolate.

4. Le glucosinolate bromé

Les glucosinolates possédants l'halogène sur la chaine latérale ont été conçu afin de réaliser facilement des substitutions avec des nucléophiles de type thiol, pour synthétiser des molécules plus complexes.

Comme modèle, une substitution avec la *N*-acétyl-L-cystéine méthyl ester a été testée en présence de carbonate de potassium pour favoriser la déprotonation du thiol.

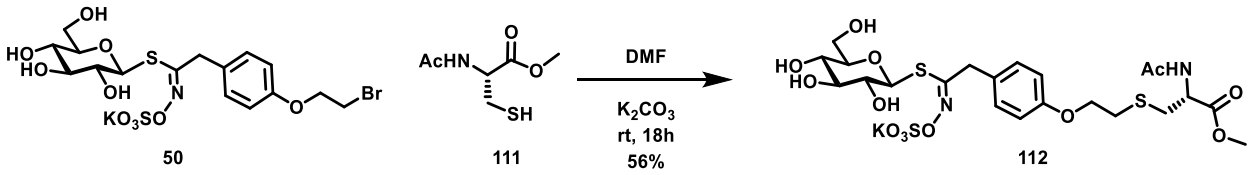


Schéma 45 : réactivité du GL bromé.

Cette réaction a aussi été testée en absence de base, mais malgré la nucléophilie du thiol, aucune substitution n'est observée. L'utilisation de la triméthylamine plutôt que le carbonate a donné une plus faible conversion comparée à la réaction avec le carbonate de potassium qui donne une conversion de 100% et un rendement de 56% après putification.

5. Développement d'un espaceur

Suite à la synthèse des GLs de type biphényl mannosides, il a été envisagé d'étudier l'insertion d'un espaceur plus long pour éloigner le ligand de la partie GL. De cette façon il serait possible de faciliter l'interaction simultanée avec la myrosinase d'un part et la lectine (ou autre cibles biologiques).

De plus cet espaceur pourrait permettre la conjugaison de l'isothiocyanate-ligand formé avec des résidus lysine proche du site actif de la lectine.

Le Schéma 46 montre l'approche de synthèse convergente pouvant mener à l'obtention d'un GL-ligand « espacé ».

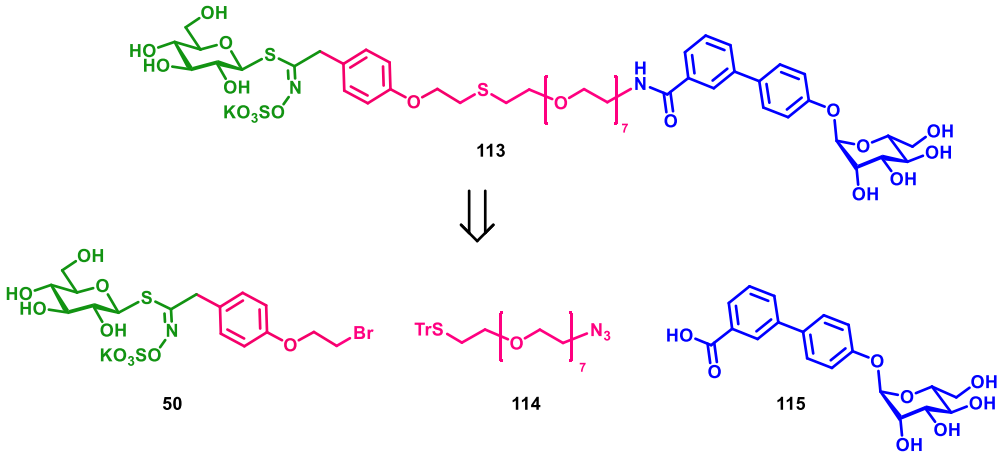


Schéma 46 : rétrosynthèse GL PEG8.

Il existe des espaceurs commerciaux de type PEG, aillant de 10 jusqu'à 50 angström, prêts à être lies sur des fonctionnalités de type amine, thiol, ou des électrophiles par des réactions click. Cependant vu la difficulté d'obtenir des bras de polyéthylène glycol avec une longueur bien définie, ces espaceurs commerciaux sont très chers et disponible en très faible quantité.

De ce fait, la synthèse d'un bras PEG8 a été envisagé afin d'obtenir le GL **113** (Schéma 46). Grâce aux fonctionnalités thiol (masqué par le trityle) et azoture, ce bras pourrait être lié d'un part au GL **50** et d'autre part avec le biphényl mannoside **115** qui possède une fonction acide libre.

En partant du tétra polyéthylène glycol **116** il a été possible d'obtenir le composé ditosylé **117** et aussi le monotosylé **118**, avec de bons rendements (Schéma 47).

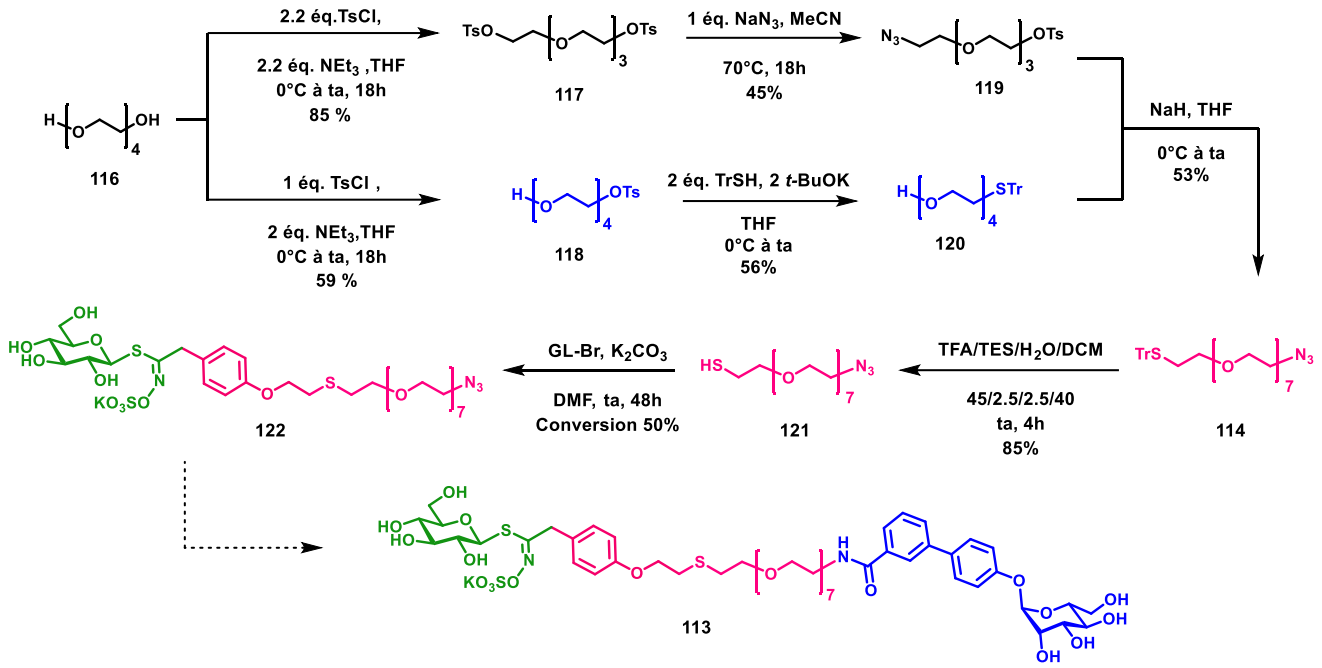


Schéma 47 : synthèse du glucosinolate PEG8.

Par la suite, une désymetrisation du PEG ditosylé (**117**) a été réalisée en présence d'azoture de sodium. Plusieurs optimisations ont été réalisées sur cette réaction, cependant à l'échelle du gramme il n'a pas été possible de dépasser le 50% de rendement.
En faisant réagir le trityl mercaptan sur le PEG4 monotosylé il a été possible obtenir le bras trityl PEG4 hydroxyle **120**, qui peut ensuite être couplé avec le bras tosyle PEG4 azido **119**.
Malheureusement en raison de la mauvaise réactivité du nucléophile et de l'électrophile mis en jeux, il n'a pas été facile d'obtenir le composé **114** avec un rendement supérieur à 53%. De plus, il est très difficile d'obtenir le composé **114** pur. Lors des séparations chromatographiques le PEG4 est facilement co-élué avec le bras PEG8 **114** par simple entrainement. De plus ce dérivé a tendance à se dégrader, ce qui ne facilite pas la mise au point des étapes suivantes. Néanmoins, il a été possible d'avancer avec la déprotection du trityle en présence de TFA, triéthylsilane (TES) et l'addition sur le glucosinolate bromé obtenu avec une conversion de 50%.

Malheureusement, à cause de la dégradation du bras PEG8 et des différentes difficultés rencontrées dans cette voie de synthèse, il n'a pas été possible d'obtenir le glucosinolate final.

Vu l'effort nécessaire pour la synthèse du PEG8, il semble judicieux utiliser des espaceurs commerciaux suivants. Ces derniers permettent des couplages sélectifs avec des amines, des thiols ou des électrophiles.

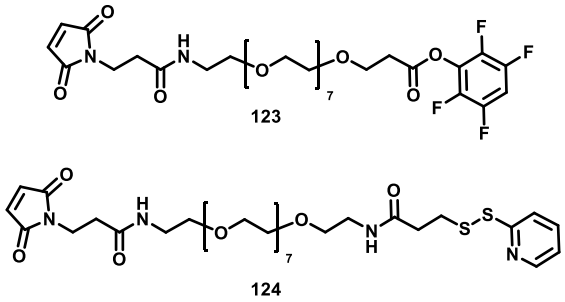


Schéma 48 : espaceurs PEG commerciaux.

La synthèse de glucosinolates espacés avec des plus petits espaceurs a aussi été prise en considération, notamment en partant du PEG 4 tosyl- azido **119**, (Schéma 47).

V. Conclusions

En conclusion, grâce à ce travail présenté dans ce premier chapitre, d'importantes avancées concernant la synthèse et l'étude de réactivité de ces glucosinolates non naturels ont été réalisées. De plus, les modes opératoires mis au point permettent la synthèse de glucosinolates à l'échelle du gramme, ce qui n'est pas facile, surtout à cause des difficultés rencontrées dans les couplages de l'oxime de Kulkarni et de la réaction de sulfatation.

De plus, cette étude a permis d'une part d'accéder à des glucosinolates originaux de type mannosides et bifonctionnels, et d'autre part de pouvoir explorer la réactivité chimique de ces substrats. La structure hors du commun des GLs leur confère une réactivité bien particulière, aussi pour des réactions bien explorées telles que les CuAAC. Par ailleurs il est très difficile d'étudier leur comportement à l'aide des outils d'analyse classiques tels que la RMN et la CCM.

Grâce aux informations obtenues lors de ce travail, il a été possible d'accéder à des glucosinolates plus complexes possédant des motifs ligands de lectines ou fluorophores.

De plus, suite aux travaux déjà débutés, il sera possible d'accéder rapidement à des glucosinolates possédant des espaceurs variables et de différentes tailles, ce qui permet de moduler plus facilement la nature du ligand et la distance avec le groupement glucosinolate.

Chapitre 2

Etude de la réaction MG

Chapitre 2 Etude de la réaction myrosinase-glucosinolate (MG)

Au cours de ce chapitre, l'étude de la réaction entre la myrosinase et les glucosinolates synthétisés précédemment sera détaillée. Afin de pouvoir évaluer la réaction MG sous tous ses aspects, la cinétique réactionnelle sera tout d'abord approfondie, puis des études de réactivité de l'isothiocyanate issu de l'hydrolyse seront menées. Les tests des différentes ligations possibles sur l'isothiocyanate permettront de poser les bases pour l'utilisation du système myrosinase-glucosinolate en bioconjugaison.

I. Les réactions enzymatiques

1. La découverte des enzymes

Une enzyme est une protéine capable de catalyser une réaction chimique. Ces macromolécules sont des catalyseurs spécifiques pour une transformation, une molécule ou fonction donnée.

Grâce aux travaux de Eduard Buchner (Prix Nobel en 1907), il a été possible de prouver qu'une réaction enzymatique était catalysée par une protéine et non par d'autres machineries cellulaires ou des systèmes vivants. Ces études furent réalisées sur des hydrolases, responsables de la fermentation alcoolique du saccharose, extraites de levures et ne contenant aucun résidu cellulaire.

Lors de cette étude, fut découvert le rôle essentiel du complexe dans la cinétique réactionnelle. En effet, Buchner suggérait que le complexe enzyme-substrat se dissociait rapidement après sa formation, pour donner lieu au produit de la réaction. De ce fait, la formation de ce complexe était l'étape déterminante de la vitesse réactionnelle.

Ainsi, les avancées scientifiques réalisée par Buchner peuvent être considérées comme les bases de la biochimie moderne.

2. Le modèle cinétique de Michaelis-Menten

Suite aux travaux de Buchner, Leonor Michaelis et Maud Leonora Menten ont poursuivi les études qui mèneront plus tard à de grandes avancées dans le domaine de l'enzymologie. Michaelis et Menten ont proposé un modèle mathématique permettant de décrire le mode d'action d'une enzyme, et donc la conversion du substrat en produit (Figure 6).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Figure 6 : équation bilan d'une réaction enzymatique

Selon le modèle de Michaelis-Menten, la réaction enzymatique se réalise en deux étapes : la première mène à la formation d'un complexe enzyme-substrat (**ES**), et la deuxième permet de former le produit. La première est à l'équilibre et réversible, la seconde est irréversible.[97]
Cette équation peut être décrite de la façon suivante :

$$\mathrm{V}_0 = \frac{d[P]}{dt} = \mathrm{V}_{\max} \frac{[S]}{[\mathrm{S}] + \mathrm{K}_\mathrm{M}}$$

Équation 1 : équation de Michaelis-Menten

V_0 correspond à la vitesse réactionnelle initiale, V_{max} à la vitesse maximale que le système atteint lorsque toute enzyme est liée au substrat. Les vitesses sont reportées en concentration molaire sur l'unité de temps (M min^{-1}).
K_m est la constante de Michaelis-Menten, qui correspond à la concentration de substrat lorsque le système est à la moitié de la vitesse maximale. Cette constante décrit l'interaction enzyme-substrat (ES), est spécifique du complexe enzyme-substrat, mais est indépendante de la concentration d'enzyme. Elle est généralement exprimée en concentration molaire.
D'un point de vue mathématique la constante de Michaelis-Menten est strictement liée aux constantes cinétiques k_1, k_{-1} et k_2 des différentes étapes cinétiques.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Équation 2 : constante de Michaelis-Menten

Le graphique représenté dans la Figure 7, exprime la vitesse réactionnelle V_0 en fonction de la concentration de substrat [S]. Il est donc possible de prévoir que à faible concentration de substrat, la vitesse réactionnelle est proportionnelle à concentration de substrat ($V_0 = (V_{max}/K_m)[S]$) dans la zone linéaire de la courbe.

[97] J. L. Tymoczko, J. M. Berg, L. Stryer, *Biochemistry: A Short Course*, W.H. Freeman, New York, **2013**.

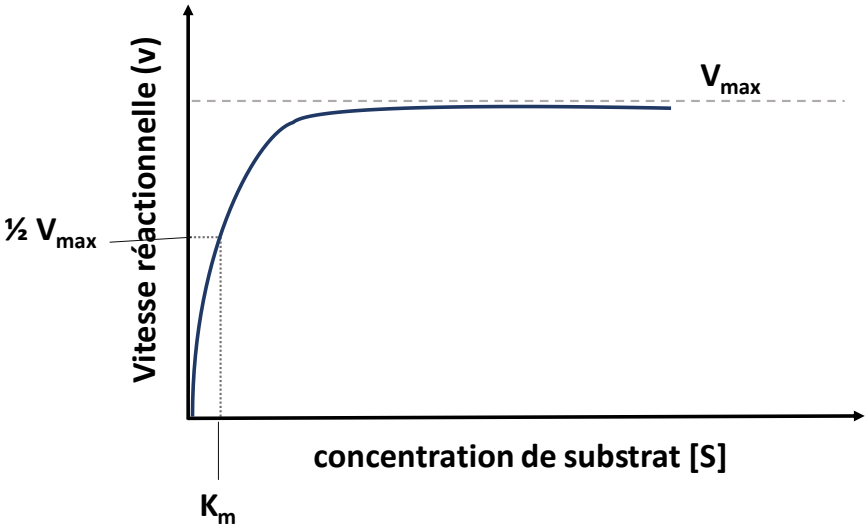


Figure 7 : courbe de la vitesse en fonction de la concentration de substrat

Pour des concentrations de substrat supérieures à la valeur de K_m, la vitesse V_0 est fonction de V_{max} Ainsi, même à concentration élevée de substrat, la vitesse ne peut dépasser la vitesse V_{max} correspondant d'un point de vue mécanistique à la saturation de l'enzyme par le substrat.
Cette hyperbole rectangulaire caractérise tous les systèmes enzymatiques qui suivent cette cinétique bien précise.

Cette équation a été ensuite modifiée par G. E. Briggs et J. B. S. Haldane, car elle faisait référence à une première étape d'équilibre entre l'enzyme et le substrat, libres et associés. En réalité, il est plus correct de définir ce système comme en étant dans un état de « quasi-steady-state ». Le « steady-state » ou état-constant indique un système dans lequel, la variable qui définit le système reste constante. Ça serait donc le cas de la concentration du complexe enzyme substrat, qui reste constante alors que celle du produit augmente. Cela est possible car la première constante de formation du complexe est beaucoup plus importante que la constante de formation du produit. Aussi, afin de pouvoir être dans des conditions de « steady-state », le substrat doit être largement en excès par rapport à l'enzyme.

D'un point de vue expérimental, afin de pouvoir tracer une courbe permettant d'extrapoler ces valeurs de K_m et V_{max}, il faudra réaliser plusieurs réactions enzymatiques à différentes concentrations de substrat, en utilisant toujours la même durée de réaction et la même concentration d'enzyme.

3. Les autres paramètres cinétiques

a. La constante catalytique k_{cat}

Cette constante k_{cat}, aussi connue comme « turnover number », représente le nombre de molécules converties en produit par unité de temps lorsque l'enzyme est complètement saturée par le substrat.

$$V_{max} = k_{cat}\, E_T \quad ; \quad k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$$

Figure 8: équations décrivant le k_{cat}.

E_T représente la concentration molaire d'enzyme. Ainsi la constante k_{cat} correspond à la constante de formation du produit k_2 lorsque l'enzyme est saturée par le substrat.

b. L'efficacité catalytique k_{cat}/K_m

Ce paramètre donne la possibilité d'évaluer et de comparer l'efficacité catalytique d'un système enzymatique. Ainsi, ce parametre est utile pour comparer des réactions enzymatiques ayant lieu entre la même enzyme et des substrats différents. En effet, le k_{cat} tient compte de l'interaction du substrat avec l'enzyme (K_m) et aussi de la capacité du complexe ES à former le produit (K_{cat}).

L'utilisation de cette constante est par contre limitée lorsque différentes enzymes sont comparées, [98] mais aussi lorsque l'enzyme utilisée n'est pas pure ou lorsque la masse moléculaire n'est pas connue précisément. Dans ce cas, ce paramètre est peu aisé à déterminer et il est alors possible d'exprimer le rapport V_{max}/K_m pour décrire l'efficacité d'une réaction enzymatique et pour comparer différents substrats.

c. Les unités d'enzyme

L'unité d'enzyme a été définie en tant qu'unité de mesure à cause de la difficulté de pouvoir estimer la concentration d'enzyme. Cela est dû, d'une part à l'incertitude sur la masse moléculaire de la protéine, et d'autre part pour des raisons de pureté.
L'unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la transformation d'une µmol de substrat en une minute.

[98] R. Eisenthal, M. J. Danson, D. W. Hough, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 247–249.

4. Le mécanisme de la catalyse enzymatique

Deux modèles ont été proposés pour décrire l'interaction entre une enzyme et son substrat : le modèle clé-serrure et le modèle de la forme induite.

Ainsi, Emil Fisher a proposé un modèle simple dit clé-serrure, selon lequel, l'enzyme symbolisée par la serrure, peut accepter uniquement une clé représentée par le substrat. Cette interaction très spécifique aboutit à la formation du produit.

Plus tard en 1958, Koshland a proposé un nouveau modèle dit de la forme induite (the induced fit). [99] Selon ce postulat, plusieurs phénomènes caractérisent l'activité d'une enzyme :

a) Afin d'observer la catalyse enzymatique, une orientation précise des fonctions catalytiques est nécessaire.
b) Le substrat peut induire des changements appréciables de conformation du site actif
c) A la différence d'une molécule qui n'est pas le substrat, le substrat de l'enzyme sera capable d'orienter les fonctions catalytiques selon une orientation favorable à la transformation chimique.

De ce fait, le substrat est initialement reconnu par le site actif de l'enzyme grâce à des liaisons de type non covalentes, puis, une adaptation entre la structure du substrat et l'enzyme se réalise. Cette réorganisation de l'environnement du site actif permet ainsi d'atteindre l'état de transition.

Ce modèle permet d'expliquer la baisse d'énergie d'activation d'une réaction induite par l'enzyme, qui est due à la formation d'un état de transition de plus faible énergie, lors de l'adaptation structurale entre le substrat et l'enzyme. Ainsi suivant le type d'enzyme, différents mécanismes peuvent être observés afin de mener à la formation du produit.
Ce postulat est aussi en accord avec le fait qu'une enzyme puisse accepter différents substrats ayant toutefois une similarité structurale.

5. La myrosinase

La myrosinase est une β–thioglucohydrolase (EC 3.2.1.147) capable d'hydrolyser la liaison carbone-soufre des glucosinolates. La myrosinase utilisée dans la globalité de cette étude est commercialisée par Sigma-Aldrich. Elle est extraite à partir des graines de moutarde blanche (*Sinapis Alba*). La myrosinase est la seule enzyme naturelle capables d'hydrolyser des thioglucosides. D'un point de vue cristallographique, 46 % de similarité a été retrouvé en comparant la myrosinase extraite de la *Sinapis Alba* avec la β–glucosidase cyanogénique. Moins de similarité a pu etre observée avec d'autres *O*-glucosidases. [100]

Elle se présente sous forme d'un dimère [100] dont chaque sous-unité a une masse moléculaire de 60 kDa environ. Les deux unités sont stabilisées par un atome de zinc tétracoordiné lequel relie deux acides

[99] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 98–104.
[100] A. Pessina, R. M. Thomas, S. Palmieri, P. L. Luisi, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *280*, 383–389.

aminés (Asp70 et His56) à symétrie identique pour chaque dimère. Ce dimère est stabilisé par des interactions hydrophobes qui ont lieu à l'interface hydrophobe de chaque unité, et par des liaisons hydrogène.
Par ailleurs, la présence de 37 résidus d'acide aspartique permet la formation de liaisons hydrogène, et ponts salins qui stabilisent la structure de cette protéine. Cela explique la grande stabilité thermique de cette enzyme, ce qui lui permet d'être efficace jusqu'à 65°C. [101]
De même, la forte glycosylation, d'environ 13 kDa [102] de groupements saccharidiques pour chaque sous-unité, permet de stabiliser fortement la protéine, [103] encore plus dans des milieux dépourvus d'eau comme les graines de la plante.

Le mécanisme d'action

Le mode d'action de la myrosinase a lieu en deux étapes (Schéma 49). Tout d'abord, un complexe covalent enzyme-substrat de type α–glucoside **125**, [104] est formé avec le résidu glutamine 409 et permet l'élimination de la partie aglycone sous forme de dérivé d'acide thiohydroxamique sulfaté **127**. Puis, après l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau, une molécule de glucose est éliminée. Le dérivé d'acide thiohydroxamique sulfaté est rapidement dégradé grâce à un réarrangement de Lossen qui donne un anion sulfate et un sous-produit de type isothiocyanate ou autres.

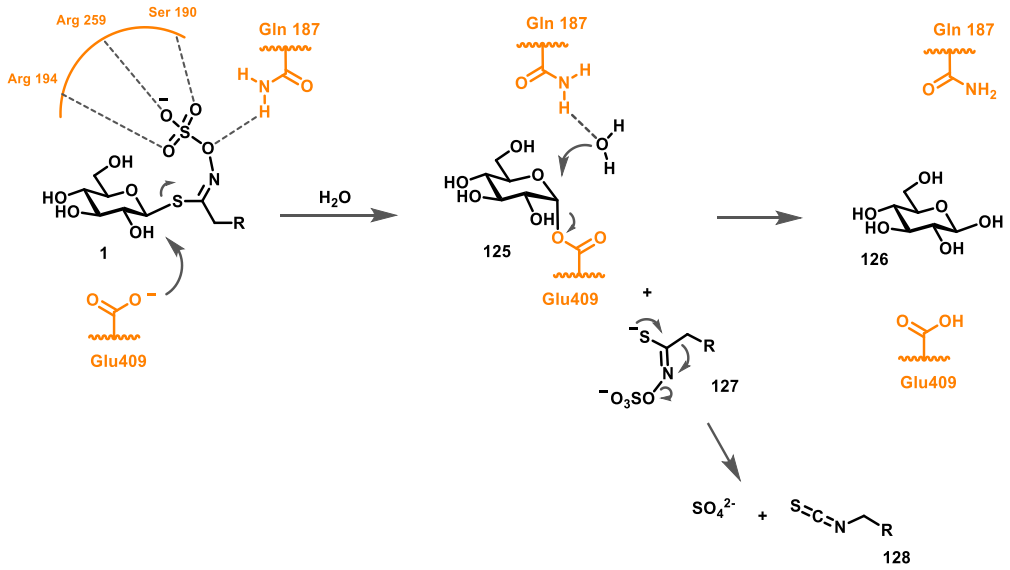
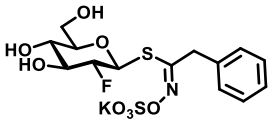


Schéma 49 : mécanisme d'hydrolyse d'un glucosinolate.

[101] A. Hochkoeppler, S. Palmieri, *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 91–96.
[102] W. P. Burmeister, S. Cottaz, H. Driguez, R. Iori, S. Palmieri, B. Henrissat, *Structure* **1997**, *5*, 663–676.
[103] R. J. Solá, K. Griebenow, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 1223–1245.
[104] S. Cottaz, B. Henrissat, H. Driguez, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15256–15259.

Une structure cristallographique de la myrosinase issue de la diffusion d'un analogue de glucosinolate, la 2-fluoro-2-déoxyglucotropaeoline (**129**) Schéma 50, a permis d'analyser l'intermédiaire covalent enzyme-substrat.



129

Schéma 50 : 2-fluoro-2-déoxyglucotropaeoline.

En comparant cette dernière avec celle d'une autre glycosidase, il a été possible de déduire que la liaison responsable du complexe myrosinase-substrat **125** correspondait tout à fait à la liaison qui caractérise les glycosidases classiques. En effet, les aminoacides responsables des interactions avec le glucoside dans les glycosidases sont conservés dans la myrosinase en permettant ainsi une reconnaissance spécifique pour le glucose.

Cependant la myrosinase se distingue des autres glycosidases car son site actif contient un résidu de type glutamine (Gln 187) qui remplace l'acide glutamique. Cet aminoacide catalyse le départ de l'aglycone en protonant l'alcoolate issu de l'hydrolyse. Dans le cas de la myrosinase, cette étape ne nécessite aucun acide aminé basique ou acide. Au contraire, la présence d'un résidu chargé, à proximité du sulfate, aurait causé une grande instabilité. Ensemble aux résidus Arg 194, Arg 259, Ser 190, la glutamine permet de stabiliser le sulfate à l'aide de liaisons hydrogène. [105]
Cet acide aminé forme aussi une liaison hydrogène avec la molécule d'eau qui hydrolyse le complexe enzyme-substrat, cependant cela n'est pas comparable à l'activation de la molécule d'eau réalisée par un glutamate.
L'aglycone du glucosinolate est un excellent groupement partant qui rend possible cette hydrolyse catalysée par la myrosinase. Ceci ne pourrait pas se réaliser avec des glycosides qui présentent de mauvais groupements partants.

D'autre part, l'absence du résidu glutamate modifie aussi le déroulement de la deuxième étape de cette catalyse. Normalement, le glutamate favorise l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur le complexe enzyme-substrat afin de faciliter le départ du carbohydrate. Dans le cas de la myrosinase, la stabilité de ce complexe est telle qu'une molécule d'eau sans autre activation, suffit pour hydrolyser l'enzyme-glycoside. De ce fait, il est très facile d'expliquer l'amélioration de la cinétique enzymatique lorsque dans le milieu réactionnel est rajouté de l'acide ascorbique. Ce dernier, joue le rôle de cofacteur et peut remplacer le glutamate manquant, en favorisant l'attaque nucléophile de la molécule d'eau. [106]
Cette enzyme unique est donc capable d'hydrolyser sélectivement des substrats de type glucosinolates, tout en acceptant une grande diversité structurale de la partie aglycone de ces substrats.

[105] A. Besle, X. Brazzolotto, A. Tatibouët, D. Cerniauskaite, E. Gallienne, P. Rollin, W. P. Burmeister, *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, *66*, 152–155.
[106] W. P. Burmeister, S. Cottaz, P. Rollin, A. Vasella, B. Henrissat, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39385–39393.

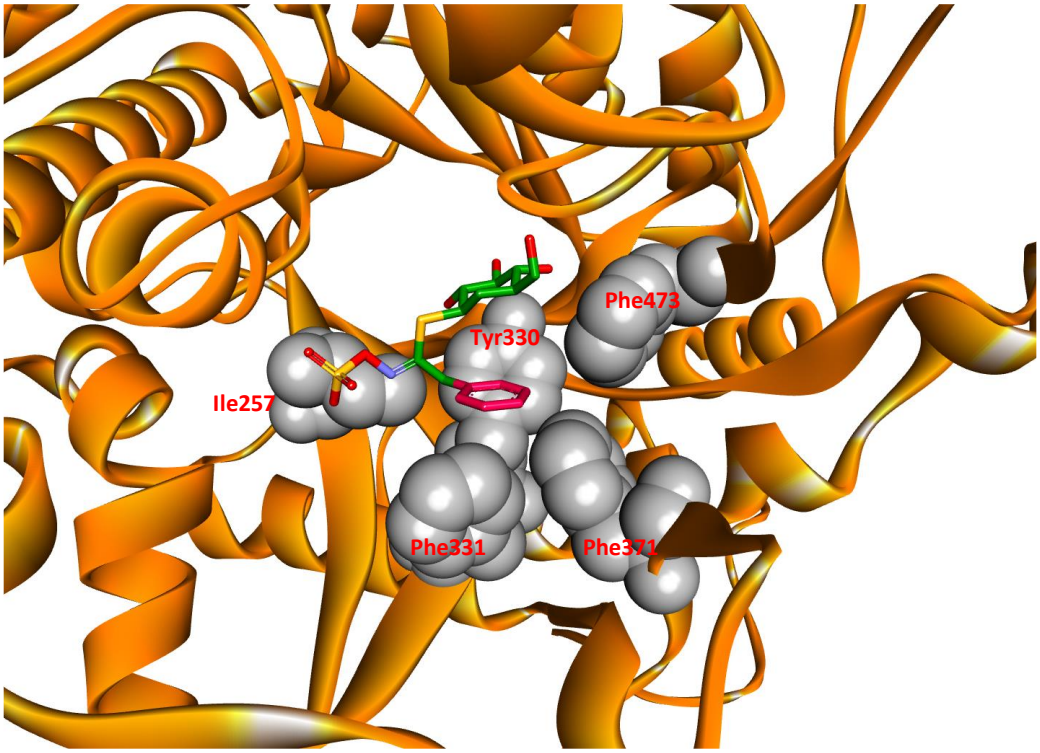
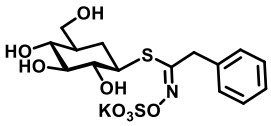


Figure 9 : figure représentante une cristallographie du site actif de la myrosinase en presence d'un inhibiteur (carba-glucotropaeoline) ; PDB : 1w9d.

Afin d'étudier l'interaction de la chaîne latérale des glucosinolates avec le site actif, un docking a été réalisé par l'équipe de Burmeister, qui a démontré la présence d'une poche hydrophobe dans le site actif de la myrosinase [102] qui peut héberger la chaîne latérale des glucosinolates.
La Figure 9 montre représente une cristallographie d'un complexe myrosinase-inhibiteur réalisée par Tatibouët *et al.* [107]. L'inhibiteur en question est la carba-glucosinolate glucotropaeoline.



carba-glucotropaeoline

Dans la Figure 9 il est possible d'identifier les aminoacides qui constituent la poche hydrophobe : Phe331, Phe371, Phe47, Tyr 330, Ile257.

[107] A. Bourderioux, M. Lefoix, D. Gueyrard, A. Tatibouët, S. Cottaz, S. Arzt, W. P. Burmeister, P. Rollin, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3*, 1872.

II. L'électrophorèse capillaire comme outil de suivi de la réaction enzymatique

La myrosinase est capable d'hydrolyser une large variété de glucosinolates ayant des aglycones de nature différente. En 2011, 132 glucosinolates naturels avaient été isolés et caractérisés. [43] Ces derniers ont des chaines latérales variables, qui dérivent d'acide-aminés précurseurs de leur biosynthèse. Ainsi la méthionine conduit à des glucosinolates aliphatiques, alors que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane sont les précurseurs des glucosinolates aromatiques.[50b,108] Cela permet d'observer des substrats naturels petits possédant une chaine latérale très courte jusqu'à des glucosinolates plus complexes avec des substituants aromatiques substitués (Schéma 51).

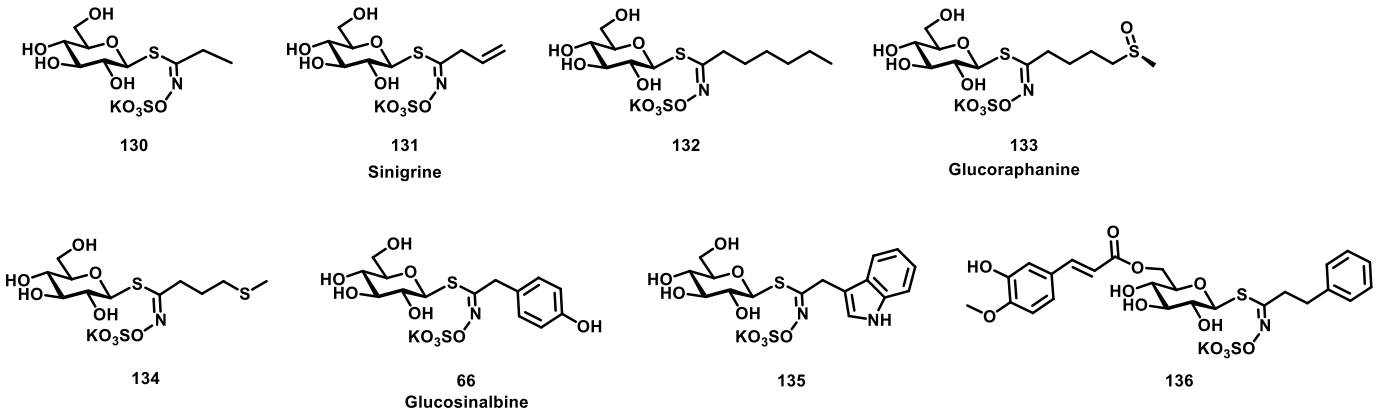


Schéma 51 : exemples de diversification structurelle de glucosinolates naturels.

La grande variété structurale des glucosinolates naturels ou non, induit des problématiques d'un point de vue de leur détection et leur quantification.

Dans le cadre de ce travail cela comporte plusieurs problèmes car il y a nécessité d'étudier la cinétique d'hydrolyse de différents GLs artificiels possédant des structures différentes.

Certains glucosinolates possèdent des groupements chromophores et ont des polarités qui autorisent une séparation par des systèmes de chromatographie liquide et une détection par spectroscopie UV-visible. Cependant, de nombreux substrats ne sont pas aisément détectables par UV-visible, ou encore dans le cas d'analyses HPLC, leur polarité nécessite de changer la nature de la colonne chromatographique et d'optimiser des nouveaux gradients pour obtenir une séparation adéquate.

Afin de résoudre ces problématiques, l'électrophorèse capillaire (EC) a été utilisée en tant qu'outil analytique.

[108] R. N. Bennett, G. Kiddle, A. J. Hick, G. W. Dawson, R. M. Wallsgrove, *Plant Cell Environ.* **1996**, *19*, 801–812.

1. Principe de séparation

La chromatographie en phase liquide ou la chromatographie en phase gazeuse sont basées sur les différentes affinités des composés envers la phase stationnaire, alors qu'en électrophorèse capillaire la séparation des analytes est fonction de leur charge et de leur taille.

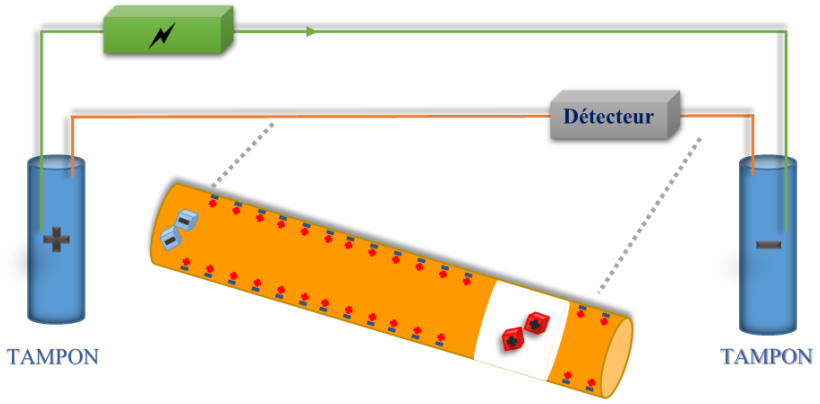


Figure 10 : représentation simplifiée d'un appareil d'électrophorèse capillaire

Un appareil d'EC comprend : un capillaire en silice, (50 ou 75 µm d.i.), rempli d'un tampon de séparation (BackGround Electrolyte - BGE) à l'aide de deux vials (d'entrée et de sortie) qui assurent un renouvellement continu des électrolytes. Aux deux extrémités de ce capillaire sont placées deux électrodes entre lesquelles est appliquée une tension (10-30 kV) qui se propage à l'aide du tampon de séparation. Le détecteur sera positionné sur le capillaire afin de détecter les analytes (Figure 10).

Le principe de ce mode de séparation repose sur la migration des analytes chargés en solution sous l'influence d'un champ électrique. En effet, les cations migreront généralement vers la cathode, les anions vers l'anode. Par conséquence des espèces très chargées et de petite masse migreront plus rapidement par rapport à des analytes possédant une faible charge repartie sur une grande masse. Les paramètres physico-chimiques suivants : charge, masse et solvatation caractérisent la **mobilité électrophorétique (μ_{ep})**.

La vitesse électrophorétique est fonction de la mobilité électrophorétique de l'analyte, et de l'intensité du champ électrique appliqué.

$$\nu_{ep} = \mu_{ep} \times E$$

ν_{ep} : vitesse électrophorétique / μ_{ep} : mobilité électrophorétique / E : intensité du champ électrique

Équation 3 : vitesse électrophorétique

Le **flux électroosmotique** est un autre paramètre qui joue un rôle important lors de la séparation par électrophorèse. Ce dernier correspond à un flux qui pousse les ions à travers le capillaire. Il est dû à la

différence de charge entre les silanols de la silice du capillaire et les cations de l'électrolyte du tampon de séparation. Selon le pH du BGE les silanols seront plus ou moins charge négativement. Afin de garder l'électroneutralité de la solution, les électrolytes du tampon forment une couche de charge positive, opposée aux silanols. Cette couche dite de Stern est dense en charges, et permet ensuite la formation d'une couche diffuse dite de Gouy-Chapman.
Suite à l'application du champ électrique, les cations du BGE migreront vers l'anode en entrainant les autres molécules de solvant, ainsi que les analytes.
Grâce au flux électroosmotique, il est possible de séparer en une seule méthode, des mélanges d'analytes anioniques cationiques et neutres. Chaque composé est soumis à une **mobilité électroosmotique (μ_{eo})**, qui dépend de la nature et du pH du BGE. Bien évidemment afin de pouvoir séparer des anions, la mobilité électroosmotique doit être plus importante que la mobilité électrophorétique du composé (Figure 11).

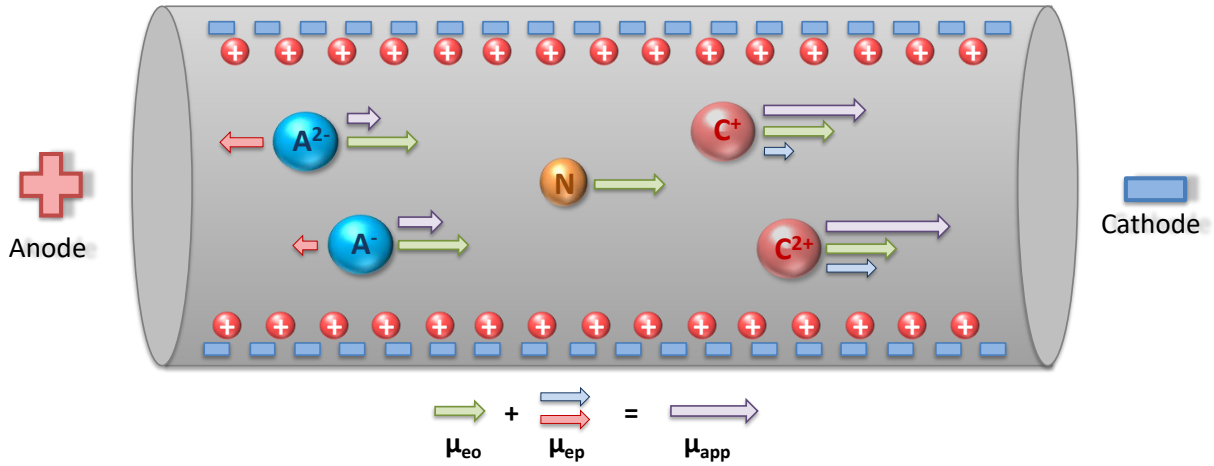


Figure 11 : représentation d'une séparation d'anions (A) cations (C) et neutres (N).

La **mobilité apparente (μ_{app})** est la mobilité résultante de la somme de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique.

De ce fait, la ***vitesse apparente*** sera définie comme égale au produit de la mobilité apparente et de l'intensité du champ électrique.

$$\nu_{app} = \mu_{app} \times E$$

$$\text{avec } \mu_{app} = \mu eo + \mu ep$$

ν_{app} : vitesse apparente / μ_{app} : mobilité apparente / E : intensité du champ électrique

Équation 4 : définition de vitesse apparente.

Cette technique permet de séparer et de quantifier de nombreuses molécules. La détection peut aller des macromolécules telles que des enzymes, protéines, anticorps, mais aussi des molécules plus petites comme des peptides, oligonucléotides, nucléotides, oligosaccharides jusqu'à la séparation des ions inorganiques tels que les nitrates, chlorures et sulfates.

2. Le suivi de la réaction MG

Une méthode générale permettant d'étudier l'activité de la myrosinase vis-à-vis des glucosinolates, a déjà été mise en place préalablement au sein de l'équipe analytique de notre laboratoire. [109] Ce protocole est basé sur la quantification de l'ion sulfate formé lors de la réaction enzymatique (Schéma 52), à l'aide d'un détecteur conductimétrique qui peut être couplé à l'électrophorèse capillaire.

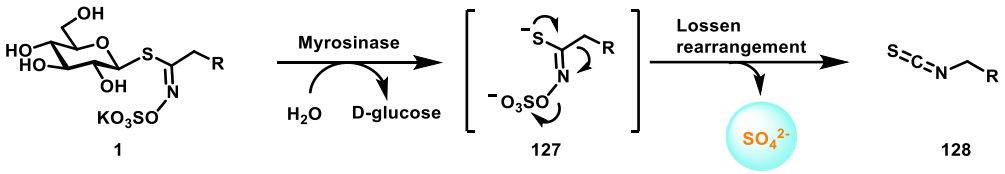


Schéma 52 : réaction d'hydrolyse d'un glucosinolate par la myrosinase.

a. La méthode utilisée

Pour ce type de séparations, un capillaire assez court (35 cm) ayant un diamètre interne de 50 µm a été employé. Le tampon de séparation est constitué d'acide acétique et d'histidine, à pH 4 ; ce choix a été fait par rapport à la nature des analytes à séparer et de la detection C^4D. En appliquant une pression négative à l'extrémité du capillaire il est possible d'injecter un faible volume d'échantillon (24.6 nL), et ensuite de réaliser une séparation rapide (3 min).

Grâce à ce protocole analytique, la réaction enzymatique peut être suivie grâce à la détection du sulfate, sous-produit commun à toutes les hydrolyses de glucosinolates réalisées par la myrosinase.
De plus, quelle que soit la nature du substrat employé dans la réaction, la méthode de séparation, ainsi que le type de BGE et les temps d'analyse resteront les mêmes car le sulfate, qui est le produit de la réaction enzymatique demeure le même.
Cette méthode a d'autres avantages comme un temps d'analyse très court (5 min) pour chaque échantillon incluant le temps de rinçage du capillaire. De plus, les quantités de produits nécessaires pour une analyse sont de l'ordre du nanolitre, à comparer au microlitre dans le cas de l'HPLC.

b. Les essais enzymatiques off-line

Un essai *off-line* sous-entend que la réaction enzymatique est tout d'abord réalisée dans un vial externe à l'appareil puis est stoppée par désactivation de l'enzyme pour terminer par une analyse de l'échantillon par EC afin de quantifier le sulfate produit dans le milieu réactionnel.

[109] R. Nehmé, H. Nehmé, G. Roux, D. Cerniauskaite, P. Morin, P. Rollin, A. Tatibouët, *Anal. Chim. Acta* **2014**, *807*, 153–158.

Pour chaque réaction, une solution de substrat a été laissée réagir pendant 5 minutes avec l'enzyme. Après ce temps la réaction est placée à 125°C pendant 3 min afin de désactiver complètement la myrosinase (Figure 12). Une étude a permis de valider ces conditions : des températures plus faibles ou des temps d'inactivation plus courts ont montré une présence résiduelle d'activité enzymatique.

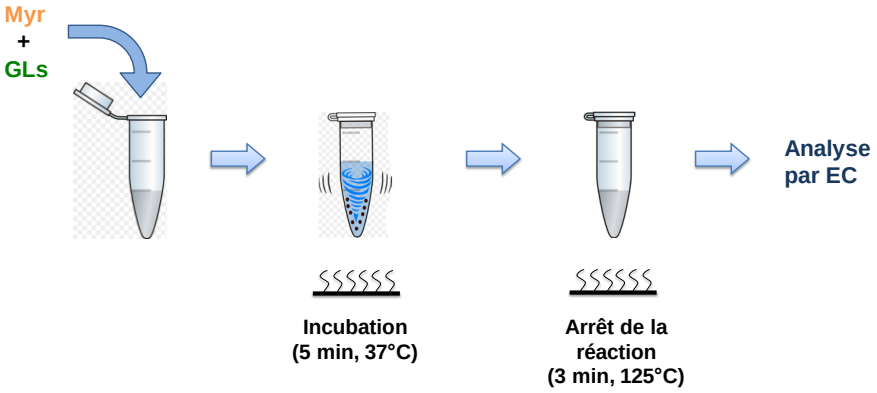


Figure 12 : réaction enzymatique pour l'analyse en électrophorèse capillaire

Lors de l'étude enzymatique des différents glucosinolates, une optimisation du volume réactionnel a été réalisée afin d'économiser des réactifs, souvent très précieux étant donné le nombre et la variété des tests réalisés. Dans le cadre de ce travail, il a été possible de réaliser des réactions avec 7 µL de substrat en solution dans le tampon d'incubation phosphate (pH 7), et 1 µL de solution d'enzyme.
Les résultats obtenus en travaillant sur ces faibles volumes ont été validés par une bonne reproductibilité des expériences ainsi qu'en réalisant des comparaisons avec des volumes plus importantes (200 µL) (Tableau 4).

V tot	**K_m (mM)**	**V_{max} (mM min^{-1})**
200 µL	**0.68** ± 0.1	**0.32** ± 0.01
7 µL	**0.62** ± 0.1	**0.31** ± 0.01

Tableau 4 : comparaison K_m et V_{max} entre les réactions faites avec un volume total de 200 µL et 7 µL pour le glucosinolate sinigrine.

D'un point de vue de consommation des réactifs, grâce à cette optimisation, une grande amélioration a pu être réalisée. En effet d'autres analyses enzymatiques réalisées précédemment au sein de l'ICOA, [109] ainsi que par le groupe de R. Iori, [110] ont utilisé respectivement des volumes réactionnels de 400 µL et 1.5 mL, ce qui implique des quantités d'enzyme et de substrat bien plus importantes.

III. Étude cinétique de glucosinolates non naturels

Ayant apporté des modifications majeures sur la chaine latérale du motif glucosinolate, il était impératif de tester l'activité de la myrosinase vis-à-vis de ces nouveaux substrats. En réalisant des essais *off line* et

[110] S. Palmieri, O. Leoni, R. Iori, *Anal. Biochem.* **1982**, *123*, 320–324.

en appliquant la méthode d'électrophorèse capillaire précédemment décrite, une cinétique enzymatique a été réalisée pour chaque molécule permettant le plus souvent d'obtenir les paramètres caractéristiques (K_m et le V_{max}).

Toutes les réactions enzymatiques ont été réalisées en utilisant les mêmes unités d'enzyme (0.05 U_E/mL), et des concentrations de substrat variables permettant d'atteindre la vitesse maximale de la réaction enzymatique.

1. Les glucosinolates à « aglycone » mannosidique

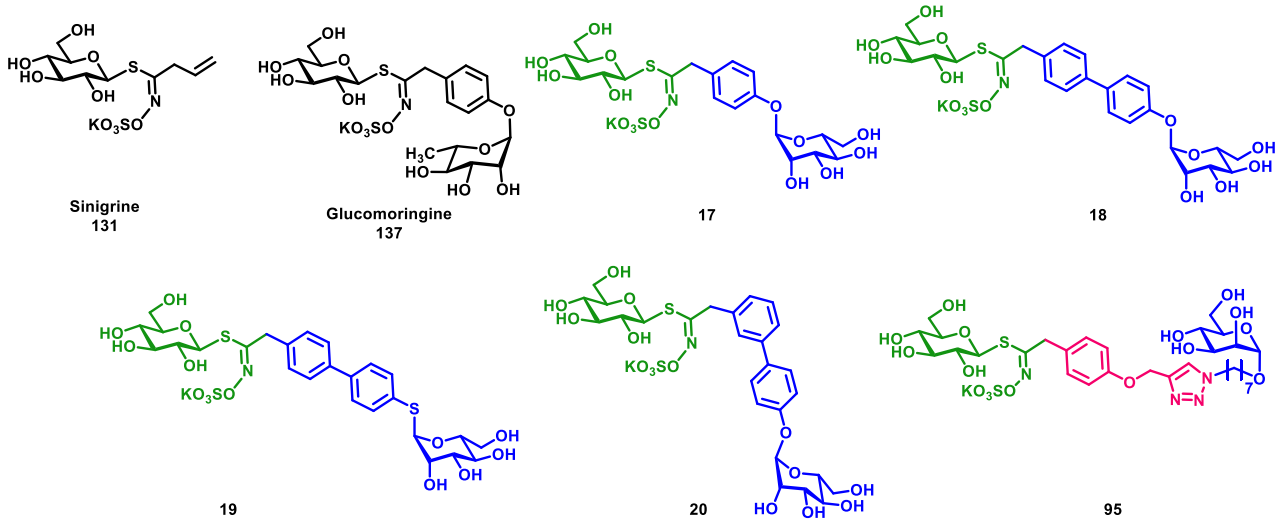


Schéma 53 : glucosinolates mannosidiques, sinigrine et glucomoringine.

La série de glucosinolates portant un résidu α–D-mannopyranoside sur la chaîne latérale a été comparée à la glucomoringine (**137**) (Schéma 53), un substrat naturel possédant une chaîne latérale α-L-rhamnopyranosilbenzyle. Des modifications importantes du squelette glucosinolate ont été apportées telles que l'introduction du système biphényle, nullement présente parmi les glucosinolates naturels. Ceci pourrait induire une prise en charge moins efficace du substrat dans le site actif de la myrosinase. L'introduction du motif triazolyl-heptylmannosyle (**95**) conduit également à une structure pour laquelle il n'existe pas d'analogie parmi les 130 glucosinolates naturels.

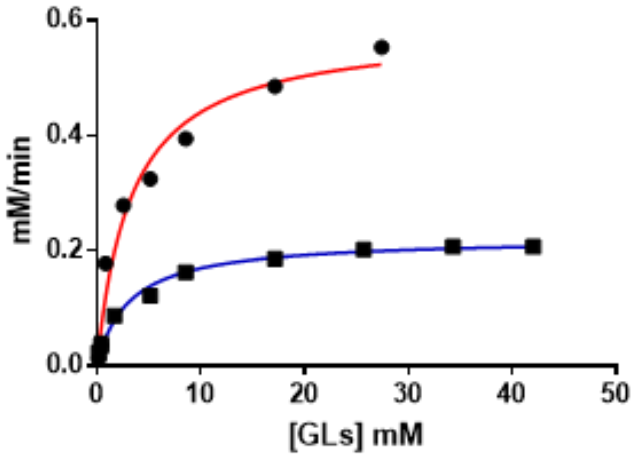


*Figure 13 : courbes de Michaelis-Menten expérimentales pour rouge le GL **19** et bleu **95**.*

Tableau 5 : paramètres cinétiques.

Glucosinolate	K_m (mM)	V_{max} (mM min^{-1})	r^2	V_{max}/K_m (min^{-1})
Sinigrine (131)	0.63 ± 0.10	0.31 ± 0.01	0.982	0.49
Glucomoringine (137)	2.60 ± 0.19	-	0.992	
17	1.31 ± 0.45	0.11 ± 0.01	0.940	0.09
18	3.33 ± 0.79	0.59 ± 0.04	0.972	0.18
19	1.19 ± 0.28	0.42 ± 0.02	0.958	0.35
20	1.79 ± 0.23	0.36 ± 0.01	0.990	0.20
95	3.11 ± 0.46	0.22 ± 0.01	0.987	0.07

D'après les valeurs de K_m et V_{max}/K_m obtenues (Tableau 5), il est possible de déduire que les glucosinolates testés présentent des activités qui restent dans le même ordre de grandeur que les glucosinolates naturels (sinigrine, glucomoringine). Les glucosinolates **18**, **19**, et **20** ont montré des valeurs d'efficacité catalytique proches de la sinigrine, comparés aux autres substrats testés.

D'un point de vue expérimental, les valeurs de V_{max} obtenues montrent que la réaction enzymatique avec les substrats non naturels, peut se faire à des vitesses réactionnelles proches de celle de la sinigrine, dont la structure est très réduite par rapport à celle des glucosinolates mannosidiques. Dans le cas des GLs **18**, **19**, et **20** avec des V_{max} légèrement plus élevées.
En comparant les vitesses maximales, les glucosinolates heptyl mannoside (**95**) et le phényl mannoside (**17**) montrent une hydrolyse légèrement plus lente comparée à la sinigrine et aux autres glucosinolates biphényl mannose. Le comportement du glucosinolate heptyl mannoside était attendu en raison de sa structure plus grande et par la présence d'un bras espaceur flexible et hydrophobe qui sépare les deux groupements hydrophiles.

Les cinétiques plus rapides des glucosinolates de type biphényle sont probablement dues à une plus grande stabilité du groupement partant, et donc du produit d'hydrolyse, par rapport au dérivé phényle et heptyl. Cela favoriserait la deuxième étape de la réaction enzymatique et ainsi l'avancement de la réaction.

En conclusion, malgré les modifications qui ont été apportées sur le squelette glucosinolate, cette étude confirme leur rôle de substrat de la myrosinase, avec des paramètres cinétiques tout à fait encourageants, proches des molécules naturelles.

2. Les glucosinolates portant une fonction orthogonale

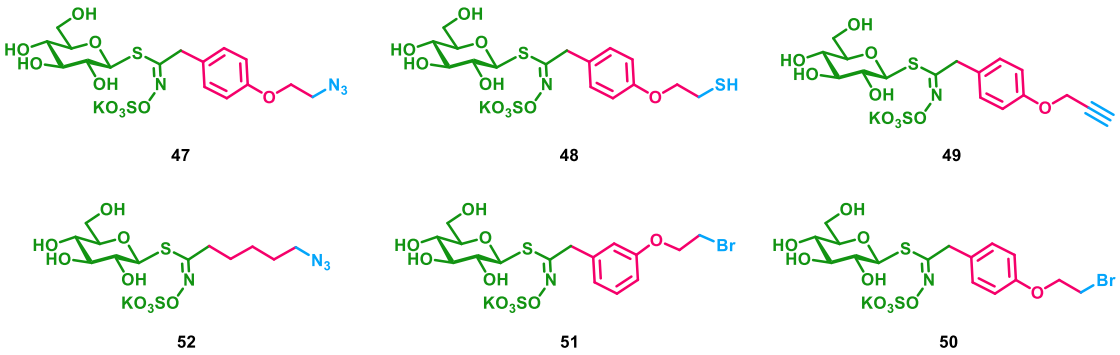


Schéma 54 : glucosinolates orthogonaux

Les paramètres cinétiques des glucosinolates **47**, **48** et **49** sont reportés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : premier lot de glucosinolates orthogonaux.

Glucosinolate	K_m (mM)	V_{max} (mM min^{-1})	r^2	V_{max}/K_m (min^{-1})
Sinigrine (131)	0.63 ± 0.10	0.31 ± 0.01	0.982	0.49
47	1.06 ± 0.39	0.12 ± 0.01	0.910	0.11
48	1.57 ± 0.64	0.56 ± 0.06	0.969	0.35
49	0.73 ± 0.26	0.08 ± 0.01	0.921	0.11

Ce premier lot de glucosinolates à fonction orthogonale a donné des résultats de K_m et V_{max} très comparables à la sinigrine. Cela était attendu car tous ces dérivés aromatiques présentent une structure très proche de la glucosinalbine (molécule **66**, Schéma 51) substrat naturel de cette myrosinase extraite de Sinapis Alba.

Les trois autres glucosinolates **50, 51 et 52** ont été testés dans un second temps. Pour des raisons d'ordre pratique un autre appareil d'électrophorèse capillaire, équipé d'un nouveau détecteur conductimétrique a été employé pour cette étude. De même, la myrosinase utilisée pour ces tests ne provient pas du même lot de production que la première utilisée.

Tableau 7 : deuxième lot de glucosinolates orthogonaux

Glucosinolate	K_m (µM)	V_{max} (µM min^{-1})	r^2	V_{max}/K_m (min^{-1})
Sinigrine	5.1 ± 2.3	23.9 ± 0.1	0.695	4.7
$(CH_2)_5N_3$	6 ± 1.7	25.4 ± 0.7	0.822	4.2
Para Br	4.3 ± 1.2	21.4 ± 0.6	0.824	5
Br méta	5.6 ± 1.7	21 ± 0.6	0.806	3.7

D'après les résultats obtenus, les valeurs de K_m ainsi que des vitesses maximales V_{max} sont de l'ordre du µM plutôt que du mM, comme dans les cas précédents. Probablement le changement d'équipement mais aussi des différences dans la qualité de l'enzyme ont pu causer ces différentes valeurs de K_m. Le fait d'utiliser la sinigrine en tant que standard lors des différentes études permet encore une fois de comparer l'activité de ces glucosinolates synthétisés. Il est possible de remarquer par les paramètres cinétiques que les activités enzymatiques des glucosinolates non naturels et de la sinigrine sont comparables, comme pour la série de molécules testée précédemment (Tableau 6).

L'allure des courbes obtenues pour ces glucosinolates peut confirmer en quelques sorte l'hypothèse de la différence de qualité d'enzyme. La Figure 14 montre une comparaison entre les profiles cinétiques de la sinigrine obtenus avec les différents lots d'enzyme.

