



HAL
open science

Synthèses d'inhibiteurs sélectifs des endosulfatases humaines H-Sulf 1 et 2

Maxime Mock-Joubert

► **To cite this version:**

Maxime Mock-Joubert. Synthèses d'inhibiteurs sélectifs des endosulfatases humaines H-Sulf 1 et 2. Chimie organique. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS137 . tel-04046871

HAL Id: tel-04046871

<https://theses.hal.science/tel-04046871v1>

Submitted on 27 Mar 2023

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

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

NNT : 2017SACLS137

Thèse de doctorat
de
L'Université Paris-Saclay
préparée à
l'Université Paris Sud

Ecole Doctorale n° 571

Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité de doctorat Chimie

Par

M. Maxime Mock-Joubert

Synthèses d'inhibiteurs sélectifs des endosulfatases humaines H-Sulf 1 et 2

Thèse présentée et soutenue à Orsay le 09 juin 2017 :

Composition du Jury :

M. Vivès Romain	Directeur de Recherches, CNRS, Grenoble	Président
Mme Lubin-Germain Nadège	Professeur, Université Cergy-Pontoise	Rapporteur
M. Ferrières Vincent	Professeur, ENSCR, Rennes	Rapporteur
Mme Le Narvor Christine	Chargée de Recherches, CNRS, Orsay	Directeur de thèse
M. Bonnaffé David	Professeur, Université Paris Sud	Co-Directeur de thèse

Abréviations :

4-MU : 4-Methylumbelliférol

4-MUS : 4-Methylumbelliféryl sulfate

AgOTf : Triflate d'argent

All : Allyle

Aq. : Aqueuse

APTS : Acide paratoluène sulfonique

ARSA : Arylsulfatase A

ARSB : Arylsulfatase B

br : large

BzCN : Oxo(phényl)acétonitrile

CA II : Anhydrase carbonique II

Calcd. : Calculée

CAT : Domaine catalytique

C-ter : Domaine C-terminal

d : Doublet

DABCO : 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane

DBMP : 2,6 Di-tert-butyl-4-méthylpyridine.

DBN : 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène

DCM : Dichlorométhane

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

DHEA : Dehydroépiandrosténone

DHEAS : Dehydroépiandrosténone sulfate

DMA : Diméthylacétamide

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine *4-(N,N-Diméthylamino)pyridine*

DME : Diméthoxyéthane

DMF : Diméthylformamide

DR : Domaine de reconnaissance

EMATE : Estrone sulfamate

Equiv. : Equivalent

ER : Reticulum endoplasmique
ESI-MS : Spectrométrie de masse avec ionisation par électronébulisation
ES : Estrone sulfate
FGE : Enzyme génératrice de formylglycine
FGH : formylglycine hydratée
FGly : Formylglycine
HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
HS : Héparane sulfate
HSPG : Héparane sulfate protéoglycane
HSQC : Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
HSulfs : Endosulfatases humaines
IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane
LevOH : Acide 4-oxopentanoïque
m : Multiplet
NMP : N-Méthyl-2-pyrrolidone
NPTFA : N-Phényltrifluoroacétamide
PARS : Pseudomonas aeruginosa sulfatase
PMB : Paramethoxybenzyle
PMP : Paramethoxyphényle
q : Quadruplet
quint. : Quintuplet
RMN ¹H : Résonance magnétique nucléaire du noyau d'hydrogène
RMN ¹³C : Résonance magnétique nucléaire du noyau du carbone 13.
s : Singulet
Satd. : Saturée
SC : Sequence clivable
SN₂ : Substitution nucléophile de moléularité 2
Soln. : Solution
STS : Stéroïde sulfatase
t : Triplet
TBDMSOTf : Triflate de Tert-butyldimethylsilyle
TMS : Trimethylsilyle

TMSOTf : Trifalate de Trimethylsilyle

Tol : Tolye

TTBP : Tert-Butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate

Remerciements

Je tiens à tout d'abord à remercier sincèrement le Docteur Romain R. Vivès, en qualité de président du jury, qui a examiné ce travail doctoral avec soin. Je remercie également le professeur Vincent Ferrières et le professeur Nadège Lubin-Germain, qui ont eu le rôle difficile de rapporteur de ce manuscrit de thèse. Merci pour tous ces précieux changements que vous notés, en espérant que les modifications apportées ont fait de cette version corrigée un meilleur manuscrit.

Mes remerciements vont ensuite vers le professeur David Bonnaffé pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, dans un premier temps en tant que stagiaire de master 2, puis en tant que doctorant. Evidemment je remercie Christine Le Narvor et David pour la patience dont ils ont fait preuve, les conseils avisés et surtout un savoir-faire qu'ils m'ont transmis lors de cet apprentissage. Lors de ces quatre années de doctorat, j'ai eu l'occasion de rencontrer et d'échanger avec beaucoup de membre du laboratoire. Ces échanges pas tout le temps scientifique, permettent de garder une cohésion essentielle pendant le doctorat. Lu, Stéphane, Sophie, Vladimir, Valentine, Yunyu, Annie, Maryline, Vincent, Pauline, Nicolas.

Pour ce travail je dois également remercier Jérôme qui a beaucoup apporté à ce projet. Un grand merci à Aurélien, beaucoup de discussions constructives, qui m'ont permis de grandir et murir, j'ai également appris à ses côtés des techniques expérimentales et d'analyses qui m'ont rendu la vie plus simple au quotidien. Que la force soit avec nous.

En plus de ce projet de thèse j'ai eu l'occasion d'intégrer plusieurs équipes pédagogiques, je tiens à remercier sincèrement ces personnes qui m'ont guidé dans cette tâche, Emilie, Nathalie, Céline, Claudia, Philippe, Mohamed, Aurélien, Richard, Nadine. J'ai également participé à la création d'un projet de réseautage et d'émulation scientifique dans le LabEx LERMIT. Je remercie tous les collègues qui ont participé à l'aventure et particulièrement Matt et Jessica. Ces deux aspects m'ont beaucoup apporté que ce soit sur un point personnel ou scientifique et donc professionnel.

Un grand merci à ma famille qui m'a toujours soutenue que ce soit Brice et Valérie pour leur soutiens logistique fort apprécié depuis mon arrivé à Orsay, ou mes parents qui ont toujours été présent pour moi. Une grosse pensée pour le club Joub' et ces activités toujours conviviales.

Une grosse pensée à mes amis, doctorant ou non pour me supporter et croire en moi.

Table des matières

1. Introduction Générale	12
1.1. Les Heparanes Sulfates.....	12
1.1.1. Description du motif.....	12
1.1.2. Organisation	13
1.1.3. Interactions avec les protéines	14
1.2. Les sulfatases	14
1.2.2. Fonctionnement des sulfatases	15
1.2.1. Des enzymes importantes : fonction et localisation	24
1.3. ... Comme cibles thérapeutiques.....	30
1.3.1. Dans des cas de cancer.....	31
1.3.2. Dans des maladies inflammatoires	34
1.3.3. Recherche de sélectivité	35
1.3.4. Des potentielles cibles thérapeutiques.....	36
2. Objectifs de la thèse	38
2.1. Construction d'inhibiteurs.....	38
2.1.1. L'inhibition des Sulfatases	38
2.1.2. Choix du sulfamate.....	44
2.2. Utilisation du domaine de reconnaissance des H Sulfs.....	48
2.2.1. Intéractions Héparane Sulfate/domaine de reconnaissance.....	49
2.2.2. Construction d'une série de molécules.....	50
3. Stratégie pour la synthèse de fragments d'Héparane sulfate	51
3.1. Stratégies existantes	51

3.1.1. La glycosylation	51
3.1.2. Exemple de synthèse de fragments d'Héparane Sulfate : Utilisation de synthèses itératives.....	57
3.2. Stratégie itérative développée à Orsay	73
3.2.1. Synthèse de fragments d'HS	73
3.2.2. Application au sujet.....	77
4. Etude d'une glycosylation : voie d'accès au	
« trisaccharide »	80
4.1. Stratégie de glycosylation	80
4.1.1. Design du monosaccharide	80
4.1.2. Types d'activations envisagés	80
4.1.3. Nécessité d'un modèle	81
4.2. Synthèse des donneurs	82
4.2.1. Vers le RSPH.....	82
4.2.2. Du RSPH au NPTFA.....	83
4.2.3. Un sous-produit à tester ?.....	85
4.3. Glycosylation avec l'accepteur modèle.....	85
4.3.1. De type Crich-van Der Marel.....	85
4.3.2. De type Khane	86
4.3.3. De type Schmidt-Yu	87
4.3.4. Discussion autour de la stéréosélectivité.....	89
4.4. Application au « Trisaccharide »	91
4.4.1. Résultats avec l'accepteur disaccharidique	91
4.4.2. Conclusion	94
4.5. Conclusion	95

5. Elongation de la chaine	96
5.1. Utilisation de la stratégie itérative du laboratoire.....	96
5.1.1. Synthèse de l'accepteur et du donneur disaccharidique.....	96
5.1.2. Synthèse du tetrasaccharide accepteur.....	98
5.1.3. Transformation du trisaccharide clé 199 en donneur.	99
5.2. Application au projet : réaction de glycosylation	100
5.2.1. Synthèse du pentasaccharide : stratégie de glycosylation 3 + 2	100
5.2.2. Synthèse du pentasaccharide : stratégie de glycosylation 1 + 4	101
5.2.3. Synthèse de l'heptasaccharide : une glycosylation 3 + 4.....	102
5.3. Conclusion	103
6. Ouverture réductrice.....	104
6.1. Rappel bibliographique sur quelques méthodes d'ouverture réductrice de benzylidène.	104
6.2. Etude sur le monosaccharide	108
6.2.1. Rôle du solvant et de la température	108
6.2.2. Conclusion	115
6.3. Applications aux oligomères	115
6.3.1. Le trisaccharide	115
6.3.2. Le penta et l'heptasaccharide	116
6.4. Conclusion	117
7. La sulfamoylation	119
7.1. Principaux mode d'installation.....	119
7.1.1. Utilisation de chlorure de sulfamyle	119
7.1.2. Utilisation de sel de Burgess pour la synthèse de sulfamates cycliques : les sulfamidates	125

7.2. Cas de monosaccharides	128
7.3. Application aux oligomères	131
7.2.1. Problèmes d'échelles	132
7.2.2. Résolution des problèmes.....	133
7.4. Conclusion	138
8. Résumé et perspectives	139
9. Partie expérimentale	144

1. Introduction Générale

1.1. Les Heparanes Sulfates

Les Héparanes Sulfates (HS) font parties d'une des cinq grandes classes de Glycosaminoglycanes. Ces polysaccharides sont linéaires et comportent un motif de répétition disaccharidique et un grand nombre de groupements sulfates sauf dans le cas de l'acide hyaluronique.

1.1.1. Description du motif

Le motif de répétition des HS est constitué d'une D-glucosamine engagée dans une liaison α 1→4 avec un acide hexuronique. La fonction amine de cette unité peut être N-fonctionnalisée sous forme : acétylée, sulfatée, ou bien rester non substituée. Cette glucosamine peut également être O-sulfatée en position 3 et 6. L'acide hexuronique peut être un acide L-iduronique ou un acide D-glucuronique étant lié à une glucosamine par une liaison α 1→4 ou β 1→4, cela correspond à une relation 1,2-*trans*. La position 2 de cet acide hexuronique peut également porter un groupement sulfate (Figure 1).¹

¹ Rabenstein, D. L. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19 (3), 312–331.

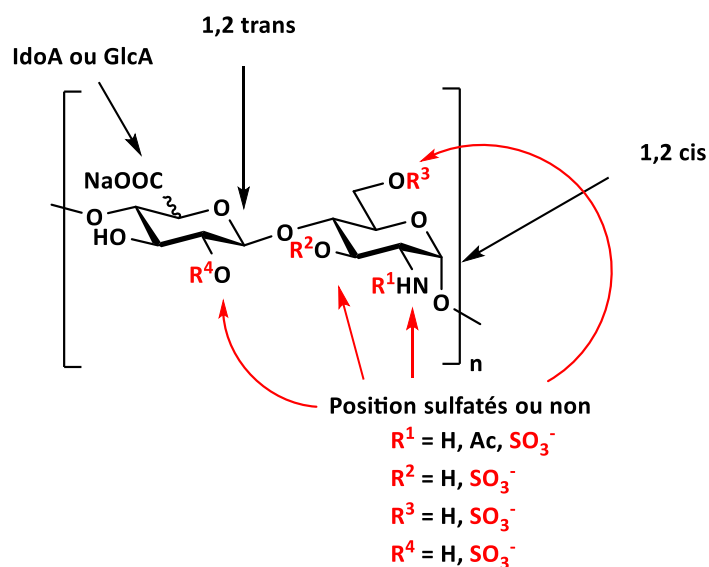


Figure 1 : Représentation des motifs des HS.²

Toutes ces possibilités de fonctionnalisation entraînent un nombre de combinaisons impressionnantes. La nature, ainsi que le chimiste, peuvent ainsi coupler 48 disaccharides différents afin de générer 2304 tétrasaccharides, jusqu'à l'obtention de plus de 5 millions d'octasaccharides.³

1.1.2. Organisation

Malgré cette grande diversité, la nature organise de manière bien précise ces motifs. En effet le long des chaînes d'HS apparaissent des régions riches en sulfate, appelées domaines S comme N-Sulfaté. Ils sont constitués en majeure partie d'une répétition d'un motif IdoA-GlcN où les groupements R¹ à R⁴ sont la plupart du temps sulfatés. En opposition aux domaines S, les chaînes d'HS possèdent aussi des régions peu ou pas sulfatées, appelées domaines A, pour « N-Acétyle », constitués majoritairement d'un motif GlcA-GlcNAc quelquefois 6-O-sulfaté.^{3,4}

² Capila, I.; Linhardt, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (3), 390–412.

³ Bonnaffé, D. C. R. *Chimie* **2011**, *14* (1), 59–73.

⁴ Lortat-Jacob, H.; Turnbull, J. E.; Grimaud, J. A. *Biochem. J.* **1995**, *310* (2), 497–505.

Cette répartition des charges entraîne l'apparition d'un deuxième niveau de diversité au sein des HS. En effet ces dernières peuvent être cartographiées puis représentées de manière schématique par une succession de ces domaines (Figure 2).



Figure 2 : Représentation schématique des HS.

Les domaines A et S sont séparés par un domaine de transition représentant un gradient de charge^{5,6} pour passer des régions les plus sulfatées aux régions les moins sulfatées et inversement.

1.1.3. Interactions avec les protéines

Ce sont ces domaines S, chargés, qui sont impliqués dans le processus de reconnaissance avec les protéines de la matrice extracellulaire. Les protéines principalement chargées positivement viennent donc interagir de manière complémentaire avec un ou plusieurs domaines S. Parmi les protéines avec lesquelles les Héparanes sulfates portés par des protéoglycanes (HSPG) interagissent, on trouve les endosulfatases.

1.2. Les sulfatases ...

Les endosulfatases font partie de la famille des sulfatases (EC 3.1.6). Elles font parties de la classe des hydrolases. Chez l'Homme il en existe 17 différentes.⁷ Elles catalysent toutes la réaction d'hydrolyse des groupements sulfates de divers substrats naturels (Schéma 1).

⁵ Lindahl, U.; Kusche-Gullberg, M.; Kjellen, L. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (39), 24979–24982.

⁶ Turnbull, J. E.; Gallagher, J. T. *Biochem. J.* ; **1991**, 273, 553–559

⁷ Sardiello, M. *Hum. Mol. Gen.* **2005**, 14 (21), 3203–3217.

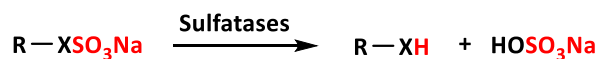


Schéma 1 : Action des sulfatases

Parmi la variété des substrats des sulfatases, on peut retrouver des sulfatides qui sont des céramides galactosylés, des stéroïdes sulfatés,⁸ ou encore des polysaccharides de la famille des glycosaminoglycanes comme des héparanes sulfates⁹ (Figure 3).¹⁰

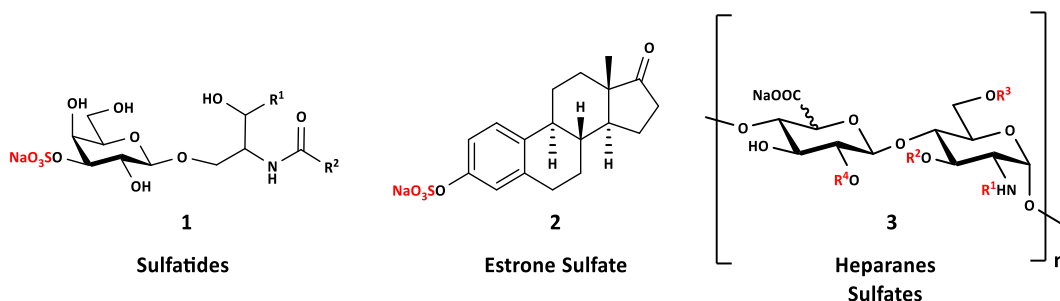


Figure 3 : Quelques substrats de sulfatases.

1.2.2. Fonctionnement des sulfatases

Les sulfatases humaines ont une séquence d'acides aminés de longueur moyenne de 550, exceptées pour les endosulfatases 1 et 2, qui elles, ont une séquence enchainant respectivement 871 et 870 acides aminés.

Tableau 1 : Quelques longueurs de sulfatases.

Entrée	Sulfatase	Nombre de résidus
--------	-----------	-------------------

⁸ Stein, C.; Hille, A.; Seidel, J.; Rijnbout, S.; Waheed, A.; Schmidt, B.; Geuze, H.; Figura, K. von. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264 (23), 13865–13872.

⁹ Morimoto-Tomita, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (51), 49175–49185.

¹⁰ Hanson, S. R.; Best, M. D.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43 (43), 5736–5763.

1	HSulf-1	871
2	HSulf-2	872
3	ARSA	507
4	ARSB	533
5	ARSC/STS	583

1.2.2.1. Une séparation en deux principaux domaines

Les sulfatases possèdent 4 domaines^{9,11,12} bien que pour comprendre la réactivité de ces enzymes, seuls deux domaines sont intéressants à étudier. Le premier noté « CAT », sert à l'activité catalytique des enzymes. Le deuxième domaine noté « DR », est celui qui sert pour la reconnaissance. Il est chargé de diriger le substrat dans la poche catalytique (Figure 4). On trouve aux extrémités le domaine « SC » qui est un domaine de séquence clivable servant à l'adressage dans l'appareil de golgi, ainsi que le domaine C terminal « C-ter » qui a une affinité pour la glucosamine 6-O-sulfatée.



Figure 4 : Représentation des différents domaines de HSulf-2.

C'est le domaine de reconnaissance, unique pour chaque sulfatase, qui permet la spécificité vis-à-vis des substrats. Bien que les sulfatases possèdent ce DR qui différencie les substrats, elles présentent une activité enzymatique sur des molécules relativement petites possédant un motif aromatique sulfaté.^{13,14,15} C'est grâce à cette activité que provient la dénomination générale d'arylsulfatase. A tel point que dans la littérature, on retrouve par exemple la stéroïde sulfatase (STS) sous son ancienne dénomination arylsulfatase C. Dans le cas de l'arylsulfatase A (ARSA) et de l'arylsulfatase B (ARSB), bien que possédant également cette réactivité d'hydrolyse sur des substrats ayant des sulfates phénoliques, leurs substrats

¹¹ Tang, R.; Rosen, S. D. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (32), 21505–21514.

¹² Frese, M.-A.; Milz, F.; Dick, M.; Lamanna, W. C.; Dierks, T. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (41), 28033–28044.

¹³ Dodgson, K. S. *Sulfatases of Microbial Origin* **1982**.

¹⁴ Roy A. B., *The Enzymes, Vol. V*, Academic press, New York, **1971**, p.1.

¹⁵ Nicholls R.G. et al., *The Enzymes, Vol. V*, Academic press, New York, **1971**, p.21.

sont respectivement des sulfatides et des dermatanes/chondroïtines sulfates, elles gardent pourtant cette dénomination générale.

Une fois que les sulfatases ont été clonées et/ou caractérisées,^{8,9,16} les activités enzymatiques de celles-ci sont déterminées sur des substrats comme le sulfate de 4-methylumbelliférol (4-MUS) qui possède ce motif aryle sulfaté.^{17,18,19,20}

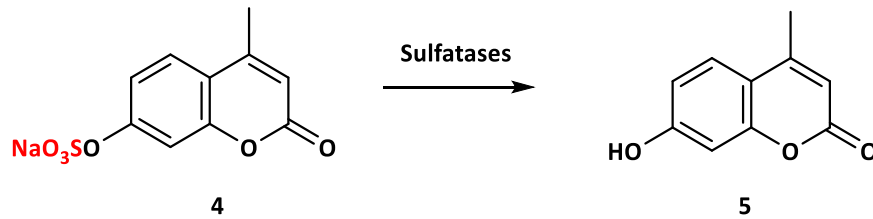


Schéma 2 : Hydrolyse du groupement sulfate de la 4-MUS.

L'hydrolyse du groupement sulfate du 4-MUS génère la 4-méthylumbelliférol (4-MU) qui est une molécule fluorescente (Schéma 2). Une fois excitée par un rayonnement de longueur d'onde $\lambda = 320$ nm, la 4-MU émet par fluorescence, une lumière de longueur d'onde $\lambda = 460$ nm, celle-ci correspondant à une couleur bleue-violette qui permet de quantifier la réactivité des sulfatases. Malgré l'hydrolyse de molécules comportant des sulfates aromatiques, cette activité reste modérée comparée à celle de leurs substrats naturels respectifs. Cela est notamment dû au fait que ces dernières ne profitent pas ou que très peu d'interactions avec le DR contrairement aux substrats naturels.

¹⁶ Kawano, J.; Kotani, T.; Ohtaki, S.; Minamino, N.; Matsuo, H.; Oinuma, T.; Aikawa, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 997 (3), 199–205.

¹⁷ Kawano, J.; Aikawa, E. *J. Histochem. Cytochem.* **1987**, 35 (5), 523–530.

¹⁸ Puca, A. A.; Zollo, M.; Repetto, M.; Andolfi, G.; Guffanti, A.; Simon, G.; Ballabio, A.; Franco, B. *Genomics* **1997**, 42 (2), 192–199.

¹⁹ Franco, B.; Meroni, G.; Parenti, G.; Levilliers, J.; Bernard, L.; Gebbia, M.; Cox, L.; Maroteaux, P.; Sheffield, L.; Rappold, G. A.; Andria, G.; Petit, C.; Ballabio, A. *Cell* **1995**, 81 (1), 15–25.

²⁰ Parenti, G.; Meroni, G.; Ballabio, A. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, 7 (3), 386–391.

1.2.2.2. Importance de la formylglycine

Certains acides aminés du domaine CAT sont très conservés, c'est le cas d'une séquence de 11 acides aminés partant d'une cystéine, qui se retrouvent dans quasiment toute la famille des sulfatases (Tableau 2).²¹

²¹ Knaust, A.; Schmidt, B.; Dierks, T.; von Bülow, R.; von Figura, K. *Biochemistry* **1998**, 37 (40), 13941–13946.

Tableau 2 : Conservation de la séquence de 11 acides aminés.

Entrée	Sulfatase	Acides aminés									Position dans la séquence			
1	ARSA	C	T	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	69-80
2	ARSB	C	T	P	S	R	S	Q	L	L	T	G	R	91-102
3	STS	C	T	P	S	R	A	A	F	M	T	G	R	83-94
4	ARSD	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	89-100
5	ARSE	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	86-97
6	ARSF	C	S	P	S	R	S	A	F	L	T	G	R	79-90
7	ARSG	C	S	P	S	R	A	S	L	L	T	G	R	82-93
8	GalN6S	C	S	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	79-90
9	GlcN6S	C	C	P	S	R	A	S	I	L	T	G	K	91-102
10	GlcNS	C	S	P	S	R	A	S	L	L	T	G	L	70-81
11	IdoA2S	C	A	P	S	R	V	S	F	L	T	G	R	84-95
12	Sulf1	C	C	P	S	R	S	S	M	L	T	G	K	87-98
13	Sulf2	C	C	P	S	R	S	S	I	L	T	G	K	88-99

(C : cystéine ; T : thréonine ; S : sérine ; A : alanine ; P : proline ; R : Arginine, V : Valine ; Q : Glutamine ; L : leucine ; F : phénylalanine ; I : Isoleucine ; M : méthionine ; G : glycine ; K : Lysine.)

La séquence commence par une cystéine, elle est cruciale pour la future activité des sulfatases.^{22,23} Les sulfatases subissent une modification post-traductionnelle, changeant cette cystéine en α -formylglycine grâce à l'action de l'enzyme génératrice de formylglycine (FGE) qui est exclusive aux sulfatases (Schéma 3).^{24,25}

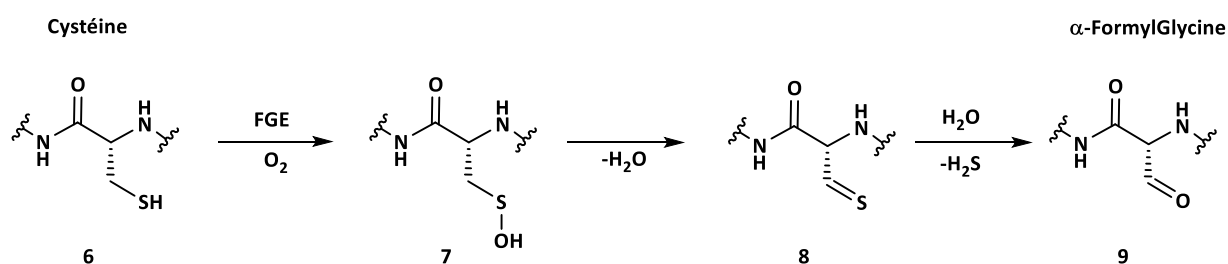


Schéma 3 : Action de la FGE sur la cystéine.

²² Dierks, T.; Lecca, M. R.; Schmidt, B.; von Figura, K. *FEBS Lett.* **1998**, *423* (1), 61–65.

²³ Miech, C. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (9), 4835–4837.

²⁴ Schmidt, B.; Selmer, T.; Ingendoh, A.; Figurat, K. von. *Cell* **1995**, *82* (2), 271–278.

²⁵ Peng, J.; Alam, S.; Radhakrishnan, K.; Mariappan, M.; Rudolph, M. G.; May, C.; Dierks, T.; von Figura, K.; Schmidt, B. *FEBS J.* **2015**, *282* (17), 3262–3274.

Bien que la séquence des 11 acides aminés soit importante, notamment pour la structuration de l'enzyme,²¹ ainsi que pour la réactivité enzymatique,²⁶ c'est l'enchaînement CXPXR, et plus particulièrement l'arginine qui sont cruciaux pour que la FGE puisse correctement transformer la cystéine en FGly, et donc donner son activité à l'enzyme.²⁷

1.2.2.3. Une structuration du site catalytique importante.

Quatre arylsulfatases ont été cristallisées. Trois sulfatases humaines ARSA,²⁸ ARSB²⁹ et ARSC, ou STS,³⁰ ainsi qu'une sulfatase de *Pseudomonas aeruginosa* (PARS).³¹ On peut voir sur une superposition de clichés de diffraction des rayons X de ces quatre sulfatases, que les acides aminés du site catalytique ont un excellent recouvrement spatial (Figure 5). Dans le cas de la STS en position 343 se trouve un résidu glutamate, alors que pour les autres sulfatases représentées, il s'agit d'asparagines (Tableau 3). Malgré cette différence, le recouvrement est quasi parfait (Figure 5).

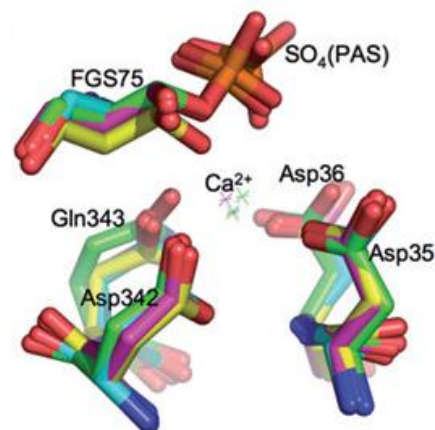


Figure 5 : Superposition de 4 sites actifs de sulfatases.³²

Sur ce même cliché on note également que, sur certaines sulfatases humaines, un groupement sulfate reste positionné sur le résidu FGly. La fonction aldéhyde de cette dernière

²⁶ Waldow, A.; Schmidt, B.; Dierks, T.; Bülow, R. von; Figura, K. von. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (18), 12284–12288.

²⁷ Dierks, T.; Lecca, M. R.; Schlotterhose, P.; Schmidt, B.; Figura, K. von. *EMBO J.* 1999, 18 (8), 2084–2091.

²⁸ Lukatela, G.; Krauss, N.; Theis, K.; Selmer, T.; Gieselmann, V.; von Figura, K.; Saenger, W. *Biochemistry* 1998, 37 (11), 3654–3664.

²⁹ Bond, C. S.; Clements, P. R.; Ashby, S. J.; Collyer, C. A.; Harrop, S. J.; Hopwood, J. J.; Guss, J. M. *Structure* 1997, 5 (2), 277–289.

³⁰ Hernandez-Guzman, F. G.; Higashiyama, T.; Pangborn, W.; Osawa, Y.; Ghosh, D. J. *Biol. Chem.* 2003, 278 (25), 22989–22997.

³¹ Boltes, I.; Czapinska, H.; Kahnert, A.; von Bülow, R.; Dierks, T.; Schmidt, B.; von Figura, K.; Kertesz, M. A.; Usón, I. *Structure* 2001, 9 (6), 483–491.

³² Ghosh, D. *Cell. Mol. Life Sci.* (2007) 64, 2013.

se retrouve donc sous forme plutôt d'hémiacétal avec l'un des oxygènes substitués par un groupement sulfate.

On note également un cation qui interagit avec tous les acides aminés représentés. Ce cation est le plus souvent un ion calcium (II). Dans le cas de l'arylsulfatase A, est représenté en violet un magnésium (II). Le fait qu'un ion calcium ait été déplacé par un ion magnésium lors des étapes de purification²⁸ reste envisageable, mais cette hypothèse est remise en question.³³ Le cation contribue à l'architecture même des sulfatases ainsi que dans l'activation et la stabilisation de la formylglycine sous forme hydratée (FGH) (Tableau 3).

Tableau 3 : Rôles des Acides Aminés en interaction avec le Ca^{II}.

Entrée	STS	PARS	ARSA	ARSB	Fonction proposée
1	FGS75	FGS51	FGS69	FGS91	Nucléophile via FGH
2	Gln343	Asn318	Asn282	Asn301	Activation de la FGH, Coordination au Ca ^{II}
3	Asp342	Asp317	Asp281	Asp300	Coordination au Ca ^{II}
4	Asp36	Asp14	Asp30	Asp54	Coordination au Ca ^{II}
5	Asp35	Asp13	Asp29	Asp63	Coordination au Ca ^{II}

L'organisation tridimensionnelle autour du centre métallique joue donc un rôle important. C'est également le cas lorsqu'on s'éloigne un tout petit peu du centre métallique. Des lysines viennent établir un pont ionique avec les charges négatives des carboxylates et du groupement sulfate. D'autres interactions ont lieu au sein du site catalytique, notamment des liaisons hydrogène entre des histidines, ou lysines en interactions avec les oxygènes de la formylglycine sulfatée. La plus remarquable se fait entre l'histidine 136 et le groupement hydroxyle restant sur la formylglycine sulfatée. Le docteur Debashis Ghosh mesurent une distance de 2,6 Å entre l'azote de l'histidine et l'hydrogène de l'hydroxyle, confirmant la possibilité de cette interaction (Figure 6).³²

³³ von Bülow, R.; Schmidt, B.; Dierks, T.; von Figura, K.; Usón, I. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305* (2), 269–277.

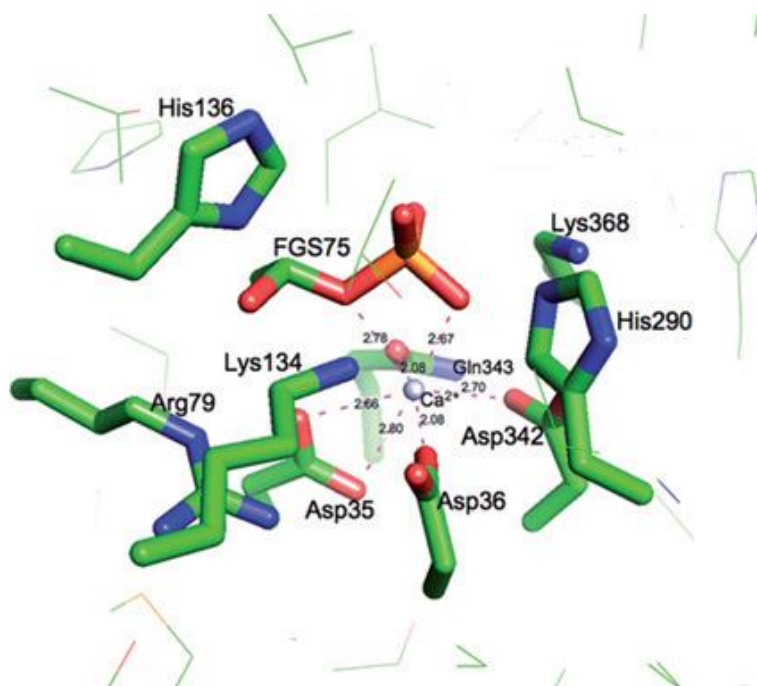


Figure 6 : Représentation du site catalytique de l'ARSC.³²

1.2.2.4. Un mécanisme d'hydrolyse unique

A notre connaissance, la FGE est exclusive des sulfatases. Son action entraîne l'apparition de la FGly qui est donc un résidu qui se retrouve uniquement dans les sulfatases ce qui rend sa réactivité si singulière.³⁴ La FGly peut être sous forme d'aldéhyde, ou sous sa forme *gem* diol dite hydrate. Le mécanisme ne reste à ce jour pas entièrement élucidé : deux voies s'opposent. La première faisant intervenir le résidu FGly comme électrophile, le second faisant intervenir lui, la FGH comme un nucléophile (Schéma 4).³⁵

³⁴ Uhlhorn-Dierks, G.; Kolter, T.; Sandhoff, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37 (18), 2453–2455.

³⁵ Roeser, D.; Preusser-Kunze, A.; Schmidt, B.; Gasow, K.; Wittmann, J. G.; Dierks, T.; von Figura, K.; Rudolph, M. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103 (1), 81–86.

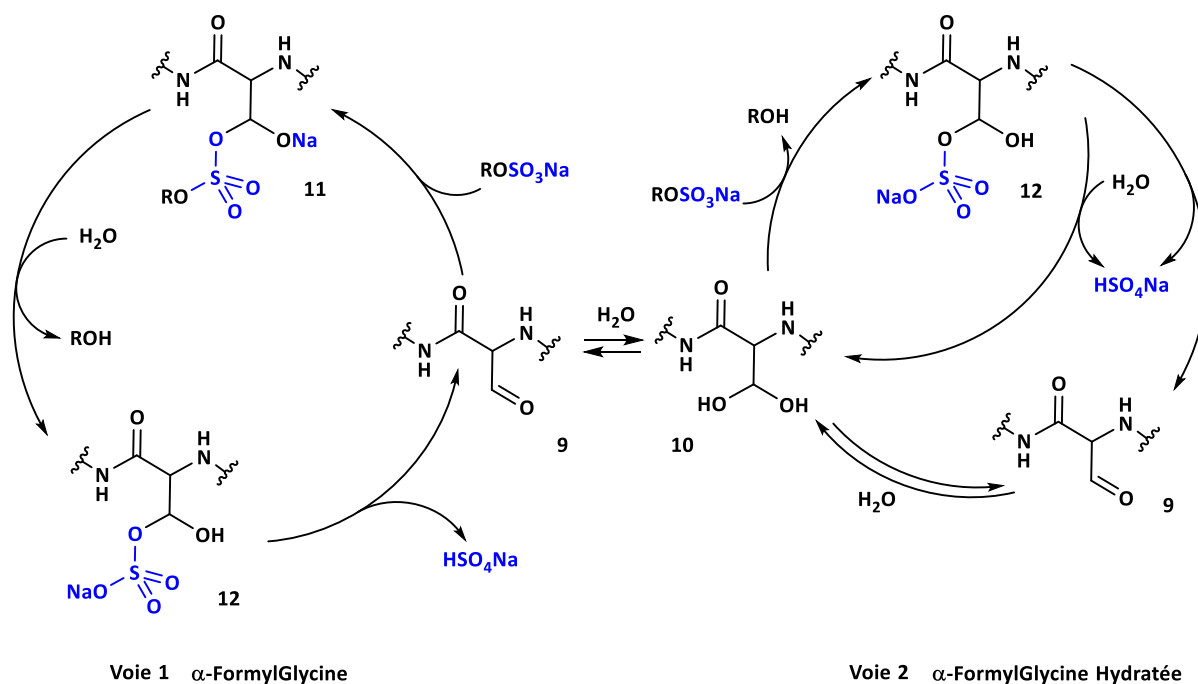


Schéma 4 : Proposition de mécanisme d'action des sulfatases.

En ce qui concerne la voie 1, l'oxygène « nucléophile » du groupement sulfate attaque le carbone de l'aldéhyde. Par action d'une molécule d'eau, via un mécanisme d'addition élimination, suivie d'une réaction acide/base, une molécule d'alcool est libérée. Une molécule d'hydrogènesulfate de sodium est spontanément libérée et on retrouve la FGly.

La voie 2 suit un mécanisme de transesterification et commence par une attaque nucléophile d'un des deux oxygènes de l'hydrate sur le soufre électrophile du groupement sulfate. Via un mécanisme d'addition élimination puis par réaction acide/base l'alcool est libéré. L'hydrate de la formylglycine est obtenu soit par hydrolyse d'une molécule d'eau, soit par élimination du groupement sulfate puis par hydratation de l'aldéhyde.

Afin d'élucider ce mécanisme, le groupe de Von Figura, a préparé des sulfatases mutées.³⁶ En remplaçant la FGly par une sérine, ils ont testé l'activité enzymatique des sulfatases mutées sur le monosulfate du *para*-nitrocatecholsulfate marqué au ³⁵S. Le transfert de sulfate s'opère, le groupement sulfate se retrouve bien sur la sérine. Cela tend à corroborer

36 Recksiek, M.; Selmer, T.; Dierks, T.; Schmidt, B.; von Figura, K. J. Biol. Chem. 1998, 273 (11), 6096–6103.

une addition nucléophile de la FGly hydratée sur l'atome de soufre et libération de l'alcool correspondant. Von Figura et ses collaborateurs ont constaté que le groupement sulfate est resté fixé sur la sérine. Ceci peut-être un élément qui permet de comprendre pourquoi la nature a choisi une FGly hydratée comme résidu, et non pas n'importe quel acide aminé comportant une fonction nucléophile pouvant opérer la transestérification. En effet le deuxième groupe hydroxyle doit de toute évidence faciliter l'élimination du groupement sulfate.³⁷

1.2.1. Des enzymes importantes : fonction et localisation

1.2.1.1. Localisation

Malgré l'absence de renseignements sur la nature des substrats de certaines sulfatases (Tableau 4 entrées 4-7), leurs localisations cellulaires sont corrélées à leurs rôles. Certaines sulfatases sont intracellulaires, localisées par exemple dans l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique (ER) ou dans le lysosome, d'autres sont situées dans la matrice extracellulaire (Tableau 4).

³⁷ Williams, S. J.; Denehy, E.; Krenske, E. H. *J. Org. Chem.* **2014**, 79 (5), 1995–2005.

Tableau 4 Localisation de 15 des Sulfatases humaines.

Entrée	Sulfatases	Abréviations	Localisation
1	Aryl sulfatase A	ARSA	Lysosome
2	Aryl sulfatase B	ARSB	Lysosome
3	Stéroïde sulfatase	STS	ER
4	Aryl sulfatase D	ARSD	ER
5	Aryl sulfatase E	ARSE	Appareil de Golgi
6	Aryl sulfatase F	ARSF	ER
7	Aryl sulfatase G	ARSG	ER
8	Galactosamine-6-sulfatase	GalN6S	Lysosome
9	Glucosamine-3-sulfatase	GlcN3S	Lysosome
10	Glucosamine-6-sulfatase	GlcN6S	Lysosome
11	Glucouronate-2-sulfatase	GlcA2S	Lysosome
12	Heparane-N-sulfatase	GlcNS	Lysosome
13	Iduronate-2-sulfatase	IdoA2S	Lysosome
14	Endo sulfatase 1	HSulf1	ECM, surface des cellules
15	Endo sulfatase 2	HSulf2	ECM, surface des cellules

Actuellement, les endosulfatases sont les seules sulfatases à être extracellulaires. Elles se distinguent ici d'une manière supplémentaire des sulfatases intracellulaire.

1.2.1.2. Rôle des sulfatases

L'hydrolyse des groupements sulfates induite par les différentes sulfatases joue un rôle crucial dans différents processus biologiques. La plupart d'entre elles sont lysosomales et ont donc un rôle important dans la dégradation des molécules, notamment des glycosaminoglycanes sulfatés (Tableau 4, entrées 1 et 2 puis 8 à 13). Les sulfatases qui ne sont pas impliquées de la dégradation lysosomale, préparent des substrats dans le but d'interagir

avec des protéines ou bien pour une cascade enzymatique réactionnelle par exemple. Elles peuvent intervenir dans un but de régulation comme dans le cas de la stéroïde sulfatase qui permet de libérer des estrogènes et androgènes qui sont transportés et stockés dans le corps sous forme sulfatés³⁸ (Schéma 5).

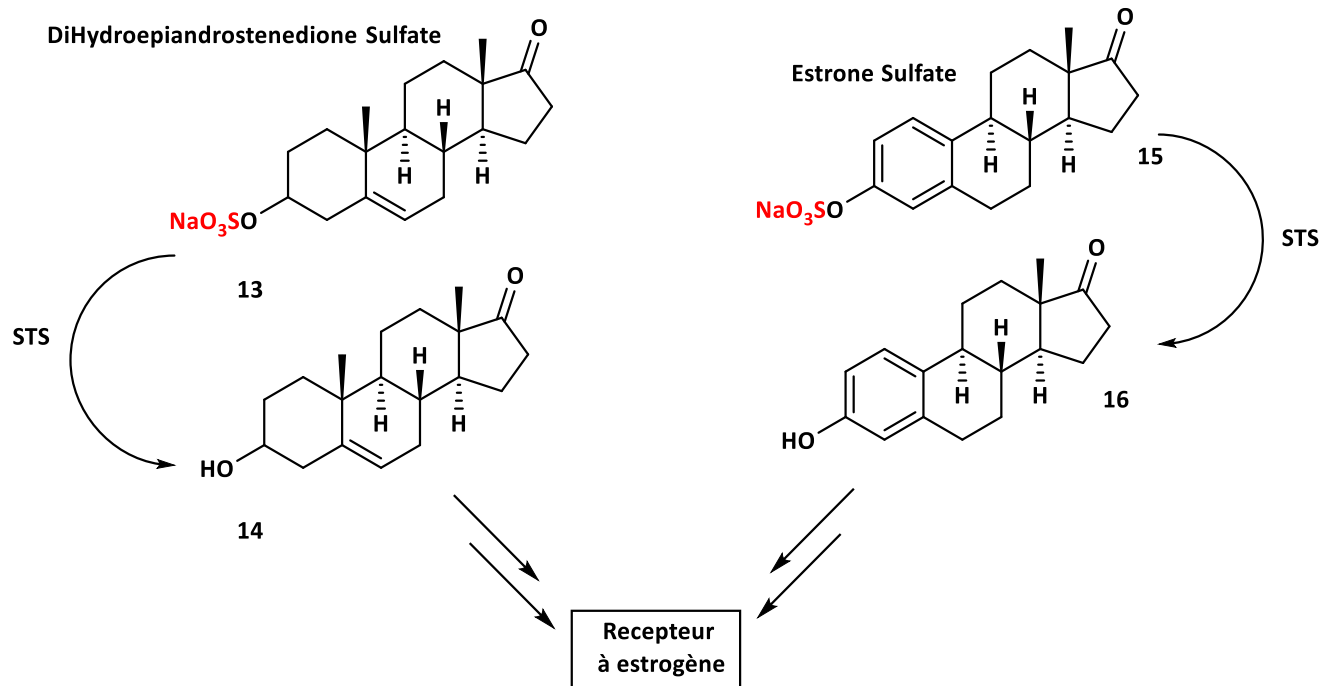


Schéma 5 : Exemple de la Stéroïde sulfatase.

Cette hydrolyse a donc un rôle clé dans la libération d'hormones. En effet via l'action de la stéroïde sulfatase l'estrone et la dehydroepiandrostedione peuvent devenir substrat de plusieurs enzymes pour *in fine* interagir avec le récepteur à estrogène.

En ce qui concerne les endosulfatases (HSulfs), elles interviennent dans la réparation ainsi que dans le développement des tissus et la régénération musculaire.^{39,40} C'est par l'hydrolyse des groupements 6-O-sulfate des glucosamines des chaînes d'heparane sulfate

³⁸ Dibbelt, L.; Kuss, E. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, 372 (3), 173–185.

³⁹ Uchimura, K.; Morimoto-Tomita, M.; Bistrup, A.; Li, J.; Lyon, M.; Gallagher, J.; Werb, Z.; Rosen, S. D. *BMC Biochem.* **2006**, 7, 2.

⁴⁰ Yue, X.; Li, X.; Nguyen, H. T.; Chin, D. R.; Sullivan, D. E.; Lasky, J. A. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (29), 20397–20407.

porté par des protéoglycane que ces enzymes régulent l'activité de nombreuses protéines (Figure 7).

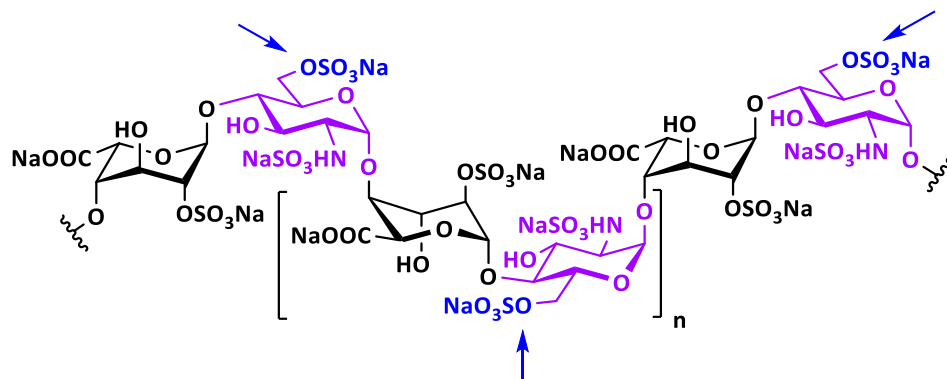


Figure 7 : Position de desulfatation des HSulfes sur les chaînes d'héparane sulfate.

Moduler la charge des HS portées par les HSPG entraîne une multitude de changements possible. Par exemple, leur capacité à libérer des cofacteurs tels que les FGF-1 et 2, le VEGF,³⁹ qui sont impliqués dans l'angiogenèse,⁴¹ la cicatrisation et Wnt, un famille de glycoprotéine engagée dans le développement embryonnaire.⁴⁰ En privant les HS de leurs 6-*O*-Sulfate les HSulfes sont capables également de promouvoir le déplacement de protéines comme des chimiokines tel CXCL12,⁴² ou encore libérer des cofacteurs afin qu'ils puissent migrer, ou encore casser/activer une interactions récepteur/cofacteur (Figure 8).⁴³

⁴¹ van Wijk, X. M. R.; van Kuppevelt, T. H. *Angiogenesis* **2013**.

⁴² Rueda, P.; Richart, A.; Recalde, A.; Gasse, P.; Vilar, J.; Guerin, C.; Lortat-Jacob, H.; Vieira, P.; Baleux, F.; Chretien, F.; Arenzana-Seisdedos, F.; Silvestre, J.-S. *Circulation* **2012**, *126* (15), 1882–1895.

⁴³ Vives, R. R.; Seffouh, A.; Lortat-Jacob, H. *Front. Oncol.* **2014**, *3*.

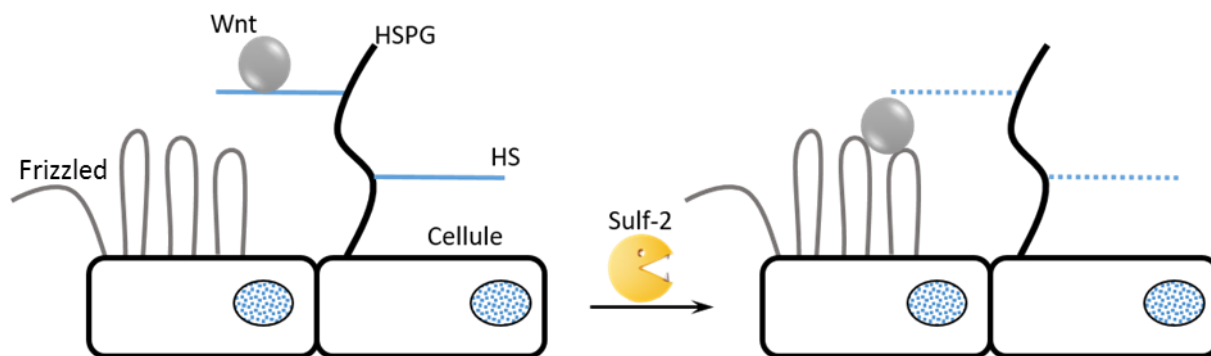


Figure 8 : Exemple d'action de sulfatase.

Les groupes de Romain R. Vivès et Joseph Zaia ont montré que pour réaliser cette hydrolyse du groupement 6-*O*-sulfate, les HSulfs glissaient de l'extrémité non réductrice du sucre vers l'extrémité réductrice.^{44,45} L'étude de Romain R. Vivès a également montré que quand HSulf-2 agit sur un polysaccharide de 8 unités il reste un unique 6-*O*-sulfate situé sur la glucosamine de l'extrémité réductrice.⁴⁵ Il faudrait donc au minimum un disaccharide voisin à une glucosamine pour que l'hydrolyse du sulfate ait lieu (Figure 9). Ce résultat peut être interpréter d'une autre manière, en effet si on raisonne en termes de substrat, la plus petite molécule utilisant le domaine de reconnaissance des HSulfs, serait donc un disaccharide trisulfatés.

⁴⁴ Staples, G. O.; Shi, X.; Zaia, J. *PLOS ONE* **2011**, *6* (2), e16689.

⁴⁵ Seffouh, A.; Milz, F.; Przybylski, C.; Laguri, C.; Oosterhof, A.; Bourcier, S.; Sadir, R.; Dutkowski, E.; Daniel, R.; Kuppevelt, T. H. van; Dierks, T.; Lortat-Jacob, H.; Vivès, R. R. *FASEB J* **2013**, *27* (6), 2431–2439.

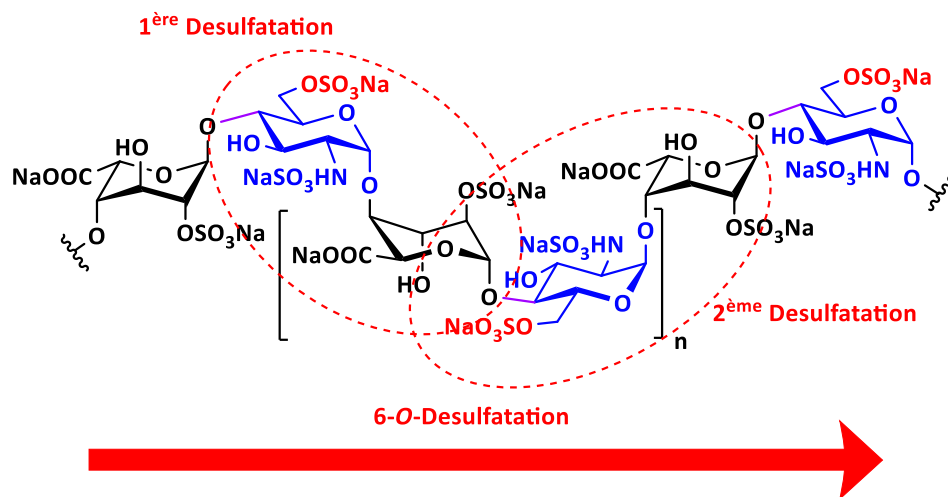


Figure 9 : Hydrolyse des sulfates le long d'un fragment d'héparane sulfate.

Thomas Dierks en 2014 vient appuyer les suppositions de l'article de Romain R. Vivès. Thomas Dierks montre que l'endosulfatase humaine HSulf-2 englobe la chaîne d'HS afin d'approcher les domaines S du site catalytique et interagit avec les sulfates des domaines S de la chaîne d'HS via une multitude de petites poches qui servent pour la reconnaissance. Autrement dit il n'y aurait pas qu'un seul domaine de reconnaissance, mais plusieurs, et ceux-ci seraient spécifiques aux régions sulfatées (Figure 10).⁴⁶

⁴⁶ Milz, F.; Harder, A.; Neuhaus, P.; Breitzkreuz-Korff, O.; Walhorn, V.; Lübke, T.; Anselmetti, D.; Dierks, T. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830* (11), 5287–5298.

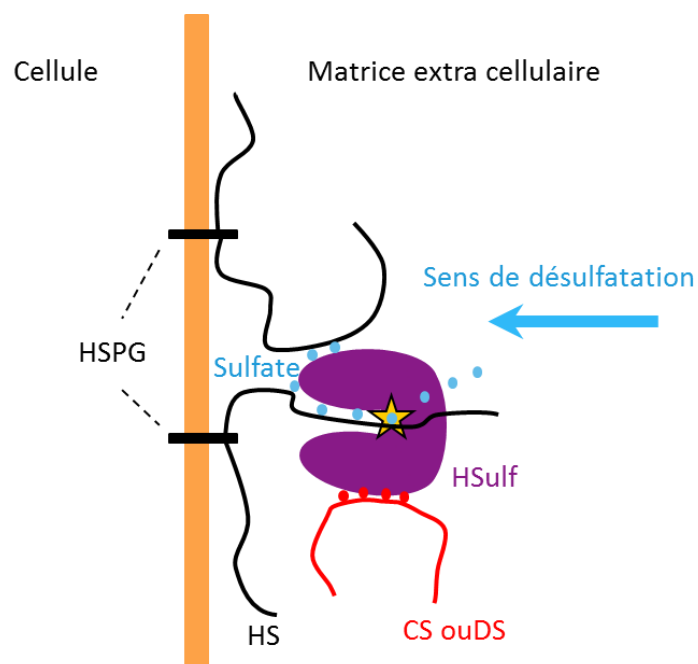


Figure 10 : Représentation de l'action des HSulfs le long d'une chaîne d'HS selon Dierks.

Chaque 6-O-Sulfate (en bleu sur le schéma) serait en interaction avec un mini domaine de reconnaissance, permettant à l'enzyme de cibler les domaines S.

Dans son article Thomas Dierks montre également qu'une deuxième chaîne d'HS interagirait avec le domaine catalytique. Une chaîne de chondroïtine ou dermatane sulfate serait également là pour stabiliser le complexe HSulf-HSPG pendant le processus d'hydrolyse.

1.3. ... Comme cibles thérapeutiques

A travers La synthèse d'inhibiteurs spécifiques pour les endosulfatases humaines nous voulons démontrer que celle-ci sont des cibles thérapeutiques. Cette idée vient du fait que ces enzymes sont impliqués dans plusieurs processus biologiques majeures, comme par exemple : la capacité à empêcher ou accélérer le développement tumoral, la régénération tissulaire. L'un des paramètres les plus important est que les HSulfs viennent modifier le profil de sulfatation des chaînes d'HS, changeant complètement la capacité des HS à interagir avec des facteurs de croissances ou des chimiokines.

