



HAL
open science

Synthèses supportées d'oligosaccharides utilisant les donneurs thioglycosides

Laurent Cattiaux

► **To cite this version:**

Laurent Cattiaux. Synthèses supportées d'oligosaccharides utilisant les donneurs thioglycosides. Chimie organique. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSLE089 . tel-04192905

HAL Id: tel-04192905

<https://theses.hal.science/tel-04192905v1>

Submitted on 31 Aug 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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Ecole Normale Supérieure de Paris

**Synthèses supportées d'oligosaccharides utilisant les
donneurs thioglycosides.**

Soutenue par
Laurent CATTIAUX
Le 07 décembre 2021

Ecole doctorale n° 406
**Chimie moléculaire de
Paris Centre**

Spécialités
**Synthèse organique
Synthèse et manipulation de
biomolécules**

Composition du jury :

Philippe KAROYAN Professeur, Sorbonne-Université	<i>Président</i>
Joanne XIE Professeur, ENS Paris-Saclay	<i>Rapporteur</i>
Laurence MULARD Directeur de recherche, Institut Pasteur	<i>Rapporteur</i>
Clotilde FERROUD Professeur, CNAM	<i>Examineur</i>
Jean-Maurice MALLET Directeur de recherche, ENS Paris	<i>Directeur de thèse</i>

SOMMAIRE

1	Liste des abréviations.....	5
2	Remerciements	7
3	Introduction.	9
4	Monosaccharide et oligosaccharide : structure, configuration et conformation.	13
4.1	<i>Structure linéaire : modèle de Fisher.....</i>	13
4.2	<i>Stéréoisomérisation-chiralité.</i>	13
4.3	<i>Structure cyclique : réaction d'hémi-acétalisation.</i>	14
4.4	<i>Effet anomère et mutarotation.</i>	15
4.5	<i>Structures de quelques monosaccharides naturels et oligosaccharides.</i>	16
5	Aspects généraux de la synthèse d'oligosaccharides.	19
5.1	<i>Formation de la liaison glycosidique sans participation de la position 2.</i>	20
5.2	<i>Formation de la liaison glycosidique avec participation de la position 2.</i>	21
5.3	<i>Réactivité des donneurs et accepteurs de glycosyle: importance des groupements protecteurs, concept "armés"/"désarmés".</i>	21
6	Les donneurs de glycosyles fréquemment utilisés.	22
6.1	<i>Les donneurs de trichloroacetimidate.....</i>	24
6.2	<i>Les donneurs de thioglycoside.</i>	25
7	Les différents supports utilisés dans la synthèse d'oligosaccharides.....	37
7.1	<i>Le support solide.</i>	37
7.2	<i>Le support soluble.</i>	47
7.3	<i>Bilan sur la synthèse supportée d'oligosaccharides.....</i>	70
8	Objectif: synthèses supportées d'oligosaccharides utilisant des donneurs thioglycoside.	72
8.1	<i>Structures / cibles envisagées : les $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et les $\alpha(1\rightarrow6)$ mannanes.</i>	72
8.2	<i>Etudes préliminaires réalisées avant la synthèse supportée.....</i>	74
8.3	<i>Synthèse et utilisation du p-alkoxy-thiophénol pour la construction supportée d'oligosaccharide.....</i>	92
8.4	<i>Stratégie de synthèse pour l'élaboration des $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et $\alpha(1\rightarrow6)$ mannanes.....</i>	95
8.5	<i>Etudes préliminaires de conditions réactionnelles.....</i>	109
8.6	<i>Etude des conditions réactionnelles de déprotection du groupement Fmoc</i>	110
8.7	<i>Etude des conditions de fonctionnalisation.....</i>	114
8.8	<i>Bilan.....</i>	119
8.9	<i>Synthèse de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes sur support solide.</i>	121
8.10	<i>Synthèse de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes sur support soluble.....</i>	126
8.11	<i>Comparaison des deux approches de synthèse de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes.....</i>	135
8.12	<i>Fonctionnalisation du $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide.</i>	138

9	Conclusions et perspectives	140
10	Experimental.....	146
10.1	<i>General procedure and numbering for assigning NMR spectra</i>	<i>146</i>
10.2	<i>Experimental section.</i>	<i>146</i>
11	Bibliographie	189

1 Liste des abréviations.

+I / -I : effet inductif donneur / effet inductif attracteur

+M / -M : effet mésomère donneur / effet mésomère attracteur

9-BBN : 9-Borabicyclo(3.3.1)nonane

Ac : acétyle

Ac₂O : anhydride acétique

AcOH : acide acétique

Alk : alkyle

APTS : acide paratoluènesulfonique

BF₃ Et₂O : diéthérate de trifluorure de bore

BH₃ THF : complexe borane-tétrahydrofurane

Bn : benzyle

Bz : benzoyle

BzCl / BzOMe : chlorure de benzoyle / benzoate de méthyle

CH₃CN : acétonitrile

DBF : dibenzofulvène

DCM : dichlorométhane

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

DMTST : dimethyl(thiomethyl)sulfonium triflate

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

Equiv. : équivalent

Et : éthyle

Fmoc / FmocCl : Fluorénylméthoxycarbonyle / chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle

FSPE : Extraction en Phase Solide Fluorée

H₂O : eau

HASP : Hydrophobically Assisted Switching Phase

HCl : acide chlorhydrique

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse à Haute Résolution)

HSMBp : 2-methyl-5-tert-butylphenylthiol

IL : Liquide Ionique

K₂CO₃ : carbonate de potassium

Lev : levunoyle

MALDI : Matrix Assisted by Laser Desorption and Ionisation

Me : Méthyle
MeOH : méthanol
MsCl : chlorure de méthanesulfonyle
Mw : Molecular weight (masse moléculaire)
NaH : hydrure de sodium
NaHCO₃ : hydrogénocarbonate de sodium
NaOH : hydroxyde de sodium
NaOMe : méthanolate de sodium
NBS / NIS : N-bromosuccinimide / N-iodosuccinimide
OGP / OGP' : groupements protecteurs permanents / temporaires
PEG : polyéthylène glycol
Ph : phényle
pHEMA : poly(2-hydroxyéthylmethacrylate)
Pht : phtalimide
PTFE : polytétrafluoroéthylène
Pyr : pyridine
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SEC : Size Exclusion Chromatography (Chromatographie d'exclusion stérique)
Série D / L : série Dextrogyre / Lévoogyre
SN1 / SN2 / SNAr: substitution nucléophile d'ordre 1 / d'ordre 2 / Aromatique
SOCl₂ : chlorure de thionyle
TBAI / TBAF : iodure de tétra-n-butylammonium / fluorure de tétra-n-butylammonium
TBDPS : tert-butylidiphénylsilyle
*t*Bu : *tert*-Butyle
Tf₂O : anhydride triflique
TFA : acide trifluoroacétique
TfOAg : triflate d'argent
TfOH : acide triflique
TfOMe : triflate de méthyle
THF : tétrahydrofurane
THP : éther de tétrahydropyranyle
TMSOTf : trifluorométhylsulfonate de triméthylsilyle
UV : Ultra Violet
 α (alpha) / β (bêta) : anomère alpha / anomère bêta
 ϵ : coefficient d'extinction molaire exprimé en M⁻¹. cm⁻¹
 λ (lambda) : longueur d'onde exprimée en nanomètre (nm)

2 Remerciements

Le Laboratoire des BioMolécules (LBM-UMR 7203) est une Unité Mixte de Recherche, contractualisée avec l'Ecole Normale Supérieure de Paris, le CNRS et les universités PSL (Paris Sciences et Lettres) et SU (Sorbonne-Université). Ce laboratoire se concentre essentiellement sur la chimie et la biologie des molécules naturelles (oligosaccharides, peptides et complexes de métaux) ainsi que sur le développement de nouveaux outils (sondes fluorescentes) facilitant leur détection dans les milieux biologiques.

Ce mémoire de thèse est l'accomplissement d'une aventure commencée depuis mon entrée au CNRS dans cette unité dans le groupe de glycochimie de Jean-Maurice MALLET. Jean-Maurice a été mon supérieur hiérarchique puis mon directeur de thèse et cette concrétisation délivrant le doctorat n'aurait sans doute pas pu être possible sans lui. Je suis arrivé dans son équipe diplômé d'un bac+2, puis j'ai validé le diplôme d'ingénieur CNAM et bientôt le doctorat. C'est pourquoi Jean-Maurice, mes remerciements te sont adressés plus particulièrement et ce, pour m'avoir fait confiance et encouragé tout au long de ces années. Les nombreuses discussions que nous avons eues toujours dans la bonne humeur sont aussi des facteurs qui ont permis de me sentir très à l'aise et donné l'envie de m'investir dans la thèse et au Laboratoire. Tes remarquables connaissances en glycochimie m'ont également permis de maîtriser la synthèse des oligosaccharides et d'aborder les diverses méthodologies pour leur préparation.