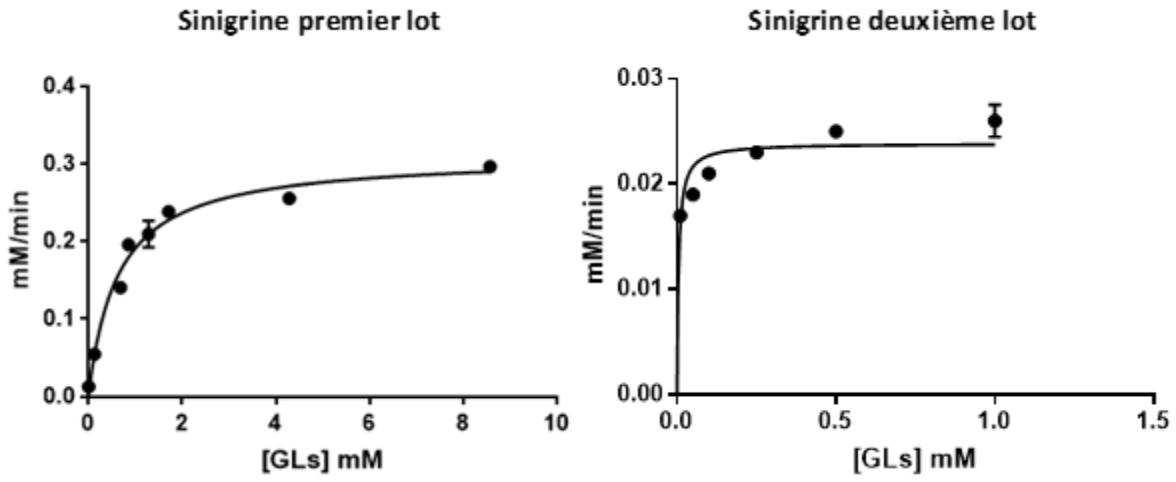


Figure 14 : courbes cinétiques de la sinigrine avec premier et deuxième lot de myrosinase.

Hormis le fait que les vitesses réactionnelles et les concentrations auxquelles la réaction atteint le V_{max} ne sont pas du même ordre de grandeur, graphiquement il est évident que le premier lot d'enzyme possède une cinétique plus lente, en raison de la pente moins importante (Figure 14, gauche). Au contraire, la courbe de droite montre une pente très exacerbée, ce qui signifie que pour ce deuxième lot de myrosinase, l'enzyme est plus rapidement saturée par le substrat. Cela indique que ce lot de myrosinase commercial possède une plus faible quantité d'enzyme active.

Les profils graphiques des autres glucosinolates sont en accord avec celui présenté pour la sinigrine.

3. Les glucosinolates fluorescents

Les quatre glucosinolates fluorescents (Schéma 55) représentent un défi remarquable pour la catalyse enzymatique. La présence de groupements fluorophore très volumineux, et dans le cas de la fluorescéine peu soluble, pourrait causer un ralentissement de la cinétique mais encore plus, l'impossibilité d'hydrolyser ces composés à l'aide de la myrosinase.

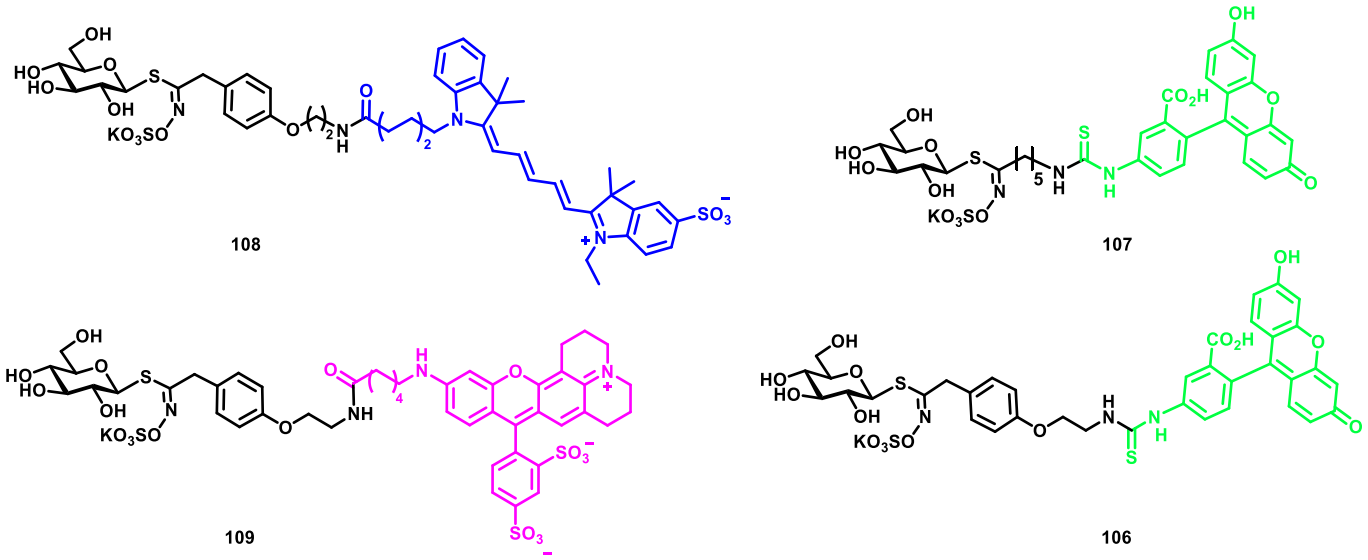


Schéma 55 : glucosinolates fluorescents.

Ces quatre substrats ont été testés de la même façon que les autres, c'est à dire en traçant des courbes permettant de corréler la vitesse réactionnelle en fonction de la concentration de substrat. A la différence des substrats plus simples, des concentrations très élevés de glucosinolate ont dû être employées, parfois jusqu'au 60 mM, ce qui correspond à la limite de solubilité des substrats dans l'eau.
Ces essais ont été réalisés avec une myrosinase de meilleure qualité, la même utilisée pour les analyses du premier lot de GLs.

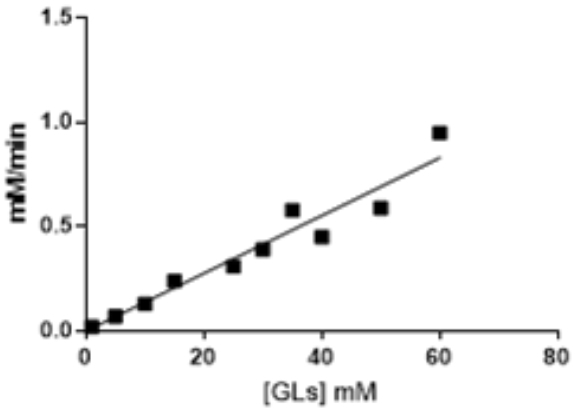


*Figure 15 : courbe cinétique du glucosinolate **109.***

D'après les profils des courbes obtenues (un exemple en Figure 15), il est confirmé que tous les glucosinolates fluorescents sont des substrats de la myrosinase. En effet, il est possible d'observer une proportionnalité directe de l'augmentation de la vitesse réactionnelle en fonction de la concentration de substrat.

Toutefois, l'allure des graphes obtenus ne permet pas de déterminer la constante de Michaelis-Menten ni la vitesse maximale. Cela est dû au fait que les courbes obtenues ne présentent aucun plateau correspondant à la saturation de l'enzyme et donc à la vitesse maximale, ce qui donne une courbe représentant exclusivement le domaine de linéarité d'une courbe de Michaelis-Menten.

Tableau 8 : paramètres cinétiques des GLs fluorescents.

Glucosinolate	K_m (mM)
108	> 50
107	> 50
109	> 60
106	> 40

Cette étude a permis de confirmer l'activité de la myrosinase sur ces glucosinolates et ceci tout en gardant les mêmes conditions réactionnelles que celles utilisées pour les substrats plus simples (des temps réactionnels courts (5 min) avec large excès de glucosinolate par rapport à l'enzyme). Plus précisément, une quantité catalytique infime correspondant à 2 10^{-4} % mol d'enzyme a été utilisé pour catalyser la réaction d'hydrolyse à 10 mM de substrat.

L'approche pouvant mener à l'obtention des constantes cinétiques.

Probablement pour déterminer les valeurs de K_m et V_{max}, une étude plus approfondie devrait être menée. Pour ce faire, des nouvelles conditions réactionnelles qui permettent d'apprécier une cinétique plus importante devraient être identifiées, tout en respectant les conditions du steady-state (très large excès

de substrat par rapport à l'enzyme). Cependant, le choix de nouvelles valeurs de temps d'incubation et de concentration d'enzyme peut se révéler très laborieux.
Par la suite, si le résultat de cette recherche préliminaire est positif, pour chaque substrat il faudrait réaliser en moyenne une douzaine de réactions enzymatiques permettant d'évaluer la cinétique sous ces nouvelles conditions, et probablement les valeurs de K_m et V_{max}.

4. Le glucosinolate biotinylé

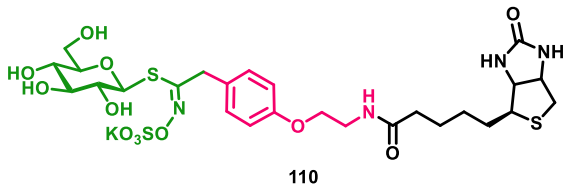


Schéma 56 : glucosinolate biotinylé.

En testant le glucosinolate biotinylée une courbe vitesse-substrat différente a été obtenue, ce qui voudrait dire que l'hydrolyse étudiée ne se fait pas avec un mécanisme qui suit le modèle de Michaelis-Menten.

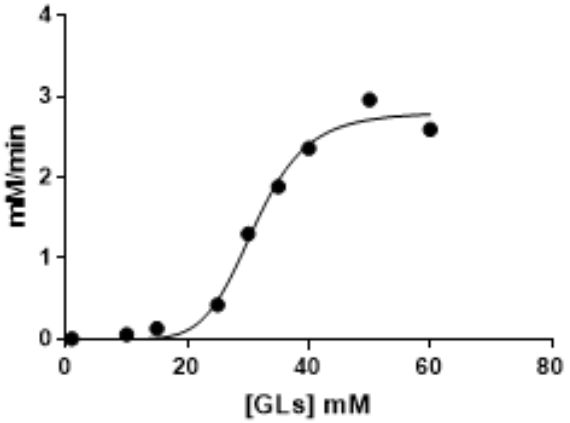


Figure 16 : courbe cinétique sinusoïdale.

En effet, ce type de courbe sinusoïdale (Figure 16), est plutôt décrite par le modèle de Hill, avec une très grande correspondance représentée par le coefficient de détermination r^2= 0.9883. La valeur de K_m pour cette molécule est de **31.12 mM**, avec un V_{max} de **2.8 mM/min**.

Ce modèle mathématique est utilisé pour des système enzymatiques qui subissent une régulation allostérique. Le phénomène d'allostérie, correspond à la modulation de l'activité d'une enzyme par une molécule effectrice, laquelle en se fixant sur un site de la protéine autre que le site actif peut modifier l'activité catalytique de l'enzyme vis-à-vis d'un substrat. La régulation allostérique est due à l'aptitude de la molécule effectrice de pouvoir modifier la structure quaternaire de l'enzyme et aussi à l'enzyme qui

possède un site capable d'engendrer cette modification. Ainsi, l'allostérie peut accélérer ou inhiber la catalyse, ce qui permet aux systèmes vivants de pouvoir en quelque sorte contrôler l'activité enzymatique. [97]
Dans ce contexte, la biotine présente sur la chaîne latérale du glucosinolate joue le rôle de molécule effectrice, ce qui expliquerait le profil cinétique différents de ceux rencontrés avec les autres substrats étudiés. L'activité allostérique est aussi confirmée par la pente de Hill égal à 7.2, à savoir, lorsque cette pente est supérieure à 1, il est possible de définir une cinétique de type allostérique. Cela indique aussi que les deux sous-unités de myrosinase sont coopératives, c'est-à-dire que l'interaction d'une sous-unité avec une molécule effectrice influence aussi le comportement du deuxième dimère.

Le modèle de Hill aboutit à une équation simple permettant de décrire l'allostérie et la coopérativité enzymatique. Il existe en effet d'autres modèles mathématiques plus récents, mais plus difficiles à adopter.

Des tests supplémentaires pourraient aider à avoir plus d'information concernant la nature et l'efficacité de cette allostérie. En effet, en faisant réagir la myrosinase et un glucosinolate (dont la cinétique est connue) en présence de biotine, il serait possible de confirmer que la biotine joue le rôle d'une molécule effectrice. Cette réaction devrait être faite en testant plusieurs concentrations de biotine, pour évaluer l'influence de la biotine sur l'enzyme.

5. Les essais enzymatiques on-line

Une seconde approche d'analyse de la réaction enzymatique est dite « on-line ». Ce test de réaction enzymatique se fait au sein du capillaire, où après un temps d'incubation déterminé, au cours duquel la réaction se déroule, l'application de la tension permet de réaliser la séparation et l'analyse du mélange réactionnel.
Pour que la réaction puisse avoir lieu dans le capillaire, il est important de mettre en pratique un protocole instrumental bien précis. Après le rinçage avec le BGE, il est impératif d'injecter tout d'abord un créneau du tampon d'incubation (IB : Incubation Buffer), lequel protège l'environnement de la réaction du contact avec le BGE. Le contact avec ce dernier pourrait interférer avec le bon déroulement de la réaction enzymatique. Par la suite des créneaux d'injection de l'enzyme (Myr), du substrat (GLs) et du tampon d'incubation suivent dans cet ordre (Figure 17).

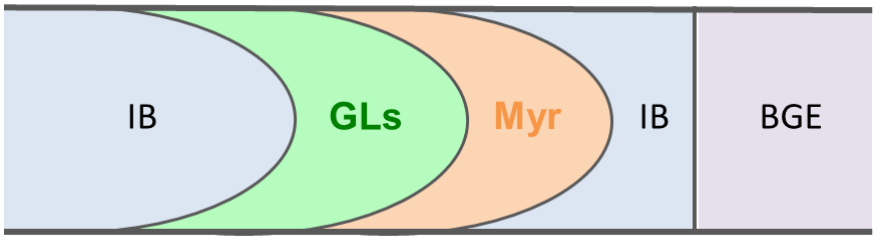


Figure 17 : créneaux d'injection pour une réaction online.

Pour assurer un mélange réactionnel optimal, les trois derniers créneaux d'injection ont des allures laminaires pour favoriser le mélange par diffusion transversale. La première injection toutefois doit avoir un profil rectangulaire afin de réduire le mélange avec le BGE.

En se basant sur les travaux déjà réalisée dans l'équipe analytique, [111] des tests permettant d'optimiser le mode *on-line* avec le système myrosinase-glucosinolate ont été réalisés.

L'avantage de la méthode *on-line* est encore une fois l'économie de produits utilisés, en effet avec une dizaine de microlitres de solutions d'enzyme et de substrat il est possible de mener entièrement une étude cinétique grâce aux faibles volumes d'injection (ordre du nanolitre).

La détermination du K_m et V_{max} avec le mode on-line

En utilisant la méthode d'essai enzymatique *on-line*, il a été possible de déterminer les K_m de certains glucosinolates afin de valider cette nouvelle méthode jamais utilisée auparavant pour la myrosinase.

[111] S. Fayad, P. Morin, R. Nehmé, *J. Chromatogr. A* **2017**, *1529*, 1–28.

En utilisant des conditions enzymatiques proches de celle mise au point précédemment, les temps réactionnels ont été de 10 minutes, il a été possible d'obtenir des courbes de Michaelis-Menten donnant des résultats relativement proches des essais *off-line*.

Le Tableau 9 montre les valeurs de K_m et V_{max} pour la sinigrine testée avec le même lot d'enzyme en mode *on-line* et *off-line*.

Tableau 9 : comparaison des modes on line off line.

	On-line	**Off-line**
K_m *(µM)*	4.8 ± 2	5.2 ± 2
V_{max} *(µM min^{-1})*	16.3 ± 0.7	24 ± 1

La validité de cette méthode a aussi été confirmé par l'étude du glucosinolate pentyl fluorescein (**107**, Schéma 55) lequel a donné un même profil cinétique qu'en mode on line, à savoir un K_m supérieur à 40 mM.

D'après ces résultats, il est possible de déduire que la méthode *on line* déjà largement utilisée pour d'autres essais enzymatiques est applicable au système myrosinase-glucosinolate.

IV. Formation et réactivité de l'isothiocyanate issu de la réaction enzymatique

L'isothiocyanate formé lors de la réaction MG sera l'objet central de cette dernière partie. En effet, après avoir confirmé la capacité de la myrosinase à hydrolyser les différents glucosinolates synthétisés, il est nécessaire de prouver que les substrats hydrolysés donnent des isothiocyanates, et non d'autres produits de dégradation issus des acides thiohydroxamiques produits transitoirement. De plus, il était indispensable d'identifier les conditions idéales pour former efficacement et rapidement l'isothiocyanate par voie enzymatique, pour pouvoir ensuite tester les différents partenaires nucléophiles permettant de réaliser une bioconjugaison.

1. Le couplage de l'isothiocyanate avec des thiols

L'isothiocyanate est une fonction très réactive, qui selon sa structure peut se dégrader rapidement pendant les purifications. De plus, concernant sa caractérisation, il n'est pas facile de prouver la présence de l'isothiocyanate par RMN ^{13}C, ni par spectrométrie de masse. En effet, le signal du carbone sp de l'isothiocyanate est normalement détecté entre 140 et 150 ppm, dans la même plage de déplacement chimique que les carbones des nitriles, ou des isocyanates.
Par ailleurs, suite à plusieurs analyses réalisées par spectrométrie de masse, certains isothiocyanates ont pu être identifiés. Cependant l'ionisation pae ESI de ces composés est très difficile, ce qui explique une mauvaise reproductibilité de ces résultats. Afin de pouvoir confirmer la formation de ces électrophiles forts, une dérivatisation avec des thiols a été réalisée, ce qui permet d'obtenir un dithiocarbamate, produit stable et facilement caractérisable.

Deux conditions réactionnelles ont été employées afin de dérivatiser les isothiocyanates : une première (A), en utilisant de l'éthanethiol et une base, dans un système biphasique eau-dichlorométhane, une deuxième (B) se basant sur une réaction dans l'eau, en présence du benzyl mercaptan (Schéma 57).

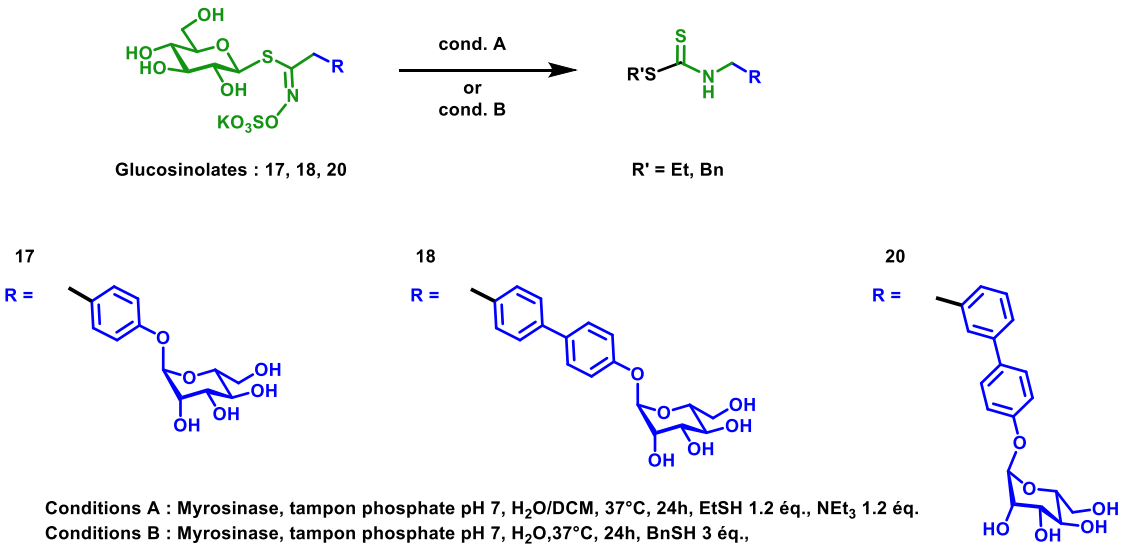


Schéma 57 : test de piégeage de l'isothiocyanate.

Grâce aux conditions A, il a été possible d'obtenir les dithiocarbamates **138** et **140** avec des bons rendements à l'aide de la triéthylamine qui favorise l'addition du thiol sur l'électrophile. L'utilisation du système biphasique permet d'utiliser une base organique sans pour autant gêner l'action de la myrosinase, ces conditions ont été inspirées par les travaux précédemment effectués au laboratoire par De Nicola et *al*. en 2014 [112].

Par la suite, les conditions B ont été mises au point afin d'avoir des conditions plus douces, qui soient le plus proche possible d'une réaction de bioconjugaison. Le choix du benzyl mercaptan plutôt que l'éthanethiol a été fait en raison de la volatilité de ce dernier. En effet, l'éthanethiol n'est pas complètement miscible dans l'eau, de plus, et en raison de sa volatilité (point d'ébullition 35°C) ce nucléophile peut facilement être éloigné du milieu réactionnel lorsque la réaction est faite uniquement dans l'eau. Cela ne se vérifie pas avec le benzylmercaptan qui possède un point d'ébullition plus élevé (195°C).

En utilisant ces nouvelles conditions, des rendements corrects d'environ 50% pour **139** et **141** et de 80% pour **142** ont été obtenus.

Tableau 10 : rendements des piégeages.

Glucosinolate	Conditions	Rendement	Produit
17	A	64%	**138**
	B	47%	**139**
18	A	81%	**140**
	B	50%	**141**
20	B	80%	**142**

[112] G. De Nicola, P. Rollin, E. Mazzon, R. Iori, *Molecules* **2014**, *19*, 6975–6986.

Ces réactions ont été réalisées en utilisant environ 30 mg de glucosinolate, et chaque composé a été purifié par colonne chromatographique sur phase inverse. Les rendements non-quantitatifs (Tableau 10) peuvent être expliqués par des pertes issues de la purification, mais aussi par la difficulté de suivre la réaction par CCM. Ce mode de suivi peut mener à un arrêt prématuré de la réaction, avant d'avoir atteint la conversion totale.

Grâce à ces dérivatisations il a été possible de caractériser ces produits par RMN du carbone du dithiocarbamate ($\delta_{C=S}$ = 200 ppm) et du proton, mais aussi par HRMS, et ainsi de confirmer la formation de l'isothiocyanate au cours de l'hydrolyse du GL.

2. La réactivité vis-à-vis des acides aminés nucléophiles.

Les isothiocyanates sont connus pour réagir efficacement avec les cystéines et les lysines des protéines, ce qui peut être définie comme étant une réaction click. Des réactions avec des phénols menant à des produits peu stables peuvent aussi être observées. [113]

Avant de procéder avec les différentes stratégies de bioconjugaison, il semblait opportun d'évaluer la faisabilité des couplages avec divers résidus d'aminoacide : la cystéine, la lysine mais aussi la tyrosine et l'histidine. Cette étude permettra de clarifier les conditions de couplages possible (souvent pas claires en littérature) ainsi que d'évaluer les conditions permettant la formation *in-situ* de l'isothiocyanate à partir du glucosinolate. Cette étude a été réalisée sur un glucosinolate modèle, la gluconasturtiine (Schéma 58).

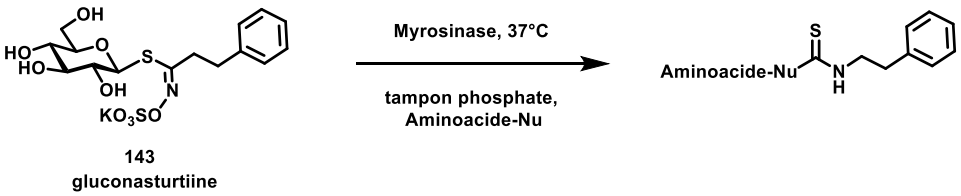


Schéma 58 : réaction model glucosinolate-acide aminé.

La gluconasturtiine a été choisie comme modèle pour la possibilité de synthétiser cette molécule en seulement 4 étapes, en suivant la voie de l'oxime décrite par Botting *et al.*[70] Lors des étapes de sulfatation et désacétylation réalisées sur 6 g de produit, des problèmes remarquables ont été rencontrés, notamment dans les étapes de purification par colonne. A cause de la polarité particulière de ce composé et des grandes quantités mises en jeu, il aurait été préférable de remplacer les colonnes chromatographiques par des cristallisations. Malgré les problèmes rencontrés, il a été possible d'obtenir suffisamment de glucosinolate (2 g) permettant de réaliser l'étude suivante. En 2018, Hewitt et al. [114] ont

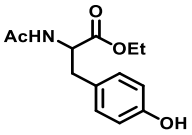
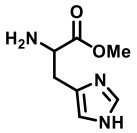
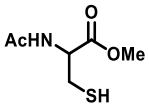
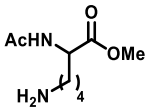
[113] M. Hernandeztriana, J. Kroll, J. Proll, J. Noack, K. Petzke, *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 322–326.
[114] Y. Lim, M. Ong, R. Hewitt, *Synthesis* **2018**, *50*, 1640–1650.

décrit une procédure de scale-up (sans purifications sur colonne chromatographique) permettant de synthétiser ce GL à l'échelle de la dizaine de grammes.

En utilisant une quantité catalytique de myrosinase, dans le tampon phosphate en présence de l'acide aminé nucléophile (1 éq.), il est possible de piéger l'isothiocyanate et de former l'adduit issu de cette addition. Cette réaction a été appliquée aux 4 acides aminés nucléophiles précédemment cités, en faisant varier le pH entre 5 et 11 (Tableau 11). Les variations de pH peuvent donner une certaine sélectivité : ainsi, à pH 7 il sera plus facile de faire une ligation avec les thiols plutôt qu'avec la lysine en raison des pKa (8.4 pour la cystéine comparée à 10.5 de l'ammonium de la lysine).

Lors de tous ces essais, l'hydrolyse enzymatique était bien réalisée, cela a été confirmé par le suivi CCM montrant la disparition du glucosinolate de départ, ainsi que la formation d'un produit intermédiaire très apolaire correspondant à l'Isothiocyanate.

Tableau 11: résultats de l'étude de réactivité glucosinolate- acide aminé.

Acide aminé	**Durée**	**pH**	**Résultat**
	5h, 24h	5	Pas de réaction
		7	
		8	
		9	
		11	
	5h, 24h	5	Pas de réaction
		7	
		11	
	5h	5	Pas de réaction
		7	32%
		8	47%
		9	45%
	5-72h	7	Pas de réaction
		8	
		9	
		10	

A l'exception de la cystéine, aucun autre aminoacide n'a conduit à la formation d'un produit d'addition. Dans le cas de la tyrosine et de l'histidine, ce résultat était attendu en raison de l'instabilité des éventuels adduits formés.
Cependant, les tests réalisés en présence de lysine à des pH basiques auraient dû mener à l'obtention du dithiocarbamate sans aucune difficulté.
Afin d'être sûr que le problème de réactivité ne soit pas dû au système myrosinase glucosinolate, le test suivant a été realisé.

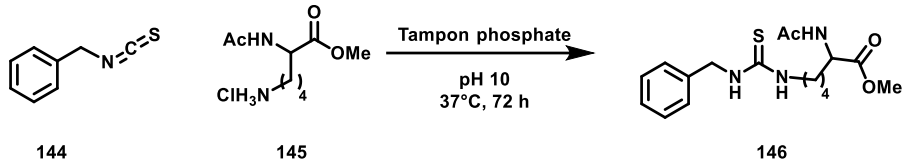


Schéma 59 : réaction entre un isothiocyanate commercial et la lysine

En utilisant le même isothiocyanate commercial, dans des conditions identiques (72h de réaction à 37°C) il est possible d'apercevoir des traces de produit par CCM. Ce résultat démontre une mauvaise réactivité de l'isothiocyanate modèle vis-à-vis de la lysine. Ce comportement peut être expliqué par une différence de polarité entre l'acide aminé fortement hydrophile et l'isothiocyanate très hydrophobe. Comparés aux exemples de bioconjugaison classiques réalisés avec le benzyl isothiocyanate, [113] l'utilisation d'une simple lysine plutôt qu'un fragment protéique possédant le résidu lysine, joue certainement un rôle discriminant dans ce type de couplage.

Bien évidemment, dans ce contexte, l'utilisation d'un co-solvant organique aurait favorisée cette condensation, ce qui est confirmé avec un exemple de bioconjugaison réalisé entre l'albumine et le benzyl isothiocyanate dans un mélange eau/éthanol 50/50. [115]

Dans ce cas, aucune amélioration nette n'a été observée en utilisant un mélange eau-acétonitrile 95/5 et 50/50. Quoi qu'il en soit, en ayant la volonté de se servir de la myrosinase, et de respecter des principes de bioconjugaison, une utilisation d'un co-solvant à 50% ne serait pas envisageable.

Afin de prouver que cette faible réactivité est dûe au modèle choisi, le glucosinolate (V) a été engagé dans ce couplage avec la lysine. A la différence du précédent substrat, celui-ci forme un isothiocyanate hydrosoluble, grâce à la présence du mannopyranoside sur sa chaine latérale.

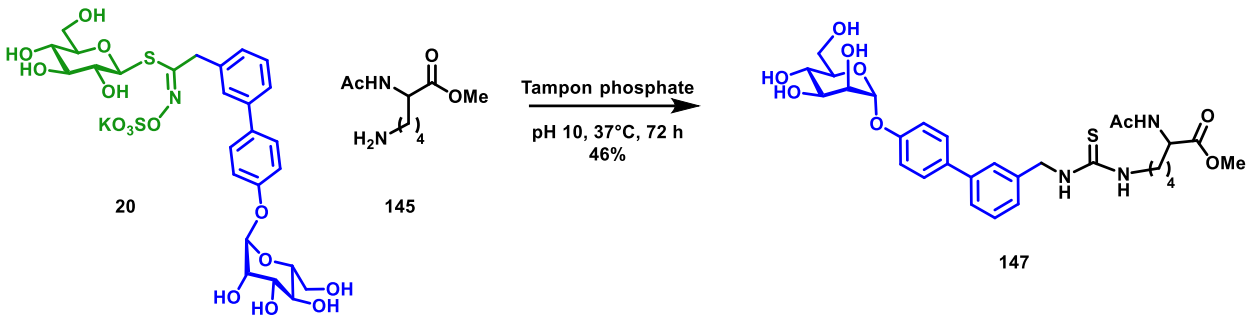


Schéma 60 : réaction entre le glucosinolate mannoside et la lysine.

De ce fait, il a été possible d'obtenir le thiocarbamate, avec un rendement de 46%, après purification par une colonne chromatographique en phase inverse.

Mis à part des informations précieuses concernant la réactivité intrinsèque des isothiocyanates hydrophobes et hydrophiles, cette étude a permis de constater que la myrosinase est capable de travailler dans des conditions de pH très variées. Cela encore une fois peut être attribué aux propriétés structurales

[115] J. Kroll, J. Noack, H. Rawel, R. Kroeck, J. Proll, *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 337–345.

de la myrosinase, comme par exemple le fort degré de glycosylation et la présence de nombreux ponts salins stabilisant la structure quaternaire.

3. Condensation de l'isothiocyanate avec des propargylamines

Hormis les additions avec les cystéines et les lysines, les isothiocyanates ont récemment été utilisés par l'équipe de Clausen pour mettre au point une conjugaison entre des lipides et des peptides modifiés avec une fonction propargylamines (**148**) et la fluorescéine isothiocyanate. [116]

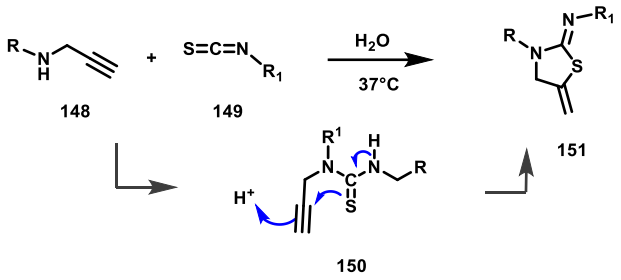


Schéma 61 : cyclisation entre une propargylamine et un isothiocyanate.

Cette méthode permet d'accéder à un dérivé de type thiazolidine (**151**) grâce à une réaction réalisée en milieu aqueux et sans aucun catalyseur (Schéma 61).
Ce type de cyclisation a été appliqué au système myrosinase-glucosinolate en étudiant la compatibilité avec différents glucosinolates, mais aussi en changeant la nature des propargylamines. Cela aurait permis d'élargir le panel de partenaires nucléophiles pouvant être employés dans des bioconjugaisons réalisées par le système MG.

a. Compatibilité avec les glucosinolates

En utilisant un protocole one-pot, il a été possible d'obtenir le produit de cyclisation pour trois glucosinolates (Schéma 62).

[116] H. M.-F. Viart, T. S. Larsen, C. Tassone, T. L. Andresen, M. H. Clausen, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7800–7802.

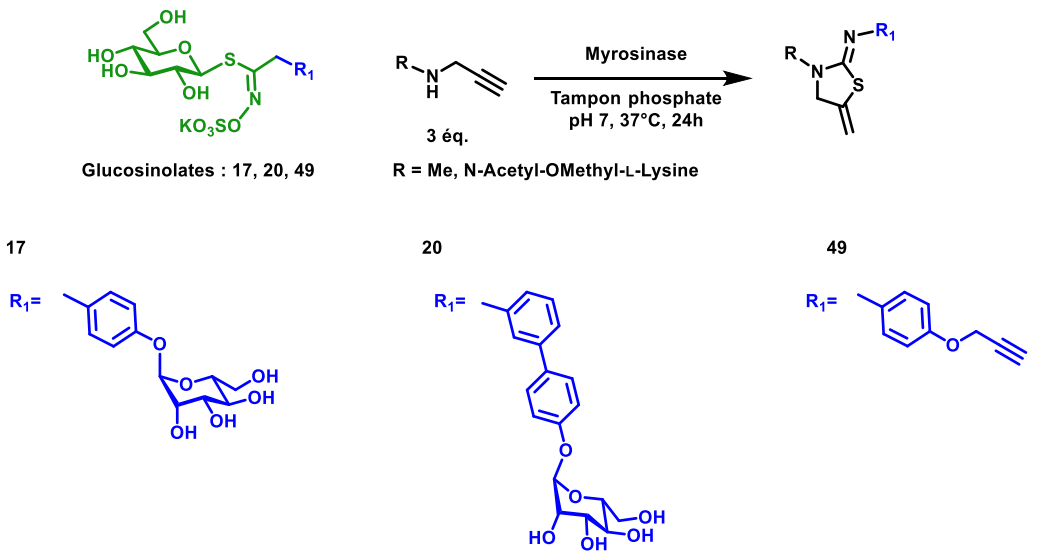


Schéma 62: réaction avec différents glucosinolates.

Différentes structures de glucosinolates conduisant à des isothiocyanates hydrophiles (GLs **17** et **20**) mais aussi hydrophobes (GL **49**) ont été testées, ce qui a donné d'excellents rendements de 70 et 86% (Tableau 12).

Par RMN du proton, il est possible de confirmer cette structure par les pics caractéristiques des protons éthyléniques, qui se présentent le plus souvent sous forme de deux multiplets et dans certains cas de triplets dédoublés (aux alentours de 5 ppm).

Tableau 12 : rendements des réactions de cyclisation

Glucosinolate	R	Rendement	Produit
17	Me	70%	152
49	Me	86%	153
20	NAc-OMe-Lys	36%	154

Cette réaction a aussi été réalisée en utilisant le glucosinolate (**20**) et la L-propargyl lysine N-acétyl-O-méthyl ester, ce qui pourrait mener ensuite à l'utilisation de cette réaction pour greffer des molécules sur des peptides possédants des propargyl lysine. Le faible rendement de cette dernière réaction peut probablement être dû à des pertes de produit lors de la purification en phase inverse. En effet, la réaction a montré une conversion totale par un suivi en spectrométrie de masse.

b. La chromatographie liquide haute performance – spectrométrie de masse (LC-MS) comme outils de suivi de la réaction.

La difficulté de suivre ces réactions par CCM, mais aussi la nécessité d'utiliser de faibles quantités de substrat, qui conduisent à des rendements très variables, nous a obligé à utiliser un suivi analytique plus adéquat, réalisé par LC-MS.
Mis à part la possibilité d'évaluer une conversion de la réaction grâce au détecteur UV, à l'aide de cette technique séparative il est possible de suivre de plus près les transformations chimiques avec la détection de la masse des intermédiaires réactionnels. En effet, lors de cette réaction enzymatique avec les propargylamines, il y a nécessité de suivre premièrement l'hydrolyse du glucosinolate, ensuite l'étape d'addition et/ou de cyclisation. De plus, une vision plus claire sur les différentes étapes permet d'optimiser les temps et conditions de réaction.

Initialement, une colonne chromatographique de silice greffée C-18 (Waters Xtera C18 2.1 x 50m, 3.5µm) a été utilisée pour tester la séparation de plusieurs glucosinolates. Cependant, l'utilisation de ce support n'a pas donné de résultat positif ; cela est dû à la double nature de ces substrats à la fois très polaires, en raison de la présence du sulfate et des quatre hydroxyles libres, mais aussi apolaires, à cause de la partie aromatique.

De ce fait, d'autres colonnes chromatographiques ont été testées : **Hypercarb** (Thermo Fisher), **Zorbax-Cyano** (Agilent Technologies), et **Kinetex-F5** (Phenomenex). A la différence des colonnes de silice greffées par des chaines à 18 atomes de carbone, ces supports sont très utilisés pour séparer des composés avec une polarité plus importante. Cela est dû essentiellement à la nature de la phase stationnaire qui diffère pour ces trois supports.

La colonne **Hypercarb** est constituée de graphite, un matériau qui permet de séparer des molécules très polaires tels que les nucléotides. En présence d'une entité chargée, les feuillets de graphène polarisés créent des interactions charge-dipôle puis grâce à la forte hydrophobicité, créent des interactions hydrophobes avec les groupements des analytes.

Le support **Zorbax-Cyano**, est constitué d'une silice greffée avec des fonctions cyanopropyldimethylsilanes, lesquels assurent principalement des interactions de type dipôle-dipôle.

La colonne **Kinetex F-5** (Phenomenex Kinetex 2.36µm Core Shell F-5, 2.1 x 100 mm, 100 Å) est formé de silice greffée avec des fonctions pentafluorophényles à l'aide d'un espaceur hydrophobe, ce qui lui confère d'excellentes propriétés séparatives. Son mécanisme de rétention est basé sur des interactions hydrophobes, $\pi-\pi$ et dipôle-dipôle et interaction ioniques, cela grâce à l'aromaticité du groupement phényle et à la forte polarité des fluorures.

L'utilisation de la colonne Hypercarb dans le cas des glucosinolates, n'a pas donné de résultat positif. En effet, à cause de la partie aromatique souvent trop importante, comparée à la seule charge du sulfate, les substrats n'étaient pas bien élués.

En revanche, le support Zorbax-Cyano et Kinetex-F5 ont donné des résultats nettement supérieurs à l'Hypercarb et à la phase inverse C-18. Afin de comparer les performances des deux colonnes et de choisir le support le plus versatile, plusieurs molécules d'intérêt ont été injectées.

La Figure 18 montre deux analyses de la gluconasturtiine réalisées avec une colonne RP C18 (à gauche) et avec la colonne Kinetex F5 (à droite). Il est évident qu'avec la colonne F5 une rétention optimale permet d'obtenir un pic symétrique et bien résolu avec un temps d'analyse réduit (12 min vs 7 min).

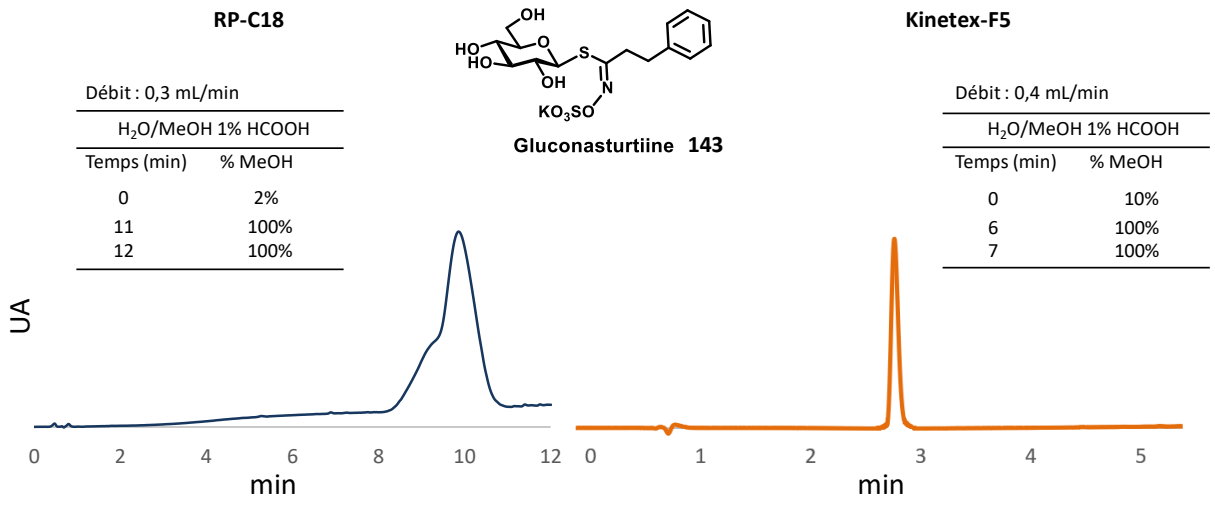


Figure 18: comparaison des chromatogrammes avec la colonne RP-C18 (à gauche), Kinetex-F5 (à droite).

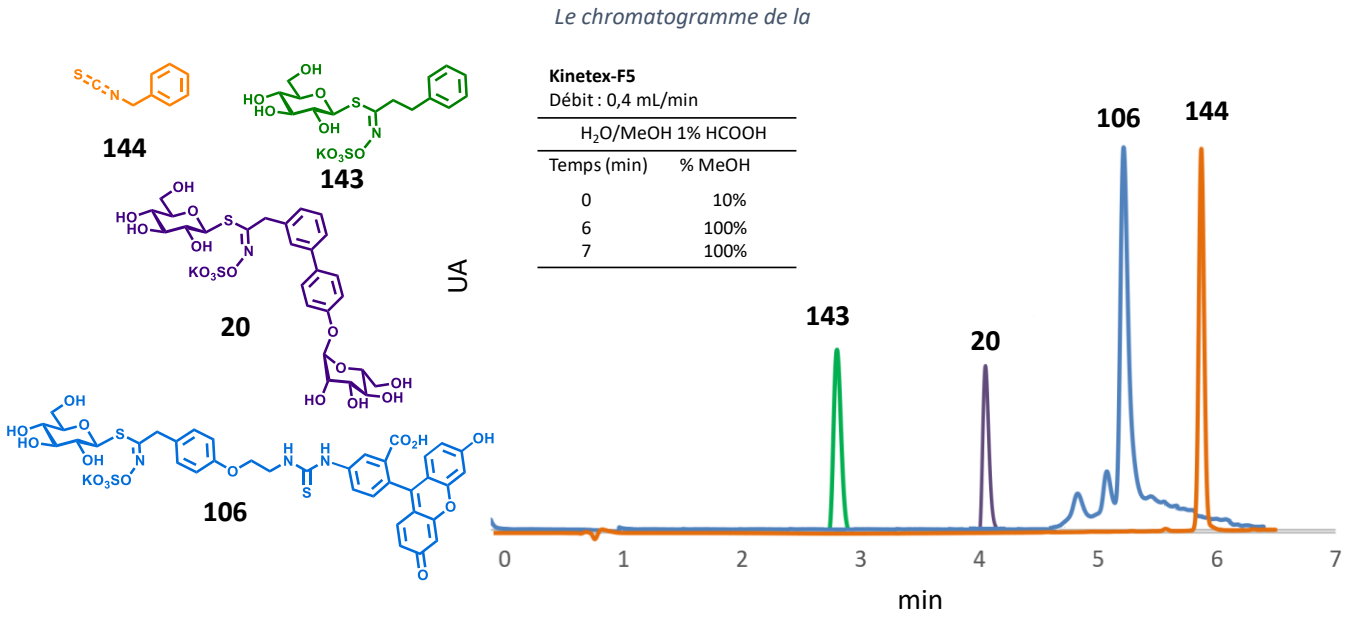


Figure 19 montre l'analyse de plusieurs glucosinolates ainsi que du benzyl isothiocyanate réalisée avec la colonne Kinetex-F5.

Concernant la phase mobile, le mélange eau-méthanol avec 0.1% d'acide formique a été choisi comme étant le plus adapté.

Grâce à ce support, il est possible de séparer des molécules possédant des polarités très différentes en utilisant le même gradient.

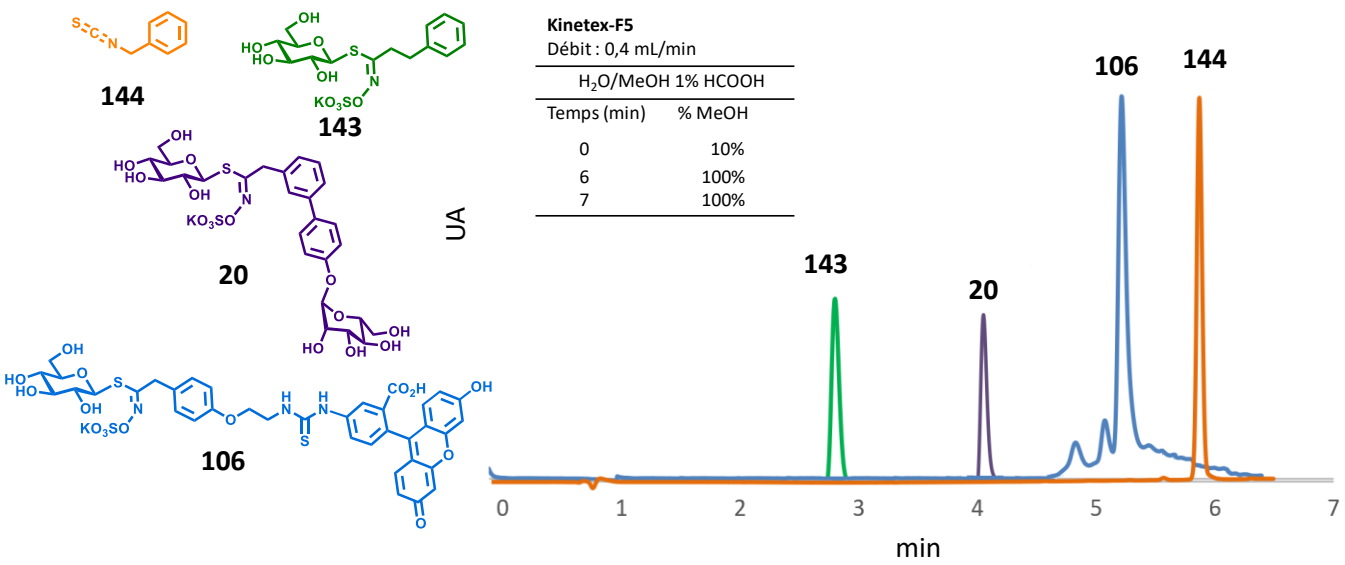


Figure 19: chromatogrammes obtenus avec la colonne Kinetex-F5.

Grâce à cette colonne (longueur 100 mm, diamètre interne 2.6 µm, porosité de 60 Å), il a été possible de séparer plusieurs composés en utilisant un gradient très rapide. Le support Zorbax donne aussi de bonnes résolutions de séparation, mais avec des temps d'analyses plus longs. Pour cette raison, la colonne F-5 a été choisie pour les séparations futures.

Après plusieurs optimisations, une séparation de 6 min avec un débit de 0.4 mL/min a été mise en place, avec un gradient allant de 20% de méthanol jusqu'à 100% en 6 min, et ensuite 1 min à 100% de méthanol, le tout avec le 1% d'acide formique. Avant chaque séparation est prévue une étape d'équilibration de 3 min. Au global, une analyse prend moins de 10 min.

c. L'amélioration de la cinétique d'hydrolyse grâce au suivi LC-MS

En ayant l'outil permettant de suivre ce type de réactions, l'optimisation d'une réaction modèle entre le glucosinolate alcyne et la propargylamine a été réalisée.

Pour cette nouvelle série de réactions, le tampon phosphate pH 7 a été remplacé par une solution d'acétate d'ammonium (pH 7), bien que ce ne soit pas un vrai système tampon. Ce changement de tampon est nécessaire pour l'utilisation de la LC-MS. Elle nécessite l'utilisation de tampons volatiles afin de ne pas obstruer l'appareil avec des sels inorganiques.
Suite à une comparaison entre la réaction conduite dans le tampon phosphate et celle dans l'acétate d'ammonium, il a été possible de montrer que le changement de tampon ne conduit à aucune différence de réactivité de la myrosinase.

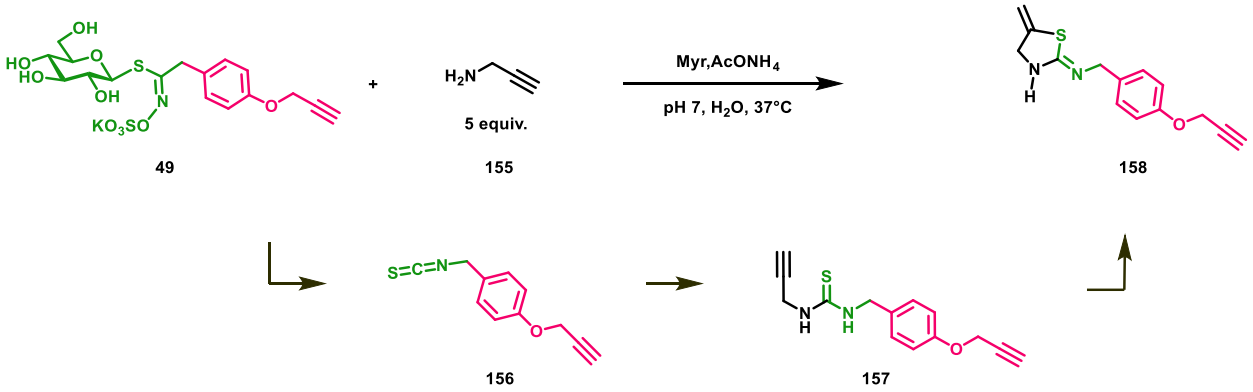


Schéma 63 : réaction modèle avec la propargylamine.

Grâce au suivi LC-MS, l'hydrolyse du glucosinolate a été confirmée, ainsi que la formation de la thiourée intermédiaire qui se convertit finalement en thiazolidine. Cependant l'hydrolyse complète du glucosinolate nécessite environ 18h.

En modifiant les proportions d'enzyme par rapport à la quantité de glucosinolate, il a été possible de moduler la réaction et d'obtenir 100% d'hydrolyse de glucosinolate en isothiocyanate, en seulement une heure de réaction (Tableau 13).

Tableau 13 : optimisation de l'hydrolyse du glucosinolate par la myrosinase.

Entrée	**GL µmol**	**[GL] mM**	**U_E /µmol**	**Temps**	**Hydrolyse**	**U_E ***
1	2.8	6	0.018	18h	100%	1.43
2	**2**	**20**	**0.13**	**1h**	**100%**	**11**
3	2	20	0.75	1h	100%	60
4	2	20	0.065	1h	60%	5.2
5	**80**	**20**	**0.027**	**3h**	**92%**	**2.16**

** Unités d'enzyme nécessaires pour une réaction avec 40 mg (80 µmol) de glucosinolate.*

Dans le Tableau 13, les paramètres de la réaction sont détaillés : le ratio unités d'enzyme par µmol de glucosinolate permet de standardiser la quantité d'enzyme ajoutée dans chaque test par rapport à la quantité de glucosinolate.

Dans ce tableau, les unités d'enzyme nécessaire pour reproduire une réaction avec 40 mg du glucosinolate-alcyne (en respectant le ratio U_E/µmol) sont aussi insérées. Cela permet de visualiser

rapidement les conditions nécessaires pour réaliser cette réaction sur une plus grande échelle. Par exemple dans le cas de l'entrée 2, l'hydrolyse est réalisée très rapidement, cependant elle nécessite 11 unités d'enzyme, ce qui correspond à presque la moitié d'un flacon de myrosinase commercialisé par Sigma Aldrich, avec un coût de 125 euros.

En revanche, ces mêmes conditions sont parfaitement utilisables pour des tests à l'échelle du mg de glucosinolate et donc aussi pour des réactions de bioconjugaison réalisées avec quelques nanomoles de substrat.

Les chromatogrammes en Figure 20 illustrent l'avancement de la réaction. Après seulement 30 minutes il est possible d'observer des traces de glucosinolates (**GL**), l'isothiocyanate (**ITC**) et majoritairement la thiourée intermédiaire majoritaire (**U**).

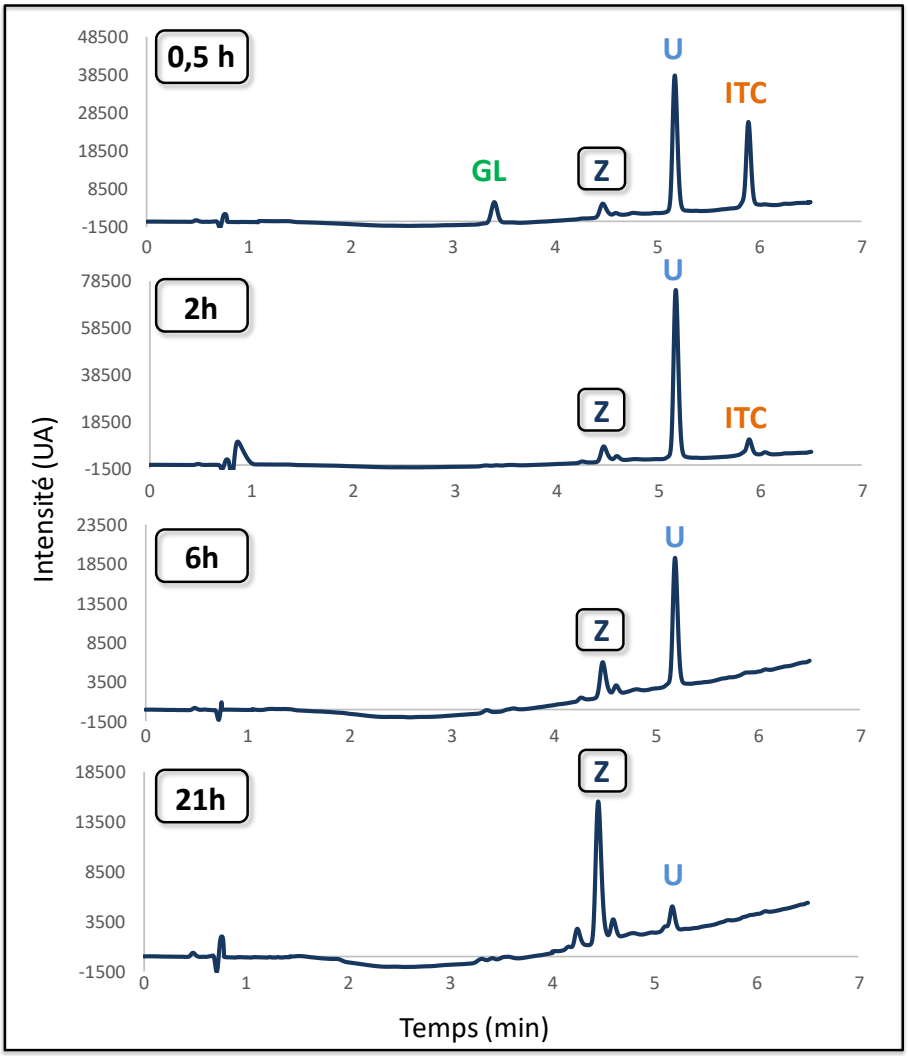


Figure 20 : chromatogrammes du suivi cinétique.

Le suivi cinétique montre que l'isothiocyanate est complètement consommé après 2 heures de réaction. Il faut ensuite attendre environ 24 heures de réaction pour observer la cyclisation totale de la thio-urée en thiazolidine (**Z**).

Visiblement l'étape limitante n'est pas l'hydrolyse mais semble être la cyclisation.

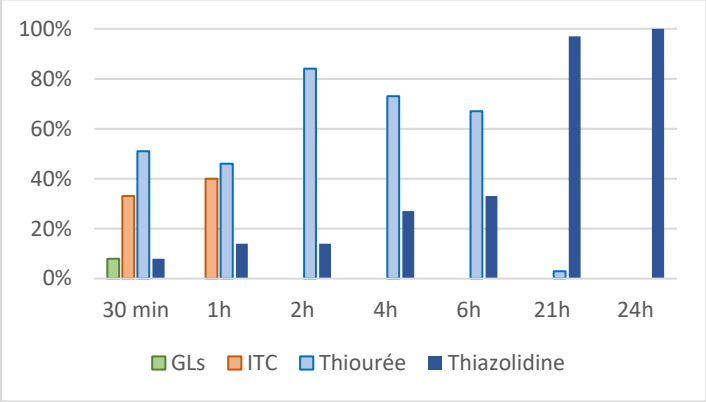


Figure 21 : évolution de la réaction.

La Figure 21 montre le taux de conversion au long de la réaction calculé par absorbance UV à 254 nm.

d. Exemplification

Les conditions optimisées (entrée 5 Tableau 13) ont été utilisées afin de réaliser une exemplification permettant d'évaluer les limites de cette réaction réalisée dans des conditions très douces.

En comparant avec les autres conditions (Tableau 13), le fait d'utiliser 0.027 U_E /µmol (entrée 5) permet d'observer un 'hydrolyse complète du GL en 3h, tout en économisant une grande quantité de myrosinase.

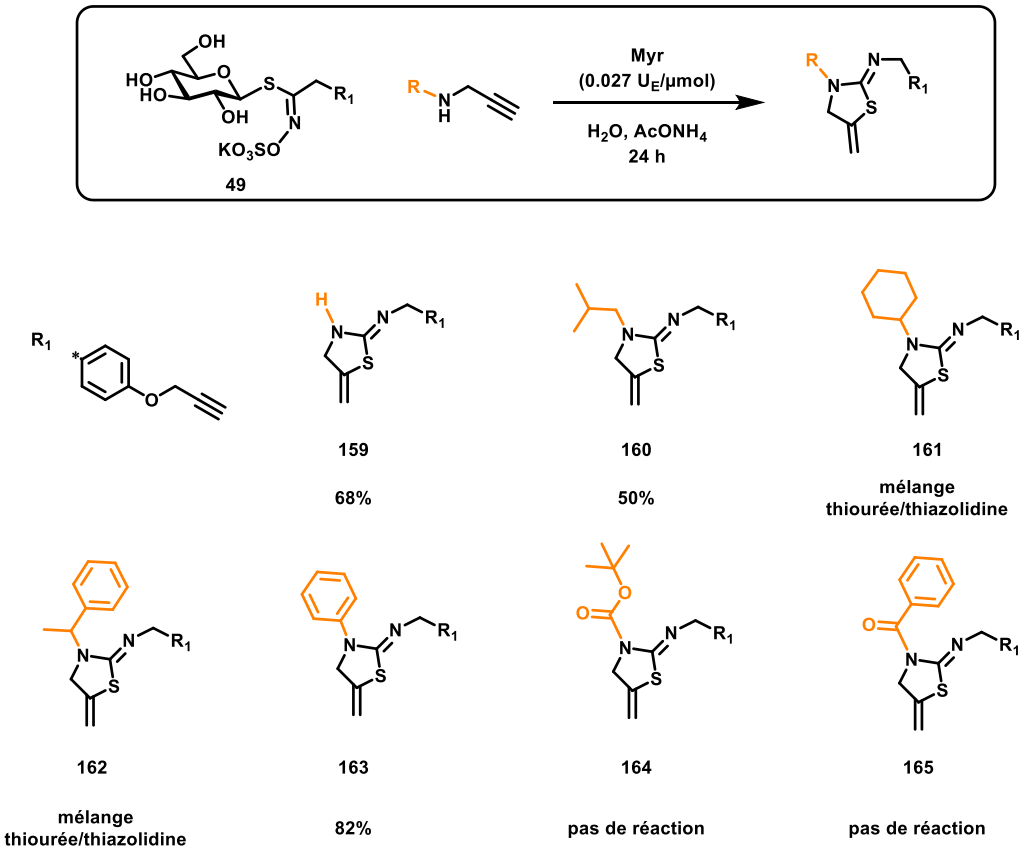


Schéma 64 : exemplification de la réaction.