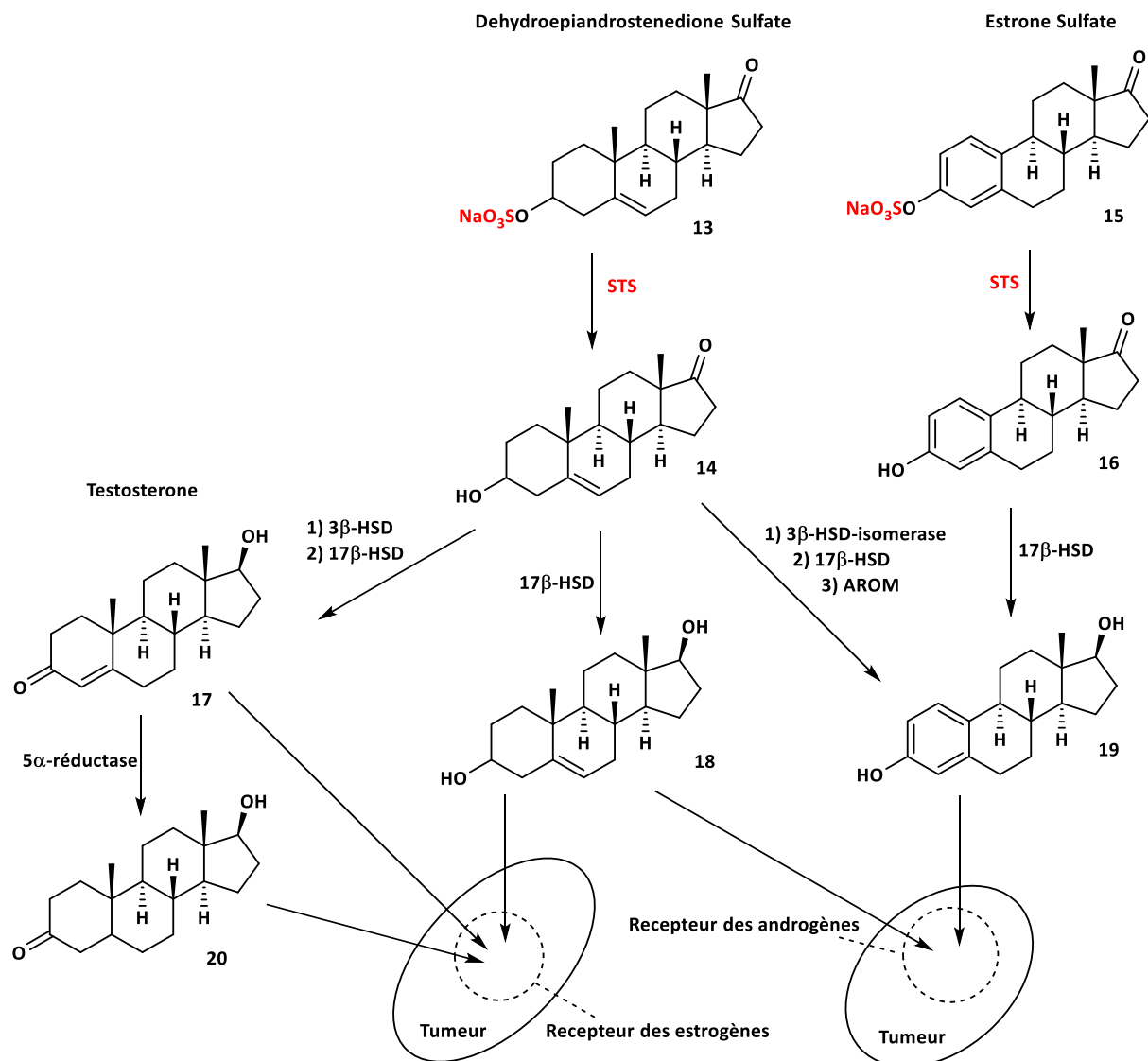
Les particularités que possèdent les HSulfs, comme leur localisation, ou leurs rôles, vis-à-vis des autres sulfatases humaines en font des cibles d'autant plus intéressantes. Un autre aspect attractif qu'ont les sulfatases est leur réactivité singulière permise par cette formylglycine. En effet à notre connaissance c'est la seule classe d'enzyme qui possède un résidu formylglycine impliqué dans la cascade réactionnelle enzymatique.

Dans ce chapitre nous expliciterons comment la stéroïde sulfatase est devenue une cible thérapeutique d'intérêt, c'est à l'heure actuelle la sulfatase humaine la plus étudiée.

Notre but est de démontrer que les HSulfs sont également des cibles thérapeutiques. Dans ce contexte deux aspects principaux sont particulièrement important. Le premier est les différences que les HSulfs ont avec les autres sulfatases humaines, ainsi que les différences entre les deux HSulfs. Le second est le rôle important qu'occupe les HSulfs dans plusieurs pathologies (cancers, maladies inflammatoires...).

1.3.1. Dans des cas de cancer

1.3.1.1. La stéroïde sulfatase et le cancer



*3β-HSD (isomérase) : HydroxyStéroïde Dehydrogénase en position 3β isomérisante ou non,
17β-HSD : HydroxyStéroïde Dehydrogénase en position 17, AROM : Aromatase,
5α-réductase : Réductase en position 5α.*

Schéma 6 : Importance de la STS dans le processus de croissance des tumeurs.

La STS est impliquée dans le développement des cancers hormonaux dépendants tels que ceux de la prostate, du sein et du cancer de l'endomètre.^{47,48} Dans le cas du cancer du sein, la STS est surexprimée, afin de palier à une trop forte concentration en dehydroepiandrosterone (DHEAS) et en estrone sulfate (ES).⁴⁹

⁴⁷ Knusden K. E. et al., Trends in Endocrinology and Metabolism, **2010**, 21, 315.

⁴⁸ de Bono, J. S.; Logothetis, C. J.; Molina, A.; Fizazi, K.; North, S.; Chu, L.; Chi, K. N.; Jones, R. J.; Goodman, O. B. J.; Saad, F.; Staffurth, J. N.; Mainwaring, P.; Harland, S.; Flaig, T. W.; Hutson, T. E.; Cheng, T.; Patterson, H.; Hainsworth, J. D.; Ryan, C. J.; Sternberg, C. N.; Ellard, S. L.; Fléchon, A.; Saleh, M.; Scholz, M.; Efstathiou, E.; Zivi, A.; Bianchini, D.; Lortol, Y.; Chieffo, N.; Kheoh, T.; Haqq, C. M.; Scher, H. I. *New England Journal of Medicine* **2011**, 364 (21), 1995–2005.

⁴⁹ Landeghem, A. A. J. van; Poortman, J.; Nabuurs, M.; Thijssen, J. H. H. *Cancer Res* **1985**, 45 (6), 2900–2906.

C'est en étant tout en haut de la cascade enzymatique que la STS régule la production d'androgène et d'estrogène (Schéma 6). En effet les stéroïdes sulfatés sont principalement utilisés pour le transport. La STS qui régule localement la libération des stéroïdes, est devenue une cible thérapeutique importante dans les cas de cancers hormonaux dépendants. C'est dans l'idée de contrôler l'activité enzymatique de la STS pour ainsi réguler la production d'hormones et donc par incidence contrôler la croissance de la tumeur qui serait potentiellement ralentie, voir arrêtée, que ces recherches ont été menées.

1.3.1.2. Cas des endosulfatases humaines

Tout comme la STS, les HSulfs ont un rôle précoce dans plusieurs processus biologiques et sont également impliquées dans des cancers. Les cancers qui concernent les HSulfs sont par exemple les cancers du sein, celui des ovaires, des poumons, des hépatocarcinomes ou encore des néoplasies.^{39,43,51-57}

Malgré cette forte implication dans ces cas de cancers leurs rôles restent encore mal compris. En effet, les deux sulfatases semblent avoir des propriétés différentes. HSulf-2 a plutôt un effet pro-oncogénique, alors que HSulf-1 a plutôt un effet anti-oncogénique.^{50,58,59} Pour Sulf-1, il a été montré qu'elle est corrélée à un pronostic vital défavorable dans le cas du cancer gastrique et des adénocarcinomes du poumons.^{53,60} En ce qui concerne Sulf-2, son

⁵⁰ Lai, J.; Chien, J.; Staub, J.; Avula, R.; Greene, E. L.; Matthews, T. A.; Smith, D. I.; Kaufmann, S. H.; Roberts, L. R.; Shridhar, V. J. *Biol. Chem.* **2003**, *278* (25), 23107–23117.

⁵¹ Narita, K.; Chien, J.; Mullany, S. A.; Staub, J.; Qian, X.; Lingle, W. L.; Shridhar, V. J. *Biol. Chem.* **2007**, *282* (19), 14413–14420.

⁵² Morimoto-Tomita, M.; Uchimura, K.; Bistrup, A.; Lum, D. H.; Egeblad, M.; Boudreau, N.; Werb, Z.; Rosen, S. D. *Neoplasia* **2005**, *7* (11), 1001–1010.

⁵³ Bret, C.; Moreaux, J.; Schved, J.-F.; Hose, D.; Klein, B. *J Transl Med* **2011**, *9*, 72.

⁵⁴ Lemjabbar-Alaoui, H.; van Zante, A.; Singer, M. S.; Xue, Q.; Wang, Y.-Q.; Tsay, D.; He, B.; Jablons, D. M.; Rosen, S. D. *Oncogene* **2009**, *29* (5), 635–646.

⁵⁵ Dai, Y.; Yang, Y.; MacLeod, V.; Yue, X.; Rapraeger, A. C.; Shriver, Z.; Venkataraman, G.; Sasisekharan, R.; Sanderson, R. D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (48), 40066–40073.

⁵⁶ Rosen, S. D.; Lemjabbar-Alaoui, H. *Expert Opin Ther Targets* **2010**, *14* (9), 935–949.

⁵⁷ Zheng, X.; Gai, X.; Han, S.; Moser, C. D.; Hu, C.; Shire, A. M.; Floyd, R. A.; Roberts, L. R. *Genes, Chromosomes and Cancer* **2013**, *52* (3), 225–236.

⁵⁸ Lai, J.P.; Sandhu D. S.; Moser C. D.; Cazanave S. C.; Oseini A. M.; Shire A. M.; Shridhar V.; Sanderson O. S.; Roberts L. R. *Journal of Hepatology* **2009**, *50*, 1112–1121.

⁵⁹ Lai J.P.; Yu C.; Moser C. D.; Aderca I.; Han T.; Garvey T. D.; Murphy L. D.; Garrity-Park M. M.; Shridhar V.; Adjei A. A.; Roberts L. R. *Gastroenterology* **2006**, *130*, 2130–2144.

⁶⁰ Hur K.; Han T.S.; Jung E.J.; Yu J.; Lee H.J.; Kim W. H.; Goel A.; Yang H.K. *J Pathol* **2012**, *228*, 88–98.

expression a été démontrée corrélée à un faible pronostic vital dans le cas de carcinomes hépatocellulaire ainsi que dans des myélomes multiples.^{53,61}

1.3.2. Dans des maladies inflammatoires

1.3.2.1. La stéroïde sulfatase et l'inflammation chronique du foie

La stéroïde sulfatase est impliquée dans l'inflammation chronique du foie.^{62,63} Grâce à l'action d'un agoniste du facteur de transcription NF- κ B, le groupe de Xie Wen a montré l'augmentation de l'expression de la STS. Cette augmentation a pour effet d'augmenter la concentration en estrogène libre.⁶⁴

1.3.2.2. Les endosulfatases et les maladies inflammatoires

HSulf-2 est impliquée dans la fibrose rénale.⁶⁵ HSulf-1 et 2 sont impliquées dans la fibrose pulmonaire, dans l'arthrite et dans l'ostéoarthrite.^{66,40,67}

Dans la majorité des maladies inflammatoires où les HSulfs sont impliquées une augmentation ou une diminution de l'expression de celles-ci est constatée, et par conséquent s'en suit une modification anormale du nombre de sulfates portés par les HSPGs. Cette modification de 6-*O*-sulfatation des chaînes d'heparane sulfate des protéoglycanes entrainerait, dans le cas de la fibrose rénale, leurs 2-*O* et la *N*-désulfatation.

Comme dans les cas de cancer, cette surexpression des HSulfs entraine donc une diminution de la régulation des sulfates, les HSulfs peuvent ainsi hydrolyser de manière anarchique.

⁶¹ Lai, J.-P.; Sandhu, D. S.; Yu, C.; Han, T.; Moser, C. D.; Jackson, K. K.; Guerrero, R. B.; Aderca, I.; Isomoto, H.; Garrity-Park, M. M.; Zou, H.; Shire, A. M.; Nagorney, D. M.; Sanderson, S. O.; Adjei, A. A.; Lee, J.-S.; Thorgeirsson, S. S.; Roberts, L. R. *Hepatology* **2008**, *47* (4), 1211–1222.

⁶² Adlercreutz, H. *J Endocrinol* **1970**, *46* (1), 129–163.

⁶³ Long, R. S.; Simmons, E. E. *AMA Arch Intern Med* **1951**, *88* (6), 762–769.

⁶⁴ Jiang, M.; Klein, M.; Zanger, U. M.; Mohammad, M. K.; Cave, M. C.; Gaikwad, N. W.; Dias, N. J.; Selcer, K. W.; Guo, Y.; He, J.; Zhang, X.; Shen, Q.; Qin, W.; Li, J.; Li, S.; Xie, W. *Journal of Hepatology* **2016**, *64* (1), 44–52.

⁶⁵ Alhasan, A. A.; Spielhofer, J.; Kusche-Gullberg, M.; Kirby, J. A.; Ali, S. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (29), 20295–20306.

⁶⁶ Yue, X.; Lu, J.; Auduong, L.; Sides, M. D.; Lasky, J. A. *Glycobiology* **2013**, *23* (6), 709–719.

⁶⁷ Otsuki, S.; Taniguchi, N.; Grogan, S. P.; D'Lima, D.; Kinoshita, M.; Lotz, M. *Arthritis Research & Therapy* **2008**, *10* (3), R61.

1.3.3. Recherche de sélectivité

Afin d'envisager une inhibition totalement sélective de ces endosulfatases, il va falloir comprendre les différences impliquées dans les multiples pathologies humaines. En effet les HSulfs ne réagissent pas de la même manière lors d'une même pathologie. Comprendre ces différences serait utiles.

1.3.3.1. Différences entre les HSulfs et les sulfatases

Hormis la longueur de la chaîne peptidique des sulfatases, leurs localisations ainsi que leurs différents domaines de reconnaissance, il existe des différences supplémentaires entre les sulfatases. L'une d'entre elles est l'environnement dans lequel les sulfatases se trouvent. Nous avons déjà vu que HSulf 1 et 2 étaient extracellulaires, et par conséquent elles se situent dans un environnement avec un pH = 7.5 alors que les sulfatases lysosomales hydrolysent les groupement sulfates dans un environnement avec un pH aux alentours de 5.

1.3.3.2. Différences entre HSulf-1&2

La première différence entre les HSulfs est leur différence de séquence. Bien qu'ayant une homologie de séquence de 64%, les deux sulfatases partagent une longueur, et une structuration spatiale identique (Tableau 5).⁹

Tableau 5 : Description de la séquence des HSulfs

Entrée	Paramètres	HSulf-1	HSulf-2
1	Longueur	871	870
2	Séquence clivable	1-22	1-24
3	CAT	42-414	43-415
4	DR	415-735	416-715
5	G6S domaine	736-843	717-824

Malgré ces différences de séquence, les HSulfs présentent une même activité enzymatique sur le substrat aromatique 4-MUS, mais une activité enzymatique différente sur des octasaccharides imitant les domaines S des HS.⁴⁵ HSulf-1 procède à une désulfatation complète des octasaccharides, alors que pour HSulfs-2, après 48h, la première et la deuxième désulfatation sont complètes alors la 3^{ème} et dernière désulfatation possible est observée à 50%. Ces indices nous montrent que le domaine de reconnaissance joue un rôle important dans l'activité enzymatique des HSulfs.

La disparité de leur expression est une autre différence majeure. Les HSulfs sont exprimées dans plusieurs tissus. En ce qui concerne HSulf-1, on la retrouve principalement dans le rein, le cerveau, le poumon, les muscles, l'estomac, les testicules, le placenta et les ovaires. Pour HSulf-2, elle est majoritairement présente dans les tissus tels que les ovaires, l'utérus, le cerveau, les muscles.

Des différences sont constatées également dans les pathologies. Suivant les cas de cancer, une surexpression de HSulf-1 est signe de bon pronostic vital alors que pour HSulf-2 c'est le contraire.^{53, 61, 64-69}

1.3.4. Des potentielles cibles thérapeutiques

D'un point de vue biologique, s'intéresser à l'inhibition des HSulfs est un défi sur plusieurs points, deux enzymes qui réagissent par le même mécanisme, avec son résidu FGly si particulier, mais qui donnent des résultats différents selon la cible étudiée. Une mauvaise compréhension des pathologies dans lesquelles elles sont impliquées avec parfois des différences dans la manière dont les HSulfs se comportent dans ses pathologies. En effet dans certains cas de cancer HSulf-1 aura un effet pro-oncogénique, alors que pour HSulf-2 aura l'effet opposé. Des différences de localisation et de domaine de reconnaissance qui peuvent

⁶⁸ Khurana, A.; Liu, P.; Mellone, P.; Lorenzon, L.; Vincenzi, B.; Datta, K.; Yang, B.; Linhardt, R. J.; Lingle, W.; Chien, J.; Baldi, A.; Shridhar, V. *Cancer Res* **2011**, *71* (6), 2152–2161.

⁶⁹ Narita, K.; Staub, J.; Chien, J.; Meyer, K.; Bauer, M.; Friedl, A.; Ramakrishnan, S.; Shridhar, V. *Cancer Res* **2006**, *66* (12), 6025–6032.

conduire à une sélectivité voir peut-être même à une spécificité. Tous ces éléments font qu'il y a un réel intérêt à poursuivre les investigations afin de valider ou invalider les endosulfatases humaines comme des cibles thérapeutiques.

2. Objectifs de la thèse

2.1. Construction d'inhibiteurs

C'est dans ce contexte que la recherche d'inhibiteurs pour les HSulfs a débuté. Nous avons décidé de nous inspirer des résultats obtenus sur les inhibiteurs de STS, en les combinant à ce que nous savions sur les HSulfs.

2.1.1. L'inhibition des Sulfatases

La recherche d'inhibiteurs des STS s'est faite dans le cadre des pathologies liées aux cancers hormonaux dépendants.

2.1.1.1. Une recherche massive d'inhibiteurs pour la STS

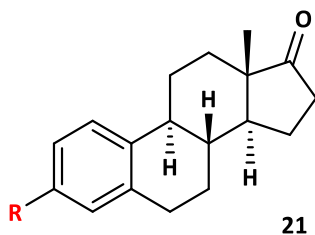
La synthèse d'inhibiteurs des STS a été réalisée par étapes. La première a été la synthèse de molécules possédant des squelettes Estrone et dihydroepiandrostène sulfates.^{70,71}

Cette recherche de molécules a permis de déterminer quelles fonctions chimiques étaient capable d'inhiber l'enzyme. Pour cela plusieurs fonctions chimiques ont été installées sur des squelettes Estrone, estradiol, ou stéroïdal (Tableau 6).

⁷⁰ Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (2), 219–221.

⁷¹ Purohit, A.; Williams, G. J.; Howarth, N. M.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J. *Biochemistry* **1995**, *34* (36), 11508–11514.

Tableau 6 : Recherche des meilleures fonctions chimiques inhibitrices



Entrée	Composé	R	Inhibition
1	21a	S(O) ₂ Cl	92% à 300 μM
2	21b	SH	10% à 10 μM
3	21c	OTs	91% à 10 μM
4	21d	S(O) ₂ NH ₂	45% à 300 μM
5	21e	OS(O) ₂ N(CH ₃) ₂	79% à 0.1 μM
6	21f	OS(O) ₂ NHCH ₃	87% à 1 μM
7	21g	NHS(O) ₂ NH ₂	53% à 50 μM
8	21h	NHC(O)NH ₂	IC ₅₀ = 12.9 μM
9	21j	OS(O) ₂ NH ₂	IC ₅₀ = 4 nM

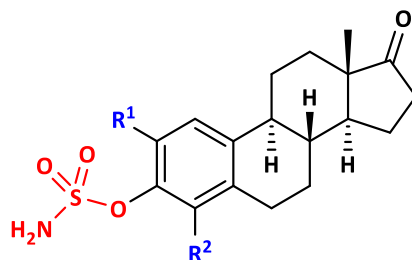
Les résultats du Tableau 6 donnent une bonne idée de ce à quoi doit ressembler la fonction inhibitrice de la STS. En effet les meilleures inhibitions ont été obtenus avec une fonction chimique espaçant le noyau aromatique avec un hétéroatome et possédant un centre électrophile (Entrées 3 puis 5 à 9). On remarque également que la fonction inhibitrice attachée au squelette estrone se doit d'être la moins encombrée possible (entrées 5, 6 vs 9). Le meilleur résultat a été obtenu avec le composé **21j**, portant comme fonction inhibitrice un sulfamate, avec une IC₅₀ de 4 nM.

Fort de cette découverte, la fonction sulfamate est devenue la fonction inhibitrice par excellence, bien que les recherches sur les fonctions inhibitrices aient continué.⁷²

⁷² Ahmed, V.; Liu, Y.; Silvestro, C.; Taylor, S. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (24), 8564–8573.

La deuxième étape de cette recherche de molécules a été de modifier le squelette de l'estrone sulfamate (EMATE) du composé **21j** afin d'améliorer l'activité inhibitrice. Dès lors plusieurs groupes ont cherché à substituer l'aryle par divers groupements fonctionnels (Tableau 7).⁷³

Tableau 7 : Résultat des tests biologiques sur EMATE substitué.



Entrée	Composé	R ¹	R ²	IC ₅₀ (nM)
1	21da	OMe	H	30
2	21db	NO ₂	H	70
3	21dc	H	NO ₂	0,8
4	21dd	H	H	4

De façon surprenante le cholestérol et le DHEA sulfamoylés testés avec une concentration de 30 μ M n'ont donné aucune activité inhibitrice.^{74,75} Cela peut être rationalisé par la comparaison des groupements partant. Dans l'hypothèse d'un mécanisme enzymatique identique à la desulfatation, avoir un noyau aromatique lié à une fonction sulfamate permet d'avoir un départ d'un « phénolate » dans le cas de l'EMATE, alors que dans le cas du cholestérol et du DHEA sulfamoylés, il y aurait départ d'un « alcoolate » qui est un moins bon groupement partant qu'un phénolate. Plusieurs autres squelettes ont été testés, comme des indoles ou encore des coumarines.^{76,77}

⁷³ Purohit, A.; Vernon, K. A.; Hummelinck, A. E.; Woo, L. W.; Hejaz, H. A.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *64* (5–6), 269–275.

⁷⁴ Nussbaumer, P.; Lehr, P.; Billich, A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (19), 4310–4320.

⁷⁵ Ciobanu, L. C.; Boivin, R. P.; Luu-The, V.; Poirier, D. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18* (1), 15–26.

⁷⁶ Woo, L. W. L.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (7), 1349–1351.

⁷⁷ Birnböck, H.; von Angerer, E. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39* (11), 1709–1713.

2.1.1.2. Une molécule sulfamoylée en phase II

Ce sont vers ces derniers motifs, et notamment les coumarines, que les résultats ont été les plus probants car les recherches sur les coumarines ont mené à la synthèse de l'Irosustat.^{78,79} Cette coumarine est substituée en position 3, 4 par un cycloheptyle, ainsi qu'en position 7 par un sulfamate (Figure 11).

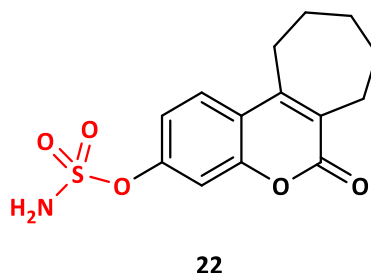


Figure 11 : Formule topologique de l'irosustat.

L'Irosustat, molécule **22**, est le premier inhibiteur à entrer en test sur des cancers hormono-dépendants du sein pour des patientes post-ménopausées. Il ira jusqu'en phase I dans le cadre de la thérapie du cancer avancé de la prostate, et en phase II pour traiter le cancer avancé du sein. Le développement de l'Irosustat n'ira pas plus loin, malgré des résultats encourageants, cette molécule ne parviendra pas à surpasser les résultats obtenus avec l'acétate de mégestrol. Néanmoins Ipsen cherche à combiner l'Irosustat en plurithérapie.

⁷⁸ Stanway, S. J.; Purohit, A.; Woo, L. W. L.; Sufi, S.; Vigushin, D.; Ward, R.; Wilson, R. H.; Stanczyk, F. Z.; Dobbs, N.; Kulinskaya, E.; Elliott, M.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Coombes, R. C. *Clin Cancer Res* **2006**, *12* (5), 1585–1592.

⁷⁹ Woo, L. W. L.; Ganeshapillai, D.; Thomas, M. P.; Sutcliffe, O. B.; Malini, B.; Mahon, M. F.; Purohit, A.; Potter, B. V. L. *ChemMedChem* **2011**, *6* (11), 2019–2034.

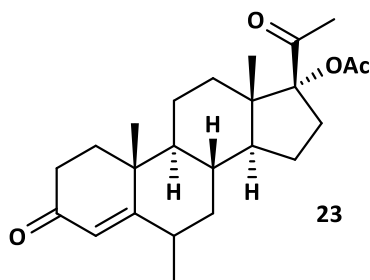


Figure 12 : Représentation de l'acétate de mégésterol.

2.1.1.3. Les inhibiteurs des HSulfs

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la synthèse de molécules inhibitrices pour HSulf-2. Ces recherches ont mené à l'élaboration de plusieurs molécules isostère du sulfamate (Figure 13).

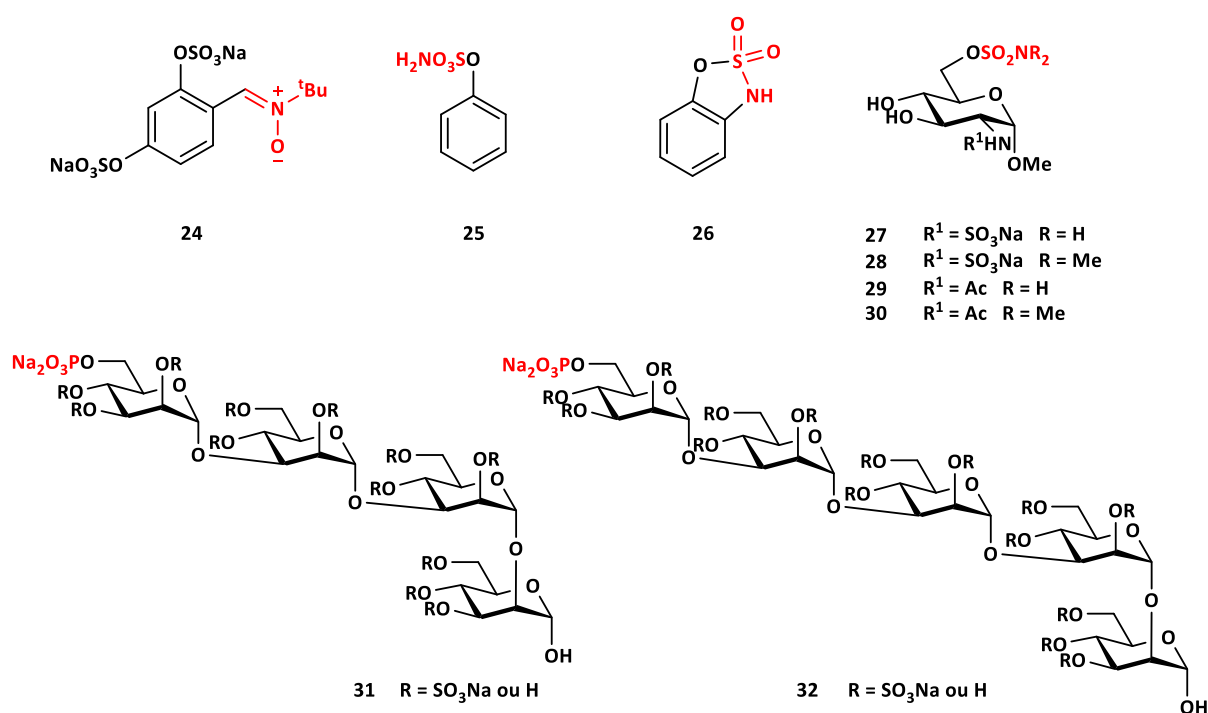


Figure 13 : Molécules inhibitrices pour HSulf-2

Le composé **24** nommé OKN-007 a montré des propriétés inhibitrices sur HSulf-2. Le groupe de Lewis R. Roberts a montré que le composé **24**, molécule comportant une fonction nitro, à une action antitumorale contre les carcinomes hépatocellulaires.^{57,80}

Le PI-88 est un mélange du phosphomannotetraose **31** et du phosphomannopentaose **32** (ratio allant de 1 :2 jusqu'à 2 :3) avec une moyenne de 2,9 à 3,1 sulfate par mannose.⁸¹ Le PI-88 a été testé en inhibition, les concentrations inhibitrices pour chaque endosulfatase, ont été déterminées. En ce qui concerne HSulf2, elle est de IC₅₀ d'environ 0.5 nmol/mL et de IC₅₀ d'environ 1.1 nmol/mL pour HSulf-1.⁸²

Les composés **25** et **26** ont été synthétisés par le groupe de Chi-Huey Wong.⁸³ De la même manière que le 4-MUS est un substrat des endosulfatases, les composés possédant un sulfamate aromatique peuvent être des molécules inhibitrices.⁸¹⁻⁸³ C'est dans cet optique que les molécules **25** et **26** ont été testées. A une concentration de 0,5 mM ; ces deux molécules présentent une inhibition de l'ordre de 20% pour HSulf-2. En ce qui concerne HSulf-1, un écart apparait entre le composé **25** qui provoque une inhibition seulement de 10% alors que la molécule **26** elle reste aux alentours de 20%.

Les monosaccharide **27-30** reprennent la structure de la glucosamine. Le groupe de Chi-Huey Wong propose des molécules possédant une position 2 N-fonctionnalisées par un groupement sulfate ou un groupement acétyle.⁸³ Les résultats en inhibition sont nettement meilleurs, comparés aux composés **25** et **26**. En effet à la même concentration (0,5 mM), le composé **27** inhibe à 70% HSulf-1, et à 80% HSulf-2. Pour le composé **28**, les inhibitions sont respectivement de 65% et 55%. Les composés **29** et **30** ont été testés à 5mM, pour HSulf-1, ils ont une inhibition de 40% et 55%, pour HSulf-2 les inhibitions sont de 30% et 50%.

⁸⁰ Coutinho de Souza, P.; Mallory, S.; Smith, N.; Saunders, D.; Li, X.-N.; McNall-Knapp, R. Y.; Fung, K.-M.; Towner, R. A. *PLOS ONE* **2015**, *10* (8), e0134276.

⁸¹ Khachigian, L. M.; Parish, C. R. *Cardiovasc. Drug. Rev.* **2006**, *22* (1), 1–6.

⁸² Hossain, M. M.; Hosono-Fukao, T.; Tang, R.; Sugaya, N.; van Kuppevelt, T. H.; Jenniskens, G. J.; Kimata, K.; Rosen, S. D.; Uchimura, K. *Glycobiology* **2010**, *20* (2), 175–186.

⁸³ Schelwies, M.; Brinson, D.; Otsuki, S.; Hong, Y.-H.; Lotz, M. K.; Wong, C.-H.; Hanson, S. R. *ChemBioChem* **2010**, *11* (17), 2393–2397.

⁸⁴ Hanson, S. R.; Whalen, L. J.; Wong, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (24), 8386–8395.

⁸⁵ Bojarová, P.; Denehy, E.; Walker, I.; Loft, K.; De Souza, D. P.; Woo, L. W. L.; Potter, B. V. L.; McConville, M. J.; Williams, S. J. *ChemBioChem* **2008**, *9* (4), 613–623.

⁸⁶ Bojarová, P.; Williams, S. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (2), 477–480.

Bien que l'inhibition reste de l'ordre du millimolaire, les inhibiteurs de type glucosamine améliorent les résultats en inhibition que ce soit pour HSulf-1 ou 2.

2.1.2. Choix du sulfamate

La fonction sulfamate permet l'inhibition des sulfatases de manière irréversible.^{87,88}

2.1.2.1. Mécanismes d'inhibitions

Alors que le mécanisme enzymatique d'hydrolyse des sulfatases est plutôt admis par la communauté, de nouvelles interrogations surviennent quant au(x) mode(s) d'inhibition(s) des sulfatases par cette fonction sulfamate. Plusieurs groupes de recherche ont cherché à comprendre comment fonctionne l'inhibition de la STS, en s'intéressant aux sulfatases cristallisées ARSA, ARSB et PARS.⁸⁴ La réactivité particulière des sulfatases couplées à une fonction inhibitrice plutôt semblable aux sulfates font que le mécanisme reste discuté.

A l'image du groupement sulfate lors de l'hydrolyse, la fonction sulfamate peut réagir par son centre sulfonyle électrophile ou par son azote nucléophile, chargé ou non, ce qui conduit à 2 cascades réactionnelles possibles (Figure 14).⁸⁹

⁸⁷ Ishida, H.; Sato, N.; Hosogi, J.; Tanaka, H.; Kuwabara, T. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *108* (1–2), 17–22.

⁸⁸ Bojarová, P.; Williams, S. J. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12* (5), 573–581.

⁸⁹ Woo, L. L.; Purohit, A.; Malini, B.; Reed, M. J.; Potter, B. V. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (10), 773–791.

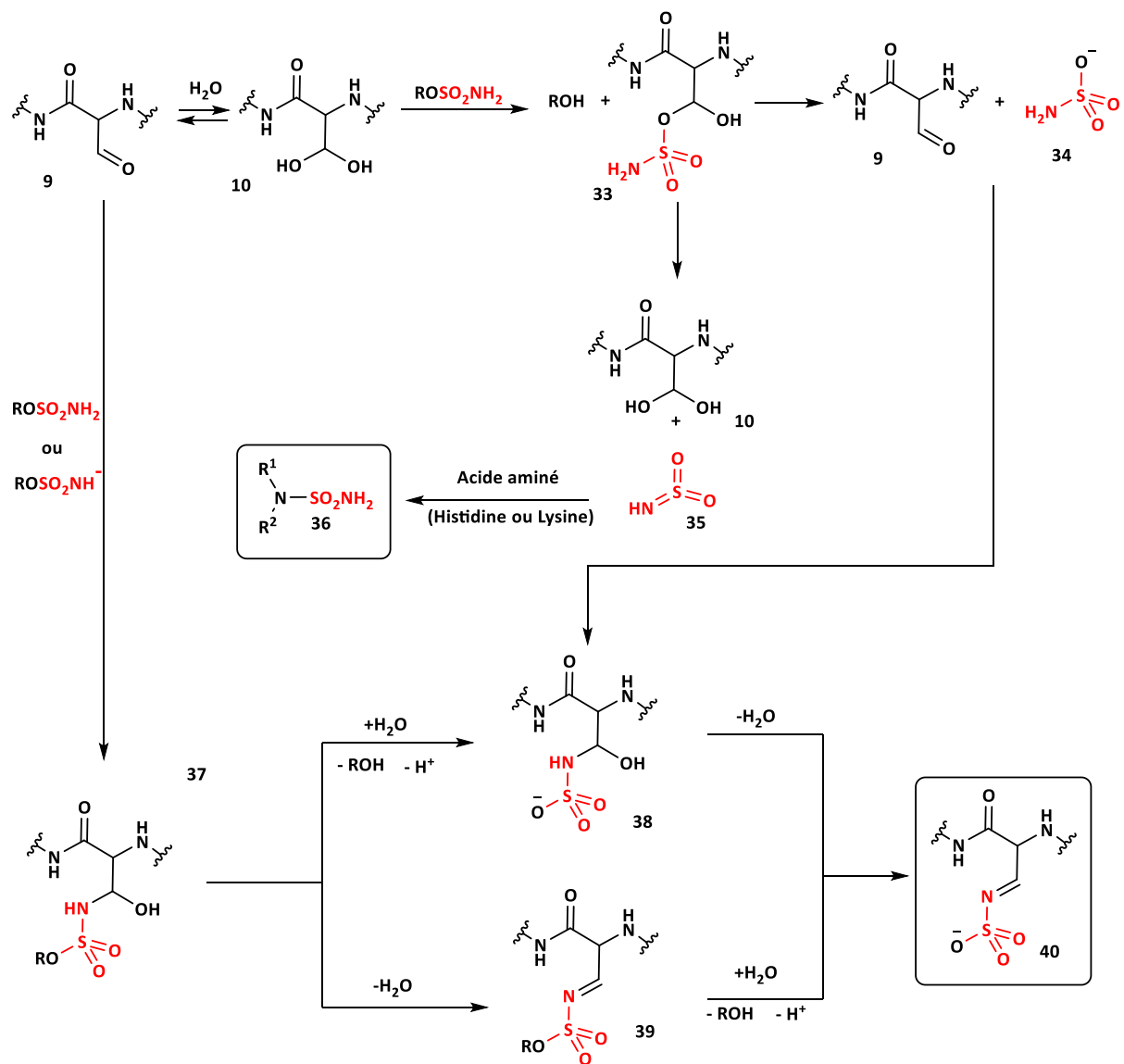


Figure 14 : Mécanismes d'inhibition proposés pour les sulfatases.

Une première voie commence avec la réaction de la FGH **10** qui peut réagir par une réaction de transsulfamoylation avec l'inhibiteur sulfamoylé et ainsi donner le composé **33**. Celui-ci peut subir une élimination par l'hydroxyle libre de **33** pour donner la FGly et la base conjugué de l'acide sulfamique. Une élimination peut également avoir lieu par l'azote du groupement sulfamate pour donner **10** et du dioxyde d'iminosulfane **35**. Le dérivé **35** est une espèce électrophile qui peut subir une attaque de la part des histidines ou lysines proches de la formylglycine dans le site catalytique et mener à des produits tel que **36**.

La deuxième voie part de la FGly **9**, celle-ci peut subir une attaque nucléophile du sulfamate ou de sa base conjuguée. On obtient le produit **37** qui peut évoluer via une hydrolyse en **38**, qui peut également provenir de la réaction de **9** avec **34**. Le composé **38** peut enfin donner **40** après déshydratation. Ce même composé **40** peut être obtenu à partir de **37** en changeant l'ordre des réactions, on obtient donc après l'élimination d'une molécule d'eau un intermédiaire **39** de type imino-sulfamate qui sera hydrolysé en **40**.

Malgré le manque d'informations sur la réactivité des sulfamates avec les sulfatases, des suppositions ont été émises pour expliquer l'inhibition. Les inhibiteurs comportant une fonction sulfamate sont susceptibles de changer l'architecture du site catalytique en fonctionnalisant les hétéroatomes nucléophiles par un sulfamate, ce sont les composés de type **36**.⁸⁹⁻⁸⁹

Une autre piste pour expliquer l'inhibition des sulfatases serait la transformation de l'aldéhyde de la FGly en iminosulfate qui serait inerte au sein du site catalytique.^{89,84}

Les études du groupe de Spencer J. Williams et de Sabbir Ahmed ont trouvé un rationnel entre le pKa des phénols (ArOH/ArO⁻) correspondant au sulfamate et la capacité à inhiber les sulfatases.^{85,93,94,95} Ils en déduisent que plus les couples acide/base phénol/phénolate ont des pKa bas, plus l'inhibition augmente. En effet plus le pKa du couple associé au phénolate sera faible, plus la base conjuguée sera stabilisée, et donc sa capacité à être un bon groupement partant augmente. Cela traduit une certaine fragilité au niveau de la liaison ArO-S.

En ce qui concerne les composés possédant un sulfamate aromatique, les pKa du couple ROSO₂NH₂/ROSO₂NH⁻ sont dans une gamme allant de 7 à 11.⁹⁶ Par exemple le pKa de l'estrone sulfamate **20j** a été calculé à 9.5 dans du méthanol contenant 30% d'eau.⁹³ Ce qui

⁹⁰ McCaw, C. J. A.; Spillane, W. J. *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19* (8–9), 512–517.

⁹¹ Denehy, E.; White, J. M.; Williams, S. J. *Chem. Commun.* **2006**, No. 3, 314–316.

⁹² Spillane, W. J.; McGrath, P.; Brack, C.; O'Byrne, A. B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (19), 6313–6316.

⁹³ Sahm, U. G.; Williams, G. J.; Purohit, A.; Isabel Hidalgo Aragones, M.; Parish, D.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L.; Pouton, C. W. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1996**, *2* (1), 17–20.

⁹⁴ Williams, A.; Douglas, K. T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, No. 14, 1727–1732.

⁹⁵ Ahmed, S.; Owen, C. P.; James, K.; Patel, C. K.; Patel, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (7), 899–902.

⁹⁶ Thea, S.; Cevasco, G.; Guanti, G.; Williams, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, No. 21, 1582.

veut dire que dans l'environnement du site catalytique de la STS et des HSulfs, à un pH aux alentours de 7.5, l'équilibre sera déplacé en favorisant la forme neutre, toutefois l'anion coexistera dans des proportions non négligeables. Le fait que le sulfamate puisse exister sous sa forme de base conjuguée, ainsi que la liaison ArO-S soit sensible, a permis à plusieurs groupes de postuler le départ spontané du dioxyde d'iminosulfane **35** à partir du sulfamate, ou de sa base conjuguée (Schéma 7).^{92,94,96,37,97}

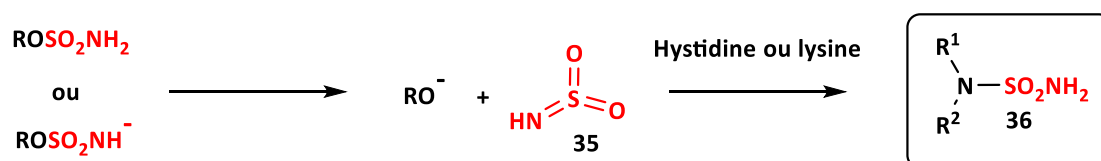


Schéma 7 : Conséquence de l'élimination du dioxyde d'iminosulfane.

Même si la plupart de ces études ont été effectuées sur des sulfamates aromatiques, on peut fortement supposer pour les sulfamates aliphatiques sera la réactivité se déroulera de manière identique, mais les groupements alkyle des molécules **27-30** par exemple, en font de moins bon groupement partant comparés aux motifs phénoliques, ne facilitant ni l'hydrolyse menant à **33**, ni l'élimination « spontanée » pour donner l'alcoolate et le dioxyde d'iminosulfane **35**. Pourtant sur les endosulfatases, les meilleurs résultats en inhibition ont été obtenus avec ces molécules.

2.1.2.2. Une fonction bioactive

La fonction sulfamate n'est pas seulement active avec les sulfatases. On la retrouve sur plusieurs molécules thérapeutiques (Figure 15).⁹⁸

⁹⁷ Spillane, W. J.; Malaubier, J.-B. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (15), 2059–2062.

⁹⁸ Winum, J.-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J.-L.; Supuran, C. T. *Med. Res. Rev.* **2005**, 25 (2), 186–228.

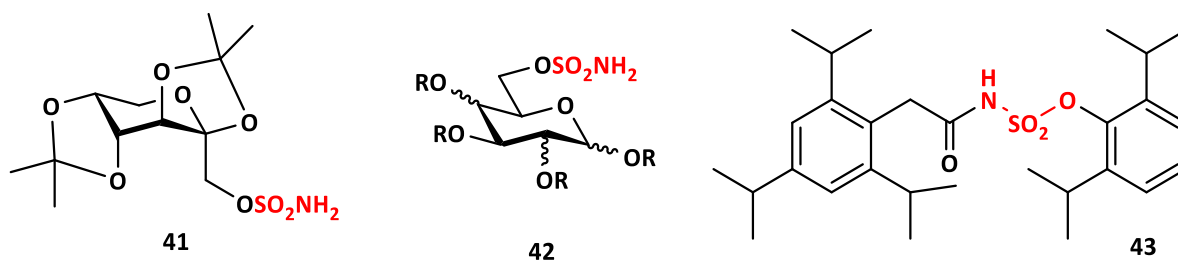


Figure 15 : Molécules sulfamoylés bioactive.

Par exemple, le topiramate **41** est un anticonvulsant disponible aux Etats-Unis d'Amérique, il permet l'inhibition de l'anhydrase carbonique II (CA II).⁹⁹ Cette enzyme permet l'hydratation du CO₂ en H₂CO₃ qui donne spontanément l'ion hydrogénocarbonate et un proton, elle a un rôle crucial dans la régulation du pH. Il y a eu donc une recherche importante d'analogues sulfamoylés du topiramate pendant ces dernières années. Elles ont mené, par exemple, à l'utilisation de D-glucose, D-mannose, D-galactose comme matières premières afin de préparer une multitude d'analogues sulfamoylés **42**.¹⁰⁰

D'autres molécules possédant un sulfamate ont montré des propriétés intéressantes, c'est le cas de l'avasimibe **43**, qui inhibe la cholestérol acyltransférase.¹⁰¹

Cette fonction n'est donc pas exclusive des sulfatases et même si notre but est de synthétiser des inhibiteurs spécifiques pour les endosulfatases, elle paraît être la fonction adéquate pour obtenir une bonne inhibition, cette fonction pourrait réagir sur d'autres protéines.

2.2. Utilisation du domaine de reconnaissance des H Sulfs

⁹⁹ Dodgson, S. J.; Shank, R. P.; Maryanoff, B. E. *Epilepsia* **2000**, *41 Suppl 1*, S35-39.

¹⁰⁰ Lopez, M.; Trajkovic, J.; Bornaghi, L. F.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (5), 1481–1489.

¹⁰¹ Raal, F. J.; Marais, A. D.; Klepack, E.; Lovalvo, J.; McLain, R.; Heinonen, T. *Atherosclerosis* **2003**, *171* (2), 273–279.

Les inhibiteurs **27**, **28**, **29**, **30**, synthétisés par le groupe de Chi-Huey Wong, nous indiquent que la fonction sulfamate ne suffit pas pour obtenir de bons résultats d'inhibitions.

2.2.1. Interactions Héparane Sulfate/domaine de reconnaissance

Notre analyse des résultats présentés par le groupe de Chi-Huey Wong, recoupés avec les recherches de Romain R. Vivès, nous indique qu'un monosaccharide n'interagit pas avec le domaine de reconnaissance, la longueur de la chaîne polysaccharidique est donc cruciale pour l'activité enzymatique (Figure 16).

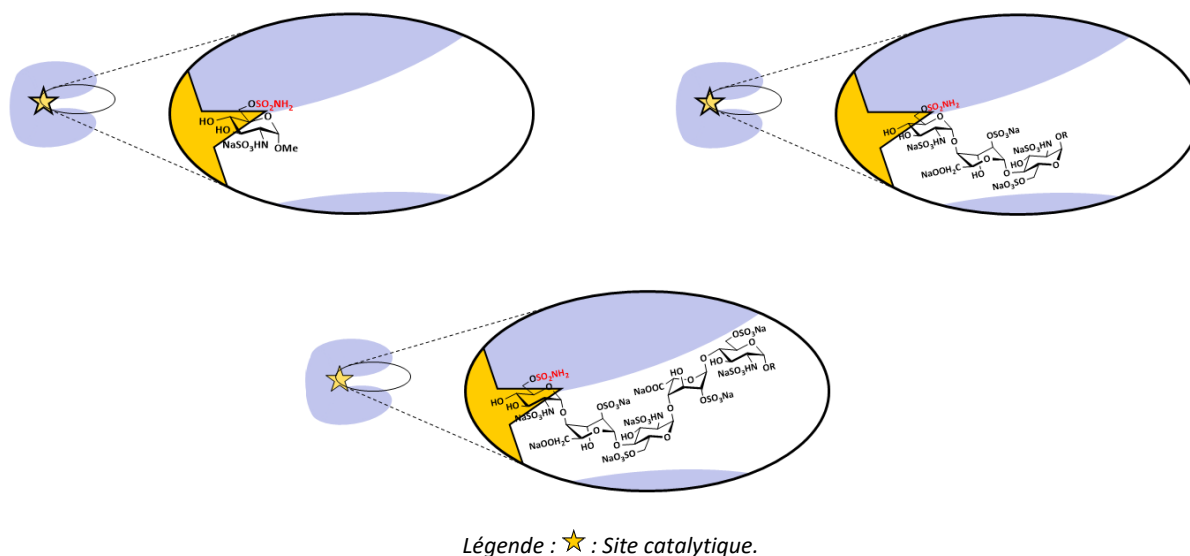


Figure 16 : Interactions DR – inhibiteurs de tailles différentes.

Afin de mieux comprendre l'inhibition des HSulfs notre objectif est donc d'augmenter la taille de la chaîne saccharidique portant la fonction sulfamate. Sachant que la sulfatase se déplace de l'extrémité non réductrice vers l'extrémité réductrice, le but est de placer la fonction inhibitrice sur une position 6 d'une glucosamine située du côté de l'extrémité non réductrice, permettant au sulfamate d'être au plus tôt en contact avec le site catalytique, laissant ainsi le reste de la chaîne le plus possible en interactions avec le domaine de reconnaissance. Il faudra donc une taille de polysaccharide assez grande pour être en

interaction avec le domaine de reconnaissance, mais pas trop grande pour éviter d'autres interactions avec d'autres protéines de la matrice extra cellulaire reconnaissant les HS.

2.2.2. Construction d'une série de molécules

Afin de trouver un inhibiteur pour les endosulfatases, nous avons décidé de synthétiser des oligosaccharides ayant des tailles allant du trisaccharide à l'heptasaccharide. Ces molécules doivent comporter le motif répétitif des domaines S des héparanes sulfates afin de maximiser les chances d'interactions avec le domaine de reconnaissance de l'enzyme (Figure 17).

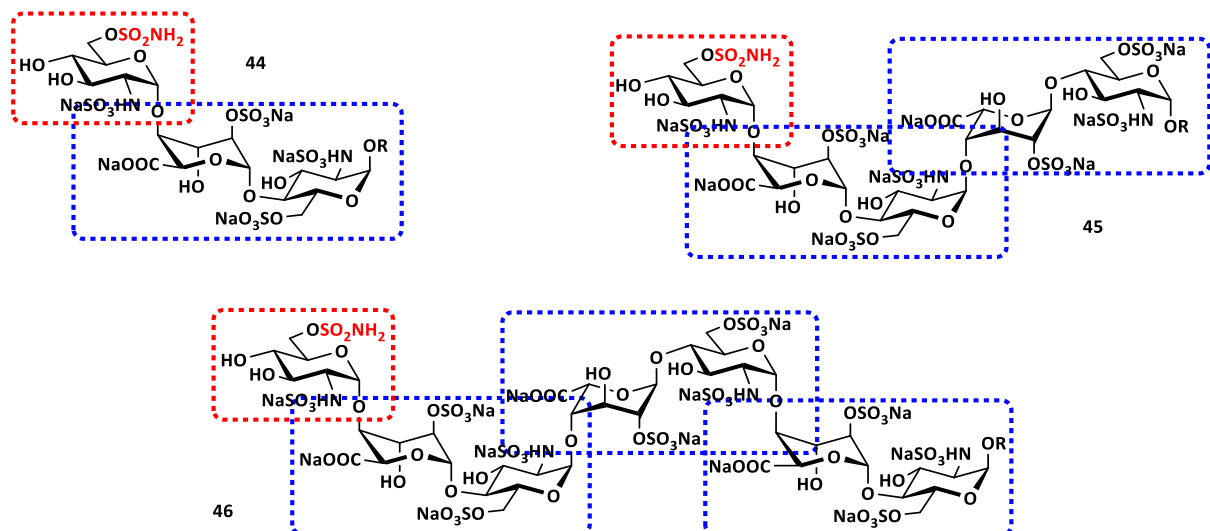


Figure 17 : Polysaccharides cibles utilisant les motifs des HS

Les oligosaccharides cibles comportent une glucosamine 6-O-sulfamoylée, 2-N-3-O-sulfatées du côté de l'extrémité réductrice, reliée grâce à une liaison 1,2-*cis* au motif disaccharidique répétitifs des domaines S des chaines d'HS, celui-ci aura un degré de polymérisation de un, deux ou trois.

3. Stratégie pour la synthèse de fragments d'Héparane sulfate

3.1. Stratégies existantes

Afin de synthétiser par voie chimique des oligosaccharides d'héparane sulfate, il convient d'établir une synthèse robuste et efficace. Les stratégies de synthèse et de groupements protecteurs sont dictées par la structure visée. En effet, le nombre d'unités saccharidiques, le nombre de sulfate, l'alternance entre les acides hexuroniques, la fonctionnalisation de la position de 2 de la glucosamine sont des éléments qui impliquent une multitude de conséquences synthétiques. Quelques groupes s'intéressent à la synthèse de ces fragments complexes et donc à l'élaboration de méthodologies pour la construction de telles architectures. Ces méthodologies reposent sur une stratégie de groupements protecteurs fiables et orthogonaux, ainsi que des méthodes de glycosylations rapides et stéréosélectives permettant d'arriver bien souvent à des bibliothèques de polysaccharides.

3.1.1. La glycosylation

La réaction de glycosylation va être l'élément clé qui va permettre la construction des polysaccharides. Il convient donc, comme pour les groupements protecteurs, de choisir soigneusement le groupement anomère, appelé « *groupement activable* », ainsi que l'espèce, ou le système d'activation, appelé « *promoteur* », de celui-ci, afin d'obtenir un bon rendement, et le diastéréoisomère désiré (Schéma 8).

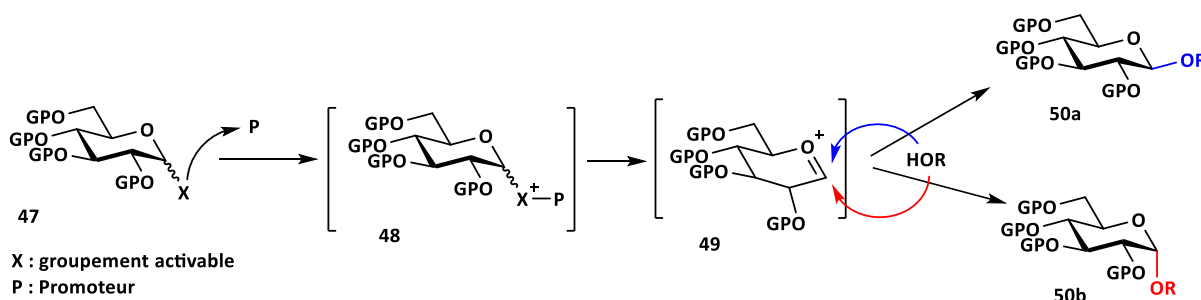


Schéma 8 : Réaction de glycosylation faisant intervenir un couple X/P

Les couples groupements activables/promoteurs doivent permettre au maximum d'obtenir une bonne stéréosélectivité. En effet, dans le cas de la synthèse d'oligosaccharides mime d'un (hétéro)polysaccharide, il convient de respecter la stéréochimie de la liaison glycosidique présente dans l'(hétéro)polysaccharide naturel. Les excès diastéréomériques doivent donc être corrects, car si il y a aucune sélectivité, la moitié du produit transformé en mauvais diastéréoisomère sera perdu, voire l'intégralité dans le cas où le mélange serait inséparable ou que la réaction donne uniquement que le mauvais diastéréomère.

Un des paramètres qui influe sur cette stéréosélectivité est l'utilisation d'un groupement participant. Ces groupements participants sont bien souvent des groupements protecteurs placés en position 2 et la plupart du temps des acyles. Le doublet non liant de l'oxygène de l'acyle vient former une liaison avec le carbone anomère permettant ainsi de délocaliser la charge positive qui se retrouve entre deux hétéroatomes. La nouvelle liaison carbone anomère – oxygène de l'acyle aura une relation 1,2-*cis* avec le groupement protecteur, bloquant ainsi une face du donneur, laissant alors à l'accepteur une seule possibilité d'attaque, celle en *trans* du groupement (Schéma 9).

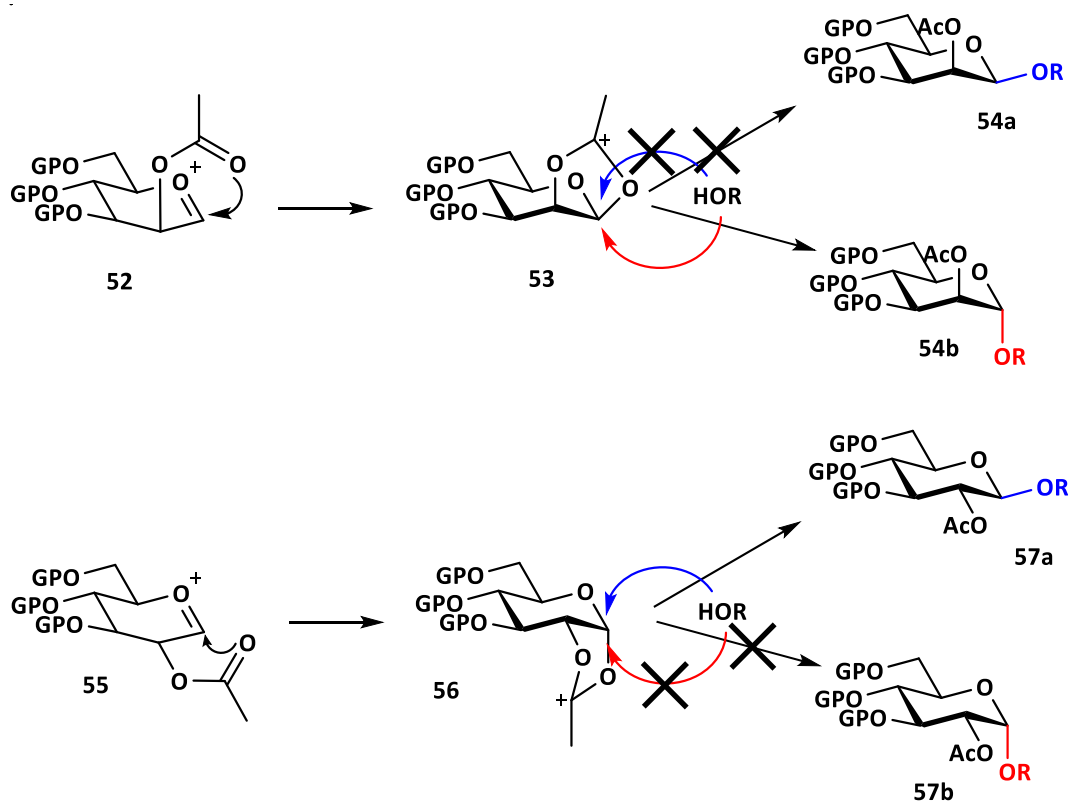


Schéma 9 : Glycosylation avec un groupement participant en position 2.

Dans le cas d'un mannose, molécule **52**, l'oxcarbénium interagit par la face supérieure avec l'acétate en position 2. Cette interaction force l'accepteur à venir par en dessous et permet de former une liaison 1,2-*trans* axiale. Dans le cas du glucose, molécule **55**, l'acétate vient former une liaison axiale avec le carbone de la position 1 et force l'accepteur à former une liaison équatoriale. Plusieurs groupements ne participent pas à la réaction de glycosylation. Ils permettent d'envisager la possibilité d'obtenir les diastéréoisomères 1,2-*cis* lors des réactions de glycosylation. Ces groupements sont par exemple des éthers de benzyle, des groupements silylés. Lorsqu'on travaille avec des glucosamines, il est plus compliqué de trouver un groupement protecteur non participant, la plupart des groupements protecteurs d'amine sont des acyles (acétyle, phtalimide, ...) et donc participe à la réaction de glycosylation. L'utilisation d'un azoture, en position 2, est une bonne alternative puisque ce groupement n'est pas participant, il permet donc l'accès à des glycosides 1,2-*cis*.