Après ces seize ans passés au LBM dans la chimie des sucres, je me suis tourné à présent vers la chimie des macrocycles polyazotés utilisés pour le ciblage d'ADN endommagé, thématique réalisée au sein de l'Institut Curie d'Orsay. C'est pourquoi je remercie également le Dr. Florence MAHUTEAU-BETZER, le Dr. Marie-Paule TEULADE-FICHOU et le Dr. Anton GRANZHAN de m'avoir accueilli au sein de l'unité CMBC (UMR 9187 : Chimie et Modélisation pour la Biologie du Cancer). Je les remercie également de m'avoir permis de finaliser le manuscrit et de préparer la soutenance de thèse dans les locaux de l'Institut.

Je tiens également à remercier tout le personnel permanent et non permanent cotoyé pendant ces seize années au LBM. Vous venez pour la plupart d'horizons divers et vous m'avez permis de m'évader et de découvrir vos origines. J'ai pu découvrir la Chine, la Grèce, l'Inde, le Portugal, le Liban en passant par des villes françaises comme Saint-Menoud, Pithiviers, Ajaccio, Versailles, Ivry, Jouy-en-Josas ou encore Fontenay-aux-Roses. Agathe, Blaise, Christina, Clotilde, David, Dominique, Eliane, Elie, Gabrielle, Géraldine, Guillaume D., Guillaume P., Hélène, Joao, Jules, Laëtizia Z., Laurence, Lucas, Luis, Marie, Marilyne, Maxime, Mayeul, Nicolas, Olivier B., Olivier L., Pascal, Philippa, Philippe,

Rodrigue, Roxanne, Sandrine, Solange, Stéphane, Sylvestre, Thomas, Victor, Yvon, ... Merci pour votre disponibilité, votre aide et votre gentillesse. Je n'oublierai pas non plus toutes ces sorties à vos côtés dans les bars, dans les "restaurants japonais à volonté" du quartier de la Contrescarpe , sur les toits ou encore dans le jardin de l'ENS.

Merci à vous tous, je ne vous oublierai pas.

Enfin, je tenais à saluer ma famille installée dans la ruralité heureuse du Nord de la France. Je les remercie de m'avoir laissé me ressourcer, de ne pas m'avoir mis à contribution dans les besoins familiales et de m'avoir laissé malgré cela voler leurs précieuses victuailles locales lors de mes visites.

3 Introduction.

Les oligosaccharides sont des molécules essentielles à la vie et constituent le groupe le plus abondant de biomolécules dans la nature. Les structures de ces composés sont très variées et leur stéréochimie leur confère des propriétés diverses. Ils existent sous forme cyclique ou acyclique, peuvent avoir différentes tailles, différents états d'oxydation et de réduction et jouent des rôles essentiels dans de nombreux processus biologiques.

On peut citer les 2 principaux polysaccharides de structure, la cellulose chez les plantes et la chitine pour les invertébrés et les champignons. La chitine est très commune dans le monde animal. C'est l'un des constituants de la carapace des insectes, des araignées et des crustacés. C'est un polysaccharide constitué d'un enchaînement de N-acétylglucosamine (GlcNAc) liés entre eux par une liaison osidique du type β -1,4. Associée à du calcium, la chitine cristallise et devient rigide formant ainsi l'exosquelette des crustacés (Fig. 1 schéma A).

Chez les bactéries, c'est le peptidoglycane qui est un polysaccharide structurant. L'acide N-acétylmuramique (MurNAc), un autre monosaccharide est un éther d'acide lactique et de N-acétylglucosamine (GlcNAc) qui, avec cette dernière, entre dans la composition du peptidoglycane constituant la paroi cellulaire de certaines bactéries. Les unités GlcNAc et MurNAc alternent en formant des chaînes polysaccharidiques liées entre elles par des peptides branchés au niveau des résidus d'acide lactique des unités MurNAc¹ (Fig. 1 schéma B)

D'autres oligosaccharides sont impliqués dans de nombreux mécanismes critiques de la cellule allant de la fécondation en passant par les mécanismes de l'inflammation et de la réponse immunitaire jusqu'à la croissance cellulaire². Présents à la surface de la plupart des cellules, les oligosaccharides assurent ces rôles biologiques clé reposant sur leur reconnaissance spécifique par d'autres biomolécules (hormones, lectines, anticorps,...) présentes à la surface d'autres cellules (virus, bactéries,...) (Fig. 1 schéma C).

Les β -glucanes sont des composés naturels entièrement constitués d'unités glucose et liés par des liaisons *bêta*. On les retrouve dans le son des céréales, les parois cellulaires de la levure de boulanger et certains champignons. Les β -glucanes isolés de ces différentes sources présentent des caractéristiques variables telles que les liaisons glycosidiques, le degré de ramification et le poids moléculaire. Par exemple, les β -glucanes dérivés des céréales sont majoritairement constitués de liaisons glycosidiques $\beta(1 \rightarrow 3)$ et $\beta(1 \rightarrow 4)$ sans aucune liaison $\beta(1 \rightarrow 6)$. Les β -glucanes provenant de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sont des mélanges de squelettes linéaires $\beta(1 \rightarrow 3)$ composés

d'une trentaine de résidus avec des ramifications de longues chaînes glucose liées via des liaisons $\beta(1 \rightarrow 6)$. Les β -glucanes fongiques sont quant à eux constitués d'une longue chaîne constituée d'unités glucose relié en position $\beta(1 \rightarrow 3)$ avec des chaînes ramifiées courtes reliées en $\beta(1 \rightarrow 6)$ ³ (Fig. 1 schéma D). Les β -glucanes sont de très puissants immunostimulants dont les propriétés sont connues depuis plusieurs dizaines d'années. Elles ont fait l'objet de centaines de publications montrant que les β -glucanes induisent une réponse immunitaire intensifiée en augmentant la production de cellules naturelles tueuses et en augmentant leur capacité et rapidité à détruire les pathogènes⁴.

Les *mannanes* présents à la surface de moisissure tel que *Candida Albicans* seront le dernier exemple parmi la pléthore de structures oligosaccharidiques référencée. La paroi cellulaire de ce champignon est principalement constituée d'un enchainement d'unités mannose reliés en position $\alpha(1 \rightarrow 2)$, $\alpha(1 \rightarrow 6)$, $\beta(1 \rightarrow 2)$ et $\alpha(1 \rightarrow 3)$ ⁵ (Fig. 1 schéma E). *Candida albicans* est naturellement présent dans la flore des muqueuses et participe à l'équilibre du microbiote. Il peut toutefois se développer de manière excessive et déclencher la candidose, pathologie touchant surtout les personnes dont le système immunitaire est fragilisé.

A

Insecte

N-acétylglucosamine (GlcNAc)

Chitine

La chitine, constituant de la carapace des insectes

B

Bactérie

N-acétylmuramique (MurNAc)

N-acétylglucosamine (GlcNAc)

Peptide

Peptidoglycane

Représentation schématique de la paroi cellulaire bactérienne

C

Matrice extracellulaire

Récepteurs membranaires

○ = monosaccharide

Reconnaissance des oligosaccharides comme marqueurs spécifiques par des récepteurs membranaires

D

Céréales

Champignons et levures

Structure chimique de β -glucanes provenant de différents organismes vivants

E

Protéine

Paroi cellulaire

Oligomannosides

Structure chimique de mannosides présents à la surface de la paroi cellulaire de *Candida Albicans*, champignon potentiellement pathogène

Figure 1: quelques exemples de structures d'oligosaccharides naturels.

Isoler des oligosaccharides purs et en quantités suffisantes pour étudier leurs propriétés et comprendre leurs mécanismes est un procédé fastidieux et les synthèses chimiques sont nécessaires dans de tels cas. Le rôle important de ces polysaccharides en biologie et en médecine a incité les chimistes organiciens à concevoir de nouvelles méthodes pour la synthèse de cette classe de molécules. Comparés à d'autres biopolymères comme les acides nucléiques, protéines et peptides, dans lesquels leur activité dépend de la séquence de nucléotides ou d'acides aminés, le cas des oligosaccharides est plus complexe. En plus de la séquence des monomères, d'autres aspects comme les groupements fonctionnels, la conformation des sucres ou la formation stéréosélective de liaisons glycosidiques doivent être pris en considération.

Ce manuscrit abordera dans un premier temps les généralités de ces biomolécules : structure chimique, stéréochimie et synthèse. Ces bases sont essentielles pour la compréhension de la complexité de la synthèse d'oligosaccharides impliquant souvent des étapes "chronophages" d'extraction, d'évaporation et de purification. Ces difficultés conduisent au final à une diminution de la disponibilité de l'oligosaccharide. De nombreuses avancées dans le domaine de la synthèse chimique ont ainsi été développées ces vingt dernières années pour améliorer cette disponibilité avec l'arrivée des techniques de synthèses supportées abordées dans un second temps.