Par RMN du proton il est aisé de détecter la présence de la thiourée en mélange avec la thiazolidine grâce à la présence du proton acétylénique de la propargylamine (triplet à environ 2.2 ppm). D'autre part la cyclisation est facilement identifiable par le signal caractéristique des deux protons éthyléniques, sous forme de deux triplets dédoublés (ou deux multiplets) à environ 5 ppm.

En exemplifiant cette réaction il a été possible de synthétiser 4 thiazolidines : avec la propargylamine, l'isobutyl propargylamine et la phényl propargylamine. Les propargylamines portant des groupements alkyles encombrées ont donné des mélanges thio-urée/thiazolidine inséparables. La présence de chaines alkyles encombrée pourrait expliquer ce résultat par une conformation de la thiourée moins adaptée à la

cyclisation (**166b**, Schéma 65). La réalisation de la réaction par activation thermique aurait probablement favorisé la formation du produit cyclique.

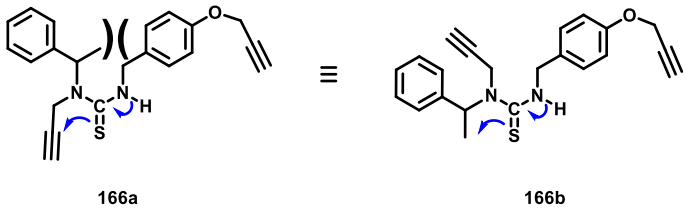


Schéma 65 : conformères de la thio-urée intermédiaire.

En revanche en présence du groupement phényle, bien qu'il semble plus encombré que d'autres propargylamines, la réaction est nettement favorisée, un rendement de 82% (**163**) est obtenu. Cela peut être expliqué par des effets électroniques de conjugaison qui stabilisent la thiazolidine formée.

Les propargylamines portant des groupements désactivants de type carbonyle n'ont donné aucune réaction, probablement en raison de la faible nucléophilie de l'azote impliqué dans des liaisons de type carbamate (**164)** et amide (**165**).

La réactivité prometteuse de la phénylpropargylamine ouvre la possibilité de tester d'autres propargylamines de type phényl activés ou désactivés pour améliorer la cinétique de cyclisation. En effet, le fait d'avoir une réaction plus rapide et plus sélective pourrait promouvoir l'utilisation de cette réaction en bioconjugaison.

V. Conclusion

En conclusion, grâce au travail présenté dans ce chapitre, il a été possible de montrer l'activité enzymatique de la myrosinase sur des glucosinolates non naturels et de déterminer leurs caractéristiques cinétiques.

Les tests de réactivité sur les glucosinolates et la fonction isothiocyanate ainsi formée donnent la possibilité de mieux choisir les partenaires pour une approche de bioconjugaison ainsi qu'une modulation des conditions réactionnelles, telles que le ratio enzyme substrat et le pH. Cela a été possible par le développement analytique d'une séparation en LC-MS. Ce travail permet donc de pouvoir introduire le système MG dans le monde de la bioconjugaison, pour des couplages avec des fonctions thiols à un pH 7 et des amines avec des pH basiques. L'utilisation de propargylamines est également une alternative complémentaire pour la formation de système thiazolidine/thiourée à pH 7.

Chapitre 3

Le système MG en bioconjugaison

Chapitre 3 Le système MG en bioconjugaison

Dans ce chapitre, nous présentons le contexte biologique, le domaine des lectines, puis les évaluations des interactions des glucosinolates synthétisés avec des lectines. Nous aborderons ensuite les approches de bioconjugaison réalisées par le biais du système MG et plus précisément la synthèse de néoglycoprotéines, la bioconjugaison sélective (« site selective labeling ») réalisée sur une lectine modèle et enfin les approches de fonctionnalisation de nanoparticules avec des glucosinolates.

I. Les Lectines

1. Introduction

Les lectines furent découvertes pour la première fois par P.H. Stillmark en 1888, [117] suite à des travaux menés sur les graines de ricin. Suite aux études menés sur la lectine végétale Concanavaline A, il fut possible de confirmer que les lectines sont des protéines destinées à se lier à des saccharides. [118] Dans les années 1950, de nombreuses études notamment en immunologie ont mené à la découverte d'hémagglutinines réagissant spécifiquement avec les globules rouges du sang humain. [119] Ces travaux ont été réalisés par Boyd et Shapleigh, qui ont ainsi choisi le terme lectine pour nommer ces protéines. [120] Ce mot provient du mot latin *legere* (choisir) et avait pour but d'exprimer la capacité de ces protéines à se fixer sur certaines substances d'une façon sélective. De ce fait et en accord avec la définition de Goldstein, [121] les lectines sont des protéines d'origine non-immunes qui se lient à des glucides. Elles ont la propriété d'agglutiner des cellules et/ou de précipiter des glycoconjugués. Ces protéines peuvent se lier à des mono ou polysaccharides, libres ou liés à des cellules. L'interaction avec des monosaccharides est plus faible que celle avec des polysaccharides.
Le fait que les lectines soient présentes dans le monde animal, végétal, chez les bactéries et les virus, laisse à penser que ces protéines jouent un rôle fondamental dans les mécanismes cellulaires des êtres vivants.

De nos jours on distingue plusieurs classifications des lectines. La classification plus courante définit 4 groupes de lectines selon leur affinité envers des saccharides (glucose/mannose, galactose et *N*-acetyl-D-galactosamine, L-fucose, acide sialique). [122] Il est aussi possible de differencier les lectines selon leur origine : animale, bacterienne virale et vegetale. [123]

---

[117] R. D. Cummings, R. L. Schnaar, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al.), Cold Spring Harbor (NY), **2015**.
[118] J. B. Sumner, S. F. Howell, *J. Bacteriol.* **1936**, *32*, 227–237.
[119] W. M. Watkins, W. T. J. Morgan, *Nature* **1952**, *169*, 825–826.
[120] W. C. Boyd, E. Shapleigh, *Science* **1954**, *119*, 419.
[121] Goldstein, IJ; Hughes, RC; Monsigny, M; Osawa, T; Sharon, N., *Nature* **1980**, *285*, 66.
[122] Kk. Kumar, Gs. Reddy, B. Reddy, Pc. Shekar, J. Sumanthi, Kl. P. Chandra, *J. Orofac. Sci.* **2012**, *4*, 20.
[123] A. Varki, M. E. Etzler, R. D. Cummings, J. D. Esko, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**.

2. Rôle biologique

Le rôle des lectines chez les plantes n'est pas encore parfaitement défini. En raison d'une forte concentration de lectines dans les graines et de leur toxicité, elles jouent probablement un rôle de défense contre les insectes et d'autres pathogènes. [124]

Chez l'animal, les lectines jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de reconnaissance et de l'adhésion cellulaire. En effet, en raison de leur grande affinité envers les saccharides qui recouvrent les membranes cellulaires, elles permettent de réaliser des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Grace à cette machinerie de signalisation il est possible de réguler des mécanismes tels que l'apoptose cellulaire, l'immuno-modulation et l'inflammation. Un exemple du grand intérêt de ces protéines est représenté par la lectine de type C : DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin).[125] Ce récepteur présent chez l'homme est impliqué dans la réponse immunitaire contre divers pathogènes : VIH, [126] VHC, [127] Dengue, [128] Ebola [129] et Leishmania *spp.* [130]

Le rôle chez les bactéries

Parallèlement à la découverte des propriétés d'hémagglutination des lectines, il fut découvert que certaines bactéries avaient aussi le pouvoir d'agglutiner les érythrocytes (globules rouges). Le plus souvent, l'agglutination bactérienne est due à la présence de lectines sur les pili (ou fimbriae) qui recouvrent la surface de certaines bactéries. [131] Dans ces bactéries, les lectines ont ainsi un rôle fondamental puisque ces pathogènes se servent des lectines pour cibler les cellules hôtes à coloniser. En effet, cette reconnaissance cellulaire se réalise par le biais de l'interaction lectine (bactérie pathogène) - saccharide (membrane de la cellule hôte), et elle est dictée par la spécificité de la lectine. En d'autres termes, les agents pathogènes (bactéries et virus) peuvent s'attaquer au « glycocalyx » (« *cell coat* » ou glycolemme) composé de polysaccharides protégeant la membrane externe de la cellule en établissant des interaction très solide et résistante via les lectines.

---

[124] (a) R. Barkai-Golan, D. Mirelman, N. Sharon, *Arch. Microbiol.* **1978**, *116*, 119–121. (b) D. H. Janzen, H. B. Juster, I. E. Liener, *Science* **1976**, *192*, 795–796

[125] B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 661–677.

[126] T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, et al., *Cell* **2000**, *100*, 587–597.

[127] P.-Y. Lozach, H. Lortat-Jacob, A. de Lacroix de Lavalette, I. Staropoli, S. Foung, A. Amara, C. Houles, F. Fieschi, O. Schwartz, J.-L. Virelizier, et al., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20358–20366.

[128] B. Tassaneetrithep, T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, et al., *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 823–829.

[129] C. P. Alvarez, F. Lasala, J. Carrillo, O. Muñiz, A. L. Corbí, R. Delgado, *J. Virol.* **2002**, *76*, 6841–6844.

[130] M. Colmenares, A. Puig-Kröger, O. M. Pello, A. L. Corbí, L. Rivas, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36766–36769.

[131] M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3583–3609.

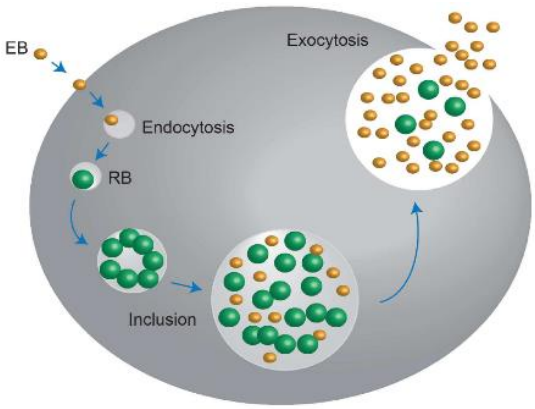


Figure 22 : cycle d'infection bactérienne (EB : elementary body, RB : reticulate body). [132]

Certaines bactéries possèdent des centaines de pili leur permettant d'adhérer aux cellules d'une manière irréversible. Après l'internalisation dans la cellule hôte, la bactérie peut se multiplier et continuer le processus infectieux (Figure 22). [132] Suite à la prolifération, les bactéries peuvent former des communautés bactériennes intracellulaires et développer un biofilm (Figure 23). [133]
Le biofilm est un réseau qui permet de relier une colonie entière de bactéries, en incluant des cellules et des matrices extracellulaires. Cette super-structure est très organisée et coordonnée, ce qui permet aux bactéries de partager des nutriments et de se protéger des agressions externes et aussi des antibiotiques. [134]

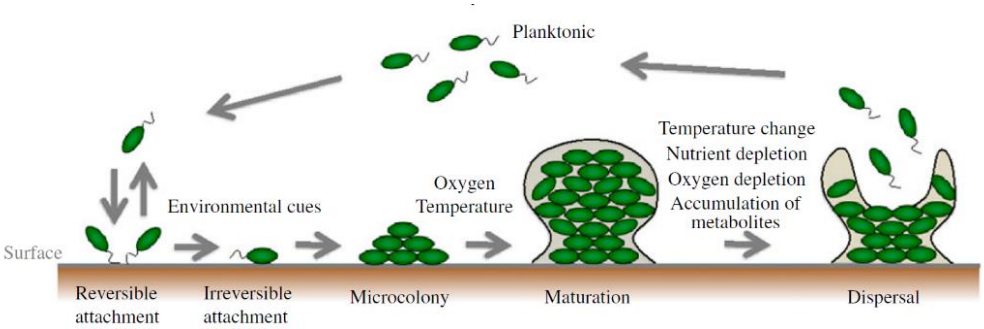


Figure 23 : cycle de formation d'un biofilm. [133]

3. La bactérie Escherichia *coli*

Escherichia *coli* (*E.coli*) est une bactérie gram-négative commensale présente dans le tractus intestinal inférieur des animaux à sang chaud. Cependant certaines souches ont un fort pouvoir pathogène. Elles sont la cause de maladies telles que des gastroentérites, des méningites chez le nourrisson, la maladie de Crohn et l'infection urinaire qui est la maladie la plus commune. Une étude réalisée en 2017 a estimé que

[132] K. A. Redgrove, E. A. McLaughlin, *Front. Immunol.* **2014**, *5*.
[133] M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 7–12.
[134] G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case, *Microbiology an Introduction*, San Francisco, CA Pearson Benjamin Cummings, **2010**.

sur le territoire des Etats Unis, il y a eu environ 400 000 cas d'infection urinaire (UTI ou Urinary Tract Infection) en 2011, avec une augmentation de 50 % entre 1998 et 2011. [135] Cela a eu un cout d'hospitalisation d'environ 28 milliards de dollars. Cela montre l'ampleur de ce type de pathologie et la nécessité d'étudier ces bactéries et leur mode d'action afin de pouvoir proposer des stratégies permettant de bloquer efficacement leurs infections.

Le danger des UTI réside dans la formation d'un biofilm de communités bactériennes intracellulaires. Ce réseau bactérien est logé dans une matrice exopolysaccharidique qui assure la survie des colonies même après le traitement par antibiotiques car ceux-ci n'arrivent pas à pénétrer au cœur du biofilm. Dans certains cas, lorsque le biofilm est dans un état d'incubation, il peut résister pendant des mois après le traitement antibiotique. [136] Le fonctionnement de ce biofilm est extrêmement complexe, il est fondé sur des phénomènes d'adhésion, d'agrégation et de croissance contrôlée de la communité bactérienne. [137] Dans ces processus, les fimbriae de type I de l'*E. coli* jouent un rôle primordial.

a. La stratégie antiadhésive

En raison de l'inefficacité des traitements antibiotiques classiques, due au mécanisme de défense du biofilm et à la résistance bactérienne de plus en plus développée, une stratégie alternative pour combattre ces infections bactériennes a été proposée. La stratégie antiadhésive vise à bloquer les lectines responsables de l'adhésion bactérienne et de la formation du biofilm. Ainsi, l'adhésion des bactéries pathogènes aux cellules hôtes est inhibée, leur élimination se fait plus facilement, en empêchant de ce fait la prolifération et l'infection bactérienne.

b. Les fimbriae de type 1

Depuis plusieurs années, les pili de *E. coli*, responsables de la virulence des bactéries, sont l'objet de nombreuses études qui se focalisent sur leur structure et leur fonctionnement. Ces bactéries sont caractérisées par des *fimbriae* de Type 1 (Figure 24) [138] , qui par définition causent une agglutination des globules rouges chez le porc, et elles peuvent être inhibées par le mannose.

[135] J. E. Simmering, F. Tang, J. E. Cavanaugh, L. A. Polgreen, P. M. Polgreen, *Open Forum Infect. Dis.* **2017**, *4*.
[136] J. D. Schilling, S. J. Hultgren, Int. J. Antimicrob. Agents **2002**, 19, 457–460.
[137] M. A. Schembri, M. Givskov, P. Klemm, Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. **2002**, 15.
[138] E. Hahn, P. Wild, U. Hermanns, P. Sebbel, R. Glockshuber, M. Häner, N. Taschner, P. Burkhard, U. Aebi, S. A. Müller, J. Mol. Biol. **2002**, 323, 845–857.

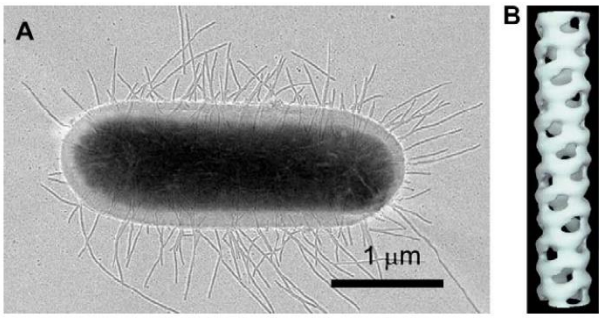


Figure 24 : A : photomicrographie électronique d'une bactérie d'E.coli et des fimbriae ; B : reconstruction 3-D de la tige représentant la base du pilus (hélice constituée du domaine FimA). [138]

Les fimbriae de Type 1 de l'*E.coli* mesurent environ 1-2 µm de longueur et environ 7 nm de largeur et elles s'étendent sur toute la surface de la bactérie. [139] Chaque fimbria est constitué de 4 sous-domaines protéiques dites pilines, nommés respectivement : FimA, FimF, FimG et FimH (Figure 25 : structure des fimbriae de Type 1 de l'E. cFigure 25).[140]

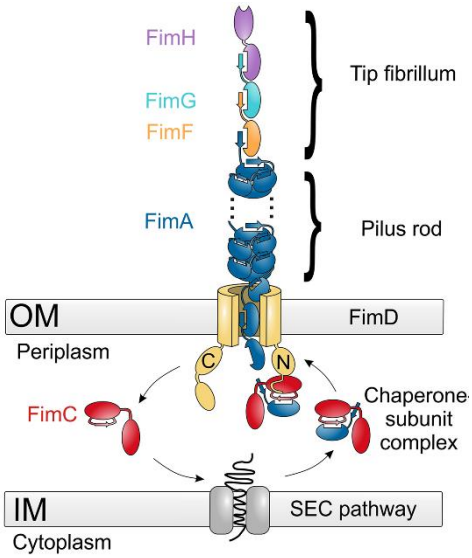


Figure 25 : structure des fimbriae de Type 1 de l'E. coli. [140]

La protéine FimA est une protéine de structure quaternaire hélicoïdale à la base des autres trois domaines, ce qui correspond à la « tige » du pilus. Les domaines FimG et FimF sont des protéines adaptatrices ayant comme rôle de médier l'interaction protéine-protéine afin de pouvoir réaliser des complexes multiprotéiques et de communiquer avec l'environnement interne de la bactérie. FimC est une protéine chaperonne responsable de l'étape de maturation des autres protéines du pilus.

[139] S. D. Knight, J. Bouckaert, in Glycosci. Microb. Adhes. (Eds.: T.K. Lindhorst, S. Oscarson), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**, pp. 67–107.
[140] G. Capitani, O. Eidam, R. Glockshuber, M. G. Grütter, *Microbes Infect.* **2006**, *8*, 2284–2290.

Enfin, le domaine FimH correspond à la lectine (dite aussi adhésine) d'*E. coli*. C'est cette dernière qui est responsable de l'adhésion aux surfaces cellulaires. Elle est classée comme étant une lectine à mannose car elle se lie spécifiquement à des mannosides sous forme de mono ou poly-saccharides. [141]

4. La lectine FimH

Le domaine FimH a été largement étudié et de nos jours de nombreuses structures issues de la cristallisation de cette protéine sont accessibles. Un complexe de co-cristallisation de cette lectine avec la protéine FimC, [142] a permis d'identifier la structure de FimH, comme étant constituée de deux domaines. Le premier est le domaine de reconnaissance ou le domaine lectine, et le deuxième est le domaine piline qui permet de s'accrocher à FimG.

FimH possède un site de liaison mannosidique chargé négativement, situé dans le domaine terminal de la lectine. La forte liaison avec le mannose est due à de nombreuses liaisons hydrogène rendues possibles par les résidus acides aminés Asp 54, Gln 133, Asn 135, Asp 140 et Asp 47. Des liaisons hydrophobes sont aussi générées par la présence de Phe 1 et Phe 142.

La série de liaisons hydrogène impliquées avec les oxygènes du mannose (O2, O3, O4, O5, O6) permettent d'avoir une liaison extrêmement sélective pour les α–mannopyranosides et non pour des pyranosides ayant les hydroxyles orientés différemment. [143]

A partir du site de reconnaissance, un collier ou poche hydrophobe dite « tyrosine gate » s'étend jusqu'à l'extrémité terminale de la lectine et est constituée principalement de deux tyrosine (Tyr 48 et Tyr 137). [144] Dans le cas d'une liaison avec le polysaccharide, la « tyrosine gate » est capable d'accepter le deuxième mannose, relié au premier mannoside qui est fixé dans la poche hydrophile. Cette poche hydrophobe crée des interactions avec la face hydrophobe du deuxième mannose, en stabilisant ainsi la liaison de FimH avec les trimannosides. [145] Suite à de nombreuses études cristallographiques, il a été démontré que la « tyrosine gate » peut adopter deux conformations, l'une dite ouverte et l'autre fermée. Cela permet de moduler le type d'interaction avec le ligand. Généralement, la conformation ouverte correspond à un minimum énergétique alors que celle fermée se présente lorsque le ligand possède un aglycone hydrophobe permettant de stabiliser le rapprochement des tyrosines.

---

[141] R. Glockshuber, in New Chem. New Oppor. Expand. Protein Universe, WORLD SCIENTIFIC, **2014**, pp. 287–292.
[142] D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, Science **1999**, 285, 1061–1066.
[143] C.-S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, et al., Mol. Microbiol. **2002**, 44, 903–915.
[144] J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. D. Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C.-S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, et al., Mol. Microbiol. **2005**, 55, 441–455.
[145] A. Wellens, C. Garofalo, H. Nguyen, N. V. Gerven, R. Slättegård, J.-P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, H. D. Greve, S. Hultgren, et al., PLOS ONE **2008**, 3.

a. Les antagonistes de FimH

Comme précisé ci-dessus, la présence d'une poche hydrophobe permet d'accueillir et de créer une forte stabilisation des mannosides possédant des aglycones hydrophobes. De cette façon, les mannosides avec un aglycone aliphatique ont de bonnes affinités avec FimH, notamment l'Heptyl mannoside qui présente un Kd (constante de dissociation) de 5 nM, d'après les travaux de Boukaert en 2008. [145] Une chaine aliphatique à 7 atomes de carbone représente le meilleur compromis entre les degrés de liberté de la chaine carbonée et l'interaction avec la poche hydrophobe. Bien que le Kd estimé par SPR (Surface Plasmon Resonance) soit de l'ordre du nM, pour avoir des effets sur les infections urinaires, une dose d'heptylmannoside de l'ordre du mM est nécessaire.

En 2010, les équipes d'Ernst [146] et de Hultgren [147] ont développé des antagonistes aromatiques initialement explorés par Sharon [148] en 1987. Plus précisément ces travaux ont conduit à des ligands de type biphényl mannosides.

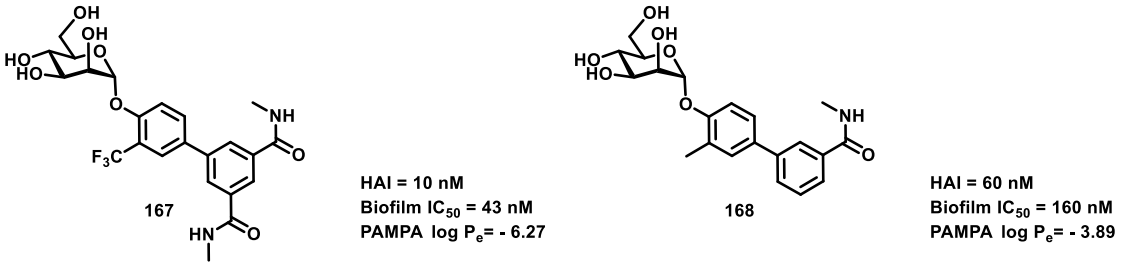


Schéma 66 : meilleurs antagonistes développés par le groupe d'Hultgren. [147]
HAI : hemagglutination inhibition assay ; Biofilm IC_{50} : half maximal inhibitory concentration on bacterial biofilm ; PAMPA : parallel artificial membrane permeability assay.

Grace à une optimisation du « lead », le groupe de Hultgren a développé une molécule (**167**) ayant des effets d'inhibition très intéressants, testée sur l'hémagglutination (HAI) et sur des biofilms (Schéma 66). Cependant ces molécules ne peuvent pas être des candidats médicamenteux très prometteurs à cause de leur solubilité trop élevée en milieu aqueux, ce qui est témoigné par les valeurs de Log P négatives, obtenues par test de perméabilité PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay). En conséquence, ces composés hydrophiles auront une difficulté à passer les membranes des cellules intestinales (faible absorption) mais aussi des valeurs de clairance très élevée, ce qui veut dire qu'ils seront éliminés rapidement du corps humain.

Afin d'améliorer les paramètres d'ADME (**a**bsorption, **d**istribution, **m**étabolisme et **e**xcrétion) une approche prodrogue a été récemment réalisée. Elle vise plus particulièrement l'augmentation de la perméabilité cellulaire et la diminution de la solubilité de ces saccharides biphényl mannosides. [149] En

[146] T. Klein, D. Abgottspon, M. Wittwer, S. Rabbani, J. Herold, X. Jiang, S. Kleeb, C. Lüthi, M. Scharenberg, J. Bezençon, et al., J. Med. Chem. **2010**, 53, 8627–8641.
[147] Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, R. Obermann, W. Nolan, S. A. Wildman, D. Hobbs, T. Ellenberger, C. K. Cusumano, S. J. Hultgren, et al., J. Med. Chem. **2010**, 53, 4779–4792.
[148] N. Firon, S. Ashkenazi, D. Mirelman, I. Ofek, N. Sharon, Infect. Immun. **1987**, 55, 472–476.
[149] W. Schönemann, S. Kleeb, P. Dätwyler, O. Schwardt, B. Ernst, Can. J. Chem. **2016**, 94, 909–919.

effet l'acétylation de l'alcool en position 6 du mannose peut augmenter la biodisponibilité de ce type de molécules.

b. La multivalence et les inhibiteurs multivalents

En raison de la grande quantité de pili présents à la surface des bactéries et de la propriété des lectines à pouvoir se lier à plusieurs carbohydrates, l'utilisation de ligands multivalents a été envisagée afin d'améliorer le pouvoir antiadhésif des inhibiteurs monovalent classiques.

Dans le Schéma 67 trois exemples de ligand multivalents mannosidiques sont présentés.

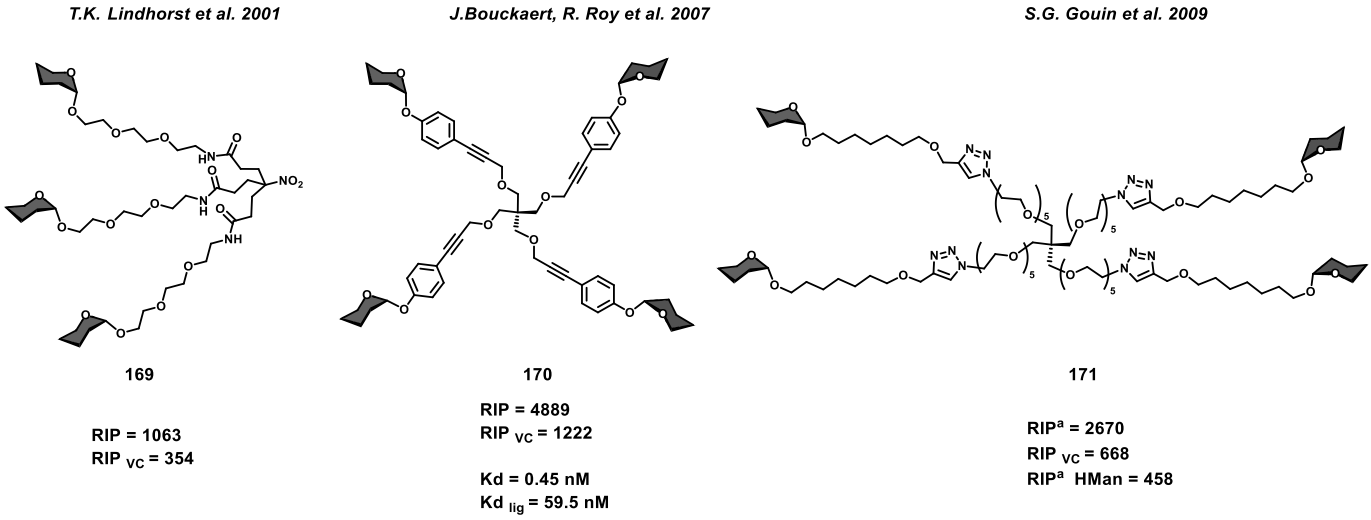


Schéma 67 : exemples de trois glycoclusters multivalents. RIP : relative inhibitor potency based on MeMan IC_{50} ; RIP VC : valency corrected RIP ; Kd lig : Kd of the monovalent ligand ; RIP [a] = RIP based on mannose (RIP Mann = 0.96), RIP [a]HMan : RIP [a] heptyl mannoside.[131, 150]

Les excellents pouvoirs antiadhésifs de ces inhibiteurs ne sont pas uniquement dus à la présence de plusieurs ligands sur la même structure. En effet, les activités de certains inhibiteurs multivalents sont nettement plus importantes que l'additivité de l'activité des ligands qui les composent.

Par exemple le composé tétravalent **171**, a un RIP de 2670, ce qui correspond à 6 fois le RIP de l'heptyl mannoside, et non pas 4 fois. Cette molécule est aussi 8 fois plus active que le ligand heptyl mannoside PEG triazole monovalent qui la constitue. De même le composé **170** montre un Kd 130 fois plus puissant que celui du ligand monovalent.

Cette grande augmentation est due à l'effet de multivalence aussi nommé l'effet cluster. Cet effet peut s'observer lorsqu'un système est caractérisé par des ligands et des récepteurs multivalents. L'effet

[150] (a) M. Touaibia, A. Wellens, T. C. Shiao, Q. Wang, S. Sirois, J. Bouckaert, R. Roy, ChemMedChem **2007**, 2, 1190–1201. (b) S. G. Gouin, A. Wellens, J. Bouckaert, J. Kovensky, ChemMedChem **2009**, 4, 749–755

multivalent s'explique par la coexistence de plusieurs phénomènes tels que **l'effet chélate**, **la recapture statistique** et **la formation de réseaux.** [151]

L'**effet chélate** prévoit une interaction simultanée de plusieurs ligands de la même molécule avec plusieurs sites de reconnaissance du même récepteur. Cela stabilise thermodynamiquement le complexe en raison du plus grand nombre d'interactions qui lie les deux entités. La **recapture statistique** admet que statistiquement la rupture d'une association peut être remplacée par la création d'une nouvelle en raison de la proximité des ligands (localisés sur la même entité). Suite à ce phénomène, l'interaction ligand multivalent-récepteur est incrémentée dans sa globalité car le nombre de liaisons qui lie les deux entités ne peut jamais diminuer drastiquement. La **formation de réseaux** décrit la formation d'un réseau, linéaire ou ramifié, constitué de plusieurs ligands et récepteurs multivalents. La formation de ce dernier favorisera ainsi la stabilisation de tous les complexes impliqués.

Le plus souvent, les interactions créées par les lectines présentes dans la nature sont expliquées par la multivalence. C'est le cas des interactions cellule-cellule, bactérie-cellule et virus-cellule. Les exemples d'antagonistes multivalent commencent par les 3 glycoconjugués du Schéma 71 et s'étendent jusqu'à des glycodendrimères, des neoglycoprotéines et des glyconanoparticules.

II. Activité biologique des GLs mannosidiques

1. Le Glycoprofile®

Les glucosinolates mannosidiques ont été soumis à un criblage vis-à-vis de différentes lectines, dans le but de déterminer un profil de reconnaissance très large. En effet, mis à part un ligand pour les lectines à mannose, ces glucosinolates possèdent aussi un groupement thioglucose qui pourrait interférer avec la reconnaissance des lectines à mannose ou vis-à-vis d'autres lectines.

Grace à un test nommé Glycoprofile [152] et mis au point par l'entreprise GLYcoDiag à Orléans, les glucosinolates mannosidiques (**17**, **18**, **20** et **95**) ont pu être testés sur un ensemble de 19 lectines. Une première série de lectines sélective du mannose : les lectines bactérienne (BC2L-A et FimH), les lectines recombinantes humaines (Langerine et DC-SIGN) et aussi les lectines végétales (ConA, LcH, PSA, VFA, GNA et HHA) ont été testées. Une seconde série de lectines présentant une spécificité pour des motifs saccharidiques différents tels que glucose, N-acétyl glucosamine, fucose, galactose, N-acétyl acide neuraminique et rhamnose a été également explorée.
Tous les GLs mannosidiques à l'exception du dérivé thiomannose ont été soumis à ce screening. Le Schéma 68 présente les Glycoprofiles obtenus : la partie en bleu présente toutes les lectines d'origine

[151] (a) G. Ercolani, L. Schiaffino, Angew. Chem. Int. Ed. **2011**, 50, 1762–1768. (b) Y. Brissonnet, C. Ortiz Mellet, S. Morandat, M. I. Garcia Moreno, D. Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Šesták, K. El Kirat, S. G. Gouin, J. Am. Chem. Soc. **2013**, 135, 18427–18435.
[152] (a) L. Landemarre, P. Cancellieri, E. Duverger, Glycoconj. J. **2013**, 30, 195–203. (b) A. Beck, Ed. , Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals: Methods and Protocols, Humana Press, **2013**

humaine, bactérienne ou végétale spécifiques pour le mannose, les histogrammes en gris correspondent aux lectines spécifiques d'autres motifs saccharidiques mentionnés ci-dessus. Les résultats du screening montrent que les molécules testées présentent une sélectivité d'interaction avec les lectines « à mannose ».

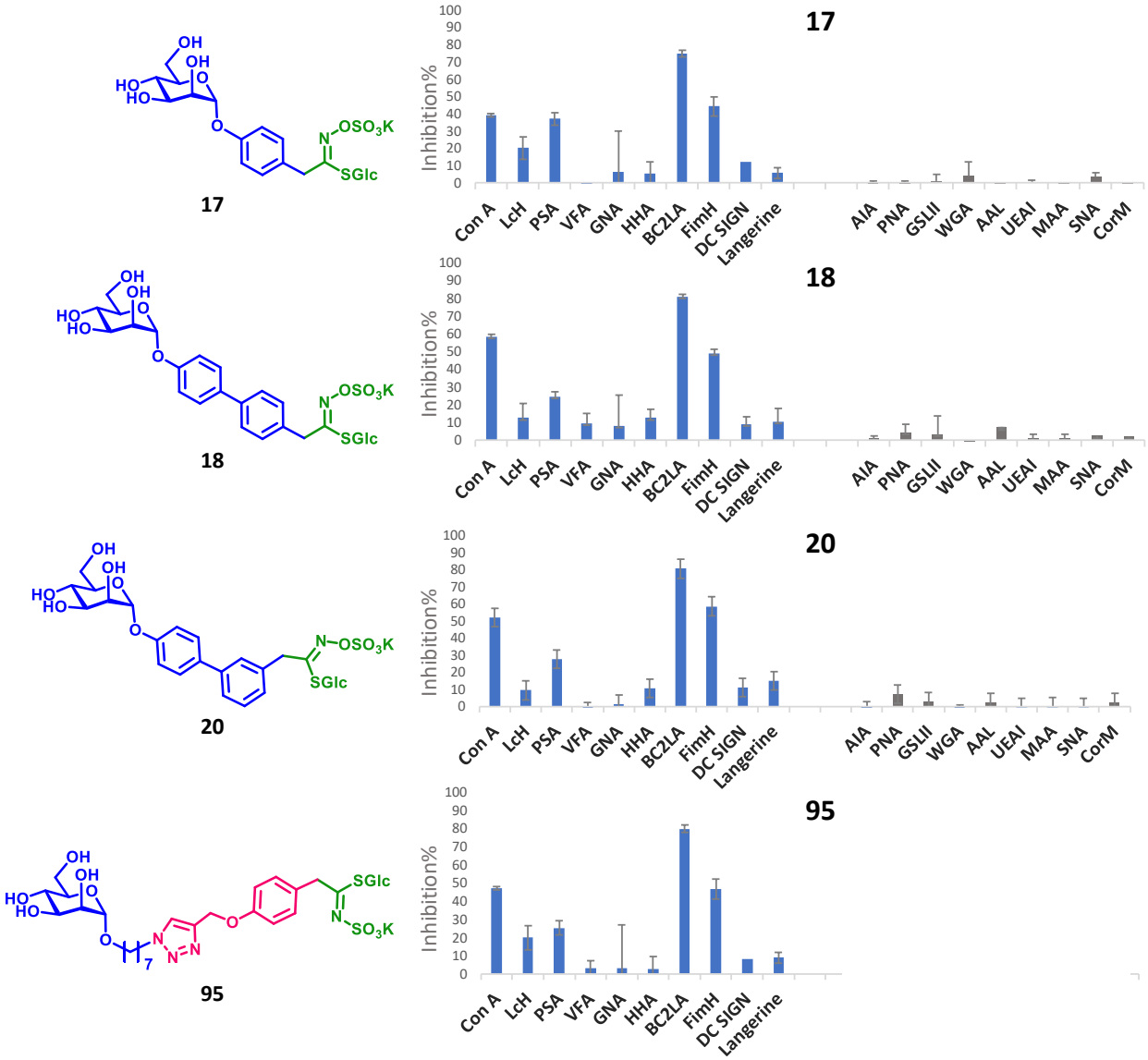


Schéma 68 : Glycoprofiles : inhibition de l'interaction en utilisant une solution 0.5 mM de glucosinolate avec 19 lectines : concanavalin A (ConA), Lens culinaris agglutinin (LcH), Pisum sativum agglutinin (PSA), Vicia faba agglutinin (VFA), Galanthus nivalis agglutinin (GLN/GNA), Hippeastrum hybrid agglutinin (HHA), Burkholderia cenocepacia lectin A (BC2LA), E. coli type I fimbrial lectin (FimH), DC-SIGN extracellular domain (DC-SIGN), langerin extracellular domain (Langerin), Artocarpus integrifolia agglutinin (AIA), peanut agglutinin (PNA), Griffonia simplicifolia lectin II (GSLII), wheat germ agglutinin (WGA), Aleuria aurantia lectin (AAL), Ulex europaeus agglutinin (UEA-I), Maackia amurensis agglutinin (MAA), elderberry lectin (SNA), et Coregonus lavaretus marenae (CorM).

Plus précisément, tous les GLs présentent une meilleure sélectivité vis-à-vis de la lectine végétale Concanavaline A et des deux lectines bactériennes FimH et de façon plus marqué BC2LA. Cela est respecté pour les 4 glucosinolates, avec une activité légèrement plus faible pour le dérivé **17**. Ces Glycoprofiles ont confirmé d'une part l'activité inhibitrice de nos composés, mais surtout, que la fonction glucosinolate ne semble pas interférer avec la sélectivité de reconnaissance des lectines.

2. Les tests d'antiadhésion sur les bactéries d'*E. coli*

Dans le cadre d'une collaboration avec le Prof. T.K. Lindhorst de l'université de Kiel (Allemagne), les glucosinolates **17**, **18**, **19**, **20** et **95** ont été testés vis-à-vis de la bactérie *E. coli*, afin de pouvoir estimer leur pouvoir antiadhésif. Plus précisément ce travail a été réalisé par la doctorante Franziska Reise.
Les désulfoglucosinolates (**172** à **176**) (Schéma 69) correspondant à chaque GL ont aussi été synthétisés et testés. L'étude de l'activité biologique de ces molécules permet d'avoir plus d'information concernant l'interaction de ces glucosinolates avec la lectine et notamment l'influence du sulfate. Les aldéhydes **177** et **178** ont aussi été testés afin d'évaluer l'activité du ligand privé de la partie glucosinolate.

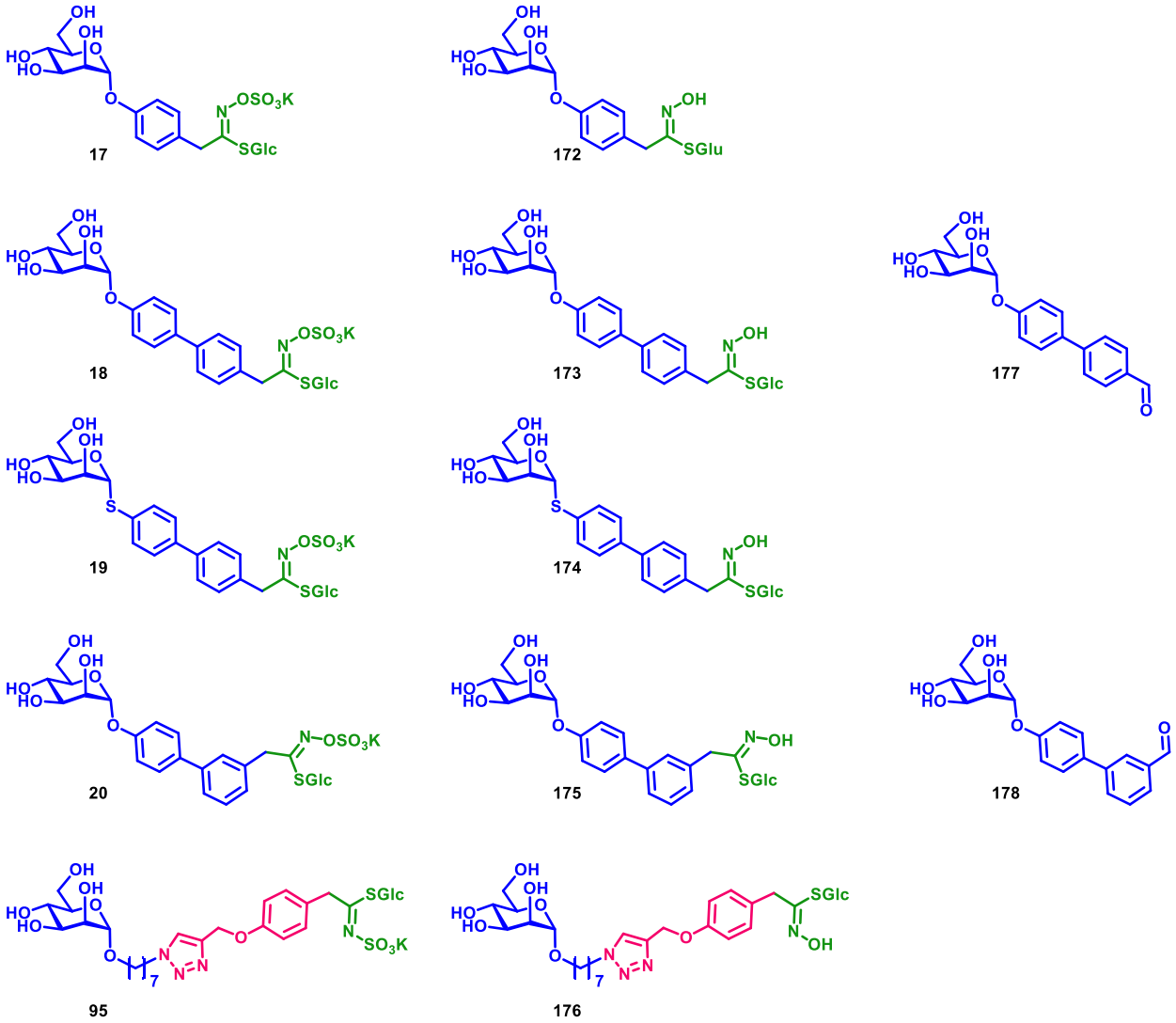


Schéma 69 : mannosides testés vis-à-vis de la bactéries E. coli.

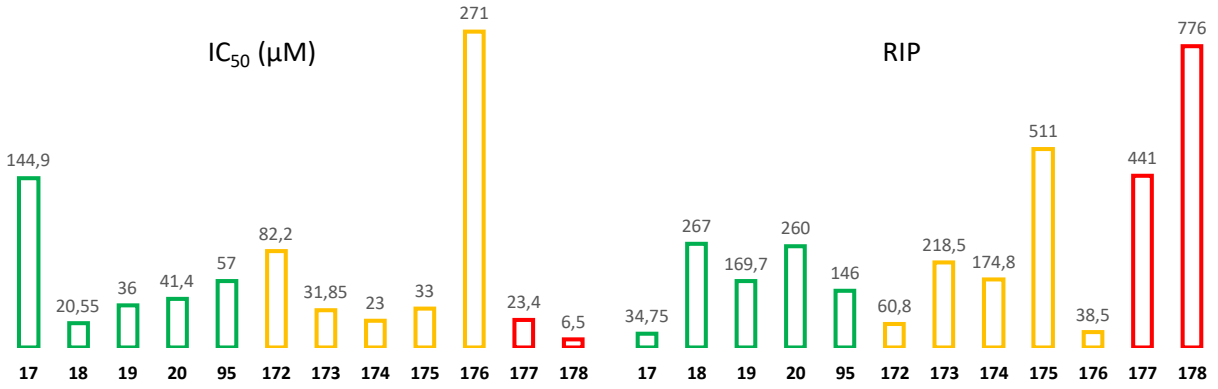


Figure 26 : valeurs d'IC$_{50}$ et RIP.

Dans les essais biologiques réalisés, l'activité antiadhésive des composés est évaluée par un test compétitif. Le kit utilisé prévoit des bactéries d'*E.coli* fluorescentes pouvant adhérer à une surface de mannane (polymère à base de mannose) situé sur le fond des puits de plaques à 96 puits. En présence d'une molécule inhibitrice de l'adhésion bactérienne, une partie des bactéries fluorescentes sera décrochée ce qui diminue le signal de fluorescence détecté ; cette différence est quantifiée.

Ce protocole mis en place dans l'équipe du Prof. Lindhorst [153] permet d'obtenir les valeurs d'IC$_{50}$. Généralement, les IC$_{50}$ de différents essais indépendants ne sont pas reproductibles en raison des différences entre plusieurs cultures bactériennes. Pour cette raison, pour chaque composé testé, le méthylmannoside (MeMan) a été utilisé comme référence. Ceci permet d'améliorer l'exactitude des résultats en rapportant l'activité d'inhibition ou l'IC$_{50}$ de chaque composé à celle du MeMann, testé comme standard lors de chaque essai. Cette activité est donc exprimée sous forme de valeurs de RIP ou Relative Inhibitor Potency. Les valeurs des RIP de divers composés sont ainsi comparées avec plus de précisions.

Les glucosinolates testés ont tous une activité de l'ordre du µM (Figure 26), nettement plus importante que le MeMan. A l'exception du GL phényl mannoside, ils ont tous une meilleure activité que le para nitrophenyl mannopyranoside (IC$_{50}$: 187 µM, RIP : 81.4), un mannoside aromatique souvent utilisé comme molécule de référence. Ces résultats étaient en parti attendus, connaissant la meilleure affinité des motifs bi-phényle et heptyle comparée à un groupement benzénique.

Lorsque l'on compare les différents analogues GLs de type biphényle, il apparait que la position para- ou méta- de la partie glucosinolate ne montre guère de différence. De même, l'utilisation d'un thiomannoside n'apporte pas d'amélioration de l'inhibition d'adhésion bactérienne. Similairement, la structure heptylmannoside présente un RIP proche des glucosinolates biphényls.

La poursuite de l'analyse de ces résultats sur les structures désulfoglucosinolate, montre que la présence ou absence du groupe sulfate n'impacte pas de manière forte l'activité antiadhésive pour les systèmes biphényles. Par contre le désulfoglucosinolate **175** basé sur une position méta du glucosinolate montre une valeur de RIP se démarquant fortement, avec un doublement de la valeur. Ainsi les RIP des Gls **18** à

[153] M. Hartmann, A. K. Horst, P. Klemm, T. K. Lindhorst, Chem. Commun. **2009**, 46, 330–332.

95 et les désulfoGL **173** et **174** oscillent autour d'une valeur moyenne de 200 (± 50) tandis que le désulfoGL **175** méta montre une valeur de 500. Cette comparaison montre que la présence ou non du sulfate ne modifie que peu l'efficacité de l'inhibition. A contrario, en comparant le glucosinolate flexible 5 à son analogue non-sulfaté, le sulfate semble faciliter l'inhibition.
Lorsque le groupement glucosinolate est entièrement supprimé du motif bi-phényle mannoside, de très bonnes inhibitions sont obtenues, avec des RIP de 441 et 776 pour l'aldéhyde **177** et **178** respectivement. Cela est en quelque sorte en accord avec les bonnes inhibitions présentées par les ligands de type biphényl mannose (**167** et **168)** auxquels nous nous sommes inspirées.
D'après les activités d'inhibition observés pour les GLs et les déulfoglucosinolates, il est évident que la présence du motif glucosinolate n'a pas un impact négatif sur l'activité antiadhésive. Cela est dû au fait que le thiohydroximate sulfaté, ainsi que le glucose sortent du site de reconnaissance de la lectine, ce qui cause moins de gène stérique. Toutefois, l'orientation méta ou para influe fortement sur l'efficacité d'inhibition, la position méta s'accommodant plus facilement de la présence du glucose.

Grace à ces essais biologiques réalisées, il a été possible de confirmer que les glucosinolates synthétisés possèdent une activité d'inhibition qui rend envisageable une utilisation de ces molécules dans différentes approches de bioconjugaison ciblant les lectines. L'IC_{50} de l'ordre du µM pour les glucosinolates confirme une bonne interaction de ces glucosinolates avec des lectines. De plus, en s'appuyant sur les résultats des aldéhydes **177** et **178** il est possible de prévoir qu'après l'hydrolyse enzymatique et donc élimination du motif GL, ces molécules présenteront des activités deux à trois fois supérieures.

III. Synthèse de Néoglycoprotéines (NGPs)

1. Introduction

Les néoglycoprotéines (NGPs) sont des protéines sur lesquelles sont greffés artificiellement des mono- ou oligosaccharides de façon covalente. Elles sont inspirées des glycoprotéines naturelles, qui jouent un rôle fondamental dans les phénomènes de reconnaissance chez les êtres vivants.
En raison de leur versatilité, les NGPs peuvent être utilisées dans plusieurs domaines, pour le développement des vaccins, [154] des outils de diagnostic, [155] l'élaboration de biopolymères et dans les processus de purification par affinité. Les NGPs sont aussi largement utilisées comme plateforme permettant de créer des glycoconjugués multivalents ayant des propriétés antiadhésives. En effet, en utilisant des protéines hautement fonctionnalisables telles que l'albumine du sérum bovin (BSA ou Bovin Serum Albumin) ou l'albumine du sérum humaine (HSA ou Human Serum Albumin), il est possible d'obtenir des glycoconjugués avec une valence d'environ 30 ligands. Ces protéines, de par leur taux de fonctionnalisation élevé et de par leur disponibilité commerciale très avantageuse, sont des plateformes idéales pour le développement de glycoconjugués multivalents.

L'approche la plus aisée permettant de synthétiser des NGPs est de cibler les résidus lysine, aminoacides très abondants sur les protéines du sérum humain et bovin (environ 60 résidus).
Pendant longtemps les méthodes d'amination réductrice [156] et du 2-iminomethoxyméthyl thioglycoside [157] ont été largement utilisées. Par la suite, des méthodes plus simples et versatiles basées sur des réactions click ont été largement développées, comme par exemple le couplage des lysines avec des isothiocyanates ou les CuAAC. [158] L'inconvénient de cette dernière approche consiste dans la nécessité de réaliser une pré-fonctionnalisation des protéines afin de convertir la fonction amine en une fonction qui se prête à la chimie de cycloaddition (alcyne ou azoture). De même, l'alternative de la chimie thiol-ène nécessite une pré-fonctionnalisation des lysines avec des fonctions alcènes lorsqu'un nombre convenable de cystéines sur la protéine native n'est pas présente.

Bien que commercialement il y ait une grande disponibilité de réactifs de couplage qui permet de fonctionnaliser ces protéines avec de bons rendements, la bioconjugaison par la réactivité d'isothiocyanate est toujours considérée comme une technique très fiable. En effet, cette réactivité exacerbée des isothiocyanates vis-à-vis des lysines donne d'excellents rendements de fonctionnalisation, et ce en réalisant une seule étape réactionnelle sur la protéine.

---

[154] G. Sandig, H. H. von Horsten, L. Radke, V. Blanchard, M. Frohme, C. Giese, V. Sandig, S. Hinderlich, Bioengineering **2017**, 4.
[155] M. Kerékgyártó, A. Fekete, Z. Szurmai, J. Kerékgyártó, L. Takács, I. Kurucz, A. Guttman, Electrophoresis **2013**, 34, 2379–2386.
[156] G. R. Gray, Arch. Biochem. Biophys. **1974**, 163, 426–428.
[157] C. P. Stowell, Y. C. Lee, Biochemistry **1980**, 19, 4899–4904.
[158] H. Wang, W. Huang, J. Orwenyo, A. Banerjee, G. R. Vasta, L.-X. Wang, Bioorg. Med. Chem. **2013**, 21, 2037–2044.

Synthèse de néoglycoprotéines en utilisant la réaction MG

Dans le cadre de ce projet réalisé en collaboration avec le Dr. L. Landemarre et la doctorante Blanka Didak de l'entreprise GLYcoDiag, il a été envisagé de synthétiser des NGPs multivalentes à propriétés antiadhésives. L'objectif de synthétiser un glycoconjugué hautement fonctionnalisé par le biais du système myrosinase-glucosinolate est d'une part de montrer la compatibilité de cet outil enzymatique avec des approches de bioconjugaison. D'autres part, l'utilisation du système MG permet de s'affranchir de l'instabilité des réactifs commerciaux de type isothiocyanates.

Grâce au système MG, il est possible de former une fonction isothiocyanate par des conditions douces, sans utiliser des catalyseurs ou réactifs difficiles à éliminer et qui pourraient gêner dans les essais biologiques. L'isothiocyanate intermédiaire peut réagir avec les nombreux résidus lysine de la protéine BSA.

Deux stratégies ont été étudiées parallèlement, une première en utilisant les GLs à fonctions orthogonales et une deuxième en utilisant les GLs mannosidiques.

2. Néoglycoprotéines à partir de glucosinolates à fonctions orthogonales

En utilisant la double fonctionnalité des glucosinolates orthogonaux, il est possible de modifier un résidu lysine d'une protéine en une fonction de type azoture, alcyne, thiol ou brome (Schéma 70). Nous avons donc engagé un test de bioconjugaison avec la BSA en présence du glucosinolate alcynyle **49** et azoture **(47)**. Nous avons souhaité développer une néoglycoprotéine fonctionnalisée et prête à être engagée dans des réactions de bioconjugaisons dans le cas de la fonction alcyne et azoture par cycloaddition de type CuAAC et aussi de réactivité thiol-yne dans le cas de l'alcynyle.

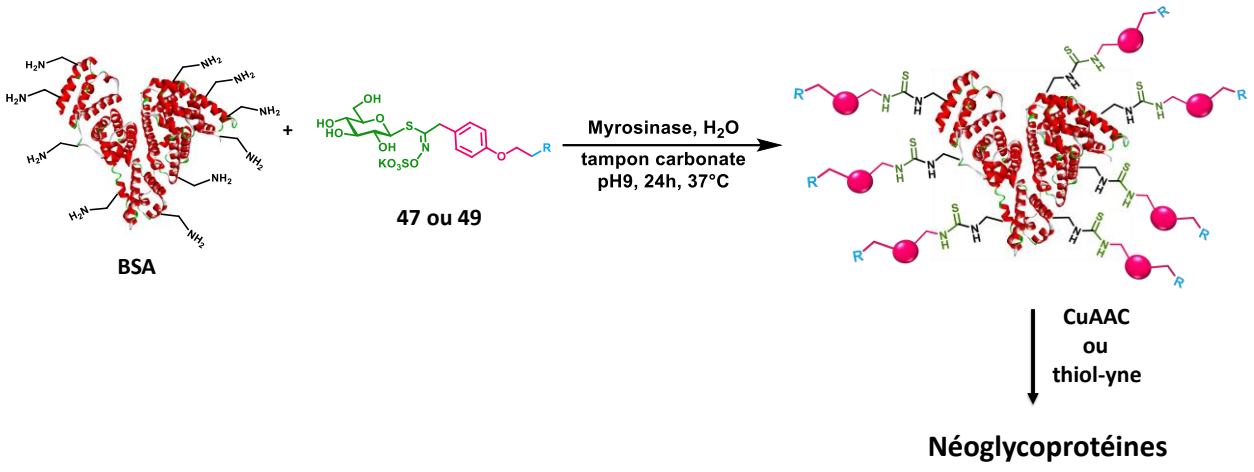


Schéma 70 : réaction entre le GLs à fonction réactive et la BSA.

Des essais préliminaires ont conduit à une moyenne de 9 ligations pour le GL alcyne et 19 pour le dérivé azoture. Cela en utilisant des excès de GL et un pH 9 (tampon carbonate) (Tableau 14).

Tableau 14 : réaction MG avec la BSA

Entrée	R	BSA (mg/mL)	GL (equiv.)	pH	greffages[a]
1	N_3	1	80	9	13
2	C≡CH	5	160	9	9

[a] nombre de greffage moyen calculé avec la masse moyenne obtenue par la spectrométrie de masse MALDI-Tof/MS.

Avec ce taux de greffage faible il ne serait pas envisageable de poursuivre dans la synthèse de NGPs. Idéalement, une moyenne de 20-25 greffages est indispensable pour obtenir par la suite une NGP hautement fonctionnalisée.

Le faible nombre de ligations est en quelque sorte en accord avec l'étude de réactivité menée dans le chapitre 2, qui montrait une réactivité moins prononcée pour ces isothiocyanates hydrophobes comparée aux analogues hydrophiles.

Ce résultat préliminaire peut éventuellement être encore amélioré en réalisant une optimisation plus aboutie. Par exemple, l'utilisation d'un co-solvant pourrait incrémenter la réactivité de l'isothiocyanate, et ne gênerait pas la BSA, mais également d'autres ratios enzymatiques et des pH plus basiques devaient être testés. Faute de temps cette optimisation n'a pas été réalisée.

3. Néoglycoprotéines à partir de glucosinolates mannosidiques

En se servant d'un glucosinolate mannosidique, l'approche MG permettrait de fonctionnaliser une protéine par une seule réaction one-pot avec un ligand ayant une activité de l'ordre du µM (Schéma 71).

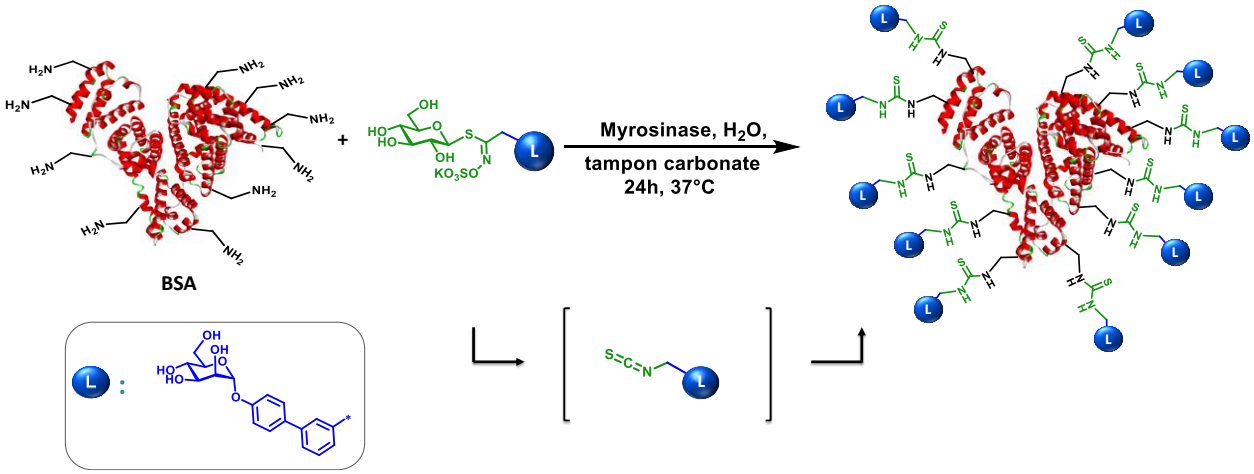


Schéma 71 : utilisation du système MG pour la synthèse de néoglycoprotéines.

Afin d'optimiser ce protocole de bioconjugaison, le glucosinolate biphényl mannoside a été choisi.

a. Optimisation de la bioconjugaison

Grâce à l'étude réalisée avec les dérivés de propargylamines, de nombreuses informations concernant l'hydrolyse par la myrosinase ont été acquises. Cependant, en raison de la présence de deux protéines dans le milieu réactionnel, l'utilisation de la même réaction pour la bioconjugaison peut apporter quelques complications. Plusieurs facteurs doivent être optimisés dans ce type de réaction. En ce qui concerne l'hydrolyse enzymatique, il faut définir la quantité d'enzyme, la concentration de substrat et la durée d'hydrolyse. De plus, afin d'obtenir le meilleur taux de fonctionnalisation de la protéine, des paramètres tels que la concentration en BSA, le nombre d'équivalents de glucosinolate et le pH doivent être considérés.