Bien qu'il existe plusieurs groupements activables, uniquement certains sont privilégiés en synthèse. C'est le cas des imidates, comme le trichloroacétimide, et des thioglycosides, principalement les thioglycosides éthyliques et phényles (Schéma 10).

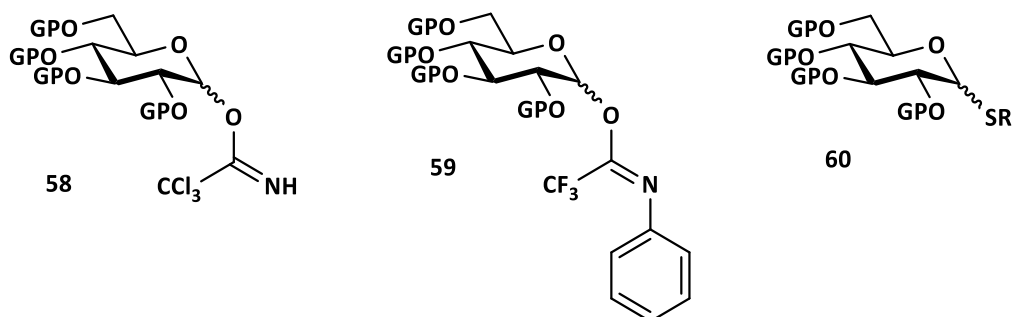


Schéma 10 : représentation des groupements activables les plus utilisés

Le trichloroacétimide, développé par le groupe de Schmidt,^{102,103} est simple d'utilisation,¹⁰⁴ il suffit de mettre en réaction, l'accepteur et le donneur, avec un acide de Brönsted ou de Lewis, tel que l'acide triflique, ou le triflate de triméthylsilyle pour que la glycosylation ait lieu. Dans certain cas, la réaction aurait comme intermédiaire un triflate anomère (Schéma 11).^{105,106}

¹⁰² Schmidt, R. R.; Michel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, 19 (9), 731–732.

¹⁰³ Schmidt, R. R.; Michel, J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25 (8), 821–824.

¹⁰⁴ Schmidt, R. R.; Kinzy, W. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 21–123.

¹⁰⁵ Park, J.; Kawatkar, S.; Kim, J.-H.; Boons, G.-J. *Org. Lett.* **2007**, 9 (10), 1959–1962.

¹⁰⁶ Walvoort, M. T. C.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; Codée, J. D. C.; van der Marel, G. A. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (23), 7990–8002.

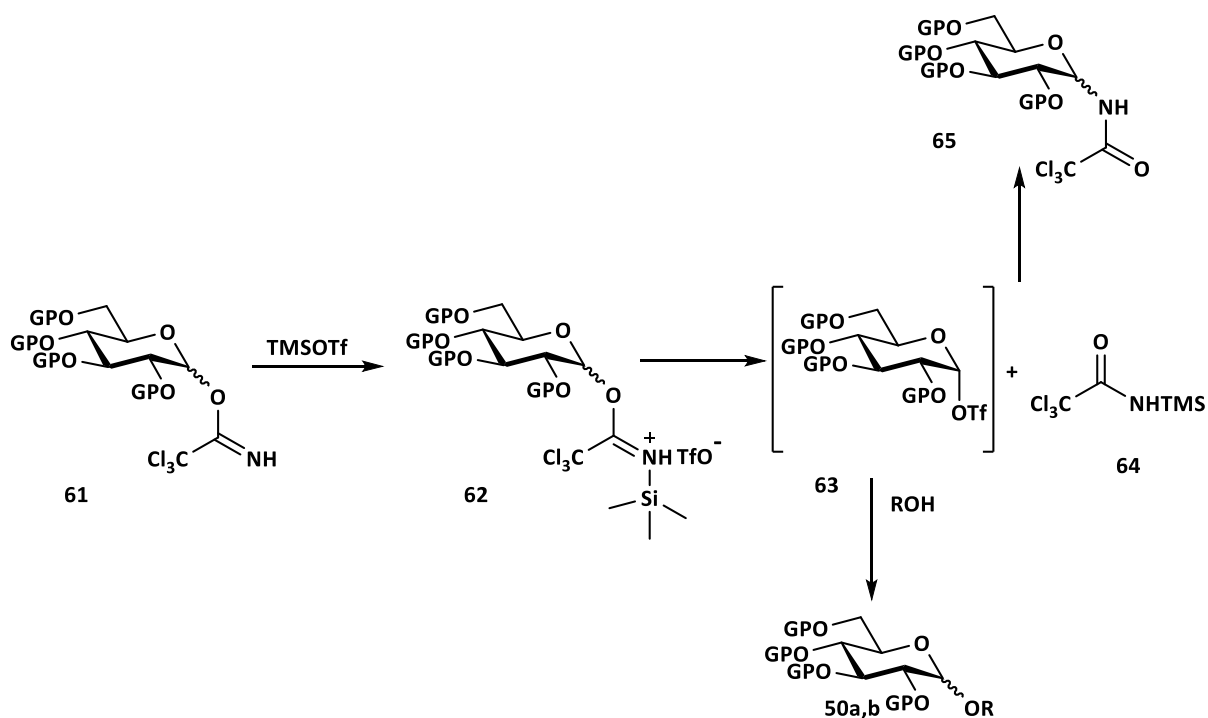


Schéma 11 : Glycosylation avec le trichloroacétimide.

Le principal inconvénient de ce trichloroacétimide est sa stabilité, les donneurs sont rarement stables. Si l'accepteur est peu réactif, on observe la formation de l'amide **65**, molécule inerte, qui ne peut être recyclée. L'amide **64** peut poser également problème lors de la purification.

Ces problèmes peuvent être palliés avec l'utilisation du N-phényltrifluoroacétimide (NPTFA), molécule **59**, développée par le groupe de Yu.¹⁰⁷ Il est moins réactif de part une délocalisation de son doublet non liant *via* le phényle et grâce au groupement trifluorométhyle qui grâce à son effet inductif attracteur appauvrit la densité électronique sur l'azote. En plus d'être moins nucléophile que le trichloroacétamide, le *N*-phényltrifluoroacétimide possède un azote plus encombré limitant d'autant plus sa réactivité. La réaction de formation de l'amide, qui parasitait la réaction de glycosylation, a été palliée par l'utilisation de ce groupement (Schéma 12).

¹⁰⁷ Yu, B.; Tao, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42 (12), 2405–2407.

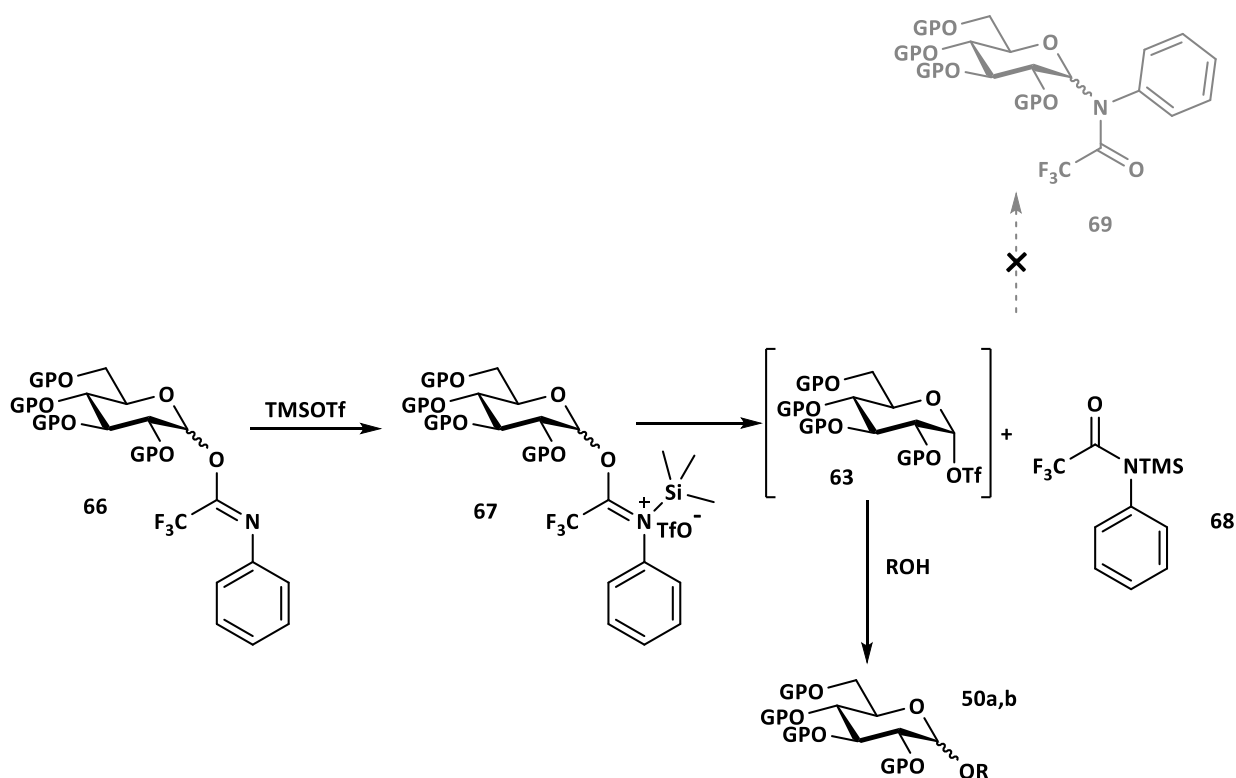


Schéma 12 : Exemple de glycosylation avec le N-trifluoroacétimidate.

Les thioglycosides sont également des groupements activables très utilisés. Ils ont été introduits par Robert J. Ferrier,¹⁰⁸ développés par David Crich.¹⁰⁹ Les systèmes d'activations des thioglycosides sont plus élaborés que pour les acétimidates.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Ces activations nécessitent l'utilisation d'une espèce électrophile, dans les cas les plus simples, l'emploi du *N*-bromosuccinimide¹¹³ ou un sel de mercure (II) suffit.^{114,115} Dans les systèmes les plus compliqués, l'électrophile est masqué, et doit réagir au préalable avant de pouvoir activer le soufre en position anomère (Schéma 13).

¹⁰⁸ Ferrier, R. J.; Hay, R. W.; Vethaviasar, N. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27* (1), 55–61.

¹⁰⁹ Crich, D.; Sun, S. *Tetrahedron* **1998**, *54* (29), 8321–8348.

¹¹⁰ Crich, D.; Smith, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (37), 9015–9020.

¹¹¹ Crich, D.; Banerjee, A.; Li, W.; Yao, Q. *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24* (4–6), 415–424.

¹¹² Codée, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; den Heeten, R.; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. A. *Org. Lett.* **2003**, *5* (9), 1519–1522.

¹¹³ Nicolaou, K. C.; Seitz, S. P.; Papahatjis, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (8), 2430–2434.

¹¹⁴ Van Cleve, J. W. *Carbohydr. Res.* **1979**, *70* (1), 161–164.

¹¹⁵ Garegg, P. J.; Henrichson, C.; Norberg, T. *Carbohydr. Res.* **1983**, *116* (1), 162–165.

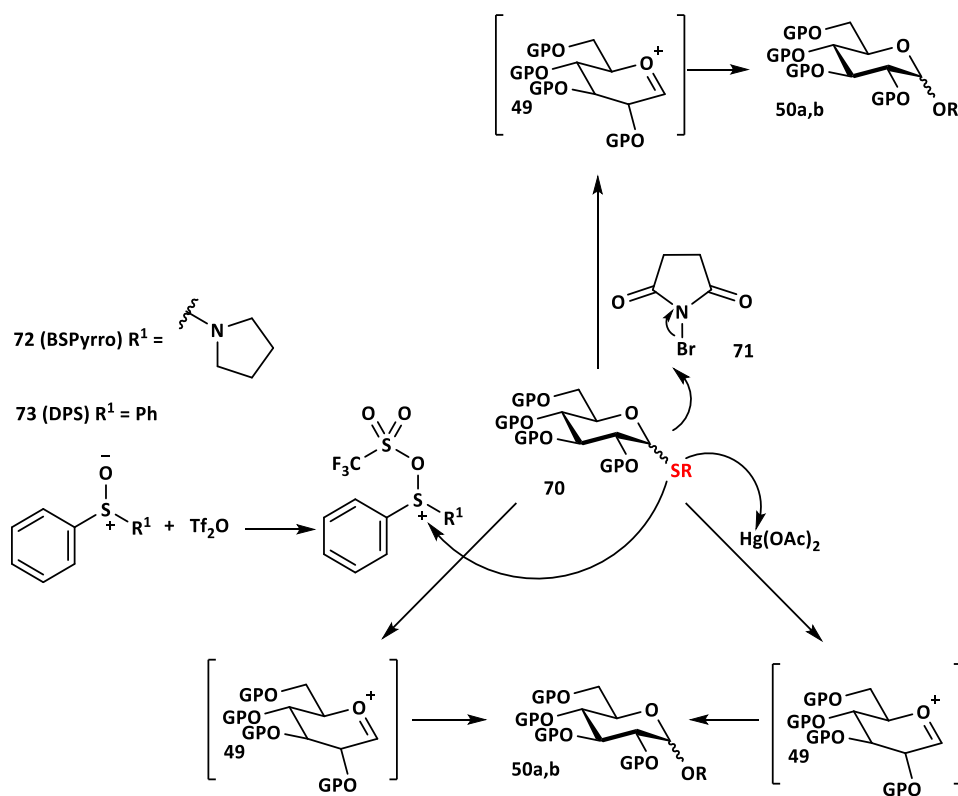


Schéma 13 : Exemple d'activations dans la réaction de glycosylation avec des thioglycosides.

Le thioglycoside est activé par une espèce possédant un centre électrophile comme par exemple les sulfoxydes, sulfinamides ou le *N*-bromosuccinimide ; un métal comme le mercure peut également activer les thioglycosides. Ce soufre activé conduit à la formation de l'oxacarbénium **49** qui peut réagir avec l'accepteur et conduire aux glycosides **50a** ou **50b**.

Le principal intérêt des thioglycosides, est qu'ils sont stables dans beaucoup de conditions réactionnelles et peuvent donc être utilisés dans des séquences réactionnelles afin de synthétiser des oligosaccharides complexes en un pot.

3.1.2. Exemple de synthèse de fragments d'Héparane Sulfate : Utilisation de synthèses itératives

C'est le cas du groupe de Xuefei Huang, qui a utilisé une stratégie de glycosylations par ajouts séquencés permettant ainsi la synthèse d'hexasaccharides monotopes. Pour mettre au

point cette méthodologie, ils ont préparé des disaccharides fonctionnalisés, ceux-ci sont des précurseurs des motifs répétitifs des héparanes sulfates (Schéma 14).^{116,117}

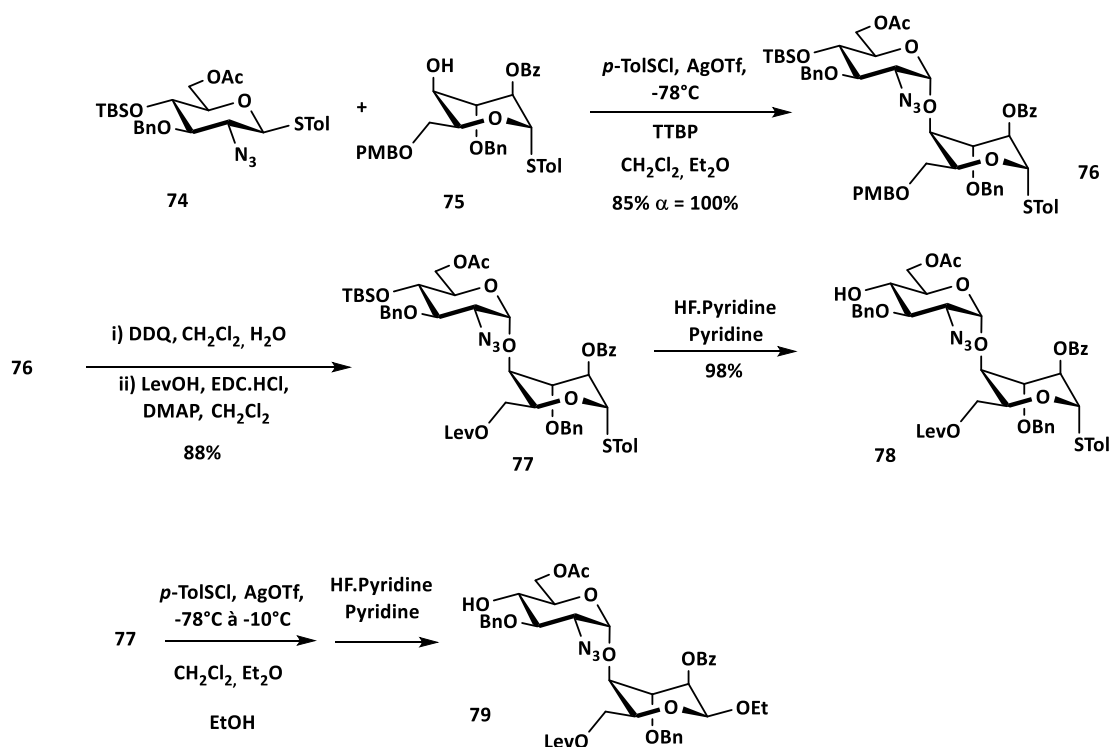


Schéma 14 : Synthèse de donneur et accepteur selon le groupe Xuefei Huang.

Afin de contrôler la stéréochimie dans la glycosylation de **76**, un azoture a été utilisé en guise de groupement amine masqué. Celui-ci étant un groupement non participant, cela ne favorisera pas la formation d'une liaison *1,2-trans*, permettant de retrouver la liaison axiale comme dans les héparanes sulfates. La préactivation de **74** permet l'emploi de la molécule **75** comme accepteur afin de former le glycoside **76**. Le groupement *para*-methoxybenzyle de la molécule **76** pourra être remplacé en 2 étapes par un groupement levulinoylé. Ce groupement a une grande importance dans la stratégie de synthèse puisqu'il laisse la possibilité de fonctionnaliser cette position protégée par des groupements sulfates. La molécule **77** a été transformée en accepteur **79** par une réaction de glycosylation, puis

¹¹⁶ Wang, Z.; Xu, Y.; Yang, B.; Tiruchinapally, G.; Sun, B.; Liu, R.; Dulaney, S.; Liu, J.; Huang, X. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (28), 8365–8375.

¹¹⁷ Dulaney, S. B.; Xu, Y.; Wang, P.; Tiruchinapally, G.; Wang, Z.; Kathawa, J.; El-Dakdouki, M. H.; Yang, B.; Liu, J.; Huang, X. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (24), 12265–12279.

une déprotection de l'éther silylé. Le plus remarquable dans cette stratégie est l'emploi des molécules **75** et **78** qui sont des molécules bifonctionnelles pouvant jouer le rôle d'accepteur et de donneur.

Une fois les disaccharides obtenus, les conditions de réaction de glycosylation ont été mises en œuvre afin de réaliser la synthèse d'hexasaccharides en réaction monotope. Cette stratégie a été réalisée en utilisant l'accepteur **79**, le donneur **76** et le disaccharide bifonctionnel **78** qui jouera le rôle d'accepteur et de donneur (Schéma 15).

Le groupe de Manuel Martín-Lomas a proposé l'utilisation de support pour faciliter la synthèse de fragments d'héparane sulfate.^{118,119,120} Les réactions de glycosylation ont été menées avec le couple trichloroacétimide et le triflate de trimethylsilyle. L'utilisation du groupement protecteur pivaloyl en position 2 de l'acide iduronique permet l'obtention de composé 1,2-*trans*, qui correspond bien à la stéréochimie de fragments d'HS (Schéma 16).

La mise en place de cette stratégie itérative, alternant la déprotection de l'acétal de benzylidène en position 4 et 6 de l'extrémité réductrice, puis protection régiosélective de la position 6 pour former les accepteurs, a conduit à la synthèse rapide et efficace d'un octasaccharide.

¹¹⁸ Czechura, P.; Guedes, N.; Kopitzki, S.; Vazquez, N.; Martín-Lomas, M.; Reichardt, N.-C. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (8), 2390–2392.

¹¹⁹ de Paz, J.-L.; Angulo, J.; Lassaletta, J.-M.; Nieto, P. M.; Redondo-Horcajo, M.; Lozano, R. M.; Giménez-Gallego, G.; Martín-Lomas, M. *ChemBioChem* **2001**, 2 (9), 673–685.

¹²⁰ Ojeda, R.; Terentí, O.; de Paz, J.-L.; Martín-Lomas, M. *Glycoconj. J.* **2004**, 21 (5), 179–195.

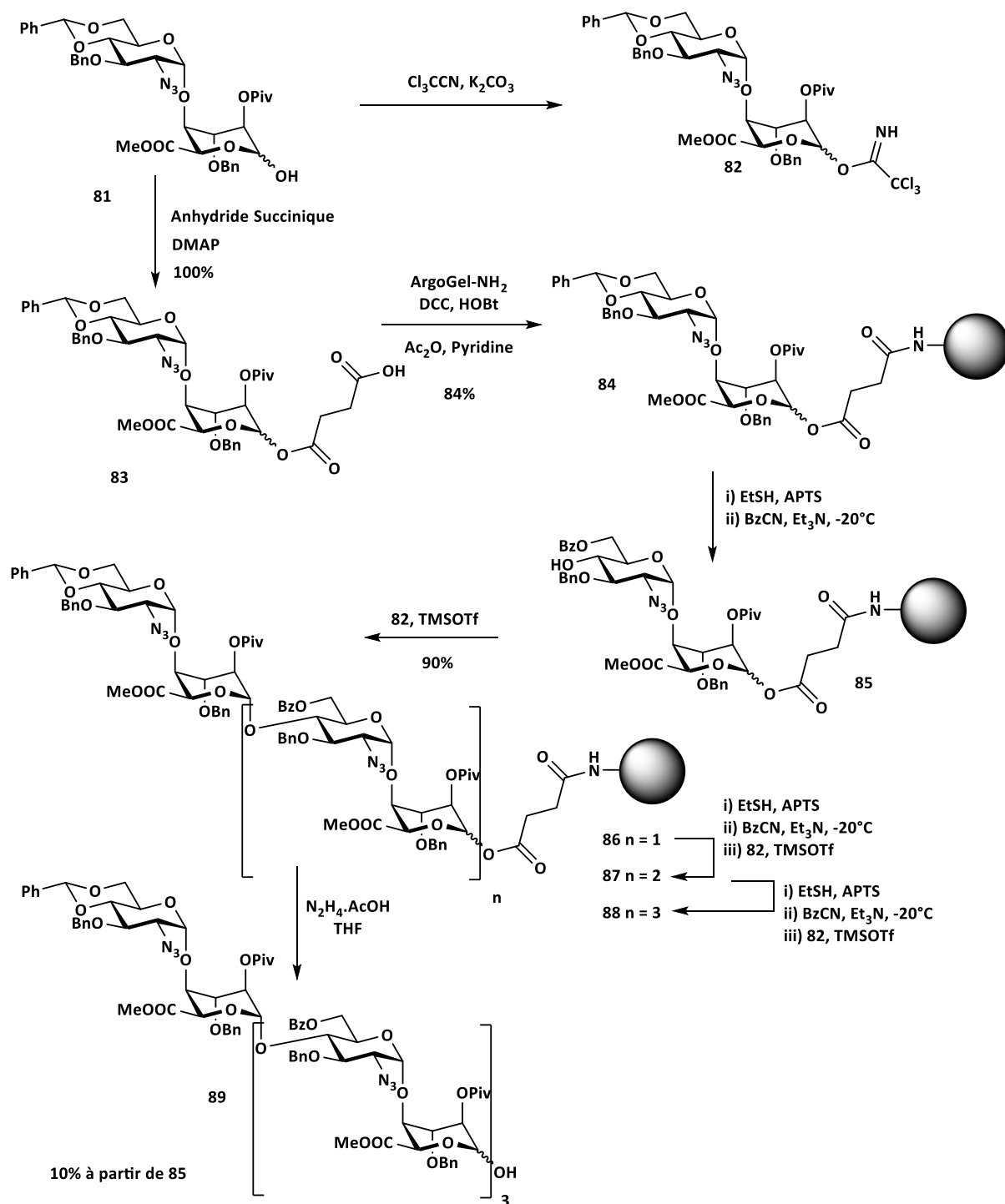


Schéma 16 : Synthèse supportée par le groupe de Martin-Lomas

Dans cette voie de synthèse l'oligosaccharide est relié par son extrémité réductrice avec l'aide d'un espaceur à un support solide. Celui-ci permet une synthèse rapide et efficace, ainsi l'octasaccharide **89** pu être isolé avec un rendement de 10% sur 8 étapes.

Le groupe de Manuel Martín-Lomas a utilisé en 2003 le diol **91** comportant une position anomère protégée par un éther silylé. Cela permet, après les réactions de glycosylation et d'acétylation formant le disaccharide **92**, l'installation rapide d'un imidate afin de préparer le donneur **93** avec de bons rendements et peu d'étapes (Schéma 17).¹²¹

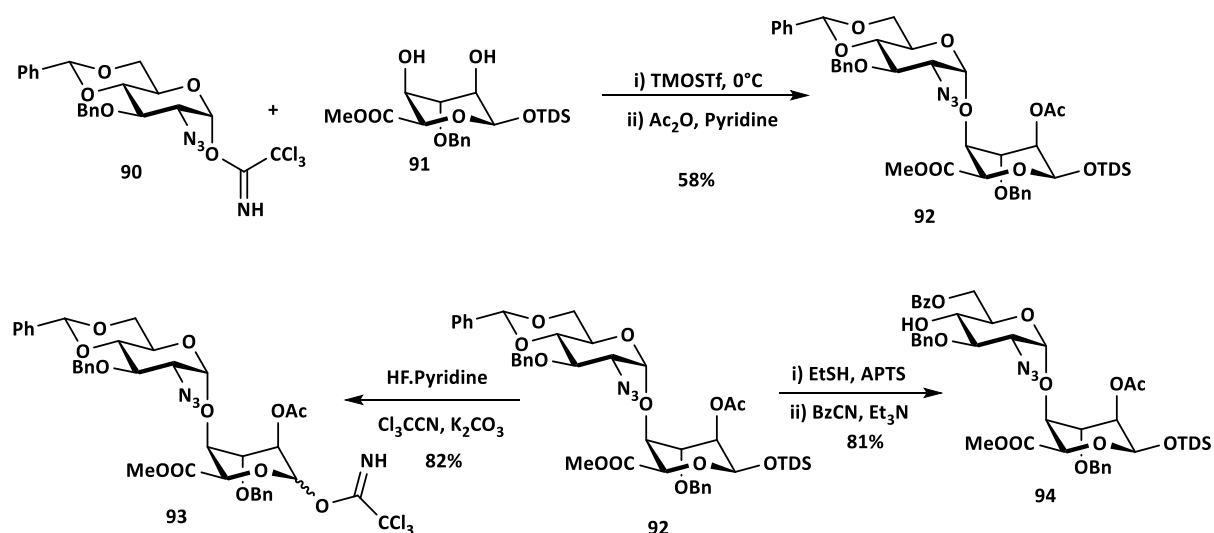


Schéma 17 : Synthèse de donneur, et accepteur via un éther silylé anomère.

Cette régiosélectivité s'explique par deux liaisons hydrogène intramoléculaires entre l'hydrogène de l'hydroxyle en position 4 avec l'oxygène de la position 2 et l'hydrogène de l'hydroxyle en position 2 avec l'oxygène de la position anomère.

En utilisant le même procédé itératif que précédemment, le disaccharide **92** permet la synthèse du donneur **94** par la déprotection de l'acétal et la protection sélective de la position 6 par un groupement benzoyle. Le disaccharide **92** permet aussi la synthèse du donneur **93** grâce à la déprotection de la position anomère, en utilisant le fluorure d'hydrogène dans la pyridine, suivi de l'installation d'un trichloroacétimide à partir de l'hémiacétal.

¹²¹ Paz, J.-L. de; Ojeda, R.; Reichardt, N.; Martín-Lomas, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003 (17), 3308–3324.

Cette stratégie a permis la synthèse de l'hexasaccharide **96**, grâce à la réaction entre le donneur **93** et l'accepteur **94** (Schéma 18).

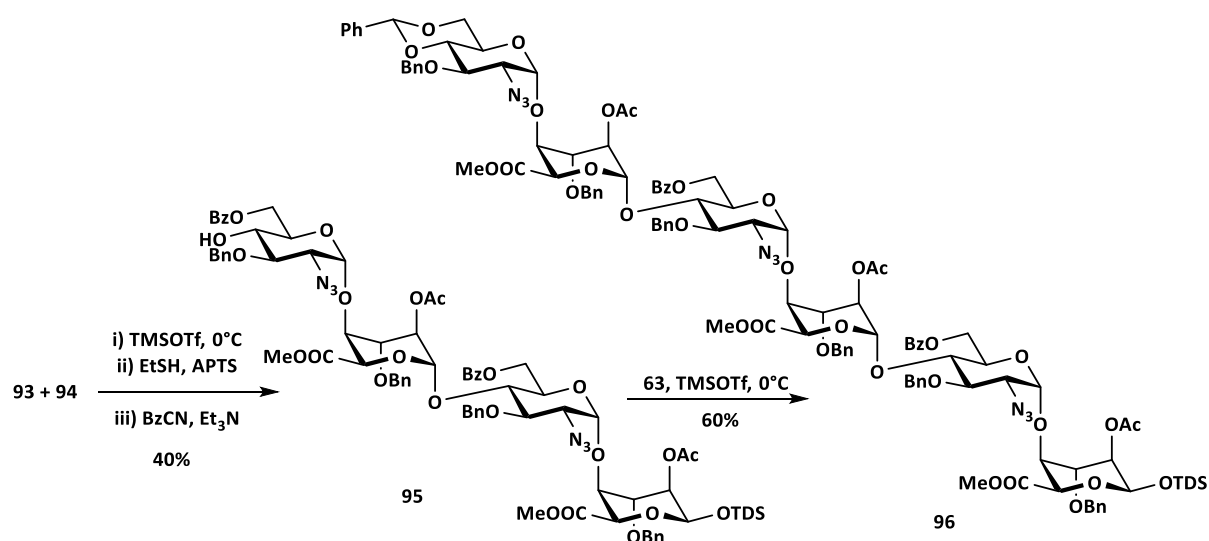


Schéma 18 : Synthèse d'hexasaccharide **96** via l'utilisation des groupements silylés.

L'oligosaccharide **96** a été isolé avec un rendement de 24% sur deux étapes. Dans cette stratégie le groupe de Manuel Martin-Lomas utilise des groupements benzoyle pour protéger les positions qui porteront les groupements *O*-sulfates.

Le groupe de Van der Marel a repris les conditions de glycosylation introduite par David Gin,¹²² afin d'utiliser des hémiacétals en tant que donneurs dans des réactions de glycosylations (Schéma 19).¹²³ Pour permettre la réaction, un système d'activation avec l'utilisation de diphénylsulfoxyde, d'anhydride triflique et de tri-*tert*-butylpyrimidine a été utilisé.

¹²² Garcia, B. A.; Poole, J. L.; Gin, D. Y. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (32), 7597–7598.

¹²³ Codée, J. D. C.; Stubba, B.; Schiattarella, M.; Overkleeft, H. S.; van Boeckel, C. A. A.; van Boom, J. H.; van der Marel, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3767–3773.

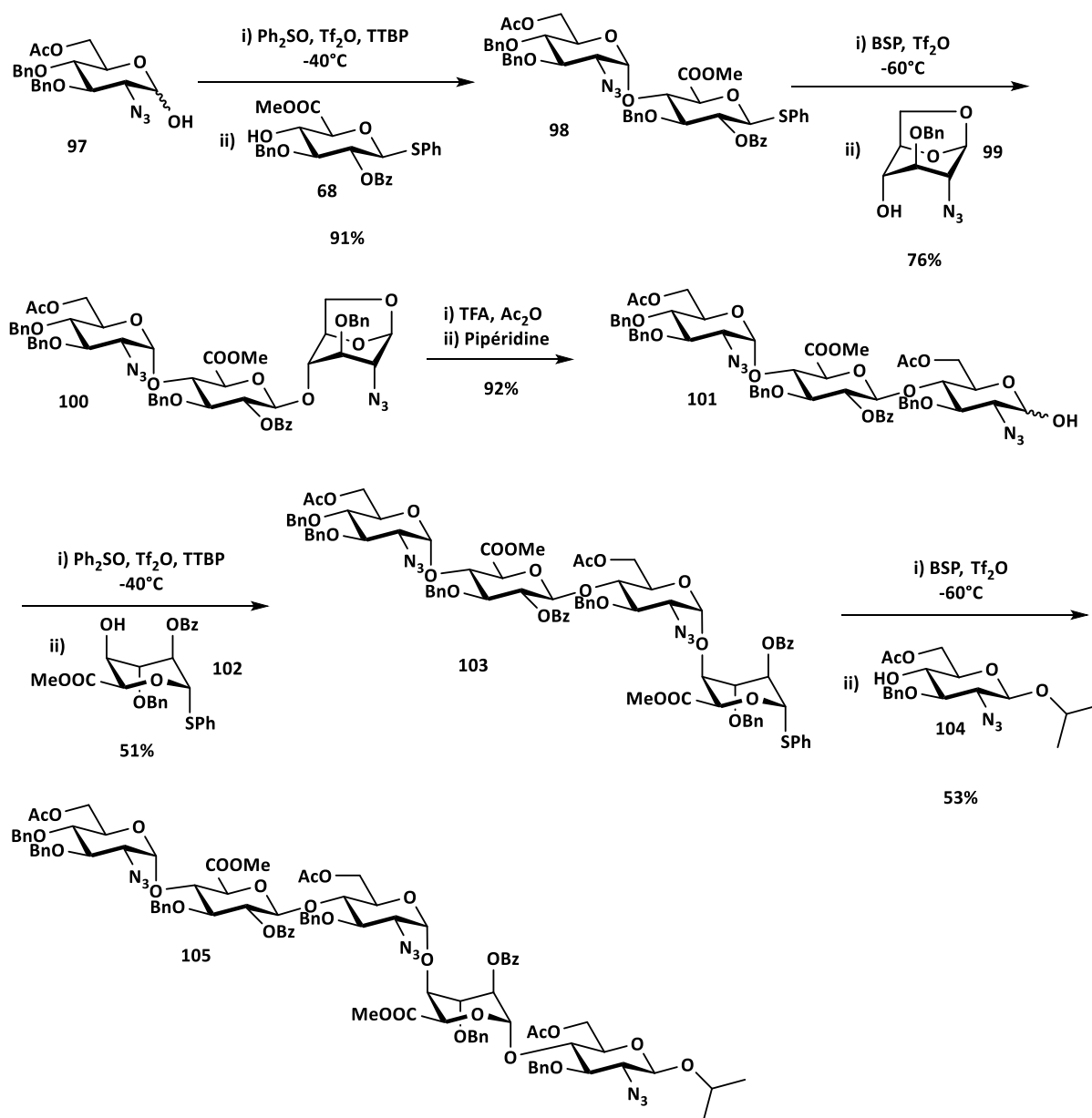


Schéma 19 : Synthèse du pentasaccharide **105** en utilisant des hémiacétals comme donneur.

Dans cette synthèse, c'est une structure type 1,6 anhydro qui a été employée en tant qu'accepteur. Des conditions acides en présence d'anhydride acétique, puis dans un second temps une déprotection sélective de la position anomère, permettent la transformation du trisaccharide **100** en donneur **101**. Ce dernier peut être engagé dans une suite de réactions de glycosylations de type 3+1+1 conduisant au pentasaccharide **105** avec un rendement de 27% sur deux étapes.

Le groupe de Geert-Jan Boons a mis au point une synthèse d'hexasaccharides possédant des acides hexuroniques différents.^{124,125,126} Dans ce but, il a été préparé des motifs répétitifs différents de dissaccharidique iduronique et glucuronique accepteurs. La synthèse de ces briques permet de choisir où placer ces motifs afin d'obtenir l'alternance désirée dans l'oligosaccharide final. En différenciant les groupements protecteurs acyle, ils ont la possibilité de contrôler le nombre de *O*-sulfates finaux. Ici seuls les groupements levulinoyle laisseront place à des sulfates (Schéma 20, Schéma 21).

¹²⁴ Zong, C.; Venot, A.; Dhamale, O.; Boons, G.-J. *Org. Lett.* **2013**, *15* (2), 342–345.

¹²⁵ Arungundram, S.; Al-Mafraji, K.; Asong, J.; Leach, F. E.; Amster, I. J.; Venot, A.; Turnbull, J. E.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17394–17405.

¹²⁶ Zong, C.; Huang, R.; Condac, E.; Chiu, Y.; Xiao, W.; Li, X.; Lu, W.; Ishihara, M.; Wang, S.; Ramiah, A.; Stickney, M.; Azadi, P.; Amster, I. J.; Moremen, K. W.; Wang, L.; Sharp, J. S.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (39), 13059–13067.

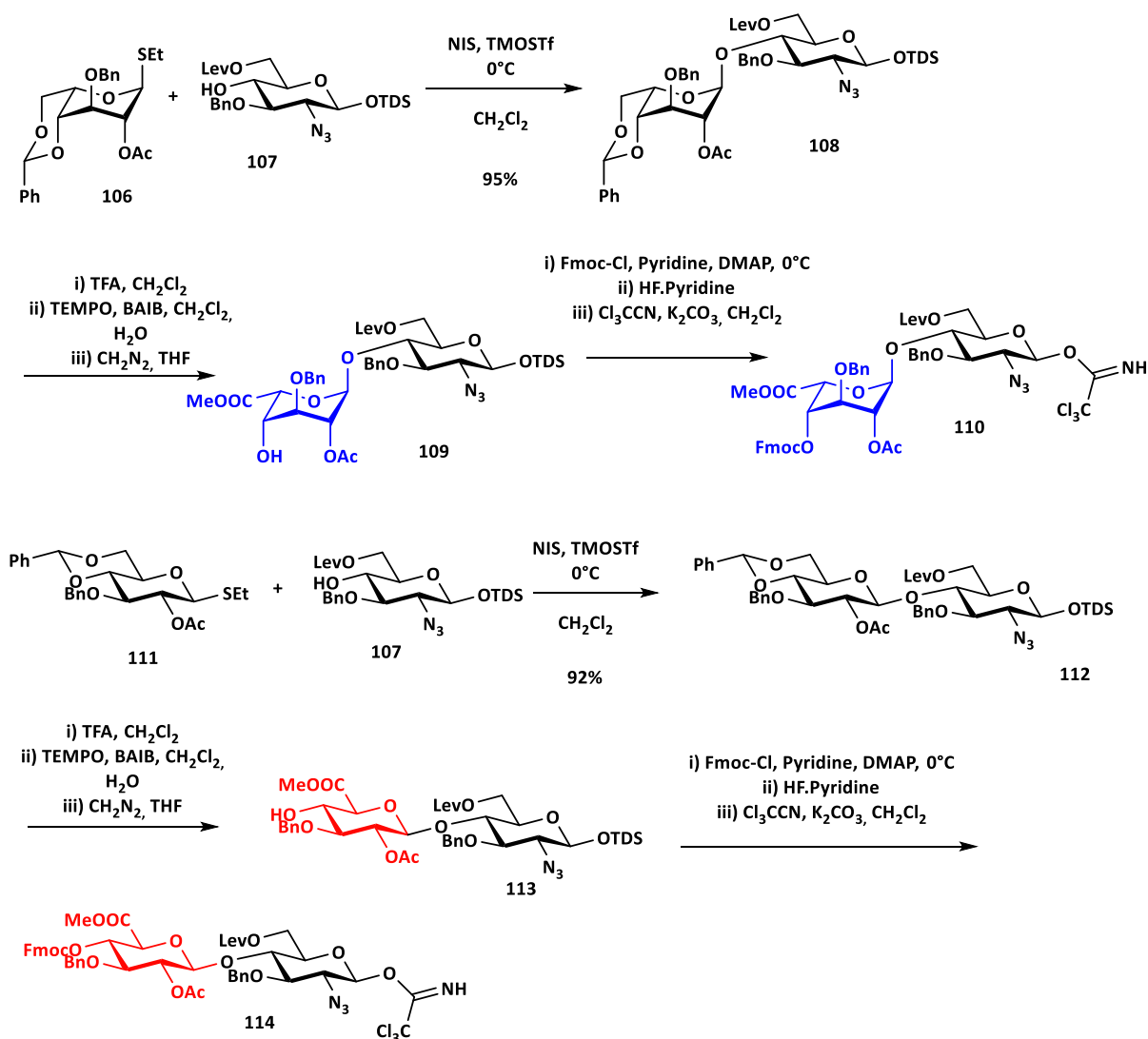


Schéma 20 : Synthèse des donneurs et accepteurs différenciés.

Avec cette synthèse le groupe de Geert-Jan Boons a préparé deux donneurs **110** et **114**, comportant une unité glucosamine identique, relié par une liaison 1,2-*trans* à une acide iduronique ou glucuronique. De la même manière, deux accepteurs disaccharidiques ont été synthétisés, **109** et **113**, où, une fois encore, seul les motifs hexuroniques changent.

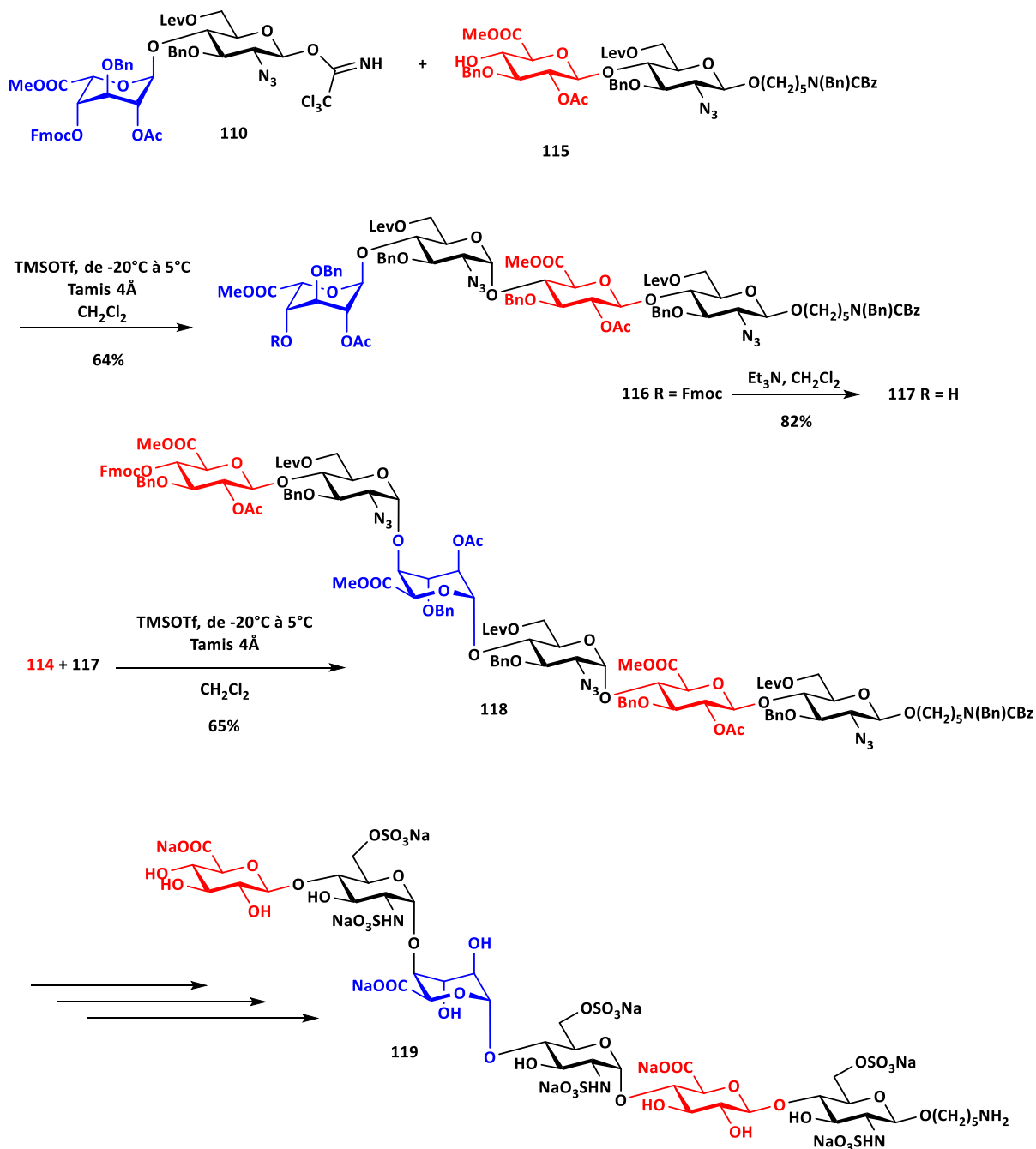


Schéma 21 : Illustration de synthèse d'hexasaccharide alternant les acides hexuroniques.

L'utilisation des synthons **110** et **114** a permis la synthèse de l'hexasaccharide **118**, cette molécule alterne les motifs hexuroniques. Après fonctionnalisation et déprotection cette dernière a conduit à la synthèse de **119** avec un rendement de 11% en 8 étapes. C'est donc en utilisant des briques disaccharidiques adaptées que le groupe de Geert-Jan Boons a pu mener la synthèse de **119**.

Récemment le groupe de Geert-Jan Boons a utilisé d'une chaîne perfluorée, molécule **120**, comme étiquette. Celle-ci, accrochée à la position anomère du côté de l'extrémité réductrice, facilite les purifications grâce à l'emploi de silice fluorée qui permet la discrimination rapide de molécules via le nombre de fluor qu'elle porte (Schéma 22).

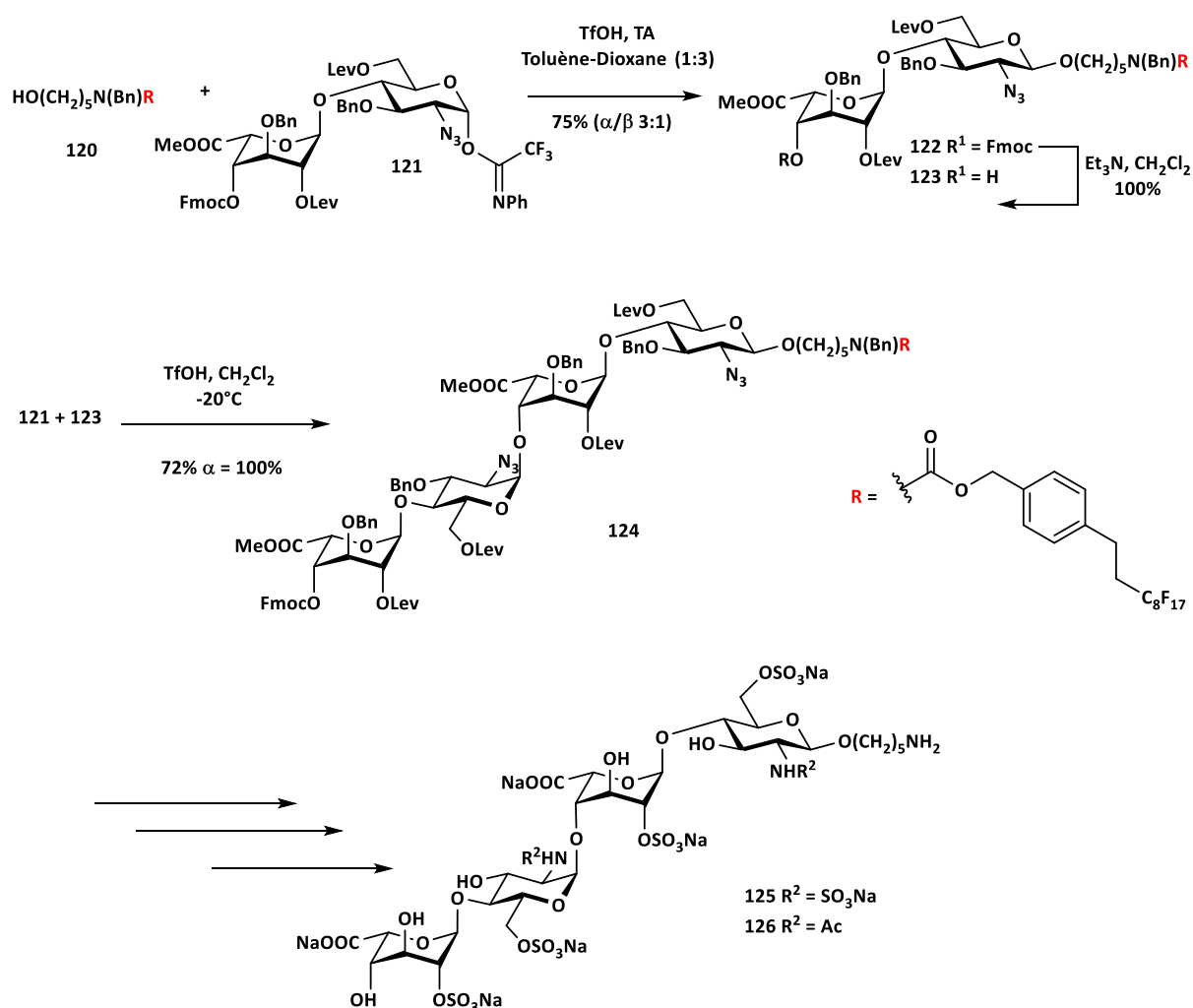


Schéma 22 : Synthèse d'un pentasaccharide via l'utilisation d'étiquette fluorée.

Cette étiquette fluorée permet notamment d'améliorer les étapes de purifications des étapes ou l'oligosaccharide commence à être trop polaire. En plus des avantages de purifications que la synthèse assistée par cette étiquette fluorée, celle-ci offre également la

possibilité de caractériser les intermédiaires réactionnels en utilisant des méthodes spectroscopiques classiques.

Le groupe de John M. Gardiner a synthétisé des dodécasaccharides. Dans un premier temps, une stratégie de glycosylation $n + 2$ a été utilisée de manière itérative pour arriver au dodécasaccharide en partant d'un tétrasaccharide.^{127,128} En utilisant les mêmes conditions opératoires un deuxième dodécasaccharide a été préparé. Cette fois-ci c'est une stratégie $n + 4$ qui a été utilisée (Schéma 23).¹²⁹

Fort de cette performance le groupe de Gardiner ne s'est pas arrêté là. Avec un accepteur dodécassacharidique dérivé de **137**, ils ont synthétisé un oligosaccharide possédant 40 unités saccharidiques (Schéma 23).¹³⁰

¹²⁷ Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. *Org. Lett.* **2013**, *15* (1), 88–91.

¹²⁸ Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Baráth, M.; Broberg, K. R.; Avizienyte, E.; Helliwell, M.; Raftery, J.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (18), 7823–7843.

¹²⁹ Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Cole, C.; Rushton, G.; Avizienyte, E.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. *Nat. Commun.* **2013**, *4*.

¹³⁰ Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Cliff, M. J.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (11), 6158–6164.

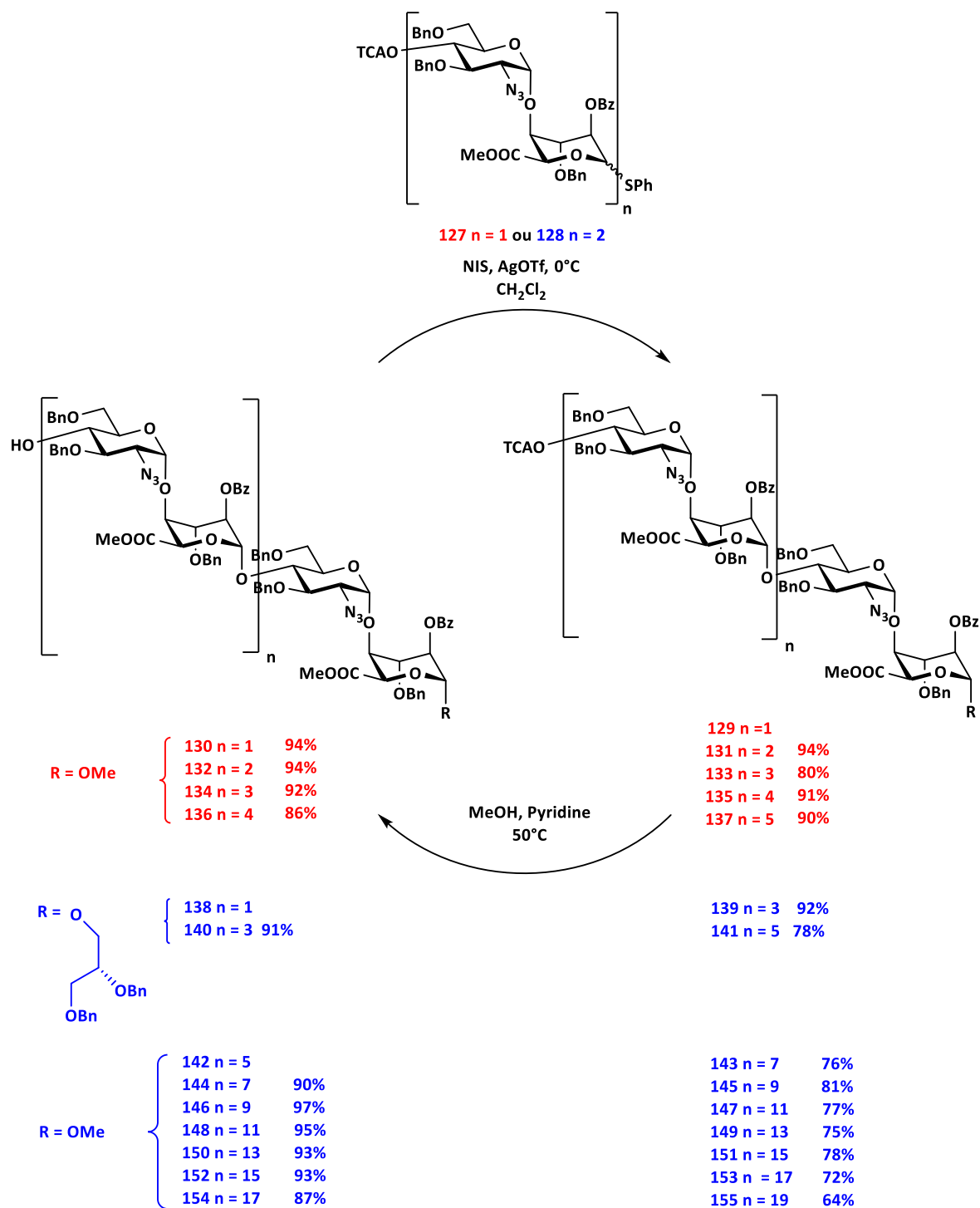


Schéma 23 : Synthèses itératives du groupe de John M. Gardiner.

Cette synthèse utilise les conditions de glycosylation développée par le groupe de Bert Fraser-Reid^{131,132} L'utilisation de méthanol dans la pyridine permet la déprotection sélective du groupement trichloroacétyle laissant ainsi la possibilité au groupe de John M. Gardiner d'utiliser un procédé itératif.

Au fur et à mesure les stratégies se font de plus en plus complètes, permettant l'élaboration de molécules ayant un haut degré de complexité corrélée à leur degré de fonctionnalisation. La stratégie itérative nécessite l'utilisation d'un groupement orthogonal permettant en peu d'étapes la préparation de l'accepteur. En ce qui concerne la position anomère du donneur, elle peut être déprotégée puis fonctionnalisée par un imidate, réagir sous forme libre, ou bien sous forme d'un thioglycoside, fonction résistante à beaucoup de conditions réactionnelles. Dans la plupart des synthèses, les positions des sulfates sont protégées par des fonctions ester. En ce qui concerne les hydroxyles libres, ce sont bien souvent des protections sous forme d'éther benzylique. Pour les positions 2 des glucosamines, il est très pratique d'utiliser une protection par des azotures. Cela permet de choisir la fonctionnalisation de cette position (acétylée, sulfatée ou libre) ultérieurement. Un autre aspect déjà évoqué précédemment est le caractère non participant de ce groupement protecteur.

A travers ces exemples nous avons pu voir les principales méthodes utilisées pour la synthèse d'oligosaccharides. Une fois ces oligosaccharides synthétisés il convient de les déprotéger et de les fonctionnaliser. Généralement, intervient d'abord la déprotection des positions qui vont être transformées en 6-*O*-sulfates. Après cette déprotection vient l'étape de *O*-sulfatation. Une fois l'oligosaccharide *O*-sulfaté, les azotures peuvent être réduits en amines, puis celle-ci fonctionnalisées sous forme de sulfate ou d'acétyle. Comme dans l'hétéropolysaccharide naturel il est également possible de les laisser libres. Dans le cas où la molécule ciblée possède des hydroxyles libres, il reste à déprotéger les groupements protecteurs dit « permanents » encore présent sur celle-ci. Bien souvent ces groupements sont des éthers benzyliques, ou encore des benzoyles qui sont clivés par hydrogénéolyse.

¹³¹ Konradsson, P.; Mootoo, D. R.; McDevitt, R. E.; Fraser-Reid, B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, No. 3, 270–272.

¹³² Konradsson, P.; Udodong, U. E.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (30), 4313–4316.