Ce travail a été l'opportunité de développer une méthode originale sur support soluble pour adapter la synthèse classique d'oligosaccharides à la synthèse supportée. En plus de son côté pratique, ce procédé a été conçu pour fonctionnaliser l'oligosaccharide par une nouvelle fonction chimique afin d'obtenir une cible prête à être conjuguée à une autre molécule d'intérêt (peptide, biotine, sonde fluorescente, ...).

4 Monosaccharide et oligosaccharide : structure, configuration et conformation.

4.1 Structure linéaire : modèle de Fisher.

Les monosaccharides sont des composés de formule brute $C_n(H_2O)_n$, d'où l'ancienne appellation d'hydrates de carbone. Ils sont caractérisés par la présence dans la même molécule d'une fonction réductrice aldéhyde ou cétone et d'au moins une fonction alcool. Les oses qui possèdent une fonction aldéhydrique sont appelés **ALDOSES** et ceux qui possèdent une fonction cétonique sont appelés **CETOSES**. La nomenclature des atomes de carbone des aldoses attribue le numéro 1 à celui qui porte la fonction aldéhyde. Dans le cas des cétooses, le carbone qui porte la fonction cétone porte le numéro 2. (Fig. 2)

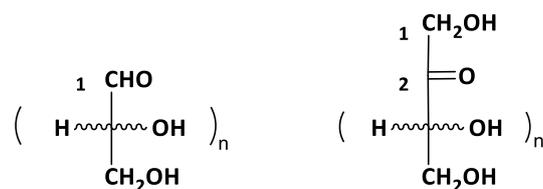


Figure 2: structure générale des aldoses et cétooses.

4.2 Stéréoisomérie-chiralité.

Le **glycéraldéhyde** est le plus petit aldose et aussi le plus simple. Il possède un atome de carbone asymétrique et il peut donc exister deux énantiomères. Emil Fischer a choisi le glycéraldéhyde comme composé de référence pour l'étude de la configuration des sucres. Emil Fischer a également choisi arbitrairement le symbole **D** pour l'énantiomère **dextrogyre**, c'est à dire celui qui dévie le plan de la lumière polarisée vers la droite (sens horaire). Tous les oses dérivant du glycéraldéhyde dextrogyre appartiennent à la série D et ceux dérivant du glycéraldéhyde **lévogyre** appartiennent à la série L (Fig. 3).

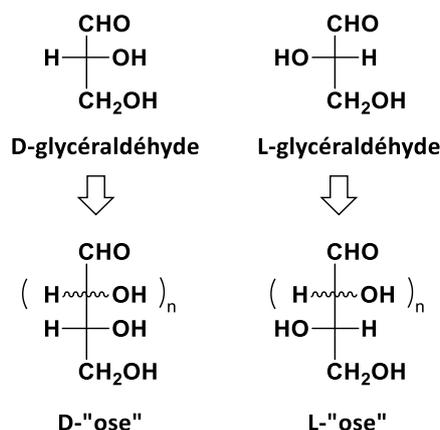


Figure 3: nomenclature et stéréochimie des D et L « -oses »

4.3 Structure cyclique : réaction d'hémi-acétalisation.

Le carbonyle est suffisamment réactif pour qu'un alcool à proximité réagisse pour former un hémi-acétal. Dans le cas par exemple du **D-glucose**, cette hémi-acétalisation intramoléculaire peut avoir lieu avec les carbones C₁-C₅ ou C₁-C₄ pour former un hétérocycle à 6 (pyranose) ou 5 (furanose) chaînons (Fig. 4).

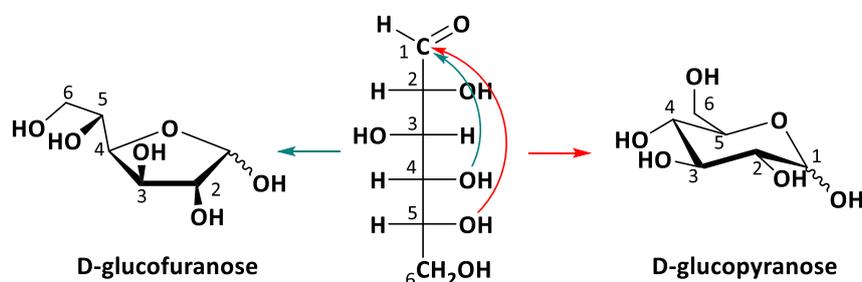


Figure 4: réaction d'hémi-acétalisation, formation des formes « furane » et « pyrane »

Cette cyclisation rend le carbone C₁ asymétrique et définit 2 nouvelles configurations de stéréoisomères, les **anomères α** et **β** (Le carbone C₁ est appelé carbone anomère). Les anomères sont distingués par les lettres α et β. La forme est α si le groupe hydroxyle -OH anomérique et le groupe CH₂OH terminal sont de part et d'autre du cycle, et β s'ils sont du même côté. Autrement dit, la forme est β si, dans la représentation de Fischer, le groupe hydroxyle -OH anomérique est du même côté que le groupe -OH impliqué dans la liaison osidique, et la forme est α s'ils sont de part et d'autre de la chaîne. Dans le cas des séries D, la forme est α si le groupe -OH anomérique est vers le bas, et β s'il est vers le haut (ou à gauche dans une représentation linéaire) ; pour les séries L, c'est l'inverse (Fig. 5).

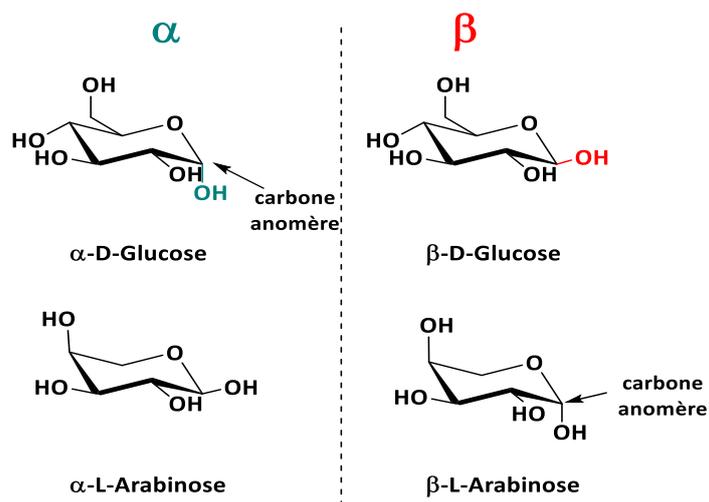


Figure 5: nomenclature et stéréochimie des anomères α et β

4.4 Effet anomère et mutarotation.

-Effet anomère

Quand il est en solution, les 2/3 environ du D-glucose sont sous forme de β -D-glucopyranose (groupement hydroxyle en équatorial) et 1/3 sous forme de α -D-glucopyranose (groupement hydroxyle en axial). Moins de 1% est sous forme de chaîne ouverte (Fig. 6).

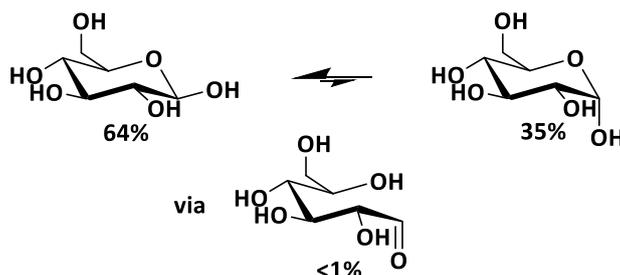


Figure 6: stéréochimie et proportion du D-glucose en solution.

Dans la plupart des dérivés du D-glucose, une proportion non négligeable des substituants anomériques peut être en position axiale (α) plutôt qu'équatoriale (β) (pourtant thermodynamiquement plus stable) : c'est **l'effet anomère**. C'est un effet stéréoelectronique qui décrit la tendance des substituants hétéroatomiques adjacents à un hétéroatome dans un cycle de type cyclohexane, à préférer l'orientation axiale au lieu de l'orientation équatoriale. L'explication est que la configuration équatoriale a des dipôles impliquant des hétéroatomes partiellement alignés se

repoussant mutuellement. En revanche, les dipôles de la configuration axiale sont opposés, ce qui représente un état d'énergie plus stable et plus bas (Fig. 7).

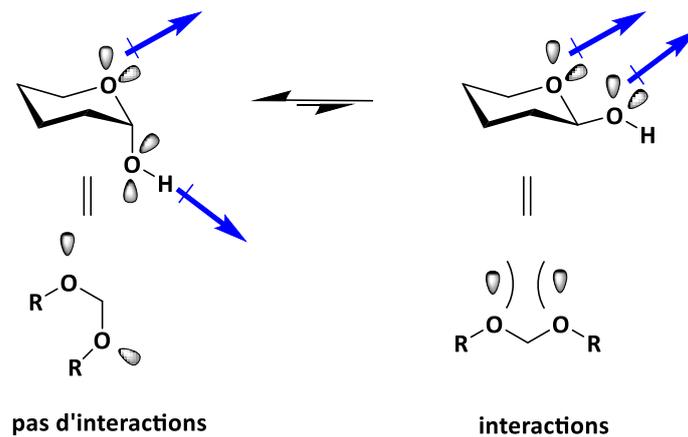


Figure 7: interaction dipôle-dipôle décrivant l'effet anomère.