La BSA possède 59 lysines, dont environ 35 sont conjugables en raison de leur positionnement sur la protéine et donc leur accessibilité. Afin d'assurer une plus grande disponibilité des amines des lysines, le pH a été fixé entre 9 et 9.5. Bien que le pKa de la lysine soit de 10.5, les pH étudiés étaient de 9 et 9.5. Les pH plus élevés n'ont pas été étudiés en raison d'une plus faible stabilité de l'isothiocyanate et de la myrosinase dans ces conditions.

Tableau 15 : Optimisation de la réaction de fonctionnalisation de la BSA.

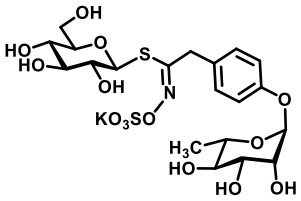
Entrée	BSA (mg/mL)	pH	GL (equiv.)	U_E /µmol [a]	Greffages [b]
1	10	9	80	0.5	0
2	5	9	160	0.25	11
3	2	9	80	0.5	20
4	1	9	80	0.5	20
5	1	9	80	0.25	29
6	1	9	160	0.25	19
7	1	9	120	0.5	25
8	1	9.5	80	0.5	28
9	1	9.5	120	0.5	23

[a] Unité d'enzyme par µmol de GL ; [b] nombre de greffage moyen calculé avec la masse moyenne obtenue par la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS.

Les unités d'enzyme par µmol de glucosinolate ont été variées entre 0.25 et 0.5, en sachant que des ratios compris entre 0.13 et 0.75 assurent une hydrolyse complète en une heure. La durée totale de la fonctionnalisation a été fixée à 24h, à 37°C.
En utilisant une concentration de 10 mg/mL de BSA (entrée 1, Tableau 15), généralement adaptée à ce type de bioconjugaison, aucune réaction d'hydrolyse ne s'est produite. Le milieu réactionnel trop concentré en protéine ne permet probablement pas à la myrosinase de travailler correctement. Généralement des concentrations de 5 ou 2 mg/mL de BSA (entrée 2 et 3) n'ont pas non plus montré un effet favorable comparé à la concentration de 1 mg/mL.
Etrangement, des excès de 120 et 160 équivalents de glucosinolate par mole de BSA (entrée 6, 7 et 9) n'ont pas apporté une amélioration du nombre de ligations moyen par rapport aux tests réalisés avec 80 équivalents (entrée 5 et 8).

En analysant les entrées 5 et 8 du Tableau 15, il est possible d'identifier deux expériences permettant d'obtenir des néoglycoprotéines hautement fonctionnalisées ; pH 9 et 9.5 avec 0.25 et 0.5 U_E /µmol respectivement et un excès de 80 équivalents de GLs. Dans ces 2 cas, le nombre moyen de ligation est de 29 et 28, respectivement.

b. La fonctionnalisation BSA-glucomoringine



137

Schéma 72 : glucomoringine.

En utilisant ces mêmes conditions (entrée 5 et 8 Tableau 15), nous avons tenté de fonctionnaliser la BSA avec le glucosinolate naturel la glucomoringine. Cela n'a donné que 18 ligations en moyenne, probablement à cause d'une instabilité de ce composé en conditions basiques. En effet, par spectrométrie de masse il est possible d'observer une élimination du rhamnose, avec départ du phénolate, ce qui explique un plus faible rendement de fonctionnalisation.

Ainsi, le protocole mis au point a montré une bonne reproductibilité et a permis d'obtenir environ 10 mg de chaque néoglycoprotéine (biphenylmannose et glucomoringine). Le mélange réactionnel a été purifié par chromatographie d'exclusion stérique, pour pouvoir soumettre les néoglycoprotéines aux tests d'activité biologiques.

c. La Myrosinase supportée

Afin de faciliter les étapes de purification, la préparation d'une myrosinase sur support solide a été envisagée. L'utilisation de l'enzyme immobilisée devrait permettre d'obtenir une néoglycoprotéine en absence d'enzyme, par simple filtration, décantation ou centrifugation après réaction.

La myrosinase a été supportée sur des billes constituées de sépharose activée par des fonctions bromure de cyanogène. Lors de cette procédure, il a été possible de mesurer la quantité de myrosinase réellement immobilisée sur la matrice polymérique grâce à des mesures d'absorbance UV de la solution avant et après fonctionnalisation. Par la suite, une évaluation d'activité de l'enzyme supportée a pu être réalisée. En utilisant l'électrophorèse capillaire il a été possible de tracer des courbes dose-réponse en suivant la cinétique d'hydrolyse d'un glucosinolate modèle.
Ce suivi a été réalisé pour l'enzyme libre et celle immobilisée, en utilisant la même solution de glucosinolate (sinigrine **131**) à 0.5 mM, et bien évidemment avec les mêmes proportions d'enzyme (0.05 U_E/mL).

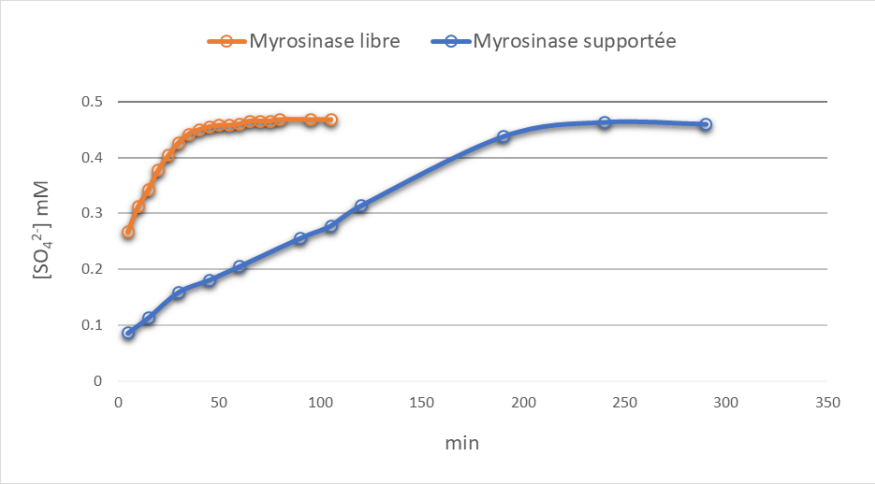


Figure 27 : courbes dose-réponse Myrosinase libre (orange) et myrosinase supportée (bleu)

A partir des courbes présentées en Figure 27, il est possible de déduire à quel moment la concentration de sulfate devient constante indiquant la fin de la réaction enzymatique. A noter que les concentrations maximales de sulfate obtenues sont proches de la concentration de la sinigrine utilisée pour ces suivis cinétiques (0.5 mM). Cela indique que les deux myrosinases sont capables d'hydrolyser tout le glucosinolate présent dans la solution.
En comparant les pentes de la partie linéaire de ces courbes, il est facile de remarquer que la myrosinase libre présente une pente beaucoup plus importante par rapport à la myrosinase supportée. Cela reflète une cinétique environ 3,5 fois plus rapide pour l'enzyme libre que l'enzyme supportée.
En effet la baisse d'activité des enzymes immobilisées est un phénomène bien connu, [159] qui peut s'expliquer de différentes façons. [160] Tout d'abord, la fixation de l'enzyme sur le support solide induit souvent un changement de la conformation 3D et une perte de l'élasticité de l'enzyme.
De plus, lorsque la myrosinase est en solution, elle est présente sous forme de dimère alors que probablement cette conformation ne peut pas être respectée pour la myrosinase supportée.
De plus, la rencontre du substrat et de l'enzyme est ralentie par le phénomène de diffusion dans la matrice polymérique. En dépit des performances cinétiques, la stabilité de l'enzyme immobilisée est souvent améliorée.

L'utilisation d'autres matrices polymériques (polystyrènes, nitrocellulose…) permettant d'adsorber l'enzyme par des liaisons électrostatiques, peut comporter des baisses d'activités moins importantes mais aussi une moins bonne résistance de l'enzyme supportée et notamment lors d'études à des pH élevés tels que les pH 9 ou 9,5 utilisés lors de cette étude. [161]

Après avoir confirmé l'activité de la myrosinase immobilisée, cette enzyme a été utilisée dans la réaction de fonctionnalisation de la BSA avec le GL biphénylmannoside **20 (**Schéma 73**)**.

[159] J. MüLler, G. Pfleiderer, Hoppe-Seyler´s Z. Für Physiol. Chem. **1980**, 361, 675–680.
[160] D.-H. Zhang, L.-X. Yuwen, L.-J. Peng, J. Chem. **2013**, 2013, 1–7.
[161] A . A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, J. Chem. Biol. **2013**, 6, 185–205.

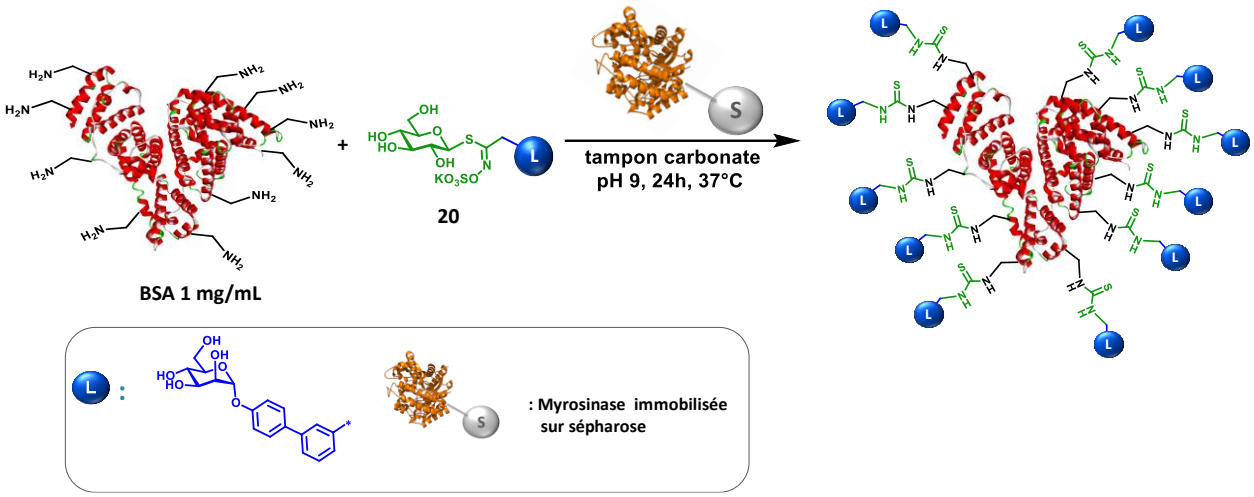


Schéma 73 : réaction de fonctionnalisation de la BSA avec la myrosinase supportée.

Le choix des conditions réactionnelles a été fait en s'inspirant des conditions mises au point précédemment (Tableau 16).

*Tableau 16 : tests de fonctionnalisation avec la myrosinase supportée BSA- GL **20.***

Entrée	GL (equiv.)	U_E /µmol	greffages[a]
1	80	0.25	**14**
2	120	0.25	**15**
3	80	0.5	**12**
4	120	0.5	**9**

[a] nombre de greffages moyen calculé avec la masse moyenne obtenu par la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS.

Pour des raisons pratiques, les concentrations de l'enzyme supportée n'ont pas pu être adaptées à son activité catalytique diminuée. En effet des quantités trop importantes de sépharose devraient être ajoutées lorsque on dépasse les 0.25 U_E/µmol, ce qui empêche l'homogénéisation de l'échantillon et le bon déroulement de la réaction. En essayant d'augmenter la quantité d'enzyme afin de se rapprocher des conditions déjà optimisées, aucune amélioration n'a été constatée.

A parité de conditions (entrée 1, Tableau 16) l'enzyme supportée permet d'obtenir une BSA avec la moitié du greffage en comparaison des résultats obtenus avec la myrosinase libre.

La présence du polymère sépharose peut aussi gêner la bioconjugaison en raison des interactions BSA-sépharose pouvant limiter la disponibilité des lysines de la BSA pour une haute fonctionnalisation. [162]

En raison de l'impossibilité d'atteindre le ratio enzyme-substrat idéal et de la présence de ce phénomène d'adsorption, il serait préférable d'utiliser la myrosinase supportée pour des applications nécessitant des

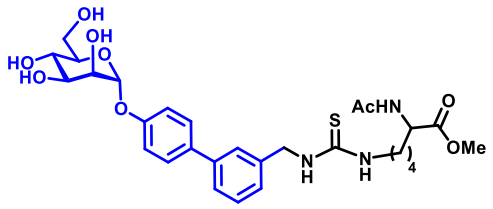
[162] B. J. Horstmann, C. N. Kenny, H. A. Chase, J. Chromatogr. A **1986**, 361, 179–190.

taux catalytiques plus faibles ou avec des protéines qui présentent des plus faibles interactions avec le sépharose.

d. L'activité antiadhésive des néoglycoprotéines synthétisées

L'activité antiadhésive de certaines des néoglycoprotéines synthétisées a été évaluée sur des lectines à mannose. Ces essais ont été réalisés par Blanka Didak, doctorante au sein de GLYcoDiag avec la méthode du Glycoprofyle.
Les lectines ciblées sont ConA, BC2LA, Langerine et FimH. Les néoglycoprotéines sélectionnées pour cette étude sont : la BSA mannose possédant 29 ligations moyennes (**BSA-Mann $_{29}$**), celle possédant 15 ligations moyennes obtenue en utilisant la myrosinase supportée (**BSA-Mann $_{15}$**) et la BSA phényl rhamnose avec 18 ligations moyennes obtenue par réaction avec la glucomoringine (**BSA-Rha $_{18}$**). Cette dernière protéine a été testée sur des lectine à mannose en tant que contrôle négatif ; par conséquence aucune activité biologique n'est attendue dans ce cas.

Le **ligand 147** (Schéma 74) (dont la synthèse a été détaillée dans le Chapitre 2 Schéma 60) est un modèle correspondant au mannoside greffé sur une lysine par le biais d'une fonction thiourée et donc du mode de fixation sur les lysines de la BSA. De ce fait, en testant cette molécule il sera possible d'évaluer l'effet de multivalence des NGPs mannose synthétisées grâce à une comparaison de l'activité du **ligand 147** et des néoglycoprotéines multivalentes. Nous avons également testé le **glucosinolate 20** précurseur afin d'évaluer l'influence de la partie glucosinolate sur l'interaction avec les lectines.



147

Schéma 74 : formation du ligand biphényl mannose lysine.

Afin de pouvoir comparer l'activité de nos glycoconjugués avec une autre néoglycoprotéine hautement fonctionnalisée, une BSA mannosidique commercialisé par GLYcoDiad (**BSA-Man $_{C}$**) (Schéma 75) a été également testée. Cette dernière a été fonctionnalisée avec une moyenne de 25 ligands de type phényl mannose isothiocyanate, ce qui est assez proche de notre glycoprotéine BSA-Man$_{29}$ possédant des motifs biphényles.

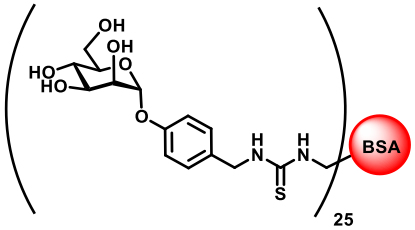


Schéma 75: néoglycoprotéines avec 25 ligations moyennes du motif phénylmannose.

Dans la Figure 28 sont présentées les valeurs de RIP (basées sur l'activité de l'α–méthyl mannoside) vis-à-vis des différentes lectines.

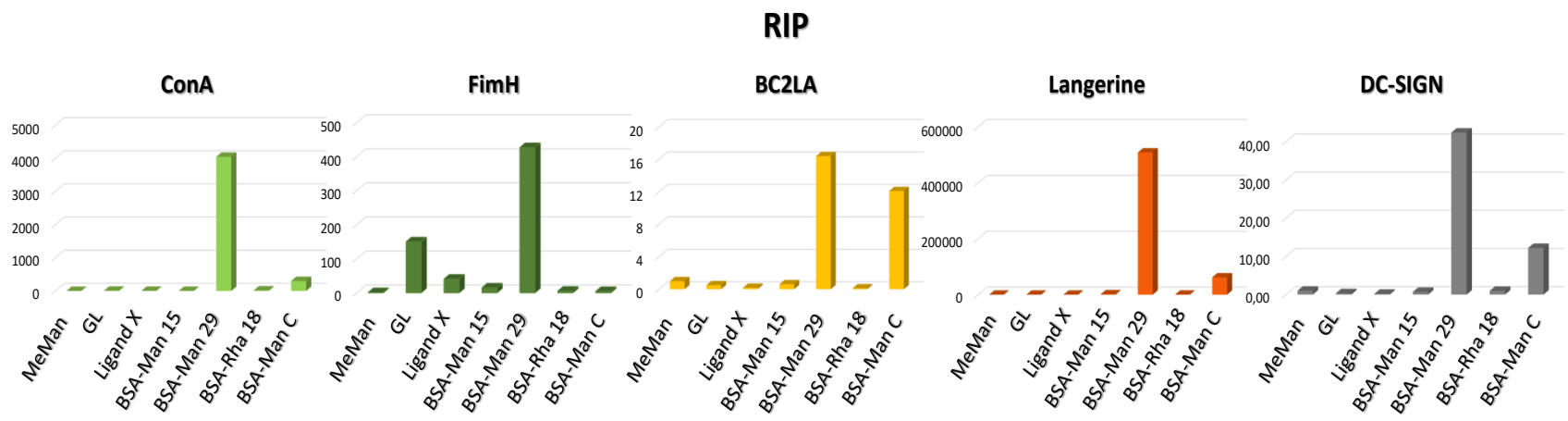


Figure 28 : valeurs de RIP pour les lectines ConA, FimH, BC2LA, Langerine et DC-SIGN

Le tableau suivant montre les valeurs d'IC_{50}, exprimées en concentration micromolaire.

Tableau 17 : valeurs d'IC_{50}, RIP

Lectines	**ConA**		**FimH**		**BC2LA**		**Langerine**		**DC-SIGN**	
Composé	IC_{50} (µM)	RIP	IC_{50} (µM)	RIP	IC_{50} (µM)	RIP	IC_{50} (µM)	RIP	IC_{50} (µM)	RIP
MeMan	923	1	58	1	7.85	1	32300	1	6.61	1
20	126	7.3	0.39	150	15.7	0.5	5970	5.42	19.5	0.34
Ligand 147	209	4.4	1.45	40.5	44.3	0.18	215	151	33.2	0.20
BSA-Man $_{15}$	0.25	8.48	0.27	14.7	0.84	0.62	1.37	1580	0.64	0.69
BSA-Man $_{29}$	**0.0076**	**4187**	**0.0046**	**427**	**0.016**	**16.4**	**0.0021**	**509000**	**0.0052**	**42.4**
BSA-Rha $_{18}$	3.97	15.5	0.76	5.11	2.11	0.12	4.85	222	1.15	0.97
BSA-Man $_{C}$	0.123	300	0.56	4.16	0.026	12.1	0.021	62000	0.022	12.2

Le biphényl mannoside glucosinolate **20**, ainsi que le **ligand 147** ont été initialement conçus et synthétisés pour avoir une sélectivité d'affinité envers la lectine FimH. Les valeurs de RIP ainsi que les valeurs d'IC_{50} montrent clairement cette sélectivité de reconnaissance. Ces composés présentent une meilleure activité inhibitrice sur FimH (IC_{50} respectivement de 0,39 µM et 1,45 µM) comparée aux autres lectines.
Concernant les valeurs d'IC_{50}, la protéine **BSA-Man$_{29}$** montre une inhibition de l'ordre du nM. Pour la langerine et la lectine FimH les meilleures inhibitions ont été constatées, avec des IC_{50} de 2.1 et 4.6 nM respectivement.
Les graphes centrés sur les valeurs de RIP montrent, pour toutes les lectines testées, que la **BSA-Man $_{29}$** présente les activités les plus élevées, ainsi que vis-à-vis du ligand seul et du glucosinolate témoin. Cette efficacité du pouvoir inhibiteur se retrouve par comparaison avec les autres NGPs, **BSA-Man $_{C}$** et la **BSA-Man $_{15}$**. A l'exception de BC2LA pour laquelle la **BSA-Man $_{C}$** montre une activité proche mais toujours inférieure.
En rapportant ces valeurs d'inhibition au modèle du **ligand 147**, la **BSA-Man $_{29}$** montre un effet de multivalence marqué vis-à-vis de la lectine langerine.

En comparaison avec les autres NGPs testées, il est évident que la **BSA-Rha$_{18}$** n'a pas une activité comparable aux autres NGPs mannosidiques, ce qui était attendu pour ce contrôle négatif. Toutefois, une activité d'inhibition de l'ordre du microM, donc non négligeable, est présente.

En comparant les résultats de la **BSA-Man $_{29}$** avec la **BSA-Man $_{C}$**, il y a manifestement une différence d'activité inhibitrice très importante surtout pour les lectines FimH, ConA et Langerin. Etant donné que ces deux NGPs ont des valences assez proches, il est probable que la différence d'activité observée est due à la nature du motif biphényl mannose, ligand qui est caractérisé par un meilleur pouvoir antiadhésif intrinsèque. [163]

4. Conclusions

En conclusion, le système MG a permis d'obtenir une NGP de type biphényl mannoside hautement fonctionnalisée, en une seule étape, sans pré-fonctionnalisation préalable. Une moyenne de 29 ligands greffés a été obtenue, ce qui est un résultat excellent, surtout en considérant qu'une moyenne de 35 lysines sont effectivement accessibles et réactives et que le ligand ajouté ne présente aucun espaceur qui pourrait favoriser le greffage. Ce glycoconjugué multivalent présente une activité inhibitrice très prometteuse avec des interactions de l'ordre du nanomolaire pour les 5 lectines évaluées.
Il a été démontré que ce type de protocole peut être appliqué à d'autres glucosinolates comme la glucomoringine.

[163] Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, E. Chorell, J. M. Crowley, C. K. Cusumano, S. Campbell, J. P. Henderson, S. J. Hultgren, J. W. Janetka, J. Med. Chem. **2012**, 55, 3945–3959.

Une myrosinase sur support solide a été préparée et a été évaluée comme outil enzymatique dans le cadre de la synthèse de néoglycoprotéines. Les propriétés cinétiques de cette enzyme supportée ont été évaluées afin de confirmer que l'immobilisation n'a pas détruit son activité catalytique. Son comportement dans des réactions de bioconjugaison a aussi été étudié. L'activité est en effet moins importante que celle de l'enzyme libre. De ce fait, cet outil pourrait être plus adapté pour des approches de bioconjugaison telles que le marquage sélectif de protéines « site selective labelling ». En effet, la myrosinase supportée peut être éliminée du mélange réactionnel par une simple centrifugation.

IV. Marquage sélectif de protéines - Site selective labeling

Le greffage sélectif d'une protéine est une approche de bioconjugaison permettant d'apporter des modifications précises à des protéines. Dans le cadre de ce projet, une ligation proche du site actif d'une lectine a été envisagée.
Afin de pouvoir étudier la mise en place de cette approche, la lectine végétale ConA a été choisie. Cette dernière est beaucoup plus accessible par rapport à d'autres lectines bactériennes telles que FimH et BC2LA.
La Concanavaline A est une cible très intéressante. Elle possède un total de 12 lysines dont certaines sont à proximité du site de reconnaissance des mannosides. L'isothiocyanate issu de la réaction MG pourrait réagir avec ces dernières pour former une liaison stable de type thiourée.
En utilisant la myrosinase et le glucosinolate heptyl mannoside, en raison de l'affinité de ce ligand envers la lectine, il serait possible de réaliser une ligation exclusivement à proximité du site actif.

La Figure 29a est obtenue par une approche de dynamique moléculaire réalisée sur la Concanavaline A par le Dr Pierre Lafite (ICOA). D'après cette expérience il est possible de visualiser les espaces occupés par les azotes des lysines 39 et 101 respectivement en jaune et orange, proches du site de reconnaissance du mannopyranoside (en bleu).

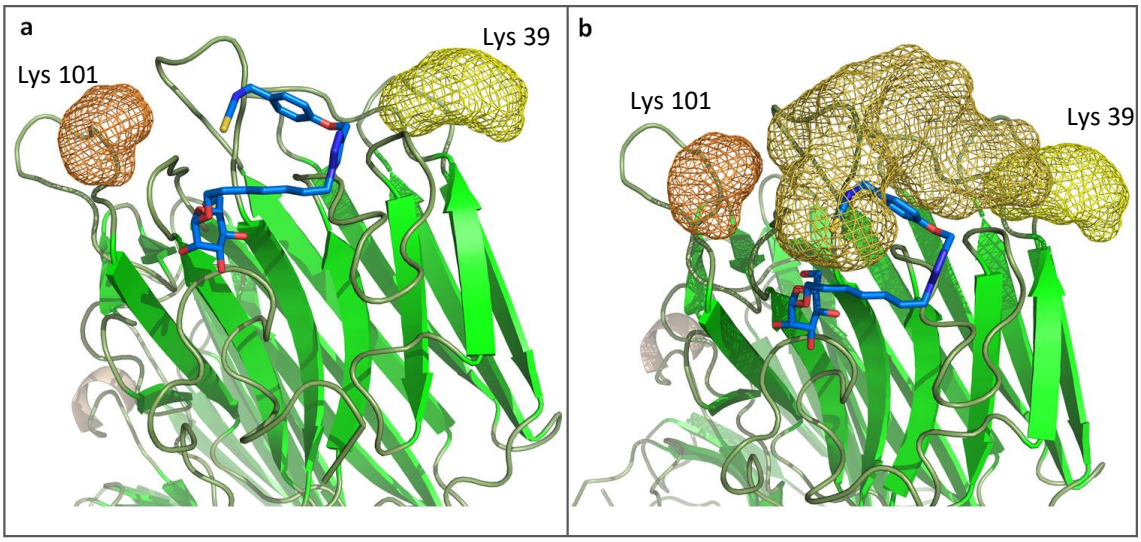


Figure 29 : dynamique moléculaire ConA-heptyl mannose isothiocyanate.

Cette expérience de dynamique moléculaire de la protéine et du ligand montre la possibilité que l'isothiocyanate de l'heptyl mannoside soit suffisamment proche d'une de ces lysines pour conduire à la formation d'une liaison thiourée. En effet, comme le présente la Figure 29b, la dynamique de l'isothiocyanate, représentée par le nuage de couleur or, montre que celui-ci peut rentrer en contact avec la lysine 39 et donc réagir avec celle-ci.

Grace à cette approche de dynamique moléculaire il a été possible d'orienter notre choix vers l'heptylmannoside par son espaceur d'une longueur optimale pour une conjugaison sélective à la Concanavaline A et une flexibilité suffisante. En effet la même expérience de modélisation réalisée pour l'isothiocyanate correspondant au GL biphényl mannoside **18,** a montré qu'aucune réaction n'était raisonnablement envisageable entre une lysine et l'isothiocyanate formé, en raison d'une trop grande distance entre ces 2 partenaires, principalement due à la rigidité de la structure biphényle.

1. La réaction de marquage

Le Schéma 76 présente la réaction de couplage entre la ConA et le glucosinolate heptylmannoside.

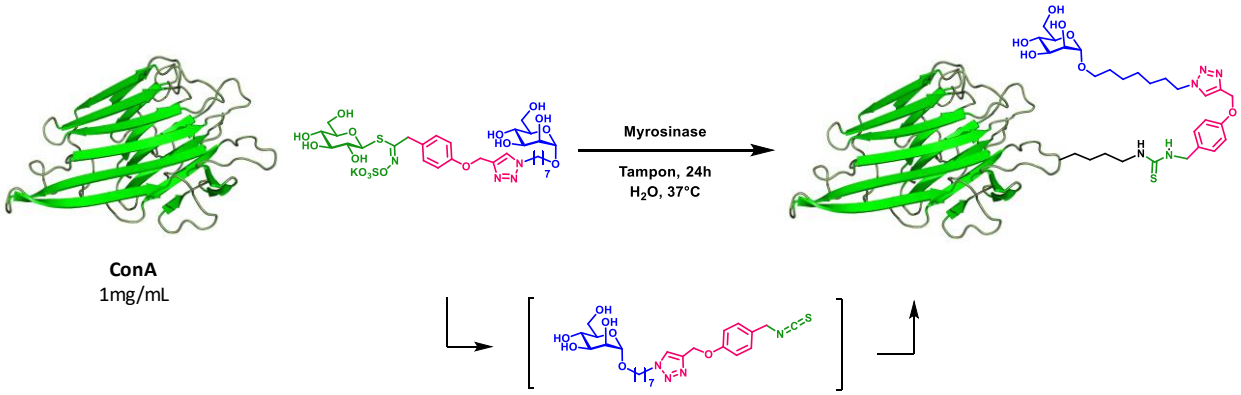


Schéma 76 : réaction de conjugaison entre la concanavaline A (ConA) et le glucosinolate heptylmannoside.

Deux mécanismes peuvent être envisagés pour cette réaction (Schéma 77). Le premier mécanisme (**B**)de type « simultané » où l'hydrolyse se fait lorsque le GL est encore lié à la lectine, en impliquant un rapprochement des deux protéines (myrosinase et lectine). Ensuite, lorsque l'isothiocyanate est formé, la ligation sur la protéine peut avoir lieu.

Le second mécanisme (**A**) est en deux temps, l'hydrolyse par la myrosinase ayant lieu en premier puis l'interaction ligand ITC-lectine et finalement la conjugaison sur une lysine à proximité du site actif.

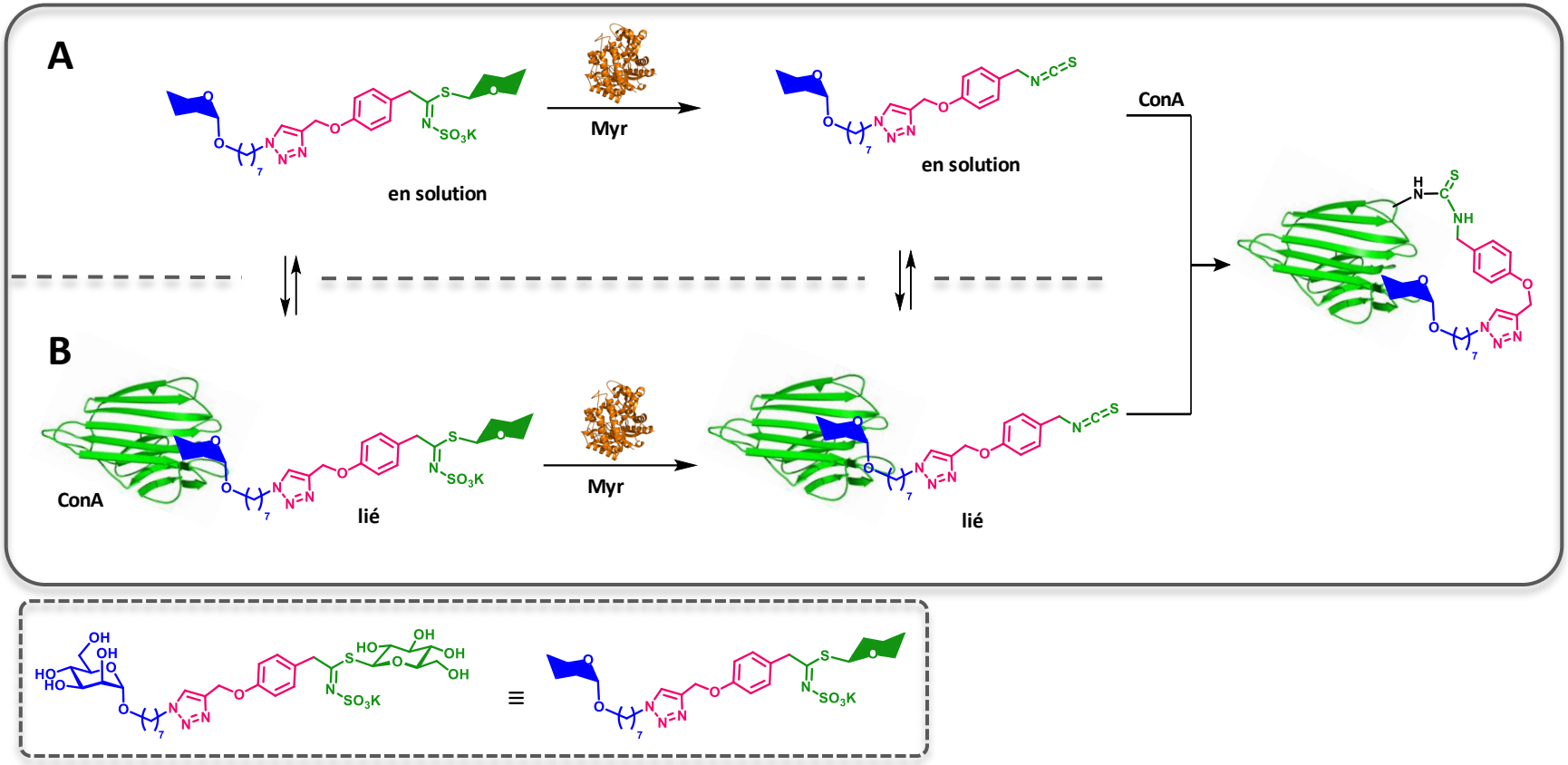


Schéma 77 : deux mécanismes possibles de ligation ConA-Heptylmannoside.

La concanavaline A possède environ 12 lysines accessibles et modifiables ; différentes conditions réactionnelles ont été testées afin d'évaluer la sélectivité de la ligation par rapport à la totalité de ces résidus nucléophiles susceptibles de réagir avec l'isothiocyanate.

Tableau 18 : ligation sélective de la ConA.

Entrée	**GLs éq.**	**[GL] (µM)**	**pH**	**greffages par protéine [a]**	**Protéine majoritaire [b]**
1	17	680	7.4	1 à 2	1 ligation
2	17	680	9	1 à 4	2 ligations
3	1	39	7.4	1	1 ligation
4	1	39	9	1 à 2	1 ligation

[a] nombre de greffages d'isothiocyanate observés par protéine, obtenu par spectrométrie de masse-Maldi-TOF/MS du mélange réactionnel ; [b] espèce majoritaire dans le mélange de protéines déterminée d'après le spectre de masse.

Suite aux résultats présentés dans le Tableau 18, il semble clair que le greffage de la protéine n'est pas réalisé de façon indiscriminée sur les 12 lysines accessibles. En effet même à pH basique et avec un excès de 17 équivalents de ligand par rapport à la protéine, l'espèce majoritaire observée est la protéine avec seulement deux greffages. A l'exception de l'entrée 2, les autres conditions permettent de former comme seule espèce majoritaire, la protéine marquée avec une seule thiourée. Lorsque la réaction est faite à pH 7.4 et avec un seul équivalent de ligand, la réaction de l'isothiocyanate sur la protéine conduit exclusivement à une seule conjugaison.

La Figure 30 montre le spectre de masse issu de l'analyse de masse-MALDI du mélange réactionnel. La masse obtenue, dichargée A^{2+}, correspond parfaitement au greffage d'un seul isothiocyanate heptylmannoside sur la protéine. Sur ce même spectre, des traces de concanavaline n'ayant pas réagi, ainsi que des fragmentations de dégradation de la myrosinase (B) sont présents.

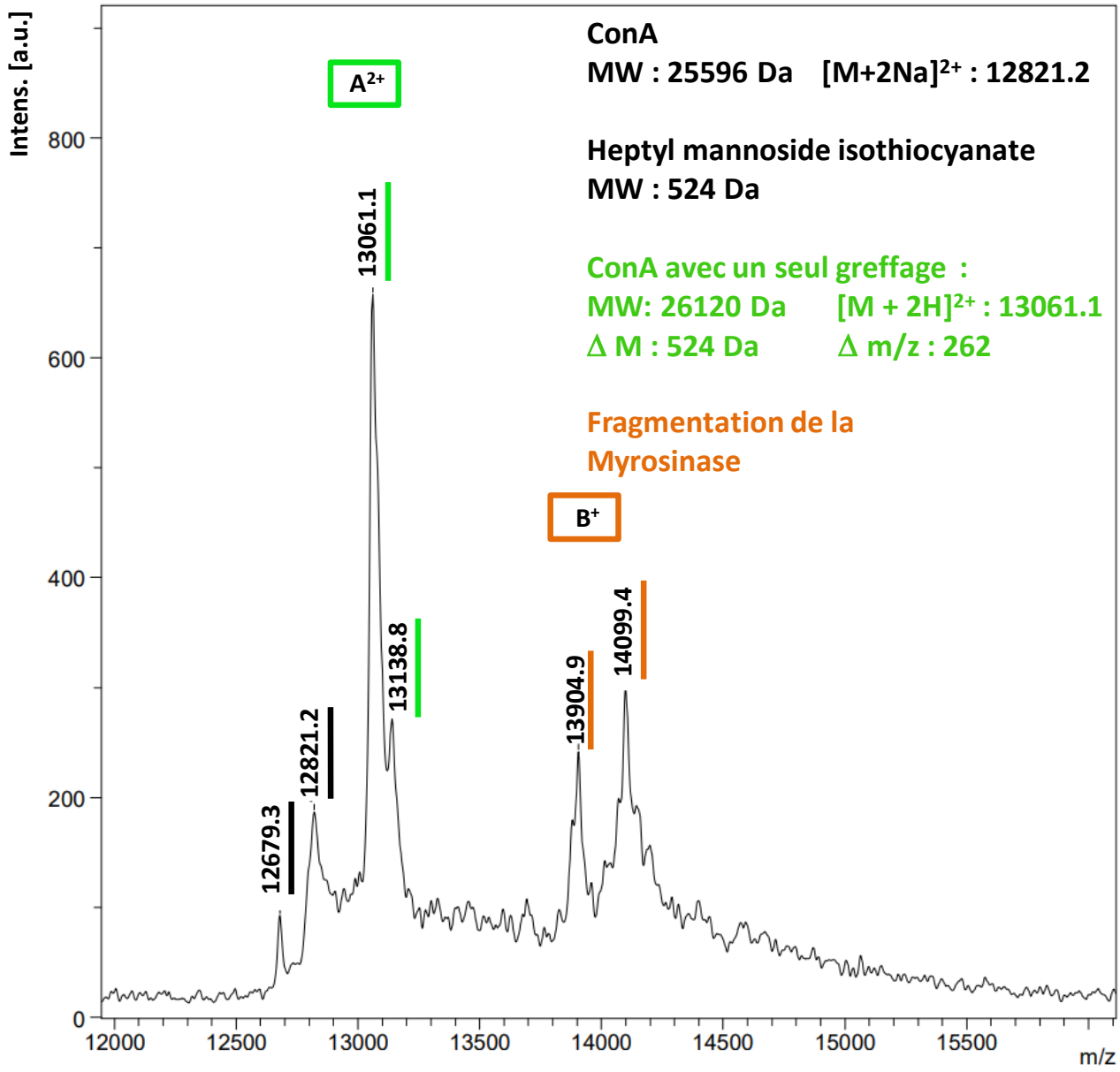


Figure 30 : spectre de masse du mélange réactionnel (conditions entrée 3 du tableau précédent).

Ces résultats sont très encourageants concernant la possibilité d'une sélectivité de conjugaison.

2. Caractérisation de la protéine marquée

Afin de prouver que le marquage se fait effectivement à proximité du site actif, la protéine marquée a été digérée enzymatiquement en partant du gel électrophorétique utilisé pour séparer le mélange réactionnel. Cette séparation est possible en raison de la différence en masse moléculaire entre la ConA (environ 25 kDa) et la myrosinase native (61.2 kDa) ou dégradée (environ 13 kDa). Après avoir réalisé cette séparation électrophorétique il est possible d'hydrolyser sélectivement la lectine en plusieurs

peptides, sans pour autant digérer la myrosinase présente dans le mélange. Suite à cette étape, grâce à une approche protéomique par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS), il a été possible d'identifier les peptides issus de l'étape de digestion.

Le même protocole a été suivi en utilisant deux kits de digestion basés sur deux enzymes différentes, la trypsine et la chymotrypsine. La trypsine hydrolyse des résidus lysine et arginine du côté carboxylique, la chymotrypsine assure des coupures du côté carboxylique de la phénylalanine, le tryptophane, la tyrosine et la leucine. L'utilisation de deux kits de digestion assure deux protéolyses différentes et complémentaires, permettant ainsi d'avoir plus d'informations sur la structure de la protéine marquée.

Cependant après l'analyse de masse, aucun peptide marqué avec l'heptyl mannoside isothiocyanate n'a été retrouvé. La protéine native a aussi été soumise aux deux types de digestions afin de pouvoir la confronter avec la ConA marquée. En effet, entre la digestion de la protéine native et de celle marquée il y a bien une différence dans le type de séquençage. Toutefois, cette approche comparative n'a pas aidé à identifier le peptide marqué.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence du peptide marqué à l'issu de cette analyse de masse. D'une part il serait possible que le marquage réalisé ne résiste pas aux étapes de séparation électrophorétique sur gel et aussi de digestion enzymatique et qu'il soit dégradé avant même l'analyse en spectrométrie de masse. D'autres part il pourrait être possible que le labelling ne soit pas spécifique et que différentes lysines de la ConA aient été marquées. En effet, bien que d'après le MALDI du mélange réactionnel il est évident qu'il existe une seule population de protéines marquées avec un isothiocyanate, il se pourrait que cette espèce mono-marquée soit en réalité constituée de plusieurs protéines qui ont été marquées sur une lysine différente. Par conséquent, l'échantillon digéré serait plus dilué ce qui expliquerait l'impossibilité de retrouver un peptide marqué.

Actuellement des analyses plus approfondies en spectrométrie de masse sont en cours. Notamment, il serait possible d'analyser l'échantillon digéré en recherchant l'ion oxonium issu de la fragmentation du mannose suite à l'ionisation. La recherche de cet ion caractéristique des carbohydrates pourrait permettre d'identifier facilement quel peptide a été « glycosylé » avec l'heptyl mannoside. Bien évidemment ce mode d'analyse nécessite la mise en place d'une méthode d'ionisation bien précise. Cette dernière doit posséder un potentiel capable de fragmenter la liaison glycosidique et de faire détecter le glycocation.

Afin de prouver que la spécificité de la ligation est dictée par le mannoside, d'autres ligations ont été conduites en utilisant des GLs qui n'ont aucun mannose qui pourrait se lier à la ConA (GL **49** et glucomoringine). Les résultats de ces tests ne seront complètement exploitables qu'après avoir identifié une méthode de spectrométrie de masse permettant d'analyser les mélanges issus des digestions enzymatiques.

Pour ce qui concerne le mécanisme de ce marquage, en considérant la taille du GL heptyl mannoside, il semble plus raisonnable d'accepter le mécanisme **A** réalisée en deux temps. En effet, d'après une analyse cristallographique (Figure 31) il est évident que l'espaceur qui sépare le ligand et le GL n'est pas suffisamment long pour permettre une interaction simultanée des deux protéines sur le même

glucosinolate. De plus, le fait que la myrosinase soit un dimère en solution défavoriserait encore plus le rapprochement si étroit avec la lectine.

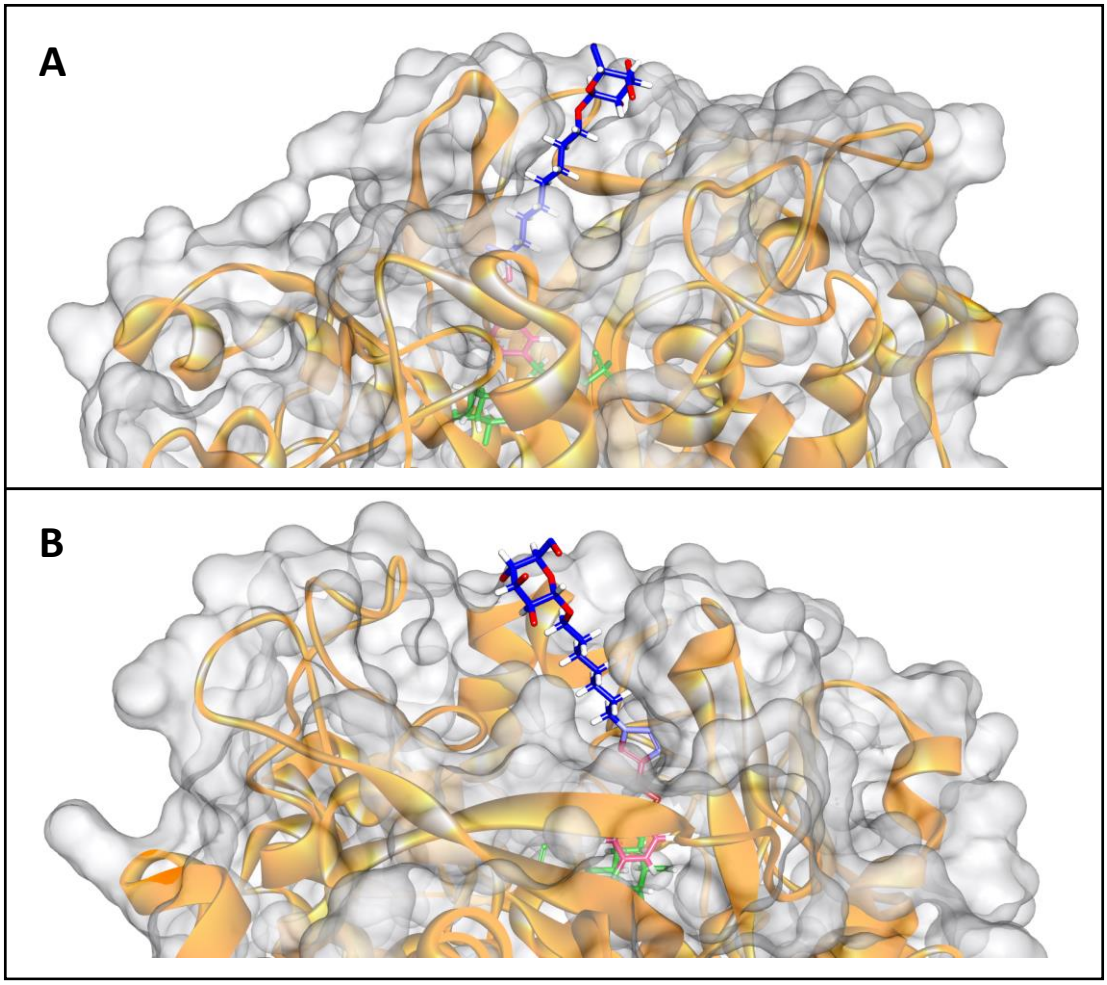


*Figure 31: clichés obtenus par modélisation moléculaire d'un complexe myrosinase-GL heptyl mannoside **95**.*

Cette figure permet de visualiser que lorsque le GL est positionné dans le site actif, le ligand mannosidique (en bleu) est incorporé dans la cavité hydrophobe de la myrosinase. De ce fait le mannose est nettement moins disponible pour créer une interaction avec la lectine.

V. La fonctionnalisation de nanoparticules d'or

1. Nanoparticules d'or - Généralités

La chémobiologie (chemical biology) est la discipline qui se sert d'outils chimiques afin d'étudier et maitriser des systèmes biologiques. Ce domaine est caractérisé par la nécessité croissante d'apporter des améliorations aux méthodes de détection, de marquage et de sélectivité. La nécessité d'avoir de nouveaux outils permettant d'étudier et de manipuler des processus biologiques a notamment contribué au développement des nanotechnologies dédiées à la chémobiologie. De manière plus précise, les nanoparticules (NPs) d'or est une catégorie de nanomatériaux inorganiques très flexibles et très inertes vis-à-vis du corps humain. Ces nanoparticules sont retrouvées dans de nombreux scénarios scientifiques incluant la chémobiologie mais aussi la catalyse, le diagnostic, l'optique, le contrôle de la libération de médicaments, la chimie analytique, etc. [164]

En raison de leurs propriétés en milieux physiologiques, les NPs d'or sont fortement utilisées dans la libération contrôlée de médicaments. En effet, elles peuvent améliorer la biodisponibilité et la vectorisation d'un médicament sans pour autant comporter d'effets négatifs par une toxicité intrinsèque ou par accumulation dans les organes. [165] Les travaux de Wang *et al.* [166] sont un exemple de cette utilisation des NPs d'or employées dans la vectorisation de l'anticancéreux doxorubicine. De plus, grâce aux propriétés optiques des NPs, cette stratégie permet de suivre le relargage du principe actif dans les cellules cancéreuses.

Ces nanomatériaux sont organisés dans un état de plasmon de résonance, ce qui correspond à la présence d'un nuage électronique qui oscille le long de la surface métallique, créant ainsi une interface avec le milieu externe (solvant ou milieu biologique).

En fonction de leur taille qui peut varier entre 1 et 400 nm environ, les NPs d'or possèdent des propriétés optiques et électroniques qui peuvent varier. Généralement, les NPs à partir de 20 nm ont des longueurs d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) à environ 520 nm, en montrant un shift de cette bande vers les 600 nm lorsque la taille atteint les 200 nm. [167] Grâce à plusieurs techniques de synthèse des NPs d'or, [168] il est ainsi possible de moduler leur taille et en conséquence leurs propriétés optiques et électroniques (fluorescence et résonance).

De ce fait, des nanoparticules comprises entre 0.5 et 20 nm sont employées pour la catalyse et selon leur taille différentes propriétés catalytiques sont observées. [169] Pour l'imagerie et le diagnostic, des NPS de tailles aillant de 20 nm jusqu'à 100 nm sont utilisées afin d'observer des propriétés optiques et de fluorescence plus importantes.

---

[164] M. Das, K. H. Shim, S. S. A. An, D. K. Yi, Toxicol. Environ. Health Sci. **2011**, 3, 193–205.
[165] M. L. Etheridge, K. R. Hurley, J. Zhang, S. Jeon, H. L. Ring, C. Hogan, C. L. Haynes, M. Garwood, J. C. Bischof, Technology **2014**, 2, 214–228.
[166] F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun, J. Wang, ACS Nano **2011**, 5, 3679–3692.
[167] M. A. K. Abdelhalim, M. M. Mady, J. Nanomedicine Nanotechnol. **2012**, 03.
[168] M. Sengani, A. M. Grumezescu, V. D. Rajeswari, OpenNano **2017**, 2, 37–46.
[169] X. Zhou, W. Xu, G. Liu, D. Panda, P. Chen, J. Am. Chem. Soc. **2010**, 132, 138–146.

En raison de leur développement dans le domaine médical les NPs sont de plus en plus étudiées en chimie analytique, notamment dans le développement des techniques permettant de les analyser et de les caractériser. Les NPs d'or sont en effet caractérisée par spectroscopie Raman, SPR (surface plasmon resonance) et microscopie électronique. Les techniques séparatives employées pour étudier ces NPs sont essentiellement la chromatographie d'exclusion stérique et l'électrophorèse capillaire (EC). Ces nanomatériaux peuvent aussi être utilisés comme pseudo-phase stationnaire en EC afin d'améliorer les performances séparatives (sélectivité, résolution et efficacité).

En effet, l'EC étant adaptée à la séparation d'espèces chargées, il est possible de séparer des nanoparticules de différente taille et nature en raison de leurs propriétés électroniques intrinsèques.

2. Les nanoparticules-glucosinolates (NP-GLs)

En raison de l'intérêt des nanoparticules d'or en chémobiologie et de l'expertise développée en électrophorèse capillaire, un projet sur l'étude du système myrosinase-glucosinolate-nanoparticules d'or a été envisagée (Figure 32). Ce travail a été réalisé avec l'aide d'une stagiaire M2, Amal Farhat, au sein de l'équipe du Dr. Nehmé et du Pr. Morin de l'ICOA.

Dans le cadre de ce projet, le glucosinolate thiol a été greffé sur des nanoparticules d'or. L'action de la myrosinase sur ces nanoparticules greffées avec un glucosinolate (NP-GL) a été évaluée. La totalité de ce processus, fonctionnalisation et réactivité, a été suivie par électrophorèse capillaire, à l'aide d'une détection UV-Vis et conductimétrique sans contact (détecteur C^4D). La séparation de ces espèces a nécessité la mise en place de nouvelles conditions séparatives en EC.

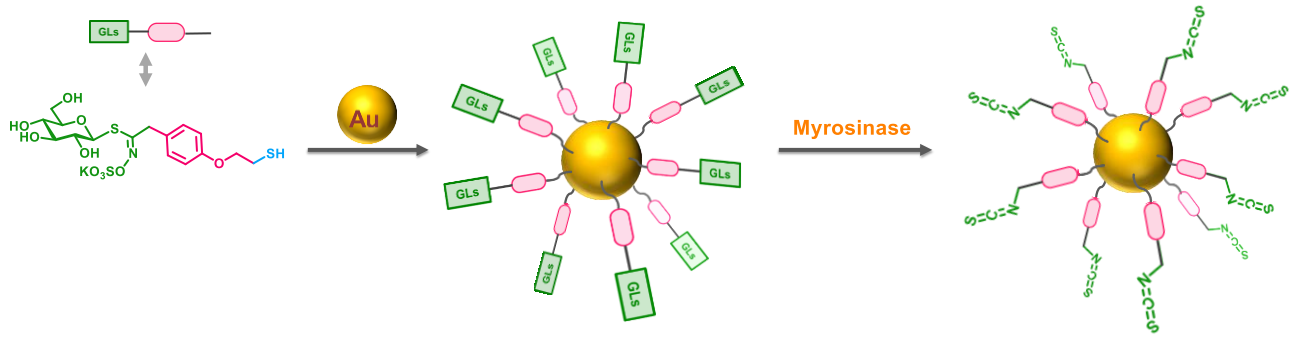


Figure 32 : fonctionnalisation de NP et réaction de la myrosinase avec les NP-GLs.

La synthèse des NP-GLs

Une première synthèse des NP-GL a été réalisée par l'équipe du Pr. Irina Zarafu de l'université de Bucharest (Romanie). Cela a été réalisée avec une méthode décrite par leur équipe qui prévoit la réduction du tétrachlorure d'or ($HAuCl_4$) d'abord avec la triphénylphosphine (pour obtenir de l'Au^+) et

ensuite avec du $NaBH_4$. Par la suite, le greffage du glucosinolate thiol a été réalisé par l'échange avec la triphénylphosphine présente sur la surface de la NP d'or. [170] Des nanoparticules polydisperses possédant une taille comprise environ entre 1 et 15 nm ont été utilisées lors de cette expérience. La mesure de la taille a été réalisée par une analyse au microscope électronique (Transmission Electron Microscopy-TEM). La liaison soufre-or est thermodynamiquement stable, pour cette raison, ce type de greffage est souvent utilisé pour toute sorte de conjugaisons avec les NP d'or. Ce type de liaison covalente S-Au est presque aussi forte que la liaison or-or (Au-Au), permettant ainsi la modification des réseaux de NPs d'or qui se forment grâce à des liaisons Au-Au. [171]

La nécessité de fonctionnaliser plusieurs lots de nanoparticules a mené à utiliser un autre protocole plus simple. [172] En utilisant des nanoparticules commerciales stabilisées dans une solution de citrate de sodium (concentration 1.09 nM), il est possible de greffer directement le glucosinolate thiol. L'avantage de cette deuxième méthode est sa rapidité (greffage en environ 24 heures) et le fait de partir cette fois d'un lot commercial de nanoparticules monodisperses (taille 20 nm), ayant donc la même taille. Plus précisément, après une fonctionnalisation en présence de GL- thiol de 18h, le mélange est centrifugé et lavé avec de l'eau distillée 2 fois. Ces lavages permettent d'éliminer au mieux les traces de GLs libres présents dans le surnageant. A la suite de la troisième centrifugation, les nanoparticules sont suspendues dans le tampon phosphate à pH 7 qui n'est autre que le tampon d'incubation dans lequel la réaction enzymatique peut avoir lieu.
La fonctionnalisation a été réalisée avec différentes quantités de GL thiol, cependant le meilleur résultat est obtenu lorsque la concentration de GLs dans le milieu réactionnel est de 1,6 mM. Des concentrations plus importantes ou plus faibles n'ont pas permis d'avoir de meilleures fonctionnalisations comme confirmé par EC.
La température optimale de la fonctionnalisation est de 25°C, ce qui favorise d'un côté la réaction avec le thiol, et de l'autre côté, empêche l'agrégation des nanoparticules.

[170] I. Turcu, I. Zarafu, M. Popa, M. Chifiriuc, C. Bleotu, D. Culita, C. Ghica, P. Ionita, Nanomaterials **2017**, 7, 43.
[171] H. Häkkinen, Nat. Chem. **2012**, 4, 443–455.
[172] M. R. Ivanov, H. R. Bednar, A. J. Haes, ACS Nano **2009**, 3, 386–394.

3. L'analyse des nanoparticules par électrophorèse capillaire

Afin de pouvoir contrôler les nanoparticules engagées dans la réaction avec le glucosinolate, un premier protocole analytique a été mis au point afin de pouvoir analyser les nanoparticules par EC, et conclure sur une éventuelle agrégation des NPs d'or.
En effet, en manipulant les nanoparticules il est souvent possible que les nanoparticules originairement à l'état colloïdal puissent s'agréger pour former des « clusters » de taille plus grande (quelques µm). Ces agrégats ont des propriétés électroniques différentes comparées aux nanoparticules dispersées. Plus précisément les agrégats absorbent la lumière à 600 nm au lieu de 520 nm pour les NPs dispersées. Grâce à l'utilisation d'un tampon de séparation électrophorétique (BGE) de type acide N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonique – dodecyl sulfate de sodium (CAPS 10 mM-SDS 70 mM, 1/1, v/v), à pH 10, il a été possible de déterminer le pourcentage d'agrégats dans nos échantillons, tout au long des manipulations et surtout après les centrifugations. Les tampons borate et phosphate (pH 10) ont aussi été testés comme BGE sans pour autant donner un meilleur résultat.

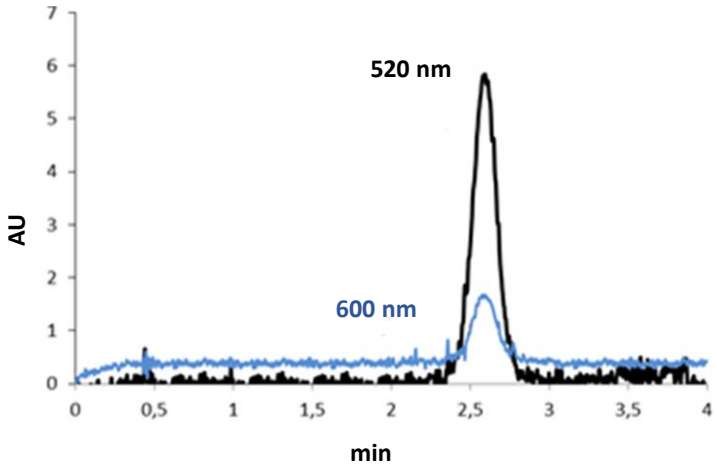


Figure 33 : électrophérogramme des nanoparticules commerciales ; AU : unité de mesure arbitraire.

La Figure 33 montre un électrophérogramme de nanoparticules commerciales analysées avec les conditions mentionnées ci-dessus. A juger de la taille du pic à 520 nm nettement plus grand que celui à 600 nm, il est possible en déduire que ces NPs sont bien dispersées. Pour plus de précision, nous avons exprimé le résultat en calculant le ratio (R) qui est égal au rapport de la surface du pic d'absorption à 520 nm sur le pic d'absorption à 600 nm. [172] Pour des NPs stables et non agrégées, la valeur de R est comprise entre 3,5 et 4. Pour l'échantillon testé dans la figure précédente, la valeur de R était de 3.9, confirmant que les NPs sont bien à l'état dispersé.

En analysant les nanoparticules-glucosinolate issues de la fonctionnalisation, un R de 3.8 a été calculé, ce qui confirme que la réaction avec le GL-thiol et les différents traitements de nettoyage des NPs fonctionnalisées n'ont pas induit une agrégation ou une précipitation des NPs.

Comme le montrent les électrophérogrammes de la Figure 34, cette même méthode permet de séparer les glucosinolates thiols, les nanoparticules commerciales et celle fonctionnalisées pour un meilleur suivi

de la réaction de fonctionnalisation des NPs. Notons le temps d'analyse relativement court, inférieur à 5 min.