Beaucoup de méthodes et de conditions réactionnelles ont été développées pour réaliser ces réactions de sulfatation et de déprotection.

3.2. Stratégie itérative développée à Orsay

3.2.1. Synthèse de fragments d'HS

Le groupe de David Bonnaffé est également spécialisé dans la synthèse de fragments d'Héparane sulfate. Par le passé le laboratoire s'est illustré par la synthèse d'un dodécasaccharide.¹³³ Cette synthèse repose sur la conception d'un disaccharide clé. Ce disaccharide est un précurseur du motif répétitif présent dans les HS. Cette brique correctement fonctionnalisée permet de transformer ce motif disaccharidique en accepteur ou en donneur. Le groupement benzylidène, permet une fois de plus une fonctionnalisation tardive, permettant ainsi de protéger la position 2 de la partie iduronique par plusieurs groupements possibles, cela permet de créer une diversité dans les briques de type iduroniques. Cela laisse le choix dans la synthèse d'avoir des groupements orthogonaux ou non et donc de contrôler le nombre de groupements sulfates en position 2 sur la molécule finale. (Figure 18).

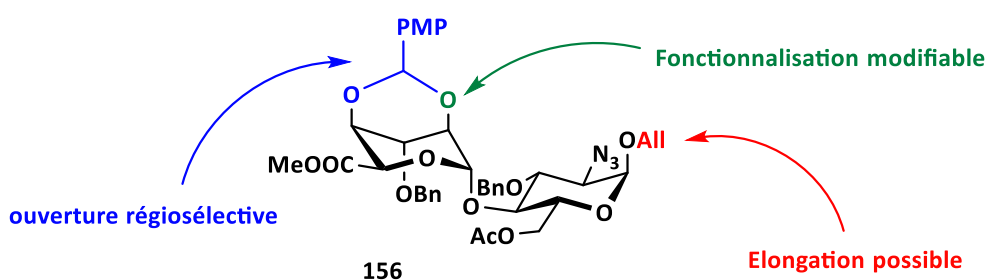


Figure 18 : Présentation du synthon permettant la stratégie itérative de l'équipe.

¹³³ Baleux, F.; Loureiro-Morais, L.; Hersant, Y.; Clayette, P.; Arenzana-Seisdedos, F.; Bonnaffé, D.; Lortat-Jacob, H. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5 (10), 743–748.

Grâce à une ouverture réductrice régiosélective en 4, ce disaccharide peut être protégé convenablement en fonction des besoins de la synthèse. Cela dépend si la position 2 du motif iduronique sera sulfatée ou non. Un premier aspect de diversité apparaît ici. Une fois le produit ouvert, l'éther de *paraméthoxybenzyle* peut être enlevé sélectivement dans des conditions oxydantes ou acides afin d'obtenir un accepteur. Le groupement allyloxy en position anomère permet de transformer le disaccharide en donneur, ou bien permet une fonctionnalisation ultérieure par une réaction de thiol-ène¹³⁴ par exemple (Schéma 24).

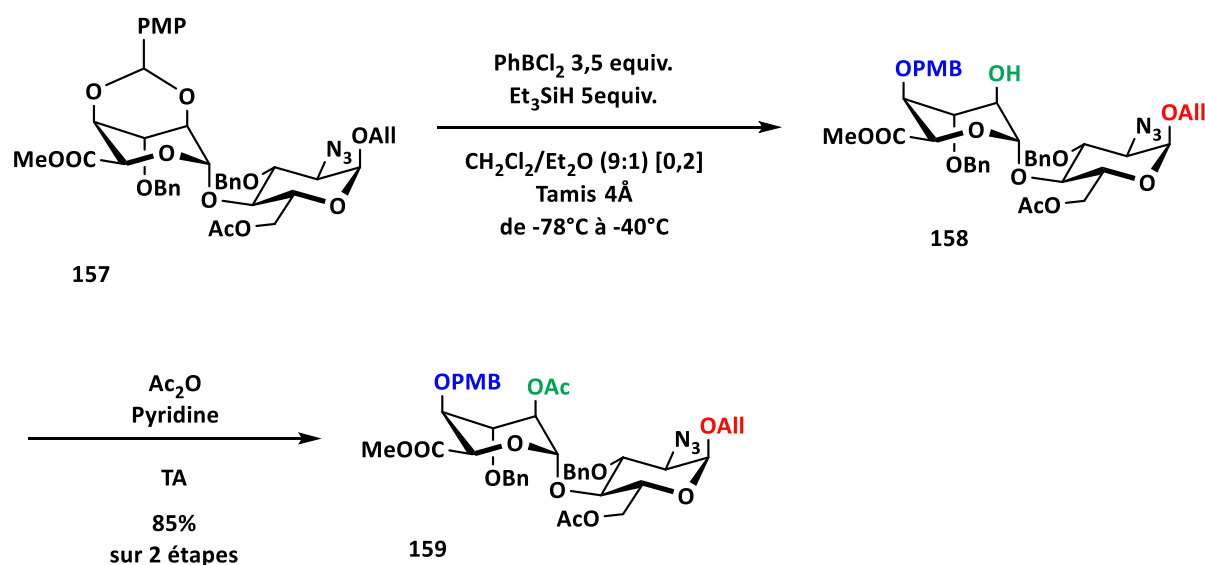


Schéma 24 : Préparation de motifs répétitifs disaccharidiques précurseurs d'HS.

En deux étapes et avec un rendement de 85%, le disaccharide clé **157** peut donner le disaccharide permettant d'obtenir la molécule **159**, intermédiaire de synthèse donnant accès au donneur **160** ainsi qu'à l'accepteur **161** (Schéma 25).

¹³⁴ Povie, G.; Tran, A.-T.; Bonnaffé, D.; Habegger, J.; Hu, Z.; Le Narvor, C.; Renaud, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53 (15), 3894–3898.

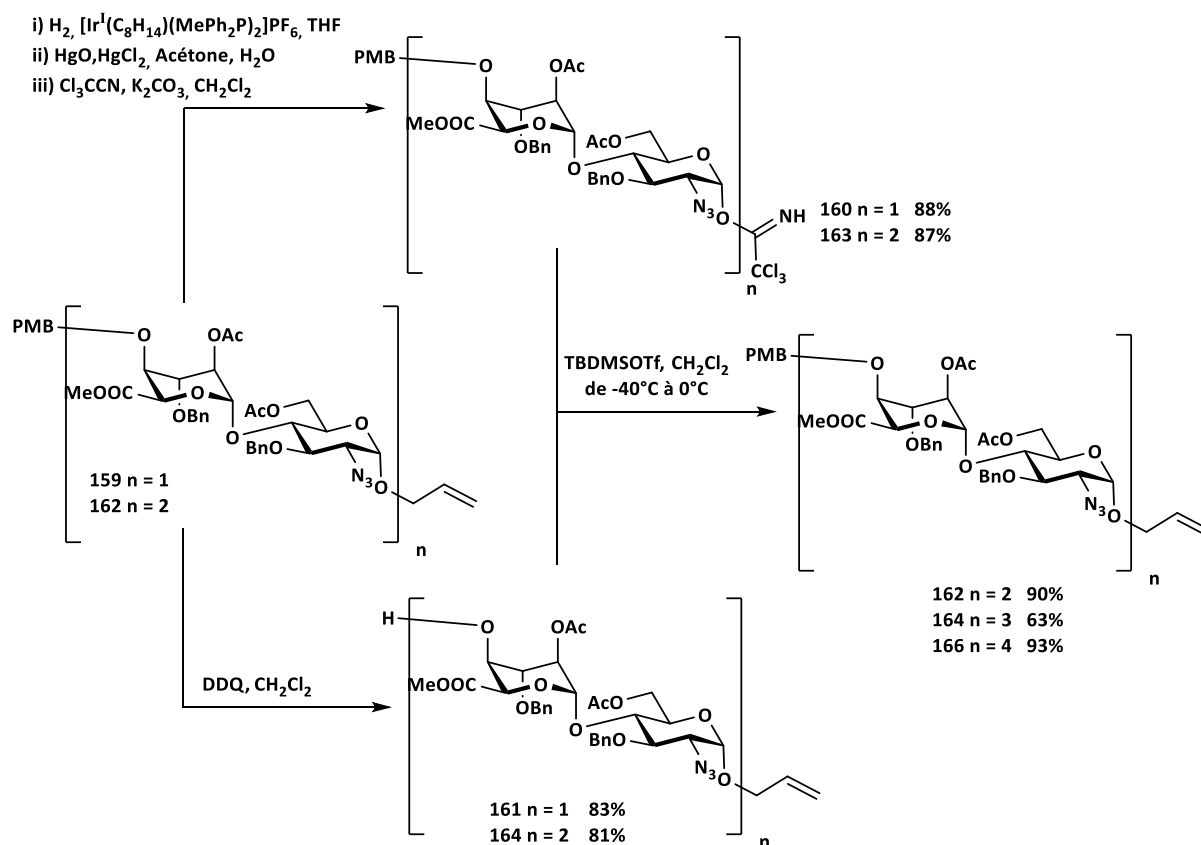


Schéma 25 : Synthèse itérative n + 2 mise au point à Orsay.

La transformation des allyloxy **159** et **162** en donneur commence par l'isomérisation afin de former l'éther d'énol qui pourra être hydrolysé en présence de sels de mercure (II). Le groupement protecteur 4-méthoxybenzyle peut être clivé par le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone et conduire à l'obtention d'un accepteur. La réaction entre le donneur de type trichloroacétimide et l'accepteur à lieu dans le dichlorométhane à $-40^\circ C$ en présence du triflate de *tert*butyldimethylsilane comme promoteur.

C'est avec cette stratégie que le laboratoire a pu choisir de synthétiser, en utilisant une double réaction de thiol-ène sur des intermédiaires réactionnelles avancés, des molécules mimant un enchainement de domaines S-A-S ou des oligosaccharides classiques.¹³⁵ Le laboratoire a également pu grâce à cette stratégie étendre cette synthèse en vue d'obtenir des dodécasaccharides (Schéma 26).¹³³

¹³⁵ Lubineau, A.; Lortat-Jacob, H.; Gavard, O.; Sarrazin, S.; Bonnaffé, D. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10* (17), 4265–4282.

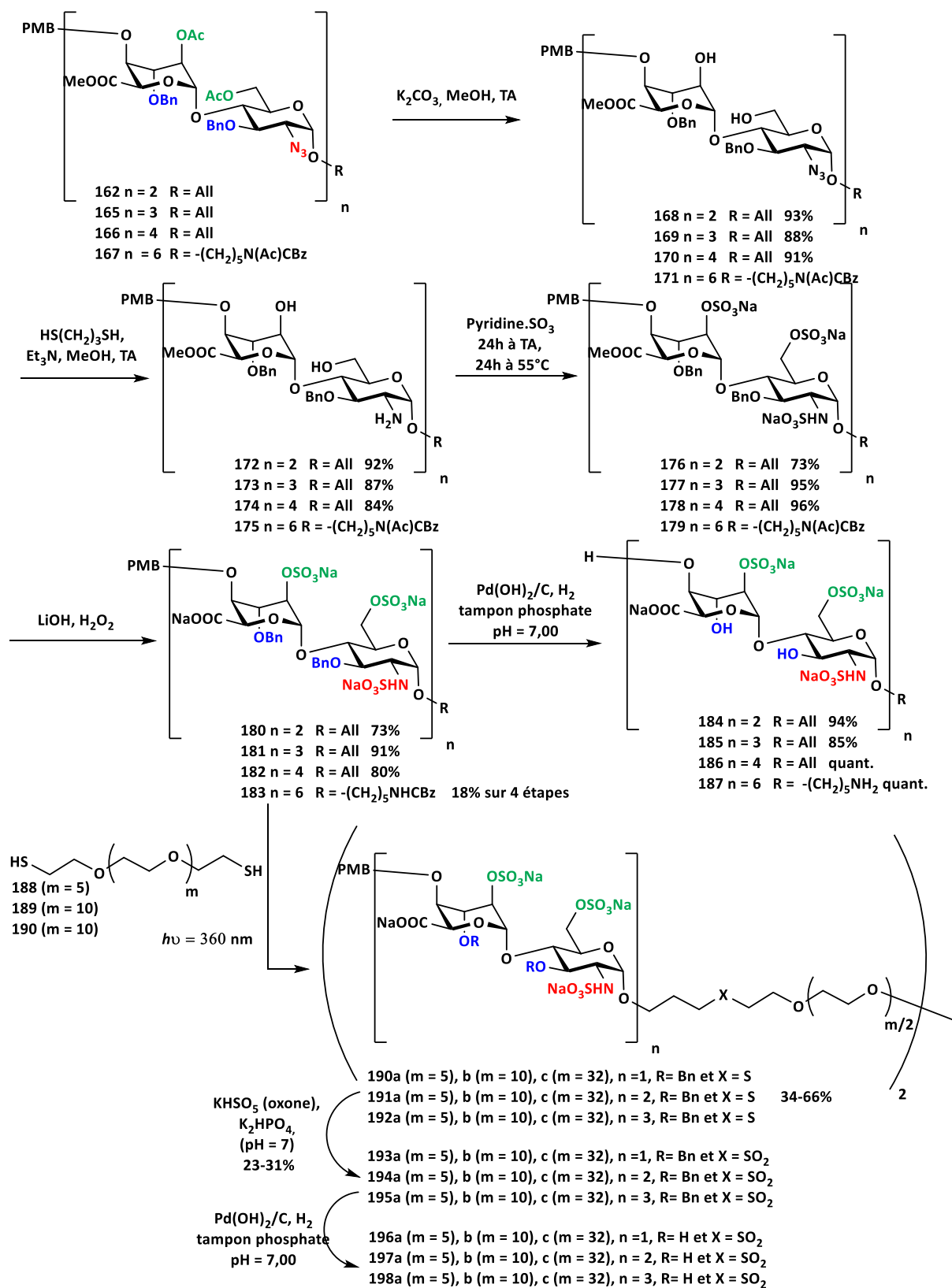


Schéma 26 : Synthèse d'oligosaccharides et de mime S-A-S mise au point par le laboratoire.

Afin de réaliser cette synthèse, le groupe de David Bonnaffé a convenu de la stratégie de groupements protecteurs. Les molécules finales totalisent 5 fonctions chimiques différentes, Les *O*-sulfates, les *N*-sulfates, les carboxylates, les fonctions acétals des sucres, et les hydroxyles libres. Il a été donc prévu 5 groupements protecteurs orthogonaux pour cette synthèse

Dans la stratégie des groupements protecteurs utilisés par le laboratoire, les acétates permettent de protéger les positions qui auront dans le produit final des *O*-sulfates, les azotures laisseront place aux *N*-sulfates et les éthers benzyliques quant à eux protégeront les positions hydroxyles libres. Les carboxylates sont protégés par des esters méthyliques et la position anomère est protégée, dans le cas de l'extrémité réductrice, par un groupement allyle qui se transformera en groupement propyle après l'hydrogénolyse des éthers benzyliques. Comme vu précédemment, l'allyle peut servir dans l'élongation de la chaîne oligosaccharidique ou bien servir pour l'installation d'un bras espaceur par exemple.

3.2.2. Application au sujet

Pour construire les polysaccharides **44**, **45**, **46**, nous allons utiliser la même stratégie de groupements protecteurs orthogonaux permettant la synthèse multiétapes d'oligosaccharides mit au point au laboratoire (Schéma 27).

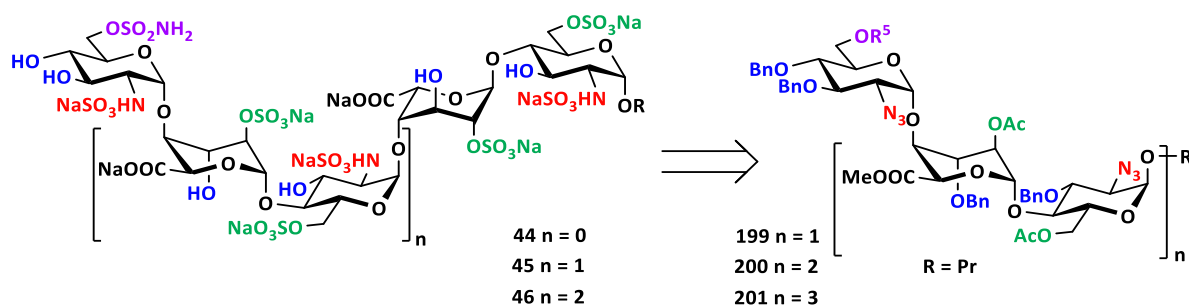


Schéma 27 : Retrosynthèse des polysaccharides.

Tout comme pour la synthèse du dodécassaccharide et des « mimes à SAS » notre stratégie repose sur l'utilisation de groupements acétyle pour protéger les positions qui comporteront des *O*-sulfates. L'azoture masquera la nucléophilie de l'azote tout en permettant l'obtention de la stéréosélectivité 1,2-*cis* lors des réactions de glycosylation d'une part, puis sa fonctionnalisation ultérieure en *N*-sulfate d'autre part. Pour les hydroxyles libres, des éthers benzyliques sont envisagés comme groupements protecteurs.

Dans le but de synthétiser des oligosaccharides inhibiteurs des endosulfatases humaines 1 et 2, notre stratégie repose sur la synthèse d'oligosaccharides impairs. En effet notre but est de présenter, le plus tôt possible la fonction inhibitrice dans le site catalytique, tout en laissant le reste de la molécule le plus possible en interaction avec le domaine de reconnaissance. Nos molécules devront être fonctionnalisées sur la position 6 de la glucosamine située du côté de l'extrémité non-réductrice avec la fonction inhibitrice. Des conditions prenant en compte la compatibilité réactionnelle entre le sulfamate et les autres fonctions chimiques d'une part, et la compatibilité des conditions opératoires utilisées pour la synthèse avec le sulfamate d'autre part, seront nécessaires. Il faudra donc différencier les glucosamines pour permettre la sulfamoylation de la position 6 de l'extrémité non-réductrice.

Notre stratégie repose sur la construction du trisaccharide **199**, celle-ci doit être la plus efficacement possible, car c'est cette molécule qui sera un intermédiaire clé pour notre synthèse. En effet celui-ci permettra d'obtenir l'oligosaccharide **44** mais aussi d'être engagé après quelques étapes de synthèse dans des réactions de glycosylation. L'obtention des polysaccharides **200** et **201** se fera à partir de **199** avec une stratégie de glycosylation de type 3+2 et 3+4. Grâce au procédé itératif mis au point par le laboratoire et à la présence du groupement allyle, la transformation du trisaccharide **199** en donneur de type imidate se fera par la courte séquence réactionnelle vue plus tôt (Schéma 28).

Pour réaliser cette stratégie de glycosylation, il conviendra de préparer les différents accepteurs. Pour la synthèse du pentasaccharide, le disaccharide accepteur est la molécule **161** et dans le cas de l'heptasaccharide l'accepteur tetrasaccharidique est la molécule **164** (Schéma 28).

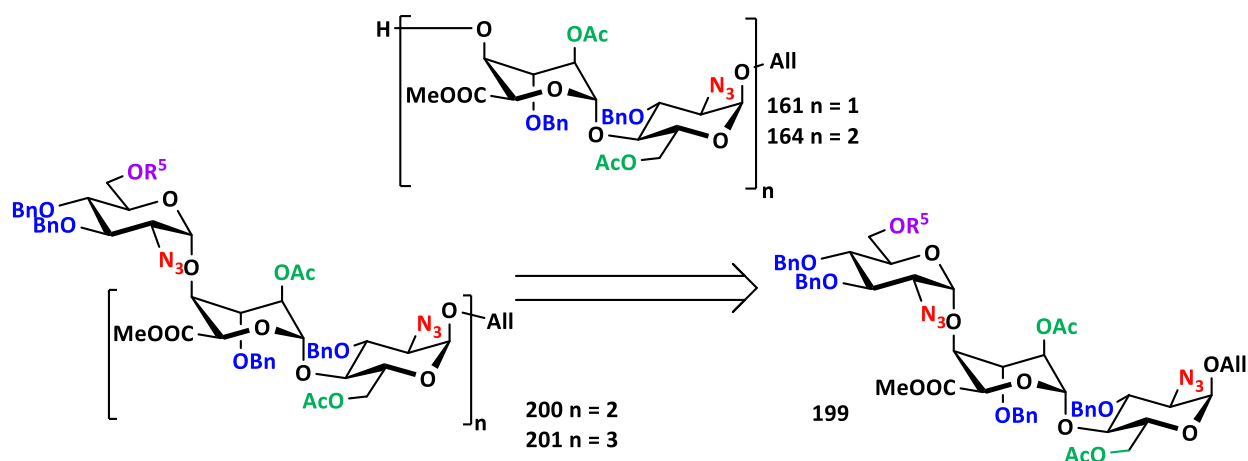


Schéma 28 : Identification d'un intermédiaire clé.

Le trisaccharide **198**, proviendra de la réaction de glycosylation entre une glucosamine portant en position 6 un groupement orthogonal, en tant que donneur et le disaccharide **165** également correctement protégé en tant qu'accepteur. Ce trisaccharide étant notre intermédiaire clé il faudra donc trouver des conditions d'obtentions pour cette molécule garantissant un accès rapide avec de bons rendements. Cela implique de trouver le meilleur couple : groupement activable/promoteur afin d'obtenir une bonne stéréosélectivité et un bon rendement lors de la réaction de glycosylation. La synthèse de ce trisaccharide se fera à partir d'un donneur monosaccharidique et de l'accepteur **161** (Schéma 29).

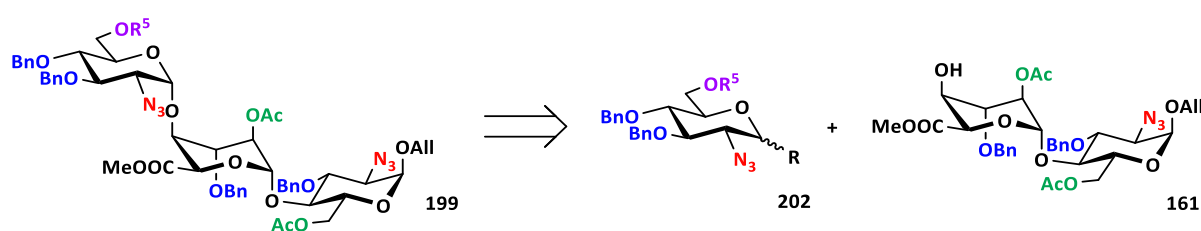


Schéma 29 : rétrosynthèse du trisaccharide clé **198**.

4. Etude d'une glycosylation : voie d'accès au « trisaccharide »

La synthèse de ce trisaccharide **199** doit être la plus rapide et efficace possible. Afin d'étudier la réaction de glycosylation menant à la synthèse de **199**. Il a fallu choisir le groupement protecteur en position 6. Une fois celui-ci fixé, nous avons travaillé sur un modèle et fait varier les couples groupements activables/promoteurs. Une fois les meilleures conditions trouvées, elles ont été appliquées pour la synthèse de **199**.

4.1. Stratégie de glycosylation

4.1.1. Design du monosaccharide

Nous avons décidé d'utiliser comme groupement protecteur acétal de benzylidène installé entre la position 4 et la position 6. Le double rôle de ce groupement protecteur est de permettre par une réaction d'ouverture réductrice régiosélective, la libération de la fonction alcool laissant ainsi l'hydroxyle en 6 fonctionnalisable, mais également de retrouver en position 4 un groupement benzyle, qui s'intègre parfaitement dans notre stratégie de groupements protecteurs. En effet, la dernière étape de synthèse est l'hydrogénolyse des éthers benzyliques permettant l'obtention des hydroxyles libres (Schéma 30).

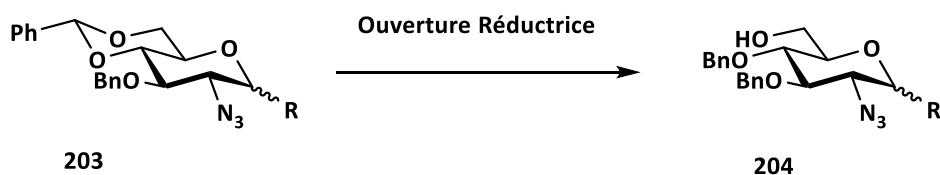


Schéma 30 : Stratégie du benzylidène.

4.1.2. Types d'activations envisagés

Nous avons donc trouvé les différentes fonctionnalisations de notre monosaccharide **203**. Afin de préparer la glycosylation, nous devons envisager quelques possibilités de groupements activables en position anomère.

Le premier groupement envisagé est le thioglycoside correspondant à la molécule **205**. Comme vu précédemment, avoir un tel motif au sein d'une brique permet la synthèse rapide et efficace d'oligosaccharides. Le second groupement activable choisi pour la synthèse du trisaccharide **199** est l'utilisation d'un *N*-phényltrifluoroacétimide, correspondant à la molécule **206** (Schéma 31).

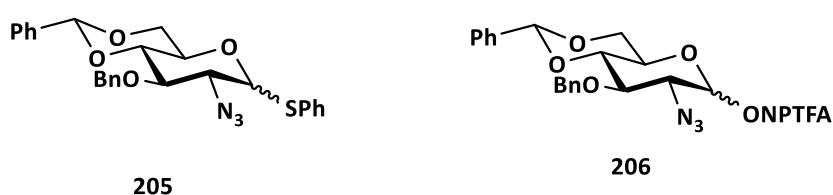


Schéma 31 : Identification des monosaccharides cibles.

4.1.3. Nécessité d'un modèle

Avant de se lancer dans la synthèse du trisaccharide et de tester la réactivité des monosaccharides avec un disaccharide qui est un intermédiaire de synthèse avancé, il nous faudra convenir d'un modèle afin d'étudier la réactivité et la stéréosélectivité lors de la réaction de glycosylation. Pour cela, nous avons envisagé d'étudier la réactivité en glycosylation des monosaccharides **205** et **206** avec le monosaccharide accepteur **207** (Schéma 32).

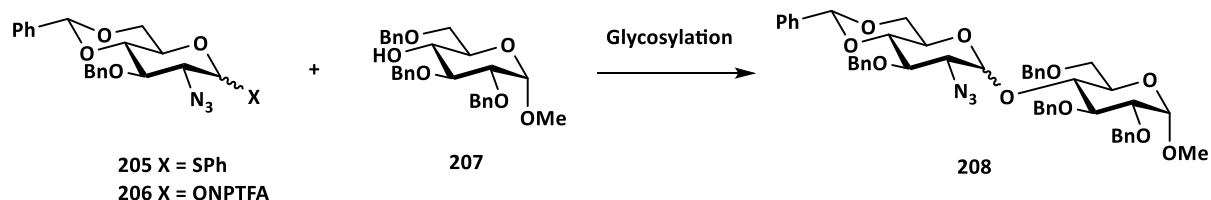


Schéma 32 : Utilisation d'un accepteur modèle.

4.2. Synthèse des donneurs

Afin de pouvoir étudier la réactivité de ces donneurs en glycosylation, nous avons synthétisé les monosaccharides **205** et **206**.

4.2.1. Vers le RSPH

Nous sommes partis du sel hydrochlorate de glucosamine afin de préparer le monosaccharide **205**. Cette synthèse est bien connue au laboratoire et se fait facilement sur l'échelle d'une dizaine de grammes.

Elle commence par la peracétylation de cette glucosamine, par l'anhydride acétique dans la pyridine. Dans un deuxième temps, le (Phenylthio)trimethylsilane en présence de iodure de zinc (II),¹³⁶ permet l'installation du thioacétal avec l'obtention de l'anomère β uniquement grâce à la participation de l'acétyle porté par l'azote en position 2. La déprotection de la position 2, ainsi que de la 3, 4 et 6 se font en utilisant l'hydroxyde de barium.¹³⁷ Une fois le triol **212** obtenu, un transfert de diazonium est effectué avec l'azote de l'imidazolesulfonyle en présence de cuivre (II).¹³⁸ Une fois l'azoture en position 2, le monosaccharide **213** peut réagir avec le PhCH(OMe)_2 afin de former l'acétal benzylidénique en position 4 et 6.¹³⁹ La synthèse s'achève en utilisant des conditions de benzylation classique : hydrure de sodium dans le *N,N*-diméthylformamide pour préparer l'alcoolate qui réagit sur le bromure de benzyle afin de protéger cette position 3 (Schéma 33).

¹³⁶ Buskas, T.; Garegg, P. J.; Konradsson, P.; Maloisel, J.-L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5 (11), 2187–2194.

¹³⁷ Conchie, J.; Levvy, G. A.; Marsh, C. A. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, 12, 157–187.

¹³⁸ Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org. Lett.* **2007**, 9 (19), 3797–3800.

¹³⁹ Evans, M. E. *Carbohydr. Res.* **1972**, 21 (3), 473–475.

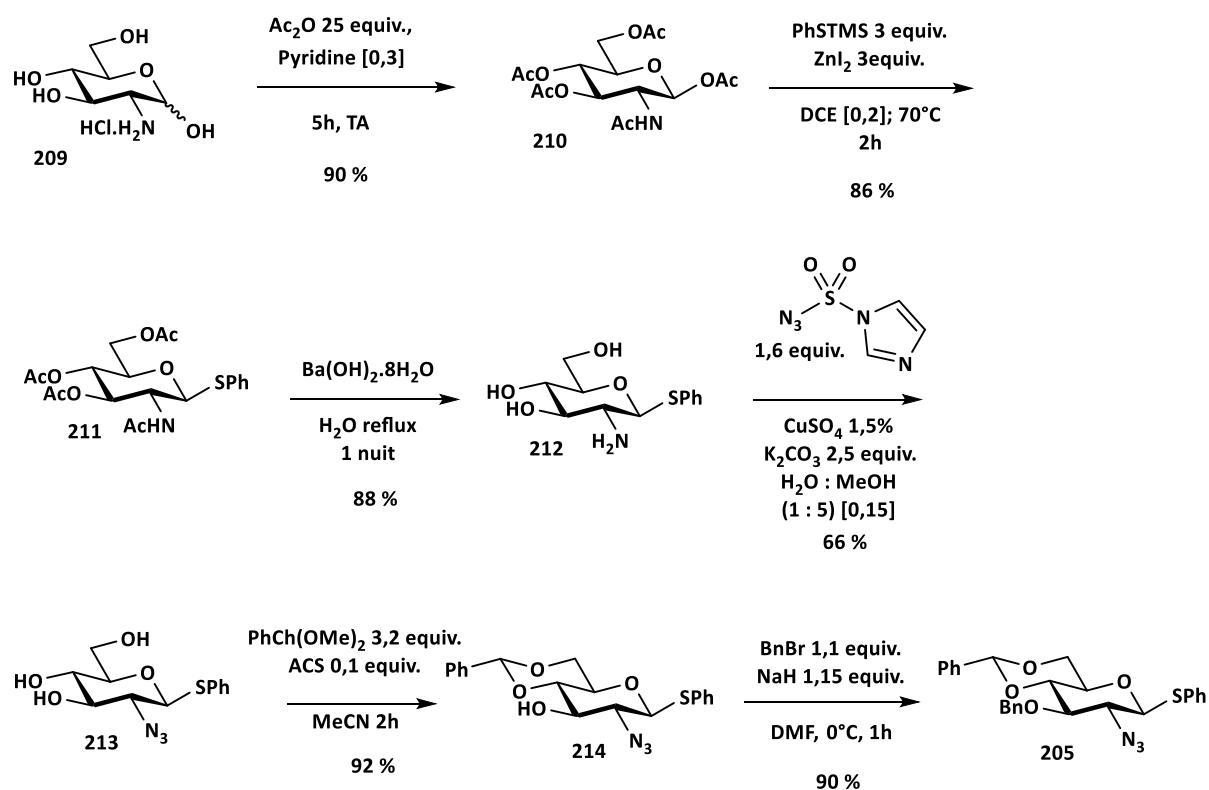


Schéma 33 : Synthèse du donneur thioglycoside **205**.

Le premier donneur a été synthétisé avec un rendement globale de 37% sur 6 étapes.

4.2.2. Du RSPH au NPTFA

Le donneur thioacétal obtenu, nous pouvons passer à la préparation du donneur de type imidate. Pour cela le monosaccharide **205** servira de produit de départ. En présence de *N*-bromosuccinimide dans un mélange acétone-eau, le thioacétal est transformé en hémiacétal avec un rendement de 90%. Ce dernier est transformé en imidate en le faisant réagir sur le chlorure de *N*-phényltrifluoroacétimidoyl avec un rendement allant de 95% à quantitatif.

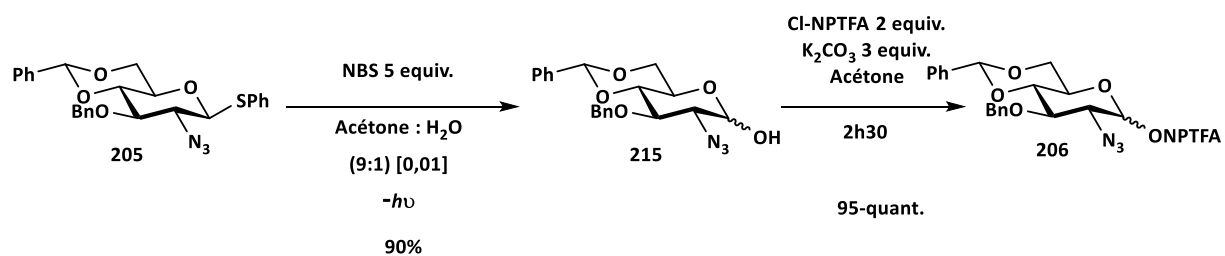


Schéma 34 : Synthèse du donneur NPTFA **206**.

Lors de cette courte séquence, un sous-produit a été identifié lors de la réaction conduisant à l'hémiacétal.

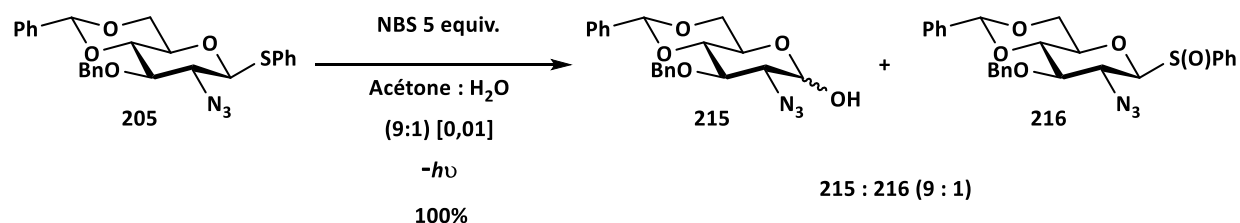


Schéma 35 : identification d'un sous-produit.

Le sulfoxyde anomère a été isolé avec un rendement de 10%. Nous expliquons la formation de ce sous-produit par l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur l'atome de soufre activé par le *N*-bromosuccinimide. L'élimination de brome fait probablement intervenir un nucléophile, ou une base présente dans le milieu, par exemple l'ion bromure, ou l'anion succinimide. La légère coloration orangée de la solution, due à la formation de brome moléculaire, tend à vérifier notre hypothèse.

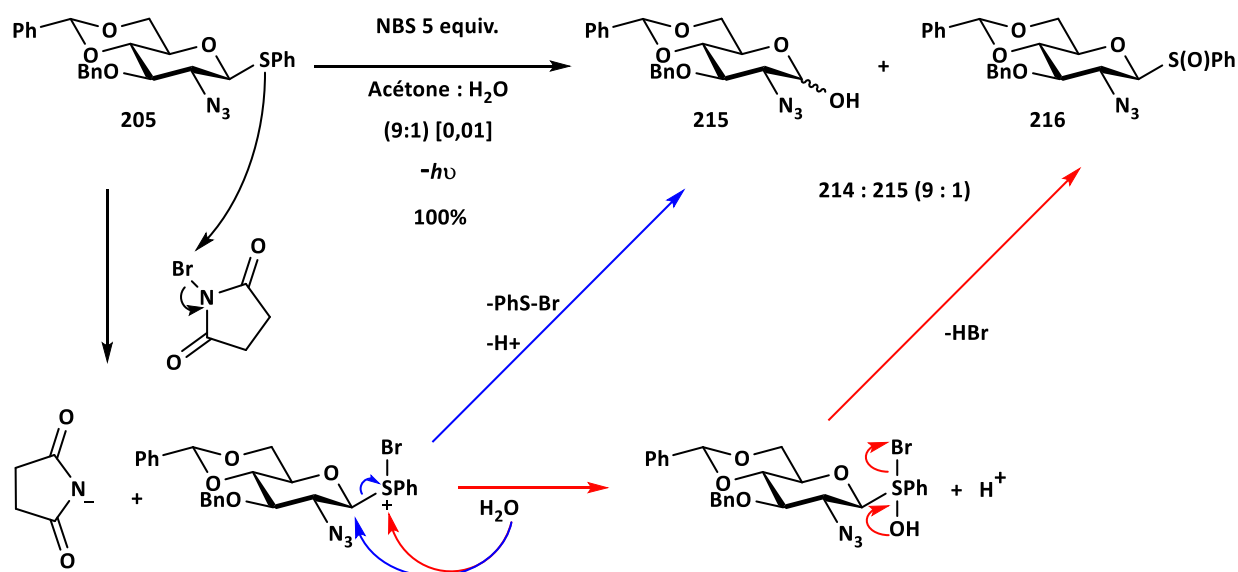


Schéma 36 : Mécanisme proposé pour la formation du sulfoxyde anomérique **216**.

4.2.3. Un sous-produit à tester ?

Bien que le rendement chute légèrement, ce sous-produit **216**, reste intéressant d'un point de vue méthodologique. Les sulfoxydes anomères ont été introduits par Kahne comme groupement activable pour la réaction de glycosylation.¹⁴⁰ Nous avons donc ajouté ce sous-produit dans les donneurs à tester.

4.3. Glycosylation avec l'accepteur modèle

Les donneurs étant synthétisés, nous avons commencé à les mettre en réaction avec l'accepteur modèle.

4.3.1. De type Crich-van Der Marel

¹⁴⁰ Kahne, D.; Walker, S.; Cheng, Y.; Van Engen, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (17), 6881–6882.

Le premier donneur testé est le thioacétal **206**. Nous avons choisi les conditions d'activation mit au point par David Crich, modifiées par Gijs A. van Der Marel, qui consistent en l'emploi de diphénylesulfoxyde combiné à l'anhydride triflique en présence d'une base encombrée permettant au thioglycoside de réagir. Une fois ce dernier activé, l'accepteur peut former la liaison glycosidique. Les premiers essais de glycosylation ont donné de bons rendements de 92% (Schéma 37).

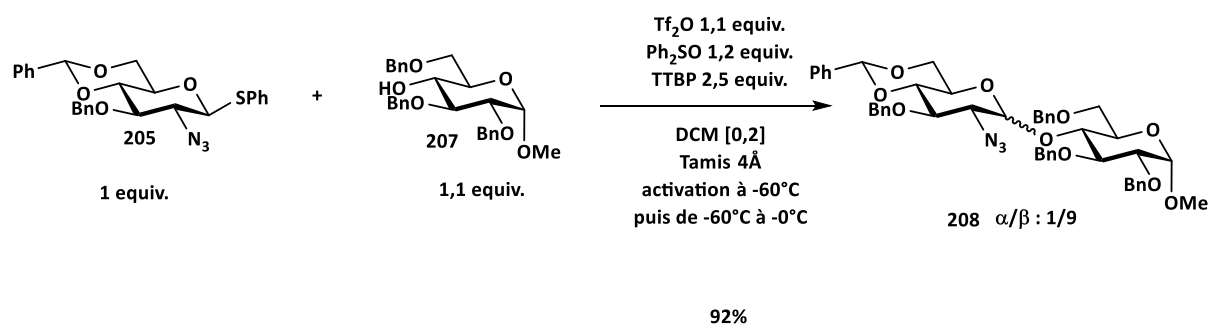


Schéma 37 : Glycosylation avec le thioglycoside **205**.

Grâce à la résonance magnétique nucléaire du proton, nous avons pu déterminer le rapport diastéréomérique de la glycosylation. En effet, les déplacements chimiques des protons portés par les benzyldènes sont très différents en fonction du diastéréoisomère obtenu, le proton du benzyldène « H α » du diastéréoisomère axial sort à un déplacement chimique de 5,57 ppm alors que le proton du benzyldène « H β » lui à un déplacement chimique de 5,50 ppm. De cette manière nous avons pu rapidement obtenir le rapport diastéréomérique du disaccharide.

La contrôle de la stéréosélectivité dans cette réaction est correct, nous obtenons un rapport α/β de 1/9. Malheureusement, le diastéréoisomère formé majoritairement est le stéréoisomère 1,2-*trans*, avec une liaison équatoriale. Les résultats restent intéressants, mais peu encourageants pour la synthèse des oligosaccharides cibles qui ont des liaisons α , 1,2-*cis*.

4.3.2. De type Khane

L'activation d'un sulfoxyde anomère en tant que groupement activable a été introduite par Daniel Kahne,¹⁴⁰ et rendue célèbre par David Crich.¹⁴¹ Elle a lieu classiquement, en présence d'anhydride triflique¹⁴² et d'une base encombrée. Nous avons appliqué ces conditions réactionnelles à notre glycosylation modèle (Schéma 38).

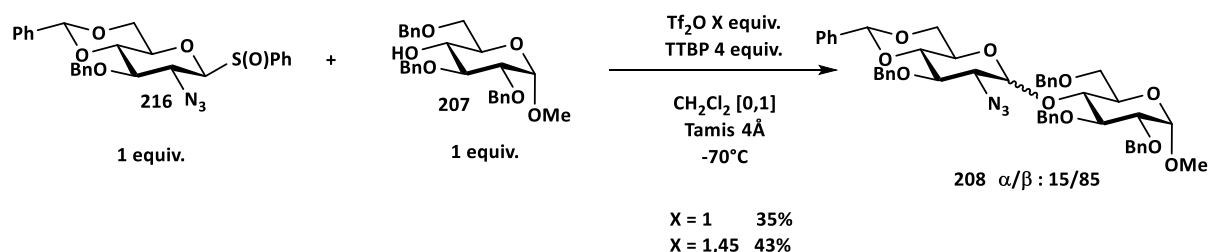


Schéma 38 : Glycosylation modèle avec le donneur sulfoxyde.

Deux essais ont été réalisés en faisant varier la quantité d'anhydride triflique. Malgré une activation complète au bout de 10 min, les rendements isolés en disaccharide ont été peu encourageants, de l'ordre de 40%. De plus, les rapports diastéréomériques se sont révélés, comme dans le cas du thioacétal, en faveur du diastéréoisomère β avec quasiment le même excès ($\alpha/\beta = 15/85$).

4.3.3. De type Schmidt-Yu

L'imidate **206** a été mis en réaction avec l'accepteur modèle. Deux promoteurs silylés ont été testés.

¹⁴¹ Crich, D.; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (46), 11217–11223.

¹⁴² Huang, M.; Retailleau, P.; Bohé, L.; Crich, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (36), 14746–14749.

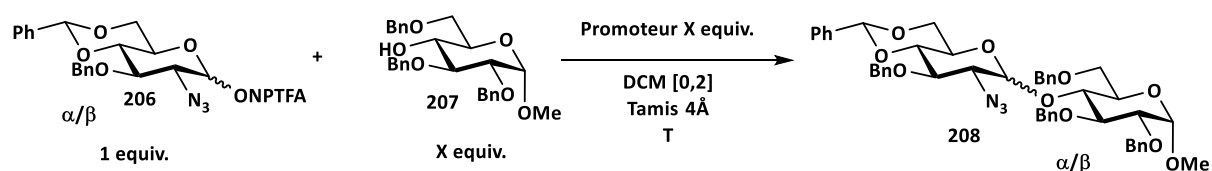


Schéma 39 : Réaction de glycosylation du disaccharide modèle.

Afin de trouver les meilleures conditions pour cette réaction de glycosylation, nous avons fait varier le promoteur silylé, les équivalents de l'accepteur **207**, ainsi que la température de réaction.

Tableau 8 : Recherche des conditions pour la glycosylation avec l'imidate **206**.

Entrée	α/β^a	Equivalent de l'accepteur	Promoteur	T (°C)	Rendement	α/β^b
1	5/5	1,3	TMSOTf 0,2 equiv.	0	66%	7/3
2	5/5	1,6	TMSOTf 0,08 equiv.	0	Traces de 208	-
3	5/5	1,3	TMSOTf 0,2 equiv.	-78 → 0	61%	7/3
4	7/3	0,77	TBDMSOTf	-40	94%	7/3
5	5/5	0,77	TBDMSOTf	-40	90%	7/3
6	5/5	0,77	TBDMSOTf	0	50%	7/3
7	5/5	0,77	TBDMSOTf	-78 → 0	65%	7/3

Légende : *a* : rapport α/β de l'imidate ; *b* : rapport α/β du disaccharide.

La recherche des meilleures conditions de glycosylation a commencé par l'utilisation du triflate de triméthylsilyle comme promoteur (Tableau 8, entrée 1 à 3). Deux types d'ajout ont été testés. Une procédure appelée méthode directe, où l'accepteur et le donneur sont

mélangés avec le tamis moléculaire, puis solubilisés dans du dichlorométhane, (Tableau 8, entrée 2) et une procédure appelée méthode inverse, où le donneur est ajouté au mélange réactionnel contenant l'accepteur, le promoteur, le tamis moléculaire et le solvant (Tableau 8, entrée 1). Lors de la glycosylation en méthode inverse, nous avons observé une hydrolyse du donneur et des traces de formation de disaccharide. Contrairement à la méthode inverse la méthode directe a bien fonctionné. Elle donne un rendement de 66 % ; même si le rapport diastéréoisomérique de 7/3 est en faveur du stéréoisomère α , il reste néanmoins plutôt décevant. Changer la température n'a pas eu d'effet sur la stéréosélectivité de la réaction.

Lors du changement de promoteur nous avons décidé d'ajuster les nombres d'équivalents du donneur et de l'accepteur. Dans notre stratégie de glycosylation l'accepteur est un intermédiaire de plus haute valeur que le donneur. Il convient donc de trouver une méthode utilisant plus de donneur que d'accepteur. L'accepteur a donc été mis en défaut pour la suite de la méthodologie.

L'emploi du triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle a permis d'améliorer le rendement, mais pas le rapport diastéréomérique. Les meilleures conditions ont été trouvées à -40°C en utilisant un rapport de nombre d'équivalent **206/207** de 1,3/1. Nous avons également constaté que changer le rapport diastéréomérique de l'imidate **206** n'influçait pas le rapport diastéréomérique du disaccharide final.

En conclusion nous avons des résultats mitigés sur ces essais de glycosylation. Avec le thioglycoside, le rapport diastéréomérique est bon mais ce n'est pas le diastéréoisomère désiré et le rendement est moins haut que pour l'imidate. Avec ce dernier, bien que nous ayons le bon diastéréoisomère majoritaire, c'est le rapport diastéréomérique qui n'est pas bon.

4.3.4. Discussion autour de la stéréosélectivité

Lors de ces réactions de glycosylation, l'intermédiaire principal est un triflate anomérique.^{143,144} Celui-ci a été mis en évidence par David Crich. Il a également essayé de rationaliser le mécanisme de glycosylation et notamment dans le cas de la réaction avec des mannoses. En combinant l'effet isotopique cinétique et des modélisations d'intermédiaire de types triflates anomériques, il arrive à la conclusion que le mécanisme suit plutôt un mécanisme de type SN₂.

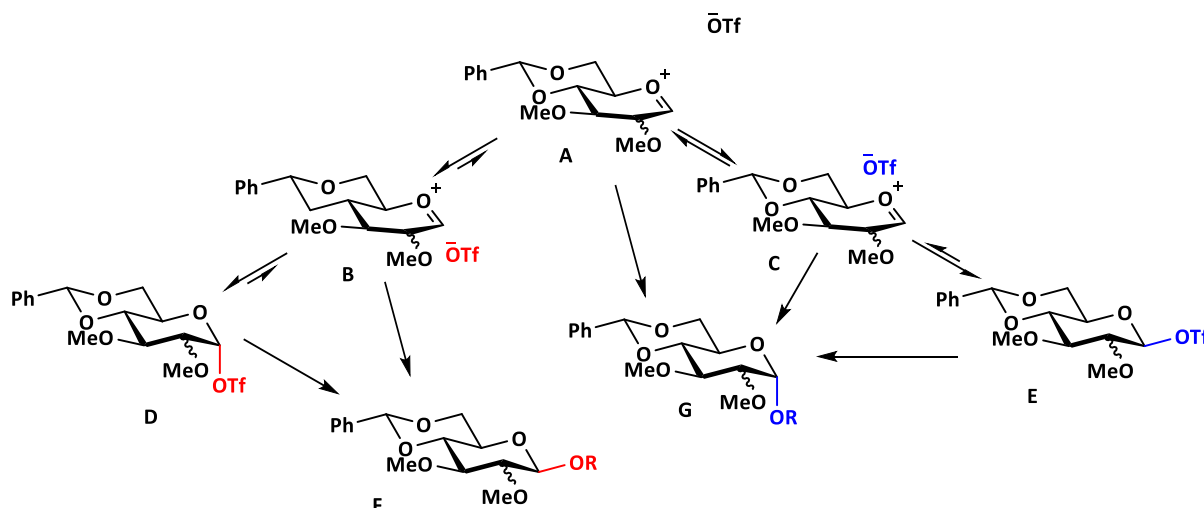


Schéma 40 : Mécanisme de glycosylation selon David Crich.^{143,144}

Dans ce mécanisme, David Crich explique que l'intermédiaire **A**, qui est un oxocarbenium avec une paire d'ions dissociée, peut évoluer dans deux voies. Ces deux voies conduisent à la formation d'intermédiaire de types triflates anomériques sous forme de paires d'ions ou de liaisons covalentes **B-E**. David Crich postule un mécanisme de réaction, entre les intermédiaires et l'accepteur, de type SN₂, menant à la formation des glycosides α et β . David Crich arrive à la conclusion que dans le cas d'une glycosylation avec un glucose portant en position 4 et 6 un acétal de benzylidène, la formation de l'anomère α est fortement favorisée.

On peut constater que dans les paragraphes 4.3.1. et 4.3.2. nos résultats sont à l'opposé de ce qui était prévu par David Crich. Plusieurs paramètres changent : le solvant et

¹⁴³ Huang, M.; Garrett, G.; Birlirakis, N.; Bohé, L.; Pratt, D.; Crich, D.; *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 663-667.

¹⁴⁴ Crich, D.; *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9193-9209.

l'accepteur. Mais globalement nous aurions dû retrouver la même tendance à savoir le diastéréoisomère α majoritaire. Or on se retrouve dans ce cas uniquement lors de la glycosylation avec le *N*-Phényltrifluoroacétamide. La principale différence entre les donneurs ayant un groupement activateur à base de soufre et les imidates sont que dans un cas il y a préactivation puis ajout de l'accepteur et dans l'autre une formation des intermédiaires au fur et à mesure de la réaction avec un promoteur en quantité catalytique. Dans l'hypothèse où les intermédiaires formés ainsi que les chemins suivis soient identiques dans les deux sortes de glycosylation, on pourrait conclure que le triflate α serait le plus stable puisque c'est celui que l'on retrouve majoritaire lors de la glycosylation par préactivation. A noter également que les températures où se déroulent les glycosylations ne sont pas identiques, cela pourrait avoir une influence majeure sur le résonnement précédent. En effet, les vitesses de réactions des formes du triflate anomérique ne sont pas identiques à -70°C qu'à -40°C . On pourrait supposer que l'échange entre les forme α et β se fait plus rapidement à -40°C et donc plus lentement à -70°C .

4.4. Application au « Trisaccharide »

Avec ces conditions en main, nous avons testé la réaction de glycosylation avec les différents donneurs et l'accepteur **161** afin de former le trisaccharide clé **199**.

4.4.1. Résultats avec l'accepteur disaccharidique

Le premier donneur à avoir été testé est le thioacétal. Ce donneur a été mis dans des conditions de réactions identiques à celles utilisées pour le disaccharide modèle (Schéma 41).

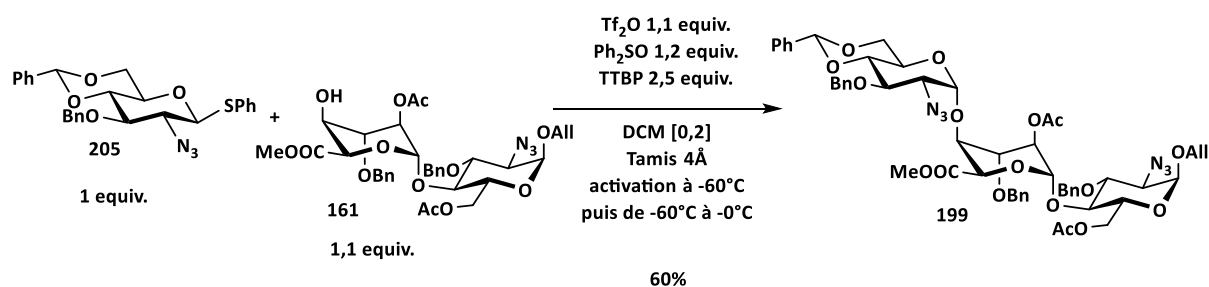


Schéma 41 : Préparation du trisaccharide **198** avec le donneur thioglycoside.

Lors de cette réaction, nous nous attendions à un mauvais rapport α/β , à notre grande surprise, seul le diastéréoisomère α a été observé lors de l'analyse par RMN ^1H . Afin de rechercher des traces du diastéréoisomère β , une analyse HSQC en laissant un délai d1 suffisamment long pour que tous les carbones puissent se retrouver à l'équilibre, a été effectuée. Ces conditions d'analyse permettent de maximiser les chances d'obtenir une tache de corrélation entre le proton H1 β et le carbone anomère. Bien que cette analyse soit plus sensible qu'une RMN du ^{13}C , aucune trace du diastéréoisomère β n'a été observée. En contrepartie, le rendement reste modeste puisque malgré les répétitions il n'a pas évolué.

Bien que les résultats sur la glycosylation entre l'accepteur modèle et le donneur de type sulfoxyde n'aient pas été probants, nous avons effectué un essai de glycosylation en utilisant 1,45 équivalent d'anhydride triflique. Nous avons mis l'accepteur en défaut afin de favoriser la formation du trisaccharide. Ces conditions ont permis d'isoler le trisaccharide avec un rendement de seulement 37% mais avec une stéréosélectivité a priori parfaite, car une fois de plus aucune trace de diastéréoisomère β n'a été observée (Schéma 42).

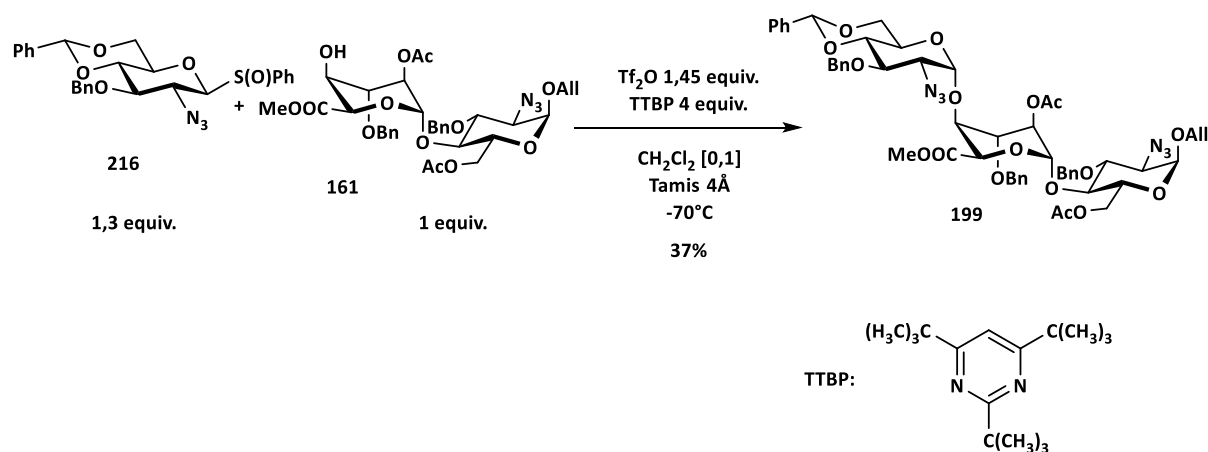


Schéma 42 : Glycosylation du donneur sulfoxyde pour former le trisaccharide clé.

Avec ces résultats en demi-teinte, nous avons testé le donneur imidate avec l'accepteur **161**. De la même manière que pour le thioglycoside **206**, nous avons appliqué les conditions obtenues pour la synthèse du disaccharide **208**. Avec le donneur de type imidate **206**, les rendements sont de l'ordre de 95%. La principale différence avec le disaccharide est le rapport diastéréomérique. En effet, de la même manière que dans le cas du thioglycoside, seul le diastéréoisomère α a été observé. Afin de pouvoir utiliser cette réaction pour synthétiser notre trisaccharide, nous avons décidé de faire varier le nombre d'équivalent du donneur monosaccharidique (Schéma 43).

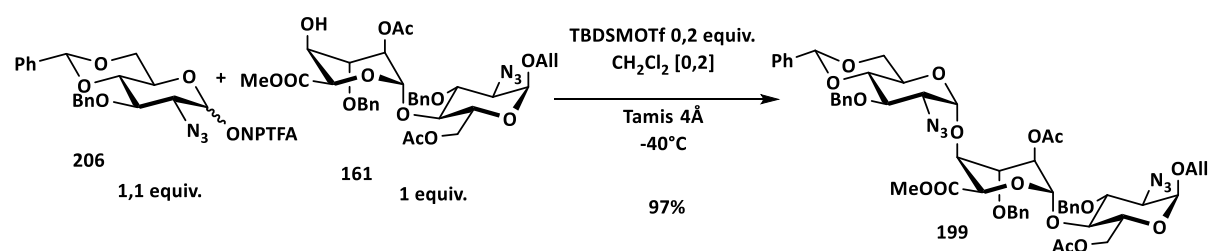


Schéma 43 : Synthèse du trisaccharide clé **199** avec le donneur imidate.