-Mutarotation

La mutarotation est l'évolution du pouvoir rotatoire d'une solution d'une forme pure (α ou β) vers le pouvoir rotatoire de la solution $\alpha + \beta$. Il est décrit par le Français Augustin-Pierre Dubrunfaut en 1846.

4.5 Structures de quelques monosaccharides naturels et oligosaccharides.

4.5.1 Monosaccharides naturels.

Le D-glucose :

Le **D-glucose** (Fig. 8) est un carburant omniprésent en biologie via la glycolyse permettant la production d'ATP. Il est utilisé comme source d'énergie dans la plupart des organismes, des bactéries aux humains. Le glucose est aussi essentiel dans la production de protéines et le métabolisme des lipides. Enfin le glucose est le principal produit issu de la photosynthèse.

Le D-mannose :

Le **D-mannose** (Fig. 8) est l'**épipère** en C2 du glucose (c'est-à-dire que sa configuration spatiale est rigoureusement la même, sauf pour les substituants du carbone 2, où ils sont inversés par rapport au

glucose). Il est présent dans certains fruits et se rencontre surtout dans le règne végétal associé avec d'autres sucres dans les graines de légumineuse.

Le D-galactose :

Le **D-galactose** (Fig. 8) est l'**épimère** en C4 du glucose. Le D-galactose est présent dans le lait sous forme de lactose. En combinaison avec le mannose, il forme des polysaccharides de type galactomannanes présents dans des gommés naturelles alimentaires comme la gomme de guar, de tara ou de caroube. Les galactomannanes sont des fibres végétales, présents dans de nombreuses graines. Ils sont solubles et acaloriques et servent de réserve de sucre lors de la germination.

La D-glucosamine :

La **D-glucosamine** (Fig. 8) un composant important de plusieurs polysaccharides, en particulier la chitine, constituant majeur de la carapace des insectes et des crustacés.

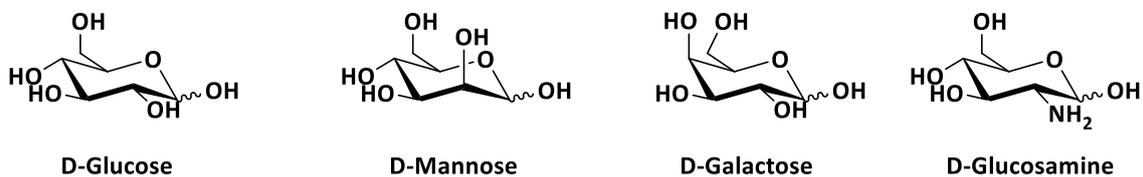


Figure 8 : noms, structures, et symboles de quelques monosaccharides naturels.

4.5.2 Polysaccharides.

Dans la nature, la plupart des monosaccharides sont assemblés entre eux pour former des oligosaccharides (3 à 9 monosaccharides) ou des polysaccharides (plus de 10 monosaccharides). Ils peuvent également être liés de façon covalente sur des peptides ou des protéines (glycoconjugués). Cette étape d'« assemblage » des sucres est appelée **glycosylation**. Elle intervient toujours sur le carbone anomère et génère la liaison glycosidique (liaison qui assemble un saccharide à un autre groupe de molécules, saccharide ou non.).

De nombreuses synthèses d'oligosaccharides naturels ont été rapportées dans la littérature pour l'étude et la compréhension de pathologies diverses. Les structures représentées sur la figure 9 en sont quelques exemples. La structure **A** (Fig. 9) représente par exemple un tétrasaccharide antigénique présent sur le parasite *Leishmania*, responsable de la leishmannose⁶.

La structure synthétisée **B** (Fig. 9) est un tétramannoside dont l'enchaînement des liaisons $\alpha(1-2)$ est présent dans la paroi cellulaire de *Candida Albicans*, champignon responsable de la candidose⁷. Enfin

le pentasaccharide **C** (Fig. 9) synthétisé est présent à la surface cellulaire de *Klebsiella pneumoniae*, bactérie impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales⁸.

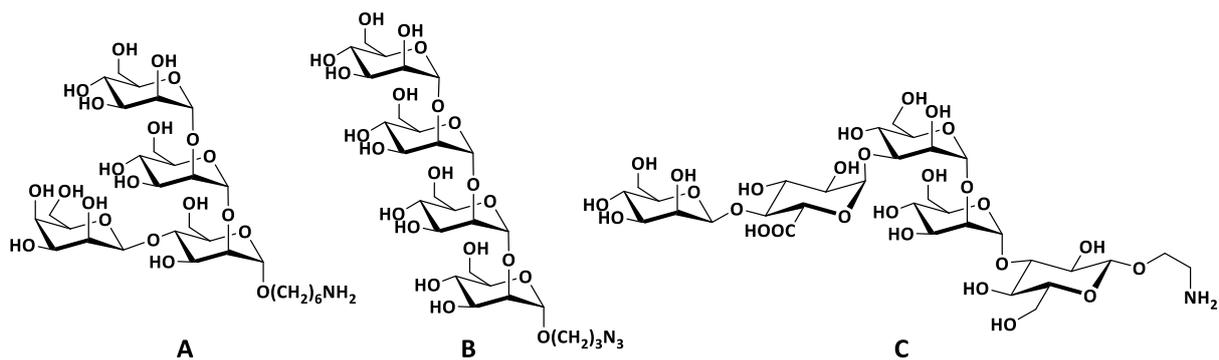


Figure 9 : structure chimique de 3 oligosaccharides naturels synthétisés en laboratoire.

Toutes ces cibles oligosaccharidiques ne sont que quelques exemples parmi la multitude de composés décrite dans la littérature. Toutefois des facteurs comme le contrôle de la stéréochimie de la liaison glycosidique doivent être pris en compte au risque d'obtenir une molécule avec un effet totalement contraire ou inactif par rapport à l'effet désiré. La synthèse d'oligosaccharides est ainsi plus complexe que les autres biopolymères (peptides et acides nucléiques) car leur synthèse, en plus de la séquence de monomères, dépend de la conformation ou de la stéréochimie de la liaison glycosidique (Fig. 10).

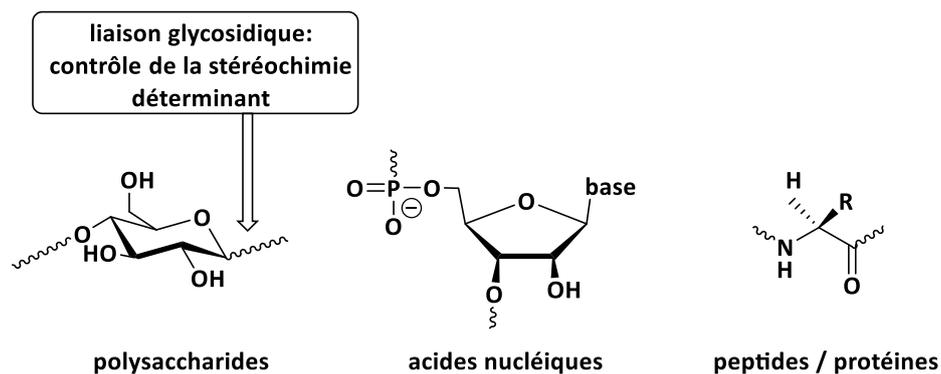


Figure 10 : structure chimique des biopolymères naturels / importance du contrôle de la stéréochimie en glycochimie.

Le contrôle de la stéréochimie de cette liaison est souvent la clé de nombreux processus biologiques. Les deux anomères ont des configurations spatiales et donc des activités biologiques très différentes. Les exemples classiques sont la cellulose et l'amidon qui partagent le même enchainement de glucose mais pas la même anomérie.

5 Aspects généraux de la synthèse d'oligosaccharides.

La synthèse chimique (ou enzymatique non abordée dans ce manuscrit) d'oligosaccharides est basée sur le principe de la **glycosylation** avec formation de la liaison glycosidique. C'est une réaction chimique entre un composé dit **donneur de glycosyle** (qui sera l'électrophile) et un **accepteur de glycosyle** (nucléophile). Le donneur (ose) possède sur sa position anomérique un groupement partant et l'accepteur (ose, peptide, molécule,...) possède un groupement nucléophile comme un alcool (ou une amine). La réaction est généralement catalysée par un **promoteur** qui active et favorise le départ du groupement partant (Fig. 11). C'est une substitution nucléophile dont le mécanisme peut être SN_1 ou SN_2 .