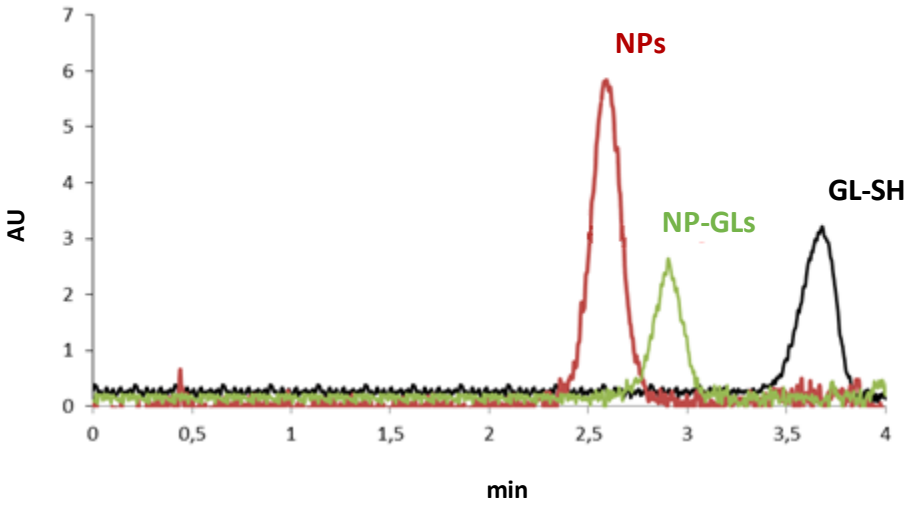


Figure 34 : séparation de NP commerciales, NP-GLs et GL thiol.

Il est bien évident que les NPs commerciales et celles fonctionnalisées possèdent des temps de migration différents du fait que les rapports charge sur taille (μ_{ep}) ne sont pas identiques. Ceci est une première preuve que la fonctionnalisation des NPs a bien eu lieu.

a. La double détection UV-conductimétrique

Par la suite, une méthode permettant d'analyser simultanément les glucosinolates libres et le sulfate (produit par la réaction d'hydrolyse de GLs par la myrosinase) a été mise en place. Cela est possible en utilisant simultanément deux détecteurs sur le même capillaire de séparation : le conductimètre et le détecteur UV. Grâce à la mise au point des conditions de double détection, il est possible de suivre, par UV, l'éventuelle présence de glucosinolate libre mais aussi la formation du sulfate issu de la réaction avec la myrosinase et ce à l'aide du conductimètre. Cette double détection a été testée avec des tampons tels que le phosphate et l'acide citrique- histidine, les deux à pH 3, cependant le meilleur résultat a été obtenu avec le BGE histidine-acide acétique à pH 4.2 (I = 40 mM).

Afin de valider la méthode d'analyse mise en place en EC-UV/conductimétrie, une réaction d'hydrolyse classique du glucosinolate thiol par la myrosinase a été suivie. Les résultats suivants ont été obtenus (Figure 35).

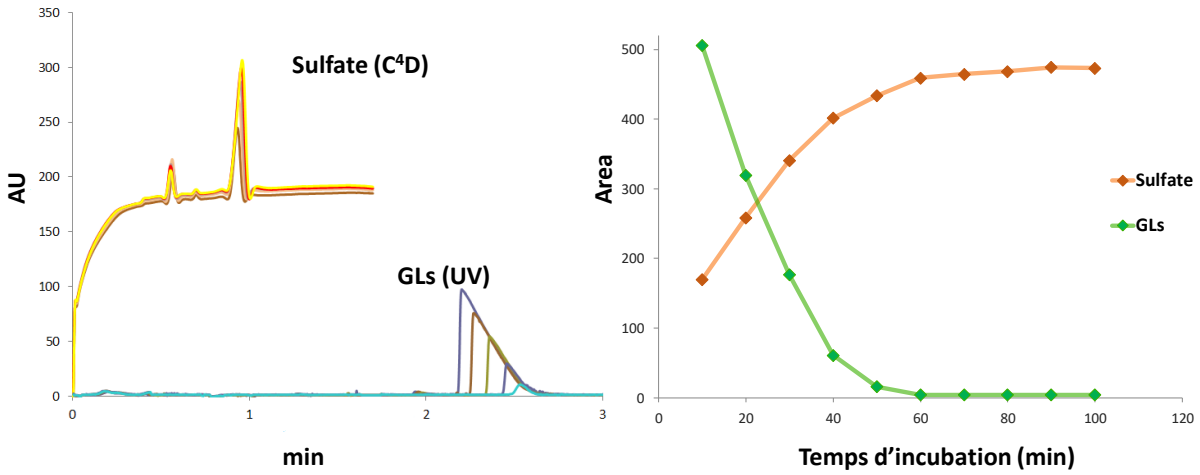


Figure 35 : Etude de la linéarité de la réaction d'hydrolyse d'un GL par la myrosinase. A gauche- électrophérogrammes obtenus à des temps d'incubation croissants par analyse EC-UV (détection du GLs en excès) et par analyse EC-conductimétrie (détection du sulfate). A droite - suivi de la concentration de GLs et de sulfate en fonction du temps d'incubation ; AU : unité de mesure arbitraire ; Area : aire du pic correspondant proportionnelle à la concentration

Les graphes de la Figure 35a, permettent de visualiser en même temps les deux signaux de détection (UV et conductimétrique) et donc toute présence de GLs et de sulfate dans le milieu réactionnel. Les courbes de la Figure 35 b, montrent que plus le temps d'incubation est élevé et plus la quantité de sulfate produite augmente alors que celle du substrat glucosinolate diminue de façon quantitative. Ces résultats valident la méthode d'analyse EC mise en place.

b. L'hydrolyse des NP-GLs

Pour les essais enzymatiques, les nanoparticules fonctionnalisées ont été gardées à la même concentration que les nanoparticules commerciales (1.09 nM) ce qui est une concentration relativement faible. Toutefois, il a été possible de tracer une courbe dore-réponse du sulfate produit en fonction du temps d'incubation pour plusieurs lots de NP-GLs. Le graphe de la Figure 36 indique l'avancement de la réaction enzymatique par l'augmentation de la concentration de sulfate en fonction du temps. Le signal obtenu simultanément par EC-UV ne montre aucun pic de GLs libre dans le milieu. Cela confirme que la réaction se réalise sur les glucosinolates greffés sur la NP et non sur des glucosinolates libres. Ces résultats complémentaires confirment que les NPs ont bien été fonctionnalisées par le GL thiol et que les NP-GL obtenues sont des substrats de la myrosinase.

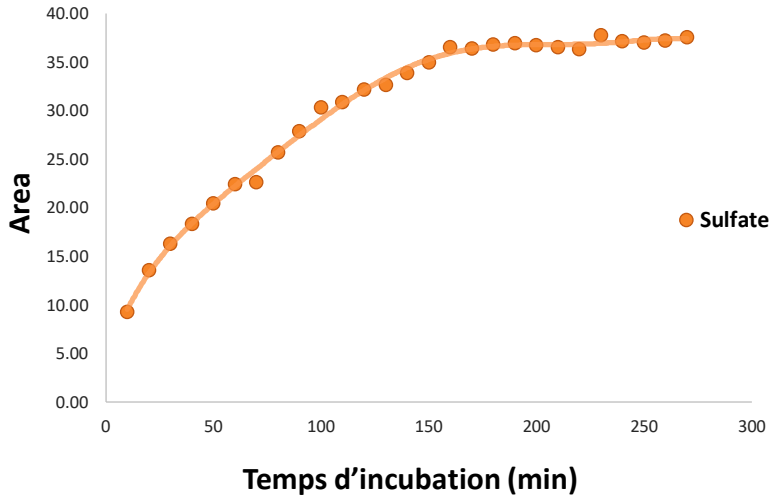


Figure 36 : suivi de la réaction entre la myrosinase et les NP-GLs.

Des essais utilisant des concentrations de nanoparticules plus élevées ont été réalisées afin de mieux évaluer la réaction de la myrosinase. Pour ce faire, les NP centrifugées ont été suspendues dans des volumes plus faibles. Cependant, la réaction entre la myrosinase et ces lots plus concentrés (3.8, 9.5 et 19 nM) ne montre pas une augmentation de l'hydrolyse du GL greffé. Il est possible d'en déduire que la concentration de 1.9 nM est la plus adaptée pour cette réaction enzymatique.

En analysant plusieurs lots de NP-GLs synthétisés dans les mêmes conditions, il a été constaté que la quantité de sulfate libéré change légèrement en fonction du lot. Différents taux de greffage pourraient être à l'origine de ce phénomène. Après plusieurs efforts pour identifier la cause de cette faible reproductibilité, aucune évidence pratique n'a été identifiée.

4. Conclusions

Dans le cadre de ce projet il a été possible de greffer un glucosinolate sur des nanoparticules d'or, et d'étudier la réaction enzymatique sur ce type de système original. Il a été donc possible de prouver la compatibilité du système MG avec le domaine des nanomatériaux, ce qui était un défi très ambitieux, en raison de la réactivité particulière des NPs d'or.
Cette étude a permis un développement analytique important. En effet, il a été possible de mettre en place et de valider une nouvelle stratégie par électrophorèse capillaire permettant d'étudier une matrice complexe, constitué de nanoparticules d'or- glucosinolate, réagissant avec une enzyme libre.

En raison de la complexité de ce sujet, des études ultérieures seront nécessaires, notamment pour le greffage de glucosinolates portant un espaceur plus long.

Conclusions et perspectives

Ce projet de recherche avait pour objet l'étude du système myrosinase-glucosinolate comme outil de bioconjugaison. Pour ce faire, nous avons conçu et synthétisé une bibliothèque de glucosinolates à double fonctionnalité. Ce travail a nécessité l'optimisation des voies de synthèse pour nous permettre d'obtenir des quantités de substrats suffisantes (de 100 mg jusqu'à 2 grammes). Parmi ces étapes d'optimisation, la préparation du précurseur thiohydroximate bromé **60** est un élément clé où 4 étapes consécutives sans chromatographie ont été développées pour atteindre après cristallisation, de très bons rendements et d'excellentes puretés par RMN et HRMS. Cela m'a permis de synthétiser une grande quantité de glucosinolate azido **47** mais aussi thiol **48**, et d'envoyer régulièrement des échantillons à nos différents collaborateurs, le Pr. P-Y. Renard à l'Université de Rouen, Pr H.H. Nour-Eldin à l'Université de Copenhague (Danemark) et le Pr. I. Zarafu à l'Université de Bucarest (Roumanie).

Ces substrats non naturels ont tous été testées vis-à-vis de l'hydrolyse par la myrosinase à l'aide d'une approche d'électrophorèse capillaire. Cela a permis de tracer des profils cinétiques permettant d'extrapoler des valeurs de K_m et de vitesse maximale atteinte V_{max} par la réaction. Aussi dans des cas plus complexes tels que les glucosinolates fluorescents et biotine, il a été possible d'obtenir un maximum d'informations concernant ces hydrolyses. Ce travail a permis de confirmer l'activité de nos GLs en tant que substrats de la myrosinase et de poursuivre l'avancement du projet et d'explorer dans le domaine de l'EC de nouvelles méthodes d'analyses on-line, ainsi que de suivre par cet outil, l'activité d'une enzyme supportée.

Parallèlement à ces études sur la cinétique d'hydrolyse, la réactivité chimique de la fonction thiohydroximate *O*-sulfatée des glucosinolates a aussi été étudiée. Pour ce faire la CuAAC, SPAAC, la réduction de Staudinger ainsi que des additions nucléophiles ont été explorées. Lors de ces explorations, il a été possible de tester la réactivité des GLs dans la réaction dite thiol-ène et dans le couplage de Vilarrasa.

Le couplage thiol-ène (CTE) est une réaction radicalaire qui se fait entre un thiol et un alcène. Suite à l'initiation faite par un initiateur radicalaire et par activation photochimique, il est possible d'obtenir le produit d'addition anti-Markovnikov avec d'excellents rendement. [173]
La réactivité thiol-ène a connu un grand succès dans le domaine des polymères,[174] des bio-polymères,[175] en glycochimie pour l'élaboration de glycoclusters,[176] mais aussi en bioconjugaison. [177] Il semblait alors intéressant de tester cette réactivité du glucosinolate thiol dans des conditions de type tiol-ene.
Pour ce faire, le test suivant a été réalisé :

[173] A. Dondoni, A. Marra, in Click Chem. Glycosci. (Eds.: Z.J. Witczak, R. Bielski), John Wiley & Sons, Inc., **2013**, pp. 45–75.
[174] P. Wessig, T. Schulze, A. Pfennig, S. M. Weidner, S. Prentzel, H. Schlaad, Polym. Chem. **2017**, 8, 6879–6885.
[175] (a) M. A. Azagarsamy, K. S. Anseth, ACS Macro Lett. **2013**, 2, 5–9. (b) T. O. Machado, C. Sayer, P. H. H. Araujo, Eur. Polym. J. **2017**, 86, 200–215.
[176] (a) M. Fiore, A. Marra, A. Dondoni, J. Org. Chem. **2009**, 74, 4422–4425. (b) Y. Gao, A. Eguchi, K. Kakehi, Y. C. Lee, Org. Lett. **2004**, 6, 3457–3460.
[177] Y. Liu, W. Hou, H. Sun, C. Cui, L. Zhang, Y. Jiang, Y. Wu, Y. Wang, J. Li, B. S. Sumerlin, et al., Chem. Sci. **2017**, 8, 6182–6187.

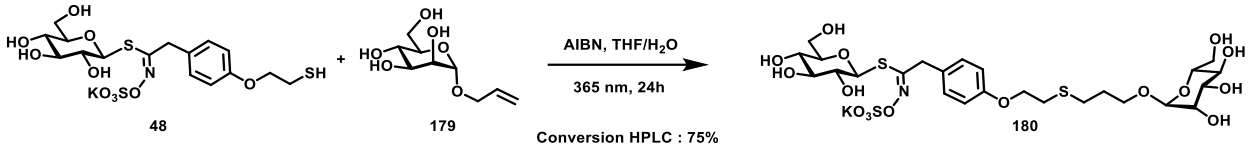


Schéma 78 : réaction tiol-ène avec d'un glucosinolate.

En présence d'AIBN jouant le rôle d'initiateur de la réaction radicalaire et d'allyl mannoside **179**, irradié avec une lampe UV à 365 nm la réaction donne une conversion optimale de 75% après 24h. Cette réaction modèle permet de prouver la compatibilité de la fonction glucosinolate vis-à-vis d'une réaction photochimique et radicalaire.
Cette réaction trouve un grand intérêt dans la synthèse de glucosinolates bifonctionnels. En effet, ces conditions douces permettent de connecter facilement une deuxième entité sur le motif glucosinolate, sans engendrer de réactions secondaires.

Le travail du Dr Wilfried Fredy (Rouen) a montré l'utilisation des GLs azido, notamment dans des réactions de couplage peptidique permettant d'obtenir des glucosinolates fluorescents. De ce fait le couplage peptidique peut être considéré comme un outil de synthétise des glucosinolates bifonctionnels, de la même façon que la réactivité thiol-ène.
Cependant la mise en œuvre de ces couplages peptidiques peut être fastidieuse. En effet en raison de l'instabilité du GL-NH_2 il n'est pas possible de stocker cet intermédiaire, par conséquent la réduction de Staudinger doit impérativement être réalisée avant chaque couplage. De plus ces réactions ont présenté des rendements de couplage moyens.

Afin d'améliorer et faciliter ce protocole, la réaction de Vilarrasa [178] sur un glucosinolate a été testée. Cette réaction permet de réaliser en une seule étape une réduction de Staudinger et un couplage peptidique à l'aide de réactifs de type di sélénides ou disulfides.
De cette façon il est possible de coupler le GL-azido avec un acide carboxylique biphényl mannoside, ce qui permet d'obtenir facilement un GL biphényl mannose.

[178] J. Burés, M. Martín, F. Urpí, J. Vilarrasa, J. Org. Chem. **2009**, 74, 2203–2206.

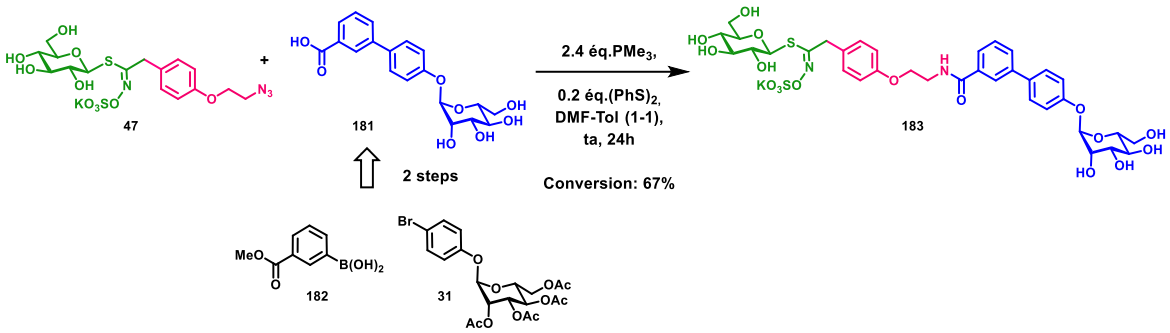


Schéma 79 : réaction de Vilarrasa d'un glucosinolate.

Le biphényl mannoside a été synthétisé grâce à un couplage de Suzuki entre l'acide boronique de l'ester benzoïque et le bromo phényle mannoside (rendement 85%) avec la méthode optimisée précédemment (Chapitre 1 Schéma 14).

Ensuite, en utilisant de la triméthyl phosphine et le phényle disulfide, dans un mélange DMF toluène, il a été possible d'observer la formation produit désiré avec une conversion de 67% vérifié par HPLC. Ce résultat déjà encourageant pourrait être amélioré en utilisant le pyridil di sélénide, ce qui est connu pour ses excellents résultats.
A l'exception du suivi LC-MS aucune caractérisation n'a été réalisée pour le composés ciblés, à cause des faibles quantités de produit de départ engagées. Néanmoins, la preuve de faisabilité de cette réaction avec des carbohydrates non protégés et des glucosinolates, permet d'envisager la synthèse d'autres sonde bifonctionnelles de type glucosinolate-ligand ou glucosinolate-fluorophore lors des dernières étapes de préparation des molécules finales.

Ces deux réactions apportent une solution aux problèmes de réactivité propre à l'instabilité du glucosinolate amino aliphatique. En effet au long de cette réaction l'espèce GL-NH_2 n'est pas générée.

Le travail d'étude de la réactivité chimique des GLs a comporté un grand nombre de tests réactionnels sur des produits issus d'environ une dizaine d'étape de synthèse, et donc une obligation de travailler le plus souvent sur des quantités d'environ 30 mg.

Pour la première fois des substrats de type glucosinolates ont été impliqués dans des réactions classique de chimie organique. Par conséquent, la mise en place de protocoles réactionnels n'a pas pu être appuyée par des protocoles préexistants en littérature. De plus, lors de ces tests, il a fallu faire face à la réactivité particulière des GL, des molécules anioniques, possédant des hydroxyles libres, très hydrophiles et souvent incompatibles avec d'autres réactifs en raison de la réactivité exacerbée de la fonction thiohydroximate sulfatée.

En raison de l'unicité des molécules synthétisées, ce travail de synthèse a nécessité la mise en place de séparations LC-MS bien particulières. Après avoir testé plusieurs colonnes chromatographiques la colonne Kinetex F-5 a permis d'obtenir des bonnes séparations, et ainsi de pouvoir suivre et élucider des réaction complexes.

L'étude de la réactivité des GLs azotures a abouti à des GLs fluorescéine à chaine aliphatique et aromatique inspirées par deux GLs naturels (Schéma 80 molécules **66** et **184**).

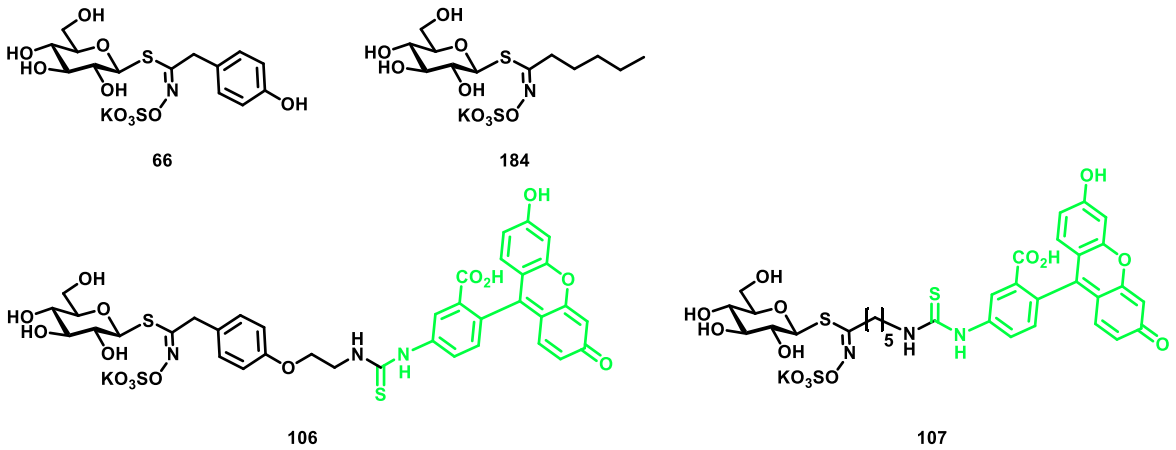


Schéma 80 : glucosinolates naturels (en haut) et GLs fluorescéine (en bas).

Ces deux glucosinolates fluorescéine ont été utilisé par des collaborateurs Danois (Pr H.H. Nour-Eldin) afin d'étudier des transporteurs membranaires de glucosinolates chez les plantes. En raison de leur similarité avec des GLs naturels, il serait possible que nos glucosinolates artificiels puissent être prise en charge par ces transporteurs (**GTR1**, **GTR2**, et **GTR3**).

Grâce à ces glucosinolates il a été démontré que certains transporteurs semblent spécifiques à des glucosinolates aromatiques. Ils permettent alors la pénétration du glucosinolate aromatique fluorescéine à l'intérieur de la cellule et leur présence peut être visualisé par imagerie de fluorescence Figure 37.

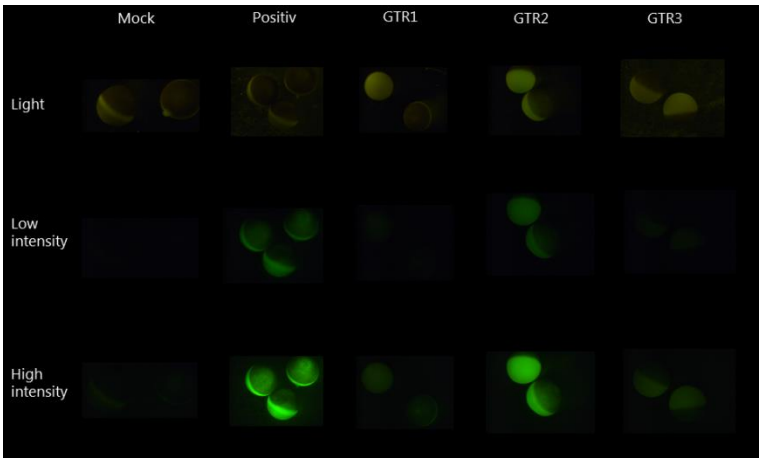


Figure 37 : image au microscope des cellules en contact avec le GL aromatique fluorescéine.

Dans la Figure 37 la colonne « Mock » correspond au contrôle négatif, dans lequel les cellules sont immergées dans une solution de glucosinolate, et ensuite lavées. La colonne « Positiv » fait référence à l'échantillon dans lequel le glucosinolate **106** a été injecté dans les cellules manuellement.

En observant les clichés il est possible de constater que hormis le contrôle positif, seul le transporteur GTR2 prend en charge le glucosinolate aromatique et permet sa pénétration dans la cellule. Le contrôle négatif montre qu'en absence de transporteur aucun glucosinolate ne pénètre dans la cellule.

Ce travail réalisé par nos collaborateurs montre le potentiel d'application de la synthèse des glucosinolates fluorescents comme substrats de la myrosinase, notamment ici, dans le cadre d'étude de physiologie des plantes. Dans le cadre de ce projet, les perspectives sont de concevoir des GLs avec une variété de fluorophores permettant une visualisation du transport des glucosinolates au sein des plantes, de même qu'une modification des chaines « aglycones » aliphatiques ou aromatique pour étudier la sélectivité des transporteurs membranaires.

Dans cette dernière perspective, l'utilisation d'un PEG_2 ou PEG_3 serait une approche permettant d'éloigner la partie glucosinolate de l'encombrement apporté par le fluorophore (Schéma 81). Le *t*-Boc-N-Amido-PEG-CH_2COOH commercialement disponible en PEG_2 et PEG_3 pourrait être couplé avec un fluorophore de type NHS activé. Par la suite, le fluorophore PEG serait branché sur le glucosinolate-azido par couplage de Vilarrasa. Cette approche permettrait de synthétiser des sondes avec un GL portant une partie « aglycone » de type aromatique ou aliphatique. De plus, l'amine du bras PEG autorise la fonctionnalisation avec un large panel de fluorophores commerciaux, vendus le plus souvent sous forme d'isothiocyanate, NHS ou acides carboxyliques.

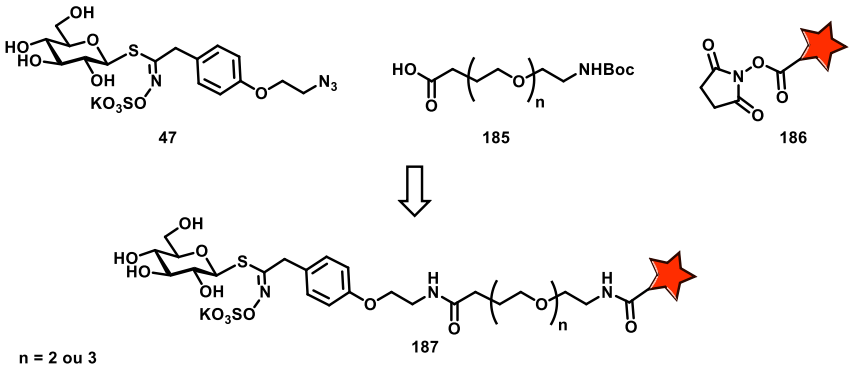


Schéma 81 : glucosinolate fluorescent PEG.

Après avoir consolidé le système MG basé sur des glucosinolates artificiels, plusieurs approches de bioconjugaison ont été tenté. L'application du système a notamment été validée pour la préparation de néoglycoprotéines. Nous avons constaté que l'approche enzymatique de production d'isothiocyanates permet de produire des résultats aussi bons que les méthodes classiques. L'avantage de ce système est que les GLs préparés sont des produits non toxiques et facilement conservables contrairement aux isothiocyanates commerciaux usuellement employés dans ces fonctionnalisations.

Pour envisager une évolution de ce projet, une stratégie de synthèse de néoglycoprotéines en présence de GLs possédant d'autres type de ligands est à développer.

La constitution d'une plus grande bibliothèque de NGPs serait envisageable en utilisant la chimie des glucosinolates portant une fonction orthogonale. En effet, grâce à une étape de couplage (sur la fonction thiol, bromure ou azoture), la nature du ligand peut être plus aisément modulable et permettre de synthétiser des néoglycoprotéines originales (Schéma 82).

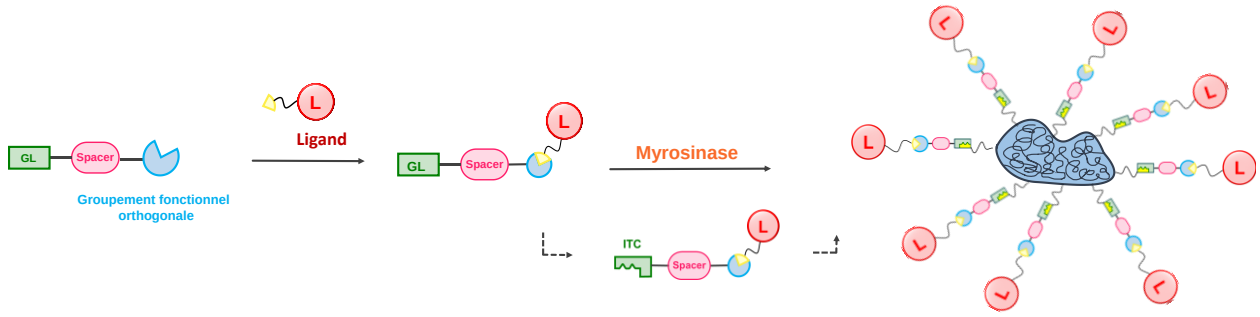


Schéma 82: diversification des glycoprotéines.

Le système MG a aussi été utilisé dans une approche de conjugaison sélective sur la ConA. Bien que la régiosélectivité de ce lien doit encore être prouvée, grâce au travail réalisé il a été possible de moduler l'activité enzymatique et la conjugaison pour orienter la conjugaison vers une monovalence et sélectivité d'accroche au site de reconnaissance. De faibles quantités d'enzyme et de glucosinolate ont ainsi permis d'obtenir un échantillon constitué de protéines mono marquées. Par ailleurs ce projet a permis, par des approches de chemoinformatique, de sélectionner le ligand pour obtenir ce mono-accroche, et qui se doute indispensable lorsque on cible des protéines.

Afin de prouver le marquage sélectif du site de reconnaissance d'une lectine, une autre stratégie pourrait se révéler utile.

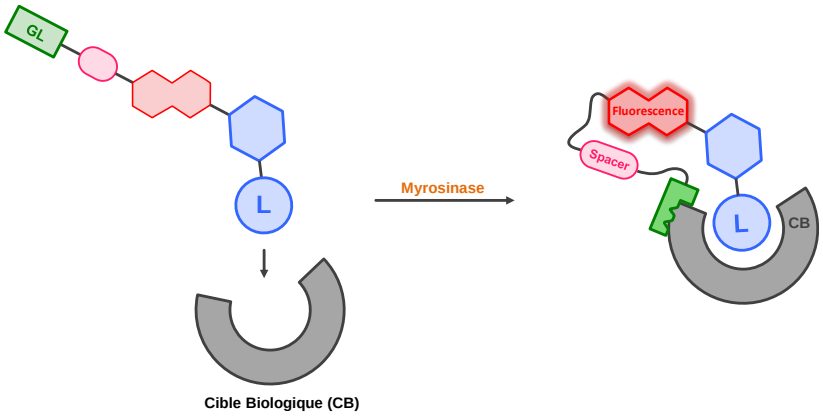


Schéma 83 : sonde GL à fluorescence turn-on.

En utilisant un système de fluorophores bien précis, il serait possible avoir une fluorescence uniquement lorsque le ligand est positionné dans le site de reconnaissance de la lectine, en raison de l'environnement hydrophobe.
Plusieurs exemples en littérature démontrent l'utilisation de fluorophores présentant une augmentation d'intensité de fluorescence lorsqu'ils sont positionnés dans un environnement hydrophobe. [179] Dans notre cas, la molécule X est susceptible de donner l'effet de fluorescence turn-on espéré.

En effet il serait possible de connecter un fluorophore de type 4-sulfamonyl-7-

[179] (a) G. Chakraborty, A. K. Ray, P. K. Singh, H. Pal, Chem. Commun. **2018**, 54, 8383–8386. (b) Z. Liu, L. Du, M. Li, Sci. China Chem. **2013**, 56, 1667–1670. (c) Y.-D. Zhuang, P.-Y. Chiang, C.-W. Wang, K.-T. Tan, Angew. Chem. Int. Ed. **2013**, 52, 8124–8128

Aminobenzoxadiazole (SDB) sur le biphényl mannoside et ensuite sur un GL azido. Les SDB sont connues pour avoir une grande augmentation d'émission de fluorescence lorsqu'elle se trouvent dans un milieu hydrophobe tel que le site actif d'un enzyme. [179 (c)] Cela semblerait donc adapté à notre approche.

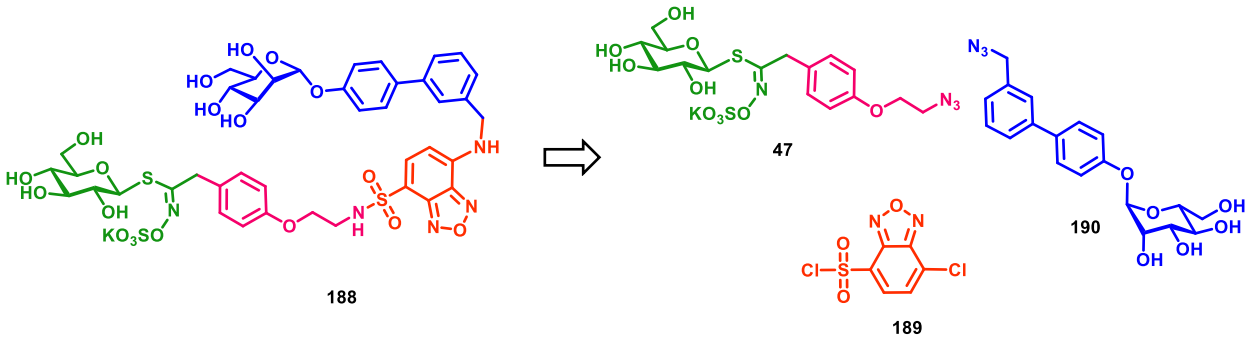


Schéma 84 : sonde turn-on GL-SDB- mannose.

La stratégie montrée dans le Schéma 84 permet d'obtenir en quelques étapes une sonde GL turn-on, en partant du glucosinolate azido et un azido bi phényl mannoside. Ces deux molécules pourraient être couplées sur le dérivé benzodiazole **189** commerciale.

Pendant ce travail de thèse l'utilisation du système MG a été orientée vers le domaine des nanomatériaux. L'étude par électrophorèse capillaire a permis d'élaborer le greffage de glucosinolates sur des nanoparticules d'or grâce à une fonction thiol. Ce glucosinolate greffé sur la nanoparticule reste substrat de la myrosinase et ouvre la possibilité de fonctionnalisation de nanoparticule d'or induite par une enzyme et ouvre un champ de recherche de fonctionnalisations très intéressant.

Pour conclure ce travail de thèse nous avons montré qu'il était possible d'utiliser un outil enzymatique naturel pour des approches de bioconjugaison. Les progrès accomplis dans la synthèse des GLs non naturels, et les résultats obtenus dans les bioconjugaisons réalisées, confirment que le système MG peut être appliqué dans le domaine de la bioconjugaison.

L'intérêt de cette approche réside dans la formation de l'isothiocyanate à l'aide de glucosinolates stables et hydrosoluble. En effet, la plupart des GLs synthétisés ont montré une grande stabilité au stockage, et aussi une stabilité à l'hydrolyse aqueuse. La fonction glucosinolate améliore nettement la solubilité des réactifs de bioconjugaison, contrairement à un réactif isothiocyanate classique.

Suite à ce travail, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. L'obtention de GLs possédant un bras espaceur plus important permettrait d'améliorer la versatilité de cet outil de bioconjugaison. En se servant d'un GL de ce type, il serait intéressant d'étudier le mécanisme d'hydrolyse de la myrosinase en présence d'une lectine, afin de savoir si l'hydrolyse se fait sur le GL en solution ou lorsqu'il est reconnu par la lectine. Cette étude pourrait se faire par électrophorèse capillaire, une technique qui offre la possibilité d'analyser en même temps protéines et GLs, et aussi par Thermophorèse, un appareillage permettant de calculer l'affinité et l'interaction de différentes espèces en solution.

Experimental Part

General methods:

Flash silica column chromatography was performed on silica gel 60N (spherical, neutral, 40-63µm, Merck) or using a Reveleris® flash chromatography system. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60F254 precoated aluminium plates. Compounds were visualised under UV light and by charring with a 10% H_2SO_4 ethanolic solution, a solution of potassium permanganate. Solvents were dried by standard methods: THF was purified with a dry station GT S100 immediately prior use, dichloromethane was distilled over P_2O_5; dried methanol from ACROS ORGANICS, *N*,*N*-dimethylformamide and dioxane were dried over molecular sieves; pyridine and triethylamine were dried over potassium hydroxide. Molecular sieves were activated prior to use by heating for 4h at 500°C. All other commercial solvents and reagents were used without further purification. All reactions were carried out under dry argon atmosphere. Melting points were determined in open capillary tubes using a Büchi 510 apparatus and are uncorrected. Optical rotation were measured at 20°C using a Perkin Elmer 341 polarimeter with a path length of 1 dm, values are given in $deg.dm^{-1}.g^{-1}.mL^{-1}$ with concentrations reported in $g.100mL^{-1}$. ^1H NMR and ^{13}C NMR were recorded with Bruker Avance II 400 or Bruker DPX 250 spectrometers. Assignments were based on DEPT 135 sequence, homo- and heteronuclear correlations. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm) using tetramethylsilane as the internal standard. For the ^{13}C NMR in deuterated water, acetone was used as internal standard. Coupling constants (J) are reported and expressed in Hertz (Hz), splitting patterns are designated as b (broad), s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), q (quartet), dt (doublet of triplet), ddd (doublet of doublet of doublet), m (multiplet). High-resolution mass spectra (HRMS) were performed on a Maxis Bruker 4G by the "Federation de Recherche" ICOA/CBM (FR2708) platform in the electrospray ionisation (ESI) mode. The infrared spectra of compounds were recorded on a Thermo Scientific Nicolet iS10. The following solvents have been abbreviated: ethyl acetate (EA), petroleum ether (PE), tetrahydrofuran (THF), diethyl ether (Et_2O) and DMF (*N*,*N*-dimethylformamide), methanol (MeOH). Thioglucosidase from Sinapis alba (white mustard) seed (myrosinase, EC 3.2.1.147, 25 U, ≥100 units per g), Concanavalin A from Canavalia ensiformis (Jack bean) Type IV, lyophilized powder were purchased from Sigma-aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France. Bovin Serum Albumins (BSA) lyophilized powder TDS-1035-70 was purchased from U2B NovacapGroup.

HPLC Separations:

Liquid-chromatography Mass-spectroscopy (LC-MS) was performed on a Thermo Scientific UltiMate 3000 UHPLC with a column Waters Xtera C18 2.1 x 50mm, 3.5µm or with a column Phenomenex Kinetex® 2.6 µm F-5 100 Å, 2.1 x 100 mm, 60 Å porosity. Two detectors were used: an UV (λ = 254 nm) and a quadrupole MSQ Plus ESI+ or -.

Capillary Electrophoresis:

procedure followed protocols earlier developed in our laboratory. [72, 109] Substrates are used at large excess relative to the enzyme (about 100 times). For this reason, Myrosinase was used at 0.05 U.mL-1 for

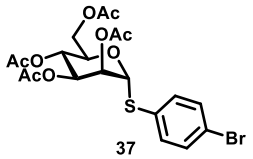
all assays. The myrosinase activity was determined by following the hydrolysis of the glucosinolate substrate, the SO_4^{2-} produced was detected by the C4D and quantified. The volume of the reaction mixture was set down to 7 µL, instead of the 100 µL used previously, and was carried out in a micro-vial of the CE instrument autosampler.

The nonlinear curve fitting program PRISM® 5.04 (GraphPad, San Diego, California, USA) was used to determine KM and Vmax according to the following equation:

$$V_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

where V_i is the reaction rate, K_M is the Michaelis Menten constant, V_{max} is the maximum reaction velocity and [S] is the substrate (glucosinolate) concentration.

1-Thio-(4-bromophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranoside 37



1-Thio-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranoside **36** (2.4 g, 6.6 mmol, 0.96 equiv.), 1-bromo-4-iodobenzene (1.95 g, 6.9 mmol, 1 equiv.), Xantphos (100 mg, 0.17 mmol, 2.5 mol%), palladium (II) acetate (78 mg, 0.35 mmol, 5 mol%) were added in the reaction vessel. The solid mixture was put under vacuum and backfilled with dry argon three times, then anhydrous dioxane (40 mL), anhydrous triethylamine (960 µL, 6.9 mmol, 1 equiv.) were sequentially added. The solution was heated at 100°C for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA: 100/0 to 50/50) to give the desired product **37** as a mixture of α/β anomers (80/20) as a brown foam (3.11 g, 87%).

R_f = 0.8 (DCM/MeOH: 96/4).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.44 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2.2H, CH_{Ar}), 7.40 - 7.33 (m, 2.2H, CH_{Ar}), 5.64 (d, $^3J_{2-3}$ = 3.4 Hz, 0.2H, $H_{2\beta}$), 5.51 - 5.43 (m, 2H, $H_{1\alpha}$, $H_{3\alpha}$), 5.36 - 5.22 (m, 2.2H, $H_{2\alpha}$, $H_{4\alpha}$, $H_{4\beta}$), 5.05 (dd, ^3J (3-4) = 10.1 Hz, $^3J_{3-2}$ = 3.3 Hz, 0.2H, $H_{3\beta}$), 4.87 (s, 0.2H, $H_{1\beta}$), 4.51 - 4.45 (m, 1H, $H_{5\alpha}$), 4.29 (dd, $^2J_{6a-6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.9 Hz, 1H, $H_{6a\alpha}$), 4.27 - 4.23 (m, 0.2H, $H_{6a\beta}$), 4.17 (dd, $^2J_{6b-6a}$ = 12.1 Hz, $^3J_{6-5}$ = 1.9 Hz, 0.2H, $H_{6b\beta}$), 4.10 (dd, ^2J (6b-6a) = 12.2 Hz, ^3J (6b-5) = 1.5 Hz, 1H, $H_{6b\alpha}$), 3.72 - 3.62 (m, 0.2H, $H_{5\beta}$), 2.20 (s, 0.7H, $CH_{3\ Ac\ \beta}$), 2.15 (s, 3H, $CH_{3\ Ac\ \alpha}$), 2.09 (s, 0.7H, $CH_{3\ Ac\ \beta}$), 2.07, 2.05, (2 x s, 6H, $CH_{3\ Ac\ \alpha}$), 2.04 (bs, 1.4H, $CH_{3\ Ac\ \beta}$), 2.01 (s, 3H, $CH_{3\ Ac\ \alpha}$), 1.98 (s, 0.7H, $CH_{3\ Ac\ \alpha}$).

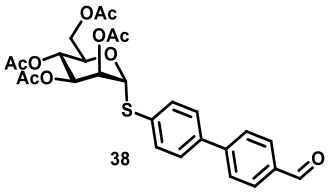
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 170.64 (C=O_β), 170.59 (C=O_α 170.2, 170.1 (C=O_β), 170.0, 169.9, 169.8 (C=O_α), 169.7 (C=O_β), 133.8 ($CH_{Ar\ \beta}$), 133.6 ($CH_{Ar\ \alpha}$), 132.4 ($CH_{Ar\ \alpha}$), 132.3 ($CH_{Ar\ \beta}$), 131.9 ($Cq_{Ar\ \alpha}$), 122.7 ($Cq_{Ar\ \beta}$), 122.6 ($Cq_{Ar\ \alpha}$), 85.6 (C-1_α), 85.5 (C-1_β), 76.6 (C-5_β), 71.9 (C-3_β), 70.9 (C-3_α), 70.5 (C-2_β), 69.8 (C-5_α), 69.4 (C-4_α or C-2_α), 66.4 (C-2_α or C-4_α), 65.8 (C-4_β), 62.9 (C-6_β), 62.6 (C-6), 21.0 ($CH_{3\ Ac\ \beta}$), 20.9 ($CH_{3\ Ac\ \alpha}$), 20.8, 20.76 ($CH_{3\ Ac\ \beta}$), 20.7 ($CH_{3\ Ac\ \alpha}$), 20.68.

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1750 (C=O), 1666 (C=C), 1474 (C=C $_{Ar}$), 1215 (C-O), 815 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{20}H_{24}BrO_9S$ ([M+H]$^+$): 519.0319, found 519.0314.

General procedure 1 : tetraacetylated (4-bromophenyl)-α-D-mannopyranoside **31 or 37** (1 equiv.), 4- or 3-formylphenyl boronic acid (3 equiv.), cesium carbonate (3 equiv.), and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (10 mol%) were heated at 80°C in dioxane/water (84/16, 0.055 M) for 1 h, under argon atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by silica gel column chromatography (PE/EA: 100/0 to 40/60).

4'-(1-Thio-[2, 3, 4, 6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyloxy])-1,1'-biphenyl-4-carboxaldehyde 38



General procedure 1 was followed with tetraacetylated 1-thio-(4-bromophenyl)-α-D-mannopyranoside **37** (3 g, 5.79 mmol), 4-formylphenyl boronic acid (2.6 g), cesium carbonate (3.11 g), and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (650 mg) in dioxane/water 84/16 (105 mL). The desired product **12** was obtained as a mixture of α/β anomers (80/20) as a yellow foam (2.7 g, 88%).

R_f = 0.45 (PE/EA: 5/5).

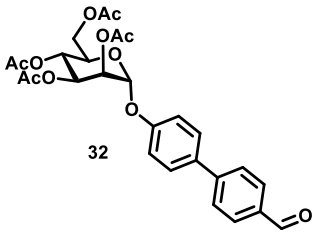
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 10.05 (s, 1.2H, CHO), 7.95 (d, ^3J = 7.9 Hz, 2.4H, CH_{Ar}), 7.71 (bd, ^3J = 7.9 Hz, 2.4H, CH_{Ar}), 7.61 - 7.53 (m, 4.8H, CH_{Ar}), 5.69 (d, ^3J (2-3) = 3.4 Hz, 0.30H,$H_{2\beta}$), 5.56 (bs, 1H, $H_{1\alpha}$), 5.51 (s, 1H, $H_{2\alpha}$), 5.45 - 5.26 (m, 2.4H, $H_{3\alpha}$, $H_{4\alpha}$, $H_{4\beta}$), 5.08 (dd, ^3J (3-4) = 10.0 Hz, ^3J (3-2) = 3.4 Hz, 0.30H, $H_{3\beta}$), 4.98 (bs, 0.25H, $H_{1\beta}$), 4.59 - 4.50 (m, 1H, $H_{5\alpha}$), 4.32 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$= 5.6 Hz, 1.4H, $H_{6a\alpha}$, $H_{6a\beta}$), 4.21 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$= 2.6 Hz, 0.30H, $H_{6b\beta}$), 4.15 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$= 2.4 Hz, 1H, $H_{6b\alpha}$), 3.78 - 3.71 (m, 0.30H, $H_{5\beta}$), 2.22 (s, 0.8H, $CH_{3\,Ac\,\beta}$), 2.16 (s, 3H, $CH_{3\,Ac\,\alpha}$), 2.10 (s, 0.91H, $CH_{3\,Ac\,\beta}$), 2.08 (s, 3H, $CH_{3\,Ac\,\alpha}$), 2.04, 2.03, (s x 3, 7.1H, $CH_{3\,Ac\,\alpha,\,\beta}$), 1.99 (s, 0.83H, $CH_{3\,Ac\,\beta}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 191.8 (HC=O), 170.6 (C=O $_{Ac\,\beta}$), 170.5 (C=O $_{Ac\,\alpha}$), 170.1 (C=O $_{Ac\,\beta}$), 170 (C=O $_{Ac\,\beta}$), 169.9 (C=O $_{Ac\,\alpha}$), 169.8 (C=O $_{Ac\,\alpha}$), 169.7 (C=O $_{Ac\,\alpha}$), 169.6 (C=O $_{Ac\,\beta}$), 145.98 (Cq $_{Ar\,\beta}$), 145.95 (Cq $_{Ar\,\alpha}$), 139.4 (Cq $_{Ar\,\beta}$), 139.37 (Cq $_{Ar\,\alpha}$), 135.5 (Cq $_{Ar\,\alpha}$), 133.9 (Cq $_{Ar\,\beta}$), 133.3 (Cq $_{Ar\,\alpha}$), 132.2 (CH $_{Ar\,\beta}$), 132.1 (CH $_{Ar\,\alpha}$), 130.7 (CH $_{Ar\,\beta}$), 130.3 (CH $_{Ar\,\alpha}$), 128.0 (CH $_{Ar\,\alpha}$), 127.9 (CH $_{Ar\,\beta}$), 127.54 (CH $_{Ar\,\alpha}$), 126.9 (CH $_{Ar\,\beta}$), 85.5 (C-1 $_{\alpha}$), 85.4 (C-1 $_{\beta}$), 76.6 (C-5 $_{\beta}$), 71.8 (C-3 $_{\beta}$), 70.9 (C-2 $_{\alpha}$), 70.6 (C-2 $_{\beta}$), 69.7 (C-5 $_{\alpha}$), 69.3 (C-4 $_{\alpha}$ or C-3 $_{\alpha}$), 66.3 (C-3 $_{\alpha}$ or C-4 $_{\alpha}$),65.8 (C-4 $_{\beta}$), 62.8 (C-6 $_{\beta}$), 62.4 (C-6 $_{\alpha}$), 20.9 ($CH_{3Ac\,\alpha}$), 20.8 ($CH_{3Ac\,\beta}$), 20.7, 20.63 (2 x $CH_{3Ac\,\alpha}$), 20.6, 20.5 ($CH_{3Ac\,\alpha}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1736 (C=O), 1698 (HC=O), 1604, 1515, 1483 (C=C $_{Ar}$), 1212 (C-O), 812,751 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{27}H_{29}NaO_{10}S$ ([M+Na]$^+$): 567.1295, found 567.1298.

4'-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyloxy)-1,1'-biphenyl-4-carboxaldehyde 11



General procedure 1 was followed with tetraacetylated 4-bromophenyl-α-D-mannoside **31** (1.6 g), 4-formylphenylboronic acid (1.43 g), cesium carbonate (3.11 g), and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (356 mg) in dioxane/water (84/16) (58 mL). The desired product **32** was obtain as a yellow foam (1.42 g, 84%).

R_f = 0.46 (PE/EA: 5/5).

$[\alpha]_D^{20}$= +79.6 (*c* = 0.69 in MeOH).

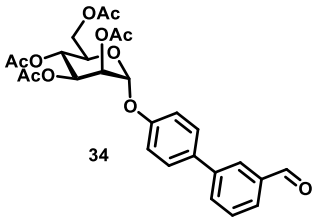
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 10.05 (s, 1H, HC=O), 7.94 (d, ^3J = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.71 (d, ^3J = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.6 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H,H_{Ar}), 7.20 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.61 - 5.57 (m, 2H, H_1, H_3), 5.49 - 5.46 (m, 1H, H_2), 5.40 (t, $^3J_{4-3}$ = $^3J_{4-5}$ = 10.2 Hz, 1H, H_4), 4.30 (dd, $^3J_{6a-6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.2 Hz, 1H H_{6a}), 4.15 - 4.07 (m, 2H,H_{6b}, H_5), 2.22, 2.07, 2.05, 2.04 (s x 4, 12H, $CH_{3\ Ac}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 192 (HC=O), 170.6, 170.1, 170.07, 169.8 (4 x C=O $_{Ac}$), 156.1 (Cq $_{Ar}$) , 146.4 (Cq $_{Ar}$), 135.2 (Cq $_{Ar}$), 134.7 (Cq $_{Ar}$), 130.5 (CH $_{Ar}$), 128.8 (CH $_{Ar}$), 127.4 (CH $_{Ar}$), 117.1 (CH $_{Ar}$), 95.9 (C-1), 69.5 (C-2 or C-5), 69.49 (C-5 or C-2), 69.0 (C-3), 66.1 (C-4), 62.2 (C-6), 21.0, 20.85, 20.83, 20.82 (4 x $CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1742 (C=O $_{Ac}$), 1698 (C=O ald), 1602, 1523, 1495 (C=C $_{Ar}$), 1212 (C-O), 847, 818 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{27}H_{29}O_{11}$ ([M+H]$^+$): 529.1704 , found 529.1708.

4'-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyloxy)-1,1'-biphenyl-3-carboxaldehyde 13



General procedure 1 was followed with tetraacetylated 4-bromophenyl-α-D-mannoside **31** (2.35 g,), 3-formylphenylboronic acid (1.43 g), cesium carbonate (3.11 g), and tetrakis(triphenylphosphine)palladium

(356 mg) in dioxane/water (84/16) (85 mL). The desired product **34** was obtained as a yellow foam (1.97 g, 80%).

***R**f* = 0.72 (PE/EA: 5/5).

$[\alpha]_D^{20}$= +92.5 (*c* = 0.13 in MeOH).

^{1}H NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 10.04 (s, 1H, HC=O), 8.02 (s, 1H, H $_{Ar}$), 7.79 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H, H $_{Ar}$), 7.58 - 7.51 (m, 3H, H $_{Ar}$), 7.17 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H $_{Ar}$), 5.59 - 5.54 (m, 2H, H_1, H_3), 5.45 (bs, 1H, H_2), 5.37 (t, $^3J_{4\text{-}3}$ = $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.2 Hz, 1H, H_4), 4.27 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.4 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$ = 5.4 Hz, 1H, H_{6a}), 4.14 - 4.04 (m, 2H, H_{6b}, H_5), 2.18 (s, 3H, $CH_{3\ Ac}$), , 2.04, 2.02, 2.01 (3 x s, 9H, $CH_{3\ Ac}$).

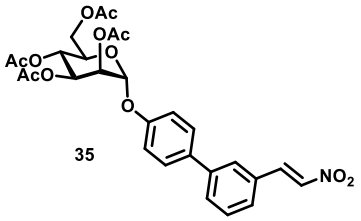
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 192.3 (HC=O), 170.5, 170.0, 169.9, 169.7 (C=O), 155.6, 141.3, 137.0, 134.6 (Cq $_{Ar}$), 132.7, 129.5, 128.5, 128.4, 127.7, 117.0 (CH $_{Ar}$), 95.9 (C-1), 69.4 (C-2 or C-5), 69.3 (C-5 or C-2), 68.9 (C-3), 66.0 (C-4), 62.1 (C-6), 20.9, 20.7 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1744 (C=O), 1696 (C=O ald), 1605, 1514 (C=C $_{Ar}$), 1215 (C-O), 836 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{27}H_{29}NaO_{11}$ ([M+Na]$^+$): 551 1524 , found 551.1524.

General procedure 2: ammonium acetate (1.1 equiv.) was added to a solution of mannoside **32, 34** and **38** (1 equiv.) in nitromethane (0.08 M). The reaction mixture was heated for 2 to 24h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by silica gel column chromatography (PE/EA: 100/0 to 40/60) (compound **35**). For compounds **33** and **39**, the residue obtained after evaporation was taken up with ethyl acetate and washed 2 times with saturated aqueous NH_4Cl, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure to give the desired product which was used in the next step without any further purification.

(*E*)-*m*-[*p*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyloxy)phenyl]-2-nitrostyrene 35



General procedure 2 was followed with mannoside **13** (2.12 g), ammonium acetate (340 mg) in nitromethane (57 mL) for 24h at 50°C. The desired product **16** was obtained as a yellow foam after purification (1.66 g, 72%).

***R**f* = 0.80 (PE/EA: 6/4).

$[\alpha]_D^{20}$= +78.0 (*c* = 0.7 in MeOH).

^{1}H NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.04 (d, $^3J_{trans}$ = 13.7 Hz, 1H, CH=CH), 7.69 - 7.60 (m, 3H, H $_{Ar}$, CH=CH), 7.54 - 7.48 (m, 4H, H $_{Ar}$), 7.18 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H $_{Ar}$), 5.60 - 5.55 (m, 2H, H_1, H_3), 5.47 (bs, 1H, H_2), 5.39 (t,

$^3J_{4\text{-}3} = {}^3J_{4\text{-}5}$ = 10.2 Hz, 1H, H_4), 4.29 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.4 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$ = 5.3 Hz, 1H, H_{6a}), 4.14 - 4.06 (m, 2H, H_{6b}, H_5), 2.20 (s, 3H, CH_3), 2.05, 2.04, 2.03 (3 x s, 9H, $CH_{3\ Ar}$).

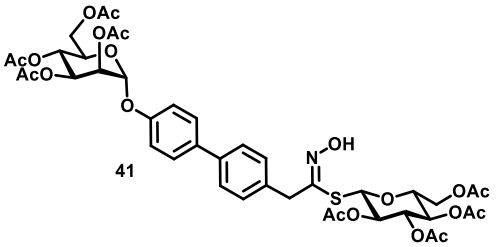
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 170.6, 170.1, 170.0, 169.8 (C=O), 155.7 (Cq $_{Ar}$), 141.8 (Cq $_{Ar}$), 139.0 (CH=CH), 137.5 (CH=CH), 134.6 (Cq $_{Ar}$), 130.7 (Cq $_{Ar}$), 130.6 (CH $_{Ar}$), 129.9 (CH $_{Ar}$), 128.4 (CH $_{Ar}$), 127.6 (CH $_{Ar}$), 127.59 (CH $_{Ar}$), 117.1 (CH $_{Ar}$), 95.9 (C-1), 69.4 (C-2 or C-5), 69.38 (C-5 or C-2), 68.9 (C-3), 66.0 (C-4), 62.2 (C-6), 20.9, 20.8 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1742 (C=O), 1697 (C=O), 1606, 1516, 1479 (C=C $_{Ar}$), 1213 (C-O), 836, 795 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{28}H_{29}NNaO_{12}$ ([M+Na]$^+$):594.1583, found 594.1582.

Thiohydroximate formation, General Procedure 3: titanium tetrachloride (2.2 equiv.) was added dropwise to a stirred solution of triethylsilane (2.1 equiv.) and biphenylnitrovinyl derivative **14-16** (1 equiv.) in anhydrous dichloromethane (0.06 M) under argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was quenched by addition of water, then the aqueous phase was extracted 2 times with dichloromethane. The combined organic phases were dried over $MgSO_4$ and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with anhydrous dichloromethane (0.06 M) and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (1.2 equiv.) and triethylamine (3 equiv.) were sequentially added and the reaction mixture was stirred for 3h at rt. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA: 100/0 to 50/50) to give the desired product.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-[4'-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyl oxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothiohydroximate 41**



General procedure 2 was followed from mannoside **32** (1.75 g), ammonium acetate (280 mg) in nitromethane (47 mL) for 2h at reflux. The desired product **33** was obtained after work up as a yellowish foam (1.86 g, 99%).

General procedure 3 was then followed from biphenyl nitrovinyl derivative **33** (300 mg), titanium tetrachloride (130 μL.) and triethylsilane (180 μL) in anhydrous dichloromethane (9 mL). For the second step, were used 9 mL of anhydrous dichloromethane, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (232 mg) and triethylamine (220 μL). The desired product **41** was obtained after purification as a yellowish foam (260 mg, 53%).

R_f = 0.60 (PE/EA: 4/6).

$[\alpha]_D^{20}$= +36.5 (*c* = 0.94 in MeOH).

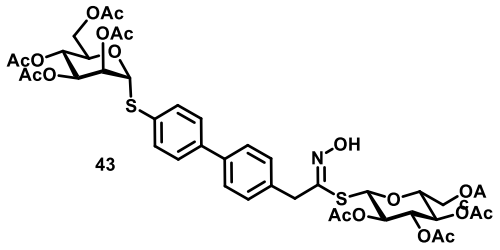
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.67 (s, 1H, NOH), 7.58 - 7.50 (m, 4H, H_{Ar}), 7.33 (d, ^3J = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.17 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.64 - 5.55 (m, 2H, H_{3M}, H_{1M}), 5.49 - 5.46 (m, 1H, H_{2M}), 5.40 (t, $^3J_{4-5}$ = $^3J_{4-3}$ = 10.0 Hz, 1H, H_{4M}), 5.13 - 4.95 (m, 3H, H_{2G}, H_{3G}, H_{4G}), 4.88 (d, ^3J(1-2) = 10.0 Hz, 1H, H_{1G}), 4.30 (dd, $^3J_{6a-6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 4.6 Hz, 1H, H_{6aM}), 4.17 - 3.97 (m, 6H, H_{6bM}, H_{5M}, H_{6aG}, H_{6bG}, $CH_2C{=}N$), 3.61 - 3.52 (m, 1H, H_{5G}), 2.22, 2.08, 2.07, 2.05, 2.01, 1.97 (s x 6 , 24H, $CH_{3\ Ac}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.7, 170.6, 170.3, 170.2, 170.1, 169.9, 169.4, 169.2 (C=O), 155.3 (Cq $_{Ar}$ or C=N), 151.1 (C=N or Cq $_{Ar}$), 139.6 (Cq $_{Ar}$), 135.5 (Cq $_{Ar}$), 134.7 (Cq $_{Ar}$), 128.6 (CH $_{Ar}$), 128.3 (CH $_{Ar}$), 127.4 (CH $_{Ar}$), 117.0 (CH $_{Ar}$), 96.0 (C-1_M), 79.6 (C-1_G), 75.8 (C-5_G), 73.8, 70.1 (C-2_G or C-3_G or C-4_G), 69.5 (C-2_M), 69.3 (C-5_M), 69.0 (C-3_M), 68.1 (C-2_G or C-3_G or C-4_G), 66.1 (C-4_M), 62.2, 62.3 (C-6_M, C-6_G), 38.5 ($CH_2C{=}N$), 20.9, 20.8, 20.79, 20.78, 20.66, 20.62 (6 x CH_3).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1742 (C=O), 1632 (C=C), 1602, 1496 (C=C $_{Ar}$), 1220, 1186, 1127 (C-O), 847, 818 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{42}H_{50}NO_{20}S$ ([M+H]$^+$) : 920.2641, found 920.2636.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-[4'-(1-thio-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothiohydroximate 43**



General procedure 2 was followed from mannoside **38** (2.6 g), ammonium acetate (420 mg) in nitromethane (70 mL) for 2h at reflux. The desired product **39** was obtained after work up as a yellowish foam (2.9 g, 100%).