En réduisant le nombre d'équivalent à 1,1, nous avons réussi à synthétiser le trisaccharide **199** sur une échelle de 50 mg avec un rendement de 97%. Comme précédemment, seul le diastéréoisomère α a été détecté.

Dans cette glycosylation, il semblerait que le groupement activable ait peu d'influence sur la stéréosélectivité finale. Un élément qui est sûrement déterminant dans cette sélectivité, c'est la vitesse de réaction relative des accepteurs. En effet, la vitesse de réaction entre les accepteurs est bien différente. L'accepteur modèle semble plus nucléophile que l'accepteur disaccharidique. La durée de la réaction entre le donneur NPTFA et l'accepteur modèle est de 2h30. Alors que dans le cas de l'accepteur disaccharidique la réaction est laissée une nuit afin de s'assurer que la réaction soit complète. En effet, l'hydroxyle en position 4 de l'iduronique est moins nucléophile de par son orientation axiale.

4.4.2. Conclusion

Les 3 donneurs ont été testés en glycosylation avec l'accepteur disaccharique. Les résultats de ces tests de glycosylations se sont montrés très intéressants. En effet peu importe le donneur utilisé, ainsi que la méthode d'activation, un seul et unique diastéréoisomère a été observé. Ce qui n'était pas le cas lors de la glycosylation du disaccharide modèle, les diastéréoselectivités étaient différentes.

En reprenant les arguments avancés dans le paragraphe 4.3.4. nous pouvons maintenant affirmer que les réactions qui permettent de passer d'un triflate α à un triflate β , sont très lente à -70°C , et beaucoup plus rapide à -40°C . Si la diastéréosélectivité du produit final est α , c'est que le triflate β se forme (toujours en supposant que le mécanisme est $\text{S}_{\text{N}}2$). Lors des glycosylations avec le monosaccharide c'est le triflate α qui réagissait préférentiellement. C'est grâce à un manque de nucléophilie de l'accepteur disaccharidique **161** que la formation du triflate β est possible. En effet, la réaction est beaucoup plus longue avec l'accepteur **161** ce qui laisse le temps au système de convertir le triflate α en β et donc de donner le trisaccharide avec la diastéréoselectivité souhaitée.

En ce qui concerne les rendements et la reproductibilité, c'est le *N*-phényltrifluoroacétamide qui donne les meilleurs résultats, même en augmentant l'échelle des produits de départ, les rendements sont supérieurs à 90%.

4.5. Conclusion

Malgré les résultats des réactions de glycosylation du disaccharide modèle, qui ne nous ont pas permis de sélectionner un couple groupement activable/promoteur, les résultats se sont montrés nettement meilleurs sur la réaction de formation du trisaccharide. Nous permettant d'obtenir une diastéréoselectivité totale.

5. Elongation de la chaîne

5.1. Utilisation de la stratégie itérative du laboratoire

5.1.1. Synthèse de l'accepteur et du donneur disaccharidique

Comme expliqué précédemment, en vue de préparer l'accepteur, nous partons d'un synthon avancé disponible en grande quantité au laboratoire. La préparation de l'accepteur commence donc par l'ouverture réductrice régiosélective du 2,4-benzylidène installé sur le motif iduronique. L'utilisation de dichlorophénylborane, acide de Lewis encombré, permet d'obtenir une régiosélectivité totale en faveur de l'ouverture en 2. Cette position peut donc être protégée convenablement selon le degré de sulfatation voulu sur l'oligosaccharide final. Dans notre cas cette position sera un sulfate. Elle est donc protégée par de l'anhydride acétique dans la pyridine pour conduire à l'obtention de **159** qui est également un intermédiaire clé pour notre stratégie itérative. En effet, c'est à partir de ce disaccharide que nous pourrons synthétiser à la fois les disaccharides donneur et accepteur. C'est en milieu acide, en utilisant l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane,¹⁴⁵ que le groupement *paramethoxybenzyle* de **159** est enlevé afin de donner l'accepteur **161** (Schéma 44).

¹⁴⁵ Yan, L.; Kahne, D. *Synlett* **1995**, 1995 (SI), 523–524.

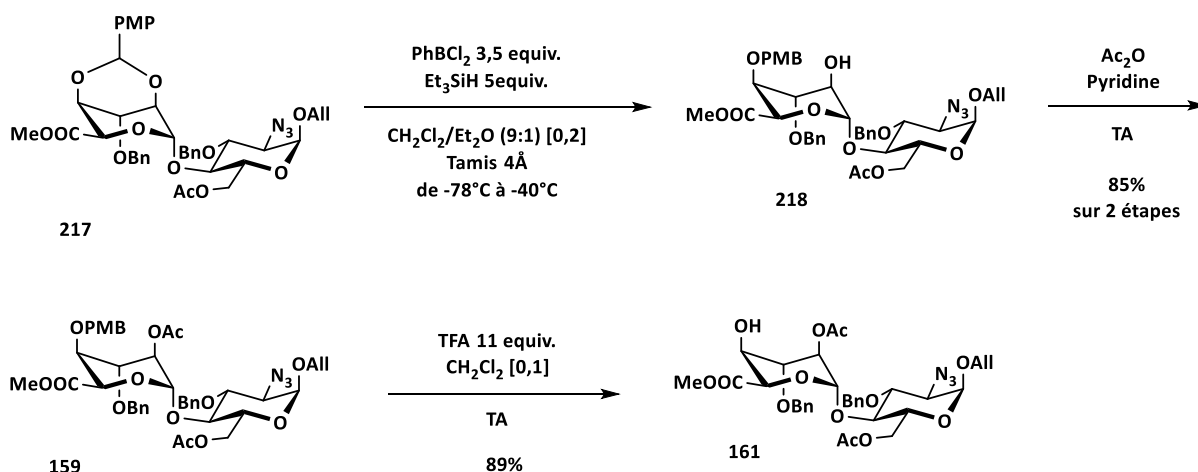


Schéma 44 : Préparation du donneur **161**.

Cette synthèse nous permet d'obtenir l'accepteur **161**, avec un rendement global de 75% sur 3 étapes. Elle permet également l'obtention de l'intermédiaire **159** qui peut subir également une courte séquence réactionnelle afin d'être transformé en donneur disaccharidique (Schéma 45).

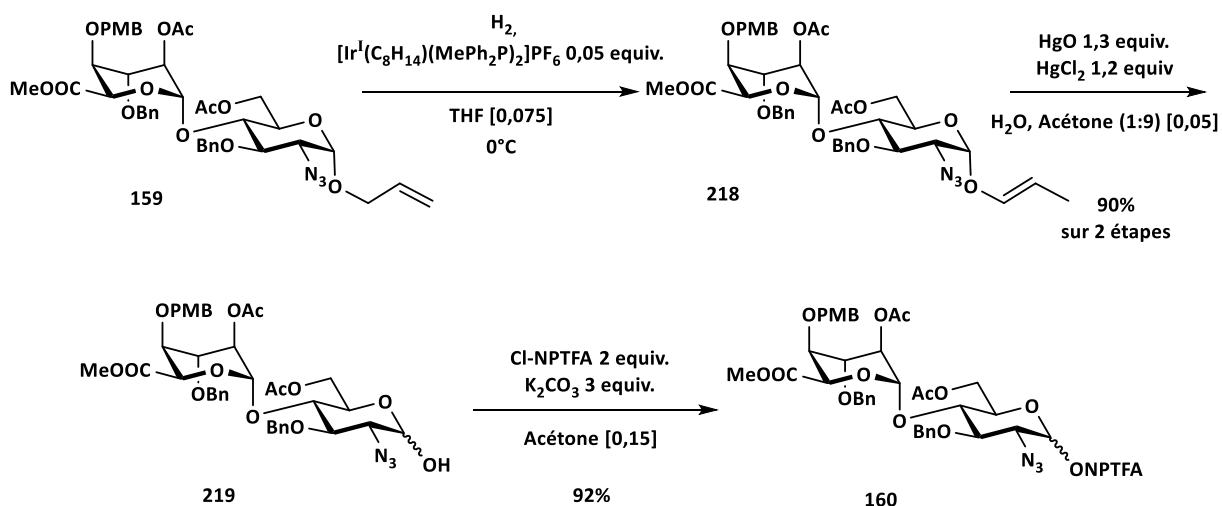


Schéma 45 : Préparation du donneur grâce à la stratégie itérative développée au laboratoire.

L'intermédiaire de synthèse **159** peut subir une isomérisation au niveau de la position allylique en utilisant un complexe d'Iridium (I).¹⁴⁶ L'éther d'énol ainsi obtenu peut subir une

¹⁴⁶ Oltvoort, J. J.; Van Boeckel, C. A. A.; De Koning, J. H.; van Boom, J. H. *Synthesis* **1981**, 1981 (4), 305–308.

coupure oxydante par des sels de Mercure (II).^{147,148} L'hémiacétal peut réagir sur le *N*-phényltrifluoroacétimide pour former le donneur **160** avec un rendement de 92%. Cette séquence réactionnelle permet d'isoler l'imidate **160** avec un rendement global de 83% à partir de **159**.

5.1.2. Synthèse du tetrasaccharide accepteur

Le donneur et l'accepteur ainsi isolés grâce à cette stratégie itérative, peuvent ainsi réagir dans une réaction de glycosylation (Schéma 46).

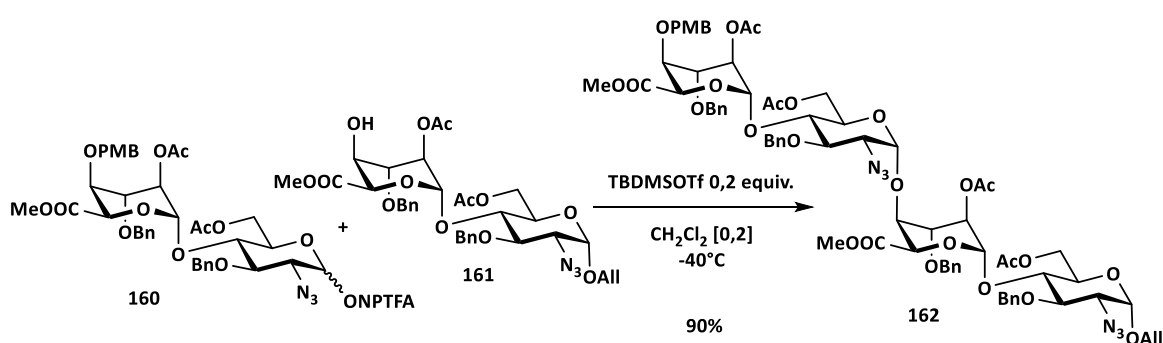


Schéma 46 : Réaction de glycosylation pour la préparation du tetrasaccharide **162**.

Le donneur **160** et l'accepteur **161** réagissent en présence du triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle, pour donner le tetrasaccharide avec un rendement de 90%. Une fois de plus, aucune trace d'un diastéréoisomère β n'a été observée.

Le tetrasaccharide **162** isolé, peut ensuite subir en milieu acide la déprotection de l'éther de *paraméthoxybenzyle* porté par la position 4, dans les mêmes conditions que pour le disaccharide. L'accepteur tetrasaccharidique **162** ainsi déprotégé, est isolé avec un rendement de 90% (Schéma 47).

¹⁴⁷ Inglis, G. R.; Schwarz, J. C. P.; McLaren, L. J. *Chem. Soc.* **1962**, 1014.

¹⁴⁸ Gigg, R.; Warren, C. D. *J. Chem. Soc. C.* **1968**, 1903.

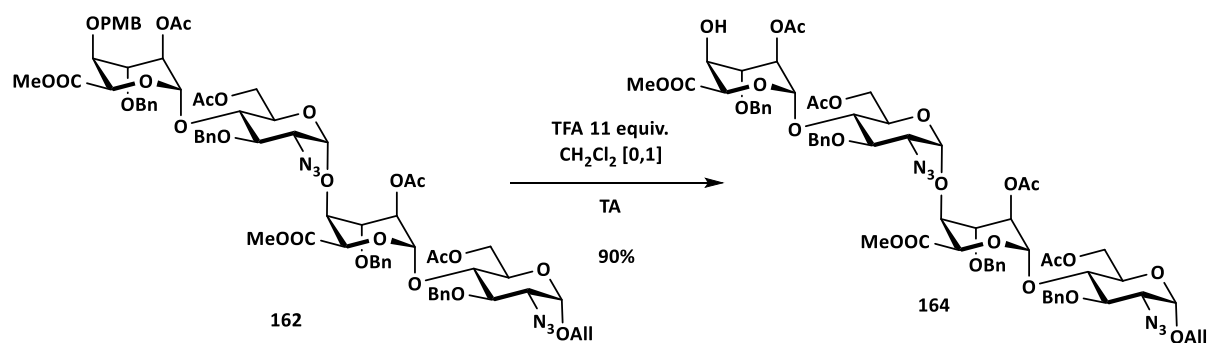


Schéma 47 : Réaction de déprotection de l'accepteur **168**.

Cette séquence réactionnelle a permis de préparer, en utilisant un unique synthon, les accepteurs **161** et **164**, intermédiaires nécessaires pour réaliser, lors des réactions de glycosylation, l'élongation du trisaccharide.

L'emploi de cette méthode itérative nous a permis d'utiliser un minimum de ressources et des méthodes robustes, fiables et compatibles avec cette synthèse afin d'obtenir les accepteurs qui serviront dans les réactions de glycosylation 3 + 4 et 3 + 2.

5.1.3. Transformation du trisaccharide clé **199** en donneur.

Parallèlement à cette synthèse d'accepteurs, et toujours dans le but de pouvoir réaliser nos polysaccharides de tailles différentes, le trisaccharide a été utilisé pour être transformé en donneur (Schéma 48).

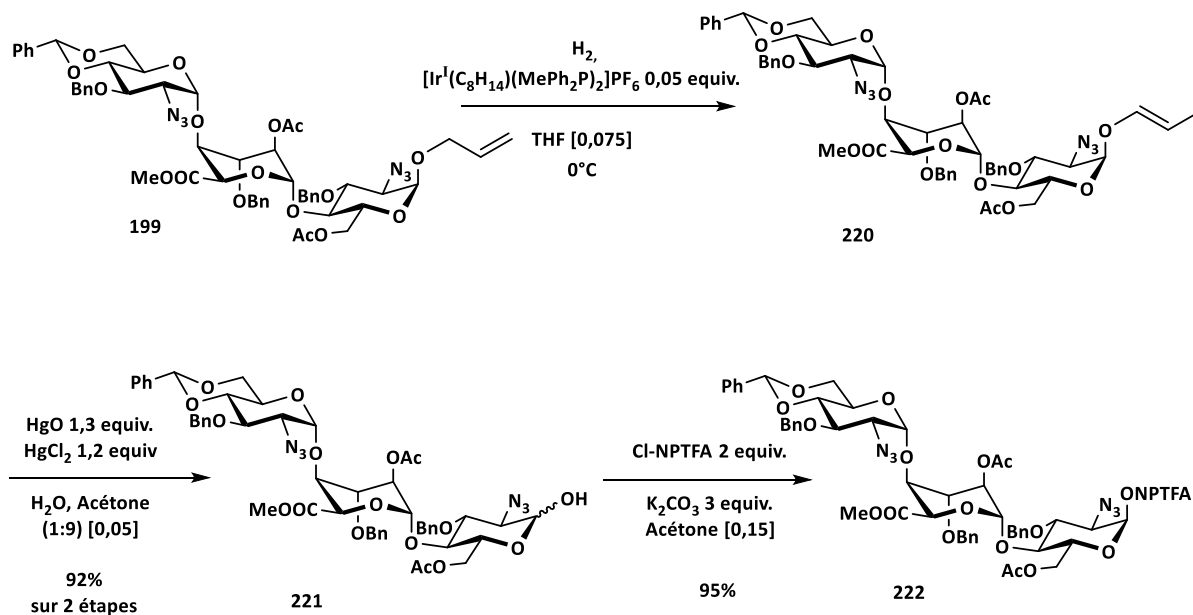


Schéma 48 : Synthèse du donneur trisaccharidique.

Cette séquence réactionnelle reprend les conditions de la stratégie itérative développée par le laboratoire. L'isomérisation de l'allyle suivie de la coupure oxydante permet d'obtenir l'hémiacétal avec un rendement de 92% sur deux étapes, puis la réaction de formation d'imidate permet de synthétiser le donneur avec un rendement isolé de 95% et un rendement global à partir du trisaccharide **199** de 87%.

5.2. Application au projet : réaction de glycosylation

Grâce à cette stratégie itérative, les accepteurs et le donneur peuvent maintenant réagir dans des réactions de glycosylation afin de préparer les polysaccharides. Notre stratégie est d'utiliser ce trisaccharide donneur dans une stratégie 3+2 et 3+4 afin de former nos polysaccharides. A titre comparatif une stratégie 1+4 a été testée.

5.2.1. Synthèse du pentasaccharide : stratégie de glycosylation 3 + 2

Le donneur **222** peut donc réagir avec l'accepteur **161** en présence de triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle, dans le dichlorométhane à -40°C pour donner le pentasaccharide **200** avec un rendement de 83%.

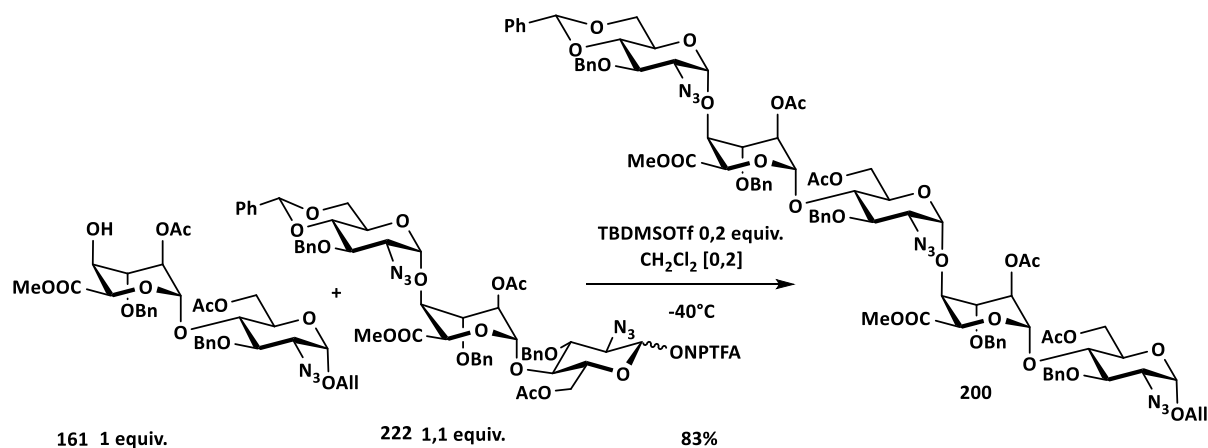


Schéma 49 : Synthèse du pentasaccharide par une glycosylation 3 + 2.

La réaction n'étant pas totale, nous avons pu récupérer 10% du donneur n'ayant pas réagi ainsi que 8% de l'accepteur n'ayant pas réagi.

Lors de cette glycosylation, de la même manière que pour les autres réactions de glycosylations, une analyse RMN HSQC a été réalisée, et de manière identique aucune tache de corrélation entre un proton anomère β et le carbone en position 1 n'a pu être détectée.

5.2.2. Synthèse du pentasaccharide : stratégie de glycosylation 1 + 4

Le pentasaccharide peut également être obtenu à partir de la réaction d'un monosaccharide donneur, réagissant avec un accepteur tetrasaccharidique. Nous avons voulu comparer les rendements et la diastéréosélectivité lors de ces réactions. Les partenaires pour effectuer la réaction en 1 + 4 ont donc été mis en présence du triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle, dans le dichlorométhane à une température de -40°C (Schéma 50).

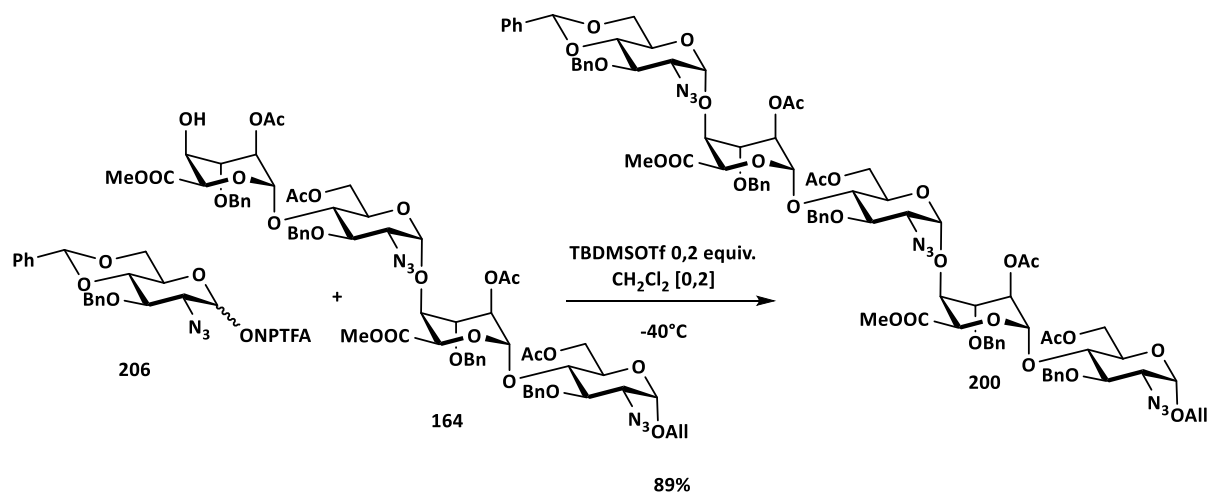


Schéma 50 : Synthèse du pentasaccharide **200** via une glycosylation 1+4

Par cette voie, le pentasaccharide a été obtenu avec un rendement similaire au précédent puisqu'il est de 89%. L'excès diastéréomérique est proche de 100% car comme dans les cas précédents aucune trace du diastéréoisomères β n'a été décelée.

5.2.3. Synthèse de l'heptasaccharide : une glycosylation 3 + 4

Pour la synthèse de l'heptasaccharide, c'est le donneur trisaccharidique **222** et l'accepteur tetrasaccharidique **164**, qui ont été associés (Schéma 51).

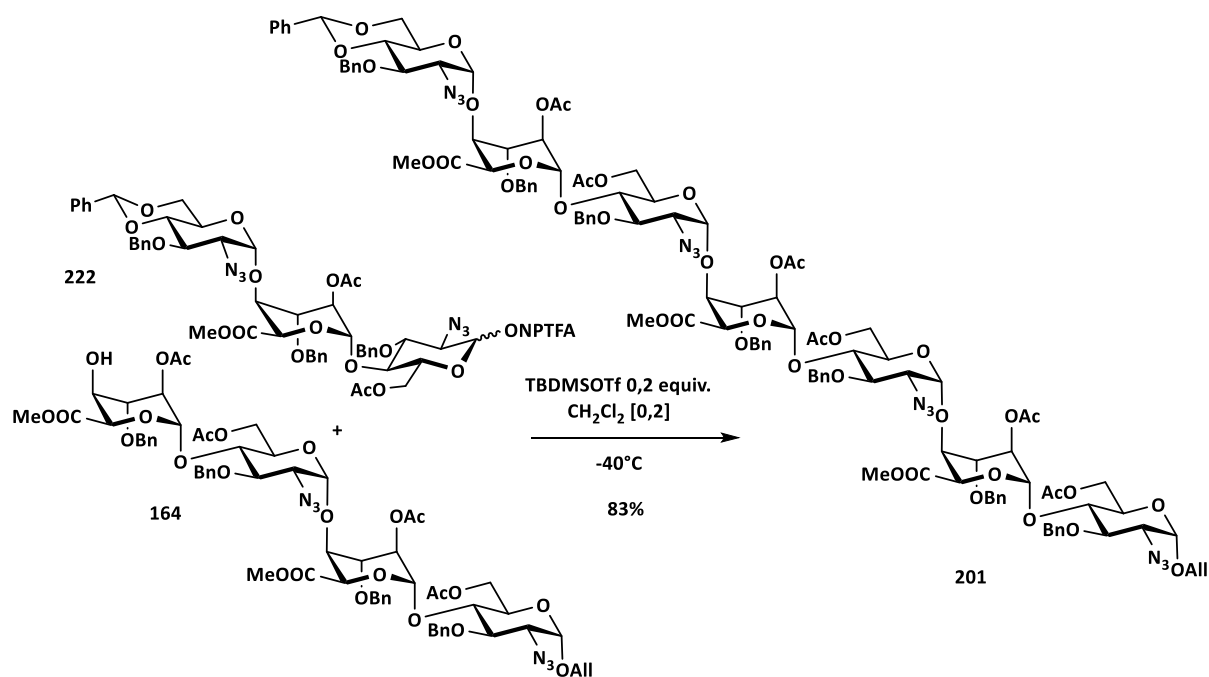


Schéma 51 : Synthèse de l'heptasaccharide **201** par une réaction de glycosylation 3+4.

Les conditions de réaction pour cette glycosylation ont donné un rendement de formation de l'heptasaccharide de 83%. Seul le diastéréoisomère α a été détecté lors de cette glycosylation.

5.3. Conclusion

Grace à une stratégie itérative solide et une réaction de glycosylation efficace, les polysaccharides ont été isolés avec de bons rendements. L'emploi du couple *N*-phényltrifluoroacétimidate/*tert*-butyldiméthylsilyle lors des glycosylations a permis une très bonne diastéréosélectivité. En effet lors de ces réactions de glycosylation le contrôle stéréochimique s'est révélé quasi-total car aucune trace de diastéréoisomère β n'a été identifiée dans aucune de nos réactions.

6. Ouverture réductrice

6.1. Rappel bibliographique sur quelques méthodes d'ouverture réductrice de benzylidène.

Après avoir isolé nos oligosaccharides, l'étape suivante est l'ouverture réductrice de l'acétal de benzylidène. Pour toute ouverture d'acétal cyclique, il est possible d'obtenir deux régioisomères (Schéma 52).

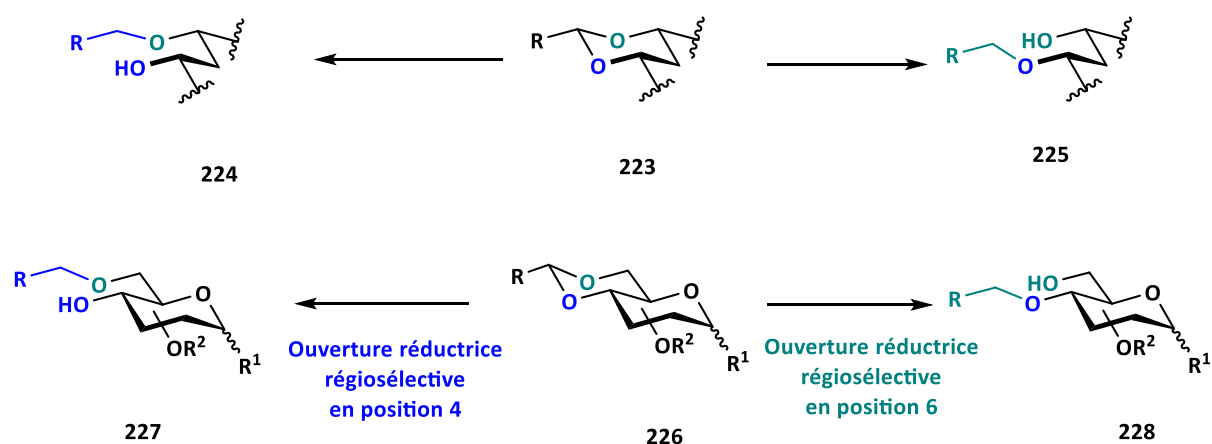


Schéma 52 : Régiosélectivité de l'ouverture d'acétals : exemple d'une chaîne linéaire et d'un sucre.

Dans la chimie des saccharides, l'ouverture réductrice a donné lieu à de nombreuses recherches pour obtenir un bon contrôle de la régiosélectivité et de bons rendements. Ce sont la plupart du temps les conditions réactionnelles employées grâce à l'utilisation d'acides de Lewis ou de Brönsted, d'agents réducteurs ou de solvants, qui dictent la régiosélectivité de cette réaction.

Dès 1969, le groupe de Bhattacharjee a montré que l'ouverture d'acétal sur des sucres,¹⁴⁹ pouvait être régiosélective. C'est en utilisant l'hydrure de lithium et d'aluminium,

¹⁴⁹ Bhattacharjee, S. S.; Gorin, P. A. J. *Can. J. Chem.* **1969**, 47 (7), 1195–1206.

en présence de trichlorure d'aluminium, dans l'éther diéthylique que cette ouverture a lieu. La réaction entre l'hydrure et l'acide de Lewis conduit à la formation d'une espèce active identifiée en tant que $\text{AlH}_2\text{Cl}^{150}$ (Schéma 53).¹⁴⁹

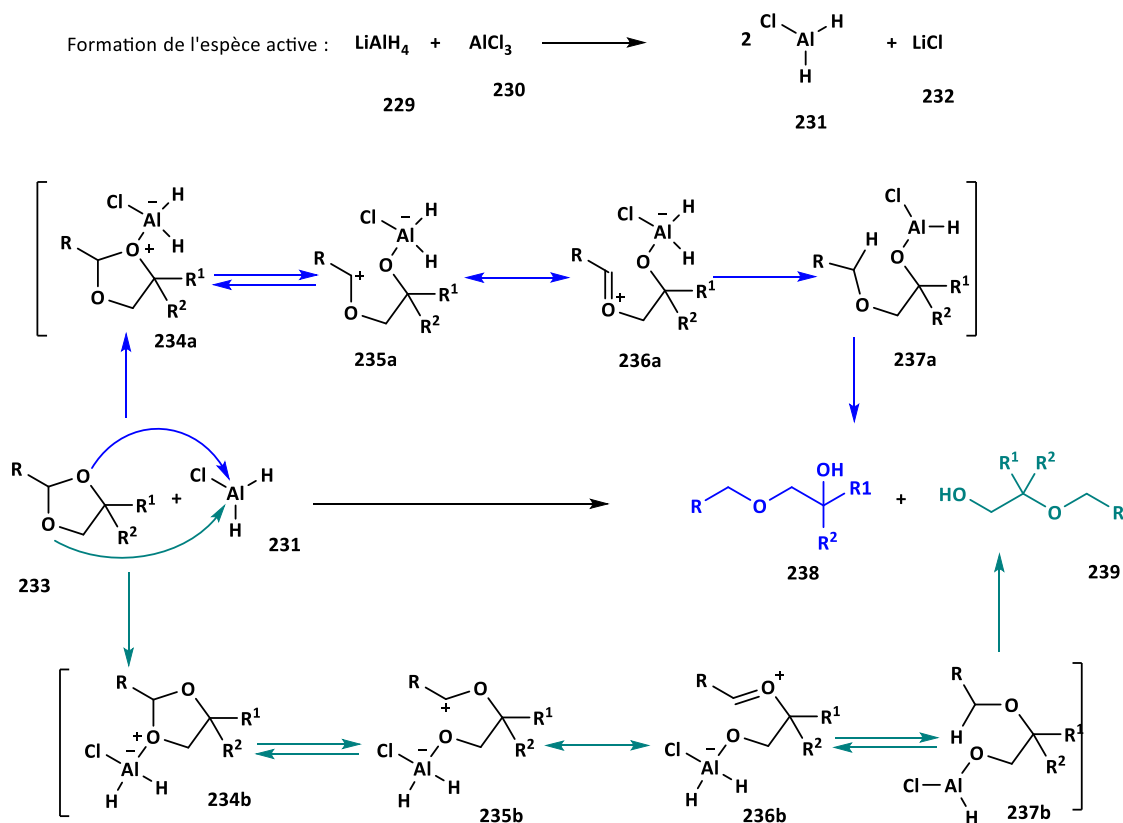


Schéma 53 : Mécanisme proposé par Bhattacharjee pour l'ouverture réductrice avec le mélange $\text{AlCl}_3\text{-LiAlH}_4$.

Ce mécanisme commence par une chélation entre l'espèce active **231** et un des oxygènes de l'acétal **233**. La liaison carbone – oxygène peut se rompre et conduire à la formation des oxocarbeniums **236a** et **236b**, l'hydrure peut attaquer cette double liaison et ainsi former les éthers **237a** et **237b**. L'hydrolyse de la réaction conduira à l'obtention des alcools **238** et **239** correspondant aux deux ouvertures possibles.

¹⁵⁰ Ashby, E. C.; Prather, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (4), 729–733.

Sur plusieurs séries furanosides et pyranosides, le groupe de Bhattacharjee a étudié la régiosélectivité de leurs conditions. L'espèce active **231** vient se complexer préférentiellement à l'oxygène de l'acétal le moins encombré, qui est bien souvent l'oxygène en position 6. La régiosélectivité peut être apportée par la molécule elle-même, si par exemple elle porte un hétéroatome en position β , généralement un oxygène, sous forme d'hydroxyle, permettant d'effectuer une « réduction intramoléculaire » grâce à une coordination avec cet hydroxyle et l'espèce active **231** (Schéma 54).

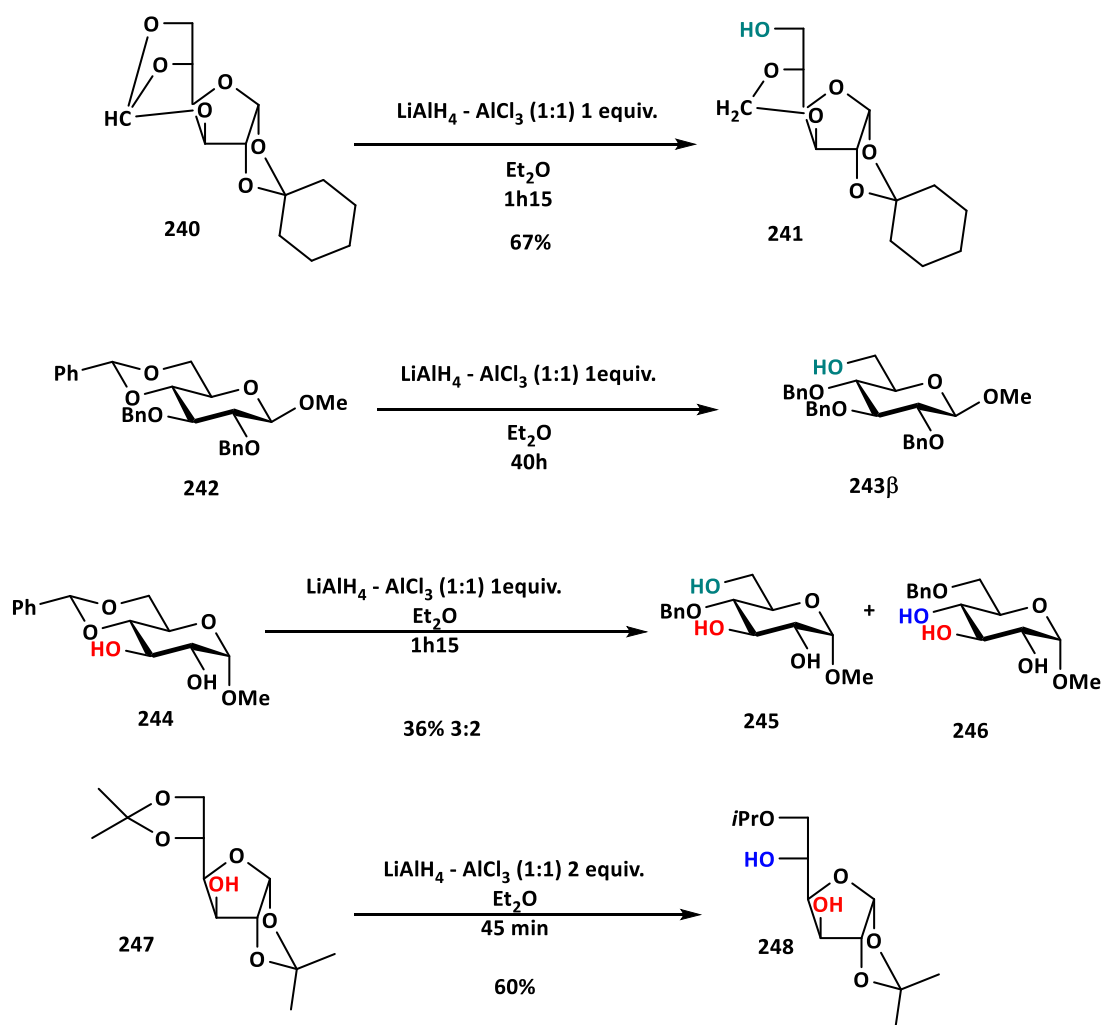


Schéma 54 : Régiosélectivité lors de l'ouverture d'acétals avec le mélange $\text{AlCl}_3\text{-LiAlH}_4$.

Ces travaux ont été repris par le professeur Lipták, qui a participé au succès de cette méthode puisque ces conditions d'ouverture réductrice portent son nom.^{151,152,153}

Depuis, plusieurs conditions opératoires ont été mises au point en fonction de la régiosélectivité désirée. Pour l'ouverture en 4, des conditions utilisant des hydrures tels que l'hydrure de diisobutylaluminium,¹⁵⁴ ou le cyanoborohydrure de sodium combiné à l'acide chlorhydrique,^{155,156} peuvent être employées. Associé à un acide de Bronsted, tel que l'acide trifluoroacétique, ou à un acide de Lewis comme le trifluoroborate complexé à l'éther d'éthylrique, au triethylsilane donne également de bons résultats.^{157,158} Ce dernier peut également permettre une ouverture en présence d'iode moléculaire.¹⁵⁹ L'action de plusieurs silanes ont été vérifiées en présence de divers acides de Lewis et donne également une régiosélectivité presque totale pour l'hydroxyle en 4.¹⁶⁰

En ce qui concerne l'ouverture en 6, le réactif le plus utilisé est sûrement le borane complexé au tétrahydrofurane. Celui-ci peut être allié aux triflates de métaux, comme le cuivre (II),¹⁶¹ du zinc (II) ou des lanthanides,¹⁶⁰ il peut également être associé au chlorure de cobalt (II).¹⁶² Le dichlorophénylborane, un autre dérivé du bore, combiné avec le triethylsilane, peut être utilisé pour obtenir une régiosélectivité totale pour l'ouverture de l'hydroxyle en 6.¹⁶³

L'emploi de l'hydrure de diisobutylaluminium, conduit selon le solvant de réaction à un bon, voire très bon contrôle de la régiosélectivité. En effet, dans le dichlorométhane à 0°C, c'est l'ouverture en 4 qui est majoritaire, alors que dans le toluène à -10°C uniquement des

¹⁵¹ Lipták, A. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17 (39), 3551–3554.

¹⁵² Lipták, A.; Imre, J.; Harangi, J.; Nánási, P.; Neszmélyi, A. *Tetrahedron* **1982**, 38 (24), 3721–3727.

¹⁵³ Lipták, A.; Borbás, A.; Jánossy, L.; Szilágyi, L. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41 (25), 4949–4953.

¹⁵⁴ Kursanov, D. N.; Parnes, Z. N.; Loim, N. M. *Synthesis* **1974**, 1974 (9), 633–651.

¹⁵⁵ Garegg, P. J.; Hultberg, H.; Wallin, S. *Carbohydr. Res.* **1982**, 108 (1), 97–101.

¹⁵⁶ Ek, M.; Garegg, P. J.; Hultberg, H.; Oscarson, S. *J. Chem. Soc.* **1983**, 2 (3), 305–311.

¹⁵⁷ DeNinno, M. P.; Etienne, J. B.; Duplantier, K. C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (5), 669–672.

¹⁵⁸ Debenham, S. D.; Toone, E. J. *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, 11 (2), 385–387.

¹⁵⁹ Panchadhayee, R.; Misra, A. *Synlett* **2010**, 2010 (8), 1193–1196.

¹⁶⁰ Shie, C.-R.; Tzeng, Z.-H.; Wang, C.-C.; Hung, S.-C. *J. Chin. Chem. Soc.* **2009**, 56 (3), 510–523.

¹⁶¹ Shie, C.-R.; Tzeng, Z.-H.; Kulkarni, S. S.; Uang, B.-J.; Hsu, C.-Y.; Hung, S.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44 (11), 1665–1668.

¹⁶² Tani, S.; Sawadi, S.; Kojima, M.; Akai, S.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48 (17), 3103–3104.

¹⁶³ Sakagami, M.; Hamana, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41 (29), 5547–5551.

traces de produit ouvert en 4 sont observées et c'est le produit issu de l'ouverture de la position 6 qui est isolée avec un rendement de 91%.¹⁶⁴

Dans le but de synthétiser des inhibiteurs pour les endosulfatases humaines, notre but est de fonctionnaliser la position 6 de la glucosamine de l'extrémité non réductrice. Mais plusieurs des méthodes permettant l'ouverture régiosélective en position 6 sont incompatibles avec nos oligosaccharides. En effet l'utilisation de borane est compromise par la présence de l'allyle en position anomère. De même que l'utilisation d'hydrures, tel que l'hydrure de lithium et d'aluminium ou l'hydrure de diisobutylaluminium, n'est pas possible, cela risquerait de provoquer la réduction des fonctions azotures placées en position 2 des glucosamines. Notre choix se porte donc sur la combinaison entre le dichlorophénylborane et le triethylsilane.

6.2. Etude sur le monosaccharide

Avant de réaliser l'ouverture sur les oligosaccharides, nous avons utilisé un modèle monosaccharidique afin de vérifier la compatibilité des conditions opératoires sur les groupements protecteurs sensibles. Ce modèle monosaccharidique possède en position anomère un groupement allyloxy, en position 2 un groupement azoture, en position 3 un benzyle, et en positions 4 et 6 l'acétal de benzylidène (Figure 19).

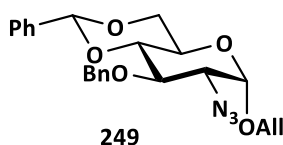


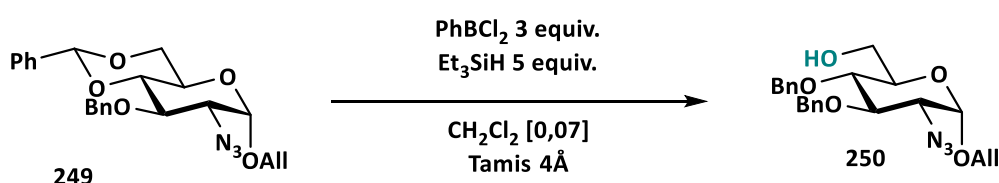
Figure 19 : Représentation du monosaccharide modèle.

6.2.1. Rôle du solvant et de la température

¹⁶⁴ Tanaka, N.; Ogawa, I.; Yoshigase, S.; Nokami, J. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343 (15), 2675–2679.

Le premier paramètre que nous avons fait évoluer est le solvant de la réaction. Nous avons pu voir que celui-ci peut jouer un rôle important dans la régiosélectivité lors de l'ouverture réductrice du benzylidène.¹⁶⁴ Notre choix s'est porté sur le dichlorométhane, comme l'a publié le groupe de Sakagami,¹⁶³ mais à une température de -78°C aucune réaction n'a été observée. Nous avons donc entrepris plusieurs essais de température pour réaliser la réaction d'ouverture (Tableau 9).¹⁶³

Tableau 9 : Réaction d'ouverture réductrice dans le dichlorométhane.

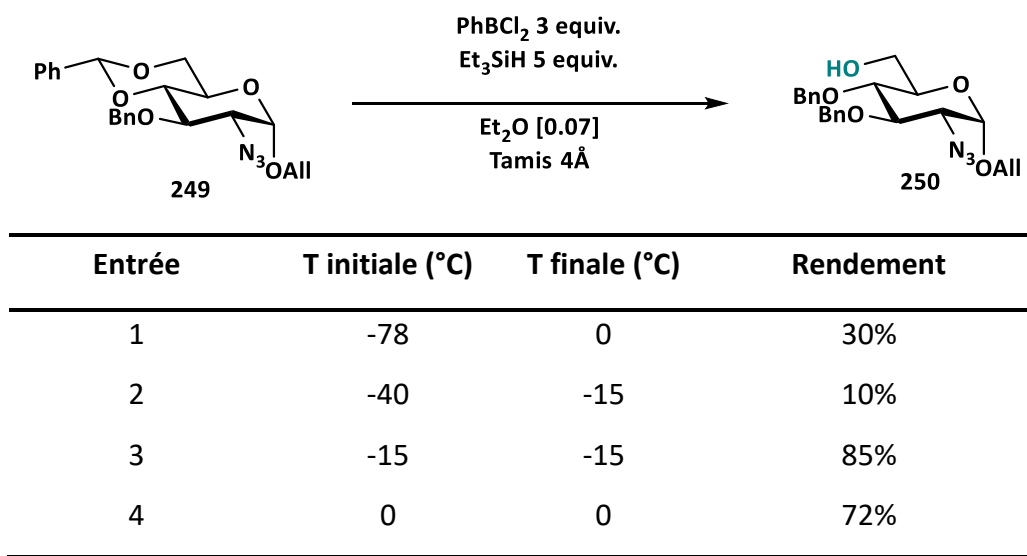


Entrée	T initiale(°C)	T finale (0°C)	Conversion	Rendement	Dégradation
1	-78	-40	58%	14%	40%
2	-78	0	50%	37%	10%
3	-40	-40	100%	0%	50%
4	-50	-50	65%	0%	28%
5	-55	-55	44%	22%	16%

A une température d'addition du dichlorophénylborane de -78°C, puis à une température de réaction de -40°C ou de 0°C, les rendements ne sont pas bons et des produits secondaires apparaissent. Afin de déterminer s'il est possible de trouver des conditions opératoires discriminant la formation du produit d'ouverture réductrice devant la formation du sous-produits de dégradation majoritaires, nous avons effectué une brève étude de température réactionnelle. Celle-ci nous montre clairement, que dans le dichlorométhane, une différenciation est peu envisageable.

Pour tenter de réaliser cette ouverture dans les meilleures conditions nous avons donc employé l'éther diéthylique qui est un solvant polaire et coordinant,¹⁶⁵ permettant ainsi de contrôler la réactivité de l'acide de Lewis (Tableau 10).

Tableau 10 : Réaction d'ouverture réductrice dans l'éther diéthylique.



L'éther diéthylique contrairement au dichlorométhane permet d'éviter la formation de produits de dégradation (Tableau 10, entrée 1 vs Tableau 9, entrée 1). Nous avons recherché la température optimale de réaction afin d'avoir une conversion totale, et un bon rendement en produit ouvert. L'utilisation de l'éther diéthylique permet d'obtenir une plage de température, allant de -15°C à 0°C où la réaction se déroule bien, même si à 0°C la réaction peut occasionner la formation de sous-produits de dégradation.

Nous avons cherché la structure du sous-produit majoritaire. Les spectres RMN 1H montrent la disparition des signaux caractéristiques de la fonction allyle ainsi que la disparition du proton de l'acétal de benzylidène (Image 1).

¹⁶⁵ Johansson R.; Samuelsson B.; *J. Chem. Soc., Perk. Trans. I* **1984**, 2371-2374

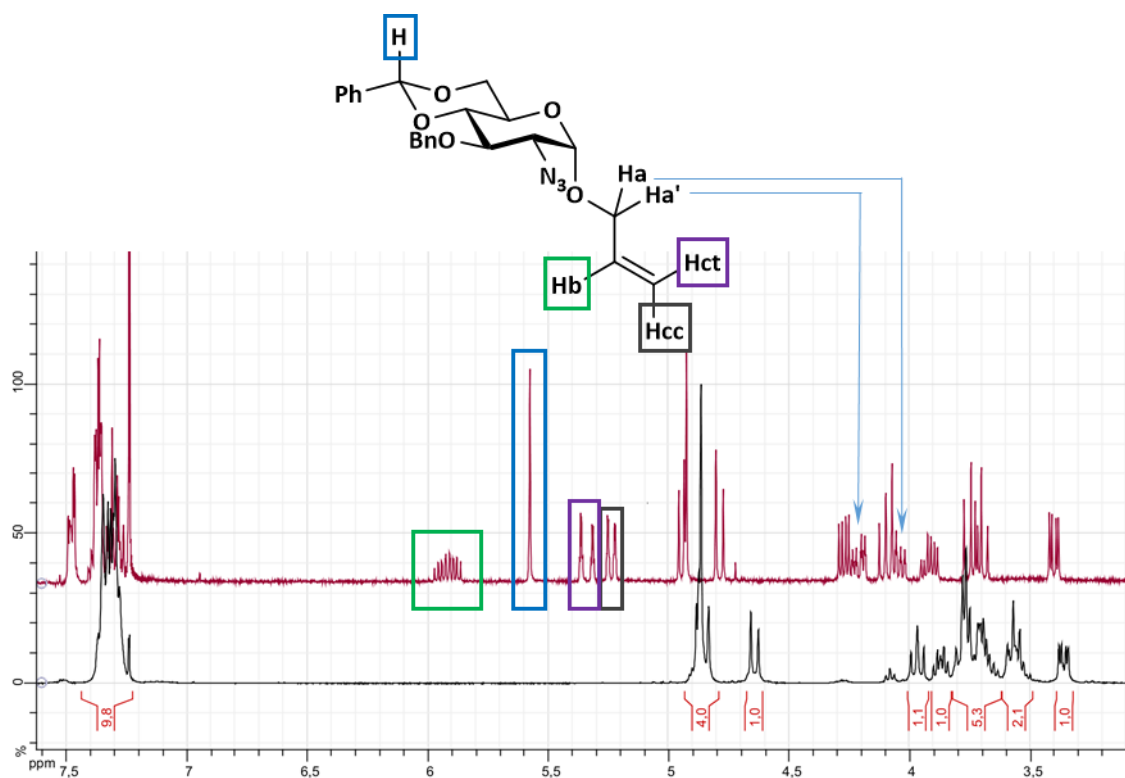


Image 1 : Comparaison de spectre RMN 1H du monosaccharide **250** (rouge) avec le sous-produit (noir)

Dans cette nouvelle molécule, les protons aromatiques intègrent pour 10, nous laissant penser que l'ouverture a bien été réalisée. Un nouveau signal apparait lui à 1,86 ppm, intégrant pour 2 protons. Grâce à une analyse TOCSY à une dimension et à une analyse COSY, les signaux couplants avec ce dernier ont été trouvés. Ces signaux sont aux nombres de 3. Ils sortent à 3,57 ppm, 3,76 ppm et à 3,88 ppm intégrant respectivement pour 1, 2 et 1 protons (Image 2).

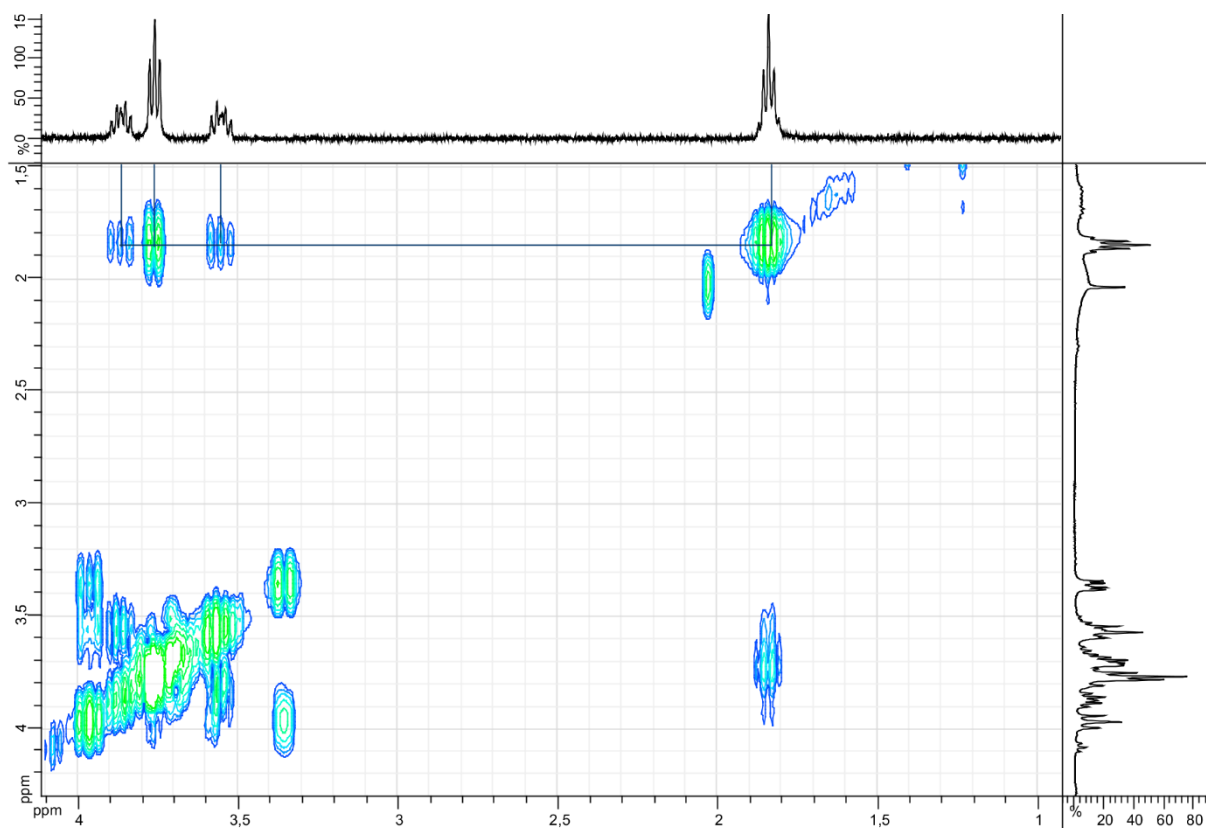


Image 2 : Analyse COSY du sous-produit avec en abscisses une analyse TOCSY 1D à 1,86 ppm et ordonnées son spectre 1H

Avec une analyse HSQC nous avons pu déterminer que les signaux à 3,57 et 3,88 ppm sont portés par le même carbone. Les signaux à 3,57; 3,76 et 3,88 ppm sont probablement portés par des carbones étant engagés dans une liaison covalente avec un hétéroatome (Image 3).

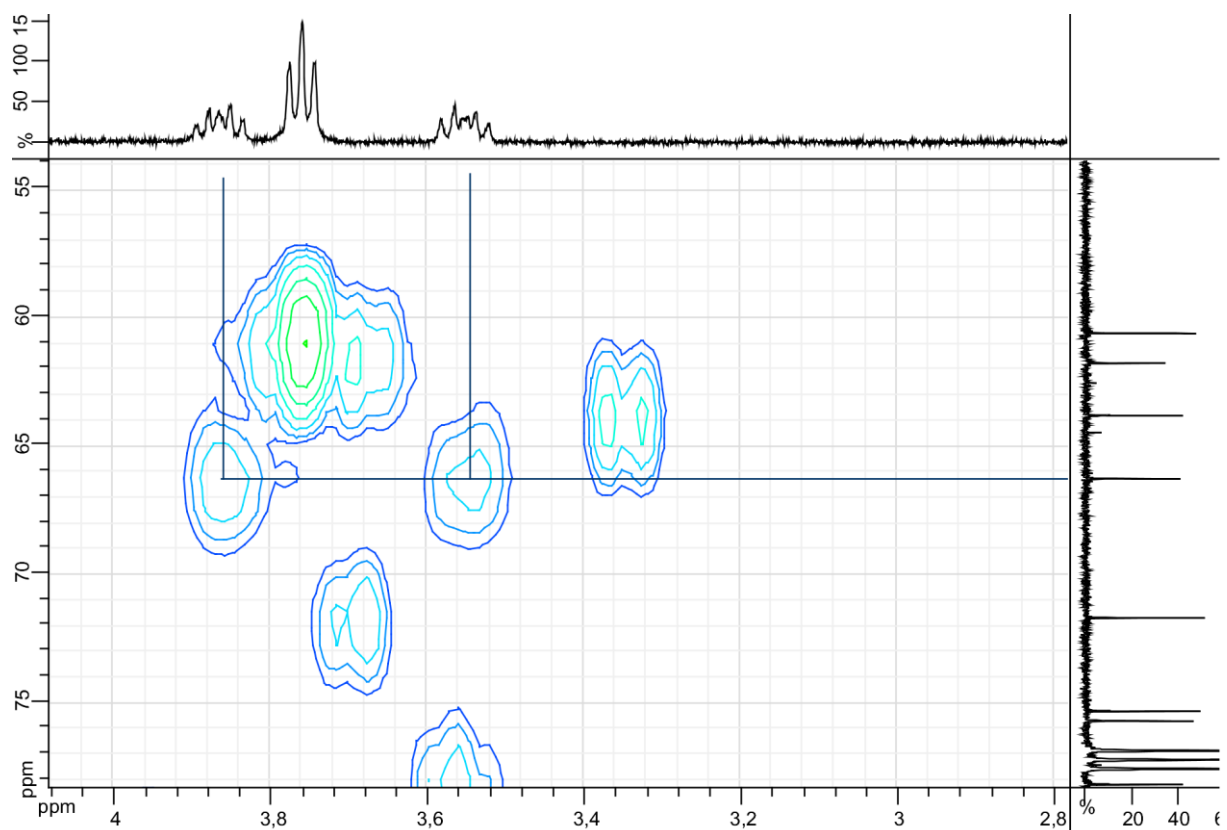


Image 3 : Analyse HSQC avec en abscisse une analyse TOCSY 1D à 1.84 ppm et en ordonnées le spectre ^{13}C du sous-produit.