GP : groupement protecteur **temporaire** **X** : groupement partant
GP : groupement protecteur **permanent**

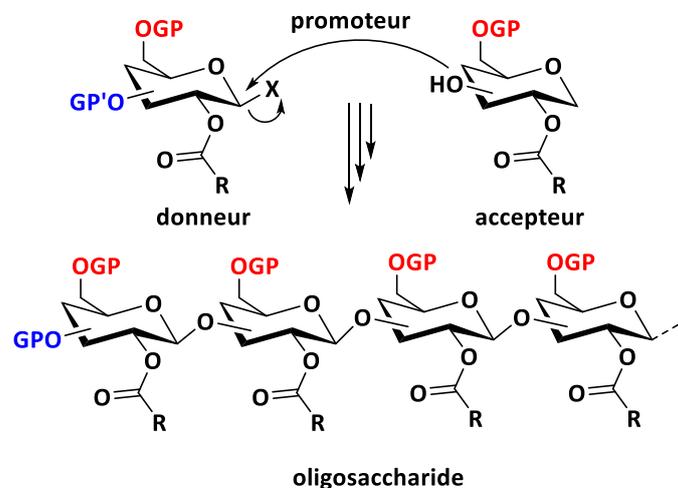


Figure 11: schéma général de la réaction de glycosylation.

La synthèse des disaccharides et des oligosaccharides implique la liaison de deux composés polyfonctionnels. Ce procédé implique de masquer la réactivité des groupements hydroxyle par des groupements protecteurs au risque d'obtenir un mélange d'isomères difficilement purifiable. Par exemple, le D-glucose a 4 groupements hydroxyle (groupement hydroxyle anomérique exclu) qui peuvent participer dans la glycosylation. En glycosylant 2 substrats glucose et en tenant compte de la possibilité de formation des anomères α et β , 8 isomères peuvent donc être formés à l'issue de cette réaction (Fig. 12).

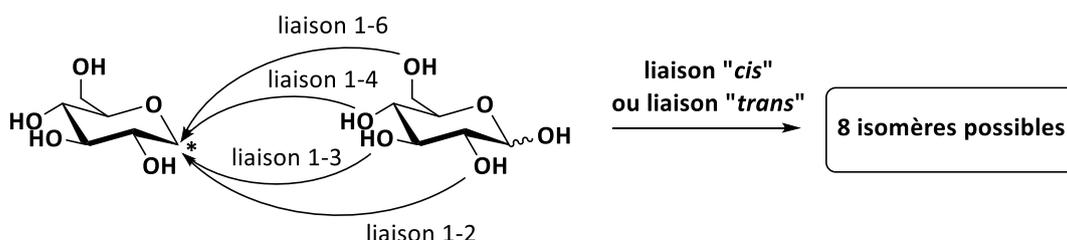


Figure 12: réaction de glycosylation entre deux unités glucose non protégées.

La liaison glycosidique peut être formée de deux façons différentes qui dépendent de la participation ou non du groupement protecteur de la position 2.

5.1 Formation de la liaison glycosidique sans participation de la position 2.

Dans ce cas, un activateur favorise le départ du groupe partant et il en résulte la formation d'un cation glycosyle. Ce cation est stabilisé intramoléculairement par le doublet non liant de l'atome d'oxygène et forme l'ion oxonium. Le carbone anomère est alors hybridé sp^2 et l'attaque nucléophile est autant possible par la face supérieure (*trans*) pour les donneurs de la série D-gluco (Fig. 13 voie a) que par la face inférieure (*cis*) (Fig. 13 voie b). Même si le produit α est le produit thermodynamiquement favorisé avec l'effet anomère, une quantité non négligeable du produit cinétique β est souvent obtenu en raison du caractère irréversible de la glycosylation. De nombreux facteurs comme la température (favorisant un mécanisme SN_2), les groupements protecteurs (un ester installé sur la position O-6 peut participer et favoriser l'anomère α), le solvant (un solvant nucléophile comme l'éther ou l'acétonitrile peut conduire à un intermédiaire augmentant la sélectivité) ou encore les groupes partants peuvent influencer les résultats de la glycosylation.

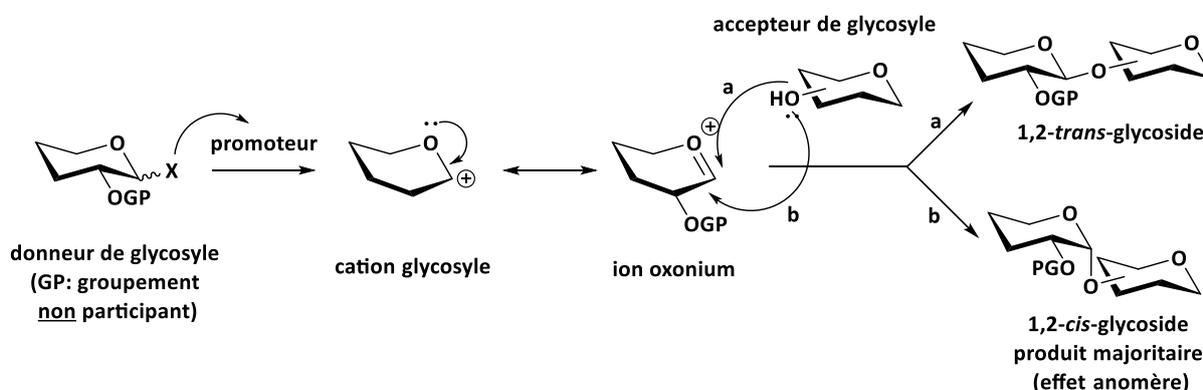


Figure 13: formation de la liaison glycosidique sans participation de la position 2.

5.2 Formation de la liaison glycosidique avec participation de la position 2.

Les liaisons 1,2-*trans* glycosidiques peuvent être formées stéréosélectivement avec la participation du groupement de la position 2, généralement un acyl comme un *O*-acétyl (Ac), un *O*-benzoyl (Bz) ou un *N*-phthalimide (Npht). Ces glycosylations sont obtenues via un ion acyloxonium (intermédiaire bicyclique). Cet acyloxonium se forme après le départ du groupement partant et résulte d'une stabilisation intramoléculaire du cation glycosyle. Dans le cas du glucose, l'attaque du nucléophile (alcool, amine ou donneur de glycosyle) est uniquement possible par la face supérieure et permet la formation stéréosélective d'une liaison glycosidique 1,2-*trans*. Cependant, des quantités non négligeables de 1,2-*cis*-glycoside (produit α) peuvent se former, le plus souvent quand des alcools peu réactifs sont utilisés et/ou à cause de la faible nucléophilie du groupement participant de la position 2. Dans ce cas, la glycosylation se produit par l'intermédiaire de l'ion oxonium via les voies a et b et forme un mélange de 1,2-*trans* glycosides (produit β) et 1,2-*cis* glycosides (produit α) (Fig. 14).

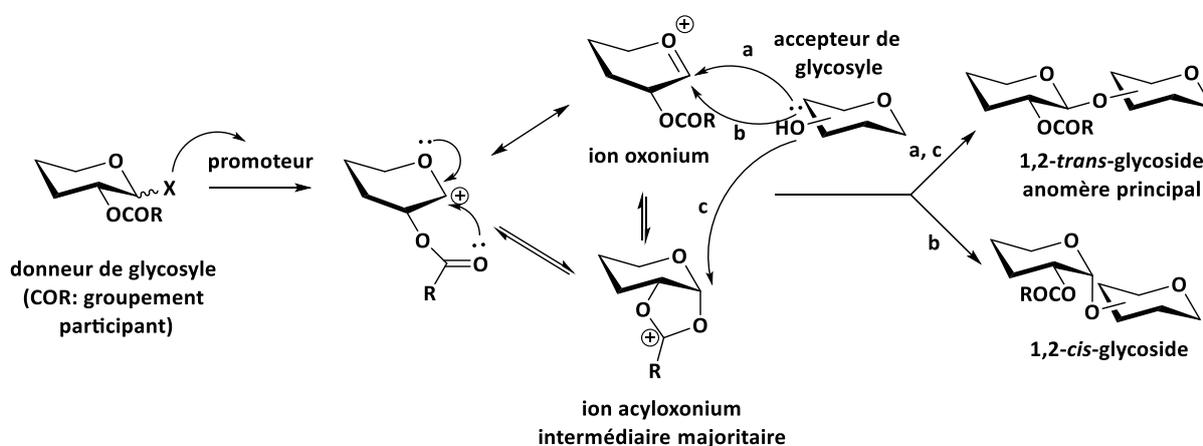


Figure 14: formation de la liaison glycosidique avec participation de la position 2.

5.3 Réactivité des donneurs et accepteurs de glycosyle: importance des groupements protecteurs, concept "armés"/"désarmés".