General procedure 3 was then followed from biphenyl nitrovinyl derivative **43** (2.3 g), titanium tetrachloride (946 µL.) and triethylsilane (1.31 mL) in anhydrous dichloromethane (65 mL). For the second step, were used 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (818 mg, 0.9 equiv.) and triethylamine (1.64 mL) and 65 mL of anhydrous dichloromethane. The desired product **43** was obtained after purification (PE/EA: 100/0 to 20/80) as a mixture of α/β anomers (75/25) as a yellow foam (1 g, 48%).

R_f =0.25 (PE/EA: 5/5).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.25 - 8.20 (m, 1H, NOH), 7.60 - 7.52 (m, 7.2H CH $_{Ar\ \alpha+\beta}$), 7.34 (d, ^3J = 7.8 Hz, 2.4 H, CH $_{Ar\ \alpha+\beta}$), 5.68 (d, ^3J (2-3) = 3.2 Hz, 0.2H, $H_{2\beta}$), 5.55 - 5.50 (m, 2H, $H_{1M\ \alpha}$, $H_{2M\ \alpha}$), 5.39 - 5.26 (m, 2.3H, $H_{3M\ \alpha}$, $H_{4M\ \alpha}$, $H_{4\beta}$), 5.12 - 4.95 (m, 3.7H,H_{2G}, H_{3G}, H_{4G}, $H_{3\beta}$, $H_{1\beta}$), 4.87 (d, ^3J (1-2) = 10.0 Hz, 1H, H_{1G}), 4.59

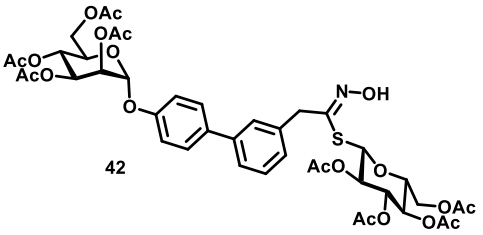
- 4.53 (m, 1H, $H_{5M\ \alpha}$), 4.32 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$= 5.5 Hz, 1.2H, $H_{6aM\alpha}$, $H_{6aM\beta}$), 4.21 - 4.01 (m, 3.3H, $H_{6bM\ \alpha}$, H_{6aG}), 3.98 (bs, 2H, $CH_2C{=}N$), 3.76 - 3.70 (m, 0.2H, $H_{5M\ \beta}$), 3.60 - 3.53 (m, 1H, H_{5G}), 2.22 (s, 0.6H, $CH_{3\ M\ \beta}$), 2.16 (s, 3H, CH_3), 2.10 (s, 0.6H, $CH_{3\ M\ \beta}$), 2.08, 2.07, 2.05 (s x 3, 9H, CH_3), 2.04 (s, 0.6H, $CH_{3\ M\ \beta}$), 2.02, 2.00 (s x 2, 6H, CH_3), 1.99 (s, 0.6H, $CH_{3\ M\ \beta}$), 1.97, 1.96 (2 x s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.7 (C=O$_\beta$), 170.6, 170.5, 170.2 (C=O$_\beta$), 170.2, 170.1 (C=O$_\beta$), 170.0, 169.9, 169.8, 169.6 (C=O$_\beta$), 169.2, 169.1 (C=O), 151.0 (C=N), 140.4 (Cq $_{Ar\ \beta}$), 140.3 (Cq $_{Ar}$), 139.3 (Cq $_{Ar}$), 135.4 (Cq $_{Ar}$), 132.5 (CH $_{Ar}$ β), 132.4 (CH $_{Ar}$), 131.9 (Cq $_{Ar}$), 128.8, 127.8, 127.6 (CH $_{Ar}$ β), 127.5 (CH $_{Ar}$), 85.8 (C-1$_M$), 85.7 (C-1$_\beta$), 79.6 (C-1$_G$), 76.5 (C-5$_\beta$), 75.8 (C-5$_G$), 73.8 (C-2$_G$ or C-3$_G$ or C-4$_G$), 71.9 (C-3$_\beta$), 71.0 (C-1 or C-2$_M$), 70.7 (C-2 $_\beta$), 70.1 (C-2$_G$ or C-3$_G$ or C-4$_G$), 69.7 (C-5$_M$), 69.5 (C-3$_M$ or C-4$_M$), 68.1 (C-2$_G$ or C-3$_G$ or C-4$_G$), 65.8 (C-4 $_\beta$), 66.4 (C-3$_M$ or C-4$_M$), 62.8 (C-6 $_\beta$), 62.5 (C-6$_G$ or C-6$_M$), 62.3 (C-6$_M$ or C-6$_G$), 38.5 ($CH_2C{=}N$), 21.0, 20.8, 20.7, 20.65, 20.62 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1743 (C=O), 1662 (C=O), 1484 (C=C $_{Ar}$), 1217 (C-O), 912 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{42}H_{50}NO_{19}S_2$ ([M+H]$^+$): 936.2413, found 936.2414.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-[4'-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyl oxy)]-1,1'-biphenyl-3-acetothiohydroximate 42**



General procedure 3 was followed from biphenyl nitrovinyl derivative **35** (1.3 g), titanium tetrachloride (554 µL.) and triethylsilane (764 µL) in anhydrous dichloromethane (38 mL). For the second step, were used 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (746 mg, 0.9 equiv.) and triethylamine (670 µL) and 38 mL of anhydrous dichloromethane. The desired product **42** was obtained after purification (PE/EA: 100/0 to 30/70) as a white foam (1.48 g, 70%).

R_f=0.2 (PE/EA: 5/5).

$[\alpha]_D^{20}$= +36.9 (*c* = 0.13 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.84 (bs, 1H, NOH), 7.49 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H $_{Ar}$), 7.46 - 7.35 (m, 3H, H $_{Ar}$), 7.19 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H, H $_{Ar}$), 7.13 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H $_{Ar}$), 5.59 - 5.53 (m, 2H, H_{3M}, H_{1M}), 5.45 (bs, 1H, H_{2M}), 5.37 (t, $^3J_{4\text{-}5}$ = $^3J_{4\text{-}3}$ = 10.0 Hz, 1H, H_{4M}), 5.07 - 4.91 (m, 3H, H_{2G}, H_{3G}, H_{4G}), 4.84 (d, ^3J(1-2) = 9.9 Hz, 1H, H_{1G}), 4.27 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.3 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$ = 5.1 Hz, 1H, H_{6aM}), 4.14 - 3.91 (m, 6H, $CH_2C{=}N$, H_{6bM}, H_{5M}, H_{6G}), 3.51 - 3.45 (m, 1H, H_{5G}), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.04, 2.03, 2.02, 2.01 (s x 4, 12H, CH_3), 1.97 (s, 3H, CH_3), 1.94 (s, 3H, CH_3), 1.90 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 170.7, 170.6, 170.3, 170.1, 170.09, 169.9, 169.4, 169.2 (C=O), 155.3 (Cq $_{Ar}$), 150.9 (C=N), 141.2 (Cq $_{Ar}$), 136.5 (Cq $_{Ar}$), 135.7 (Cq $_{Ar}$), 129.4 (CH $_{Ar}$), 128.4 (CH $_{Ar}$), 126.9 (CH $_{Ar}$),

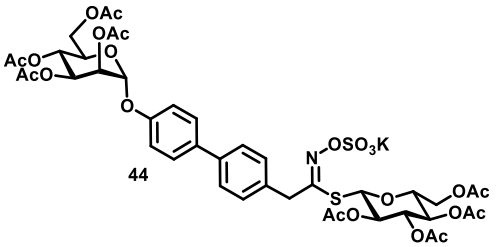
126.5 (CH $_{Ar}$), 126.0 (CH $_{Ar}$), 116.9 (CH $_{Ar}$), 95.9 (C-1_M), 79.6 (C-1_G), 75.7 (C-5_G), 73.8, 70.1, 69.5, 69.3, 69.0 (C-3_M), 68.1, 66.0 (C-4_M), 62.2 (C-6_G or C-6_M), 62.17 (C-6_M or C-6_G), 38.9 (CH_2C=N), 20.9, 20.8, 20.59, 20.57 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1742 (C=O), 1607, 1479 (C=C $_{Ar}$), 1213, 1031 (C-O), 795 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{42}H_{50}NO_{20}S$ ([M+H]$^+$): 920.2641, found 920.2636.

Sulfation General Procedure 4: sulfur trioxide-pyridine complex (5 equiv.) was added to a solution of thiohydroximate (1 equiv.) in anhydrous DMF (0.4 M). The suspension was heated at 50°C overnight. It was then cooled at 0°C, quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (10 equiv.) and then stirred for 30 minutes at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (EA/MeOH 9/1).

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-[4'-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyl oxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothiohydroximate *N*,*O*-sulfate potassium salt 44**



General procedure 4 was followed from thiohydroximate **41** (440 mg) and sulfur trioxide-pyridine complex (380 mg) in anhydrous DMF (6 mL). The desired compound **44** was obtained as a yellowish oil (400 mg, 80%).

R$_f$ = 0.37 (EA/MeOH: 9/1).

$[\alpha]_D^{20}$= +34.6 (*c* = 1.53 in MeOH).

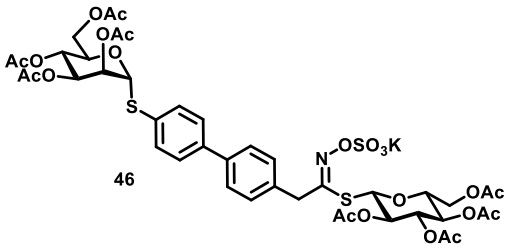
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 7.65 - 7.58 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.47 (d, ^3J = 7.9 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.22 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.67 (s, 1H, H_{1M}), 5.53 - 5.46 (m, 2H, H_{3M}, H_{2M}), 5.33 (t, $^3J_{4\text{-}3}$ = $^3J_{4\text{-}5}$ = 9.8 Hz, 1H, H_{4M}), 5.20 - 5.09 (m, 2H, H_{1G}, H_{2G}), 4.99 (t, $^3J_{4\text{-}3}$ = $^3J_{4\text{-}5}$ = 9.7 Hz, 1H, H_{4G}), 4.88 (t, ^3J (3-2) = ^3J (3-4) = 9.6 Hz, 1H, H_{3G}), 4.24 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 11.9 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$= 5.3 Hz, 1H, H_{6aM}), 4.17 - 4.05 (m, 5H, H_{5M}, H_{6aG}, H_{6bM}, CH_2C=N), 3.91 (d, ^2J (6b-6a) = 10.8 Hz, 1H, H_{6bG}), 3.77 - 3.71 (m, 1H, H_{5G}), 2.19, 2.06, 2.03, 2.01, 1.98, 1.96, 1.93, 1.91 (8 x s, 3H, $CH_{3\ Ac}$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 172.22, 172.2, 171.6, 171.5, 171.48, 171.4, 171.1, 170.8 (C=O $_{Ac}$), 157.8 (C=N or Cq $_{Ar}$), 156.5 (Cq $_{Ar}$ or C=N), 140.7 (Cq $_{Ar}$), 136.8 (Cq $_{Ar}$), 135.9 (Cq $_{Ar}$), 130.0 (CH $_{Ar}$), 129.2 (CH $_{Ar}$), 128.2 (CH $_{Ar}$), 118.2 (CH $_{Ar}$), 97.1 (C-1_M), 80.8 (C-1_G), 76.7 (C-5_G), 75.0 (C-3_G), 71.3 (C-2_G), 70.63, 70.59, 70.5 (C-5_M, C-3_M, C-2_M), 69.3 (C-4_G), 67.1 (C-4_M), 63.4 (C-6_M or C-6_G), 63.1 (C-6_G or C-6_M), 39.2 (CH_2 CN), 20.64, 20.62, 20.60, 20.53, 20.49 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1742 (C=O), 1666 (C=C), 1603, 1497 (C=C $_{Ar}$), 1230, 1127 (C-O), 847, 818 (C_{sp2}-H Ar).

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{42}H_{48}NO_{23}S_2$ ([M-K]$^-$) : 998.2064, found 998.2069.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-[4'-(1-thio-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothiohydroximate *N*,*O*-sulfate potassium salt 46**



General procedure 4 was followed from thiohydroximate **43** (950 mg) and sulfur trioxide-pyridine complex (811 mg) in anhydrous DMF (15 mL). After 24h at 50°C, sulfur trioxide-pyridine complex (811 mg, 5.1 mmol, 5 equiv.) was added again, and the reaction mixture was heated for an additional 24h. The desired compound **46** was finally obtained as a yellow foam (290 mg, 26%).

R_f = 0.35 (EA/MeOH: 9/1).

$[\alpha]_D^{20}$= +122.1 (*c* = 0.13 in MeOH).

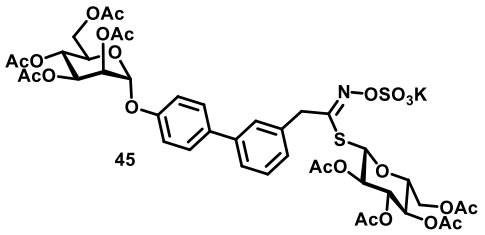
^{1}H NMR (250 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.70 - 7.57 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.49 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.70 - 5.57 (m, 1H, H_{1M}), 5.54 - 5.48 (m, 1H, H_{2M}), 5.32 - 5.27 (m, 1H, H_{3M}), 5.20 - 5.09 (m, 2H, H_{1G}, H_{2G}), 5.05 - 4.83 (m, 3H, H_{3G}, H_{4G}, H_{5M}), 4.62 - 4.49 (m, 1H, H_{4M}), 4.37 - 4.20 (m, 1H, H_{6aM}), 4.18 - 4.04 (m, 4H, $H_{6'M}$, H_{6aG}, CH_2CN), 3.91 (dd, $^2J_{6a-6b}$ = 12.3 Hz, ^3J (6-5) = 2.4 Hz, 1H, H_{6aG}), 3.83 - 3.66 (m, 1H, H_{5G}), 2.15, 2.08, 2.02, 2.00, 1.99, 1.98, 1.93, 1.91 (8 x s, 24H, $CH_{3\ Ac}$).

^{13}C NMR (62.5 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 172.3, 172.2, 171.5, 171.47, 171.1, 170.8 (C=O), 157.6 (C=N), 141.8 (Cq $_{Ar}$), 140.3 (Cq $_{Ar}$), 136.7 (Cq $_{Ar}$), 133.9 (CH $_{Ar}$), 132.7 (Cq $_{Ar}$), 130.1 (CH $_{Ar}$), 128.8 (CH $_{Ar}$), 128.4 (CH $_{Ar}$), 86.6 (C-1_M), 80.9 (C-1_G), 76.7, 75.0, 71.9, 71.3, 71.0, 71.8, 69.3, 67.5, 63.6, 63.1, 39.2 (CH_2CN), 20.67, 20.61, 20.5, 20.45 (CH_3).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1742 (C=O), 1666, 1603 (C=O), 1497, 1434, 1367 (C=C $_{Ar}$), 1230 (C-O), 1035, 1001, 979 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{42}H_{48}NO_{22}S_3$ ([M-K]$^-$): 1014.1836, found 1014.1858.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-[4'-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyl oxy)]-1,1'-biphenyl-3-acetothiohydroximate *N*,*O*-sulfate potassium salt 45**



General procedure 4 was followed from thiohydroximate **42** (1.3 g) and sulfur trioxide-pyridine complex (1.12 g) in anhydrous DMF (22 mL). After 16h at 50°C, sulfur trioxide-pyridine complex (560 mg) was added again, and the reaction mixture was heated for an additional 8h. The desired compound **45** was obtained as a white foam (1.26 g, 86%).

R_f = 0.38 (EA/MeOH: 9/1).

$[\alpha]_D^{20}$=+ 32.7 (*c* = 0.18 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.68 - 7.62 (m3H, CH $_{Ar}$), 7.53 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H, H $_{Ar}$), 7.44 (t, ^3J = 7.6 Hz, 1H, H $_{Ar}$), 7.36 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H, H $_{Ar}$), 7.23 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H $_{Ar}$), 5.67 (s, 1H, H_{1M}), 5.53 - 5.46 (m, 2H, H_{3M}, H_{2M}), 5.32 (t, $^3J_{4\text{-}3}$ = $^3J_{4\text{-}5}$ = 9.8 Hz, 1H, H_{4M}), 5.15 - 5.08 (m, 2H, H_{1G}, H_{2G}), 4.97 (t, $^3J_{4\text{-}3}$ = $^3J_{4\text{-}5}$ = 9.7 Hz, 1H, H_{4G}), 4.87 (t, ^3J (3-2) = ^3J (3-4) = 9.6 Hz, 1H, H_{3G}), 4.24 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 11.9 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$= 5.3 Hz, 1H, H_{6aM}), 4.20 - 4.05 (m, 5H, H_{5M}, H_{6aG}, H_{6bM}, CH_2C=N), 3.83 (bd, ^2J (6b-6a) = 11.9 Hz, 1H, H_{6bG}), 3.71 - 3.64 (m, 1H, H_{5G}), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.06 (s, 3H, CH_3), 2.01 (s, 6H, CH_3), 1.97 (s, 6H, CH_3), 1.93 (s, 3H, CH_3), 1.86 (s, 3H, CH_3).

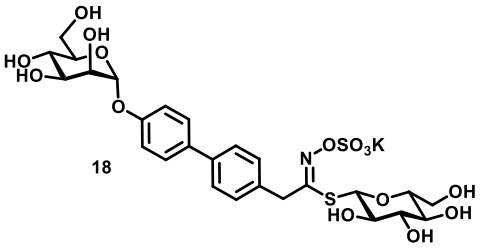
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 172.3, 172.1, 171.6, 171.55, 171.52, 171.4, 171.1, 170.8 (C=O), 158.1 (C=N or Cq $_{Ar}$), 156.5 (Cq $_{Ar}$ or C=N), 142.2 (Cq $_{Ar}$), 137.7 (Cq $_{Ar}$), 136.8 (Cq $_{Ar}$), 130.5 (CH $_{Ar}$), 129.4 (CH $_{Ar}$), 128.1 (CH $_{Ar}$), 127.5 (CH $_{Ar}$), 126.7 (CH $_{Ar}$), 118.3 (CH $_{Ar}$), 97.1 (C-1_M), 80.9 (C-1_G), 76.6 (C-5_G), 74.9 (C-2_G), 71.2 (C-3_G), 70.64, 70.61, 70.4 (C-5_M, C-3_M, C-2_M), 69.2 (C-4_G), 67.1 (C-4_M), 63.3 (C-6_M or C-6_G), 63.1 (C-6_G or C-6_M), 39.2 (CH_2), 20.7, 20.63, 20.6, 20.58, 20.49, 20.44, 20.42 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 1742 (C=O), 1697 (C=C), 1606, 1515 (C=C $_{Ar}$), 1213, 1031 (C-O), 836 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m*/*z* calculated for $C_{42}H_{50}NO_{23}S_2$ ([M-K+2H]$^+$): 1000.2206, found 1000.2207.

General procedure 5 : potassium methoxide (0.4 equiv.) was added to a solution of acetylated compound (1 equiv.) in anhydrous methanol (0.15 M). The reaction mixture was stirred at room temperature during 6h. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the crude product was purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100).

***(Z)-S*-(β-D-Glucopyranosyl)-[4'-(α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothiohydroximate *N,O*-sulfate potassium salt 18**



General procedure 5 was followed with acetylated compound **44** (400 mg, 0.38 mmol, 1 equiv.) to give product **18** as a white resin (207 mg, 78 %).

$[\alpha]_D^{20}$= +55.7 (*c* = 0.98 in MeOH).

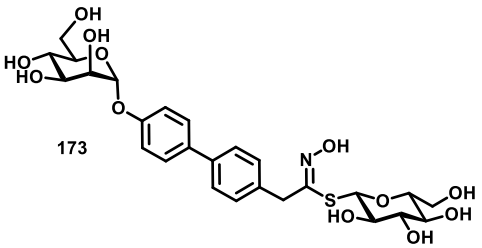
^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) : δ (ppm) = 7.43 (d, ^3J = 8.3 Hz, 4H, CH_{Ar}), 7.36 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.10 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.59 (s, 1H, H_{1M}), 4.77-4.70 (m, 1H, H_{1G}), 4.18 (bs, 1H, H_{2M}), (4.13 -4.04 (m, 3H, H_{6M}, H_{3M}), 3.82 (t, $^3J_{4-3}$ = $^3J_{4-5}$ = 9.8 Hz, 1H, H_{4M}), 3.78 - 3.65 (m, 3H, $CH_2C{=}N$, H_{5M}), 3.65-3.54 (m, 2H, H_{6G}), 3.48-3.41 (m, 1H, H_{4G}), 3.41 - 3.32 (m, 2H, H_{2G}, H_{3G}), 3.24 - 3.18 (m, 1H, H_{5G}).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O, internal acetone): δ (ppm) = 163.0 (Cq $_{Ar}$), 155.7 (C=N), 139.4 (Cq $_{Ar}$), 135.0 (Cq $_{Ar}$), 134.5 (Cq $_{Ar}$), 129.2 (CH $_{Ar}$), 128.6 (CH $_{Ar}$), 127.7 (CH $_{Ar}$), 117.9 (CH $_{Ar}$), 98.7 (C-1_M), 82.1 (C-1_G), 80.4 (C-5_G), 77.6 (C-2_G or C-3_G), 73.9 (C-5_M), 72.5 (C-3_G or C-2_G), 71.1 (C-3_M), 70.6 (C-2_M), 69.3 (C-4_G), 67.1 (C-4_M), 61.2 ($CH_2C{=}N$), 60.9 (C-6_G), 38.6 (C-6_M).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3384 (O-H), 1607, 1497 (C=C), 1231, 1056 (C-OH).

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{26}H_{32}NO_{15}S_2$ ([M-K]$^-$): 662.1219, found 662.1224.

***(Z)-S*-(β-D-Glucopyranosyl)-[4'-(α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothiohydroximate 173**



General procedure 5 was followed from acetylated compound **18** (135 mg, 0.147 mmol, 1 equiv.) to give product **173** as a white resin (74 mg, 84 %).

$[\alpha]_D^{20}$= +34.8 (*c* = 0.9 in MeOH).

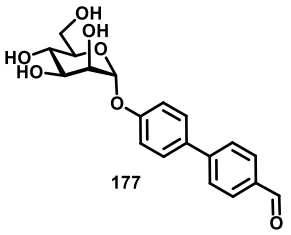
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 7.57 - 7.52 (m, 4H, H_{Ar}), 7.39 (d, ^3J = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.18 (d, ^3J = 7.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.53 (bs, 1H, H_{1M}), 4.60 - 4.54 (m, 1H, H_{1G}), 4.16 (d, ^2J = 16.2 Hz, 1H, $CH_2C{=}N$), 4.03 (bs, 1H, H_{2M}), 4.01 - 3.91 (m, 2H, H_{3M}, $CH_2C{=}N$), 3.87 - 3.71 (m, 4H, H_{6aM}, H_{6bM}, H_{4M}, H_{6aG}), 3.67 - 3.59 (m, 2H, H_{6bG}, H_{4G}), 3.28 - 3.13 (m, 4H, H_{3G}, H_{5G}, H_{5M}, H_{2G}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 157.4 (Cq $_{Ar}$), 153.4 (C=N), 140.5 (Cq $_{Ar}$), 137.1 (Cq $_{Ar}$), 136.2 (Cq $_{Ar}$), 129.7 (CH $_{Ar}$), 128.9 (CH $_{Ar}$), 127.9 (CH $_{Ar}$), 118.1 (CH $_{Ar}$), 100.2 (C-1_M), 82.7 (C-1_G), 82.1 (C-5_G or C-3_G), 79.5 (C-2_G or C-5_M), 75.4 (C-4_G), 74.4 (C-5_M or C-2_G), 72.4 (C-3_M), 72.0 (C-3_G or C-5_G), 71.2 (C-2_M), 68.3 (C-4_M), 62.7 (C-6_G or C-6_M), 62.6 (C-6_M or C-6_G), 39.1 (CH_2C=N).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3310 (O-H), 1606, 1497 (C=C), 1231 (C-O).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{26}H_{34}NO_{12}S$ ([M+H]$^+$): 584.1796, found 584.1798.

4'-(α-D-Mannopyranosyloxy)-1,1'-biphenyl-4-carboxaldehyde 177



177

General procedure 5 was followed from acetylated compound **32** (200 mg, 0.38 mmol, 1 equiv.) to give product **27** as an uncoloured resin (68 mg, 50%).

$[\alpha]_D^{20}$= +160.9 (*c* = 0.4 in MeOH).

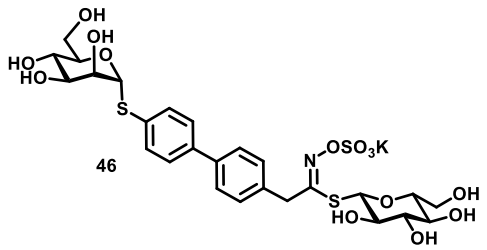
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 10.00 (s, 1H, HCO), 7.96 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.80 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.66 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.24 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.56 (d, ^3J (1-2) = 1.8 Hz, 1H, H_1), 4.06 - 4.02 (m, 1H, H_2), 3.93 (dd, ^3J (3-4) = 9.4 Hz, ^3J (3-2) = 3.4 Hz, 1H, H_3), 3.81 - 3.70 (m, 3H, H_4, H_{6a}, H_{6b}), 3.65 - 3.57 (m, 1H, H_5).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 193.8 (HC=O), 158.4 (Cq $_{Ar}$), 148.0 (Cq $_{Ar}$), 136.4 (Cq $_{Ar}$), 134.9 (Cq $_{Ar}$), 131.3 (CH $_{Ar}$), 129.5 (CH $_{Ar}$), 128.2 (CH $_{Ar}$), 118.3 (CH $_{Ar}$), 100.1 (C-1), 75.5 (C-5), 72.4 (C-3), 71.9 (C-2), 68.3 (C-4), 62.7 (C-6).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3341 (O-H), 1691 (C=O), 1599 (C=C), 1113 (C-O).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{19}H_{21}O_7$ ([M+H]$^+$): 361.1282, found 361.1281.

***(Z)-S*-(β-D-Glucopyranosyl)-[4'-(1-thio-α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothio hydroximate *N,O*-sulfate potassium salt 19**



General procedure 5 was followed from acetylated compound **46** (280 mg, 0.27 mmol, 1 equiv.) to give product **5** as a white resin (76 mg, 40%).

$[\alpha]_D^{20}$= +126.6 (*c* = 1.23 in MeOH).

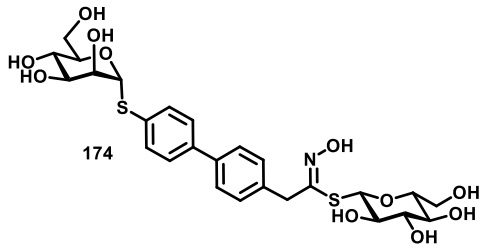
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 7.66 - 7.55 (m, 6H, CH $_{Ar}$), 7.50 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, CH $_{Ar}$), 5.48 (d, ^3J(1-2) = 1.5 Hz, 1H, H_{1M}), 4.56 (dm, ^3J (1-2) = 9.5 Hz, 1H, H_{1G}), 4.30 (d, ^3J (3-4) = 16.1 Hz, 1H, CH_2C=N), 4.13 - 4.03 (m, 3H, H_{2M} , $H_{4M,}$ CH_2C=N), 3.89 - 3.68 (m, 5H, H_{3M}, H_{5M}, H_{6aG}, H_{6aM}, H_{6bM}), 3.66 - 3.58 (m, 1H, H_{6bG}), 3.27 - 3.21 (m, 2H, H_{3G}, H_{5G}), 3.19 - 3.13 (m, 2H, H_{2G},H_{4G}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 159.1 (C=N), 139.8, 139.0, 135.5, 133.5 (Cq $_{Ar}$), 131.9, 128.6, 127.0, 126.9 (CH $_{Ar}$), 89.0 (C-1_M), 81.5 (C-1_G), 80.8 (C-5_G or C-3_G), 78.0 (C-2_G or C-4_G), 74.3 (C-4_M), 72.8 (C-4_G or C-2_G), 72.3 (C-2_M), 71.8 (C-5_M or C-3_M), 69.8 (C-3_G or C-5_G), 67.3 (C-3_M or C-5_M), 61.4 (C-6_G or C-6_M), 61.2 (C-6_M or C-6_G), 37.9 (CH_2C=N)

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3380 (O-H), 1484 (C=C $_{Ar}$), 1276 (C-O), 1057 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI^-): *m/z* calculated for $C_{26}H_{32}NO_{14}S_3$ ($[M-K]^-$): 678.0990, found 678.0996.

***(Z)-S*-(β-D-Glucopyranosyl)-[4'-(1-thio-α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-4-acetothiohydroximate 174**



General procedure 5 was followed from acetylated compound **43** (300 mg, 0.32 mmol, 1 equiv.) to give product **174** as a white resin (90 mg, 50%).

$[\alpha]_D^{20}$= +77.5 (*c* = 0.54 in MeOH).

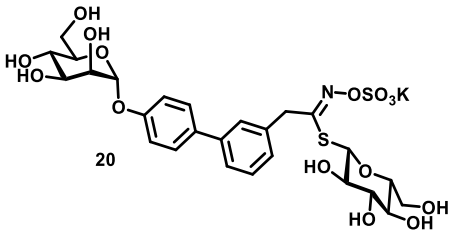
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 7.66 - 7.55 (m, 6H, CH_{Ar}), 7.50 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.48 (d, ^3J (1-2) = 1.5 Hz, 1H, H_{1M}), 4.59 - 4.53 (m, 1H, H_{1G}), 4.30 (d, ^2J = 16.1 Hz, 1H, CH_2CN), 4.13 - 4.03 (m, 2H, H_{2M}, $H_{4M,}$), 3.90 (d, ^2J = 16.2Hz, 1H, CH_2CN), 3.89 - 3.68 (m, 5H, H_{3M}, H_{5M}, H_{6aG}, H $_{6M}$), 3.60 (dd, ^3J $_{6a-6b}$ = 12.2 Hz, ^3J (6b-5) = 5.8 Hz, 1H, H_{6bG}), 3.27 - 3.13 (m, 4H, H_{3G}, H_{2G}, H_{4G}, H_{5G}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 159.1(C=N), 139.8, 139.0, 135.5, 133.5 (Cq $_{Ar}$), 131.9, 128.6, 127.0, 126.9 (CH $_{Ar}$), 89.0 (C-1_M), 81.5 (C-1_G), 80.8, 78.0, 74.3(C-3_M), 72.8, 72.3 (C-2_M), 71.8, 69.8, 67.3, 61.4 (C-6), 61.2 (C-6), 37.9 (CH_2CN).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3320 (O-H), 1484 (C=C $_{Ar}$), 1274, 1220 (C-OH), 1057, 1003 (C_{sp2}-H $_{Ar}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{26}H_{34}NO_{11}S_2$ ([M+H]$^+$): 600.1568, found 600.1568.

***(Z)-S*-(β-D-Glucopyranosyl)-[4'-(α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-3-acetothiohydroximate *N,O*-sulfate potassium salt 20**



General procedure 5 was followed from acetylated compound **45** (1.16 g, 1.12 mmol, 1 equiv.) to give product **20** as a white resin (655 mg, 84%).

$[\alpha]_D^{20}$= +77.4 (*c* = 0.17 in MeOH).

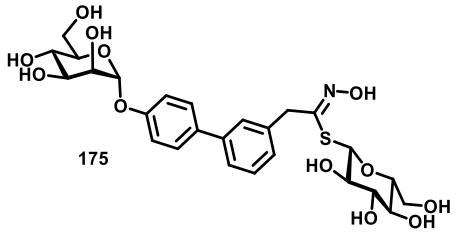
^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) : δ (ppm) = 7.66 - 7.60 (m, 3H, H_{Ar}), 7.57 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.50 (t, ^3J = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.38 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.23 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.66 (bs, 1H, H_{1M}), 4.79 - 4.77 (m, 1H, H_{1G}), 4.21 (s, 3H, CH_2C=N, H_{2M}), 4.10 (dd, ^3J (3-4) = 9.1 Hz, ^3J (3-2) = 3.3 Hz, 1H, H_{3M}), 3.85 - 3.72 (m, 4H, H_{4M}, H_{5M}, H_{6M}), 3.62 - 3.51 (m, 2H, H_{6G}), 3.45 - 3.30 (m, 3H, H_{2G}, H_{3G}, H_{4G}), 3.18 - 3.12 (m, 1H, H_{5G}).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O, internal acetone) : δ (ppm) = 163.2 (C=N), 155.9 (Cq $_{Ar}$), 141.2 (Cq $_{Ar}$), 136.5 (Cq $_{Ar}$), 135.3 (Cq $_{Ar}$), 130.4 (CH $_{Ar}$), 128.9 (CH $_{Ar}$), 127.5 (CH $_{Ar}$), 126.8 (CH $_{Ar}$), 126.3 (CH $_{Ar}$), 118.1 (CH $_{Ar}$), 98.8 (C-1_M), 82.2 (C-1_G), 80.4 (C-5_G), 77.6, 74.0, 72.4 (C-4_M or C-5_M), 71.1, 70.6 (C-3_M), 69.2 (C-2_M), 67.2 (C-5_M or C-4_M), 61.3 (C-6_M), 60.7 (C-6_G), 38.9 (CH_2CN).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3380 (O-H), 1515 (C=C), 1230, 1055 (C-O).

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{26}H_{32}NO_{15}S_2$ ([M-K]$^-$): 662.1219, found 662.1213.

***(Z)-S*-(β-D-Glucopyranosyl)-[4'-(α-D-mannopyranosyloxy)]-1,1'-biphenyl-3-acetothiohydroximate 175**



175

General procedure 5 was followed from acetylated compound **42** (120 mg, 0.128 mmol, 1 equiv.) to give product **26** as a white resin (48 mg, 64%).

$[\alpha]_D^{20}$= +86.7 (*c* = 0.14 in MeOH).

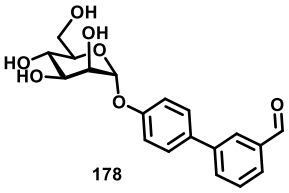
^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) : δ (ppm) = 7.48 - 7.39 (m, 3H, H_{Ar}), 7.34 (bd, ^3J = 4.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27 - 7.20 (m, 1H, H_{Ar}), 7.10 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.58 (s, 1H, H_{1M}), 4.74 (d, ^3J (1-2) = 9.1 Hz, 1H, H_{1G}), 4.16 (bs, 1H, H_{2M}), 4.07 (dd, ^2J (3-4) = 9.6 Hz, ^3J (3-2) = 3.3 Hz, 1H, H_{3M}), 4.00 (s, 2H, CH_2C=N), 3.82 (t, $^3J_{4-5}$ = $^3J_{4-3}$ = 9.7 Hz, 1H, H_{4M}), 3.78 - 3.74 (m, 2H,H_{6M}), 3.73 - 3.67 (m, 1H, H_{5M}), 3.61 - 3.51 (m, 2H, H_{6G}), 3.46 - 3.37 (m, 1H, H_{4G}), 3.38 -3.30 (m, 2H, H_{2G}, H_{3G}), 3.15 - 3.08 (m, 1H, H_{5G}).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O, internal acetone) : δ (ppm) = 155.8 (Cq $_{Ar}$ or C=N), 154.8 (C=N or Cq $_{Ar}$), 141.0 (Cq $_{Ar}$), 137.3 (Cq $_{Ar}$), 135.2 (Cq $_{Ar}$), 130.2 (CH $_{Ar}$), 128.7 (CH $_{Ar}$), 127.5 (CH $_{Ar}$), 126.7 (CH $_{Ar}$), 126.0 (CH $_{Ar}$), 117.9 (CH $_{Ar}$), 98.8 (C-1_M), 82.0 (C-1_G), 80.4 (C-5_G), 77.7 (C-2_G or C-3_G), 74.0 (C-5_M), 72.7 (C-3_G or C-2_G), 71.2 (C-3_M), 70.6 (C-2_M), 69.3 (C-4_G), 67.1 (C-4_M), 61.2 (C-6_G or C-6_M), 60.8 (C-6_M or C-6_G), 38.7 (CH_2C=N).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3323 (O-H), 1605, 1514 (C=C), 1228 (C-OH).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{26}H_{34}NO_{12}S$ ([M+H]$^+$): 584.1796, found 584.1804.

4'-(α-D-Mannopyranosyloxy)-1,1'-biphenyl-3-carboxaldehyde 178



178

General procedure 5 was followed from acetylated compound **34** (130 mg, 0.245 mmol, 1 equiv.) to give product **178** as a white resin (70 mg, 79%).

$[\alpha]_D^{20}$= + 160.9 (*c* = 0.35 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 10.04 (s, 1H, HC=O), 8.10 (s, 1H, CH $_{Ar}$), 7.91 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H, CH $_{Ar}$), 7.86 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H, CH $_{Ar}$), 7.71 - 7.52 (m, 3H, CH $_{Ar}$), 7.26 - 7.19 (m, 2H, CH $_{Ar}$), 5.60 - 5.50 (m, 1H, H_1), 4.04 (bs, 1H, H_2), 3.94 (dd, ^3J (3-4) = 9.5 Hz, ^3J (3-2) = 3.4 Hz, 1H, H_3), 3.82 - 3.69 (m, 3H, H_4, H_6), 3.67 - 3.59 (m, 1H, H_5).

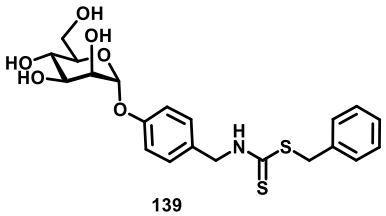
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 194.3 (HC=O), 158.0 (Cq $_{Ar}$), 142.9 (Cq $_{Ar}$), 138.6 (Cq $_{Ar}$), 135.0 (Cq $_{Ar}$), 133.7 (CH $_{Ar}$), 130.7 (CH $_{Ar}$), 129.2 (CH $_{Ar}$), 129.0 (CH $_{Ar}$), 128.7 (CH $_{Ar}$), 118.3 (CH $_{Ar}$), 100.1 (C-1), 75.5 (C-5), 72.4 (C-3), 72.0 (C-2), 68.3 (C-4), 62.7 (C-6).

IR (neat) ν (cm^{-1}) = 3341 (O-H), 1599, 1524 (C=C), 1185 (C-OH).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{19}H_{21}O_7$ ([M+H]$^+$): 361.1282, found 361.1281.

General Procedure 6: 0.67 U of myrosinase from Sinapis alba (white mustard) seed (10U/mL) solution was added to a solution of glucosinolate (0.1 mmol, 1 equiv.) and benzylmercaptan (0.3 mmol, 3 equiv.), in a mixture of water/phosphate buffer pH = 7 (2/1) (0.029M). The mixture was stirred at 37°C for 24h, then purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100).

***S*-Benzyl-*N*-(4-(α-D-mannopyranosyloxy)benzyl)dithiocarbamate 139**



139

General procedure 6 was followed from glucosinolate **17** (30 mg, 0.0480 mmol, 1 equiv.) to give product **139** as a whitish solid (10.2 mg, 47%).

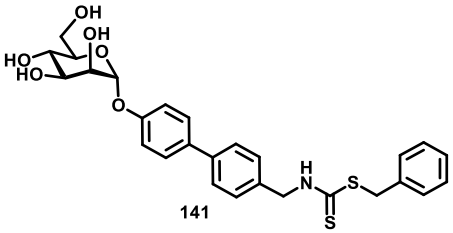
$[\alpha]_D^{20}$= +72.6 (*c* = 0.74 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 7.39 - 7.04 (m, 9H, CH $_{Ar}$), 5.46 (s, 1H, H_1),4.84 (s, 2H, CH_2*N*) 4.54 (s, 2H, CH_2*S*), 3.99 (s, 1H, H_2), 3.89 (dd, ^3J (3-4) = 9.4 Hz, ^3J (3-2) = 3.4 Hz, 1H, H_3), 3.78 - 3.68 (m, 3H, H_{6a}, H_{6b}, H_4), 3.61 - 3.55 (m, 1H, H_5).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 197.6 (C=S), 155.9 (Cq $_{Ar}$), 137.3 (Cq $_{Ar}$), 131.1 (Cq $_{Ar}$), 129.0 (CH $_{Ar}$), 128.7 (CH $_{Ar}$), 128.1 (CH $_{Ar}$), 126.8 (CH $_{Ar}$), 116.4 (CH $_{Ar}$), 98.8 (C-1), 73.9 (C-5), 71.0 (C-3), 70.6 (C-2), 66.9 (C-4), 61.3 (C-6), 49.4 (CH_2*N*), 38.81 (CH_2*S*).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{21}H_{25}NO_6S_2$ ([M+H]$^+$): 452.1196, found 452.1195.

***S*-Benzyl-*N*-(4-(4-(α-D-mannopyranosyloxyphenyl)benzyl)dithiocarbamate 141**



141

General procedure 6 was followed from glucosinolate **18** (16 mg, 0.0228 mmol, 1 equiv.) to give product **141** as a whitish solid (6 mg, 50 %).

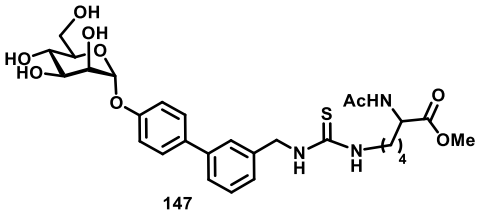
$[\alpha]_D^{20}$= +66.9 (*c* = 0.35 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 7.63 - 7.16 (m, 13H, CH $_{Ar}$), 5.52 (s, 1H, H_1), 4.94 (s, 2H, CH_2*N*), 4.56 (s, 2H, CH_2*S*), 4.03 (s, 1H, H_2), 3.92 (dd, ^3J (3-4) = 9.4 Hz, ^3J (3-2) = 3.4 Hz, 1H, H_3), 3.80 - 3.70 (m, 3H, H_6, H_4), 3.66 - 3.60 (m, 1H, H_5).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 199.2 (C=S), 157.5 (Cq $_{Ar}$), 141.1 (Cq $_{Ar}$), 138.7 (Cq $_{Ar}$), 137.3 (Cq $_{Ar}$), 136.2 (Cq $_{Ar}$), 130.1 (CH $_{Ar}$), 129.5 (CH $_{Ar}$), 129.0 (CH $_{Ar}$), 128.3 (CH $_{Ar}$), 127.7 (CH $_{Ar}$), 118.1 (CH $_{Ar}$), 100.2 (C-1), 75.4 (C-5), 72.4 (C-3), 72.0 (C-2), 68.4 (C-4), 62.7 (C-6), 51.0 (CH_2*N*), 40.3 (CH_2*S*).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{27}H_{29}NO_6S_2$ ([M+H]$^+$): 528.1509, found 528.1508.

***N*- methyl acetyl-L-lysinate-*N*-(4-(4-(α-D-mannopyranosyloxyphenyl)benzyl)carbamate 147**



147

Myrosinase solution 10 U/mL (67 µL) was added to a solution of glucosinolate **20** (30 mg, 0.042 mmol, 1 equiv.) and N- methyl acetyl-L-lysinate hydrochloride (10.2 mg, 0.042 mmol, 1 equiv.) in potassium carbonate buffer pH = 9 - 10 then the reaction mixture was shaken with a thermomixer for 5-24h at 37°C. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude was purified using silica gel column chromatography (PE/EA : 100/0 to 0/100) to afford the pure product.

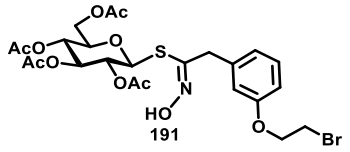
$[\alpha]_D^{20}$= + 7.5 (*c* = 0.4 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.60 - 7.18 (massif, 8H, H_{Ar}), 5.53 (d, ^3J = 1.7 Hz, 1H, H_1), 4.440 - 4.28 (m, 1H, H_2), 4.06 - 3.87 (m, 2H, H_6), 3.82 - 3.35 (massif, 8H, H_2), 1.96 (s, 3H, $CH_{3\ Ac}$), 1.85 - 1.27 (m, 6H, $CH_{2\ aliph}$).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{29}H_{39}CaN_3O_9S$ ([M+Ca]$^+$): 322.6011, found 322.6015.

Glucosinolate *m*-bromide 51

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2- [3-(2-bromoethoxy)phenyl]acetothio hydroximate 191**



1,2-Dibromoethane (20 mL, 0.23 mol, 4 equiv.) was added to a solution of 3-hydroxybenzaldehyde (7 g, 0.057 mol, 1 equiv.) and potassium carbonate (11.9 g, 0.086 mol, 1.5 equiv.) in anhydrous acetonitrile (285 mL). The reaction mixture was heated 18h at, then 4 supplementaries equivalents of 1,2-dibromoethane and 2 equiv. of potassium carbonate were added in 2 portions over a period of 24 h. The reaction mixture was then cooled down to room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with ethyl acetate and washed once with water, then twice with NaOH 1M aqueous solution. The organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure to give a yellow solid (11.2 g)

Ammonium acetate (1.85g, 24.0 mmol, 1.1 equiv.) was added to a solution of the crude 3-(2-bromoethoxy) benzaldehyde (5 g, 21.8 mmol, 1 equiv.) in 70 mL of nitromethane, then the mixture was stirred at 100°C for 4h. Once the solvent evaporated under vacuum, the residue was taken up with EA, and washed with NaOH 1 M solution twice, then with brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$, and the solvent evaporated, to give 5.3 g of crude product, used in the next step without any further purification.

Titanium tetrachloride (560 μL, 5.01 mmol, 2.2 equiv.) was added dropwise to a stirred solution of triethylsilane (760 μL, 4.8 mmol, 2.1 equiv.) and nitrovinyl derivative (620 mg, 2.3 mmol, 1 equiv.) in anhydrous dichloromethane (38 mL) under argon atmosphere, at -10°C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4h. Then quenched by addition of water, and the aqueous phase was extracted 2 times with dichloromethane. The combined organic phases were dried over $MgSO_4$ and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with 38 mL of anhydrous dichloromethane, then 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (415 mg, 1.14 mmol, 0.5 equiv.), anhydrous triethylamine (950 μL, 6.8 mmol, 3 equiv.) were simultaneously added at -10°C under argon atmosphere, the reaction mixture was stirred for 3h at rt. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA: 100/0 to 50/50) to give the desired product as a yellow foam (640 mg, 65% over three steps).

R_f = 0.55 (PE/EA : 70/30).

$[\alpha]_D^{20}$= + 34 (*c* = 0.9 in MeOH).

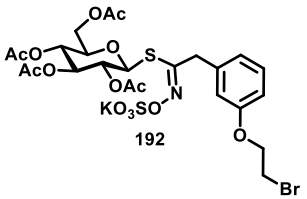
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.61 (s, 1H, OH), 7.35 - 7.20 (m, 1H, H_{Ar}), 6.97 - 6.79 (m, 3H, H_{Ar}), 5.13 - 4.91 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 4.81 (d, ^3J = 9.7 Hz, 1H, H_1), 4.30 (t, ^3J = 6.1 Hz, 2H, CH_2-O), 4.16 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.4 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$ = 5.6 Hz, 1H, H_{6a}), 4.03 (dd, $^2J_{6b\text{-}6a}$ = 12.4 Hz, $^3J_{6b\text{-}5}$ = 2.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.93 (bs, 2H, CH_2-CN), 3.65 (t, ^3J = 6.1 Hz, 2H, CH_2-Br), 3.57 - 3.49 (m, 1H, H_5), 2.09, 2.01, 1.982, 1.978 (s, 12H, $CH_{3\ Ac}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 170.6, 170.2, 169.3, 169.1 (C=O), 158.6 (C=N), 151.1, 137.5 (Cq $_{Ar}$), 130.1, 121.1, 115.0, 113.2 (CH Ar), 79.4 (C-1), 75.7 (C-5), 73.7 (C-H), 70.0 (C-H), 68.0 (C-H), 67.9 (CH_2-O), 62.2 (C-6), 38.7 (CH_2-CN), 29.2 (CH_2-Br), 20.8, 20.6, 20.5 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν = 3127 (C_{sp2}-H), 1732, 1584 (C=C), 1215, 1106, 965 (C-O) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{24}H_{30}BrNNaO_{11}S$ ([M+Na]$^+$): 642.0615 found : 642.0623.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[3-(2-bromoethoxy)phenyl]acetothio hydroximate-*N*,*O*-sulfate potassium salt 192**



The bromide thiohydroximate **191** (2.5 g, 4.0 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous DCM (40 mL), sulfur trioxide-pyridine complex (3.21 g, 20 mmol, 5 equiv.) was added and the suspension was heated at reflux for 24h. The reaction was then cooled down to 0°C and quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (4.03 g, 40.3 mmol, 10 equiv.) and stirred for 45 minutes at room temperature. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was purified using silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 9/1) to give the sulfated compound as a resin (2.54 g, 85%).

R_f = 0.5 (EA/MeOH : 9/1).

$[\alpha]_D^{20}$= + 6.0 (*c* = 0.30 in MeOH).

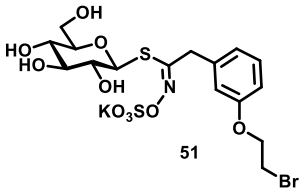
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.30 (t, ^3J = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.05 – 6.85 (m, 3H, H_{Ar}), 5.11 (t, ^3J = 9.2 Hz, 1H, H_3), 5.03 (d, ^3J = 10.2 Hz, 1H, H_1), 4.99 (t, ^3J = 9.7 Hz, 1H, H_4), 4.90 - 4.84 (m, 1H, H_2), 4.34 (t, ^3J = 5.6 Hz, 2H, CH_2-O), 4.18 (dd, $^2J_{6a\text{-}6b}$= 12.4Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$= 4.9 Hz, 1H, H_{6a}), 4.05 (d, ^3J = 6.4 Hz, 2H, CH_2-CN), 3.93 (dd, ^2J 6b-6a= 12.4Hz, ^3J 6b-5= 2.0 Hz, 1H, H_{6b}), 3.74 - 3.69 (m, 3H, CH_2-Br, H_5), 2.06, 1.99, 1.94, 1.93 (s, 12H, $CH_{3\ Ac}$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 172.2, 171.4, 171.1, 170.8 (C=O), 160.3 (C=N), 157.8 (Cq $_{Ar}$), 138.7 (Cq $_{Ar}$), 131.1, 122.3, 115.6, 114.9 (CH_{Ar}), 80.8 (C-1), 76.8 (C-5), 75.0 (C-3), 71.2 (C-2), 69.4 (CH_2-O), 69.2 (C-4), 63.1 (C-6), 39.5 (CH_2-CN), 30.8 (CH_2-Br), 20.7, 20.5, 20.4 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν = 1721(C=O), 1559 (C=C), 1418 (S=O), 815 (C_{sp2}-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{24}H_{29}BrNO_{14}S_2$ ([M-K]$^-$): 698.0205, found : 698.0219.

***(Z)-S*-(β-D-Glucopyranosyl) 2-[3-(2-bromoethoxy)phenyl]acetothio hydroximate-*N*-*O*-sulfate potassium salt 51**



51

Potassium methoxide (53 mg, 0.76 mmol, 0.4 equiv.) was added to a solution of the acetylated compound (1.4 g, 1.9 mmol, 1 equiv.) in anhydrous methanol (24 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the azide glucosinolate as a white resin (890 mg, 64%).

$[\alpha]_D^{20}$= + 8.5 (*c* = 0.29 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7.43 (t, ^3J = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.14 - 6.97 (m, 3H, H_{Ar}), 4.78 (bs, 1H, H_1), 4.43 (t, ^3J = 5.3 Hz, 2H, CH_2-O), 4.23 - 4.12 (m, 2H, CH_2-CN), 3.79 (t, ^3J = 5.3 Hz, 2H, CH_2-Br), 3.73 - 3.69 (m, 2H, H_6), 3.49 - 3.37 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 3.32 - 3.27 (m, 1H, H_5).

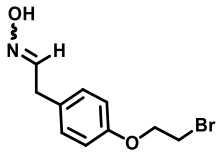
^{13}C NMR (100 MHz, D_2O, internal acetone) δ (ppm) = 162.9 (C=N), 158.6 (Cq $_{Ar}$), 137.5 (Cq $_{Ar}$), 131.1 (CH $_{Ar}$), 122.1 (CH $_{Ar}$), 115.3 (CH $_{Ar}$), 114.7 (CH $_{Ar}$), 82.0 (C-1), 80.4 (C-5), 77.5 (C-3), 72.4 (C-2), 69.3 (C-4), 69.0 (CH_2-O), 60.9 (C-6), 38.7 (CH_2-CN), 31.3 (CH_2-Br).

IR (neat) ν = 3100 (OH), 1570 (C=C), 1402 (S=O), 780 (C_{sp2}-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{16}H_{21}BrNO_{10}S_2$ $[M]^-$ = 529.979, found 529.9795.

Glucosinolate *p*-bromide 50

2-[4-(2-bromoethoxy)phenyl]acetaldehyde oxime 77



77

1,2-Dibromoethane (19 mL, 0.22 mol, 10 equiv.) was added to a solution of ethyl 2-(4-ydroxyphenyl)acetate **61** (4 g, 0.022 mol, 1 equiv.) and potassium carbonate (5.5 g, 0.040 mol, 1.8 equiv.) in anhydrous acetonitrile (70 mL). The reaction mixture was heated 18h at 70°C, then 9 supplementaries equivalents of 1,2-dibromoethane were added in 5 portions over a period of 60 h. The reaction mixture was then cooled down to room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with ethyl acetate and washed once with water, then twice with NaOH 1M. The

organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure to give a yellow solid (**75**).

The solid was dissolved in anhydrous DCM (220 mL, 0.1M) at -78°C, then a solution of DIBAl-H 1.2M in toluene (20 mL, 0.024 mol, 1.1 equiv.) was added dropwise. The solution was stirred at -78°C for 80 min and then was quenched by addition of a saturated aqueous solution of sodium potassium tartrate, and then stirred for 20 min. The aqueous phase was then extracted twice with DCM, then the combined organic phases were washed twice with 1M HCl aqueous solution, dried over $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under reduced pressure to give the crude aldehyde as a yellow oil (**76**).

Finally, the aldehyde **76** was dissolved in a mixture of H_2O/MeOH (1/2) (20 mL, 0.75 M) to which hydroxylamine hydrochloride (1.16 g, 0.017 mol, 1.1 equiv.) and solid potassium carbonate (940 mg, 0.006 mol, 0.45 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4h and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude residue was then taken up with ethyl acetate and washed twice with water then once with brine; after drying over $MgSO_4$, the solvent was evaporated under reduced pressure to give the desired product as a mixture of E/Z isomers as a pale yellow solid (3.22 g, 82% over 3 steps).

R_f = 0.6 (PE/EA : 70/30).

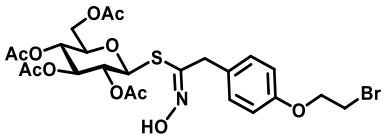
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.41 (bs, 1H, NOH), 7.16 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.91 - 6.83 (m, 3H, CH_{Ar}, HC=N), 4.28 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH_2O), 3.68 (d, ^3J = 5.4 Hz, 2H, CH_2CN), 3.63 (t, ^3J = 6.3 Hz, 2H, CH_2Br).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 157.1 (C=N), 151.5 (Cq Ar), 151.1 (Cq Ar), 130.1 (CH Ar), 115.2 (CH Ar), 68.1 (CH_2O), 35.2 (CH_2Br), 29.2 (CH_2CN).

IR (neat) ν = 3201 (C_{sp3}-H), 2866(C_{sp2}-H), 1608, 1511(C=C), 1242, 813 (C-O) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{10}H_{12}BrNO_2$ ($[M+H]^+$): 258.0124, found 258.0125.

(Z)-S-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(2-bromoethoxy)phenyl]acetothio hydroximate 60



60

A sodium hypochlorite solution (12.5 % active chlorine) (33.8 mL, 69.7 mmol, 3 equiv.) was added to a vigorously stirred solution of crude oxime **77** (6.0 g, 23.2 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DCM (115 mL), the color of the solution changed from yellow to blue before returning to yellow. The solution was then stirred for 20 min at room temperature. After separation, the organic phase was slowly added to a solution of 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio-*β*-D-glucopyranose (4.23 g , 11.6 mmol, 0.5 equiv.) in 62 mL of anhydrous DCM at -10°C under argon atmosphere, then triethylamine (9.7 mL, 69.7 mmol, 3 equiv.) was added dropwise and the solution was allowed to warm up to room temperature. After stirring for 2h at rt, the

reaction was quenched by addition of water and the aqueous phase was extracted twice with DCM. The combined organic layers were then washed twice with a 0.5 M aqueous HCl solution, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was finally crushed in warm MeOH and filtered to give a yellow solid (7.4 g, 100%) (**60**).

R_f = 0.56 (PE/EA : 4/6).

m.p. = degradation at 125°C.

$[\alpha]_D^{20}$= +19.1 (*c* = 0.25 in MeOH).

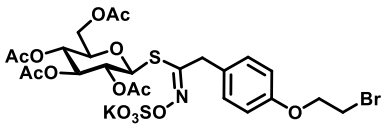
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.66 (s, 1H, NOH), 7.16 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.89 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.11 - 4.90 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 4.81 (d, $^3J_{1-2}$ = 9.7 Hz, 1H, H_1), 4.30 (t, ^3J = 6.2 Hz, 2H, CH_2O), 4.15 (dd, $^2J_{6a-6b}$ = 12.3 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 6.2 Hz, 1H, H_{6a}), 4.04 (dd, $^2J_{6b-6a}$ = 12.3 Hz, $^3J_{6b-5}$ = 2.1 Hz, 1H, H_{6b}), 3.88 (s, 2H, CH_2CN), 3.65 (t, ^3J = 6.2 Hz, 2H, CH_2Br), 3.59 - 3.49 (m, 1H, H_5), 2.07, 2.01, 1.97 (3 x s, 12H, CH_3Ac).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 170.6, 170.3, 169.4, 169.2 (C=O), 157.6 (Cq $_{Ar}$), 151.7 (C=N), 129.4 (CH $_{Ar}$), 128.5 (Cq $_{Ar}$), 115.4 (CH $_{Ar}$), 79.5 (C-1), 75.9 (C-5), 73.8 (CH), 70.2 (CH), 68.2 (CH), 68.1 (CH_2O), 62.4 (C-6), 38.2 (CH_2 CN), 29.2 (CH_2Br), 20.9, 20.7, 20.68 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν = 3164 (C_{sp2}-H), 1748, 1601, 1514 (C=C), 1243, 1053, 983 (C-O) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{24}H_{30}NO_{11}S$ ([M+H]$^+$): 620.0795, found 620.0801.

(Z)-S-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(2-bromoethoxy)phenyl]acetothio hydroximate -*N*,*O*-sulfate potassium salt 72



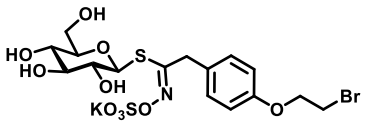
72

The bromo thiohydroximate **60** (1 g, 1.60 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous DCM (40 mL), sulfur trioxide-pyridine complex (1.30 g, 8.1 mmol, 5 equiv.) was added and the suspension was heated at reflux for 24h. The reaction was cooled down to 0°C and quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (1.6 g, 16.1 mmol, 10 equiv.) and left under stirring for 45 minutes at room temperature. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was purified using silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol : 9/1) to obtain the sulfated compound **72** as a resin (1.15 g, 97%).

R_f = 0.4 (EA/MeOH : 80/20).