Les analyses faites par RMN nous indiquent que la chaîne allyle s'est transformée dans les conditions réactionnelles. Cette réaction a conduit à un enchainement de trois méthylènes, l'allyloxy c'est donc transformer en groupement propyloxy (Image 4).

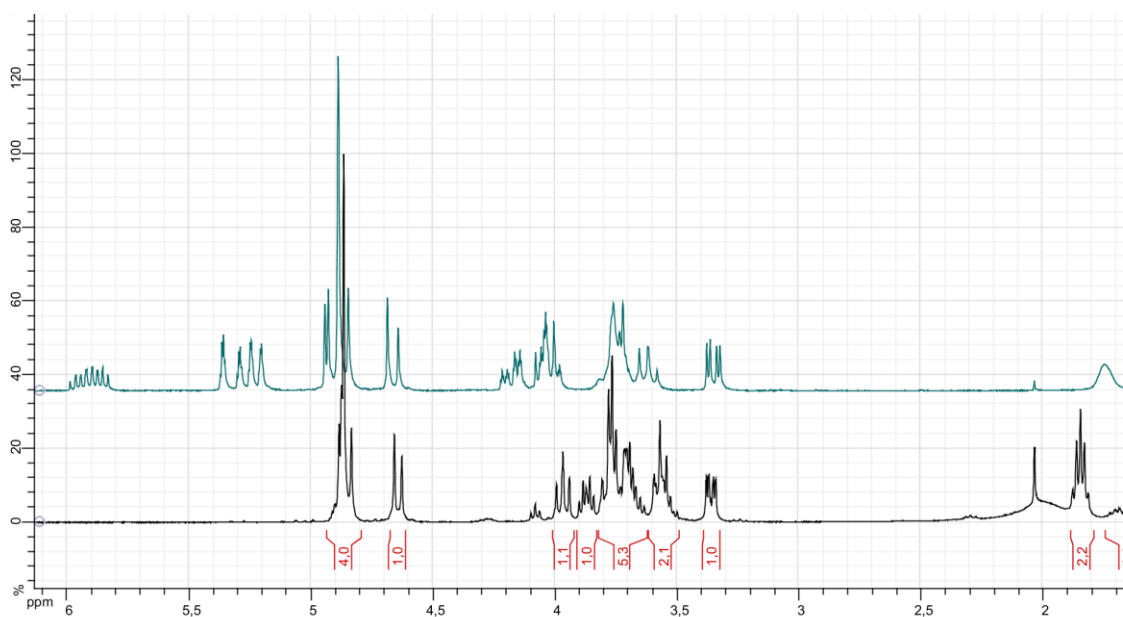


Image 4 : Comparaison de spectre RMN 1H du sous-produit (noir) et du produit d'ouverture en 6 (vert)

Cependant il n'est pas facile de savoir avec quelles espèces du milieu réactionnel ou si cet allyle a réagi de manière intramoléculaire. En effet, les signaux de la partie glucosamine du sous-produit ne sont pas très différents de ceux du produit d'ouverture en 6 (Figure 20). D'après le profil isotopique de l'analyse de masse, la molécule ne contient pas de chlore. La fonctionnalisation terminale de la chaîne propyle ne serait pas un dérivé de bore. Une analyse RMN ^{11}B a été effectuée ne montrant aucun déplacement chimique. Une analyse RMN HMBC à montrer une seule tache de corrélation entre le proton de la chaîne propyle et le carbone anomère de la glucosamine. En comparant les analyses de masses du produit d'ouverture en 6 et sous-produit, une différence de 18 unités apparait. Cela pourrait correspondre à une hydratation de la double liaison, ou bien à une hydroboration qui conduirait, après substitution, à un alcool. Le groupement R pourrait donc être un groupement hydroxyle. Malgré les conditions expérimentales cette piste reste la plus plausible, bien qu'elle reste à confirmer.

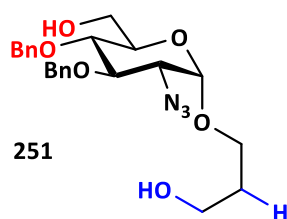


Figure 20 : Représentation du sous-produit.

6.2.2. Conclusion

Malgré la formation de sous-produits, pour cette réaction d'ouverture réductrice, des conditions expérimentales ont été trouvées pour permettre la formation uniquement du produit d'ouverture en 6. Lorsque le dichlorométhane est remplacé par de l'éther diéthylique, la réaction est plus propre, évitant ainsi la réaction sur le groupement allyloxy.

6.3. Applications aux oligomères

Ces conditions réactionnelles mises au point sur un monosaccharide modèle ont été appliquées aux oligosaccharides

6.3.1. Le trisaccharide

En appliquant ces conditions au trisaccharide, il faut arrêter la réaction aux alentours de 90% de conversion, permettant ainsi d'obtenir 80% de rendement de produit ouvert en 6. Dans ces conditions nous pouvons récupérer la masse de produits qui n'a pas réagi et éviter la trop grande formation de sous-produit (Schéma 55).

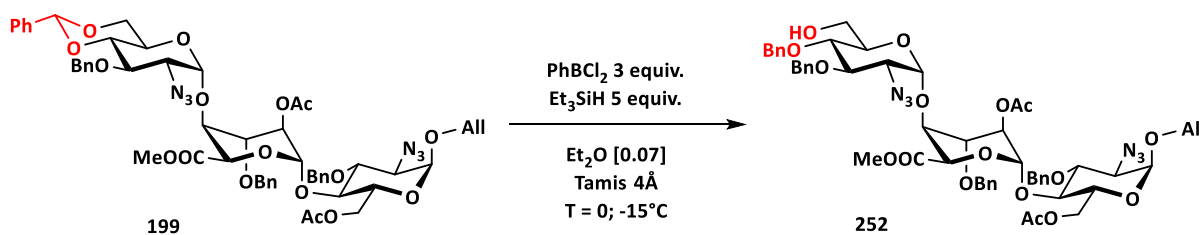


Schéma 55 : Réaction d'ouverture réductrice sur le trisaccharide **252**.

Lorsque la réaction se déroule à 0°C le rendement baisse à 55% et la formation de sous-produits augmente.

6.3.2. Le penta et l'heptasaccharide

Les oligosaccharides de plus grandes tailles ont été mis en réaction à -15°C. L'ouverture a eu lieu avec des rendements modestes et la formation des sous-produits n'a pu être évitée (Schéma 56).

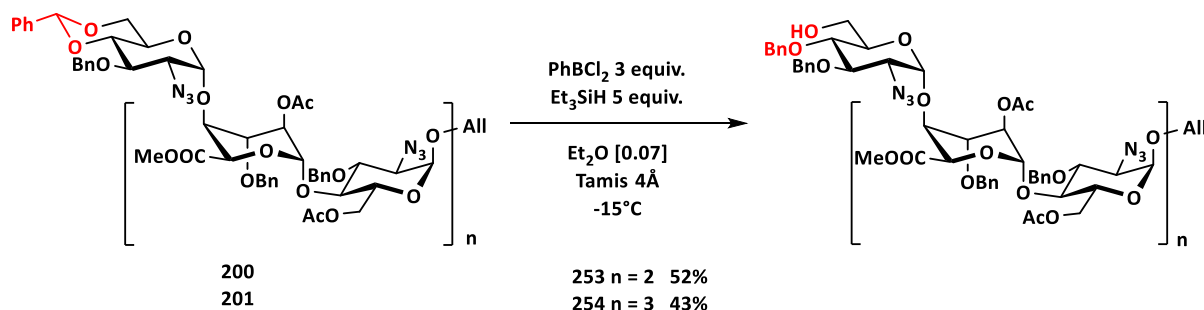


Schéma 56 : Réaction d'ouverture réductrice des oligosaccharides.

Dans le cas du pentasaccharide, un sous-produit majoritaire s'est formé. Une analyse TOCSY sur le signal 1.92 ppm montre que ce sous-produit est sûrement identique à celui identifié dans le cas du monosaccharide (Image 5).

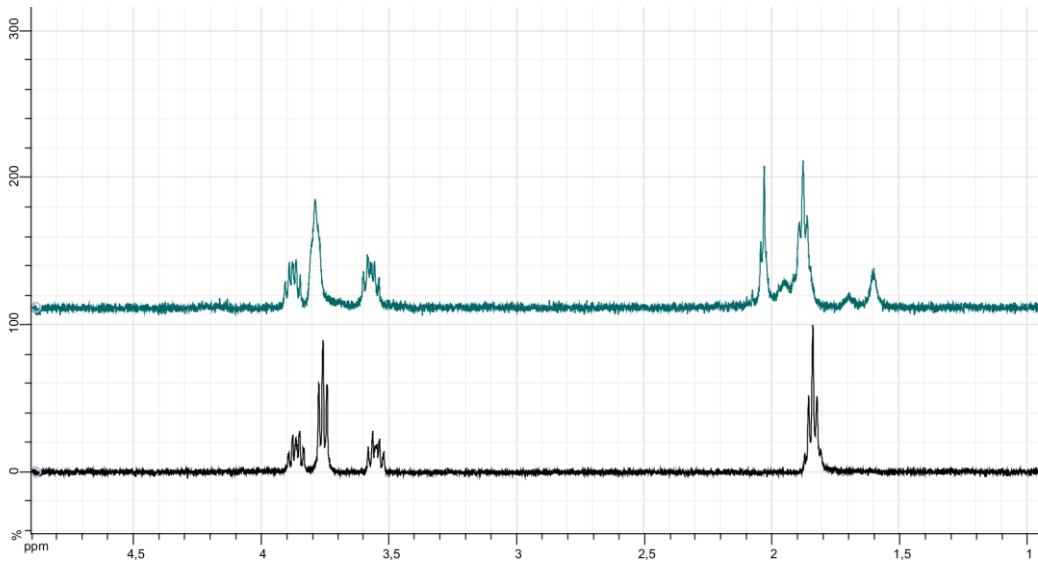


Image 5 : Superposition d'analyse TOCSY à une dimension. En noir : le sous-produit issu de la réaction d'ouverture du monosaccharide, en vert : celui du pentasaccharide.

L'analyse de masse apporte une preuve supplémentaire car il y a également une différence de masse de 18 unités, entre le produit d'ouverture et le sous-produit.

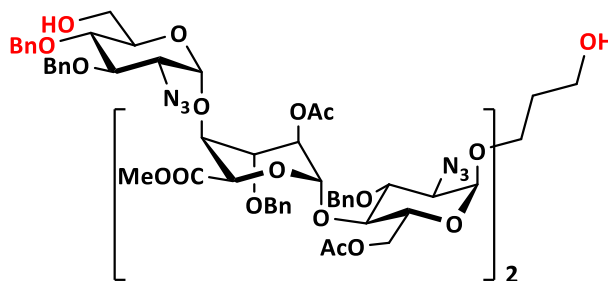


Image 6 : Représentation supposée du sous-produit de la réaction d'ouverture avec **200**.

Dans le cas de l'heptasaccharide plusieurs sous-produits ont été constatés, mais aucun n'a été isolé en quantité suffisante pour pouvoir effectués les analyses.

6.4. Conclusion

La mise au point de conditions sur le monosaccharide n'a pas été suffisante. En effet la gamme de température permettant la réaction n'est pas assez grande, afin de prévenir la formation de sous-produits. Le sous-produit majoritaire quant à lui peut se former à partir du produit de départ comme du produit d'ouverture en position 6. Les rendements ont chuté par rapport au monosaccharide où le changement de solvant et de température réactionnelle ont permis la formation du seul produit d'ouverture réductrice en position 6. Une méthodologie plus poussée doit être effectuée pour obtenir de meilleur résultat : changer la quantité d'acide de Lewis, sous réserve que cela ne change pas la régiosélectivité peut être un facteur modifiable, un second serait de travailler avec un mélange de solvant permettant ainsi de travailler à plus basse température.

Malgré ces conditions qui ne se sont pas révélées à la hauteur de nos attentes à cause de réactions parasites, l'ouverture réductrice du benzylidène a conduit uniquement à l'obtention unique de l'ouverture en 6.

7. La sulfamoylation

L'hydroxyle en position 6 ainsi obtenu va pouvoir être fonctionnalisé de manière à permettre l'inhibition des endosulfatases. En parallèle de l'emploi de cette fonction en thérapeutique, les chimistes ont trouvé plusieurs outils pour la synthèse de molécules sulfamoylées.

7.1. Principaux mode d'installation

Cette première partie résumera les principales méthodes permettant l'obtention du motif sulfamate au sein de squelette moléculaire. Ici nous résumerons deux principales méthodes pour la préparation de sulfamate.

7.1.1. Utilisation de chlorure de sulfamyle

7.1.1.1. Préparation de chlorures de sulfamyles primaires et secondaires

La première méthode de préparation de réactif de sulfamoylation, a été introduite par Rolf Appel et Günter Berger en 1958 et consiste en la mise au point d'un chlorure de sulfamyle (Schéma 57).¹⁶⁶

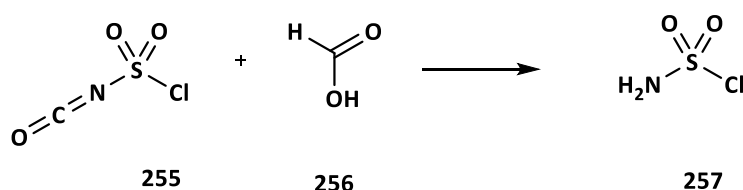


Schéma 57 : Réaction de formation du chlorure de sulfamyle.

Cette réaction a lieu entre le chlorure d'isocyanatesulfuryle et l'acide formique, elle permet la préparation du chlorure de sulfamyle primaire de manière quantitative.

¹⁶⁶ Appel, R.; Berger, G. *Chem. Ber.* **1958**, 91 (6), 1339–1341.

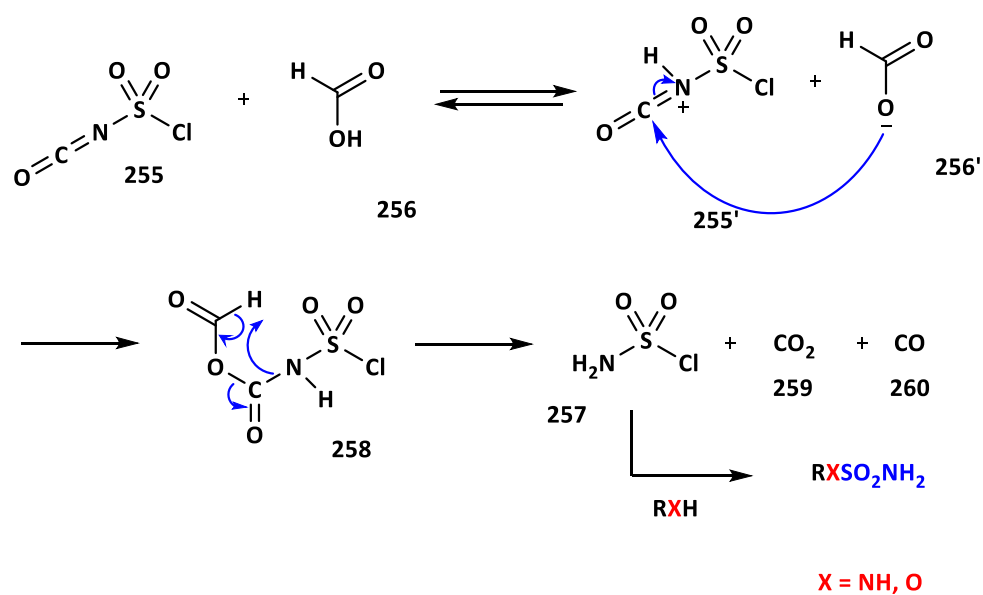


Schéma 58 : Mécanisme réactionnel de formation du chlorure de sulfamyle.

Ce mécanisme débute par une réaction acide – base entre le proton de l'acide formique et l'azote de l'isocyanate puis est suivie d'une addition nucléophile du formiate sur le carbone de l'isocyanate. Cet intermédiaire **258** peut subir une décarboxylation et une décarbonylation concomitantes conduisant au chlorure de sulfamyle.

Pour effectuer la préparation de réactifs de sulfamylation substitués sur l'atome d'azote, deux principales méthodes ont été décrites : l'une fait intervenir le dichlorure de sulfuryle qui peut réagir sur les amines correspondantes,¹⁶⁷ l'autre se fait par réaction entre l'acide sulfamique correspondant et le pentachlorophosphorane (Schéma 59).¹⁶⁸

¹⁶⁷ Hansen, N. C.; Palenius, I.; Jerslev, B.; Hatanaka, A.; Munch-Petersen, J. *Acta Chem. Scand.* **1963**, *17*, 2141–2142.

¹⁶⁸ Kloek, J. A.; Leschinsky, K. L. J. *Org. Chem.* **1976**, *41* (25), 4028–4029.

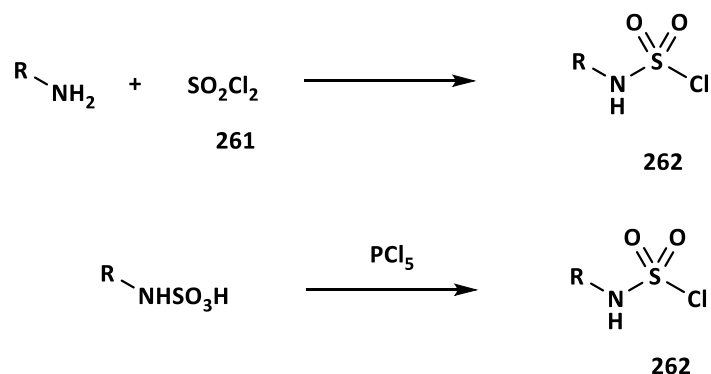


Schéma 59 : Préparation de chlorures de sulfamyles *N*-substitués.

7.1.1.2 Réactivité des chlorures de sulfamyles, obtention de sulfamate

Plusieurs conditions de réaction de formation de sulfamate ont été trouvées, les premières développées sont des conditions utilisant une base.¹⁶⁹ Certaines utilisent des bases faibles pour piéger l'acide chlorhydrique formé lors de la réaction.¹⁷⁰ Dans le but de synthétiser des sulfamates *N*-substitués, le groupe de Gerhard Schulze a utilisé le chlorure de sulfamyle *N*-méthylé. Celui-ci mis en réaction en présence d'alcool ou de phénol en présence de triéthylamine permet l'obtention des sulfamates correspondants (Schéma 60).

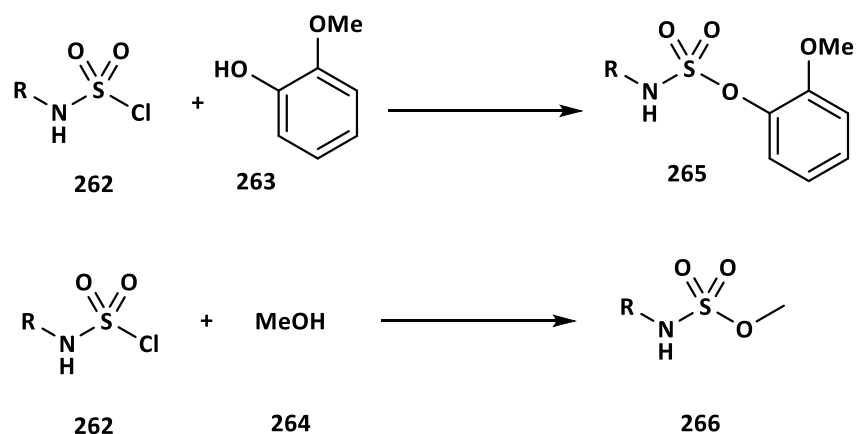


Schéma 60 : Synthèse de dérivés sulfamoylés *N*-substitués par le groupe de Schulze.

¹⁶⁹ Appel, R.; Senkpiel, W. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1961**, 310 (1-2), 94-99.

¹⁷⁰ Weiß, G.; Schulze, G. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1969**, 729 (1), 40-51.

Cette méthodologie permet d'obtenir une diversité moléculaire grâce à cette substitution sur l'atome d'azote, en effet avec les méthodes précédentes il n'était possible d'obtenir qu'un sulfamate primaire.

Les conditions les plus courantes, pour la préparation de sulfamates, reprennent celles développées par Appel, en employant une base forte afin de déprotonner l'alcool pour former sa base conjuguée pour améliorer sa nucléophilie (Schéma 61).^{171,172,173,174} Dans ces conditions le mécanisme réactionnel est le même que pour une estérification en milieu basique, l'alcoolate réagit sur le soufre par un mécanisme d'addition – élimination pour libérer un ion chlorure, formant ainsi la fonction sulfamate.

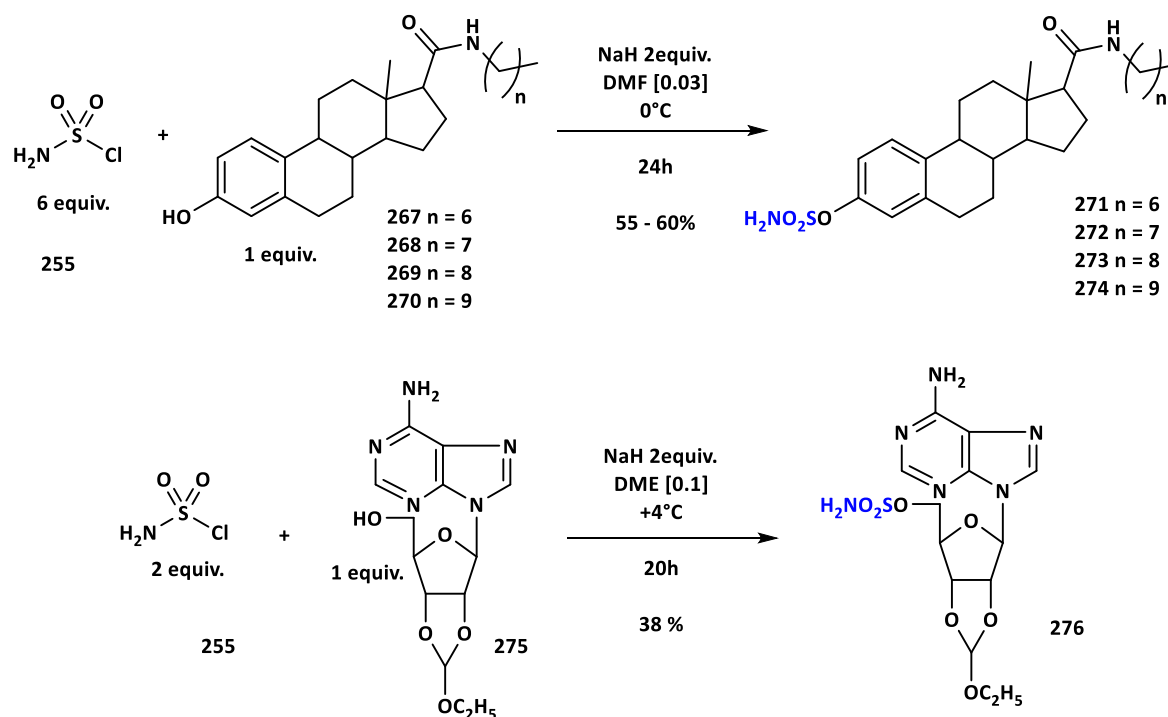


Schéma 61 : Exemple de sulfamoylation.

¹⁷¹ Shuman, D. A.; Robins, M. J.; Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92 (11), 3434–3440.

¹⁷² Greco, M. N.; Maryanoff, B. E. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33 (35), 5009–5012.

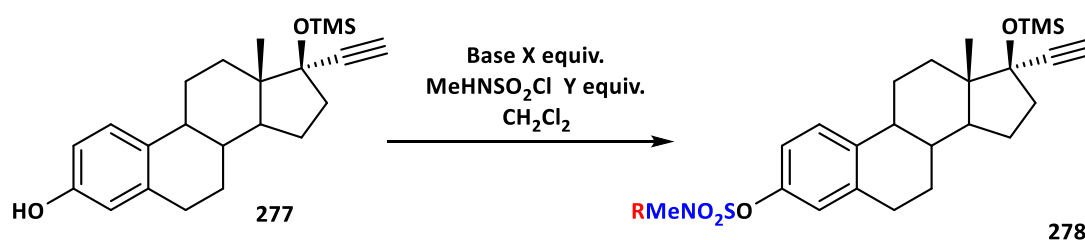
¹⁷³ Li, P.-K.; Chu, G.-H.; Guo, J.; Peters, A.; Selcer, K. W. *Steroids* **1998**, 63 (7–8), 425–432.

¹⁷⁴ Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **1994**, 37 (2), 219–221.

Les rendements de sulfamoylations sont plutôt modestes, ils varient en fonction du substrat et des conditions opératoires. Pour la sulfamoylation de stéroïdes avec l'emploi de deux équivalents d'hydrure de sodium dans le *N,N*-diméthylformamide, à une température de zéro degré, les rendements sont de l'ordre de 60%. En ce qui concerne la sulfamoylation de nucléosides, elle se fait également en utilisant 2 équivalents d'hydrure de sodium, le diméthoxyéthane comme solvant et se déroule pendant 20h à quatre degrés. Le rendement de cette réaction est de 38%.

Le groupe de Sigfrid Schwarz a apporté un élément de réponse à ces rendements modestes.¹⁷⁵ La base serait un élément important lors de cette réaction (Tableau 11).

Tableau 11 : Réaction de sulfamoylation en présence de différentes bases.



Entrée	Base	MeHNSO ₂ Cl	Rendement	Sous-produits
	(X equiv)	(Y equiv)	(R = H)	(R = SO ₂ NH ₂)
1	Et ₃ N (6)	3	58 %	29%
2	Pyridine (6)	3	65%	23%
3	DBN (12)	9	72%	7%
4	DABCO (6)	3	63%	29%
5	DMAP (0,1)	4,5	76%	0%
6	DBMP (6)	3	98%	0,1%

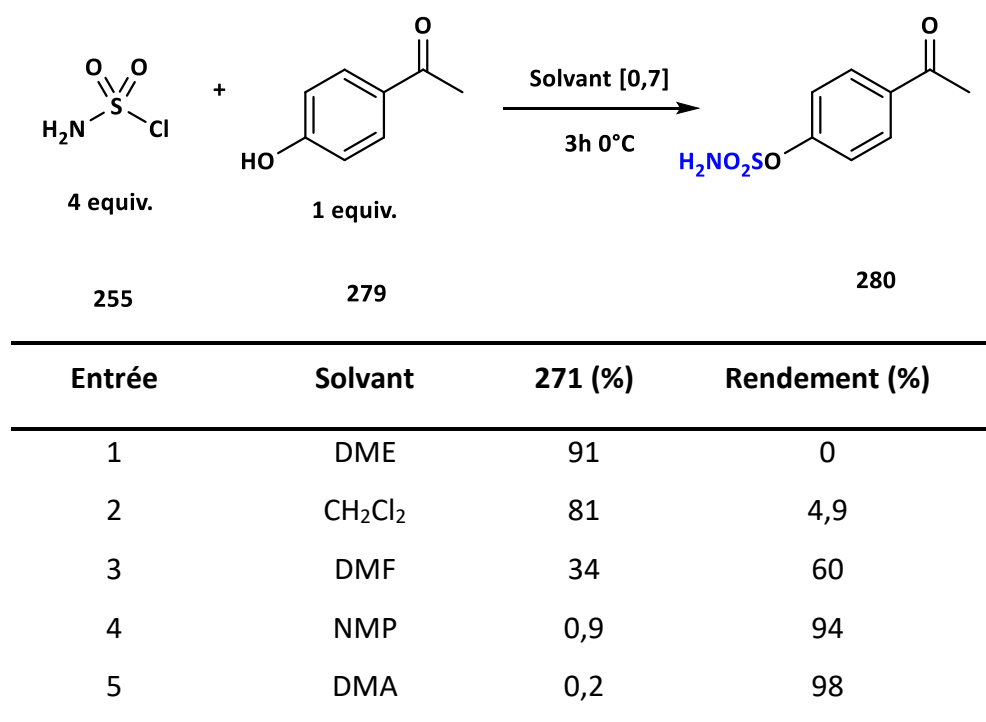
Légende : DBN : 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-ène ; DABCO : 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane ;
DMAP : 4-(*N,N*-Diméthylamino)pyridine ; DBMP : 2,6 Di-*tert*-butyl-4-méthylpyridine.

L'ajout de base semble réellement influencer le rendement sans pour autant qu'une corrélation avec le pKa de la base utilisée soit apparente. Le groupe de Makoto Okada s'est

¹⁷⁵ Schwarz, S.; Thieme, I.; Richter, M.; Undeutsch, B.; Henkel, H.; Elger, W. *Steroids* **1996**, 61 (12), 710–717.

également penché sur la question de la sulfamoylation. Ils ont d'abord cherché le solvant idéal de la réaction (Tableau 12).¹⁷⁶

Tableau 12 : Variation du solvant lors de la réaction de sulfamoylation.



Les solvants comme le *N,N*-diméthylacétamide et le *N*-méthylpyrrolidone sont les meilleurs solvants de réaction (Tableau 12, entrée 4 et 5) permettant d'isoler la molécule **280** avec d'excellent rendement.

En employant les mêmes conditions que pour l'entrée 5 du tableau 12, le groupe d'Okada a fait varier le nombre d'équivalents de triéthylamine dans la réaction (Tableau 13).¹⁷⁶

¹⁷⁶ Okada, M.; Iwashita, S.; Koizumi, N. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41 (36), 7047–7051.

Tableau 13 : Sulfamoylation en présence de triéthylamine.

Entrée	Et ₃ N (equiv.)	279 (%)	Rendement (%)
1	0	0,2%	98%
2	1,3	0,1%	96%
3	4	2%	73%
4	6	18%	55%

Cette méthodologie montre que plus le nombre d'équivalent de base augmente moins la réaction de sulfamoylation est efficace. En optimisant l'utilisation d'ajout de base le groupe d'Okada a montré que celles-ci étaient néfastes pour le déroulement de la réaction de formation de sulfamate à partir des chlorures de sulfamyle.

7.1.2. Utilisation de sel de Burgess pour la synthèse de sulfamates cycliques : les sulfamidates

Une deuxième méthode utilisée pour réaliser des sulfamates cycliques, appelés sulfamidates, a été mise au point par le professeur Nicolaou.¹⁷⁷ Cette méthodologie utilise la réactivité du réactif de Burgess^{178,179} pour former des sulfamates cycliques à partir de motifs variés.

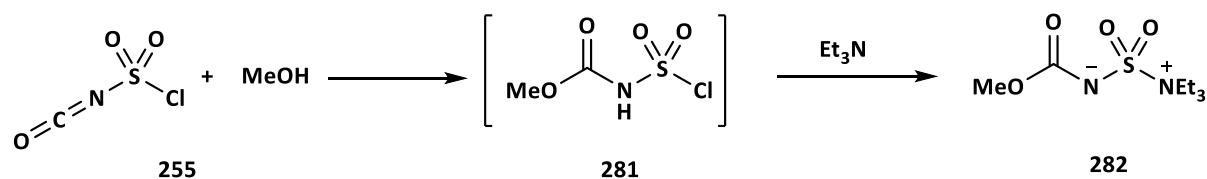


Schéma 62 : Préparation du réactif de Burgess.

¹⁷⁷ Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Longbottom, D. A.; Nalbandian, A. Z.; Huang, X. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10* (22), 5581–5606.

¹⁷⁸ Atkins, G. M.; Burgess, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (17), 4744–4745.

¹⁷⁹ Khapli, S.; Dey, S.; Mal, D. *J. Indian Inst. Sci.* **2001**, *81*, 461.

Le réactif de Burgess se prépare par action du méthanol sur le chlorure d'isocyanatesulfuryle qui forme l'intermédiaire (*N*-chlorosulfonyl)carbamate de méthyle **281**. Ce dernier réagit avec la triéthylamine afin de donner le sel **282**.

Le professeur Nicolaou a utilisé la réactivité de ce sel afin d'obtenir des sulfamidates à partir de molécules fonctionnalisées (Schéma 63).

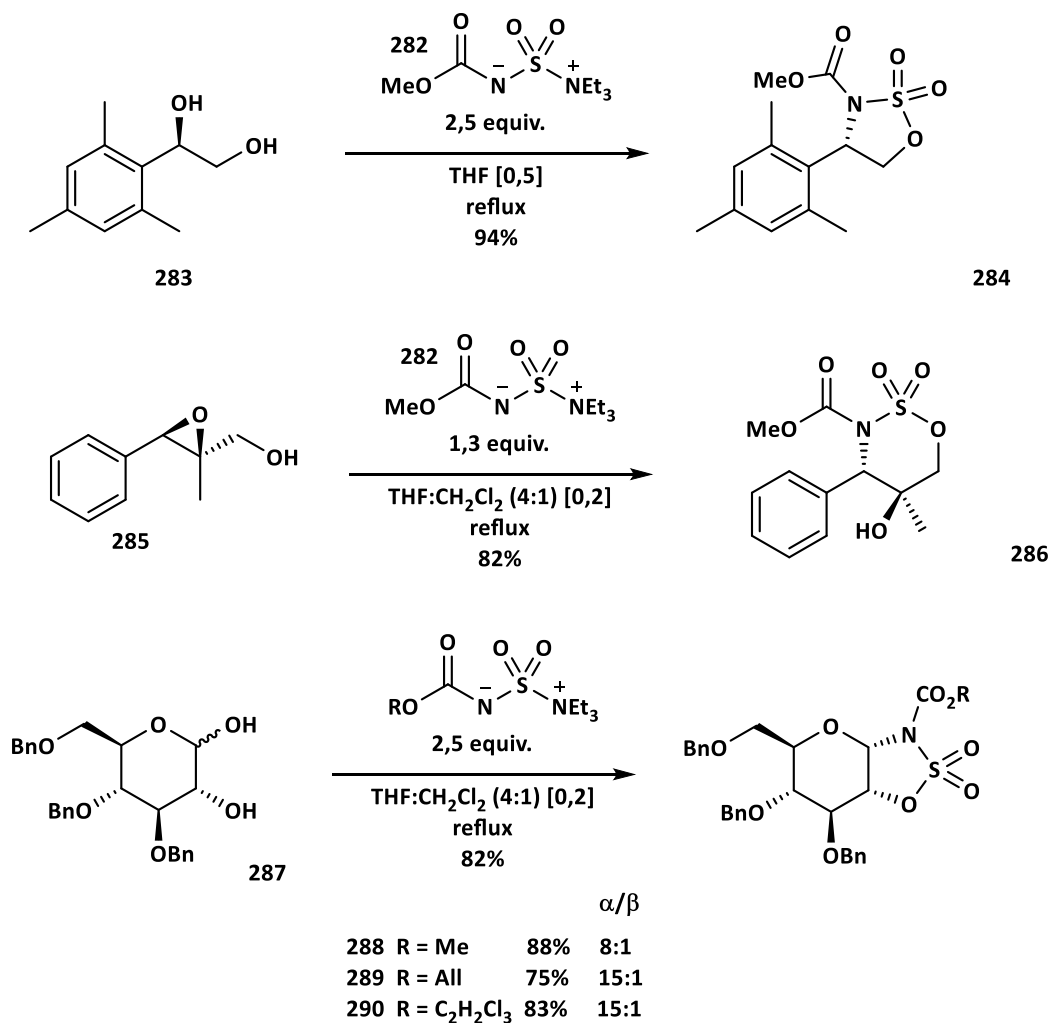


Schéma 63 : Utilisation du réactif de Burgess par le groupe de Nicolaou.

Le groupe de Nicolaou s'est servi de la nucléophilie de l'azote permettant d'envisager une réaction supplémentaire après l'installation du sulfamidate. Dans le cas du diol **283**, 2,5 équivalents sont nécessaires pour réaliser cette réaction. Chaque hydroxyle se retrouve

fonctionnalisé par un sulfamate. C'est le soufre du sulfamate en position benzylique qui subit une attaque nucléophile de l'azote du sulfamate voisin permettant la formation du sulfamidate **284**. Cet azote nucléophile peut également permettre l'ouverture d'époxyde, comme par exemple dans le cas de la sulfamoylation de **285** qui mène à la formation du sulfamate cyclique **286**. Cette réactivité a également permis la synthèse de *N*-glycoside avec de bon rendement.

Ce Réactif de Burgess a conduit à la création de plusieurs autres réactifs dérivés de celui-ci. Plusieurs groupes ont remplacé le méthanol par un autre alcool, et la triéthylamine par d'autres bases azotées.^{177,180} Afin de synthétiser des sulfamates primaires le groupe Lei Zhu a mis au point un analogue au réactif de Burgess permettant la déprotection de la fonction carbamate. Ils ont envisagé la possibilité d'avoir un groupement acido-labile sur cet azote (Schéma 64).

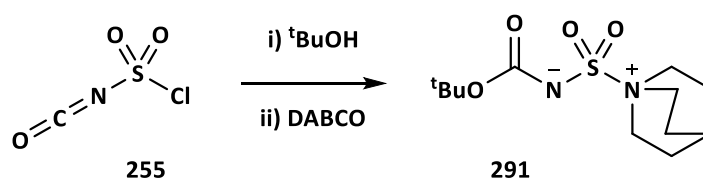


Schéma 64 : Synthèse d'un analogue au réactif de Burgess.

Le groupe de Zhu a fait réagir le chlorure d'isocyanatesulfuryle en présence de *tert*-butanol afin de former un carbamate de butyle. C'est le DABCO qui a été employé comme base afin d'obtenir l'analogue au réactif de Burgess.

Le réactif **291** réagit en présence d'un alcool afin de former le sulfamate protégé. Celui-ci peut subir en milieu acide une déprotection afin d'obtenir le sulfamate primaire (Schéma 65).

¹⁸⁰ Armitage, I.; Berne, A. M.; Elliott, E. L.; Fu, M.; Hicks, F.; McCubbin, Q.; Zhu, L. *Org. Lett.* **2012**, *14* (10), 2626–2629.

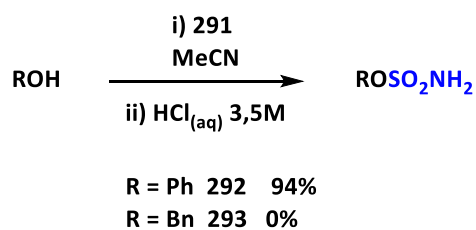


Schéma 65 : Réaction de sulfamoylation avec le réactif du groupe de Zhu.

Lorsque cette réaction est réalisée avec le phénol la réaction fonctionne très bien et le sulfamate de phényle est obtenu avec un rendement de 94% ; mais lorsque la réaction est effectuée avec l'alcool benzylique, l'unique produit de la réaction est le chlorure de benzyle. Ceci est dû à l'électrophilie de la position benzylique. Celle-ci est attaquée par l'ion chlorure du milieu réactionnel une fois que le DABCO a été déplacé par l'alcool benzylique.

7.2. Cas de monosaccharides

Dans nos synthèses d'inhibiteurs sélectifs pour les endosulfatases humaines, nous avons choisi la fonction sulfamate primaire comme fonction inhibitrice. Pour réaliser la réaction de sulfamoylation, il faut donc passer par l'utilisation de chlorure de sulfamyle primaire, ou protégé sous forme d'une benzylamine ou d'un carbamate de tertbutyle. D'un point de vue synthétique, rajouter une étape de déprotection orthogonale nous semblait moins élégant que de travailler directement avec le sulfamate primaire. De plus la base conjuguée d'un (alkoxysulfonyl)carbamate semble être très nucléophile et pourrait risquer la dégradation de nos oligosaccharides (tri-, penta- et heptasaccharides). Nous avons donc décidé de travailler sur la sulfamoylation avec le chlorure de sulfamyle primaire.

De la même manière que pour l'ouverture réductrice, nous avons d'abord effectué cette réaction de sulfamoylation sur modèles afin de maîtriser les principaux paramètres de cette réaction.

Pour cela nous avons choisi deux modèles monosaccharidiques, le premier est le composé **250** issu de l'ouverture réductrice de **249**, le second est le 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -*D*-glucopyranoside de méthyle **243 α** .

Dans un premier temps les conditions en utilisant une base forte ont été reprises de la synthèse des inhibiteurs monosaccharidiques mis au point par le groupe de Chi-Huey Wong,⁸³ et appliquées à nos modèles.

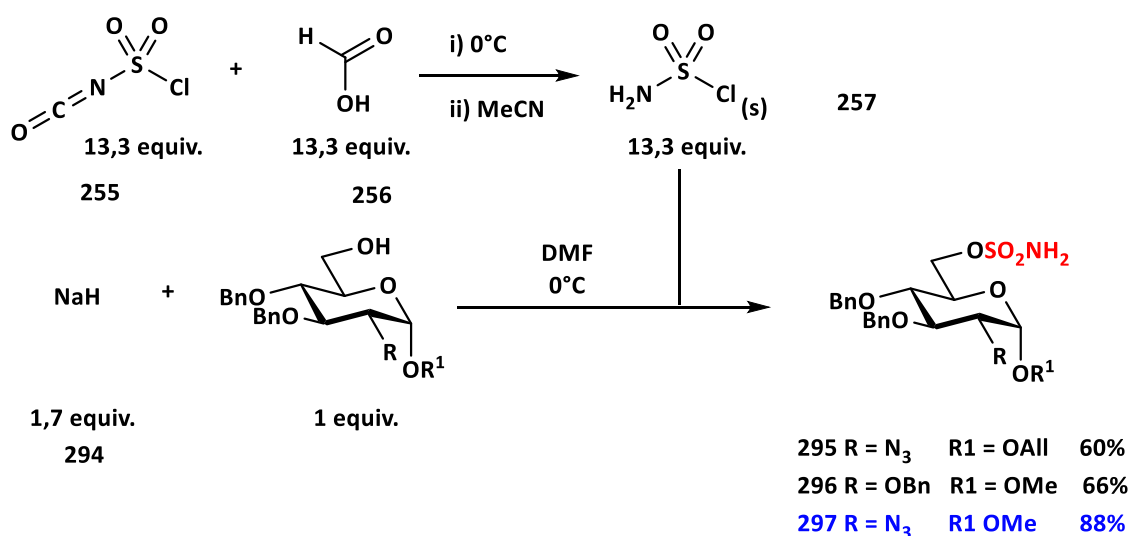


Schéma 66 : Réaction de sulfamoylation des monosaccharides modèles.

La préparation d'une solution fraîche de chlorure de sulfamyle est requise pour cette réaction. Une fois l'alcoolate formé grâce à l'hydrure de sodium dans le *N,N*-diméthylformamide, la solution de chlorure de sulfamyle dans l'acétonitrile peut être additionnée sur l'alcoolate. Malheureusement avec cette méthode nos rendements sont modestes et n'arrivent pas à ceux du groupe de Wong (en bleu sur le Schéma 66) qui sont de 88%. La réaction de formation du chlorure de sulfamyle est peu reproductible. En effet gérer cette réaction liquide – liquide donnant comme produit un solide blanc n'est pas chose facile. La réaction de formation du chlorure de sulfamyle lorsque l'acétonitrile est ajouté au milieu réactionnel semble lente.

Les conditions sans base trouvées par le groupe d'Okada¹⁷⁶ semble plus simples à mettre en œuvre que les conditions passant par un alcoolate. De plus des conditions utilisant une base forte en présence de motifs iduronique est déconseillée. En effet le proton en position α de l'ester méthylique étant suffisamment acide pour être déprotoné par l'hydrure de sodium, la formation de l'énolate d'ester est envisageable. Cet énolate peut conduire à l'isomérisation du centre stéréogène et peut également conduire à une β -élimination, coupant ainsi notre chaîne saccharidique (Schéma 67).

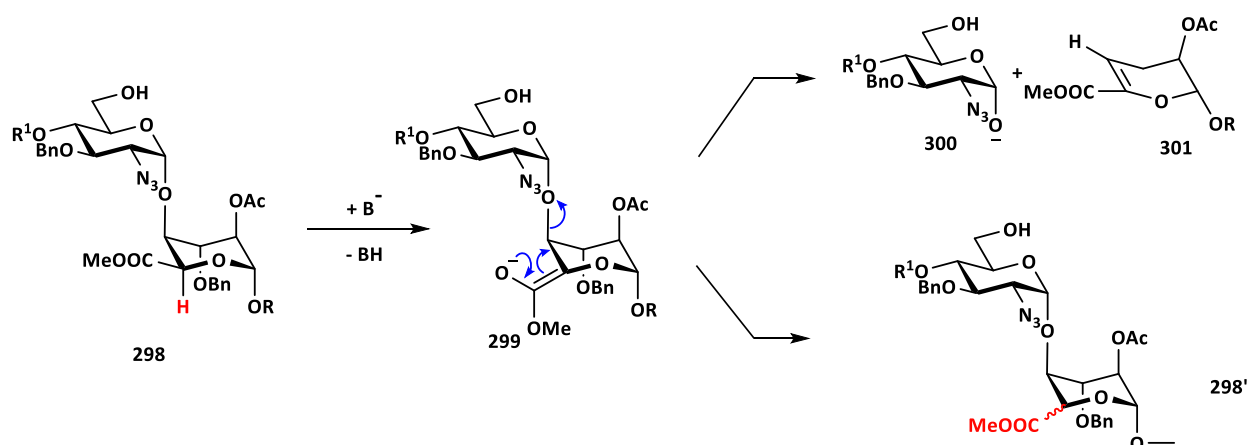
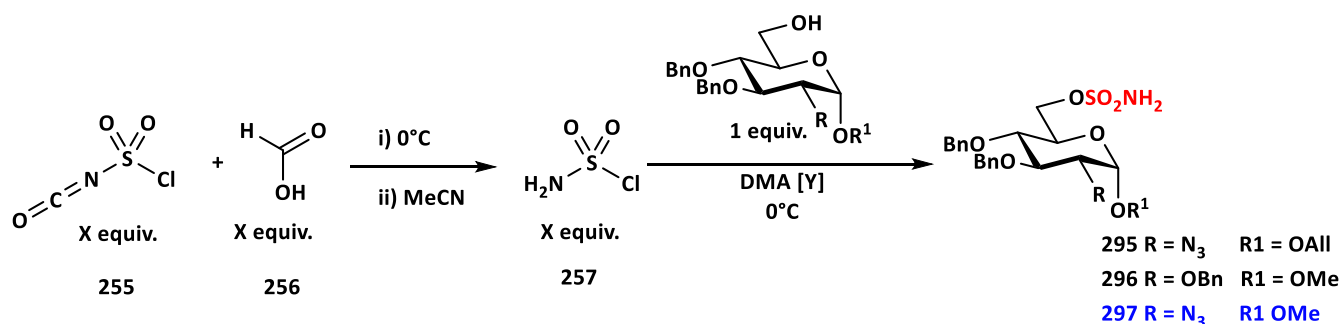


Schéma 67 : Dégradation possible de l'iduronate en présence de base forte.

Dans l'optique de préserver au mieux nos oligosaccharides, nous avons décidé de nous tourner vers les conditions utilisées par le groupe d'Okada.

Tableau 14 : Application des conditions d'Okada à nos modèles.



Entrée	Substrat	Y (mol.L ⁻¹)	X	Rendement (%)
1	250	0.1	4	91%
2	243α	0.1	4	89%
3	243α	0.5	4	94%
4	243α	1	4	90%
5	243α	1	2	38
6	243α	1	1	-

Les conditions d'Okada nous ont permis de travailler avec une gamme de concentration large (Tableau 14, entrées 2, 3 et 4). Dans ces conditions, les résultats sont plus reproductibles que dans les conditions employant une base forte. Nous avons cherché la quantité optimale de chlorure de sulfamyle, quatre équivalents sont nécessaires pour obtenir un bon rendement (Tableau 14, entrées 4,5 et 6). Ces conditions ont été validées sur nos deux modèles monosaccharidiques et peuvent donc être testées sur les oligosaccharides.

7.3. Application aux oligomères

Le premier oligosaccharide à avoir été testé est le trisaccharide **252**. Celui-ci a été mis dans les conditions réactionnelles précédemment utilisées (Schéma 68).

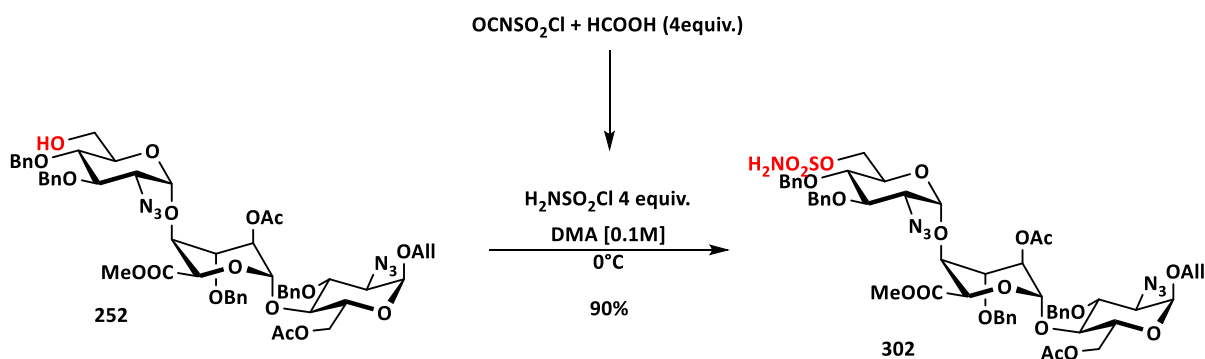


Schéma 68 : Sulfamylation du trisaccharide **252**.

Le trisaccharide **302** comportant la fonction sulfamate a été isolé avec un rendement de 90%. Les conditions d'Okada fonctionnent très bien même sur notre trisaccharide.

7.2.1. Problèmes d'échelles

Fort de ce résultat, nous avons décidé de nous lancer dans la sulfamylation des penta- et heptasaccharides **253** et **254**. Malheureusement nous n'avons pas pris en compte la différence relative des masses molaires de nos composés vis-à-vis de nos réactifs. En effet les réactifs employés pour la sulfamylation possèdent peu d'atomes et donc une faible masse molaire moléculaire, ce qui n'est pas le cas de nos oligosaccharides. Plus le degré de répétition du motif disaccharidique augmente plus la masse molaire moléculaire est grande. Cela a pour conséquence de diminuer les volumes réactionnels d'acide formique et de chlorure d'isocyanatesulfuryle à tel point que la réaction de formation du chlorure de sulfamyle est impossible. En effet réussir à faire réagir moins d'une dizaine de microlitres de réactifs dans une réaction liquide – liquide afin de former dans les meilleures conditions le chlorure de sulfamyle s'est révélé compliqué. D'autre part être sûr d'avoir introduit dans le milieu réactionnel le volume précis pour obtenir 1 équivalent de chaque réactif, en limitant l'introduction d'eau dans le montage, n'est également pas simple lorsqu'on travaille avec de très petit volume.

Afin de réaliser la sulfamoylation de nos oligosaccharides il a fallu développer d'autres conditions expérimentales.

7.2.2. Résolution des problèmes

Pour cela, il a été envisagé plusieurs possibilités. La première a été de multiplier par un facteur les équivalents de chlorure d'isocyanatesulfuryle et d'acide formique afin d'avoir des quantités pouvant former convenablement le chlorure de sulfamyle.

A partir de cette idée deux solutions expérimentales sont possibles. Il est possible de faire réagir la totalité du chlorure de sulfamyle ou bien de solubiliser ce chlorure de sulfamyle, formé dans une réaction sans solvant, dans le *N,N*-diméthylacétamide puis d'en prendre une quantité de manière à introduire quatre équivalents pour réaliser la réaction.

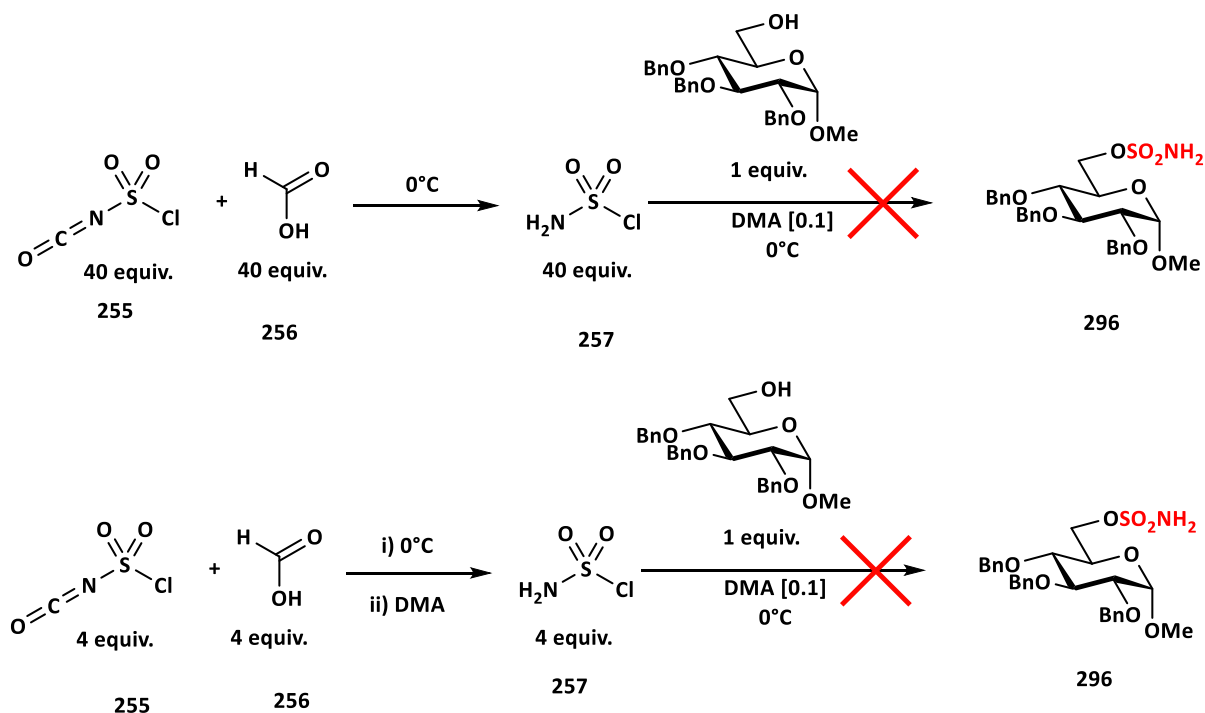


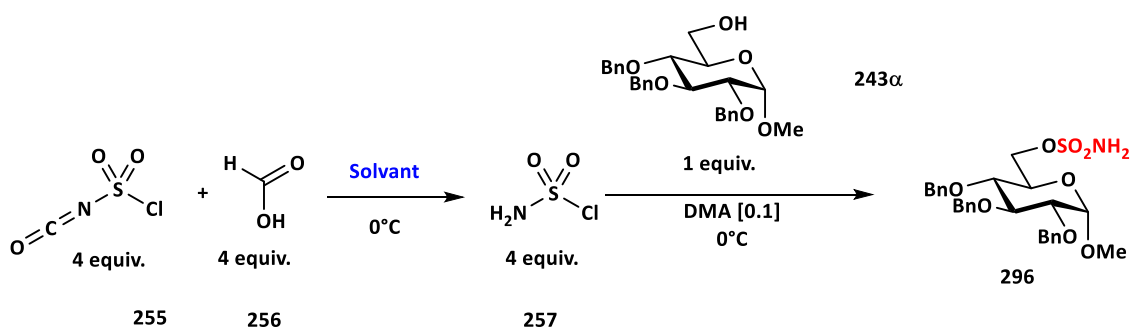
Schéma 69 : Recherche d'alternative pour la sulfamoylation.

L'utilisation de quarante équivalents pour la sulfamoylation s'est révélée infructueuse. Lors du suivi de la réaction par chromatographie sur couche mince, seul un produit ne migrant pas dans les conditions d'élution classique est apparue. Dans le cas où le chlorure de sulfamyle a été solubilisé par du *N,N*-diméthylacétamide, aucune réaction n'a été observée et seul le produit de départ a été récupéré.

Une autre possibilité expérimentale est de réaliser la dilution du chlorure d'isocyanatesulfuryle et de l'acide formique afin de réaliser une réaction en solvant. Puis de la même manière que précédemment additionner le réactif en solution sur le sucre, ou introduire le sucre dans cette solution.

Le choix du solvant ici est crucial. Il ne doit en aucun cas interférer dans la réaction entre l'alcool en 6 et le chlorure de sulfamyle. Plusieurs solvants ont été testés.

Tableau 15 : Test de solvant pour la réaction de formation du chlorure de sulfamyle.



Entrée	Solvant	Rendement
1	Toluène	0%
2	CH ₂ Cl ₂	58%
3	Et ₂ O	85%

Lorsque le toluène est utilisé pour effectuer les dilutions et ainsi permettre la rencontre entre le chlorure d'isocyanatesulfuryle et l'acide formique, malgré la formation d'un précipité blanc, aucune réaction de sulfamoylation n'a été observée (Tableau 15, entrée 1). Dans le cas du dichlorométhane le rendement de sulfamoylation a été de 58% (Tableau 15,

entrée 2). C'est dans l'éther diéthylique que les rendements se sont révélés être pratiquement identiques aux conditions sans solvant (Tableau 15, entrée 3).

L'utilisation de l'éther diéthylique comme solvant de réaction pour la formation du chlorure de sulfamyle, permet également de laisser celui-ci s'évaporer grâce à un léger flux de gaz. Cela permet de diminuer au fur et à mesure le volume réactionnel afin que les deux partenaires se rencontrent afin de réagir puis se déposent tout doucement sur les parois de la verrerie utilisée.