Le meilleur contrôle de la stéréosélectivité de la liaison glycosidique est la participation du groupement protecteur en C-2 pour obtenir directement des produits 1,2-*trans*. Les autres groupements protecteurs peuvent également avoir un effet sur le départ du groupement partant appelée effet « armé » ou « désarmé ». Le concept des donneurs de glycosyle armés/désarmés établi par Fraser-Reid⁹ se réfère à la réactivité accrue des donneurs benzylés par rapport à la réactivité des donneurs benzoylés. La stabilisation et le départ du groupement partant sont favorisés dans le cas des donneurs armés benzylés (Fig. 15 cas A et B) via l'intermédiaire oxonium avec le doublet non liant de l'atome d'oxygène. Dans le cas des dérivés per-benzoylés (Fig. 15 cas C et D), la réactivité est

fortement diminuée à cause des effets électroattracteurs des substituants en C4 et C6. L'intermédiaire acyloxonium est stabilisé dans ce cas par l'acyl de la position 2.

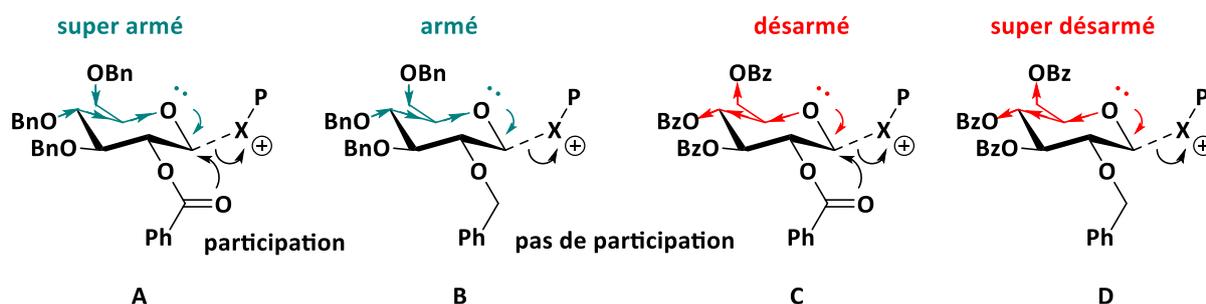


Figure 15: concept des donneurs de glycosyle armés/désarmés.

Concernant la réactivité de l'accepteur, elle dépend de la nucléophilie du groupement hydroxyle, de l'orientation spatiale (la position équatoriale, plus dégagée, est plus réactive que l'axiale), de la présence des autres groupements protecteurs dans la molécule et de l'encombrement stérique. Les groupements électroattracteurs diminuent généralement la réactivité de l'accepteur, toujours en se référant au concept armé/désarmé.

6 Les donneurs de glycosyles fréquemment utilisés.

Les méthodes de synthèse d'oligosaccharides impliquent la réaction entre un alcool et un donneur de glycosyle. Ces réactions sont généralement réalisées sous l'action d'un promoteur facilitant le départ du groupe partant installé au niveau du carbone anomérique du donneur. Yang and Yu ont répertorié les principaux types de donneurs de glycosyle utilisés depuis les deux dernières décennies dans la synthèse totale de complexes O-glycoside¹⁰. Ils y ont mentionné entre autre les bromures, fluorures et iodures de glycosyle, les trichloroacetimidates, les N-phenyl trifluoroacetimidates, les thioglycosides, les sulfoxydes, les hétéroaryl thioglycosides, les sucres hydroxylés, les -O-acétates, les ortho-alkynylbenzoates, les glycosyl phosphates, les glycals ou encore les pyranones. La figure 16 représente les structures des différents donneurs de glycosyles énumérés précédemment et leurs promoteurs associés.

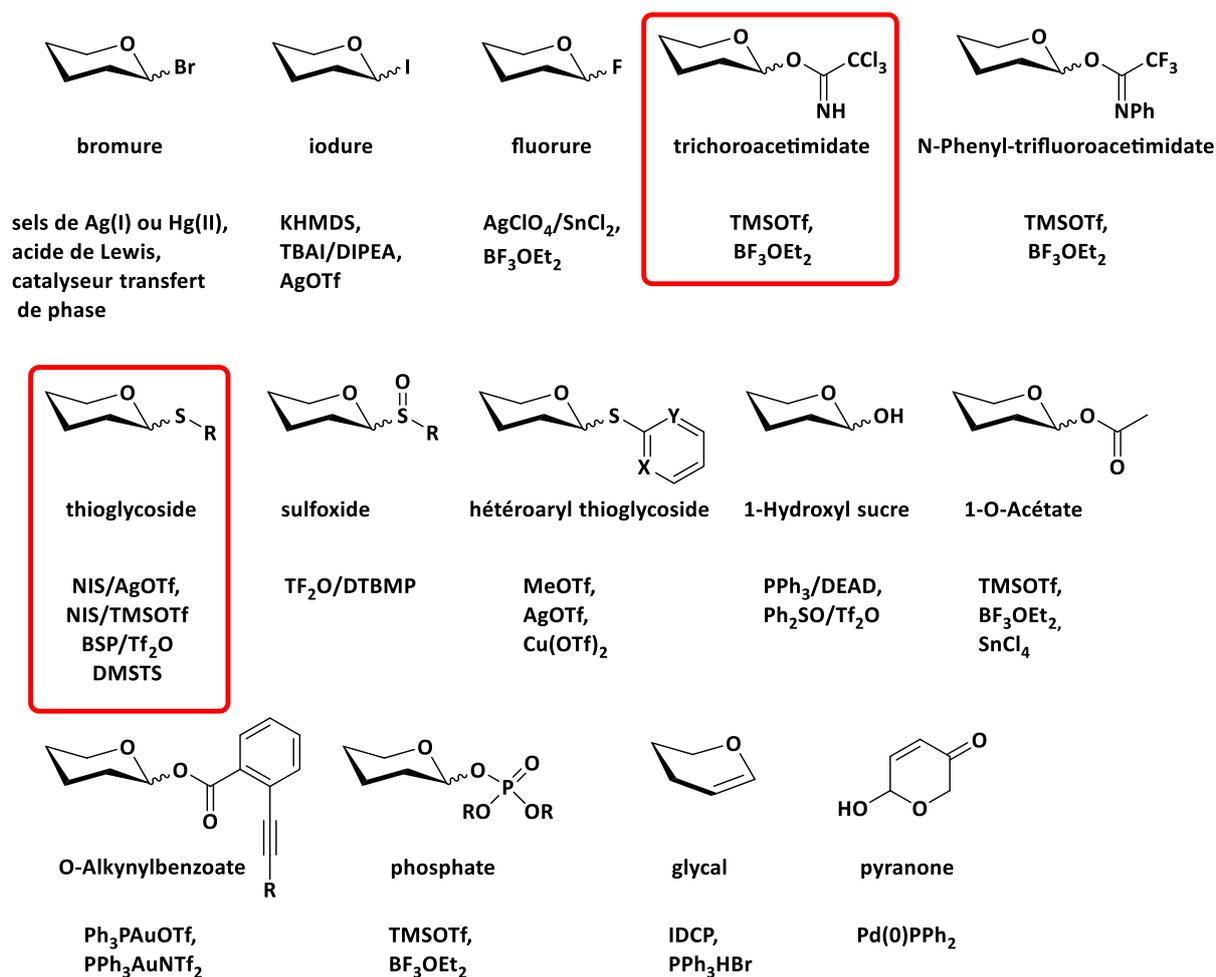


Figure 16: structures chimiques de différents donneurs de glycosyle et promoteurs associés.

Il existe de nombreux donneurs de glycosyle avec chacun son propre mode d'activation (sels de métaux, condition acide, condition basique, halonium, ...). Parmi les nombreux donneurs représentés dans le tableau précédents, le cas des donneurs de trichloroacetimidate et des donneurs de thioglycosides seront abordés dans ce manuscrit.

Les donneurs de trichloroacetimidate ressortent comme étant les donneurs les plus populaires dans la synthèse de glycosides complexes.

Les donneurs de thioglycosides sont aussi largement utilisés dans la synthèse d'oligosaccharides. Ces composés présentant de nombreux avantages par rapport aux autres donneurs et sont régulièrement utilisés dans la synthèse d'oligosaccharides.

6.1 Les donneurs de trichloroacétimide

Ces composés ont été introduits par Richard Schmidt en 1980¹¹. Ils sont obtenus en faisant réagir la forme hémiacétale d'un monosaccharide sur le trichloroacétonitrile (Fig. 17). Les nitriles sont connus pour subir, en présence de bases, des attaques par des alcools sur la triple liaison pour fournir des *O*-imidates. Les imidates sont assez stables (0 °C) et peuvent être isolés.

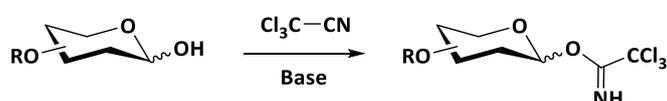


Figure 17: formation des donneurs de trichloroacétimide.