^{1}H NMR (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.32 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.96 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.18 - 4.86 (m, 4H, H_1, H_2, H_3, H_4), 4.32 (t, ^3J = 6.3 Hz, 2H, CH_2-O), 4.17 (dd, $^2J_{6a-6b}$ = 12.5 Hz, $^3J_{5a-6a}$ = 5.0 Hz, 1H, H_{6a}), 4.01 (bs, 2H, CH_2-CN), 3.96 (dd, $^2J_{6b-6a}$ = 12.5 Hz, $^3J_{5-6b}$ = 2.4 Hz, 1H, H_{6b}), 3.77 - 3.74 (m, 1H, H_5), 3.70 (t,^3J = 5.8 Hz, 2H, CH_2-Br), 2.06, 2.00, 1.94, 1.92 (4 x s, 12H, $CH_{3\ Ac}$).

***(Z)-S*-(β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(2-bromoethoxy)phenyl]acetothiohydroximate-*N*-*O*-sulfate potassium salt 50**



50

Potassium methoxide (40 mg, 0.5 mmol, 0.4 equiv.) was added to a solution of the acetylated glucosinolate **72** (1 g, 1.35 mmol, 1 equiv.) in anhydrous methanol (17 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the glucosinolate as a colorless resin (535 mg, 70%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 14.1 (*c* = 0.43 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz,CD_3OD) δ (ppm) = 7.30 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.89 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.48 (d, ^3J = 9.5 Hz, 1H, H_1), 4.26 (t, ^3J = 5.7 Hz, 2H, CH_2O), 4.15 (d, ^2J = 15.9 Hz, 1H, CH_2-CN), 3.95 (d, ^2J = 15.8 Hz, 1H, CH_2-CN), 3.81 (bd, $^2J_{6a\text{-}6b}$ = 11.7 Hz, 1H, H_{6a}), 3.65 (t, ^3J = 5.7 Hz, 2H, CH_2-Br), 3.58 (dd, $^2J_{6b\text{-}6a}$ = 12.2 Hz, $^3J_{5\text{-}6b}$ = 5.7 Hz, 1H, H_{6b},), 3.22 - 3.05 (m, 4H, H_2, H_3, H_4, H_5).

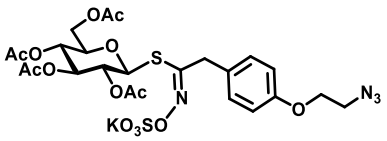
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 161.4 (C=N), 159.5 (Cq_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 130.4 (Cq_{Ar}), 116.6 (CH_{Ar}), 83.3 (C-1), 82.7 (C-5), 79.9, 74.7, 71.7, 69.9 (CH_2-O), 63.3 (C-6), 39.4 (CH_2-CN), 31.1 (CH_2-Br).

IR (neat) ν = 3018 (C_{sp2}-H),1521 (C=C), 1403 (S=O), 854 (C-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{16}H_{21}BrNO_{10}S_2$ ($[M]^-$): 529.9796, found 529.9792.

Glucosinolate- Azido- 47

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(2-azidoethoxy)phenyl]acetothiohydroximate *N*,*O*- sulfate potassium salt 81**



81

Sodium azide (690 mg, 10.6 mmol, 3 equiv.) was added to a solution of thiohydroximate **S2** (2.2 g, 3.5 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (12 mL). The mixture was heated at 50°C for 4h. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was taken up with ethyl acetate and washed three times with brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure to give the desired product as a a yellow solid.

The crude azidothiohydroximate (2 g, 3.4 mmol) was dissolved in anhydrous DCM (49 mL), sulfur trioxide-pyridine complex (2.7 g, 17 mmol, 5 equiv.) was added and the suspension was heated at reflux for 24h. The reaction was then cooled down to 0°C and quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (2.4 g, 23.8 mmol, 10 equiv.) and left under stirring for 45 minutes at room temperature. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was purified using silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 9/1) to give the sulfated compound **S3** as a white resin (1.96 g, 83%).

R_f = 0.3 (EA/MeOH : 9/1).

$[\alpha]_D^{20}$= -5.78 (*c* = 0.83 in MeOH).

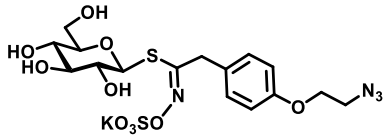
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.33 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.97 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.13 (t, ^3J = 9.2 Hz, 1H, H_3), 5.05 (d, $^3J_{1-2}$ = 10.2 Hz, 1H, H_1), 5.01 - 4.99 (m, 1H, H_4), 4.87 (t, ^3J = 10.1 Hz, ^3J = 9.6 Hz, 1H, H_2), 4.22 - 4.11 (m, 3H, CH_2O, H_{6a}), 4.07 - 3.94 (m, 3H, CH_2CN, H_{6b}), 3.78 - 3.72 (m, 1H, H_5), 3.60 (t, ^3J = 4.8 Hz, 1H, CH_2N), 2.06, 2.00, 1.94, 1.92 (4 x s, 12H, CH_3Ac).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 172.2, 171.4, 171.1, 170.8 (C=O), 159.2 (Cq_{Ar}), 158.3 (C=N), 130.5 (CH_{Ar}), 129.3 (Cq_{Ar}), 116.1 (CH_{Ar}), 80.7 (C-1), 76.7 (C-5), 75.0 (C-3), 71.2 (C-2), 69.3 (C-4), 68.4 (CH_2O), 63.2 (C-6), 51.3 (CH_2N_3), 38.7 (CH_2CN), 20.7, 20.53, 20.5 ($CH_{3\,Ac}$).

IR (neat) ν = 3160, 2111 (C_{sp2}-H), 1745, 1511 (C=C), 1368, 1216, 794 (C-O) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$) : *m/z* calculated for $C_{24}H_{29}N_4O_{14}S_2$ $[M]^-$ = 661.1127, found 661.1125.

***(Z)-S*-(β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(2-azidoethoxy)phenyl]acetothiohydroximate *N,O*-sulfate potassium salt 47**



47

Potassium methoxide (76 mg, 1.08 mmol, 0.4 equiv.) was added to a solution of the acetylated compound **81** (1.9 g, 2.7 mmol, 1 equiv.) in anhydrous methanol (39 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH : 100/0 to 0/100) to give the azido glucosinolate **47** as a white resin (1.17 g, 81%).

$[\alpha]_D^{20}$= +10.0 (*c* = 0.34 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7.34 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.93 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 4.57 - 4.54 (m, 1H, H_1), 4.21 - 4.14 (m, 3H, CH_2O, CH_2CN), 4.02 (d, ^3J = 15.8 Hz, 1H, CH_2CN), 3.86 (bd, ^2J = 12.5 Hz, 1H, H_{6a}), 3.66 (dd, $^2J_{6b-6a}$ = 12.5 Hz, $^3J_{6b-5}$ = 5.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.58 (t, ^3J = 4.8 Hz, 2H, CH_2N_3), 3.28 - 3.14 (m, 2H, H_4, H_5), 3.22 - 3.11 (m, 2H, H_2, H_3).

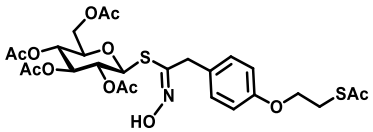
^{13}C NMR (100 MHz, D_2O, internal methanol) δ (ppm) = 161.9 (Cq Ar), 159.5 (C=N), 131.0 (CH Ar), 130.2 (Cq Ar), 116.5 (CH Ar), 83.3 (C-1), 82.6 (CH), 79.8 (CH), 74.6 (CH), 71.6 (CH), 68.9 (CH_2O), 63.2 (C-6), 51.8 (CH_2N_3), 39.4 (CH_2CN).

IR (neat) ν = 3480, 2110 (N_3), 1745, 1513 (C=C), 1216, 794 (C-O) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{16}H_{21}N_4O_{10}S_2$ $[M]^-$ = 493.0704, found 493.0705.

Glucosinolate thiol 48

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(2-acetylsulfanylethoxy)phenyl]acetothiohydroximate 78**



78

Potassium thioacetate (1.1 g, 9.7 mmol, 3 equiv.) was added to a solution of bromo thiohydroximate **60** (2 g, 3.2 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (40 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature during 24h, then EA was added, and the organic phase was washed 3 times with brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$ then evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel flash column chromatography, using toluene-acetone (100/0 to 50/50) to afford a yellow foam (1.1 g, 55%) **78**.

R_f = 0.5 (PE/EA : 50/50).

$[\alpha]_D^{20}$= + 17.2 (*c* = 0.43 in MeOH).

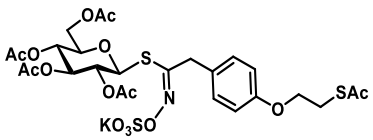
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.45 (s, 1H, OH), 7.15 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.88 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.10 - 4.92 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 4.80 (d, $^3J_{1-2}$ = 10.0 Hz, 1H, H_1), 4.20 - 4.01 (m, 4H, H_{6a}, H_{6b}, CH_2-O), 3.88 (s, 2H, CH_2-CN), 3.57 - 3.50 (m, 1H, H_5), 3.28 (t, ^3J = 6.4 Hz, 2H, CH_2-S), 2.37 (s, 3H, CH_{3Ac}-S), 2.08, 2.01, 1.96 (3 x s, 12H, $CH_{3\ Ac}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 195.6 (C=O $_{SAc}$), 170.7, 170.3, 169.4, 169.2 (C=O $_{Ac}$), 157.7 (C=N), 151.5 (Cq $_{Ar}$), 129.2 (CH $_{Ar}$), 128.1 (Cq $_{Ar}$), 115.2 (CH $_{Ar}$), 79.3 (C-1), 75.7 (C-5), 73.8, 70.1, 68.1, 66.6 (CH_2O or C-6), 62.3 (C-6 or CH_2O), 38.1, 30.6 ($CH_{3\ SAc}$), 28.5 (CH_2S), 20.8, 20.65, 20.60 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν = 3200 (C_{sp2}-H),1725 (C=O), 1520 (C=C), 830 (C-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{26}H_{33}NNaO_{12}S_2$ ($[M+Na]^+$): 638.1336, found 638.1327.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(2-acetylsulfanylethoxy)phenyl]acetothiohydroximate-*N*,*O*-sulfate potassium salt 80**



80

The thioacetate thiohydroximate (460 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous DCM (10 mL), sulfur trioxide-pyridine complex (595 mg, 3.7 mmol, 5 equiv.) was added and the suspension was heated at reflux for 3 days. The reaction was then cooled down to 0°C and quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (750 mg, 7.5 mmol, 10 equiv.) stirred for 45 minutes at room temperature. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was purified using silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 9/1) to obtain the sulfated compound as a white resin (2.2 g, 92%).

R_f = 0.4 (EA/MeOH : 90/10).

$[\alpha]_D^{20}$= + 29.4 (*c* = 0.3 in MeOH).

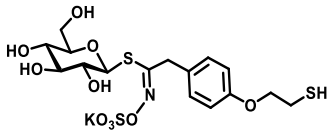
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.30 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.94 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.12 (t, $^3J_{3\text{-}2}$ = $^3J_{3\text{-}4}$ = 9.2 Hz, 1H, H_3), 5.03 (d, $^3J_{1\text{-}2}$= 10.1 Hz, 1H, H_1), 4.98 (t, $^3J_{4\text{-}3}$ = $^3J_{4\text{-}5}$ = 9.7 Hz, 1H, H_4), 4.88 - 4.85 (m, 1H, H_2), 4.16 (dd,$^2J_{6a\text{-}6b}$= 12.4 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$ = 5.0 Hz, 1H, H_{6a}), 4.11 (t, ^3J = 6.4 Hz, 2H, CH_2-O), 4.06 - 3.97 (bs, ^3J = 3.5 Hz, 2H, CH_2-CN), (dd, ^2J = 12.3 Hz, ^3J = 2.9 Hz, 1H, H_{6b}), 3.76 - 3.66 (m, 1H, H_5), 3.27 (t, ^3J = 6.4 Hz, 1H, CH_2-S), 2.35 (s, 3H, CH_{3AcS}), 2.06, 1.99, 1.93, 1.92 (4 x s, 12H, CH_{3Ac}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 196.9 (C=O $_{SAc}$), 172.2, 171.4, 171.1, 170.8 (C=O $_{Ac}$), 159.2 (C=N), 157.9 (Cq $_{Ar}$), 130.5 (CH $_{Ar}$), 129.2 (Cq $_{Ar}$), 116.1 (CH $_{Ar}$), 80.7 (C-1), 76.7 (C-5), 75.0 (C-3), 71.3 (C-2), 69.3 (C-4), 67.8 (CH_2-O), 63.2 (C-6), 38.8 (CH_2-CN), 30.4 ($CH_{3\,SAc}$), 29.3 (CH_2-S), 20.6, 20.57, 20.54, 20.52 ($CH_{3\,Ac}$).

IR (neat) ν = 1712 (C=O), 1505 (C=C), 1406 (S=O), 804 (C_{sp2}-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{26}H_{32}NO_{15}S_3$ ([M]$^-$): 694.0940, found 694.0937.

(Z)-S-(β-D-Glucopyranosyl) 2-[4-(2-mercaptoethoxy)phenyl]acetothiohydroximate-*N*,*O*-sulfate potassium salt 48



48

Potassium methoxide (13 mg, 0.17 mmol, 0.4 equiv.) was added to a solution of the acetylated glucosinolate (320 mg, 0.4 mmol, 1 equiv.) in anhydrous methanol (4 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the glucosinolate as a white resin (180 mg, 79%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 23.6 (*c* = 0.8 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7.38 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.07 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 4.75 (d, ^3J = 9.7 Hz, 1H, H_1), 4.24 (t, ^3J = 6.1 Hz, 2H, CH_2-O), 4.12 (s, 2H, CH_2-CN), 3.69 (d, ^3J = 3.6 Hz, 2H, H_6), 3.49 - 3.35 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 3.29 - 3.25 (m, 1H, H_5), 2.94 (t, ^3J = 6.1 Hz, 2H, CH_2-S).

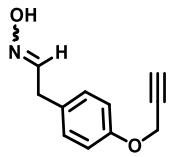
^{13}C NMR (100 MHz, D_2O, internal acetone) δ (ppm) = 163.3 (C=N), 157.7 (Cq $_{Ar}$), 129.9 (CH $_{Ar}$), 128.5 (Cq $_{Ar}$), 116.1 (CH $_{Ar}$), 81.9 (C-1), 80.4 (C-5), 77.5 (C-H), 72.3 (C-H), 70.4 (CH_2-O), 69.2 (C-H), 60.8 (C-6), 38.0 (CH_2-CN), 23.6 (CH_2S).

IR (neat) ν = 3020 (OH), 1721 (C=C), 1393 (S=O), 798 (C_{sp2}-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{16}H_{22}NO_{10}S_3$ ($[M]^-$): 484.0411, found 484.0410.

Glucosinolate alkyne 49

(*E*,*Z*) 2-(4-(prop-2-ynyloxy) phenyl)acetaldehyde oxime 84



84

3-bromo propyne (2.4 mL, 21 .6 mmol, 3 equiv.) was added to a suspension of 2-(4-h ydroxyphenyl)acetate **61** (1.3 g, 7.2 mmol, 1 equiv.) and potassium carbonate (3 g, 21.6 mmol, 3 equiv.) in anhydrous ACN (36mL). The mixture was stirred at room temperature for 18h. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was taken up with ethyl acetate and washed twice with NaOH 1M solution and once with brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure to give a yellow solid (**82**).

A solution of DIBAL-H 1 M in toluene (7.8 mL, 7.8 mmol, 1.1 equiv.) was added dropwise to a solution of ethyl 2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)acetate **82** (1.5 g, 7.1 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DCM (71 mL, 0.1M) at -78°C. The solution was stirred at -78°C for 80 min and then was quenched by addition of a saturated aqueous solution of sodium potassium tartrate, and then stirred for 20 min. The aqueous phase was then extracted twice with DCM, then the combined organic phases were washed twice with 1M HCl aqueous solution, dried over $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under reduced pressure to give a yellow oil: 1.2 g, 98% (**83**).

The crude aldehyde **83** (1.2 g, 7 mmol, 1 equiv.), was dissolved in a mixture of H_2O/MeOH (1/2) (9 mL, 0.75 M) and hydroxylamine hydrochloride (530 mg, 7.7 mmol, 1.1 equiv.) and solid potassium carbonate (530 mg, 3.8 mmol, 0.55 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4h, then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude residue was then taken up with

ethyl acetate and washed twice with water then once with brine; after drying over $MgSO_4$, the solvent was evaporated under reduced pressure to give the desired product as a yellow solid (1.2 g, 87%) as 75/25 mixture of *E/Z* isomers **84**.

R_f = 0.55 (PE/EA : 70/30).

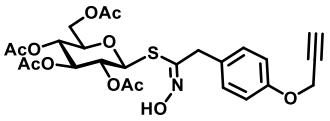
^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 9.04 (bs, 0.75H, NOH), 8.55 (bs, 0.5H, NOH), 7.50 (t, ^3J = 6.3 Hz, 0.25H, N=CH_Z), 7.22 - 7.08 (m, 1.5H_E, 0.5 H_Z, CH_{Ar}), 6.98 - 6.91 (m, 1.5H_E, 0.5 H_Z, CH_{Ar}), 6.86 (t, ^3J = 5.4 Hz, 0.75H, N=CH_E), 4.69 - 4.67 (m, 1.5H, CH_2O_E), 4.68 - 4.66 (m, 1.5H, CH_2O_Z), 3.68 (d, ^3J = 5.3 Hz, 1.5H, CH_2-CN_Z), 3.48 (d, ^3J = 6.3 Hz, 0.5H, CH_2-CN_E), 2.52 - 2.50 (m, ^4J = 2.4 Hz, 1H, CH_{alkyne}).

^{13}C NMR isomer *Z* (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 156.6 (Cq $_{Ar}$), 150.9 (C=N), 130.0 (CH $_{Ar}$), 129.2 (Cq $_{Ar}$), 115.4 (CH $_{Ar}$), 75.7 (Cq $_{Alkyne}$), 75.6 (CH $_{Alkyne}$), 56.0 (CH_2O), 35.2 (CH_2CN_E), 30.9 (CH_2CN_Z).

IR (neat) ν = 3290 (NOH), 2870 ($C_{sp2}H$), 2175 (C≡C), 1608, 1504, 1220, 790 (≡C-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{11}H_{12}NO_2$ ([M+H]$^+$): 190.0862 , found 190.0860.

(Z)-S-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl]aceto thiohydroximate 85



85

A sodium hypochlorite solution (12.5 % active chlorine) (7.7 mL, 36.6 mmol, 6 equiv.) was added to a vigorously stirred solution of crude 2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy) phenyl) acetaldehyde oxime **84** (1.15 g, 6.1 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DCM (41 mL), the color of the solution changed from yellow to blue before returning to yellow. The solution was then stirred for 20 min at room temperature. The aqueous phase was discarded, then the organic phase was slowly added to a solution of 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (1.13 g, 4.9 mmol, 0.8 equiv.) in 60 mL of anhydrous DCM at 0°C under argon atmosphere, then triethylamine (6.8 mL, 48.8 mmol, 8 equiv.) was added dropwise and the solution was allowed to warm up to room temperature. After stirring for 2h at rt, the reaction was quenched by addition of water and the aqueous phase was extracted twice with DCM. The combined organic layers were then washed twice with a 0.5 M aqueous HCl solution, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with PE/EA (100/0 to 0/100) to give the final product as a yellow solid (1.6 g, 59%) (**85**).

m.p. = degradation at 150°C

R_f = 0.4 (PE/EA : 50/50).

$[\alpha]_D^{20}$= + 4.5 (*c* = 0.21 in MeOH).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 9.24 (s, 1H, NOH), 7.19 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.97 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.08 - 4.91 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 4.81 (d, $^3J_{1-2}$= 9.7 Hz, 1H, H_1), 4.72 (d, ^4J = 2.4 Hz, 2H, CH_2O), 4.16

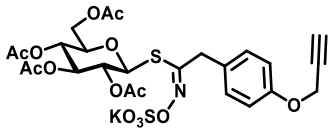
(dd,$^2J_{6a-6b}$= 12.4 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.6 Hz, 1H, H_{6a}), 4.03 (dd, $^2J_{6b-6a}$ = 12.3 Hz, $^3J_{6b-5}$ = 2.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.90 (bs, 2H, CH_2Ar), 3.58 - 3.47 (m, 1H, H_5), 2.58 (t, ^4J = 2.4 Hz, 1H, C≡CH), 2.08, 2.01, 1.97, 1.96 (4 x s, 12H, CH_3Ac).

^{13}C NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 170.7, 170.3, 169.4, 169.3 (4 x C=O), 156.8 (Cq $_{Ar}$), 151.4 (C=N), 129.2 (CH $_{Ar}$), 128.6 (Cq $_{Ar}$), 115.6 (CH $_{Ar}$), 79.4 (C-1), 78.5, 75.9 (C-5), 75.7, 73.8, 70.0, 68.1 (C-6), 62.3 (CH_2O), 55.9 ($CH_{2\ Ar}$), 38.1, 20.8, 20.65, 20.62 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν = 3285 (NOH), 2860 ($C_{sp2}H$), 2190 (C≡C), 1620, 1500, 784 (≡C-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{25}H_{30}NO_{11}S$ ($[M+H]^+$): 552.1534 , found 552.1532.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl]aceto thiohydroximate 86**



86

The alkynyl thiohydroximate **85** (2 g, 3.5 mmol 1 equiv.) was dissolved in anhydrous DCM (50 mL), sulfur trioxide-pyridine complex (2.8 g, 17.8 mmol, 5 equiv.) was added and the suspension was heated at reflux for 24h. The reaction was then cooled down to 0°C and quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (2.5 g, 24.9 mmol, 7 equiv.) and left under stirring for 45 minutes at room temperature. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was purified using silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 9/1) to obtain the sulfated compound as a white resin (2.2 g, 92%) (**86**).

R_f = 0.77 (EA:MeOH : 90/10).

$[\alpha]_D^{20}$= + 7.1 (*c* = 0.4 in MeOH).

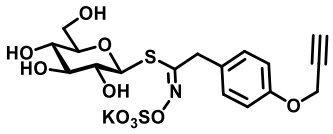
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.33 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.01 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.11 (t, $^3J_{4-3}$= $^3J_{4-5}$ = 9.2 Hz, 1H, H_4), 5.04 - 4.96 (m, 2H, H_1, H_2), 4.90 - 4.84 (m, 1H, H_3), 4.74 (d, ^4J = 2.4 Hz, 2H, CH_2O), 4.19 (dd,$^2J_{6a-6b}$= 12.4 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.0 Hz, 1H, H_{6a}), 4.05 - 3.94 (m, 3H, CH_2-CN, H_{6b}), 3.77 - 3.68 (ddd, $^3J_{5-4}$ = 8.4 Hz, $^3J_{5-6a}$ = 5.4 Hz, $^3J_{5-6b}$ = 2.2 Hz, 1H, H_5), 2.92 (t, ^4J = 2.4 Hz, 1H, C≡CH), 2.06, 2.00, 1.94, 1.92 (s, 12H, CH_{3Ac}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 172.2, 171.5, 171.1, 170.8 (C=O), 158.4 (Cq $_{Ar}$ or C=N), 158.1 (C=N or Cq $_{Ar}$), 130.4 (CH $_{Ar}$), 129.6 (Cq $_{Ar}$), 116.5 (CH $_{Ar}$), 80.7 (C-1), 79.8 (Cq alkyne), 76.8 (≡C or C-5),76.7 (C-5 or ≡C) 75.0 (C-4), 71.2 (C-3), 69.2 (C-2), 63.2 (C-6), 56.7 (CH_2O) , 38.8 (CH_2-CN), 20.7, 20.5, 20.49, 20.45 ($CH_{3\ Ac}$).

IR (neat) ν = 3272 (C-H), 2709 ($C_{sp2}H$), 2205 (C≡C), 1590, 1535, 803 (≡C-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{25}H_{28}NO_{14}S_2$ ($[M]^-$): 630.0952, found 630.0956.

***(Z)-S*-(β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(prop-2-ynyloxy)phenyl]acetothiohydroximate -*N,O*- sulfate potassium salt 49**



49

Potassium methoxide (40 mg, 0.6 mmol, 0.4 equiv.) was added to a solution of the acetylated compound (950 mg, 1.4 mmol, 1 equiv.) in anhydrous methanol (22 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH : 100/0 to 0/100) to give the glucosinolate as a white resin (710 mg, 80%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 1.2 (*c* = 0.18 in MeOH).

^{1}H NMR (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.19 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 6.97 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, CH_{Ar}), 4.71 (d, ^4J = 2.4 Hz, 2H, CH_2O), 4.59 - 4.51 (m, 1H, H_1), 4.19 (d, ^2J = 16.0 Hz, 1H, CH_2CN), 4.00 (d, ^2J = 16.0 Hz, 1H, CH_2CN), 3.88 - 3.79 (m, 1H, H_{6a}), 3.63 (dd, $^2J_{6b\text{-}6a}$ = 12.1 Hz, $^3J_{6b\text{-}5}$ = 5.5 Hz, 1H, H_{6b}), 3.27 - 3.14 (m, 4H, H_2, H_3, H_4, H_5), 2.93 (t, ^4J = 2.5Hz, 1H, ≡CH).

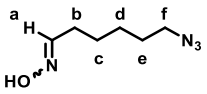
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 161.0 (Cq $_{Ar}$), 158.4 (C=N), 130.4 (CH $_{Ar}$), 130.1 (Cq $_{Ar}$), 116.3 (CH $_{Ar}$), 82.8 (C-1), 82.2 (CH), 79.8 (Cq alkyne), 79.4 (CH), 76.8 (C≡C-H), 74.2 (CH), 71.2 (CH), 62.8 (C-6), 56.7 (CH_2O), 38.9 (CH_2 CN).

IR (neat) ν = 3480 (OH), 3200 ($C_{sp2}H$), 2112 (C≡C), 1746, 1535, 792 (C≡C-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{17}H_{20}NO_{10}S_2$ ($[M]^-$): 462.0534, found 462.0534.

Glucosinolate pentyl azide 52

6-azidohexanald oxime 193



193

Sodium azide (18.5 g, 0.285 mol, 2.7 equiv.) was added to a suspension of 6-chloro-11-hexanol (14.4 g, 0.105 mol, 1 equiv.) in water (116 mL) and the reaction mixture was heated at reflux for 19h. It was then cooled and extracted 3 times with ethyl acetate. The collected organic phases were dried over $MgSO_4$, filtrated and evaporated to give the crude as a colorless oil 14.5 g (96%).

Trichloroisocyanuric acid (24.7 g, 0.106 mol, 1.05 equiv.) was added to a stirred solution of 6-azido-1-hexanol (14.5 g, 0.101 mol, 1 equiv.) in anhydrous DCM (160 mL) at 0°C. Then, a solution of TEMPO (158 mg, 1.01 mmol, 0.01 equiv.) in 3 mL of DCM was added dropwise. The mixture was stirred at 4°C during

10 min, then at rt for 30 min, then filtered through a pad of Celite. The organic phase was washed twice once with: saturated solution of Na_2CO_3, water, 1 M solution HCl, and then with brine. The organic phase was dried over $MgSO_4$, evaporated and then purified by silica gel column chromatography (PE/EA: 100/0 to 0/100), to yield the aldehyde 7.5 g (52%) as a colorless oil.[3] [180]

6-azidohexanal (4.4 g, 31.2 mmol, 1 equiv.), was dissolved in a mixture H_2O/MeOH 30/70, (42 mL), then hydroxylamine hydrochloride (2.7g, 38.9 mmol, 1.25 equiv.) and solid potassium carbonate (2.15 g, 3.8 mmol, 0.50 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4h, then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude residue was then taken up with ethyl acetate and washed twice with water then once with brine; after drying over $MgSO_4$, the solvent was evaporated under reduced pressure to give the desired product as a yellow solid (1.2 g, 87%), 55/45 mixture of *E*/*Z* isomers **193**.

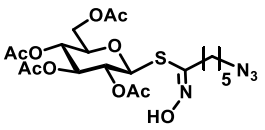
R_f = 0.3 (PE/EA: 50/50).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.51 (bs, 1H, OH), 7.41 (t, ^3J = 6.0 Hz, 0.55H, $H_{a\,E}$), 6.71 (t, ^3J = 5.5 Hz, 0.45H, $H_{a\,Z}$), 3.26 (t, ^3J = 6.9 Hz, 0.9H, H_{fZ}), 3.26 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1.1H, H_{fE}), 2.43 - 2.36 (m, 0.9H, $H_{b\,Z}$), 2.24 - 2.18 (m, 1.1H, $H_{b\,E}$), 1.66 - 1.37 (m, 12H, H_{cZ}, H_{cE}, H_{dZ}, H_{dE}, H_{eZ}, H_{eE}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) =152.4 (C-a_Z), 151.8 (C-a_E), 51.38 (C-f_Z), 51.36 (C-f_E), 29.4 (C-b_E), 28.64 (CH_2), 28.62 (CH_2), 26.5 (CH_2), 26.3 (CH_2), 26.1 (CH_2), 25.7 (CH_2), 24.88 (C-b_Z).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_6H_{12}N_4O$ ([M+H]$^+$): 157.1084, found 157.1081.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 5-azidopentanothiohydroximate 194**



194

A sodium hypochlorite solution (12.5 % active chlorine) (20 mL, 36.6 mmol, 3 equiv.) was added to a vigorously stirred solution of crude 6-azidohexanal oxime (4.4 g, 28.2 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DCM (140 mL), the color of the solution changed from yellow to blue before returning to yellow. The solution was then stirred for 20 min at room temperature. After separation, the organic phase was slowly added to a solution of 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (5.13 g, 14.1 mmol, 0.5 equiv.) in 140 mL of anhydrous DCM at -10°C under argon atmosphere, then anhydrous triethylamine (11.8 mL, 84.5 mmol, 3 equiv.) was added dropwise and the solution was allowed to warm up to room temperature. After stirring for 2h at rt, the reaction was quenched by addition of water and the aqueous phase was extracted twice with DCM. The combined organic layers were then washed twice with a 0.5 M aqueous HCl solution, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product

[180] Schneider, Eric L., Ashley, Gary, *WO2015051307 (A1) — 2015-04-09- SLOW-RELEASE CONJUGATES OF SN-38*.

was purified by silica gel column chromatography using EP/EA 100/0 to 0/100 to give the final product **194** as a yellow solid (5.4 g, 74%).

R_f = 0.35 (EP/EA : 50/50).

m.p.: degradation at 140°C.

$[\alpha]_D^{20}$= + 21.6 (*c* = 0.5 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 8.93 (s, 1H,NOH), 5.28 - 5.20 (m, 1H, H_2), 5.07 (d, ^3J = 9.9 Hz, 1H, H_1) 5.10 - 4.99 (m, 2H, H_3, H_4), 4.18 (dd,$^2J_{6a-6b}$= 12.4 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.4 Hz, 1H, H_{6a}), 4.10 (dd, $^2J_{6b-6a}$ = 12.3 Hz, $^3J_{6b-5}$ = 2.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.73 (ddd, $^3J_{5-4}$ = 10.0 Hz, $^3J_{5-6a}$ = 5.4 Hz, $^3J_{5-6b}$ = 2.4 Hz, 1H, H_5), 3.27 (t, ^3J = 6.7 Hz, 2H, CH_2CN), 2.59 - 2.41 (m, 2H, CH_2N_3), 2.05, 2.02, 2.00, 1.98 (4x s, 12H, $CH_{3\ Ac}$), 1.70 - 1.56 (m, 4H, $CH_{2\ pent}$), 1.48 - 1.38 (m, 2H, $CH_{2\ pent}$).

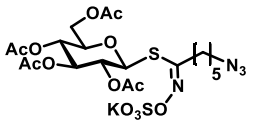
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 170.7, 170.3, 169.5, 169.3 (C=O), 151.9 (C=N), 80.0 (C-1), 76.0 (C-5), 73.8 (C-2), 70.2 (CH), 68.2 (CH), 62.3 (C-6), 51.3 (CH_2CN), 32.5 (CH_2N_3), 28.6, 26.5, 26.3 ($CH_{2\ pent}$), 20.75, 20.72, 20.6 (CH_3 Ac).

IR (neat) ν = 2160 (N_3), 1740 (C=O), 1533 (Csp^3-H), 987 (C-C sp^3) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{20}H_{30}N_4NaO_{10}S$ ([M+Na]$^+$): 541.157485, found 541.156951.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 5-azidopentanothiohydroximate**

-*N*-*O*-sulfate potassium salt 195



195

The azido thiohydroximate **194** (3.5 g, 6.75 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous DCM (84 mL), sulfur trioxide-pyridine complex (5.4 g, 33.7 mmol, 5 equiv.) was added and the suspension was heated at reflux for 24h. The reaction was then cooled down to 0°C and quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (6.8 g, 67.5 mmol, 10 equiv.) and stirred for 45 minutes at room temperature. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was purified using silica gel column chromatography (ethyl acetate/methanol: 9/1) to give the sulfated compound as a resin (4.3 g, 84%) (**195**).

R_f = 0.4 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 14 (*c* = 0.68 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 5.49 - 5.40 (m, 2H, H_1, H_3), 5.12 (t, ^3J = 9.7 Hz, 1H, H_4), 5.08 - 5.01 (t, ^3J = 9.6 Hz, 1H, H_2), 4.29 (dd,$^2J_{6a-6b}$ = 12.5 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.3 Hz, 1H, H_{6a}), 4.21 (dd, $^2J_{6b-6a}$ = 12.4 Hz, $^3J_{6b-5}$ = 2.3 Hz, 1H, H_{6b}), 4.08 (ddd, $^3J_{5-4}$ = 10.1, $^3J_{5-6a}$ = 5.3, $^3J_{5-6b}$ = 2.3 Hz, 1H, H_5), 3.41 - 3.35 (m, 2H, CH_2C=N), 2.77 -

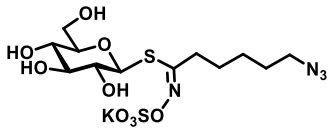
2.70 (m, 2H, CH_2N_3), 2.13, 2.1, 2.09, 2.04 (4 x s, 12H, $CH_{3\ Ac}$), 1.83 (quin., ^3J = 7.5 Hz, 2H, $CH_{2\ pent}$), 1.76 - 1.67 (m, 2H, $CH_{2\ pent}$), 1.62 - 1.52 (m, 2H, $CH_{2\ pent}$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 172.2, 171.5, 171.2, 170.9 (C=O), 159.0 (C=N), 80.9 (C-1), 76.7 (C-5), 75.0 (C-3), 71.4 (C-2), 69.5 (C-4), 63.4 (C-6), 52.3 (CH_2C=N), 33.5 (CH_2N_3), 29.6, 27.7, 27.2 (CH_2), 20.7, 20.54, 20.51 (CH_3).

IR (neat) ν = 2150 (N_3), 1754 (C=O), 1533 (C-H), 1266 (C-O), 1193 (S=O), 1003 (C-C) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{20}H_{29}N_4O_{13}S_2$ ([M]$^-$): 597.1178, found 597.1175.

***(Z)-S*-(β-D-glucopyranosyl) 5-azidopentanothiohydroximate-*N*-*O*-sulfate potassium salt 52**



52

Potassium methoxide (132 mg, 1.88 mmol, 0.4 equiv.) was added to a solution of the acetylated compound **195** (3g, 4.7 mmol, 1 equiv.) in anhydrous methanol (60 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the glucosinolate **52** as a white resin (1.9 g, 86%).

R_f = 0.1 (EA:MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 32 (*c* = 0.6 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 4.86 (d, ^3J = 9.8 Hz, 1H, H_1), 3.92 - 3.83 (m, 1H, H_{6a}), 3.66 (dd,$^2J_{6a-6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.44 (t, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H_3), 3.39 - 3.25 (m, 5H, CH_2CN, H_2, H_4, H_5), 2.73 (t ^3J = 7.3Hz, 2.8 Hz, 1H, CH_2N_3), 2.71 (t ^3J = 7.3Hz, 2.8 Hz, 1H, CH_2N_3) 1.79 (quint, ^3J = 7.6 Hz, 2H, $CH_{2\ pent}$), 1.70 - 1.61 (m, 2H, $CH_{2\ pent}$), 1.55 - 1.46 (m, 2H, $CH_{2\ pent}$).

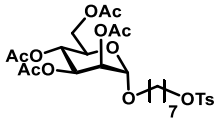
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 162.2 (C=N), 83.6 (C-1), 82.2 (C-4 or C-5), 79.4 (C-3), 74.1 (C-2), 71.1 (C-5 or C-4), 62.6 (C-6), 52.3 (CH_2N_3), 33.5 (CH_2CN), 29.5, 28.0, 27.3 ($CH_{2\ pent}$).

IR (neat) ν = 3605 (OH), 2155 (N_3), 1780, 1260 (C-O), 1545 (C-H), 954 (C-C), 789 (C-H) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{12}H_{21}N_4O_9S_2$ ([M]$^-$): 429.0755, found 429.0754.

Glucosinolate heptyl mannoside 95

(7-*O*-p-Toluenesulfonylheptyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranoside 98



98

p-Toluene sulfonic acid (7.9 g, 41.6 mmol, 1.1 equiv.) was added to a mixture of 1,7- heptanediol (5 g, 37.8 mmol, 1 equiv.), Et_3N (5.8 mL, 41.6 mmol, 1.1 equiv.), and DMAP (920 mg, 7.6 mmol, 0.2 equiv.) in anhydrous DCM (250 mL). The reaction was stirred 30 min at 0 °C, then for 4h at rt. The reaction was quenched by the addition of saturated NH_4Cl aqueous solution and the aqueous phase was extracted with DCM twice. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude compound was then used in the next step without any purification.

Boron trifluoride diethyl etherate (46%) (9.5 mL, 38.5 mmol, 3 equiv.) was added dropwise at 0°C to a mixture of tosylated heptanol (5.5 g, 12.8 mmol, 1.5 equiv.) and 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose (5 g, 12.8 mmol, 1 equiv.) in freshly distilled DCM (140 mL). After 30 min at 0°C, it was allowed to return at rt and stirred for further 5h.

The reaction was quenched with water, extracted 3 times with DCM, dried with $MgSO_4$ then purified by column chromatography (PE/AE) 100:0 to 0:100 to give 3.6 g glycosylated mannoside as foam (23%) (**98**).

R_f = 0.6 (PE/EA : 70/30).

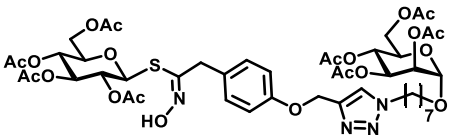
$[\alpha]_D^{20}$= + 25 (*c* = 0.7 in MeOH).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7.79 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H, CH_{Ar}), 7.37 (d, ^3J = 7.9 Hz, 2H, CH_{Ar}), 5.34 - 5.20 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 4.80 (bs, 1H, H_1), 4.29 (dd,$^2J_{6a\text{-}6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a\text{-}5}$ = 5.3 Hz, 1H, H_{6a}), 4.11 (dd, $^2J_{6b\text{-}6a}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6b\text{-}5}$ = 2.4 Hz, 1H, H_{6b}), 4.02 - 3.94 (m, 3H, CH_2O, H_5), 3.72 - 3.61 (m, 1H, CH_2O-Ts), 3.49 - 3.38 (m, 1H, CH_2O-Ts), 2.46 (s, 3H, CH_3Ts), 2.16, 2.10, 2.05, 2.00 (4 x s, 12 H, CH_3Ac), 1.71 - 1.50 (m, 4H, CH_2 Aliph.), 1.39 - 1.24 (m, 6H, CH_2 Aliph.).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 170.8, 170.2, 170.0, 169.9 (C=O), 144.8 (Cq Ar), 133.4 (Cq Ar), 129.9 (CH Ar), 128.0 (CH Ar), 97.7 (C-1), 70.7 (CH_2O), 69.8 (CH), 69.3 (CH), 68.6 (C-5), 68.5 (CH_2O-Ts), 66.4 (CH), 62.7 (C-6), 29.2, 28.9, 28.8, 26.0, 25.4 (CH_2 Aliph.), 21.8 (CH_3Ts), 21.1, 21.0, 20.8, 20.83 (CH_3 Ac).

IR (neat) ν = 1750, 1684 (C=O Ac), 1398 (S=O), 1212 (C-O), 954 (C-C) 847, 818 (C_{sp2}-H) cm^{-1}.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(1-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-mannopyranosidyloxyheptyl)-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxyphenyl]acetothiohydroximate 99**



99

Sodium azide (380 mg, 5.8 mmol, 3 equiv.) was added to a solution of tosyl heptyl mannoside **98** (1.2 g, 1.9 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (6.5 mL). The mixture was heated at 50°C for 4h. The solvent was then evaporated under reduced pressure and the residue was taken up with ethyl acetate and washed three times with brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure to give a yellow solid. The crude product **96** was directly used in the next step.

Alkynyl thiohydroximate **85** (905 mg, 1.6 mmol, 1 equiv.) and the azido heptyl mannoside **96** were solubilized in a mixture t-BuOH/H_2O (1/1, 6 mL). Then copper sulfate (26 mg, 0.164 mmol, 0.1 equiv.) and sodium ascorbate (65 mg, 0.33 mmol, 0.2 equiv.) were successively added. The mixture was stirred 4h at rt, then taken-up with EA, and washed with water (1 time) and twice with brine. The solvent was dried over $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using silica gel column chromatography (PE/EA : 100/0 to 0/100) to give the desired product (1.1g, 65%) as a resin **99**.

R_f = 0.1 (PE/EA : 50/50).

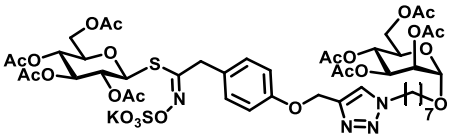
$[\alpha]_D^{20}$= + 24 (*c* = 0.55 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 9.79 (bs, 1H, NOH) 7.70 (s, 1H, $H_{triaz.}$), 7.18 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.97 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.35 (dd, $^3J_{3-4}$= 10.0 Hz, $^3J_{3-2}$ = 3.4 Hz, 1H, H_{3aM}), 5.25 (d, $^3J_{4-3}$ = 9.8 Hz, 1H, H_{4M}), 5.26 - 5.19 (m, 3 H, H_{2M},$CH_2O_{triaz.}$), 5.09 - 4.93 (m, 3H, H_{4G}, H_{3G}, H_{2G}), 4.82 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H, H_{1G}), 4.85 (bs, 1H, H_{1M}), 4.38 (t, ^3J = 7.2 Hz, 2H, CH_2O_M), 4.28 (dd, $^2J_{6a-6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.3 Hz, 1H, H_{6aM}), 4.16 - 4.10 (m, 2H,H_M), 4.03 - 3.96 (m, 2H, H_{6bG}, H_{5M}), 3.89 (s, 2H, CH_2CN), 3.69, - 3.67 (d t, ^3J = 6.5 Hz, 1H, CH_2N_a), 3.55 - 3.51 (m, 1H, H_{5G}), 3.45, 3.43 (dt, ^3J = 6.5 Hz, 1H, CH_2N_b), 2.16, 2.10, 2.08, 2.04, 2.02, 2.00, 1.97, 1.96 (8 x s, 24H, $CH_{3\ Ac}$), 1.95 - 1.92 (m, 2H, $CH_{2\ Hept.}$), 1.65 - 1.55 (m, 2H, $CH_{2\ Hept.}$), 1.41 - 1.33 (m, 6H, $CH_{2\ Hept.}$).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 170.7, 170.5, 170.2, 170.0, 169.8, 169.3, 169.1 (C=O), 157.5 (C=N), 150.4 (Cq Ar), 144.0 ($Cq_{triaz.}$), 129.1 (CH Ar), 128.5 (Cq Ar), 122.8 (CH_{triaz}), 115.2 (C Ar), 97.5 (C-1_M), 79.3 (C-1_G), 75.6 (C-5_G), 73.8 (C-4_G), 70.1 (C-2_G), 69.7 (C-2_M), 69.2 (C-3_M), 68.5 (C-5_M), 68.4 ($CH_2N_{Hept.}$), 68.1 (C-4_G), 66.3 (C-2_M), 62.6 (C-6_G or C-6_M), 62.2 (C-6_M or C-6_G), 62.1 ($CH_2O_{triaz.}$), 50.5 (CH_2O_M), 38.0 (CH_2 CN), 30.2, 29.1, 28.8, 26.4, 26.0 (CH_2 Hept.), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 20.72 , 20.6, 20.64, 20.5 (CH_3 Ac).

IR (neat) ν = 1772, 1665 (C=O_{Ac}), 1225 (C-O), 929 (C-C) 840 (C_{sp2}-H_{Ar}) cm^{-1}.

***(Z)-S*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(1-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosidyloxyheptyl)-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxyphenyl]acetothiohydroximate *N*,*O*-sulfate potassium salt 100**



100

Sulfur trioxide-pyridine complex (770 mg, 4.8 mmol, 5 equiv.) was added to a solution of thiohydroximate **99** (1 g, 0.96 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (10 mL). The suspension was heated at 50°C overnight. It

was then cooled down to 0°C, quenched by addition of a 0.5M aqueous $KHCO_3$ solution (20 mL) and stirred for 30 minutes at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (EA/MeOH 9/1) to give the desired compound **100** as a yellow resin (750 mg, 68%).

R_f = 0.2 (EA/MeOH : 90/10).

$[\alpha]_D^{20}$= + 16.3 (*c* = 0.76 in MeOH).

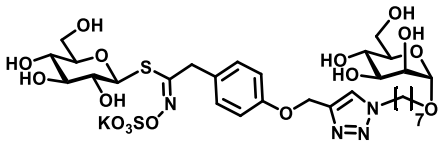
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8.05 (s, 1H, $H_{triaz.}$), 7.30 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.00 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.24 - 5.13 (m, 5H), 5.11 - 4.86 (m, 4H), 4.84 - 4.80 (m, 1H, H_{1M}), 4.40 (t, ^3J = 7.1 Hz, 2H, $CH_2N_{Hept.}$), 4.21 (dd, $^2J_{6a-6b}$ = 12.2 Hz, $^3J_{6a-5}$ = 5.2 Hz, 1H, H_{6aM}), 4.16- 4.03 (m, 2H, H_{6aG}, H_{6bM}), 4.01 - 3.85 (m, 4H, H_{6bG}, H_{5M}, CH_2CN), 3.75 - 3.64 (m, 2H, H_{5G}, CH_2N), 3.58 - 3.39 (m, 1H, CH_2N), 2.10, 2.02, 2.00, 1.97, 1.93, 1.91, 1.89 (7 x s, 26H, $CH_{3\,Ac}$, $CH_{2Hept.}$), 1.67 - 1.51 (m, 2H, CH_{2Hept}), 1.42 - 1.26 (m, 6H, CH_{2Hept}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 172.3, 172.2, 171.6, 171.56, 171.5, 171.4 , 171.1, 170.8, (C=O), 159.1 (C=N), 157.8 (Cq Ar), 130.6 (CH Ar), 129.5 (Cq $_{triaz.}$), 116.3 (CH Ar), 116.28, 116.2, 98.8 (C-1_M), 76.7 (C-1_G), 75.0 (C-5_G), 71.3, 70.9, 70.8, 69.9, 69.3 (CH_2O), 67.4, 63.8 (C-6_G), 63.2, 62.5, 51.4 (CH_2N), 31.1, 30.1, 29.7, 27.3, 27.1 (CH_2 Hept.), 20.7, 20.63, 20.6, 20.56, 20.54, 20.43 (CH_3Ac).

IR (neat) ν = 1782, 1654 (C=O $_{Ac}$), 1217 (C-O), 1190 (S=O), 915 (C-C sp^3) 870 (C_{sp2}-H $_{Ar}$) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{46}H_{61}N_4O_{24}S_2$ ([M]$^-$): 1117.3123, found 1117.3116.

***(Z)-S*-(β-D-glucopyranosyl) 2-[4-(1-(⍰-D-mannopyranosidyloxyheptyl)-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxyphenyl]acetothiohydroximate *N,O*-sulfate potassium salt 95**



95

Potassium methoxide (18 mg, 0.24 mmol, 0.4 equiv.) was added to a solution of the acetylated compound **100** (710 mg, 2.7 mmol, 1 equiv.) in anhydrous methanol (39 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the azido glucosinolate as a white resin (1.17 g, 81%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 10 (*c* = 0.25 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8.05 (s, 1H, $H_{triaz.}$), 7.34 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.00 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.16 (s, 2H, CH_2-O $_{triaz.}$), 4.73 (d, ^3J = 1.4 Hz, 1H, H_{1M}), 4.52 (d, ^3J = 9.6 Hz, 1H, H_{1G}), 4.42 (t, ^3J = 7.0

Hz, 2H, CH_2O_M), 4.18 (d, ^2J = 15.8 Hz, 1H, CH_2-CN), 3.99 (d, ^2J = 15.8 Hz, 1H, CH_2-CN), 3.87 - 3.76 (m, 3H, H_{2M}, $H6_M$), 3.75 - 3.66 (m, 3H, CH_2N_a, H_{6Ga}, H_{5M}), 3.65 - 3.58 (m, 2H, H_{3M}, H_{6Gb}), 3.55 - 3.48 (m, 1H, H_{5G}),3.43 - 3.37 (m, 1H, CH_2N_b), 3.26 - 3.19 (m, 2H, H_{3G}, H_{4M}), 3.17 - 3.11 (m, 2H, H_{2G}, H_{4G}), 1.92 (quin., ^3J = 7.0 Hz, 2H, $CH_{2\ Hept.}$), 1.68 - 1.51 (m, 2H, $CH_{2\ Hept.}$), 1.42 - 1.28 (m, 6H, $CH_{2\ Hept.}$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 160.9 (C=N), 160.0 (Cq Ar), 145.0 (Cq triaz.), 130.5 (CH Ar), 130.0 (C triaz.), 125.3 (Cq Ar), 116.4 (CH Ar), 101.5 (C-1_M), 82.8 (C-1_G), 82.2 (CH), 79.3 (CH), 74.6 (C-5_G), 74.2 (CH), 72.6 (C-5_M), 72.2 (C-2_M), 71.2 (CH), 68.6 (C-3_M), 68.5 ($CH_2N_{triaz.}$), 62.9 (C-6_M or G), 62.8 (C-6_G or C-6_M), 62.5 ($CH_2O_{triaz.}$), 51.4 (CH_2O_M), 38.9 (CH_2-CN), 31.2, 30.4, 29.7, 27.3, 27.1 (CH_2 Hept.).

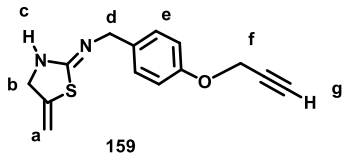
IR (neat) ν = 3020 (OH), 1205 (S=O), 918 (C-C) 868 (C_{sp2}-H_{Ar}) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{30}H_{45}N_4O_{16}S_2$ ($[M]^-$): 781.2278, found 781.2285.

General procedure A (reaction between ITC and propargylamines)

Myrosinase solution 10 U/mL (x µL) was added to a solution of glucosinolate (1 equiv.) and propargyl amine (3 equiv.) in phosphate buffer pH = 7 (20 mM) or aqueous ammonium acetate pH 7 (20 mM), then the reaction mixture was shaken with a thermomixer for 5-24h at 37°C. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude was purified using silica gel column chromatography (PE/EA : 100/0 to 0/100) to afford the pure product.

***(Z)*-2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzyl)imino]- 5-methylidene-1,3-thiazolidine 159**



159

General procedure A was followed from prop-2-ynamine (22 mg, 0.4 mmol, 5 equiv.), alkynyl glucosinolate **49** (40 mg, 0.08 mmol, 1 equiv.), 216 µL (2.16 U_E) of myrosinase solution in ammonium acetate buffer solution (4 mL) during 24h. The desired product was obtained as a yellow oil (14 mg, 68%).

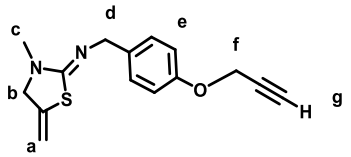
R_f = 0.3 (PE /AE : 70/30).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7.26 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.95 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.19 - 5.18 (m, 1H, H_a), 5.12 (td, ^2J = 2.8 Hz, ^3J = 1.6 Hz, 1H, $H_{a'}$), 4.72 (t, ^3J = 2.6 Hz, 2H, H_b), 4.68 (d, ^3J = 2.4 Hz, 2H, H_f), 4.41 (s, 2H, H_d),2.51 (t, ^3J = 2.4 Hz, 1H, H_h).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 159.0 (C=N), 157.2, 148.3 (Cq_{Ar}), 131.2 (Cq C=C), 129.2, 115.3 (CH_{Ar}), 103.0 (=CH_2), 78.6 (Cq alkyne), 75.7 (≡C-H), 66.6 (CH_2N), 56.0 (CH_2O), 48.0 (CH_2 Bn).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{14}H_{15}N_2OS$ ($[M+H]^+$): 259.0900, found 259.0900.

***(Z)*- 3-*N*-methyl 2-[(4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzyl)imino]-5-methylidene-1,3-thiazolidine 194**



194

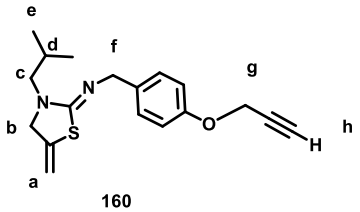
General procedure A was followed from *N*-methylprop-2-ynamine (8.9 mg, 0.13 mmol, 1 equiv.), alkynyl glucosinolate **49** (32 mg, 0.064 mmol, 1 equiv.), 100 µL (1 U_E) of myrosinase solution in phosphate buffer (3.2 mL) during 5h. The desired product was obtained as a yellow oil (12 mg, 70%).

R_f = 0.3 (PE/AE : 60/40).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7.27 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.92 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.24 - 5.22 (m, 1H, H_a), 5.16 - 514 (m, 1H, $H_{a'}$), 4.67 (d, ^3J = 2.4 Hz, 1H, H_f), 4.33 (s, 2H, H_d), 4.16 (t, ^3J = 2.1 Hz, 2H, H_b), 2.97 (s, 3H, CH_3), 2.50 (t, ^3J = 2.4 Hz, 1H, H_g).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 156.5 (C=N), 137.7 (Cq $_{Ar}$), 134.2 (Cq C=C), 134.0 (Cq $_{Ar}$), 128.7, 114.9 (CH $_{Ar}$), 105.9 (=CH_2), 78.9 (Cq alkyne), 75.4 (C-g), 58.1 (CH_2N or CH_2Bn), (58.0 CH_2Bn or CH_2N) 56.1 (CH_2O), 33.3 (CH_3).

***(Z)*-3-*N*-isobutyl 3-[(4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzyl)imino]-5-methylidene-1,3-thiazolidine 160**



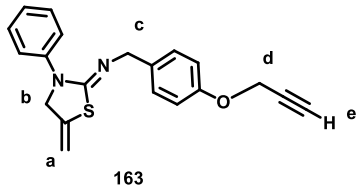
160

General procedure A was followed with (isobutyl)(prop-2-yn-1-yl)-hydrochloride (45 mg, 0.3 mmol, 3 equiv.), alkynyl glucosinolate **49** (51 mg, 0.1 mmol, 1 equiv.), 270 µL (2.7 U_E) of myrosinase solution, in an ammonium acetate solution during 24h. The desired product was obtained as a yellowish oil (17 mg, 53%).

R_f = 0.4 (PE/AE : 60/40).

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7.30 - 7.18 (m, 2H, H_{Ar}), 6.91 (d, ^3J = 8.8 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.23 - 5.18 (m, 1H, H_a), 5.16 - 5.10 (m, 1H, $H_{a'}$), 4.67 (d, ^3J = 2.4 Hz, 2H, H_g), 4.34 (s, 2H, H_f), 4.19 (t, ^3J = 2.2 Hz, 2H, H_b), 3.26 (d, ^3J = 7.6 Hz, 2H, H_c).

***(Z)*-3-*N*-phenyl-3-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzyl)imino]-5-methylidene-1,3-thiazolidine 163**



163

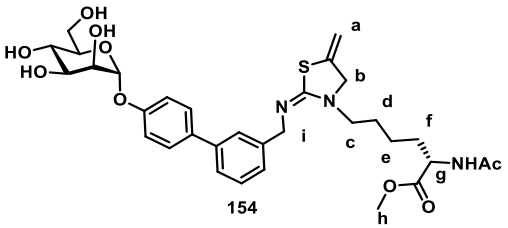
General procedure A was followed with *N*-(prop-2-yn-1-yl)aniline (40 mg, 0.3 mmol, 3 equiv.), alkynyl glucosinolate **X** (51 mg, 0.1 mmol, 1 equiv.), 270 µL (2.7 U_E) of myrosinase solution, in an ammonium acetate solution during 24h. The desired product was obtained as a yellowish oil (28 mg, 82%).

R_f = 0.4 (PE/AE : 60/40).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.60 - 7.55 (m, 2H, H_{Ar}), 7.39 - 7.22 (m, 4H, H_{Ar}), 7.11 - 7.06 (m, 1H, H_{Ar}), 6.93 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.31 - 5.29(m, 1H, H_a), 5.20 - 5.18 (m, 1H, $H_{a'}$), 4.68 - 4.65 (m, 4H, H_d, H_b), 4.42 (s, 2H, H_c), 2.50 (t, ^3J = 2.4 Hz, 1H, H_e).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 156.5, 154.3, 141.2, 136.4, 133.7 (Cq), 128.9, 128.6 (CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 122.1, 114.9 (CH_{Ar}), 105.8 (=CH_2), 78.9 (Cq alkyne), 75.5 (≡CH), 58.7 (CH_2-Ar), 57.3, 56.0 (CH_2N, CH_2O).

Methyl (2S)-2-acetamido-6-[(2Z)-2-[({4'- α-D-mannopyranosyloxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl}methyl)imino]-5-methylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]hexanoate 154



154

General procedure A was followed with N-methylprop-2-yn-1-amine methyl acetyl-L-lysinate (10 mg, 0.43 mmol, 1 equiv.), glucosinolate **20** (30 mg, 0.043 mmol, 1 equiv.), 67 µL (0.67 U_E) of myrosinase solution in phosphate buffer during 24h. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the desired product as a colorless oil (10 mg, 36%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

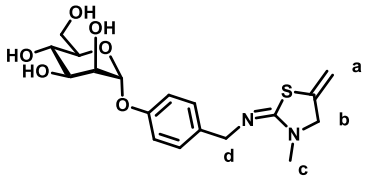
$[\alpha]_D^{20}$= + 5.8 (*c* = 0.3 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.56 - 7.40 (massif, 4H, H_{Ar}), 7.35 (t, ^3J = 7.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.18 - 7.12 (m, 3H, H_{Ar}), 5.53 (d, ^3J = 1.7 Hz, 1H, H_1), 5.34 - 5.28 (m, 1H, H_a), 5.22 - 5.15 (m, 1H, $H_{a'}$), 4.40 (s, 2H, CH_2Bn), 4.36 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^3J = 5.3 Hz, 1H, H_g), 4.30 (t, ^3J = 2.0 Hz, 1H, H_b), 4.03 (dd, $^3J_{2-3}$ = 3.4 Hz, $^3J_{2-1}$ = 1.8 Hz, 1H, H_2), 3.93 (dd,$^3J_{3-4}$= 9.4 Hz, $^3J_{3-2}$= 3.4 Hz, 1H, H_3), 3.82 - 3.70 (m, 3H, H_4, H_6), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.58 (ddd, $^3J_{5-4}$ = 9.8 Hz, $^3J_{5-6}$ = 5.0 Hz, $^3J_{5-6}$ = 2.6 Hz, 1H, H_5), 3.43 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H_c), 1.95 (s, 3H, $CH_{3\,Ac}$), 1.89 - 1.77 (m, 1H, H_f), 1.75 - 1.59 (m, 3H, $H_{f'}$, H_d), 1.45 - 1.34 (m, 2H, H_e).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 172.8, 172.0 (C=O), 159.2 (C=N), 156.1, 141.0, 140.6 (Cq $_{Ar}$), 137.2, 135.3 (Cq), 128.4, 127.6, 125.6, 125.3, 124.7, 116.7 (CH $_{Ar}$), 104.9 (=CH_2), 98.8 (C-1), 74.0 (C-5), 71.0 (C-3), 70.6 (C-2), 67.0 (C-4), 61.3 (C-6), 58.0 CH_2Bn), 55.9 (CH_2N), 52.3 (C-g), 51.2 (OCH_3), 45.2 (C-c), 30.8, 25.9, 22.7 (CH_2), 20.9 (CH_3 Ac).