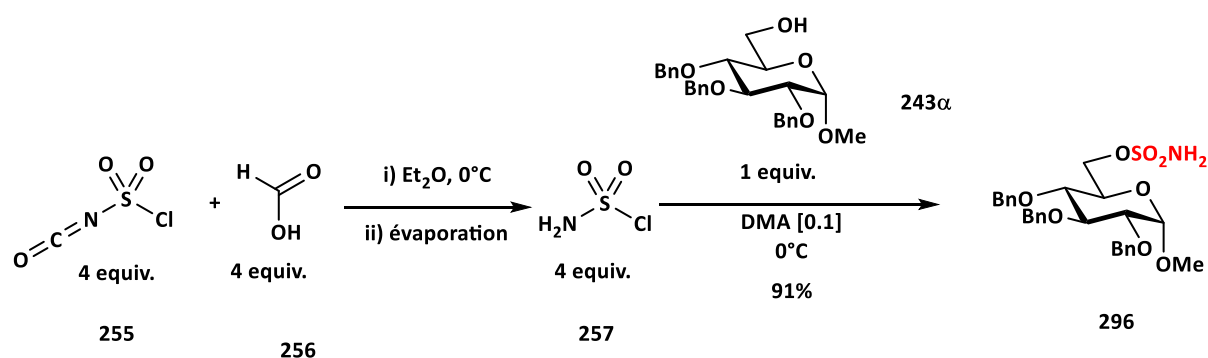


Schéma 70 : Formation du chlorure de sulfamyle par évaporation de l'éther.

Ce sont les conditions expérimentales, où les réactifs sont dilués dans l'éther puis mis à sec, qui permettent d'être le plus proche des conditions sans solvant, car avant l'ajout de la solution d'alcool dans le *N,N*-diméthylacétamide, le chlorure de sulfamyle se retrouve à l'état solide. Grâce à ces conditions expérimentales, nous retrouvons les mêmes résultats que sur le monosaccharide **295** dans les conditions sans solvant.

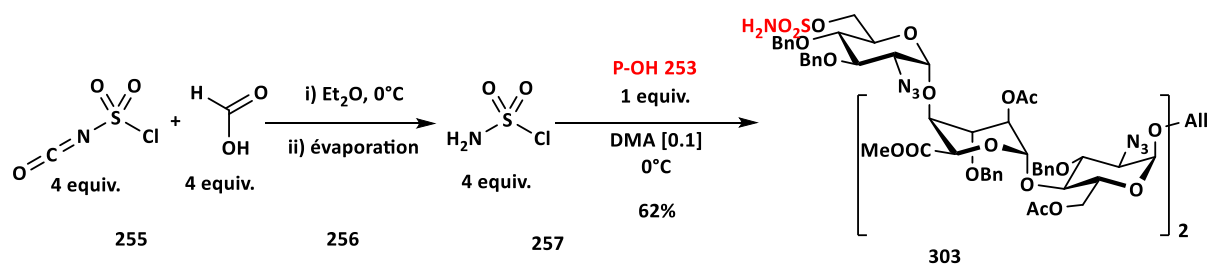


Schéma 71 : Sulfamoylation du pentasaccharide **253**.

En appliquant ces conditions au pentasaccharide, nous avons pu isolé le produit sulfamoylé avec un rendement de 62%.

Et enfin une dernière possibilité est de changer l'agent de sulfamoylation et de travailler avec un réactif analogue à celui développé par le professeur Burgess. Nous avons donc essayé de synthétiser des sels de Burgess (Schéma 72).¹⁸⁰

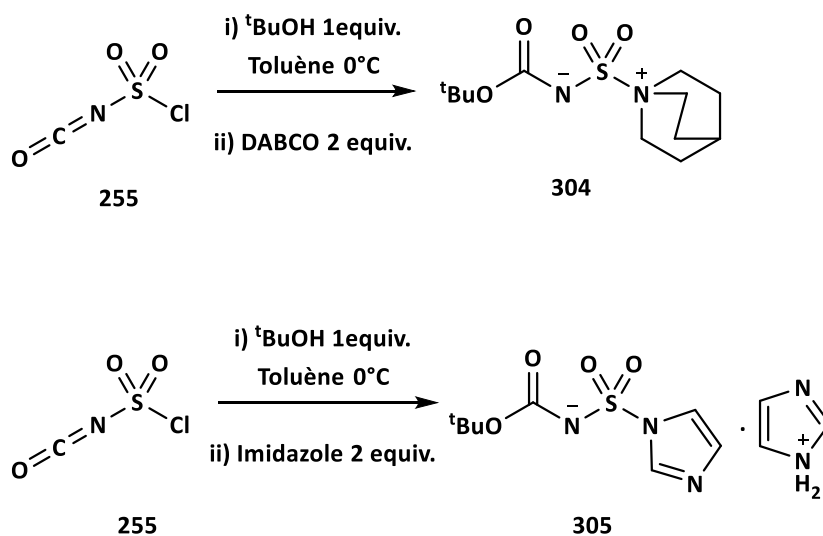


Schéma 72 : Synthèse d'analogue de réactif de Burgess.

En faisant réagir dans un premier temps, un équivalent d'alcool *tertiobutylique* avec le chlorure d'isocyanatesulfuryle, nous pouvons additionner la base de notre choix afin de créer un sel de Burgess. L'imidazole et le DABCO ont été testés. Ces réactifs ont été engagés dans des réactions de sulfamoylation (Schéma 73).

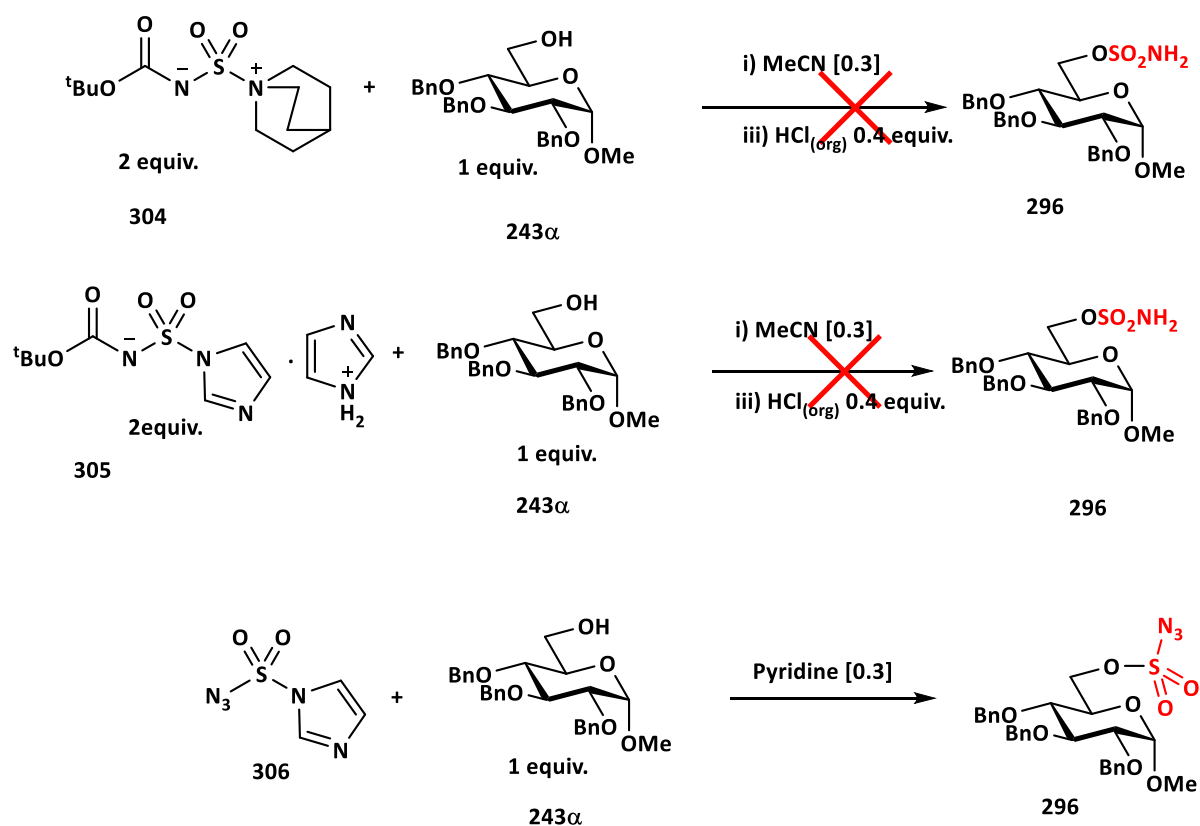


Schéma 73 : Réaction de sulfamoylation avec différents agents.

En reprenant les conditions de synthèse du groupe de Zhu,¹⁸⁰ nous avons réalisé des tests réactionnels sur des réactifs du type de celui de Burgess et également sur l'azoture de 1H-imidazol-1-sulfonyle.

Dans le cas des analogues du réactif de Burgess, les réactions n'ont pas fonctionné. Aucune trace de produit sulfamoylé n'a été observée. Dans le cas de la réaction avec **305**, un produit a été isolé, mais le spectre RMN ¹H ne semble pas correspondre à une simple fonctionnalisation de la position 6. En effet sur ce spectre le signal du proton H3 varie beaucoup par rapport à l'alcool initial. Un spectre ¹³C a été enregistré, il indique un nombre de carbone sp³ de 9, montrant que par rapport à la molécule du produit de départ il manque un groupement fonctionnel. L'intégration des protons aromatiques indique également une perte d'un groupement aromatique.

Une analyse COSY montre un couplage entre les H6 et un proton à 2,47 ppm. Ce déplacement chimique ne montre aucune corrélation hydrogène – carbone, que ce soit avec un HSQC ou avec un HMBC. Cela nous laisse à penser que la position 6 n'est pas fonctionnalisée.

Grâce à la RMN, notre conclusion sur la structure de cette molécule est que la position 6 est libre et que la perte d'un éther benzylique a été occasionnée sur une des positions du monosaccharide. Les conditions dans l'éther fonctionnant nous n'avons pas poussé plus loin les investigations pour trouver la structure de ce composé.

7.4. Conclusion

La réaction de sulfamoylation a été appliquée avec succès à nos modèles monosaccharidiques. L'application au trisaccharide à donner un excellent rendement permettant ainsi d'avancer dans cette voie de synthèse. Il a fallu développer de nouvelles conditions opératoires pour la synthèse d'oligosaccharides de masse molaire moléculaire plus importante. Ces conditions reprennent les travaux des groupes de Burgess, Nicolaou, et Zhu. Malheureusement les analogues de type Burgess n'ont probablement pas dû être synthétisés correctement, ne permettant ainsi aucune réaction de sulfamoylation. Néanmoins la synthèse du pentasaccharide sulfamylé **303** a été possible grâce à une étude de la réaction de formation du chlorure de sulfamyle en solvant. Celle-ci nous a permis de trouver que cette réaction était possible dans l'éther diéthylique et que ce dernier pouvait être évaporé afin de se retrouver dans des conditions sans solvant.

8. Résumé et perspectives

Dans le but de synthétiser des inhibiteurs sélectifs pour les endosulfatases humaines 1 et 2, nous avons mis au point une stratégie de synthèse reprenant la stratégie itérative développée au laboratoire. La combinaison de groupements protecteurs utilisée dans l'équipe a été transposée à notre synthèse. En utilisant les connaissances du laboratoire nous avons élaboré une synthèse reposant sur la fonctionnalisation tardive du motif inhibiteur de nos oligosaccharides. Pour ce faire un groupement protecteur de type acétal de benzylidène en position 4,6 a été choisi pour protéger la position 6 lors de la réaction de glycosylation, formant ainsi nos oligosaccharides avec ce motif. La mise au point de conditions de glycosylation afin de synthétiser notre trisaccharide, synthon clé dans notre stratégie, s'est faite avec plusieurs accepteurs. Dans un premier temps ceux-ci ont réagi sur un donneur modèle donnant des résultats encourageants, puis dans un deuxième temps, ils ont réagi sur l'accepteur répétitif du motif heparane sulfate. Les résultats obtenus lors de ces glycosylations se sont révélés intéressants puisque dans les trois cas, seul le diastéréoisomère α a été observé. C'est le donneur ayant un groupement de type NPTFA qui a donné les meilleurs résultats au niveau du rendement de la réaction. Une fois ce trisaccharide isolé il a pu être transformé en donneur afin de former un penta- et un heptasaccharide dans une réaction de glycosylation utilisant une stratégie 3 + 2 et 3 + 4.

Une fois nos oligosaccharides isolés, c'est la réaction d'ouverture réductrice qui a fait l'objet d'une méthodologie. Celle-ci a montré que l'emploi de 3,4 équivalents de dichlorophénylborane avec 5 équivalents de triéthylsilane, selon le solvant de réaction et la température, peut accompagner la réaction d'ouverture régiosélective, de réactions secondaires. L'une d'entre elles conduit à la modification chimique de la fonction allyle la transformant en un enchainement propylique fonctionnalisé par le côté terminal.

Grâce à l'emploi de l'éther diéthylique et une température de -15°C la formation de sous-produit a pu être évitée sur le monosaccharide ainsi que sur le trisaccharide. Lorsque ces conditions ont été appliquées au penta et à l'heptasaccharide, la formation de sous-produits n'a pu être empêchée faisant diminuer drastiquement le rendement.

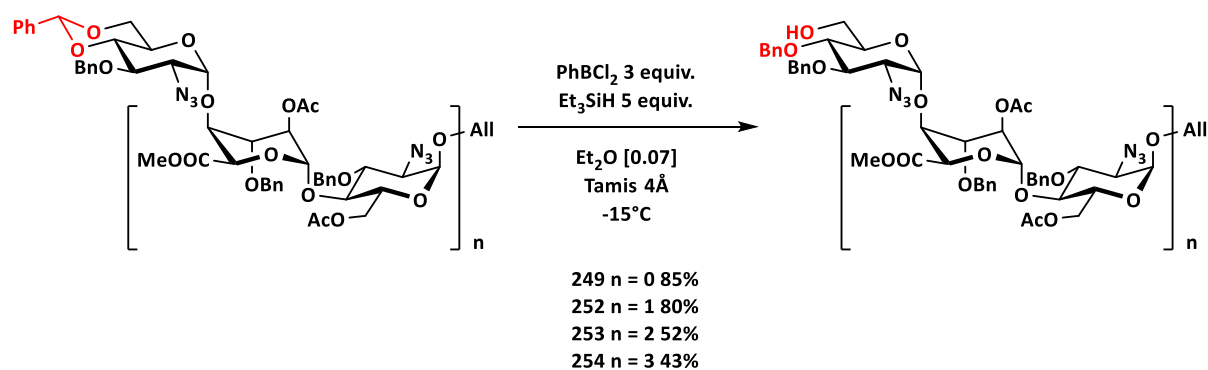


Schéma 74 : Résultats de l'ouverture réductrice régiosélective d'acétals de benzilidènes.

La réaction de sulfamoylation a été étudiée sur des modèles dans deux conditions. La première fait intervenir l'hydruire de sodium comme base afin de préparer un alcoolate qui réagit sur une solution fraîche de chlorure de sulfamyle dans l'acétonitrile. Les deuxièmes conditions à avoir été testées sont l'utilisation du chlorure d'isocyanatesulfuryle et d'acide formique afin de former le chlorure de sulfamyle à sec, sans solvant, puis d'y ajouter une solution d'alcool dans le *N,N*-diméthylacétamide. Ces conditions ont permis d'obtenir de meilleurs rendements et une meilleure constance dans les résultats. Il a été impossible d'appliquer ces conditions opératoires au pentasaccharide et à l'heptasaccharide. Nous avons donc cherché un autre moyen de fonctionnaliser nos plus grands oligosaccharides. Des conditions permettant l'emploi de solution diluée dans l'éther diéthylique ont été développées. Cette méthode permet de s'affranchir du solvant si désiré. Avec ces conditions le pentasaccharide a été sulfamoylé avec un rendement de 62%.

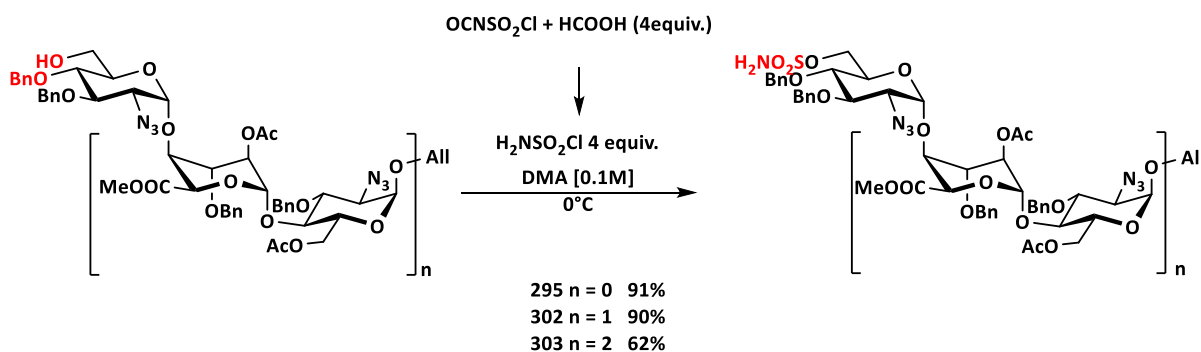


Schéma 75 : Résultats sur la sulfamylation de saccharides.

La stratégie de synthèse a été validée car le trisaccharide a pu être fonctionnalisé et déprotégé, selon le schéma habituel au laboratoire.

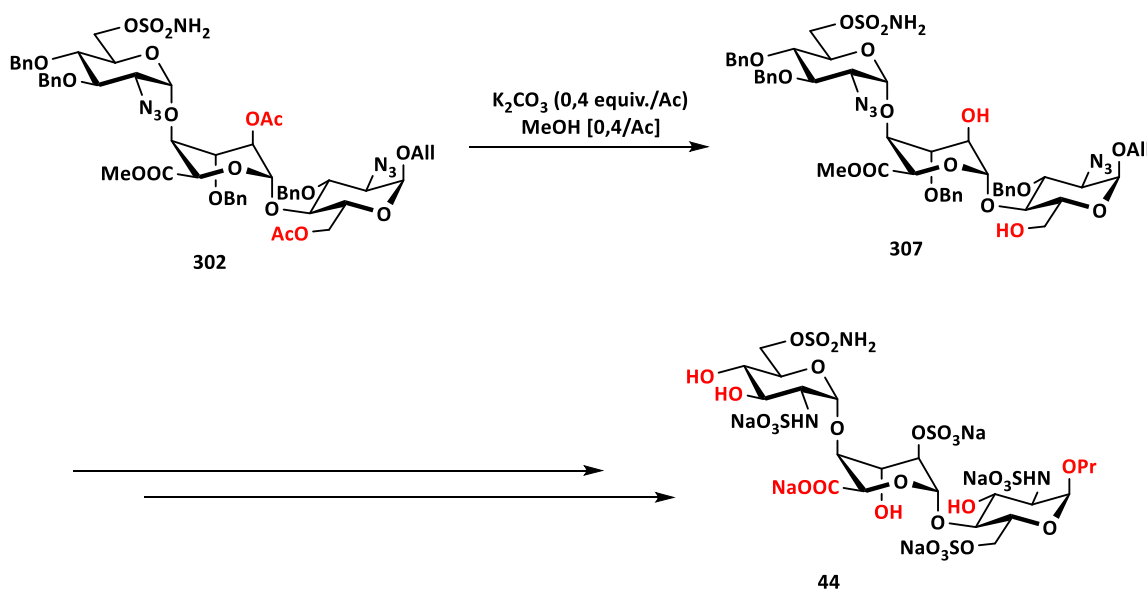


Schéma 76 : Déprotection et fonctionnalisation du trisaccharide **44**.

Les mauvais résultats lors de la réaction d'ouverture réductrice peuvent suggérer, si la synthèse était à refaire, le remplacement de l'acétal de benzylidène par un acétal de 4-methoxybenzylidène. En effet, ils sont connus pour être plus réactifs et permettraient peut-être d'obtenir une meilleure chimiosélectivité entre la réaction d'ouverture réductrice et la réaction parasite ; limitant ainsi la formation potentielle de sous-produits. Améliorer le

rendement de cette étape d'ouverture réductrice est important. La quantité de produit engagée pour effectuer la réaction de sulfamoylation doit être importante pour limiter les problèmes d'échelle et ne transformer qu'une cinquantaine de pourcent du produit engagé à l'étape précédente se révèle crucial pour le déroulement de la sulfamoylation.

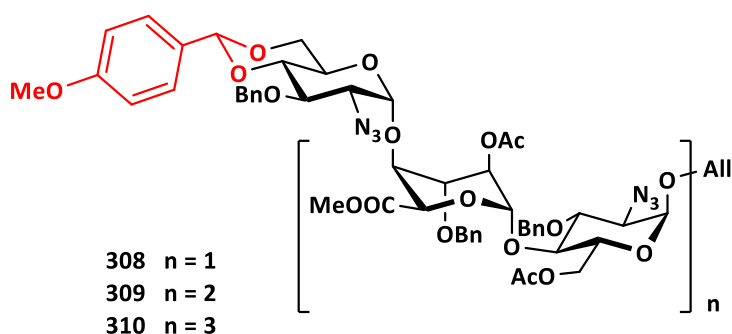


Figure 21 : Structure d'oligosaccharides pour améliorer la synthèse.

Dans le but de synthétiser des inhibiteurs spécifiques pour les endosulfatases humaines 1 et 2 il convient de discriminer leurs domaines de reconnaissance. Pour cela, une possibilité que nous offre notre voie de synthèse est l'utilisation du groupement allyle. En effet il est tout à fait possible d'imaginer la synthèse d'une molécule possédant d'un côté la fonction inhibitrice portée par un motif trisaccharidique, par exemple, reliée par un espaceur de taille définie à un autre motif oligosaccharidique. La fonction allyle permet la synthèse de ce type de molécule, grâce à une réaction de type thiol-ène, ou bien par une réaction de conjugaison. Cela permettrait de cibler d'un côté le domaine de reconnaissance de l'enzyme, et de l'autre le site catalytique tout en ayant une synthèse plus rapide et moins coûteuse.

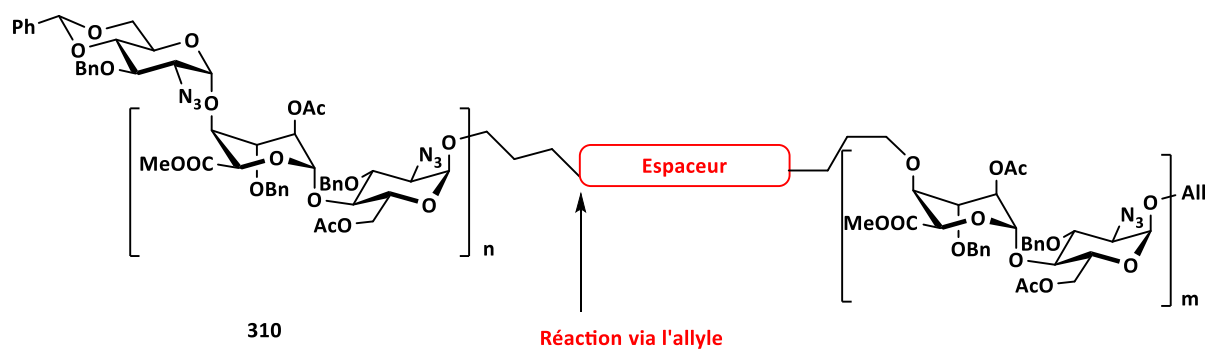


Figure 22 : illustration de molécule contenant un bras espaceur.

La stratégie de synthèse permet aussi de moduler la fonction inhibitrice une fois l'oligosaccharide obtenu. En effet telle que nous l'avons développée cette stratégie permet d'accéder aux oligosaccharides de taille désirée puis ensuite de les fonctionnaliser via une ouverture réductrice. En se reposant sur une synthèse connue et reproductible de l'oligosaccharide de taille voulue, il restera à se focaliser sur le changement de la fonction en restant vigilant sur la compatibilité entre la nouvelle fonction inhibitrice et les groupements protecteurs déjà présents ainsi que sur les conditions réactionnelles de déprotection de ceux-ci.

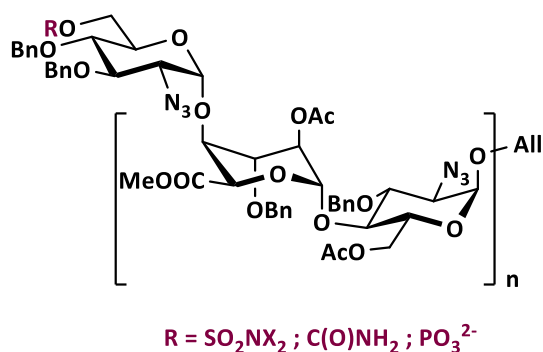


Figure 23 : Exemple de fonction inhibitrice possible.

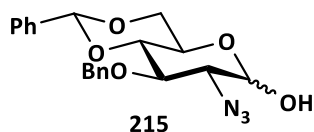
9. Partie expérimentale

Material and methods:

All moisture-sensitive reactions were performed under an argon atmosphere using oven-dried glassware. Evaporations were performed under reduced pressure. All solvents were dried by filtration on alumine columns or over standard drying agents and freshly distilled prior to use. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 A.C.C. (30–60 μm). Reactions were monitored by TLC on Silica Gel 60 F254 plates with detection by UV light at 254 nm and by charring with 5 % ethanolic H_2SO_4 .

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

Compound 215 : 2-azido-3-O-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy-D-glucofuranose



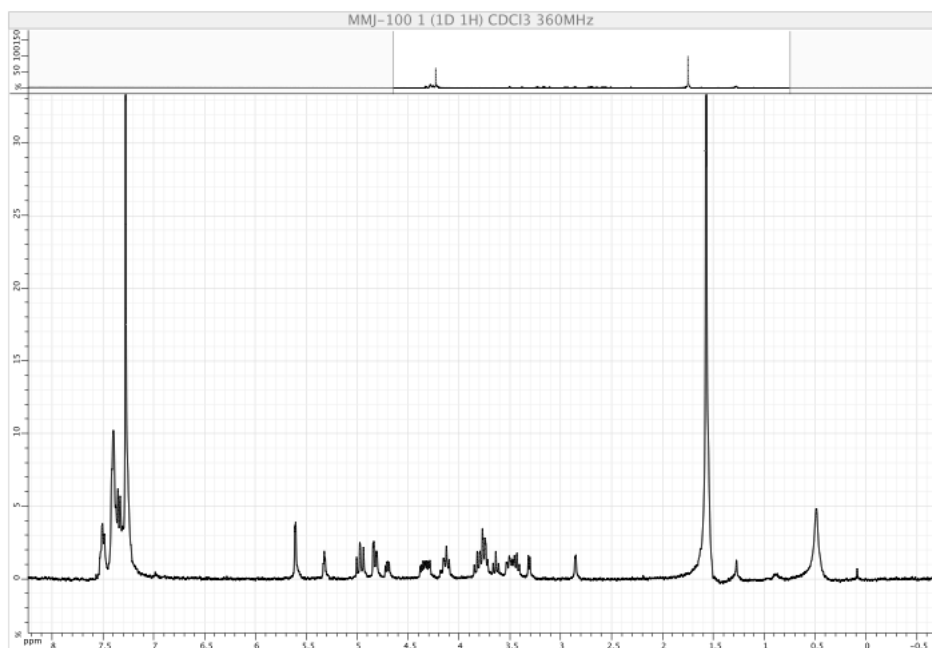
Method A:

To an ice-cooled soln of **204** (200 mg, 0.41 mmol) in acetone/water (9:1, 42 mL, 0.01M) was added *N*-bromosuccinimide (374 mg, 2.12 mmol, 5 equiv.). After total consumption of starting material, the reaction was diluted with AcOEt and washed with Na₂S₂O₃ (0.1 M), satd aq. NaHCO₃ soln and satd aq. NaCl soln. The organic phases were dried (MgSO₄), filtered and concentrated. Flash chromatography on silica gel (toluene/acetone 9:1) of the residue gave the desired compound **214** in 90 % yield (150 mg).

Method B:

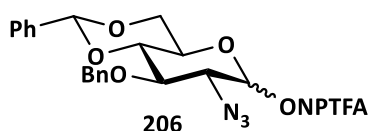
The iridium catalyst (C₈H₁₄(MePh₂P)₂Ir^I-PF₆) (77 mg, 0.09 mmol, 5 mol. %) was added to a soln of allyl compound (890 mg, 1.82 mmol) in THF (24 mL, 0.075 M). The mixture was degassed and the Ir catalyst was activated with H₂ at 0 °C, the solution became nearly colourless. The reaction mixture was degassed and stirred 2 h under argon at r.t. The solvent was then evaporated and the residue was dissolved in acetone-water (36.4 mL, 9/1, 0.05 M), then HgO (513 mg, 2.37 mmol, 1.3 equiv.) and HgCl₂ (593 mg, 2.19 mmol, 1.2 equiv.) were added. After stirring for 2 h at r.t., the mixture was diluted with Et₂O, washed with 10 % KI solution, satd aq. Na₂SO₃ and water. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/ AcOEt). Compound **214** was obtained in 92 % yield (882 mg).

HRMS (ESI-MS, positive mode): *m/z* calcd 406.1373 for C₂₀H₂₁N₃NaO₅, found 406.1362 [M+Na⁺].



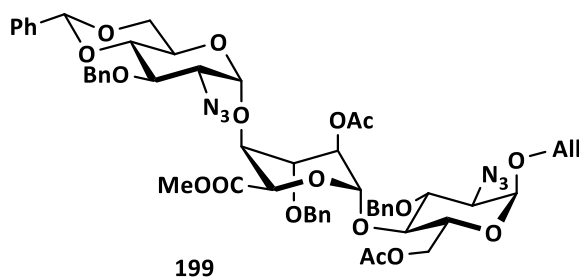
RMN ^1H (compound **214**)

Compound **205** : 2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy-D-glucopyranosyl *N*-phenyltrifluoroacetimidate



Compound **214** (882 mg, 1.97 mmol) was dissolved in wet acetone (13 mL, 0.15M). K_2CO_3 (816 mg, 5.91 mmol, 3 equiv.) and the *N*-phenyl-2,2,2-trifluoroacetimidoyl chloride (819 mg, 3.9 mmol, 2 equiv.) were subsequently added. After total consumption of the hemiacetal, the mixture was evaporated and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene/ acetone 100 to 95:5) to give the desired product (745 mg, 1.34 mmol, 70 %) as α/β mixture.

Compound **199** : Allyl (2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside).



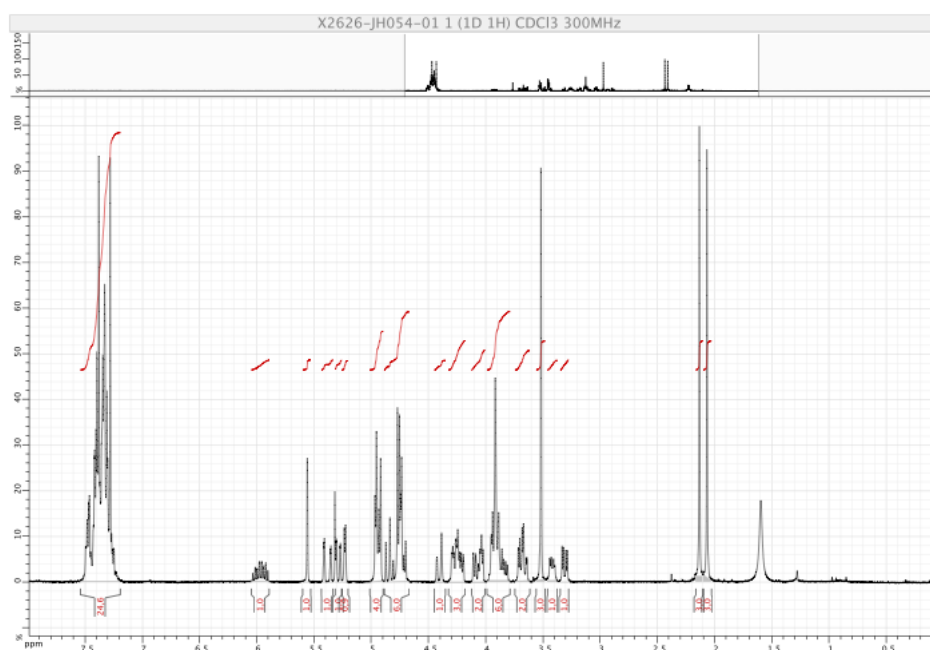
Acceptor **161**, obtained as previously described, (600 mg, 0.858 mmol) and donor **206** (618 mg, 1.10 mmol, 1.3 equiv.) were azeotropically dried with toluene and dissolved in CH₂Cl₂ (4.29 mL, 0.2 M). Powdered 4-Å molecular sieves (2.34 g) were added and the mixture was then stirred for 20 mn at r.t.. The solution was cooled to -40 °C and TBDMSOTf (0.2 M in CH₂Cl₂, 230 μL, 0.17 mmol, 0.2 equiv.) was added. The reaction was stirred at this temperature overnight and quenched with a soln of NEt₃ (0.3 M in CH₂Cl₂, 120 μL, 0.34 mmol, 0.4 equiv.). After filtration through a pad of silica and evaporation, the residue was applied to the top of a flash chromatography column filled with silica gel and eluted (toluene/acetone 100 to 96 :4) to give the trisaccharide **199** (764 mg, 84 %).

HRMS (ESI-MS, positive mode): *m/z* calcd 1087.3907 for C₅₄H₆₀N₆NaO₁₇, found 1087.4006 [M+Na⁺].

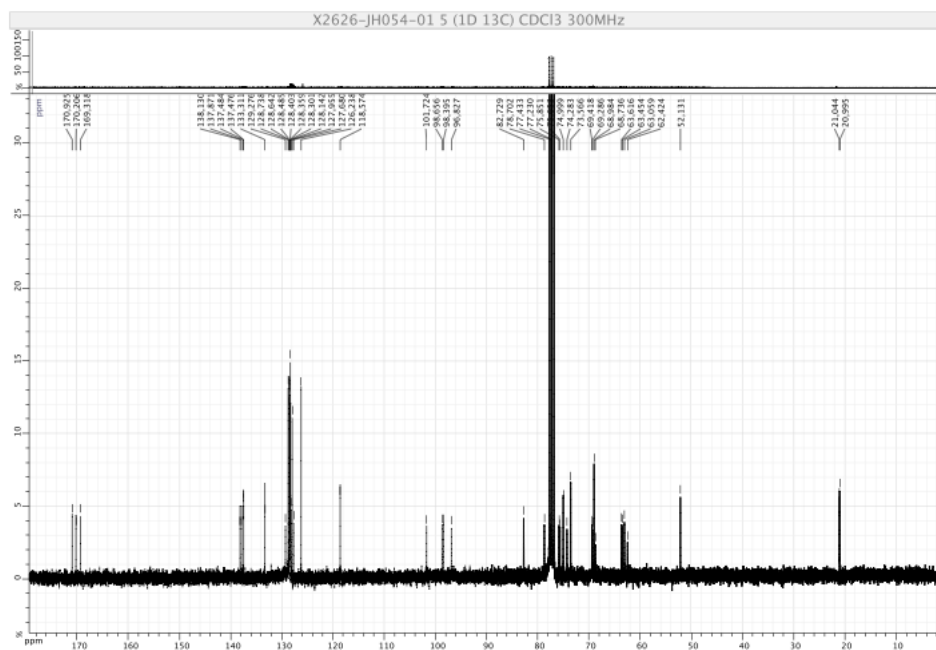
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ= 7.50-7.13 (m, 20H, Ph), 5.95 (dddd, J_{b,ct}=17.0 Hz, J_{b,cc}=10.5 Hz, J_{b,a'}= 6.0 Hz, J_{b,a}=5.0 Hz, 1H, H-b), 5.54 (s, 1H, H-benz), 5.36 (dq, J_{ct,b}=17.0 Hz, J_{ct,a}=J_{ct,a'}=J_{gem}=1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.26 (dq, J_{cc,b}=10.5 Hz, J_{cc,a}=J_{cc,a'}=J_{gem}=1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.21 (d, J=, 1H, H-1^B), 4.98-4.88 (m, 4H, H-1^A, H-2^B, H-1^C, 1H, OCH₂Ph), 4.83 (d, J_{gem}=10.5 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.79-4.67 (m, 5H, H-5^B, OCH₂Ph), 4.39 (d, J= 12 Hz, 1H, H-6^a^A), 4.24 (d, J= 12 Hz, 1H, H-6^b^A), 4.22 (dd, J_{gem}= 10.0 Hz, J_{6a,5}=5.0 Hz 1H, H-6^a^C), 4.20 (ddt, J_{gem}= 13.0 Hz, J_{a,b}= 5.0 Hz, J_{a,cc}=J_{a,ct}= 1.5 Hz, 1H, H-a), 4.05 (ddt, J_{gem}= 13.0 Hz, J_{a',b}= 6.0 Hz, J_{a',cc}=J_{a',ct}= 1.5 Hz, 1H, H-a'), 4.01 (t, J_{4,3}=J_{4,5}= 5.0 Hz, 1H, H-4^B), 3.92 (t, J_{3,2}=J_{3,4}= 5.0 Hz, 1H, H-3^B), 3.90 (t, J_{3,4}= 9,5 Hz, J_{2,3}= 10.0 Hz, 1H, H-3^C), 3.89 (t, J_{4,5}= 10.0 Hz, 1H, H-4^A), 3.88 (t, J_{2,3}=

9.5 Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, 1H, H-3^A), 3.87 (d, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1H, H-5^A), 3.83 (dt, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, $J_{5,6b} = 10.0$ Hz, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, 1H, H-5^C), 3.66 (t, $J_{6b,5} = J_{6b,6a} = 10.0$ Hz, 1H, H-6^{bC}), 3.65 (t, $J_{4,5} = J_{9.5}$ Hz, 1H, H-4^C), 3.49 (s, 3H, COOMe), 3.40 (dd, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, 1H, H-2^A), 3.29 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, 1H, H-2^C), 2.12 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.05 (s, 3H, (O)CCH₃).

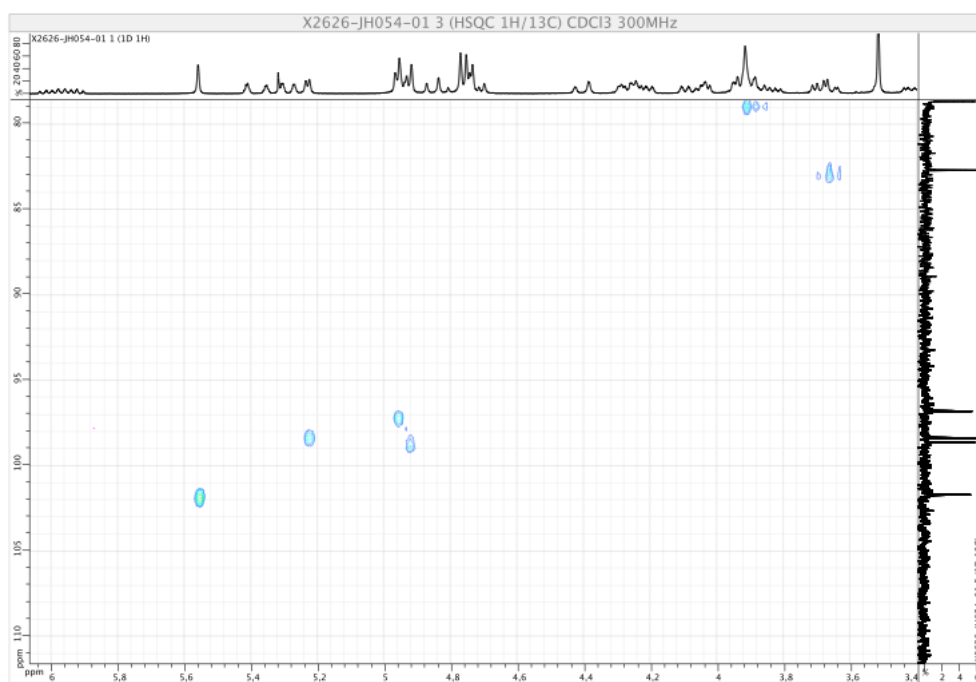
RMN ¹³C (75,8 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.7, 169.9, 169.1$ (C=O), 137.9, 137.7, 137.3, 137.3 (C_{quat arom}), 133.1 (C-b), 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.45, 126.0, (C_{arom}), 118.3 (C-c), 101.5 (C-benz), 98.5 (C-1^C), 98.2 (C1^B), 96.6 (C-1^A), 82.5 (C-4^C), 78.5 (C-3^A), 75.6 (C-4^A), 75.4 (C-3^B), 74.5 (2C, CH₂Ph), 74.1 (C-3^C), 73.4 (2C, C-4^B, CH₂Ph), 69.2 (C-5^A), 69.1 (C-5^B), 68.8 (2C, C-2^B, Ca), 68.5 (C-6^C), 63.4 (C-2^A), 63.2 (C-5^C), 62.8 (C-2^C), 62.2 (C-6^A), 51.9, (COOCH₃), 20.8 (2C, C(O)CH₃).



RMN ¹H (compound **199**)

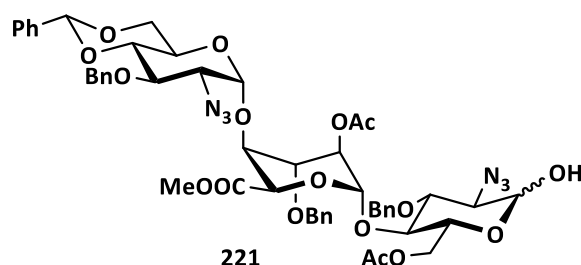


RMN ^{13}C (compound 199)



RMN HSQC (compound 199)

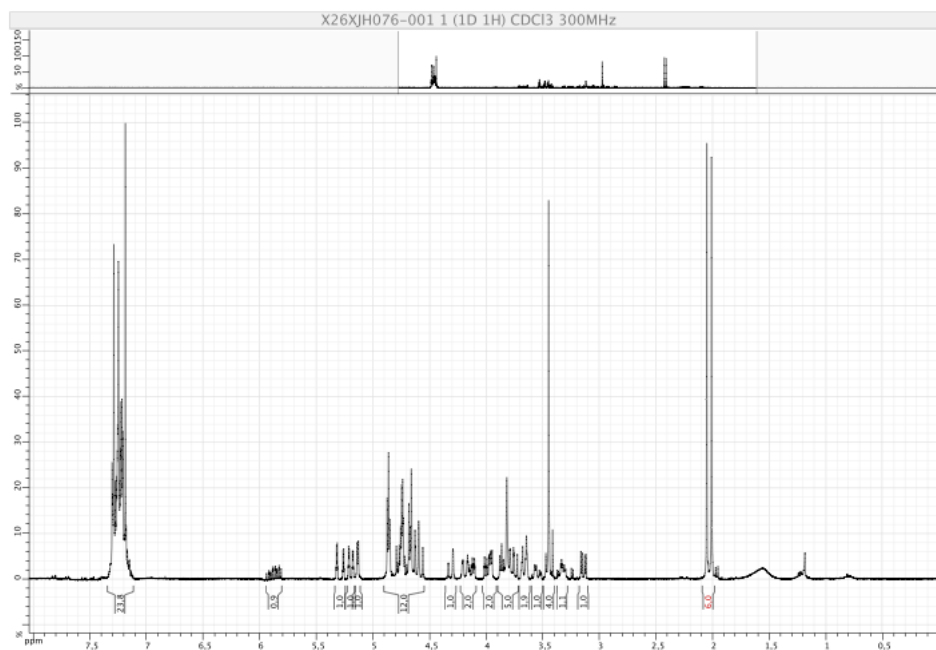
Compound 220 : (2-azido-3-O-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy- α -D-glucofuranose)-(1-4)-O-(methyl 2-O-acetyl-3-O-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-O-(6-O-acetyl-2-azido-3-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glucofuranose).



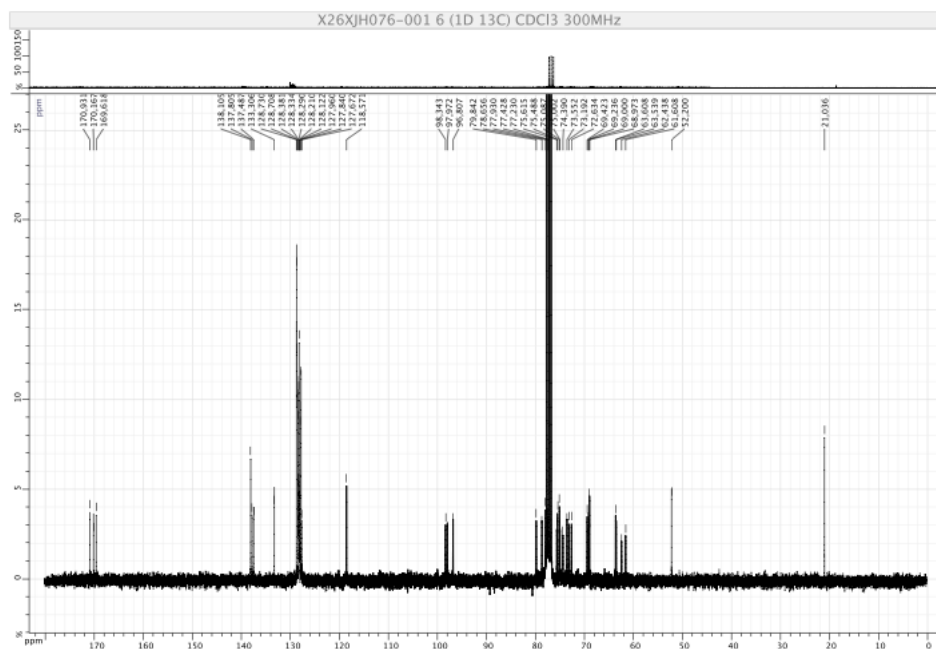
The iridium catalyst ($C_8H_{14}(MePh_2P)_2Ir^I-PF_6$) (24 mg, 0.03 mmol, 5 mol. %) was added to a soln of allyl compound **199** (603 mg, 0.566 mmol) in THF (7.5 mL, 0.075 M). The mixture was degassed and the Ir catalyst was activated with H_2 at 0 °C, the solution became nearly colourless. The reaction mixture was degassed and stirred 2 h under argon at r.t. The solvent was then evaporated and the residue was dissolved in acetone-water (11.3 mL, 9/1, 0.05 M), then HgO (160 mg, 0.74 mmol, 1.3 equiv.) and $HgCl_2$ (185 mg, 0.68 mmol, 1.2 equiv.) were added. After stirring for 2 h at r.t., the mixture was diluted with Et_2O , washed with 10 % KI solution, satd aq. Na_2SO_3 and water. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene/ acetone 100 to 85:15). Compound **221** was obtained in 98 % yield (568 mg).

HRMS (ESI-MS, positive mode): calcd 1047.3594 for $C_{51}H_{56}N_6NaO_{17}$, found 1047.3588 [$M+Na^+$].

Cette molécule n'a pas été caractérisée plus que cela. La masse étant suffisante pour ce mélange de diastéréoisomères. En effet, l'analyse RMN 1H se complique grâce à la présence des deux diastéréoisomères.

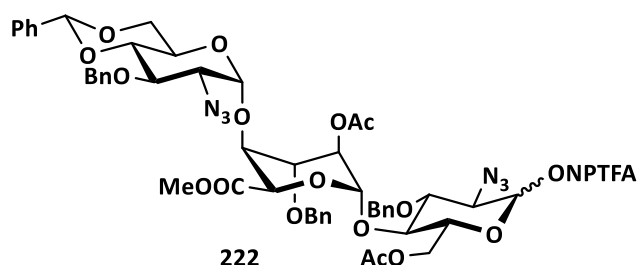


RMN ^1H (compound **221**)



RMN ^{13}C (compound **221**)

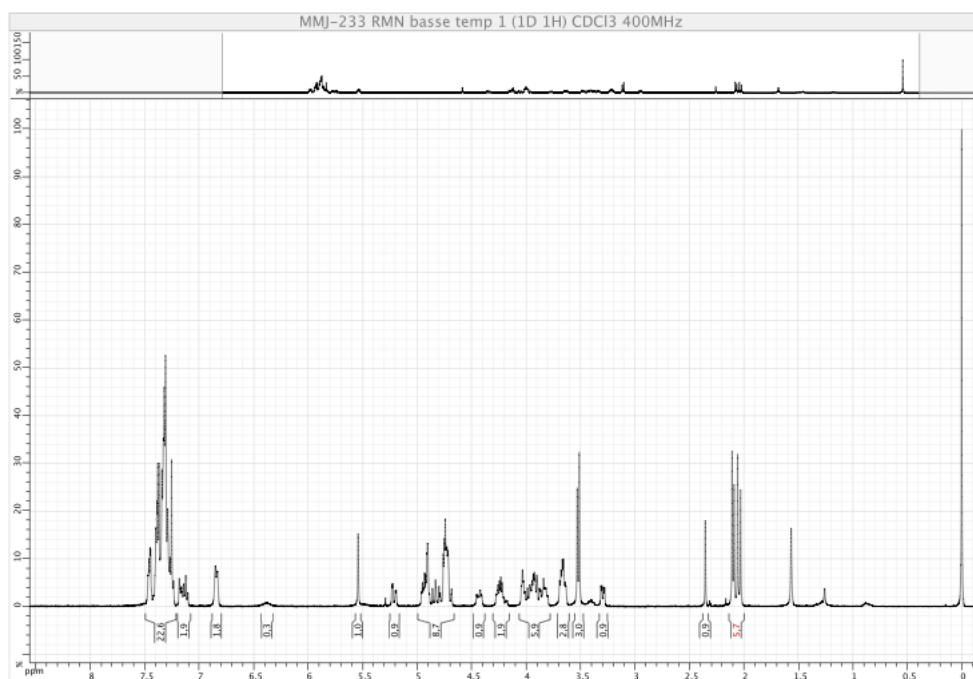
Compound 222 : (2-azido-3-O-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-O-(methyl 2-O-acetyl-3-O-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-O-(6-O-acetyl-2-azido-3-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside *N*-phenyltrifluoroacetamide).



Compound **221** (568 mg, 0.55 mmol) was dissolved in wet acetone (3.5 mL, 0.15M). K_2CO_3 (228 mg, 1.65 mmol, 3 equiv.) and the *N*-phenyl-2,2,2-trifluoroacetimidoyl chloride (138 mg, 0.66 mmol, 2 equiv.) were subsequently added. After total consumption of the hemiacetal, the mixture was evaporated and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (toluene/ AcOEt 100 to 90:10) to give the desired product (602 mg, 0.49 mmol, 89 %) as α/β mixture.

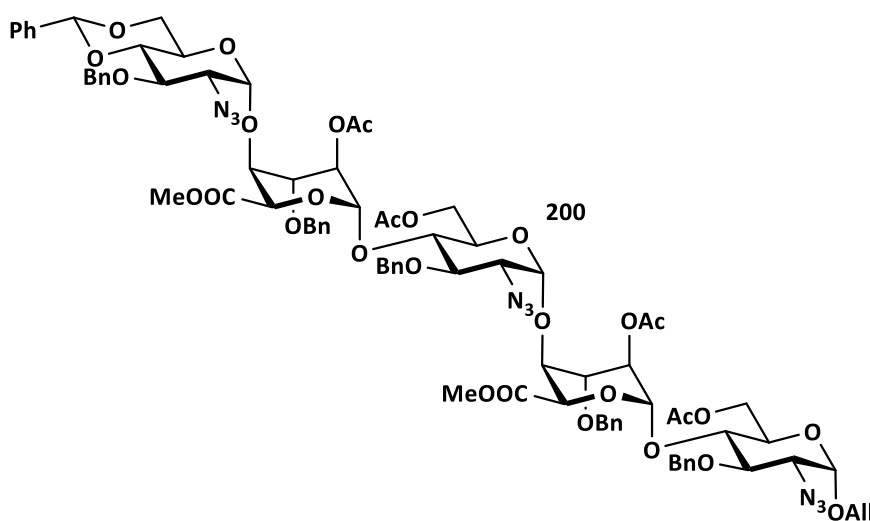
HRMS (ESI-MS, positive mode): calcd 1218.3890 for $C_{54}H_{60}N_6NaO_{17}$, found 1218.3989 $[M+Na^+]$.

Cette molécule n'a pas été caractérisée plus que cela. La masse étant suffisante pour ce mélange de diastéréoisomères. En effet, l'analyse RMN 1H se complique grâce à la présence des diastéréoisomères d'une part mais également dû à la présence du groupement *N*-phényltrifluoroacétimidate, celui-ci a un effet sur les protons $H_{1\alpha}$ et β leurs déplacements chimiques sort sous forme d'un massif lorsque l'analyse est réalisée 20°C.



RMN ^1H (compound **222**)

Compound **200** : Allyl (2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside.

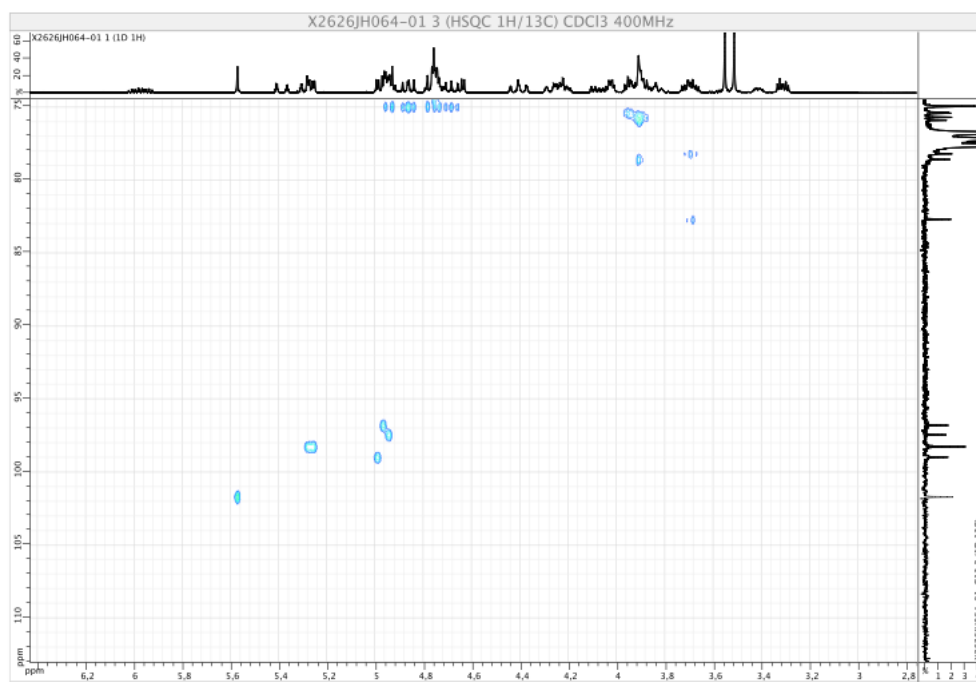


Acceptor **161**, obtained as previously described, (100 mg, 0.14 mmol) and donor **222** (221 mg, 0.19 mmol, 1.3 equiv.) were azeotropically dried with toluene and dissolved in CH₂Cl₂ (0.71 mL, 0.2 M). Powdered 4-A molecular sieves (390 mg) were added and the mixture was then stirred for 20 mn at r.t.. The solution was cooled to -40 °C and TBDMSOTf (0.2 M in CH₂Cl₂, 50 μL, 0.03 mmol, 0.2 equiv.) was added. The reaction was stirred at this temperature overnight and quenched with a soln of NEt₃ (0.4 equiv.). After filtration through a pad of silica and evaporation, the residue was applied to the top of a flash chromatography column filled with silica gel and eluted (toluene/AcOEt 100 to 80:20) to give the pentasaccharide **200** (222 mg, 91 %).

HRMS (ESI-MS, positive mode): calcd 1728.6128 for C₈₅H₉₅N₉NaO₂₉, found 1728.6247 [M+Na⁺].