Les donneurs de trichloroacétimides sont activés dans des conditions douces nécessitant des quantités catalytiques acides comme TMSOTf ou $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. L'ion oxonium (ou acyloxonium si un groupement participant de type ester est installé) est alors formé et réagit avec l'alcool de l'accepteur. Le proton libéré sur la liaison glycosidique réagit avec le groupement partant. Cela conduit à un trichloroacétamide stable et non basique qui est la force motrice de la réaction (Fig. 18). Toutefois, cet amide lipophile généré peut être difficile à éliminer du brut réactionnel. Les impuretés du trichloroacétamide peuvent être facilement ignorées car leur détection par RMN-¹H est compromise en raison du manque de protons. Il n'y a actuellement aucune procédure rapportée pour éliminer ces sous-produits amides excepté la chromatographie sur colonne.

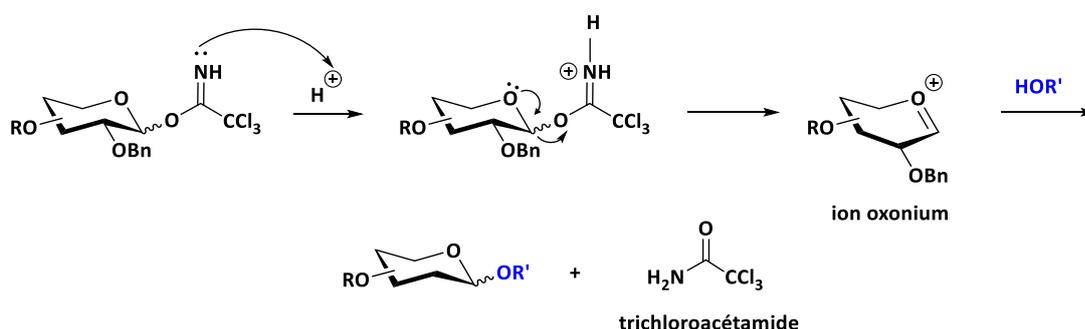


Figure 18: mécanisme réactionnel de l'activation des donneurs de glycosyle trichloroacétimide.

Un réarrangement indésirable catalysé en milieu acide est également connu transformant le donneur de trichloroacétimide en *N*-trichloroacétylglycosyl amine (Fig. 19).

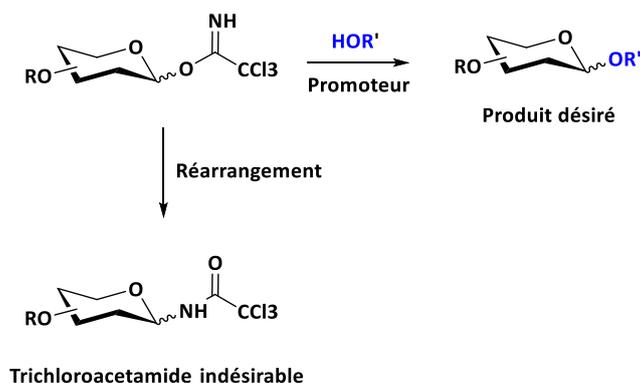


Figure 19 : réarrangement du donneur de trichloroacetimidate en *N*-trichloroacetyl glycosyl amine

Plus récemment, les *N*-phenyl trifluoroacetimidates ont été développés comme alternative, donnant en particulier moins de réactions secondaires. Ces donneurs sont stables et peuvent être stockés plusieurs semaines à 4°C. Les donneurs de *N*-phenyl trifluoroacetimidates peracétylés, perbenzoylés et perbenzylés sont facilement préparés à partir de l'hydroxyle anomère en présence de K_2CO_3 dans le DCM¹² (Fig. 20).

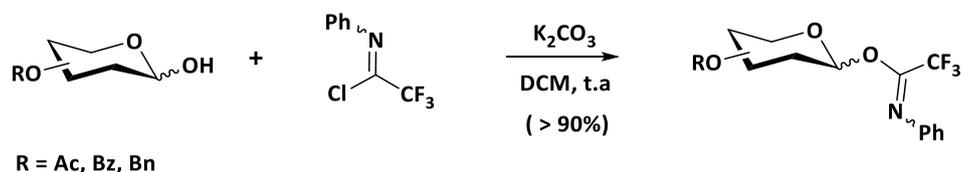


Figure 20: préparation des donneurs de *N*-phenyl trifluoroacetimidates.

6.2 Les donneurs de thioglycoside.

6.2.1 Avantages des donneurs de thioglycoside.

Le premier protocole de glycosylation avec un thioglycoside comme donneur a été publié en 1973 par Ferrier *et al*¹³. Depuis cette date les thioglycosides sont couramment utilisés comme donneur de glycosyle dans la construction d'une large gamme de liaisons glycosidiques. Une étude de 734 liaisons glycosidiques publiée en 1995 révélait qu'environ 24% des donneurs utilisés étaient des thioglycosides¹⁴.

On estime que cette situation n'a pas changé depuis car certains groupes de glycochimistes préfèrent utiliser ces donneurs pour diverses raisons:

-Ce sont des composés faciles à préparer à partir de monosaccharides per-acétylés. La réaction se fait en présence d'un acide de Lewis. Le groupement anomérique se trouve alors activé et peut être aisément substitué par un thiol pour conduire au thioglycoside désiré (Fig. 21).

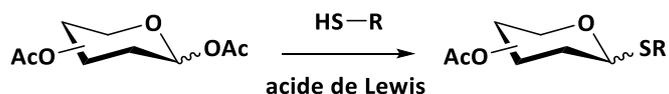


Figure 21: formation des donneurs de thioglycoside.

-Les thioglycosides résistent dans de nombreuses conditions opératoires (conditions d'alkylation, d'acylation, acides, basiques, ...) et ils peuvent être ensuite activés dans des conditions douces n'altérant pas les autres substrats mis en jeu dans les réactions. La fonction thioacétal combine ainsi le rôle d'un groupe protecteur anomérique et celui d'un groupe partant efficace. Les thioglycosides sont habituellement moins réactifs que les imidates ; cependant ces derniers sont introduits en milieu basique et nécessitent l'introduction de groupements protecteurs plus résistants (acétate ou groupements silylé) et donc plus d'étapes de synthèse.

Ces caractéristiques font que les thioglycosides sont des composés appropriés pour être exploités dans les stratégies de glycosylation chimiosélectives, orthogonales et itératives (Fig. 22).

- Dans une glycosylation chimiosélective, un donneur thio de réactivité élevée est condensé avec un thioglycoside de réactivité plus faible pour fournir un nouveau thioglycoside qui peut être immédiatement utilisé dans un autre événement de glycosylation (Fig. 22 cas A).

- Une condensation orthogonale utilise deux glycosides avec des groupes partants anomères différents (par exemple un sulfure d'aryle / alkyle et un fluorure), qui sont mutuellement stables aux conditions utilisées pour activer l'autre groupe partant (Fig. 22 cas B).

- Les thioglycosides peuvent être utilisés de manière itérative dans la construction d'oligosaccharide (Fig. 22 cas C). Dans ce procédé, un thioglycoside précurseur est utilisé pour l'élongation de l'oligosaccharide en combinaison avec un seul ensemble de conditions de glycosylation qui sont indépendantes des partenaires de couplage.