HRMS (ESI$^+$): *m/z* calculated for $C_{32}H_{42}N_3O_9S$ ([M+H]$^+$): 644.2636, found 644.2637.

***(Z)-N*-methyl-2-[(4-α-D-mannopyranosyloxybenzyl)imino]-5-methylidene-1,3-thiazolidine 152**



152

General procedure A was followed with *N*-methylprop-2-yn-1-amine (10 mg, 0.32 mmol, 2 equiv.), glucosinolate **17** (20 mg, 0.064 mmol, 1 equiv.), 67 µL (0.67 U_E) of myrosinase solution in phosphate buffer during 24h. The crude product was finally purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the desired product as a colorless oil (9 mg, 70%).

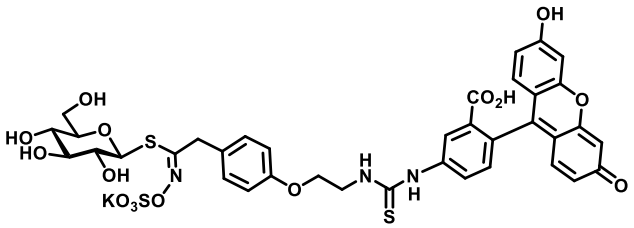
R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 13.7 (*c* = 0.2 in MeOH).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 7.21 (d, ^3J = 8.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.06 (d, ^3J = 8.7 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.45 (d, ^3J = 1.8 Hz, 1H, H_1), 5.32 - 5.31 (m, 1H, H_a), 5.20 - 5.18 (m, 1H, $H_{a'}$), 4.29 (s, 2H, H_d), 4.26 (t, ^3J = 2.2 Hz, 2H, H_b), 3.99 (dd, $^3J_{2-3}$ = 3.4 Hz, $^3J_{2-1}$ = 1.8 Hz, 1H, H_2), 3.89 (dd, $^3J_{3-4}$ = 9.4 Hz, $^3J_{3-2}$ = 3.4 Hz, 1H, H_3), 3.78 - 3.68 (m, 3H, H_4, H_{6a}, H_{6b}), 3.60 (ddd, $^3J_{5-4}$ = 9.8 Hz, $^3J_{5-6}$ = 4.7 Hz, $^3J_{5-6}$ = 2.9 Hz, 1H, H_5), 2.93 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 161.4 (C=N), 156.9 (Cq $_{Ar}$), 138.5 (Cq C=C), 135.5 (Cq $_{Ar}$), 129.7 (CH $_{Ar}$), 117.7 (CH $_{Ar}$), 106.4 (=CH_2), 100.3 (C-1), 75.3 (C-5), 72.4 (C-3), 72.0 (C-2), 68.4 (C-4), 62.6 (C-6), 59.3 (CH_2N or CH_2O), 58.8 (CH_2O or CH_2N), 33.4 (CH_3).

(Z)-S-(β-D-glucopyranosyl)-2-(4-{2-[(fluoresceinylcarbamothioyl)amino]ethoxy}phenyl)acetothiohydroximate sulfate potassium salt



106

To a solution of azido-glucosinolate **47** (10 mg, 0.019 mmol, 1 equiv.) dissolved in MeOH (100 µL), triphenylphophine (5.4 mg, 0.021 mmol, 1.1 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, and then quenched with water (1 mL). A precipitate was formed corresponding to

the by-product triphenylphosphine oxide. The mixture was washed with EA 3 times, then the water phase was evaporated under reduced pressure to afford the crude glucosinolate amine **105**.

Fluorescein isothiocyanate (88 mg, 0.22 mmol, 1 equiv.) was added to a solution of glucosinolate amino **105** (114 mg, 0.22 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (30 mL). The solution was stirred at rt 18h, then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the desired product **106** as a red resin (135 mg, 66%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$ = + 2.8 (*c* = 0.7 in MeOH).

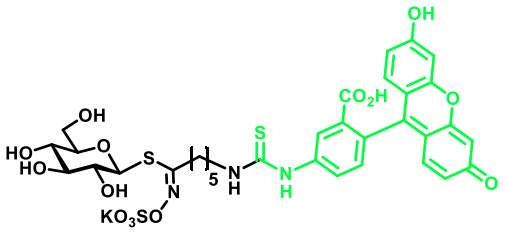
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm) = 10.04 (s, 1H, H_{Ar}), 8.34 - 8.26 (m, 1H, H_{Ar}), 7.77 - 7.72 (m, 1H, H_{Ar}), 7.25 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.18 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.00 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.69 - 6.55 (m, 5H, H_{Ar}), 4.35 (d, ^3J = 9.3 Hz, 1H, H_1), 4.21 - 4.17 (m, 2H), 4.08 (d, ^3J = 15.8 Hz, 2H), 3.99 - 3.72 (m, 13H), 3.41 (dd, ^3J = 12.0 Hz, ^3J = 6.8 Hz, 1H), 3.15 (ddd, ^3J = 8.9 Hz, ^3J = 6.8 Hz, ^3J = 1.8 Hz, 1H), 3.06 - 3.01 (m, 1H), 3.00 - 2.94 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ (ppm) = 181.5, 169.3, 160.4, 158.0, 155.9, 152.7, 142.1, 130.0, 129.9, 129.5, 127.3, 124.9, 117.4, 115.4, 113.5, 110.6, 103.0, 82.2, 78.8, 73.6, 70.6, 66.4, 61.8, 44.2, 37.8.

IR (neat) ν = 3415 (OH), 1232 (S=O), 1581 (C=C),1116 (C-OH), 723, 690 (C_{sp2}-H $_{Ar}$) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{37}H_{34}N_4O_{15}S_3$ ([M]$^-$): 856.1157, found 856.1151.

(Z)-S-(β-D-glucopyranosyl) 6-[(fluoresceinylcarbamothioyl)amino]hexanothiohydroximate *O*-sulfate potassium salt 107



107

Triphenylphophine (112 mg, 0.43 mmol, 2 equiv.) was added to a solution of pentyl azido glucosinolate **52** (100 mg, 0.21 mmol, 1 equiv.) in a THF/Water (9/1) mixture (2.1 mL). The solution was stirred 5h at 50°C, then fluorescein isothiocyanate (83 mg, 0.21 mmol, 1 equiv.) in DMSO (200µL) was added and the mixture was stirred at room temperature for further 20h.

Afterwards the solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the desired product 107 as a red resin (100 mg, 56%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 20.2 (*c* = 0.45 in MeOH).

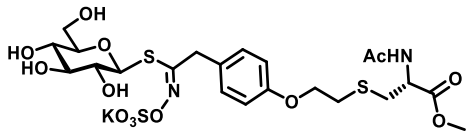
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 8.15 (s, 1H, H_{Ar}), 7.90 - 7.72 (m, 2H, H_{Ar}), 7.17 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.01 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.68 - 6.58 (m, 5H, H_{Ar}), 4.90 - 4.88 (m, 1H, H_1), 3.90 - 3.81 (m, 1H, H_{6a}), 3.72 - 3.57 (m, 3H, H_{6b}), 3.43 (t, ^3J = 8.7 Hz, 1H, H_3), 3.40 - 3.29 (m, 6H), 3.26 (t, ^3J = 9.2 Hz, 1H, H_2), 2.77 (q, ^3J = 7.3 Hz, 2H, $CH_{2\ pent}$), 2.70 - 2.61 (m, 1H), 1.82 (quint, ^3J = 7.4 Hz, 2H, $CH_{2\ pent}$), 1.73 (quint, ^3J = 7.3 Hz, 2H, $CH_{2\ pent}$), 1.55 (quint, ^3J = 7.4 Hz, 2H, $CH_{2\ pent}$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 161.9, 157.2, 142.0, 136.3, 134.8, 134.7 (Cq), 131.8, 131.3, 131.2, 114.0, 103.8 (C_{Ar}), 83.6 (C-1), 82.2, 79.5 (C-3), 74.2 (C-2), 71.2, 62.7 (C-6), 33.2, 29.2, 27.5, 26.9 ($CH_{2\ pent}$).

IR (neat) ν = 3223 (OH), 1198 (S=O), 1565 (C=C),1103 (C-OH), 684 (C_{sp2}-H $_{Ar}$) cm^{-1}.

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{33}H_{34}N_3O_{14}S_3$ ([M]$^-$): 792.1208, found 792.1210.

(Z)-*S*-(β-D-Glucopyranosyl)-2-(4-{2-[(2S)-(2-acetamido-3-methoxy-3-oxopropanesulfanyl]ethoxy}phenyl)acetothiohydroximate-*N,O*-sulfate potassium salt 112



112

Potassium carbonate (14 mg, 0.1 mmol, 3 equiv.) was added to a solution of methyl acetyl-L-cysteine (18 mg, 0.1 mmol, 3 equiv.) and bromide glucosinolate **50** (20 mg, 0.035 mmol, 3 equiv.) in anhydrous DMF (500 µL).

The reaction mixture was stirred at room temperature for 18h then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified using Reveleris® column chromatography on C-18 reverse phase (H_2O/MeOH: 100/0 to 0/100) to give the glucosinolate 112 as a colorless resin (13 mg, 56%).

R_f = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

$[\alpha]_D^{20}$= + 11.9 (*c* = 0.3 in MeOH).

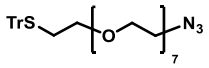
^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) = 7.29 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.97 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.69 - 4.58 (m, 2H, H_α, H_5), 4.20 (t, ^3J = 5.8 Hz, 1H, CH_2O), 4.03 (t, ^3J = 5.8 Hz, 2H,CH_2S), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.59 (d, ^3J = 3.4 Hz, 2H, CH_2CN), 3.38 - 3.26 (m, 3H,H_{6a}, H_{6b}, H_β), 3.20 - 3.08 (m, 2H,H_1, H_2), 3.01 - 2.88 (m, 3H, H_3, H_4, H_β), 1.97 (s, 3H, CH_3Ac).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ (ppm) = 174.3, 172.8 (C=O), 162.8 (C=N), 157.2 (Cq_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 128.0 (Cq_{Ar}), 115.5 (CH_{Ar}), 81.4 (C-α), 79.9 (C-1), 77.0, 71.8, 68.8, 67.8 (CH_2O), 60.3 (CH_2S), 53.2 (OCH_3), 52.7 (C-5), 37.5 (CH_2CN), 32.8 (C-β), 31.0 (C-6), 21.6 (CH_3 Ac).

IR (neat) ν = 3129 (OH), 1735, 1689 (C=C), 1384 (S=O), 846 (C_{sp2}-H) cm^{-1}.

MS (ESI$^-$): *m/z* found for $C_{22}H_{31}N_2O_{13}S_3$ ([M]$^-$) : 627.8.

25-azido-1,1,1-triphenyl-5,8,11,14,17,20,23- heptaoxa-2-thiapentacosane 114



114

NaH (60% in mineral oil; 25 mg, 0.43 mmol, 2 equiv.) was slowly added to a solution of tetraethylene glycol monotrityl thioether (110 mg, 0.24 mmol, 1.1 equiv.) **120** in anhydrous (THF 7.5 mL) at 0°C, the mixture was stirred for 30 min. Afterwards, a solution of tetraethylene glycol tosyl azido **119 (**80 mg, 0.21 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (7.5 mL) was added dropwise to the previous mixture. The resulting solution was stirred at rt 18h, then at 85°C for further 24h.

The reaction mixture was diluted with EA and quenched by the addition of a saturated solution of NH_4Cl, then the aqueus phase was extracted twice with EA. The organic phases were collected and dried over $MgSO_4$,the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA 100/0 to 0/100) to give the desired compound as a yellow gel (74 mg, 53%).

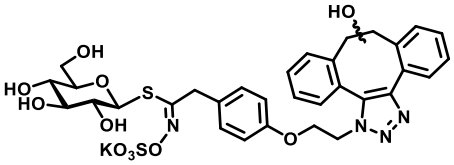
***R**f* = 0.1 (PE/EA : 50/50).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 7.43 (d, ^3J = 7.3 Hz, 6H, H_{Ar}), 7.32 - 7.19 (m, 9H, H_{Ar}), 3.71 - 3.64 (m, 20H, CH_2), 3.60 - 3.55 (m, 2H, CH_2), 3.50 - 3.44 (m, 2H, CH_2), 3.40 (t,^3J = 5.1 Hz, 2H, CH_2), 3.32 (t, ^3J = 6.9 Hz, 2H, CH_2), 2.45 (t, ^3J = 6.9 Hz, 2H, CH_2), 1.69 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 144.8 (Cq_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 126.6 (Cq_{Ar}), 70.7, 70.7, 70.6, 70.58, 70.4, 70.2, 70.0, 69.6, 66.6, 50.7, 31.6 (CH_2).

MS (ESI$^+$): *m/z* found for $C_{35}H_{47}NaN_3O_7S$ ([M+Na]$^+$) : 676.30.

***(Z)-S*-(β-D-glucopyranosyl)-2-[4-(1-*N*- 8,9-dihydro-1l2-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-d]- ol -[1,2,3]triazole)phenyl]acetothiohydroximate -*N,O*- sulfate potassium salt 102**



102

DIBO (14 mg, 0.062 mmol, 1.1 equiv.) was added to a solution of azido glucosinolate **47** (30 mg, 0.056 mmol, 1 equiv.) in anhydrous MeOH (5.6 mL). The mixture was stirred at 50°C for 5h. Then the solvent was evaporated, the residu was taken up with distilled water and washed twice with DCM. The water was evaporated under reduced pressure to afford the crude glucosinolate, mixture of diastereoisomeres as a yellow resin. Conversion 93%

***R**f* = 0.1 (EA/MeOH : 80/20).

HRMS (ESI$^-$): *m/z* calculated for $C_{32}H_{33}N_4O_{11}S_2$ ([M]$^-$): 713.1593, found 713.1584.

Bioconjugation of isothiocyanates using the MG system

Buffers and solutions.
pH 7 to 8: phosphate buffer (KH_2PO_4/K_2HPO_4), *I* = 33 mM.
pH 9 to 10: carbonate buffer ($KHCO_3/K_2CO_3$), *I* = 33 mM**.**
For the reaction followed by LC-MS the phosphate buffer pH 7 was replaced by $AcONH_4$, 33 mM.

All buffers, myrosinase and proteins (BSA and ConA) solution was mabe by using purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 MΩ cm).

General procedure for the bioconjugation of proteins with the MG system.

A 10 U/mL Myrosinase was added to a solution of glucosinolate and protein in the appropriate buffer. The solution was shaken with a thermomixer during 24h at 37 °C. After this period the solution was frozen at -78°C and stored at -18°C ready to the further analysis or purifications.

The amount of myrosinase, glucosinolate and BSA necessary for a reaction are showed in the following tables.

Tableau 19 : BSA fonctionalisation with orthogonals GLs.

Entry	GL	BSA (mg/mL)	GL (equiv.)	pH	U_E /µmol [a]	ligations [b]
1	47	1	80	9	0.5	13
2	49	5	160	9	0.5	9

[a] U_E per µmol of GL ; [b] number of ligation on the BSA calculated from the average mass obtained by a MALDI-Tof/MS analysis.

Tableau 20 : BSA functionalization with mannoside GL 20.

Entrée	BSA (mg/mL)	pH	GL (equiv.)	U_E /µmol [a]	ligations [b]
1	10	9	80	0.5	0
2	5	9	160	0.25	11
3	2	9	80	0.5	20
4	1	9	80	0.5	20
5	1	9	80	0.25	29
6	1	9	160	0.25	19
7	1	9	120	0.5	25
8	1	9.5	80	0.5	28
9	1	9.5	120	0.5	23

[a] U_E per µmol of GL ; [b] number of ligation on the BSA calculated from the average mass obtained by a MALDI-Tof/MS analysis.

Tableau 21 : BSA functionalization with supported-Myrosinase and GL 20.

Entry	GL (equiv.)	U_E /µmol [a]	ligations [b]
1	80	0.25	14
2	120	0.25	15
3	80	0.5	12
4	120	0.5	9

1 mg /mL of BSA ; pH 9 [a] U_E per µmol of GL ; [b] number of ligation on the BSA calculated from the average mass obtained by a Maldi-TOF/MS analysis.

Tableau 22 : site selective ligation of the Con A with GL 95.

Entry	GLs éq.	[GL] (µM)	pH	Ligations per protéine [a]	Protéine majoritaire [b]
1	17	680	7.4	1 à 2	1 ligation
2	17	680	9	1 à 4	2 ligations
3	1	39	7.4	1	1 ligation
4	1	39	9	1 à 2	1 ligation

[a] number of ligations of isothiocyanate per protein, obtained by a Maldi-TOF/MS analysis of the reactional mixture; [b] majoritary species present in the mixture, observed from the Mass spectra.

Detailed reaction of entry 5 Tableau 20

15 µL of a Myrosinase solution (10 U_E/mL) were added to a solution of GL 20 (0.42 mg, 0.6 µmol, 80 equiv.) and BSA (0.5 mg) in 485 µL of carbonate buffer. The solution was shaken with a thermomixer during 24h at 37 °C.

Detailed reaction of entry 2 Tableau 21

94 µL of a settled sepharose-Myrosinase solution were added to a solution of GL 20 (0.42 mg, 0.6 µmol, 80 equiv.) and BSA (0.5 mg) in 405 µL of carbonate buffer. The solution was shaken with a thermomixer during 24h at 37 °C.

** The necessary amount of supported myrosinase was measured by volume of settled solution of sepharose-myrosinase gel. The volume of sepharose-myrosinase gel have been calculated considering that 3.36 mg of commercial myrosinase (480 U_E) have been fixed on 1 mL of sepharose gel.*

Both the proteins products were analyzed by Maldi-Tof Ms. TheHRMS analysis of the ConA gave a positive response.

Tryptic and Chemotryptic in gel digestion.

All the samples digested were previously purified by SDS-PAGE electrophoresis chromatography, then the procedure provided by ThermoFisher® for the In-Gel Digestion Kit was followed. After the digestion, the samples were analyzed by HRMS.

Gold Nanoparticles-GL study

Materials

3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS, $C_6H_{11}NH(CH_2)_3SO_3H$, purity ≥ 98 %), glacial acetic acid (AcOH, CH_3CO_2H, purity ≥ 99.99 %), gold nanoparticules (20 nm of diameter, OD1, stabilized suspension in citrate buffer, MW 196.97g/mol), L-histidine (L-His, $C_6H_9N_3O_2$, purity ≥ 99.5 %), potassium phosphate dibasic trihydrate ($K_2HPO_4.3H_2O$, purity ≥ 99.0 %), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4, purity ≥ 99.0 %), sodium dodecyl sulfate (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, purity ≥ 98.5 %), sodium hydroxide (NaOH, purity ≥ 98 %), sodium sulfate (Na_2SO_4, purity ≥ 99.0%), sodium tetraborate ($B_4Na_2O_7$, purity ≥ 99%), (−)-sinigrin hydrate ($C_{10}H_{16}NO_9S_2$·K·xH2O, ≥ 99.0 %) and thioglucosidase from Sinapis alba (white mustard seed (myrosinase, EC 3.2.1.147, 25 U, ≥100 units.g-1) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Bidistilled 18 MΩ-cm water with a Milli-Q system. All chemicals were used as received. All product bottles were placed in tightly closed plastic bags to preserve them from aerosol contaminations and then stored at 4°C.

Equipment and operating conditions

Experiments were carried out on an HP3DCE electrophoretic system (Agilent, Waldbronn, Germany). Agilent software 3D-CE Chemstation (rev B.04.02) was used to pilot the CE. The HP3DCE was equipped with an on-capillary TraceDec capacitively coupled contactless conductivity detector (C4D) (Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof, Austria). The following parameters were fixed for the C4D: frequency medium; voltage 0 dB; gain 100 %; offset 130; filter: frequency 1/3 and cut-off 0.05. The detection signal was acquired with the Tracemon software (Istech, version 0.07a).

CE analyses were performed in an uncoated fused-silica capillary of 33 and 40 cm total length and 50 µm i.d., purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The effective detection length to the C4D in short-end injection was 19 cm. New capillaries were conditioned by performing the following rinses: 1 M NaOH (15 min), water (5 min) and BGE (10 min) for equilibration before analyses. Between runs, the capillary was only rinsed with the BGE for 3 min. All rinse cycles were carried out at about 950 mbar. At the end of each working-day, the capillary was rinsed for 10 min with water before storing it over night.

Polypropylene flasks, containers, CE vials and polyethylene olefin snap caps were used since they have little extractable material unlike glass. To avoid any inadvertent contamination, nitrile – powder free – gloves were worn during solution preparation and sample handling. To ensure good-quality cleaning, all volumetric equipment, vials and snap caps were rinsed with water (18 MΩ-cm), and then soaked in water for an overnight period.

Solutions

All solutions were prepared with ultra-pure bidistilled water, filtered through a 0.45 µm polyvinylidenedifluoride (PVDF) Millex-HV Syringe Filter (Millipore, Molsheim, France) before use and stored at 4° C when not in use these filters do not introduce significant amounts of inorganic impurities (e.g. chloride and sulfate) into solutions, especially into sample solutions. Phosphate buffer (KH_2PO_4/K_2HPO_4) was used as an incubation buffer at an ionic strength (I) of 33.1 mM. Its pH was fixed at 7.0 to be at the optimum pH value for the myrosinase to be active [6]. For electrophoretic separation, the background electrolyte was His/AcOH (I = 40 mM; pH 4.2). It was degassed by ultra-sonication before use. The BGE solution in the separation vials was changed every three runs. The ionic composition and parameters of these buffers were given by Phoebus software (Analis, Namur, Belgium). Their pH was

measured with a MeterLab PHM201 Portable pH-Meter (Radiometer Analytical, Villeurbanne, France). Stock solutions of each glucosinolate substrate, of the product SO_4^{2-} (100 mM) and of the enzyme myrosinase (0.5 U.mL-1) solution were prepared by dissolving the appropriate quantity of salt – accurately weighed – in the incubation phosphate buffer. Working solutions were prepared by appropriate dilution of the corresponding stock solution in the incubation buffer. Substrates must be used at large excess compared to enzyme (about 100 times). For this, myrosinase was used at 0.05 U.mL-1 for all enzymatic assays.

The response function of the C4D detector was examined by plotting the relative corrected-peak areas versus SO_4^{2-} concentrations. The calibration curve was performed over the concentration range 0.015–15 mM SO_4^{2-}. Three independent determinations were performed at each concentration. Repeatability was expressed as relative standard deviation (RSD) on the migration times and the corrected-peak areas. Corrected-peak area (CPA) represents peak area corrected for migration time. In fact, in CE any fluctuation in migration time will cause error in peak area determination unless this latter is normalized for migration time.

Preparation of the functionalized NP: 40 µL of aqueous solution of thiol GL (10 mM) was added to 210 µL of commercial NP stabilized in citrate buffer. After 18h at room temperature, the solution was centrifuged at 10000 RPM during 20 min at 10 °C in order to settle the NPs and discard the supernatant that main contain free GL-SH. The residue of NP-GL was suspended in water (250 µL) and the centrifuged again. This process was repeated twice. The cleaned functionalized NP were suspended in 210 µL of incubation buffer.

Enzymatic assays: pre-capillary electrophoresis

Myrosinase catalyzes the hydrolysis of glucosinolates (GLS) – free or immobilized on the NPs - to isothiocyanate (ITC), glucose and sulfate. The myrosinase activity was determined by following the hydrolysis of the glucosinolate substrate. The SO_4^{2-} produced was detected by the C4D and quantified. Unless otherwise stated, the reaction mixture was of 11 µL volume. It was done in a micro-vial of the CE instrument auto-sampler. It contained the myrosinase (0.05 U.mL-1) and its substrate at different concentrations in the incubation phosphate buffer (pH 7.0). The incubation time must be fixed so that the substrate conversion does not exceed 10 %. Unless otherwise stated, the mixture was incubated for 10 min at 37 ± 1 °C. The reaction was stopped by heating the mixture with a sand bath at 125 °C ± 5 °C for 5 min. The reaction mixture was then injected into the capillary at the cathode (short-end injection) by applying a pressure of -50 mbar for 10 s (24.6 nL). The electrophoretic separation was performed at 25 °C under +20 kV in the His/AcOH buffer.

A blank reaction was conducted according to the same procedure without adding the myrosinase. Moreover, it is important to note that the solutions used to assess the calibration curve for SO_4^{2-} underwent the same treatments in order to avoid any error due to evaporation in the sand bath.

BIBLIOGRAPHIE

1. V. H. Zahn, J. Meienhofer, *Makromol. Chem.* **1958**, *26*, 153–166.
2. (a) H. M. O'Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488–494. (b) C. A. Royer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784. (c) M. Dumont, A. Lehner, B. Vauzeilles, J. Malassis, A. Marchant, K. Smyth, B. Linclau, A. Baron, J. M. Pons, C. T. Anderson, et al., *Plant J.* **2016**, *85*, 437–447.
3. F. M. Veronese, P. Caliceti, in *Tumor Target. Cancer Ther.* (Ed.: M. Pagé), Humana Press, Totowa, NJ, **2002**, pp. 411–429.
4. J. F. DiJoseph, *Blood* **2004**, *103*, 1807–1814.
5. C. R. Middaugh, R. Pearlman, in *Nov. Ther. Mod. Biotechnol. Lab. Hum. Test.* (Eds.: D.L. Oxender, L.E. Post), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1999**, pp. 33–58.
6. (a) W. B. Geho, H. C. Geho, J. R. Lau, T. J. Gana, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2009**, *3*, 1451–1459. (b) Y. Shechter, M. Mironchik, A. Saul, E. Gershonov, L. Precido-Patt, K. Sasson, H. Tsubery, B. Mester, A. Kapitkovsky, S. Rubinraut, et al., *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 105–117.
7. F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1451–1458.
8. D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163.
9. J. Escorihuela, M.-J. Bañuls, S. Grijalvo, R. Eritja, R. Puchades, Á. Maquieira, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 618–627.
10. T. Palai, A. Kumar, P. K. Bhattacharya, *Mater. Today Proc.* **2016**, *3*, 3568–3586.
11. L. S. Witus, M. B. Francis, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 774–783.
12. Hermanson,G.T., *Bioconjugate Techniques, Second Edition, (Academic Press 2008)*.
13. C. B. Rosen, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 697–705.
14. O. Koniev, A. Wagner, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5495–5551.
15. G. D. Fasman, *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Springer US, **1989**.
16. D. G. Isom, C. A. Castañeda, B. R. Cannon, B. García-Moreno E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 5260–5265.
17. F. H. Westheimer, D. E. Schmidt, *Biochemistry* **1971**, *10*, 1249–1253.
18. *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions. Concepts and Applications. 2 Volumes. Edited by J. Rademann, W. Russ Algar, Philip Dawson, and Igor L. Medintz.*, **2018**.
19. (a)O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174–2195. (b) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
20. D. Podhradský, Ľ. Drobnica, P. Kristian, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1977**, *42*, 384–389.
21. J. L. Riggs, R. J. Seiwald, J. H. Burckhalter, C. M. Downs, T. G. Metcalf, *Am. J. Pathol.* **1958**, *34*, 1081–1097.
22. Coons A H, Creech H J, Jhones R N, Berliner G, *J Immunol.* **1942**, *45*, 159–70.
23. (a) J. Tuls, L. Geren, F. Millett, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16421–16425. (b) L. D. Burtnick, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *791*, 57–62. (c) M. Miki, C. G. dos Remedios, J. A. Barden, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 339–345.
24. T. M. Rana, C. F. Meares, *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 357–362.
25. (a) C. Quétard, S. Bourgerie, N. Normand-Sdiqui, R. Mayer, G. Strecker, P. Midoux, A.-C. Roche, M. Monsigny, *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 268–276. (b) D. F. Smith, D. A. Zopf, V. Ginsburg, in *Methods Enzymol.*, Academic Press, **1978**, pp. 169–171. (c) S. Y. Wong, I. D. Manger, G. R. Guile, T. W. Rademacher, R. A. Dwek, *Biochem. J.* **1993**, *296*, 817–825.

26. N. Masutomi, K. Toyoda, M. Shibutani, N. Niho, C. Uneyama, N. Takahashi, M. Hirose, *Toxicol. Pathol.* **2001**, *29*, 617–622.
27. (a) H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensen, U. Boas, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117–3119. (b) R. Wong, S. J. Dolman, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3969–3971. (c) N. Sun, B. Li, J. Shao, W. Mo, B. Hu, Z. Shen, X. Hu, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 61–70.
28. J. S. Nanda, J. R. Lorsch, in *Methods Enzymol.* (Ed.: J. Lorsch), Academic Press, **2014**, pp. 87–94.
29. (a) C. Gu, D. A. Shannon, T. Colby, Z. Wang, M. Shabab, S. Kumari, J. G. Villamor, C. J. McLaughlin, E. Weerapana, M. Kaiser, et al., *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 541–548. (b) E. C. Hett, H. Xu, K. F. Geoghegan, A. Gopalsamy, R. E. Kyne, C. A. Menard, A. Narayanan, M. D. Parikh, S. Liu, L. Roberts, et al., *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1094–1098
30. Q. Wang, Z. Guo, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 373–378. (b) Y. Pan, P. Chefalo, N. Nagy, C. Harding, Z. Guo, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 875–883
31. J. M. McFarland, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490–13491.
32. O. M. T. Pearce, K. D. Fisher, J. Humphries, L. W. Seymour, A. Smith, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1057–1061.
33. M. A. Robinson, S. T. Charlton, P. Garnier, X. Wang, S. S. Davis, A. C. Perkins, M. Frier, R. Duncan, T. J. Savage, D. A. Wyatt, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 14527–14532.
34. K. Tanaka, K. Fukase, S. Katsumura, *Chem. Rec.* **2010**, *10*, 119–139.
35. P. M. S. D. Cal, J. B. Vicente, E. Pires, A. V. Coelho, L. F. Veiros, C. Cordeiro, P. M. P. Gois, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10299–10305.
36. P. M. S. D. Cal, R. F. M. Frade, V. Chudasama, C. Cordeiro, S. Caddick, P. M. P. Gois, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5261–5263.
37. S. Diethelm, M. A. Schafroth, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3908–3911.
38. M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, A. Guerreiro, P. M. S. D. Cal, J. Bertoldo, M. Maneiro, E. Perkins, J. Howard, M. J. Deery, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4004–4017.
39. J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
40. J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
41. J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 16793–16797.
42. (a) G. E. Ravilious, J. M. Jez, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1138. (b) T. Liu, X. Zhang, H. Yang, N. Agerbirk, Y. Qiu, H. Wang, D. Shen, J. Song, X. Li, *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*. (c) L. M. Jensen, B. A. Halkier, M. Burow, *Biol. Chem.* **2014**, *395*.
43. N. Agerbirk, C. E. Olsen, *Phytochemistry* **2012**, *77*, 16–45.
44. J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, P. Talalay, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5–51.
45. L. Latxague, C. Gardrat, J. L. Coustille, M. C. Viaud, P. Rollin, *J. Chromatogr. A* **1991**, *586*, 166–170.
46. R. F. Mithen, M. Dekker, R. Verkerk, S. Rabot, I. T. Johnson, *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 967–984.
47. G. R. Fenwick, R. K. Heaney, W. J. Mullin, C. H. VanEtten, *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, *18*, 123–201.
48. M. Benn, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 197–210.
49. J.-C. Kuchernig, A. Backenköhler, M. Lübbecke, M. Burow, U. Wittstock, *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1699–1709.
50. (a) S. Textor, J. Gershenzon, *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 149–170. (b) B. A. Halkier, J. Gershenzon, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 303–333.
51. M. del Carmen Martínez-Ballesta, D. Moreno, M. Carvajal, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 11607–11625.

52. (a) F. A. Razis, A. Arumugam, N. Konsue, in *Fruit Veg. Phytochem.* (Ed.: E.M. Yahia), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2017**, pp. 199–210.
53. S. Petrović, M. Drobac, L. Ušjak, V. Filipović, M. Milenković, M. Niketić, *Ind. Crops Prod.* **2017**, *109*, 398–403.
54. B. Abbaoui, C. R. Lucas, K. M. Riedl, S. K. Clinton, A. Mortazavi, *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, 1800079.
55. M. K. Tripathi, A. S. Mishra, *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *132*, 1–27.
56. T. A. Shapiro, J. W. Fahey, A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, K. K. Stephenson, K. L. Wade, L. Ye, P. Talalay, *Nutr. Cancer* **2006**, *55*, 53–62.
57. P. Rollin, A. Tatibouët, *Comptes Rendus Chim.* **2011**, *14*, 194–210.
58. M. G. Ettlinger, A. J. Lundeen, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1764–1765.
59. Y. Basel, A. Hassner, *Synthesis* **1997**, *1997*, 309–312.
60. D. Cerniauskaite, J. Rousseau, A. Sackus, P. Rollin, A. Tatibouët, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 2293–2300.
61. Jensen, S.R., Kjaer, A., **1971**, *25*, 3891–3893.
62. M. Mavratzotis, S. Cassel, S. Montaut, P. Rollin, *Molecules* **2018**, *23*, 786.
63. Q. V. Vo, C. Trenerry, S. Rochfort, J. Wadeson, C. Leyton, A. B. Hughes, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5945–5954.
64. G. Kumaran, G. H. Kulkarni, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1516–1520.
65. M. H. Benn, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 2393–2397.
66. T. H. Keller, L. J. Yelland, M. H. Benn, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 437–440.
67. J. Waser, W. H. Watson, *Nature* **1963**, *198*, 1297–1298.
68. (a) C. Grundmann, J. M. Dean, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2809–2812. (b) Y.-H. Chiang, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2146–2155.
69. *Organic Chemistry - Second Edition - Jonathan Clayden, Nick Greeves, Stuart Warren - Oxford University Press*.
70. S. E. Cobb, K. F. Morgan, N. P. Botting, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1605–1607.
71. S. Castellano, D. Kuck, M. Viviano, J. Yoo, F. López-Vallejo, P. Conti, L. Tamborini, A. Pinto, J. L. Medina-Franco, G. Sbardella, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7663–7677.
72. G. Cutolo, F. Reise, M. Schuler, R. Nehmé, G. Despras, J. Brekalo, P. Morin, P.-Y. Renard, T. K. Lindhorst, A. Tatibouët, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4900–4913.
73. T. Klein, D. Abgottspon, M. Wittwer, S. Rabbani, J. Herold, X. Jiang, S. Kleeb, C. Lüthi, M. Scharenberg, J. Bezençon, et al., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8627–8641.
74. (a) Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, R. Obermann, W. Nolan, S. A. Wildman, D. Hobbs, T. Ellenberger, C. K. Cusumano, S. J. Hultgren, et al., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4779–4792. (b) Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, E. Chorell, J. M. Crowley, C. K. Cusumano, S. Campbell, J. P. Henderson, S. J. Hultgren, J. W. Janetka, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3945–3959.
75. D. Gueyrard, R. Iori, A. Tatibouët, P. Rollin, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 3657–3664.
76. (a) Bruneau, M. Roche, A. Hamze, J.-D. Brion, M. Alami, S. Messaoudi, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 8375–8379.
77. B. Gairaud, G. R. Lappin, *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 1–3.
78. Z. Liu, Q. Ma, Y. Liu, Q. Wang, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 236–239.
79. K. Oyama, T. Kondo, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 209–212.
80. K. Tadpetch, *Phytochem. Lett.* **2015**, *v. 11*, 5–110.
81. M.-Y. Huang, L. Chen, R. Li, X. Jia, R. Hong, *Chin. J. Chem.* **2014**, *32*, 715–720.

82. J. Hoshino, E.-J. Park, T. P. Kondratyuk, L. Marler, J. M. Pezzuto, R. B. van Breemen, S. Mo, Y. Li, M. Cushman, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5033–5043.
83. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
84. C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075–1101.
85. G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278–308.
86. B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.
87. V. O. Rodionov, S. I. Presolski, S. Gardinier, Y.-H. Lim, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12696–12704.
88. T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
89. N. Maezaki, M. Izumi, S. Yuyama, H. Sawamoto, C. Iwata, T. Tanaka, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7927–7945.
90. N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
91. P. Agarwal, B. J. Beahm, P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11504–11510.
92. P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1821–1826.
93. W. Q. Tian, Y. A. Wang, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4299–4308.
94. (a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010. (b) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
95. P. Hu, T. Feng, C.-C. Yeung, C.-K. Koo, K.-C. Lau, M. H. W. Lam, *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22*, 11537–11542.
96. M. Guinó, K. K. (Mimi) Hii, *Chem Soc Rev* **2007**, *36*, 608–617.
97. J. L. Tymoczko, J. M. Berg, L. Stryer, *Biochemistry: A Short Course*, W.H. Freeman, New York, **2013**.
98. R. Eisenthal, M. J. Danson, D. W. Hough, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 247–249.
99. D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 98–104.
100. Pessina, R. M. Thomas, S. Palmieri, P. L. Luisi, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *280*, 383–389.
101. Hochkoeppler, S. Palmieri, *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 91–96.
102. W. P. Burmeister, S. Cottaz, H. Driguez, R. Iori, S. Palmieri, B. Henrissat, *Structure* **1997**, *5*, 663–676.
103. R. J. Solá, K. Griebenow, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 1223–1245.
104. S. Cottaz, B. Henrissat, H. Driguez, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15256–15259.
105. Besle, X. Brazzolotto, A. Tatibouët, D. Cerniauskaite, E. Gallienne, P. Rollin, W. P. Burmeister, *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, *66*, 152–155.
106. W. P. Burmeister, S. Cottaz, P. Rollin, A. Vasella, B. Henrissat, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39385–39393.
107. R. N. Bennett, G. Kiddle, A. J. Hick, G. W. Dawson, R. M. Wallsgrove, *Plant Cell Environ.* **1996**, *19*, 801–812.
108. R. Nehmé, H. Nehmé, G. Roux, D. Cerniauskaite, P. Morin, P. Rollin, A. Tatibouët, *Anal. Chim. Acta* **2014**, *807*, 153–158.
109. S. Palmieri, O. Leoni, R. Iori, *Anal. Biochem.* **1982**, *123*, 320–324.
110. S. Fayad, P. Morin, R. Nehmé, *J. Chromatogr. A* **2017**, *1529*, 1–28.
111. G. De Nicola, P. Rollin, E. Mazzon, R. Iori, *Molecules* **2014**, *19*, 6975–6986.
112. M. Hernandeztriana, J. Kroll, J. Proll, J. Noack, K. Petzke, *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 322–326.
113. Y. Lim, M. Ong, R. Hewitt, *Synthesis* **2018**, *50*, 1640–1650.

114. J. Kroll, J. Noack, H. Rawel, R. Kroeck, J. Proll, *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 337–345.
115. H. M.-F. Viart, T. S. Larsen, C. Tassone, T. L. Andresen, M. H. Clausen, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7800–7802.
116. R. D. Cummings, R. L. Schnaar, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, et al.), Cold Spring Harbor (NY), **2015**.
117. J. B. Sumner, S. F. Howell, *J. Bacteriol.* **1936**, *32*, 227–237.
118. W. M. Watkins, W. T. J. Morgan, *Nature* **1952**, *169*, 825–826.
119. W. C. Boyd, E. Shapleigh, *Science* **1954**, *119*, 419.
120. Goldstein, IJ; Hughes, RC; Monsigny, M; Osawa, T; Sharon, N., *Nature* **1980**, *285*, 66.
121. Kk. Kumar, Gs. Reddy, B. Reddy, Pc. Shekar, J. Sumanthi, Kl. P. Chandra, *J. Orofac. Sci.* **2012**, *4*, 20.
122. Varki, M. E. Etzler, R. D. Cummings, J. D. Esko, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**.
123. (a) R. Barkai-Golan, D. Mirelman, N. Sharon, *Arch. Microbiol.* **1978**, *116*, 119–121. (b) D. H. Janzen, H. B. Juster, I. E. Liener, *Science* **1976**, *192*, 795–796
124. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 661–677.
125. T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, et al., *Cell* **2000**, *100*, 587–597.
126. P.-Y. Lozach, H. Lortat-Jacob, A. de Lacroix de Lavalette, I. Staropoli, S. Foung, A. Amara, C. Houles, F. Fieschi, O. Schwartz, J.-L. Virelizier, et al., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20358–20366.
127. Tassaneetrithep, T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, et al., *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 823–829.
128. P. Alvarez, F. Lasala, J. Carrillo, O. Muñiz, A. L. Corbí, R. Delgado, *J. Virol.* **2002**, *76*, 6841–6844.
129. M. Colmenares, A. Puig-Kröger, O. M. Pello, A. L. Corbí, L. Rivas, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36766–36769.
130. M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3583–3609.
131. K. A. Redgrove, E. A. McLaughlin, *Front. Immunol.* **2014**, *5*.
132. M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 7–12.
133. G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case, *Microbiology an Introduction*, San Francisco, CA Pearson Benjamin Cummings, **2010**.
134. J. E. Simmering, F. Tang, J. E. Cavanaugh, L. A. Polgreen, P. M. Polgreen, *Open Forum Infect. Dis.* **2017**, *4*.
135. J. D. Schilling, S. J. Hultgren, Int. J. Antimicrob. Agents **2002**, 19, 457–460.
136. M. A. Schembri, M. Givskov, P. Klemm, Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. **2002**, 15.
137. (a) Hahn, P. Wild, U. Hermanns, P. Sebbel, R. Glockshuber, M. Häner, N. Taschner, P. Burkhard, U. Aebi, S. A. Müller, J. Mol. Biol. **2002**, 323, 845–857.
138. S. D. Knight, J. Bouckaert, in Glycosci. Microb. Adhes. (Eds.: T.K. Lindhorst, S. Oscarson), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**, pp. 67–107.
139. G. Capitani, O. Eidam, R. Glockshuber, M. G. Grütter, *Microbes Infect.* **2006**, *8*, 2284–2290.
140. R. Glockshuber, in New Chem. New Oppor. Expand. Protein Universe, WORLD SCIENTIFIC, **2014**, pp. 287–292.
141. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, Science **1999**, 285, 1061–1066.

142. C.-S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, et al., Mol. Microbiol. **2002**, 44, 903–915.
143. J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. D. Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C.-S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, et al., Mol. Microbiol. **2005**, 55, 441–455.
144. Wellens, C. Garofalo, H. Nguyen, N. V. Gerven, R. Slättegård, J.-P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, H. D. Greve, S. Hultgren, et al., PLOS ONE **2008**, 3, e2040.
145. T. Klein, D. Abgottspon, M. Wittwer, S. Rabbani, J. Herold, X. Jiang, S. Kleeb, C. Lüthi, M. Scharenberg, J. Bezençon, et al., J. Med. Chem. **2010**, 53, 8627–8641.
146. Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, R. Obermann, W. Nolan, S. A. Wildman, D. Hobbs, T. Ellenberger, C. K. Cusumano, S. J. Hultgren, et al., J. Med. Chem. **2010**, 53, 4779–4792.
147. N. Firon, S. Ashkenazi, D. Mirelman, I. Ofek, N. Sharon, Infect. Immun. **1987**, 55, 472–476.
148. W. Schönemann, S. Kleeb, P. Dätwyler, O. Schwardt, B. Ernst, Can. J. Chem. **2016**, 94, 909–919.
149. M. Touaibia, A. Wellens, T. C. Shiao, Q. Wang, S. Sirois, J. Bouckaert, R. Roy, ChemMedChem **2007**, 2, 1190–1201. (b) S. G. Gouin, A. Wellens, J. Bouckaert, J. Kovensky, ChemMedChem **2009**, 4, 749–755
150. (a) G. Ercolani, L. Schiaffino, Angew. Chem. Int. Ed. **2011**, 50, 1762–1768. (b) Y. Brissonnet, C. Ortiz Mellet, S. Morandat, M. I. Garcia Moreno, D. Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Šesták, K. El Kirat, S. G. Gouin, J. Am. Chem. Soc. **2013**, 135, 18427–18435.
151. (a) L. Landemarre, P. Cancellieri, E. Duverger, Glycoconj. J. **2013**, 30, 195–203. (b) A. Beck, Ed. , Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals: Methods and Protocols, Humana Press, **2013**
152. M. Hartmann, A. K. Horst, P. Klemm, T. K. Lindhorst, Chem. Commun. **2009**, 46, 330–332.
153. Sandig, H. H. von Horsten, L. Radke, V. Blanchard, M. Frohme, C. Giese, V. Sandig, S. Hinderlich, Bioengineering **2017**, 4.
154. M. Kerékgyártó, A. Fekete, Z. Szurmai, J. Kerékgyártó, L. Takács, I. Kurucz, A. Guttman, ELECTROPHORESIS **2013**, 34, 2379–2386.
155. R. Gray, Arch. Biochem. Biophys. **1974**, 163, 426–428.
156. C. P. Stowell, Y. C. Lee, Biochemistry **1980**, 19, 4899–4904.
157. Wang, W. Huang, J. Orwenyo, A. Banerjee, G. R. Vasta, L.-X. Wang, Bioorg. Med. Chem. **2013**, 21, 2037–2044.
158. MüLler, G. Pfleiderer, Hoppe-Seyler´s Z. Für Physiol. Chem. **1980**, 361, 675–680.
159. D.-H. Zhang, L.-X. Yuwen, L.-J. Peng, J. Chem. **2013**, 2013, 1–7.
160. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, J. Chem. Biol. **2013**, 6, 185–205.
161. J. Horstmann, C. N. Kenny, H. A. Chase, J. Chromatogr. A **1986**, 361, 179–190.
162. Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, E. Chorell, J. M. Crowley, C. K. Cusumano, S. Campbell, J. P. Henderson, S. J. Hultgren, J. W. Janetka, J. Med. Chem. **2012**, 55, 3945–3959.
163. M. Das, K. H. Shim, S. S. A. An, D. K. Yi, Toxicol. Environ. Health Sci. **2011**, 3, 193–205.
164. M. L. Etheridge, K. R. Hurley, J. Zhang, S. Jeon, H. L. Ring, C. Hogan, C. L. Haynes, M. Garwood, J. C. Bischof, Technology **2014**, 2, 214–228.
165. F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun, J. Wang, ACS Nano **2011**, 5, 3679–3692.
166. M. A. K. Abdelhalim, M. M. Mady, J. Nanomedicine Nanotechnol. **2012**, 03.
167. M. Sengani, A. M. Grumezescu, V. D. Rajeswari, OpenNano **2017**, 2, 37–46.
168. X. Zhou, W. Xu, G. Liu, D. Panda, P. Chen, J. Am. Chem. Soc. **2010**, 132, 138–146.
169. Turcu, I. Zarafu, M. Popa, M. Chifiriuc, C. Bleotu, D. Culita, C. Ghica, P. Ionita, Nanomaterials **2017**, 7, 43.
170. H. Häkkinen, Nat. Chem. **2012**, 4, 443–455.

171. M. R. Ivanov, H. R. Bednar, A. J. Haes, ACS Nano **2009**, 3, 386–394.
172. Dondoni, A. Marra, in Click Chem. Glycosci. (Eds.: Z.J. Witczak, R. Bielski), John Wiley & Sons, Inc., **2013**, pp. 45–75.
173. P. Wessig, T. Schulze, A. Pfennig, S. M. Weidner, S. Prentzel, H. Schlaad, Polym. Chem. **2017**, 8, 6879–6885.
174. M. A. Azagarsamy, K. S. Anseth, ACS Macro Lett. **2013**, 2, 5–9. (b) T. O. Machado, C. Sayer, P. H. H. Araujo, Eur. Polym. J. **2017**, 86, 200–215.
175. M. Fiore, A. Marra, A. Dondoni, J. Org. Chem. **2009**, 74, 4422–4425. (b) Y. Gao, A. Eguchi, K. Kakehi, Y. C. Lee, Org. Lett. **2004**, 6, 3457–3460.
176. Y. Liu, W. Hou, H. Sun, C. Cui, L. Zhang, Y. Jiang, Y. Wu, Y. Wang, J. Li, B. S. Sumerlin, et al., Chem. Sci. **2017**, 8, 6182–6187.
177. Burés, M. Martín, F. Urpí, J. Vilarrasa, J. Org. Chem. **2009**, 74, 2203–2206.
178. (a) G. Chakraborty, A. K. Ray, P. K. Singh, H. Pal, Chem. Commun. **2018**, 54, 8383–8386. (b) Z. Liu, L. Du, M. Li, Sci. China Chem. **2013**, 56, 1667–1670. (c) Y.-D. Zhuang, P.-Y. Chiang, C.-W. Wang, K.-T. Tan, Angew. Chem. Int. Ed. **2013**, 52, 8124–8128
179. Schneider, Eric L., Ashley, Gary, *WO2015051307 (A1) — 2015-04-09- SLOW-RELEASE CONJUGATES OF SN-38*

Giuliano CUTOLO – Curriculum Vitae

RESEARCH and PROFESSIONAL EXPERIENCES

PhD, Chemistry Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) Dec 2018
Supervisor: Pr. A. Tatibouët
Enzymatically driven bioorthogonality: The myrosinase-glucosinolate system as a ligation tool in biological chemistry
- Synthesis of unnatural glucosinolates and carbohydrates targeting *E. Coli* bacteria.
- Improving an enzymatic reaction with unnatural substrates for bioconjugation and organic synthesis.
- Synthesis of antibacterial multivalent neoglycoprotein, site selective labelling of lectins.
- Supervision of 6 Interns (from Bs to Ms level); Teacher of Practical Work (128h) organic chemistry 2nd year Bs students; high school teaching program.

Internship -- Idenix Sarl – a Merck & Co. Inc. company, Montpellier Feb.-Aug. 2015
Synthesis, purification and characterization of nucleosides and nucleotides for Hepatitis C Virus
-Synthesis and purifications of a prodrug nucleotides series, pharmacomodulation of: Heterocycle base, sugar moiety and phosphate group.
-Multistep synthesis of modified nucleosides; Synthesis of phosphorylation reagent.

Internship - DAPP (Department Amino Acids, Peptides and Proteins) IBMM Montpellier Apr.-Jul. 2014
Synthesis of antibacterial heterocyclics as Inhibitors of Dizinc Métallo-β-lactamases
- Multi-step synthesis of polyfunctionalized 1,2,4-Triazole-3-thione compounds and thions-oxadiazoles
- Pharmacomodulation

Internship - Dacan (Department Analogues and Constituents of Nucleic Acids) IBMM Montpellier winter 2013
Métabolomics approach by Liquid Chromatography / Mass Spectrometry
- Optimizations of an analytical method for the characterization of 25 nucleotides mono-, di- and triphosphates, métabolites of De novo-synthesis

Quality Controller & Laboratory Technician - CHIBILAB Srl chemical laboratory |Pagani, Italy summer 2011 & 2012
- Verify raw materials and finished products in the food industry
- Preparing samples; chemical and microbiological analysis

Quality Control Team Manager – NATIONAL CONSERVE Srl food industry | Salerno, Italy summer 2010
- Controlling the entire production chain
- Checking factories compliance with European quality standards

Quality Controller – ELVEA Srl food industry| Salerno, Italy summer 2008 & 2009
- Control of the purchased products at industrial scale
- Controlling production quality and its preservation

Lab Technician – ECOSCREENING Srl chemical laboratory| Salerno, Italy summer 2007
- Sampling and qualitative analysis of water on spill zone

EDUCATION

Orleans University **Orleans (France)**
PhD, Chemistry Expected November
2018

Montpellier University **Montpellier**
(France) MS in "Applied synthesis, separation and analysis in medicinal chemistry"
2015

Montpellier University **Montpellier**
(France) BS in organic chemistry and biomolecules
201

Poitiers University **Poitiers**
BS in chemistry
2012

Federico II, Naples University **Naples (Italy)**
BS in chemistry
2011

Relevant coursework: Advanced Organic Synthesis; Retrosynthesis; Medicinal Chemistry; Organométallic Catalysis; Organocatalysis; Heterocyclic Chemistry; Chemistry of the fluorination and phosphorylation; Palladium Chemistry; Study of reactional mechanism; Asymmetric synthesis; Biomolecules; Synthesis of Oligonucleotides; Synthesis of modified Nucleosides; Peptide Synthesis and SPPS; Carbohydrate Chemistry; Inorganic Chemistry; Green Chemistry; Analytical Chemistry; Spectrometry; Separative methods.

SKILLS

Chemistry
Multistep synthesis; temperature and air sensitive synthesis; large-scale (100 g) and small-scale synthesis (10 mg); carbohydrate chemistry; reactivity study of bifunctional molecule and their compatibility with biological systems; design of molecules for chemical biology; Palladium-Cross-Coupling; Click Chemistry; pharmacomodulation; parallel synthesis.

Biochemistry
Investigation of the enzyme reactivity: Michaelis-Menten kinetic studies (K_m and V_{max} evaluation) by miniaturized capillary electrophoretic assays; dose-response curves; study of substrate activity; improvement of an enzymatic reactivity; protein digestion and protein sequencing, synthesis of Neoglycoproteins.

Bioconjugation
Optimization of protein functionalization, fluorescent tag of proteins, site selective labelling of proteins

Analysis and separation
-Optimization of the separative methods and the detection conditions with:
Mass Spectrometry, LC/MS, LC/MSMS, UPLC, HPLC, Capillary Electrophoresis (Waters, Thermo, Agilent).
-Protein characterization by MALDI; SDS-Page.
-Microscale Thermophoresis

-Flash Column Chromatography (Biotage and Grace).
-Characterization of glycoconjugate by NMR.

Computer | Chemdraw, Mestrenova, DS Visualiser and PyMol (for protein visualization), SciFinder, Reaxys, Zotero, GraphPad Prisme5, Xcalibour (process data), Agilent Chemstation Software, Microsoft Office.

Others |Good communication skills; adaptability; dead-line conscious; creativity; team-working; tenacity.

Languages :	English	| Proficiency	Italian	|Mother Tongue
	French	| Bilingual Proficiency	Spanish	| Proficiency

Scientific Production

Publications:

Bifunctional Mannoside–Glucosinolate Glycoconjugates as Enzymatically Triggered Isothiocyanates and FimH Ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2018, *16* (26), 4900–4913.
Cutolo, G.; Reise, F.; Schuler, M.; Nehmé, R.; Despras, G.; Brekalo, J.; Morin, P.; Renard, P.-Y.; Lindhorst, T. K.; Tatibouët, A.

2 others articles in preparation

Oral Communications:

The MG system, a new tool in bioconjugate chemistry.
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé,R. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
27èmes journées du Groupe Français des Glucides
May 2018 – Nouan le Fuzelier (France)
Best oral presentation award

Bifunctional glucosinolate glycoconjugates as enzymatically triggered masked isothiocyanates.
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé, R. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
25th Young Research Fellows meeting (International Congress)
March 2018 -Orleans (France)

A natural Lossen Rearrangement as a ligation tool.
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé, R. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
4th Glucosinolate Conference (International Congress)
September 2017 Berlin (Germany)

A natural Lossen Rearrangement as a ligation tool.
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé, R. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
19th European Carbohydrate Symposium (International Congress)

July 2017 Barcelona (Spain)

Synthesis of new glucosinolates probes for bioconjugation
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé, R. ; Morin, Ph. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
Journée de Chimie Organique (JCO) (International Congress)
September 2016 – Palaiseau- Paris (France)

Synthesis of new glucosinolates probes targeting FimH
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé, R. ; Morin, Ph. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
Symposium de Chime Organique en Centre-Auvergne-Limousin (SyCOCAL X)
August 2016 - Clermont Ferrand (France)

Glucosinolates in bioorthogonal ligation
Cutolo G. ; Reise, F. ; Brekalo, J. ; Nehmé, R. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
Glycosciences at CAU (International Seminar)
June 2016 - Kiel (Germany)

The MG system as a ligation tool in biological chemistry
Cutolo G. ; Reise, F. ; Brekalo, J. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
26èmes journées du Groupe Français des Glucides
May 2016 – Aussois (France)

Posters

The MG system a new enzymatic tool in bioconjugate chemistry.
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé,R. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
256th ACS National Meeting & Exposition,
19 -23 Août, 2018, Boston, MA, United States.

May 2018 – Nouan le Fuzelier (France)

The MG system for the synthesis of multivalent neoglycoproteins and gold nanoparticles.
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé,R. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
27èmes journées du Groupe Français des Glucides
May 2018 – Nouan le Fuzelier (France)

Synthesis of new glucosinolates probes targeting FimH
Cutolo G. ; Reise, F. ; Nehmé, R. ; Morin, Ph. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
Symposium de Chime Organique en Centre-Auvergne-Limousin (SyCOCAL X)
August 2016 - Clermont Ferrand (France)

The MG system as a ligation tool in biological chemistry
Cutolo G. ; Reise, F. ; Brekalo, J. ; Renard, P.-Y. ; Schuler, M. ; Lindhorst, T. K. ; Tatibouët, A.
26èmes journées du Groupe Français des Glucides
May2016 – Aussois (France)

Other activities

Sports; cuisine; travels; music; DIY; photography; organization of events and integration for the ICOA.

Giuliano CUTOLO

ETUDE DU SYSTEME MYROSINASE-GLUCOSINOLATES COMME OUTIL DE BIOCONJUGAISON

Depuis longtemps les réactifs isothiocyanates (ITCs) sont largement utilisés dans le domaine de la bioconjugaison. Ces électrophiles forts réagissent avec les cystéines et les lysines des protéines pour former une liaison stable. Cette réactivité click permet de réaliser des marquages sélectifs ainsi que des fonctionnalisations de protéines. Cependant, les ITCs ne sont pas faciles à synthétiser et à isoler et leur stabilité ne permet pas une conservation optimale.

Le but de ce projet est de développer le système enzymatique myrosinase-glucosinolate (MG) comme outil de conjugaison capable de former un ITC *in situ*. Le tandem MG est un mécanisme de défense des plantes de l'ordre des Brassicales bien connu. Dans ce système biochimique, la myrosinase opère comme thioglucosidase, en hydrolysant les glucosinolates (GLs), pour générer des ITCs. L'avantage de ce tandem enzymatique est de produire les ITCs à partir de précurseurs solubles dans l'eau, non toxiques, sous conditions douces.

Afin d'explorer cet outil enzymatique, deux types de GLs non naturels ont été conçus. En raison de l'importance de l'interaction lectine-mannose dans les mécanismes d'adhésion bactérienne, nous avons conçu une petite librairie de GLs intégrant un mannoside. De cette façon il est possible d'étudier des lectines bactérienne (FimH). Le second type de glucosinolate est caractérisé par une deuxième fonction chimique, permettant de réaliser des réactions orthogonales.

Le système MG a été évalué dans plusieurs approches de bioconjugaison telles que le marquage sélectif d'une lectine, la synthèse de néoglycoprotéines et la fonctionnalisation de nanoparticules.

Mots clés : myrosinase, glucosinolates, isothiocyanates, bioconjugaison, marquage sélectif, lectines, FimH

STUDY OF THE SYSTEM MYROSINASE-GLUCOSINOLATES AS A BIOCONJUGATION TOOL

Since many decades, Isothiocyanate (ITCs) reagents are widely used in bioconjugation approaches to create a stable bond onto the lysin and cysteine residues of proteins and peptides. Thanks to this click reaction it is possible to achieve a selective ligation or a high functionalization of proteins. On the others hand, isothiocyanates are not easy to prepare, to isolate, to store and most of the time insoluble in water.

The aim of this work is to explore the myrosinase-glucosinolate (MG) enzymatic tandem as a ligation system, in order to release ITCs *in-situ*. The MG tandem is a well-known mechanism of defense in plants of the order Brassicales. In this biochemical system, myrosinase acts as a thioglucosidase, hydrolyzing glucosinolates (GLs) to liberate transient species that spontaneously form ITCs. The advantage of this enzymatic tandem is to generate ITCs from a stable non-toxic GLs precursor, soluble in water, using mild conditions.

In order to develop this enzymatic tool, two kind of unnatural GLs were synthetized. Due to the important role of the mannoside-lectins interaction in the bacterial adhesion mechanism, at first, we designed a small library of GL bearing mannosides, in order to target and study the bacterial lectin FimH. The second kind of GL possess a chemical function allowing to study orthogonal reactions. After, the ability of the myrosinase to hydrolyze those unnatural GLs was investigated, as well their chemical reactivity.

Then, the performances of the MG system was studied in different approaches of bioconjugation, such as: the synthesis of neoglycoproteins (NGPs), the site selective labeling of a lectin and the functionalization of gold nanoparticles. The feasibility of these strategies confirmed that the MG system can be used as an enzymatic tool in some bioconjugation approaches.

Keywords : myrosinase, glucosinolates, isothiocyanates, bioconjugaison, site selective labeling, lectins, FimH

Institut de Chimie Organique et Analytique

Rue de Chartres, 45100 Orléans

UNIVERSITE D'ORLEANS