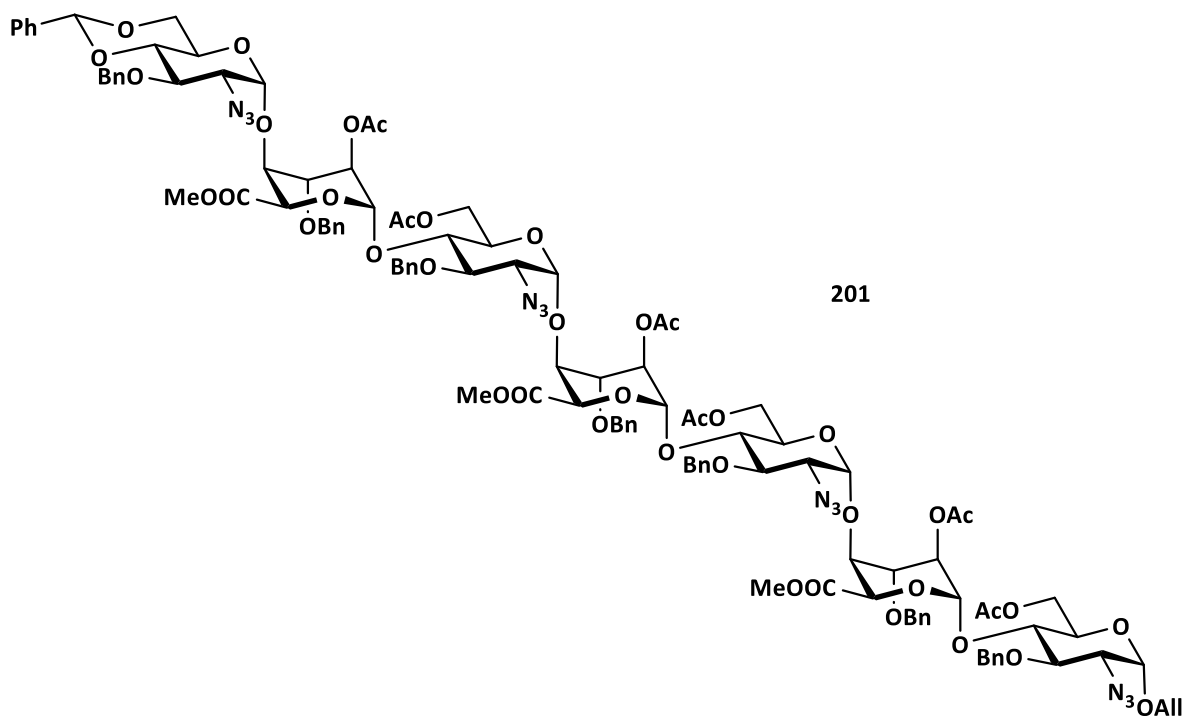
RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ = 7.51-7.24 (m, 30H, Ph), 5.97 (dddd, J_{b,ct}=17.0 Hz, J_{b,cc}=10.5 Hz, J_{b,a'}= 6.0 Hz, J_{b,a}=5.0 Hz, 1H, H-b), 5.57 (s, 1H, Hbenz), 5.39 (dq, J_{ct,b}=17.0 Hz, J_{ct,a}=J_{ct,a'}=J_{gem}=1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.32-5.23 (m, 3H, dq, J_{cc,b}=10.5 Hz, J_{cc,a}=J_{cc,a'}=J_{gem}=1.5 Hz, 1H, H-cc, H-1^B, H-1^D), 5.02-4.90 (m, 6H, H-2^B, H-2^D, H-1^A, H-1^C, H-1^E, 1 OCH₂Ph), 4.89-4.81 (m, 2H, 2 OCH₂Ph), 4.80-4.60 (m, 9H, H-5^B, H-5^D, 7 OCH₂Ph), 4.46-4.35 (m, 2H, H-6a^A, H-6a^C), 4.31-4.16 (m, 4H, H-6a^E, H-a, H-6b^A, H-6b^C), 4.12-3.98 (m, 3H, H-4^B, H-4^D, H-a'), 3.98-3.78 (m, 9H, H-3^A, H-3^C, H-3^E, H-6b^E, H-3^B, H-3^D, H-5^A, H-5^C, H-5^E), 3.74-3.64 (m, 3H, H4^A, H-4^C, H-4^E), 3.50 (s, 3H, COOMe), 3.48 (s, 3H, COOMe), 3.43 (dd, J_{2,3}= 9.5 Hz, J_{1,2}= 3.5 Hz, 1H, H-2^A), 3.37-3.26 (m, 2H, H-2^C, H-2^E), 2.15 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.12 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.09 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.05 (s, 3H, (O)CCH₃).

RMN ¹³C (75,8 MHz, CDCl₃): δ = 170.9 (C=O), 170.8 (C=O), 170.2 (C=O), 170.0 (C=O), 169.5 (C=O), 169.5 (C=O), 138.1, 137.9, 137.8, 137.5, 137.3, (6C, C_{quat arom}), 133.3 (C-b), 129.3, 129.3, 129.2, 128.8, 128.7, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.9, 127.8, 126.2 (30 C_{arom}), 118.6 (C-c), 101.7 (Cbenz), 99.0 (C-1^E), 98.2 (2C, C-1^B, C-1^D), 97.4 (C-1^C), 96.82 (C-1^A), 82.7 (C-4^E), 78.6 (C-4^A), 78.2 (C-3^C), 77.4 (C-3^A), 75.9 (C-3^B), 75.3 (C-3^D), 75.7(CH₂Ph), 75.5(CH₂Ph), 74.9(CH₂Ph), 74.0 (C-3^E), 73.8 (CH₂Ph), 73.6 (CH₂Ph), 70.2 (C-4^B), 70.2 (C-4^D), 69.9 (C-5^C), 69.5 (C-5^B), 69.4 (2C, C-5^D, C-2^D), 69.0 (C-5^A), 69.0 (2C, C-6^E, C-a), 68.7 (C-2^B), 63.6 (C-5^E), 63.5 (C-2^E), 63.3 (C-2^C), 62.9 (C-2^A), 62.4 (C-6^A), 62.0 (C-6^C), 52.2 (2C, COOCH₃), 51.9 (COOCH₃), 21.1 (C(O)CH₃), 21.0 (C(O)CH₃), 21.0 (C(O)CH₃).



RMN HSQC (compound **200**)

Compound **201** : Allyl (2-azido-3-*O*-benzyl-4,6-benzylidene-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside.



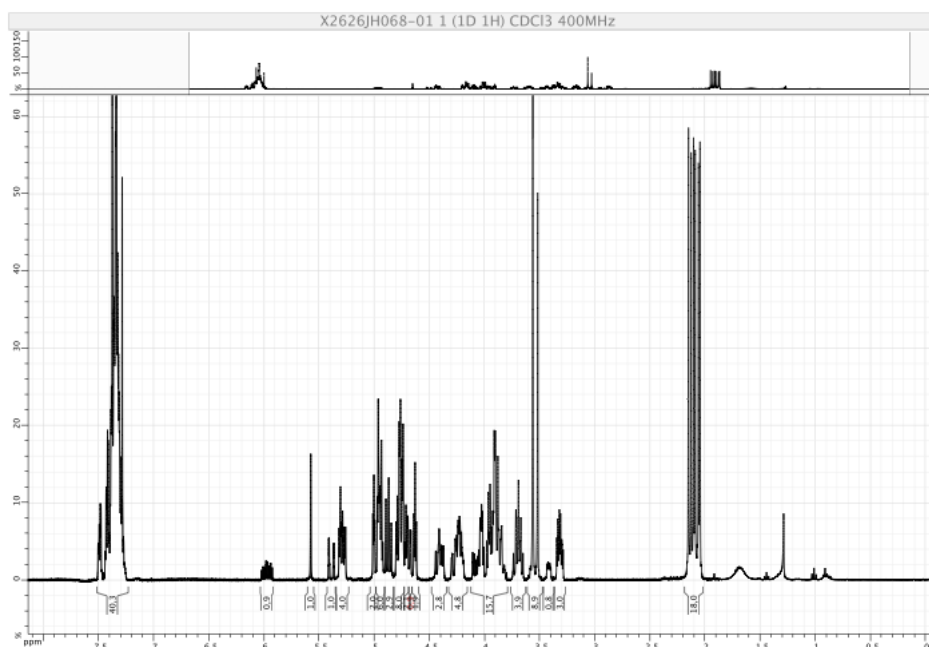
Acceptor **164**, obtained as previously described, (185 mg, 0.14 mmol) and donor **222** (215 mg, 0.18 mmol, 1.3 equiv.) were azeotropically dried with toluene and dissolved in CH_2Cl_2 (0.70 mL, 0.2 M). Powdered 4-A molecular sieves (370 mg) were added and the mixture was then stirred for 20 mn at r.t.. The solution was cooled to $-40\text{ }^\circ\text{C}$ and TBDMSOTf (0.2 M in CH_2Cl_2 , 50 μL , 0.03 mmol, 0.2 equiv.) was added. The reaction was stirred at this temperature overnight and quenched with a soln of NEt_3 (0.4 equiv.). After filtration through a pad of silica and evaporation, the residue was applied to the top of a flash chromatography column filled with silica gel and eluted (heptane/ AcOEt 100 to 80:20) to give the heptasaccharide **201** (281mg, 87 %).

HRMS (ESI-MS, positive mode): calcd 2369.8349 for $\text{C}_{116}\text{H}_{130}\text{N}_{12}\text{NaO}_{41}$, found 2369.8333.

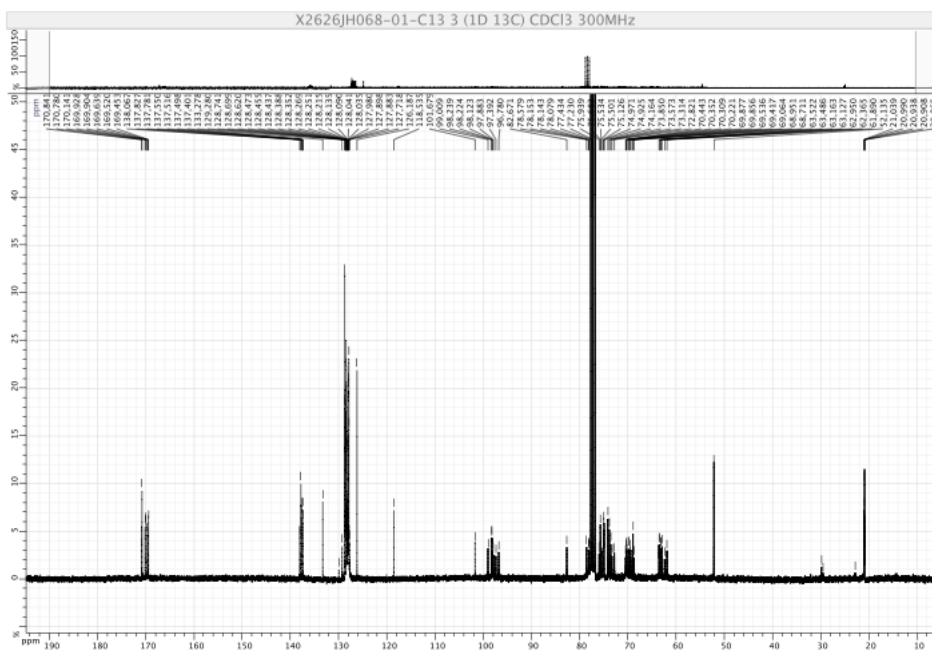
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 7.52-7.22 (m, 40H, Ph), 5.97 (dddd, $J_{b,ct}=17.0\text{ Hz}$, $J_{b,cc}=10.5\text{ Hz}$, $J_{b,a'}=6.0\text{ Hz}$, $J_{b,a}=5.0\text{ Hz}$, 1H, H-b), 5.57 (s, 1H, Hbenz), 5.38 (dq, $J_{ct,b}=17.0\text{ Hz}$, $J_{ct,a}=J_{ct,a'}=J_{gem}=1.5\text{ Hz}$, 1H, H-ct), 5.33-5.25 (m, 4H, H-1^B, H-1^D, H-1^F, dq, $J_{cc,b}=10.5\text{ Hz}$, $J_{cc,a}=J_{cc,a'}=J_{gem}=1.5\text{ Hz}$, H-cc), 5.02-4.60 (m, 26H, 16 OCH_2Ph , H-2^B, H-2^D, H-2^F, H-5^B, H-5^F, H-5^D, H-1^C, H-1^A, H-1^E, H-1^G), 4.46-4.35 (m, 3H, H-6^{aA}, H-6^{aC}, H-6^{aE}), 4.31-4.16 (m, 5H, H-6^{bA}, H-6^{bC}, H-6^{bE}, H-a, 6^{aG}), 4.08 (ddt, $J_{gem}=13.0\text{ Hz}$, $J_{a',b}=6.0\text{ Hz}$, $J_{a',cc}=J_{a',ct}=1.5\text{ Hz}$, 1H, H-a'), 4.06-3.87 (m, 16H, H-4^B, H-4^D, H-4^F, H-3^B, H-3^D, H-3^F, H-3^G, H-4^A, H-4^C, H-4^E, H-3^A, H-3^C, H-3^E, H-5^A, H-5^C, H-5^E), 3.83 (dt, $J_{4,5}=10.0\text{ Hz}$, $J_{5,6b}=10.0\text{ Hz}$, $J_{5,6a}=5.0\text{ Hz}$, 1H, H-5^C),

3.75-3.61 (m, 5H, H-6^G, H-4^G, H-5^G), 3.56 (s, 6H, 2 COOMe), 3.51 (s, 3H, COOMe), 3.36-3.26 (m, 3H, H-2^A, H-2^C, H-2^E), 3.42 (m, 1H, H-2^G), 2.14 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.12 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.10 (s, 3H, (O)CCH₃). 2.08 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.05 (s, 3H, (O)CCH₃). 2.04 (s, 3H, (O)CCH₃).

RMN ¹³C (75,8 MHz, CDCl₃): δ = 170.7 (C=O), 170.7 (C=O), 170.1 (C=O), 169.8 (C=O), 169.8 (C=O), 169.5 (C=O), 169.4 (C=O), 169.3 (C=O), 137.9, 137.6, 137.6, 137.4, 137.3, 137.3, 137.2 (8C, C_{quat arom}), 133.1 (C-b), 128.6-127.6 (40C, C_{arom}), 118.4 (C-c), 101.5 (C_{benz}), 98.8 (C-1^G), 98.0 (2C, C-1^F, C-1^E), 97.9 (C-1^B), 97.7 (C-1^D), 97.2 (C-1^C), 96.6 (C-1^A), 82.5 (C-4^G), 78.4(C-4^A), 78.0 (C-3^C), 77.9 (C-3^E), 77.8 (C-3^A), 75.7 (CH₂Ph), 75.5 (C-3^E), 75.4 (C-3^B), 75.3 (C-3^D), 74.8 (3C, C-4^C, 2 CH₂Ph), 74.8 (2C, C-4^E, CH₂Ph), 74.0 (C-3^G), 73.7 (CH₂Ph), 73.4 (CH₂Ph), 73.2 (CH₂Ph), 72.7 (3C, C-4^B, C-4^D, C-4^F), 70.3 (C-5^D), 70.2 (C-5^F), 70.1 (C-5^B), 70.0 (2C, C-5^C, C-5^E), 69.7 (C-5^A), 69.7 (C-2^F), 69.3 (C-2^D), 69.2 (C-2^B), 68.5 (2C, C-6^G, C-a), 63.3 (3C, C-5^G, C-6^A, C-5^G), 63.0 (C-2^G), 62.9 (C-2^E), 62.7 (C-2^C), 62.2 (2C, C-2^A, C-6^E), 61.7 (2C, C-6^C, C-6^A), 52.0 (2C, COOCH₃), 51.9 (COOCH₃), 20.9 (C(O)CH₃), 20.9 (C(O)CH₃), 20.8 (C(O)CH₃), 20.8 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃).



RMN ¹H (compound **201**)

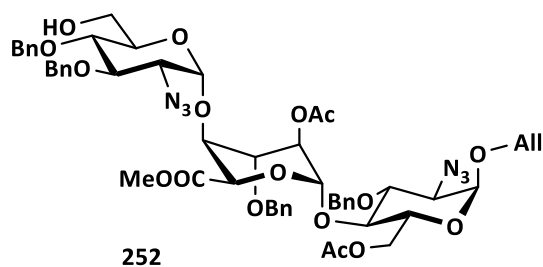


RMN ^{13}C (compound **201**)

General protocol for selective reducing opening

Et_3SiH (1.1 equiv) was added to a suspension of 4,6 benzylidene compound (1 equiv, 0.12 M) and powered molecular sieves 4 Å in dry CH_2Cl_2 at rt under atmosphere of argon. After 15 min, the mixture was cooled down at (-60 °C) and PhBCl_2 (3.4 equiv) was added. Then the reaction mixture was stirred at this temperature during 1 hr. The reaction was quenched at (-60 °C) by addition of Et_3N , MeOH and saturated aq. NaHCO_3 . The mixture was then diluted with Et_2O . The organic layer was washed with 1M aq. NaOH, 5 % KH_2PO_4 and water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The residue was then applied to the top of a flash chromatography column filled with silica gel and eluted (toluene/acetone) to give the desired compound.

Compound **252**: Allyl (2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-O-(methyl 2-O-acetyl-3-O-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-O-(6-O-acetyl-2-azido-3-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside).

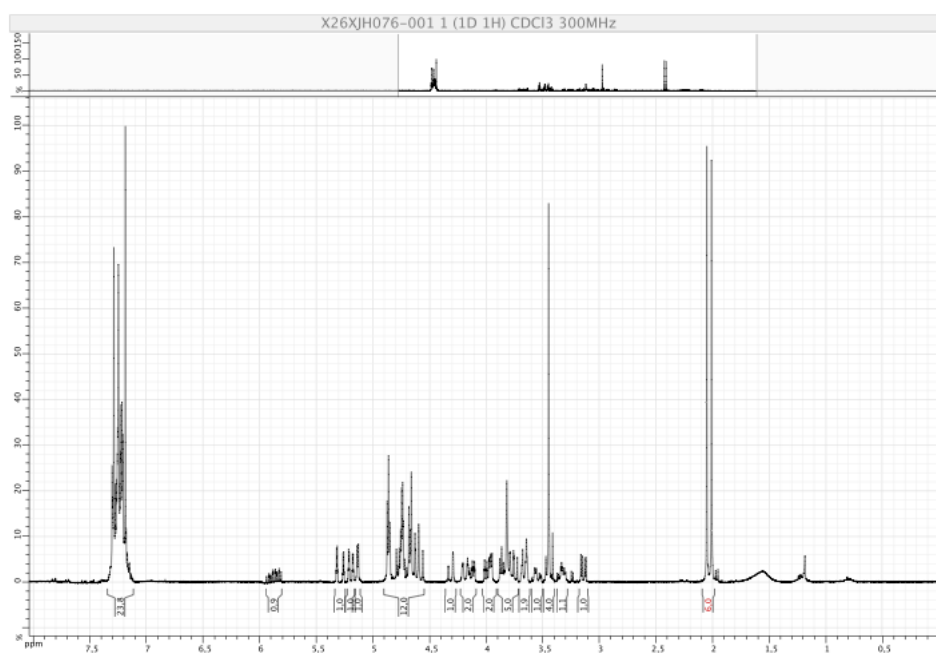


Compound was prepared from compound **199** (46 mg, 43 μ mol) according to general procedure furnishing 38 mg of a white powder, a 82 % yield after flash chromatography on silica gel (toluene/ acetone 100 to 80 :20).

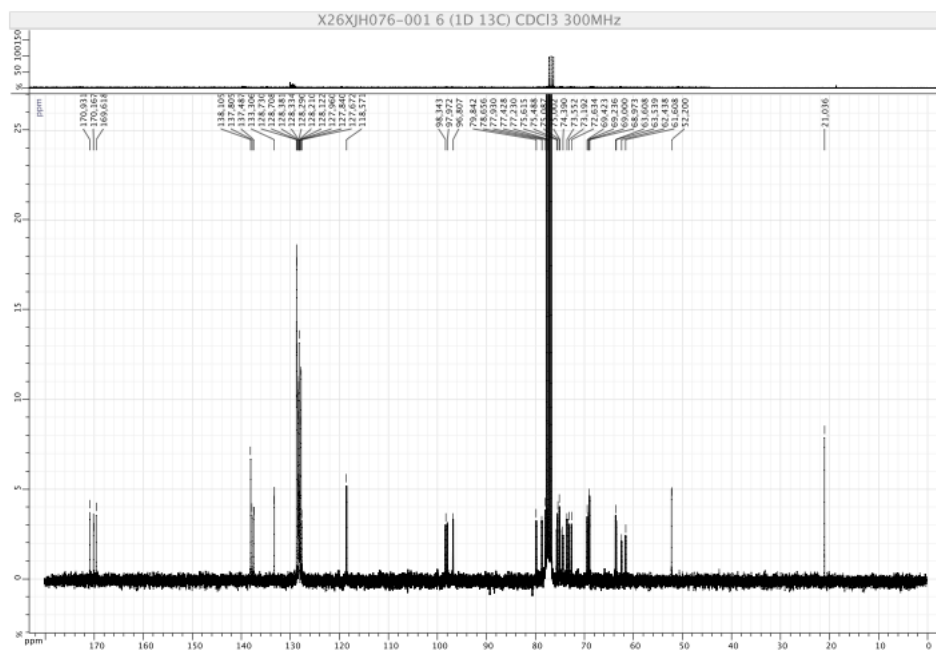
HRMS (ESI-MS, positive mode): calcd 1089.4064 for $C_{54}H_{62}N_6NaO_{17}$, found 2369.8333.

RMN 1H (360 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.39-7.20 (m, 20H, Ph), 5.94 (dddd, $J_{b,ct}$ =17.0 Hz, $J_{b,cc}$ =10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ =5.0 Hz, 1H, H-b), 5.35 (dq, $J_{ct,b}$ =17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} =1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.25 (dq, $J_{cc,b}$ =10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} =1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.19 (d, $J_{1,2}$ =3,5 Hz, 1H, H-1^B), 4.92 (3d, 3H, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, H1^A; $J_{2,1}$ =3,5 Hz H2^B, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz H1^C), 4.61-4.86 (m, 9H, 8 OCH_2Ph , $J_{5,4}$ = 5.0 Hz H5^B), 4.38 (d, J = 12 Hz, 1H, H-6^{aA}), 4.23 (d, J = 12 Hz, 1H, H-6^{bA}), 4.20 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a,b}$ = 5.0 Hz, $J_{a,cc}$ = $J_{a,ct}$ = 1.5 Hz, 1H, H-a), 4.05 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 6.0 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ = 1.5 Hz, 1H, H-a'), 4.01 (t, $J_{4,3}$ = $J_{4,5}$ = 5.0 Hz, 1H, H-4^B), 3.92 (t, $J_{3,2}$ = $J_{3,4}$ = 5.0 Hz, 1H, H-3^B), 3.88 (t, $J_{4,5}$ = 10.0 Hz, 1H, H-4^A), 3.87 (d, $J_{5,4}$ = 10.0 Hz, 1H, H-5^A), 3.85 (t, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz, 1H, H-3^A), 3.81 (t, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, $J_{3,4}$ = 9.5 Hz, 1H, H-3^C), 3.73 (dt, $J_{4,5}$ = 10.0 Hz, $J_{5,6b}$ = 10.0 Hz, $J_{5,6a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-5^C), 3.72 (t, $J_{6b,5}$ = $J_{6b,6a}$ = 10.0 Hz, 1H, H-6^{bC}), 3.61 (t, $J_{6a,5}$ = $J_{6a,6b}$ = 10.0 Hz, 1H, H-6^{aC}), 3.51 (s, 3H, COOMe), 3.50 (t, $J_{4,5}$ = 9.5 Hz, 1H, H-4^C), 3.40 (dd, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, H-2^A), 3.19 (dd, $J_{2,3}$ = 10 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, H-2^C), 2.11 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.07 (s, 3H, (O)CCH₃).

RMN ^{13}C (75,8 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.7, 170, 169.4 (C=O), 138.1, 138.1, 137.8, 137.5 (C_{quat} arom), 133.3, (C-b), 128.7, 128.7, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, (20 C_{arom}) 118.6 (C-c), 98.4 (C-1^B), 98.00 (C-1^C), 96.8 (C-1^A), 79.9 (C-3^C), 78.7 (C-3^A), 78.0 (C-4^C), 75.6 (C-4^A), 75.5 (CH_2Ph), 75.1 (CH_2Ph), 75.0 (CH_2Ph), 74.4 (C-3^B), 73.6 (CH_2Ph), 73.2 (C-4^B), 72.75 (C-5^C), 69.4 (C-5^A), 69.3 (C-5^B), 69.0 (Ca), 69.0. (C-2^B), 63.6 (C-2^C), 63.6 (C-2^A), 62.5 (C-6^A), 61.6 (C-6^C), 52.2 (COOCH₃), 21.1 (2C, C(O)CH₃).



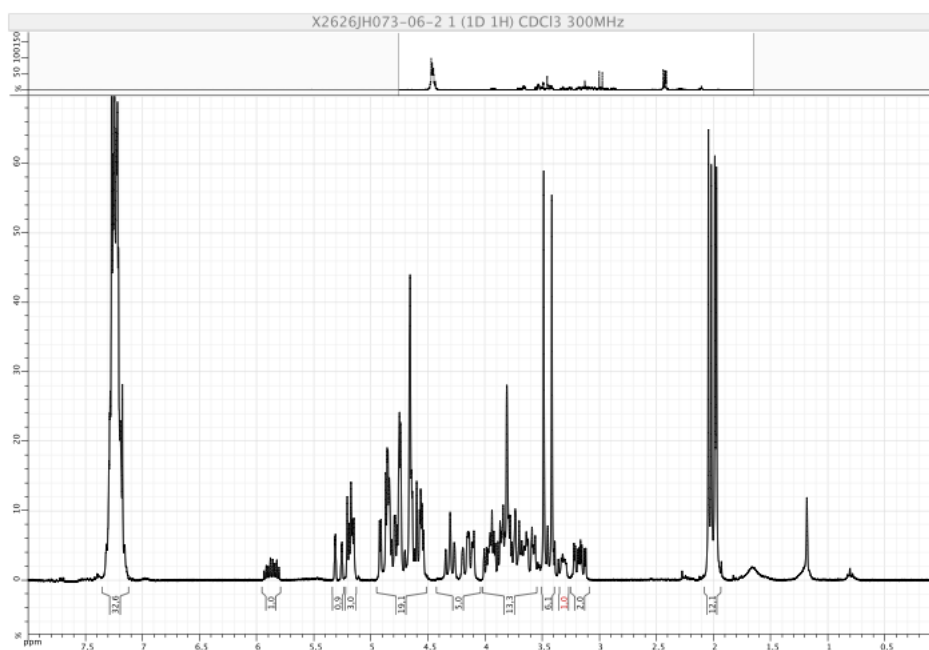
RMN ^1H (compound 252)



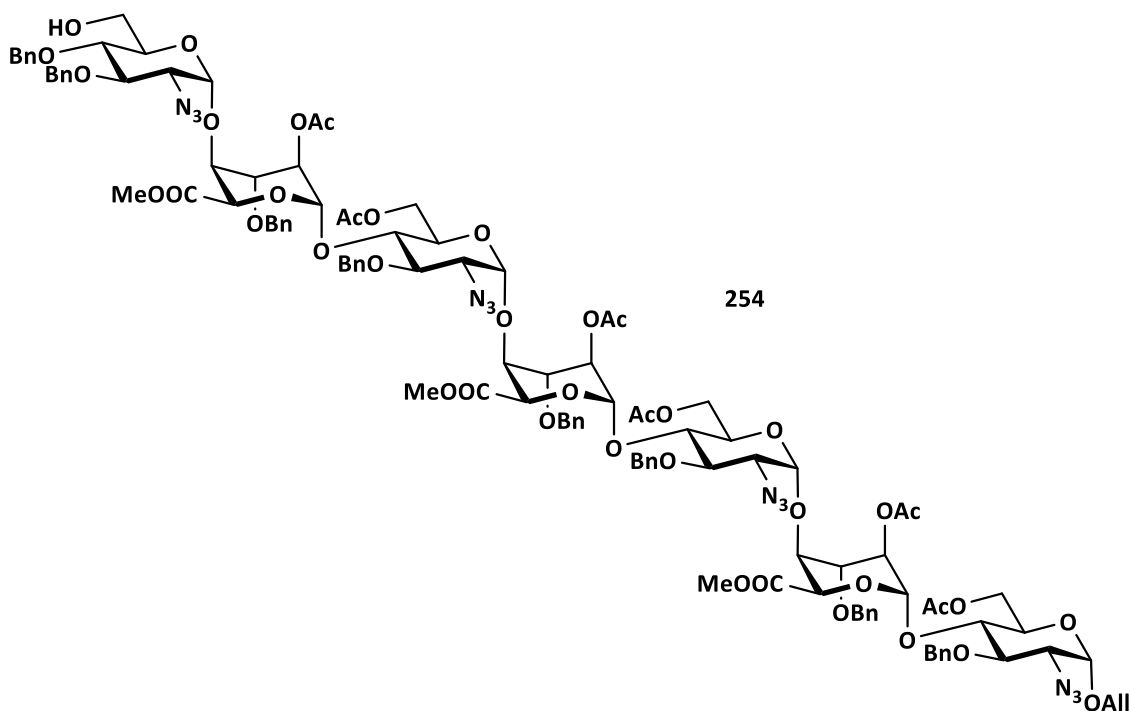
RMN ^{13}C (compound 252)

10 Hz, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, 1H H-2^C), 2.11 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.08 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.05 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.04 (s, 3H, (O)CCH₃).

RMN ¹³C (75,8 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.9$ (C=O), 170.8 (C=O), 170.2 (C=O), 169.9 (C=O), 169.7 (C=O), 169.5 (C=O), 138.0, 137.8, 137.7, 137.5, 137.4, (6C, C_{quat} arom), 133.2 (C-b), 128.7, 128.7, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7, (30 C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.2, (2C, C-1^D, C-1^B), 98.2 (C-1^E), 97.4 (C-1^C), 96.7 (C-1^A), 79.5 (C-3^C), 78.6 (C-4^A), 78.1 (C-3^A), 77.8 (C-4^E), 75.8 (2c, C-3^D, C-3^B), 75.5 (CH₂Ph), 75.4 (C-4^C), 75.1 (CH₂Ph), 74.9 (CH₂Ph), 74.1 (C-3^E), 73.7 (CH₂Ph), 73.5 (CH₂Ph), 73.3 (C-4^D), 72.8 (C-4^B), 72.6 (C-5^E), 70.1 (2C, C-2^B, C-5^A), 70.0 (C-5^D), 69.4 (2C, C-5^B, C-5^C), 68.9 (2C, C-a, C-2^D), 63.5, (C-2^C), 63.4, (C-2^E), 63.1, (C-2^A), 62.4, (C-6^E), 62.9, (C-6^A), 61.5, (C-6^C), 52.2 (COOCH₃), 52.1 (COOCH₃), 21.1 (C(O)CH₃), 21.0 (C(O)CH₃), 20.9 (C(O)CH₃), 20.9 (C(O)CH₃).



RMN ¹H (compound **253**)



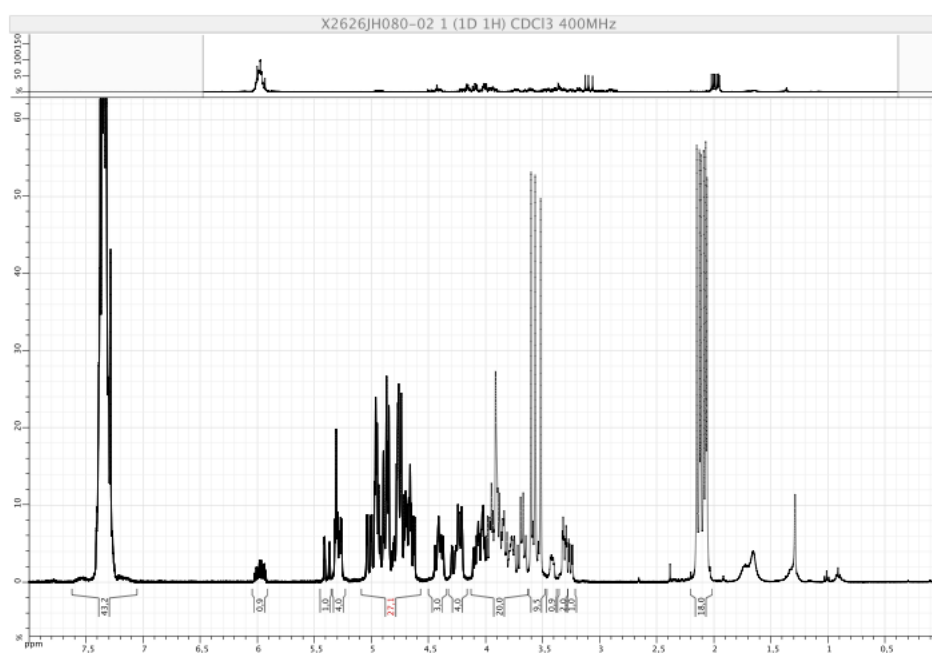
Compound was prepared from compound **201** (100 mg, 43 μ mol) according to general procedure furnishing 86 mg of a white powder, a 86 % yield after flash chromatography on silica gel (toluene/ acetone 100 to 70 :30).

HRMS (ESI, positive mode): calcd 2371.8505 for $C_{116}H_{132}N_{12}NaO_{41}$, found 2371.8495.

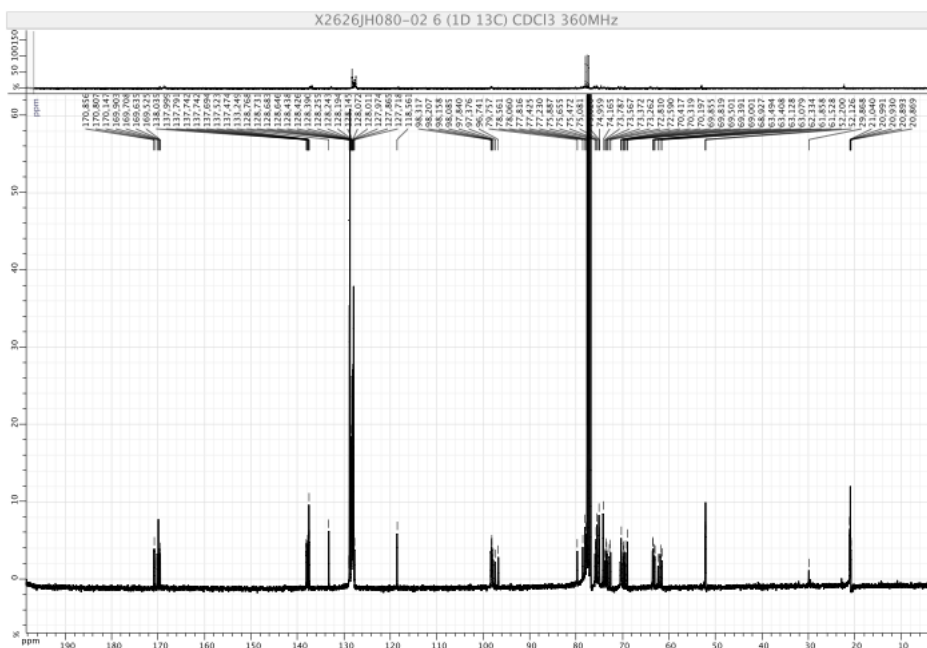
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41-7.18 (m, 40H, Ph), 5.93 (dddd, $J_{b,ct}=17.0$ Hz, $J_{b,cc}=10.5$ Hz, $J_{b,a'}=6.0$ Hz, $J_{b,a}=5.0$ Hz, 1H, H-b), 5.34 (dq, $J_{ct,b}=17.0$ Hz, $J_{ct,a}=J_{ct,a'}=J_{gem}=1.5$ Hz, 1H, H-ct), 5.29-5.20 (m, 4H, H-1^B, H-1^D, H-1^F, dq, $J_{cc,b}=10.5$ Hz, $J_{cc,a}=J_{cc,a'}=J_{gem}=1.5$ Hz, H-cc), 4.99 (d, 1H, H-1^C), 4.96 (d, 1H, H-1^G), 4.94-4.56 (m, 24H, 16 OCH_2Ph , H-2^B, H-2^D, H-2^F, H-5^B, H-5^D, H-5^F, H-1^A, H-1^E), 4.42-4.31 (m, 3H, H-6^{aA}, H-6^{aC}, H-6^{aE}), 4.28-4.13 (m, 4H, H-6^{bA}, H-6^{bC}, H-6^{bE}, H-a), 4.09-3.58 (m, 20H, H-6^{aG}, H-6^{bG}, H-4^B, H-4^D, H-4^F, H-3^B, H-3^D, H-3^F, H-3^G, H-4^A, H-4^C, H-4^E, H-3^A, H-3^C, H-3^E, H-5^A, H-5^C, H-5^E, H-3^G, H-5^G), 3.57-3.45 (3s, m, 10H, 3 COOMe, H-4^G), 3.37 (m, 1H, H-2^G), 3.31-3.17 (m, 3H, H-2^A, H-2^C, H-2^E), 2.11 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.08 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.07 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.04 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.03 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.02 (s, 3H, (O)CCH₃).

RMN ^{13}C (75,8 MHz, $CDCl_3$): δ =170.7 (C=O), 170.7 (C=O), 170.6 (C=O), 170.0 (C=O), 169.8 (C=O), 169.6 (C=O), 169.5 (C=O), 169.4 (C=O), 137.9 (C_{quat} arom), 137.6 (C_{quat} arom), 137.6 (8C, C_{quat} arom), 137.5 (C_{quat} arom), 137.4 (C_{quat} arom), 137.3 (C_{quat} arom), 133.1 (C-b), 128.7-128.5 (40C, C_{arom}), 118.4 (C-c), 98.3 (C-1^B), 98.2 (C-1^C), 98.2 (C-1^D), 98.1 (C-1^G), 97.9 (C-1^E), 97.4 (C-

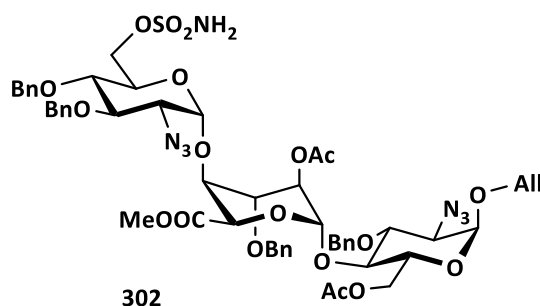
1^A), 96.8 (C-1^F), 79.6 (C-3^C), 77.9 (C-3^G), 77.8 (C-4^A), 77.5 (C-3^A), 75.7 (C-3^E), 75.5 (2C, CH₂Ph, C-3^B), 75.3 (C-3^F), 75.1 (2C, CH₂Ph, C-3^D), 74.9 (CH₂Ph), 74.8 (CH₂Ph), 74.2 (3C, 3 CH₂Ph), 73.6 (C-4^G), 73.4 (CH₂Ph), 73.2 (C-4^E), 73.1 (C-4^C), 72.8 (2C, C-4^D, C-4^F), 72.6 (2C, C-4^B, C-5^G), 70.4 (C-5^B), 70.2 (C-5^D), 70.0 (C-5^A), 69.9 (C-5^E), 69.8 (C-2^B), 69.5 (C-2^F), 69.4 (C-5^F), 69.0 (C-5^C), 68.9 (2C, C-a, C-2^D), 63.5 (C-2^A), 63.5 (C-2^G), 63.2 (C-2^E), 63.1 (C-2^C), 62.3 (2C, C-6^A, C-6^G), 61.9 (C-6^C), 61.6 (C-6^E), 52.0 (COOCH₃), 52.0 (COOCH₃), 20.9 (C(O)CH₃), 20.8 (C(O)CH₃), 20.8 (2C, 2 C(O)CH₃), 20.8 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃).



RMN ¹H (compound **254**)



Compound 302 : Allyl (2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-O-(methyl 2-O-acetyl-3-O-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-O-(6-O-acetyl-2-azido-3-O-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside).

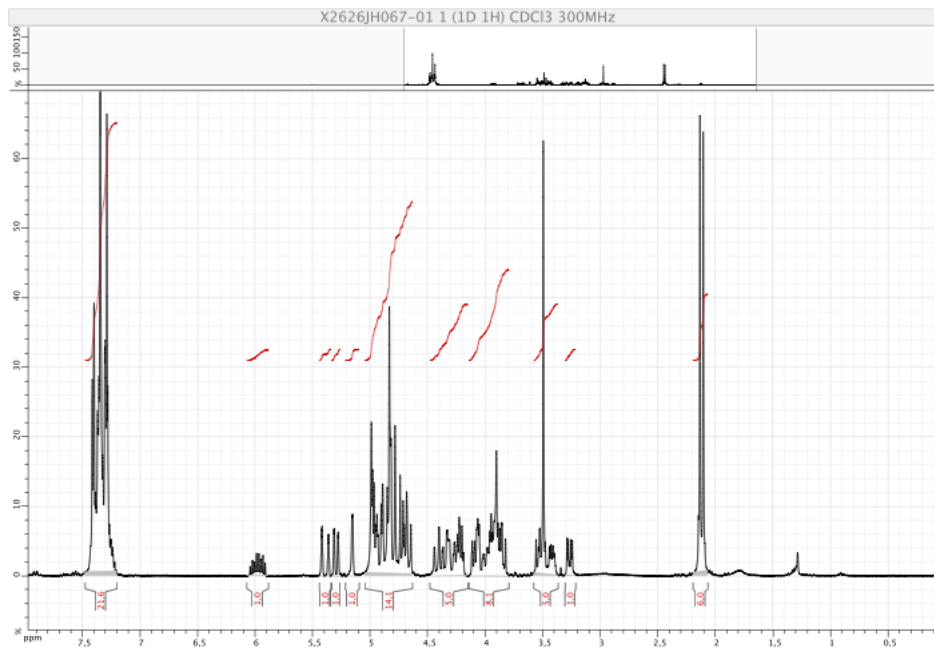


Sulfamoylated trisaccharide was prepared from compound **252** (100 mg, 94 μ mol) according to general procedure furnishing 105 mg of a white powder, a 97 % yield after flash chromatography on silica gel (toluene/ AcOEt 90 :10 to 65 :35).

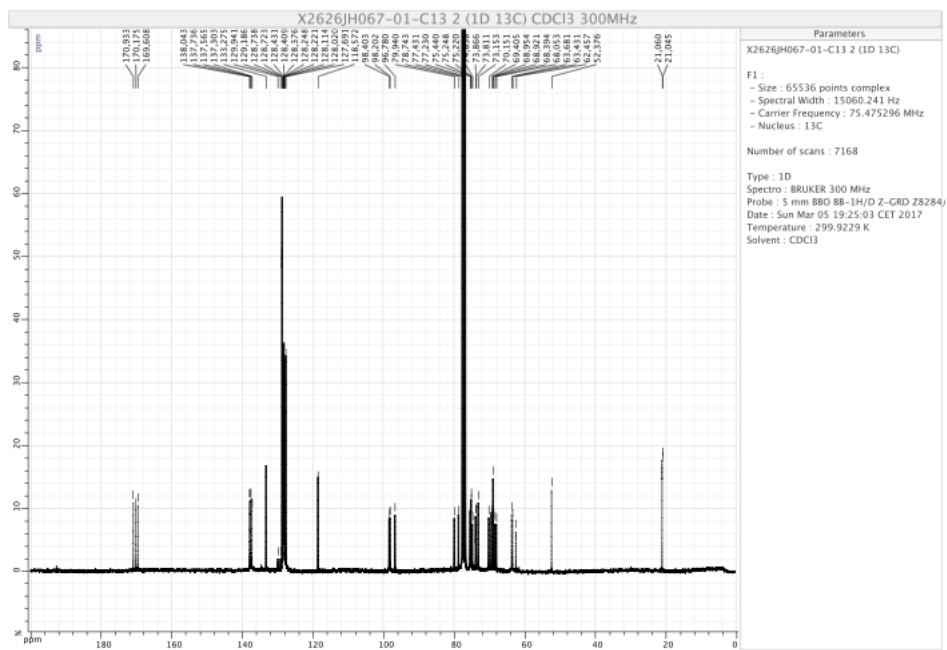
HRMS (ESI, positive mode): calcd 1168.3792 for $C_{54}H_{63}N_7NaO_{19}S$, found 1168.3780.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ =7.47-7.22 (m, 20H, Ph), 5.95 (dddd, $J_{b,ct}$ =17.0 Hz, $J_{b,cc}$ =10.5 Hz, $J_{b,a'}$ = 6.0 Hz, $J_{b,a}$ =5.0 Hz, 1H, H-b), 5.39 (dq, $J_{ct,b}$ =17.0 Hz, $J_{ct,a}$ = $J_{ct,a'}$ = J_{gem} =1.5 Hz, 1H, H-ct), 5.30 (dq, $J_{cc,b}$ =10.5 Hz, $J_{cc,a}$ = $J_{cc,a'}$ = J_{gem} =1.5 Hz, 1H, H-cc), 5.15 (d, $J_{1,2}$ =3,5 Hz, 1H, H-1^B), 4.97-4.88 (m, 5H, H1^A; H2^B; H1^C; 2 OCH_2Ph), 4.61-4.86 (m, 7H, 6 OCH_2Ph , $J_{5,4}$ = 5.0 Hz H5^B), 4.42 (d, J = 12 Hz, 1H, H-6^A), 4.38-4.17 (4H, H-6^B, H-6^C, H-a), 4.10 (ddt, J_{gem} = 13.0 Hz, $J_{a',b}$ = 6.0 Hz, $J_{a',cc}$ = $J_{a',ct}$ = 1.5 Hz, 1H, H-a'), 4.05 (t, $J_{4,3}$ = $J_{4,5}$ = 5.0 Hz, 1H, H-4^B), 4.00 (dt, $J_{4,5}$ = 10.0 Hz, $J_{5,6b}$ = 10.0 Hz, $J_{5,6a}$ = 5.0 Hz, 1H, H-5^C), 3.97-3.80 (m, 5H, H-3^B, H-3^A, H-3^C, H-4^A, H-5^A), 3.52 (t, $J_{4,5}$ = 9.5 Hz, 1H, H-4^C), 3.49 (s, 3H, COOMe), 3.42 (dd, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, H-2^A), 3.26 (dd, $J_{2,3}$ = 10 Hz, $J_{2,1}$ = 3.5 Hz, 1H, H-2^C), 2.13 (s, 3H, (O)CCH₃). 2.11 (s, 3H, (O)CCH₃).

RMN ^{13}C (75,8 MHz, $CDCl_3$): δ =170.9, 170.2, 169.6 (C=O), 138.0, 137.7, 137.6, 137.3, 133.3, 128.8, 128.8, 128.7, 128.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.7 (20 C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.4 (C-1^B), 98.2 (C-1^C), 96.8 (C-1^A), 79.9 (C-3^C), 78.7 (C-3^A), 77.6 (C-4^C), 75.4 (CH_2Ph), 75.3 (CH_2Ph), 75.2 (C-4^A), 74.9 (CH_2Ph), 73.9 (C-3^B), 73.8 (C-4^B), 73.2 (CH_2Ph), 70.2 (C-5^C), 69.4 (C-5^A), 69.0 (Ca), 68.9 (C-6^C), 68.4 (C-5^B), 68.1 (C-2^B), 63.7 (C-2^A), 63.4 (C-2^C), 62.5 (C-6^A), 52.4 (COOCH₃), 1.1(C(O)CH₃), 21.0(C(O)CH₃).

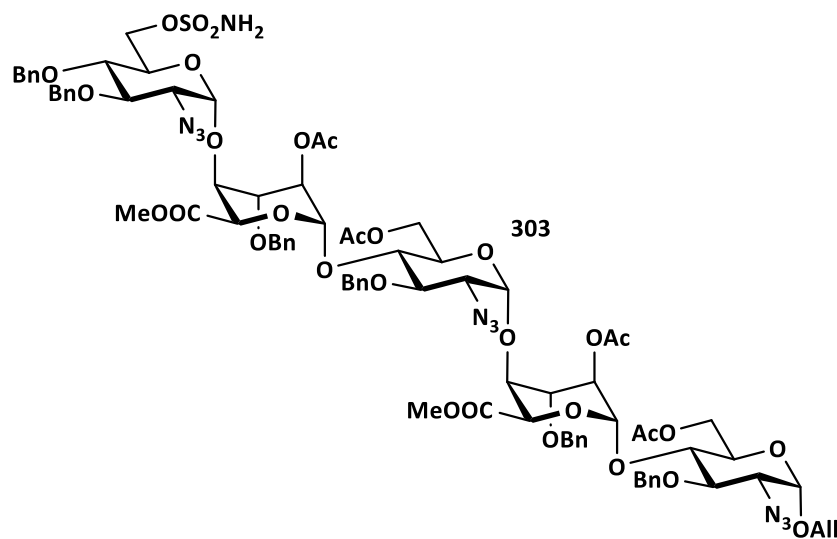


RMN ^1H (compound **302**)



RMN ^{13}C (compound **302**)

Compound pentasaccharide 303: Allyl (2-azido-3,-di-*O*-benzyl-2-deoxy-6-sulfamoyl- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-(6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside)-(1-4)-*O*-(methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl- β -L-ido pyranosyl uronate)-(1-4)-*O*-6-*O*-acetyl-2-azido-3-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranoside.

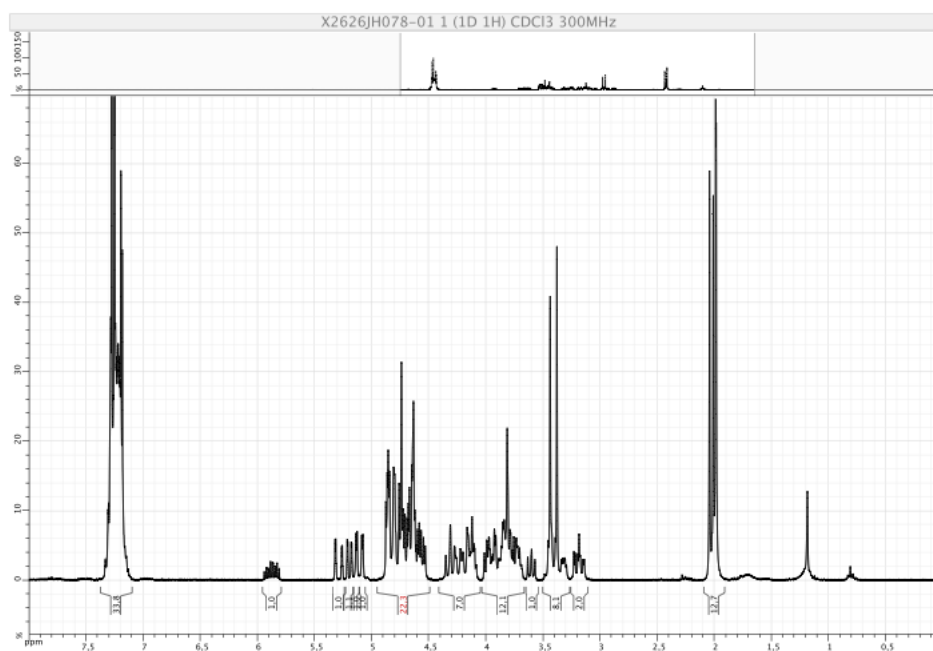


Compound was prepared from compound **253** (205 mg, 120 μ mol) according to general procedure furnishing 176 mg of a white powder, a 82 % yield after flash chromatography on silica gel (toluene/ AcOEt 90 :10 to 65 :35).

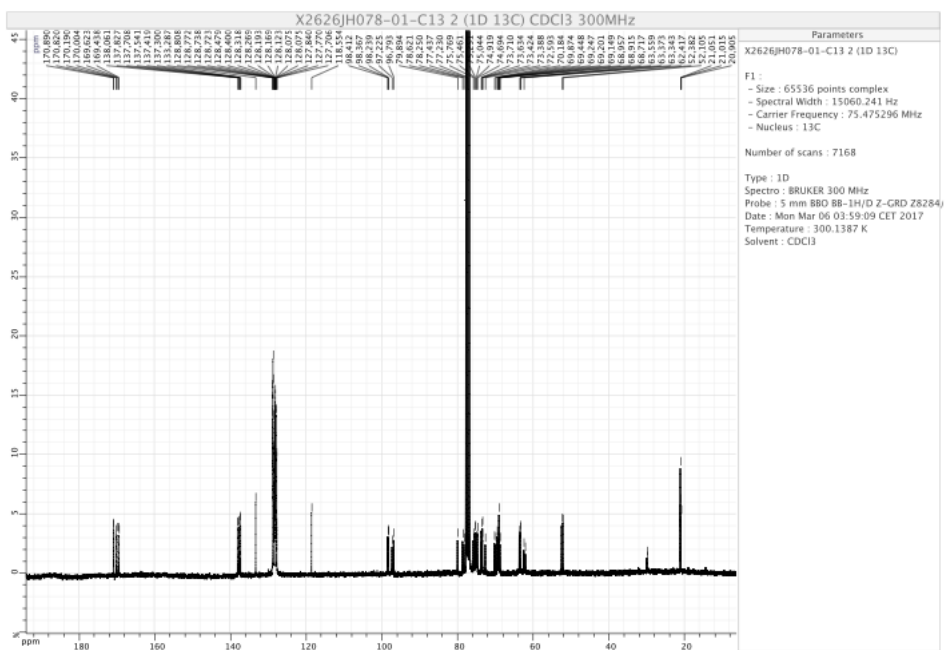
HRMS (ESI, positive mode): calcd 1809.6012 for $C_{85}H_{98}N_{10}NaO_{31}S$, found 1809.6117.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41-7.17 (m, 30H, Ph), 5.93 (dddd, $J_{b,ct}=17.0$ Hz, $J_{b,cc}=10.5$ Hz, $J_{b,a'}=6.0$ Hz, $J_{b,a}=5.0$ Hz, 1H, H-b), 5.36 (dq, $J_{ct,b}=17.0$ Hz, $J_{ct,a}=J_{ct,a'}=J_{gem}=1.5$ Hz, 1H, H-ct), 5.26 (dq, $J_{cc,b}=10.5$ Hz, $J_{cc,a}=J_{cc,a'}=J_{gem}=1.5$ Hz, 1H, H-cc), 5.19 (d, $J=3$ Hz, 1H, H-1^D), 5.14 (d, $J=3$ Hz, 1H, H-1^B), 4.95-4.89 (m, 4H, H-1^A, H-1^C, H-1^E, H-2^D), 4.88-4.57 (m, 17H, H-2^B, H-5^B, H-5^D, 12 OCH_2Ph), 4.42-4.13 (m, 7H, 6^a^A, H-6^a^C, H-6^b^C, H-6^b^A, H-6^a^E, H-6^b^E, H-a), 4.08-3.72 (m, 12H, H-3^B, H-3^D, H-3^A, H-3^E, H-5^A, H-5^C, H-5^E, H-4^A, H-4^C, H-4^E, H-4^B, H-4^D), 3.66 (dd, $J_{2,3}=9.0$ Hz, $J_{4,3}=9.5$ Hz, 1H, H-3^C), 3.53-3.41 (m, 2s, 7H, 2 COOMe, H-4^E), 3.40-3.34 (m, 1H, H-2^E), 3.30-3.18 (m, 2H, H-2^A, H-2^C), 2.10 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.07 (s, 3H, (O)CCH₃), 2.04 (s, 3H, (O)CCH₃).

RMN ^{13}C (75,8 MHz, CDCl_3): δ = 170.9, 170.8, 170.2, 170.0, 169.6, 169.5 (C=O), 138.0, 137.8, 137.7, 137.6, 137.4, 137.3 ($\text{C}_{\text{quat arom}}$), 133.0, (C-b), 128.8, 128.8, 128.8 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, (30 C_{arom}), 118.6 (C-c), 98.4 (C-1^B), 98.3 (C-1^E), 98.3 (C-1^D), 97.2 (C-1^C), 96.8 (C-1^A), 79.9 (C-3^C), 78.7 (C-4^A), 78.2 (C-3^A), 77.5 (C4^E), 75.8 (CH_2Ph), 75.5 (C-3^B), 75,3 (C-3^D), 75.1 (CH_2Ph), 74.9 (CH_2Ph), 74.7 (CH_2Ph), 74.7 (C-5^C), 73.7 (CH_2Ph), 73.4 (CH_2Ph), 73.4 (C-4^D), 72.60 (C-4^B), 69.9 (C-3^E), 69.5 (C-4^C), 69.4 (C-5^A), 69.3 (C-2^D), 69.3 (C-5^E), 69.2 (C-5^B), 69.2 (C-5^D), 69.0 (C-6^E), 69.0 (Ca), 68.9. (C-2^B), 63.6 (C-2^E), 63.4 (C-2^A), 63.4 (C-2^C), 62.4 (C-6^A), 62.0 (C-6^C), 52.4 (COOCH_3), 52.1 (COOCH_3), 21.1, 21.0, 20.9 (4C, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).



RMN ^1H (compound **303**)



RMN ^{13}C (compound **303**)

Titre : Synthèse d'inhibiteurs sélectifs des endosulfatases humaines H-Sulf 1 et 2

Mots clés : Synthèse totale, Héparane sulfate, glycosylation, stéréosélectivité, sulfatase, inhibiteurs.

Résumé : Les endosulfatases (H-Sulf 1 et 2) catalysent l'hydrolyse des sulfates en position 6 des résidus glucosamine des chaînes d'héparane sulfate. Elles modulent ainsi l'activité des héparanes sulfate vis à vis de nombreuses protéines.

Plusieurs études ont montré que l'endosulfatase H-Sulf 2 est produite en quantité plus importante dans de nombreux cancers (poumons, sein, pancréas etc ...). La réduction de l'activité de cette enzyme chez des souris malades permet la diminution de la tumeur ainsi que le prolongement de la durée de vie.

Ce travail de thèse vise à synthétiser une série d'inhibiteurs spécifiques des endosulfatases humaines.

Une étude préliminaire a été menée sur un monosaccharide portant une fonction sulfamate, cette fonction étant connue pour inhiber les sulfatases. Ce projet de thèse repose sur la synthèse d'oligosaccharide de type héparane sulfate de tailles différentes portant tous cette fonction inhibitrice. Pour ce faire il a fallu mettre au point une stratégie itérative incluant des réactions de glycosylations stéréosélectives. Puis l'ouverture régiosélective d'acétal de benzylidène ainsi que la sulfamoylation ont été examinées l'optimisation des fonctionnalisations et des déprotections sont encore en cours afin de compléter cette librairie de molécules inhibitrice des endosulfatases humaines.

Title : Synthesis of selective inhibitors of human endosulfatase 1 and 2

Keywords : Total synthesis, Heparan Sulfate, glycosylation, stereoselectivity, sulfatase, inhibitors.

Abstract : Human endosulfatase (H-Sulf 1 and 2) catalyse heparan 6-O-sulfate hydrolysis. Thanks to this hydrolysis they change the heparan sulfate proteoglycan activity.

Many studies have shown that H-Sulf 2 are surexpressed in many cancer (lung, breast, pancreas etc...) The decrease of the activity of this enzyme in the case of the mouse allow a decrease of the size of the tumor and a extension of the mouse life.

The aim of this thesis is to synthetise a library of endosulfatase specific inhibitors.

A preliminary study was made on a monosaccharide carrying a sulfamate. This functional group have shown that it is able to inhibit the sulfatases. This project thesis is to synthetise heparan sulfate oligosaccharides carrying this sulfamate moiety. We apply an iterative process to make this oligosaccharide, thanks to a high stereoselective glycosylation. Finally a reductive opening of benzylidène acetals, a sulfamoylation have been examined, functionalization and deprotection are still in progress for get the full library.