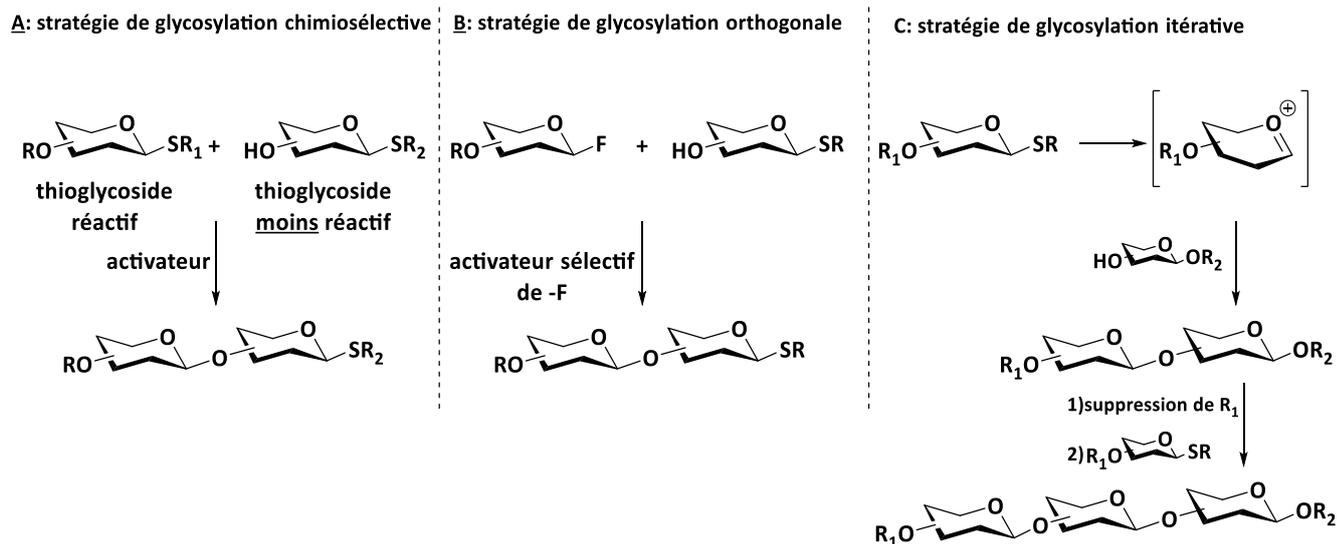
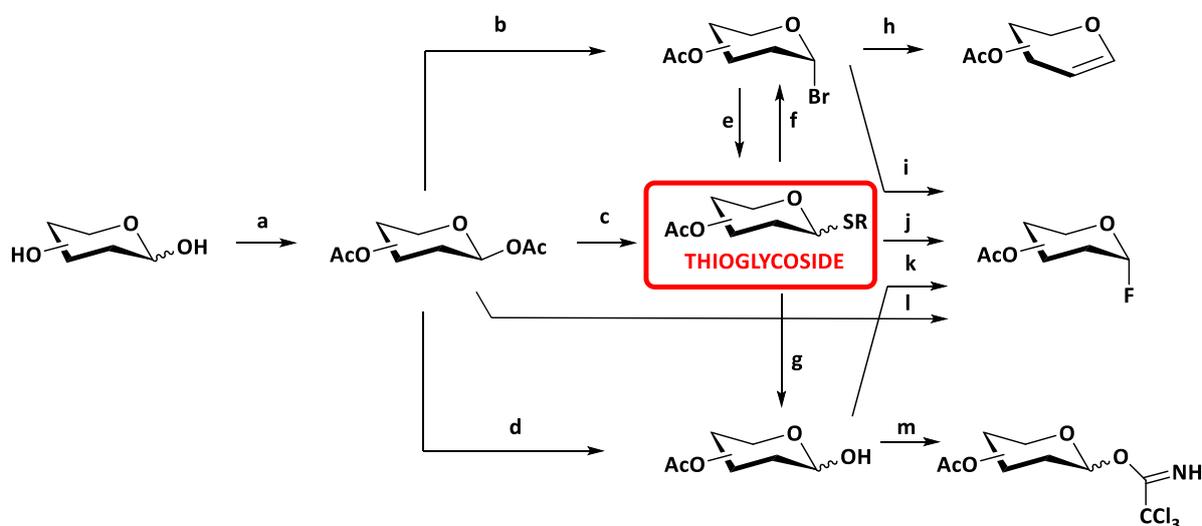


Figure 22: stratégie de glycosylation chimiosélective (cas A), orthogonale (cas B), et itérative (cas C) utilisant les thioglycosides.

Les thioglycosides ont l'avantage de combiner un double rôle (groupe protecteur anomérique et groupe partant efficace), ils peuvent facilement être convertis en d'autres donneurs de glycosyle comme les bromures, fluorures ou les trichloroacetimidates (Fig. 23)¹⁵. Cette conversion peut être un choix initial ou tardif selon les stratégies de synthèse envisagée, les problèmes de réactivité rencontrés ou encore l'incompatibilité des substrats mis en jeu.



Réactifs et conditions: (a) Ac_2O , NaOAc, 140°C , 1h; (b) Hbr/HOAc, Ac_2O , ta, 1h; (c) RSH, $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, DCM, 0°C , 45 min; (d) amine, THF, 75°C , 18h; (e) NaSPh, Et_2O , ta, 2j; (f) IBr, DCM, 0°C , 10 min; (g) NBS, acétone, H_2O , ta, 1h; (h) Zn/Ag-C, THF, -20°C , 10 min; (i) AgF, CH_3CN , ta, 2h; (j) DAST, NBS, DCM, 0°C à ta, 25 min; (k) DAST, DCM, -78°C , 15 min; (l) HF/pyridine, 0°C , 6h; (m) CCl_3CN , DBU, DCM, -10°C à ta, 3h.

Figure 23: conversion des donneurs de thioglycoside en autres donneurs de glycosyles.

-Enfin pour ajouter un dernier avantage au sujet des thioglycosides, ce sont des composés très stables contrairement à d'autres donneurs (imidates, halogénures) et peuvent être stockés plusieurs années à température ambiante sans être altérés.

6.2.2 Inconvénients des donneurs de thioglycosides.

Les deux inconvénients majeurs des thioglycosides sont l'odeur nauséabonde et (ou) la toxicité des précurseurs soufrés utilisés lors de leur préparation. L'emploi de thiols non odorants permet d'éviter ces désagréments. Parmi les thiols non odorants utilisés dans la synthèse de thioglycosides, Dohi et Nishida ont référencé les thiols suivants¹⁶: le 4-méthylbenzenethiol¹⁷, le 1-dodecanethiol¹⁸ (C₁₂) et le 1-octadecanethiol¹⁸ (C₁₇), le 1-adamantanethiol¹⁹, les *p*-alkyl et *p*-alkoxythiophenols²⁰, le méthylthiosalicylate²¹ et le 2-Méthyl-5-*tert*-butylthiophenol²² (Fig. 24). Un des paramètres clé pour avoir des thiols non odorants est leur point d'ébullition élevé et leur faible volatilité.

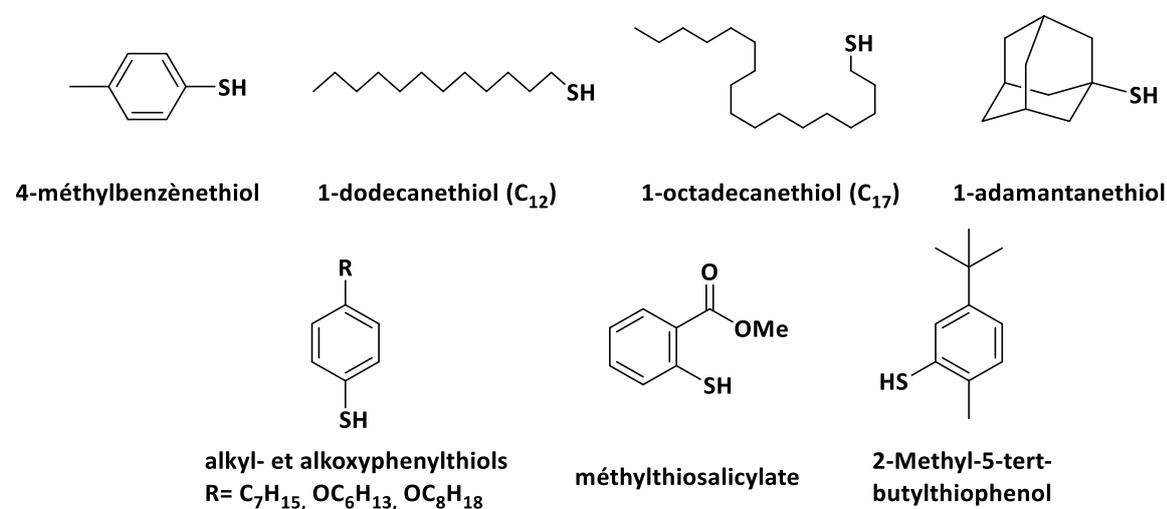


Figure 24: structure de quelques thiols non odorants dans la synthèse des thioglycosides.

Ce dernier thiol a été développé dans le Laboratoire des Biomolécules il y a une dizaine d'années. Il est maintenant exploité par d'autres groupes et a également été utilisé au sein du Laboratoire dans la construction d'un oligosaccharide antigénique présent à la surface d'*Aspergillus Fumigatus*, champignon responsable de l'aspergillose²³. Ce thiol a également permis la synthèse d'un autre oligosaccharide présent dans la paroi cellulaire de *Candida Albicans*⁷, champignon responsable de la candidose abordé en début de manuscrit

6.2.3 Promoteurs utilisés pour l'activation des thioglycosides

Les thioglycosides doivent être activés dans des conditions douces et de manière spécifique afin de ne pas altérer les autres composés mis en jeu. Il existe de nombreux promoteurs qui ont été développés depuis l'instauration des alkyl/phenyl 1-thioglycosides. Tous ces promoteurs sont capables de générer des espèces thiophiles et qui peuvent être classés en 4 catégories : les sels de métaux MX, les réactifs d'halonium $[\text{Halonium}]^+\text{X}^-$, les réactifs organosulfurés $[\text{S}^+]\text{X}^-$ et les méthodes de transfert d'électron SET (Single Electron Transfert) (Fig. 25):

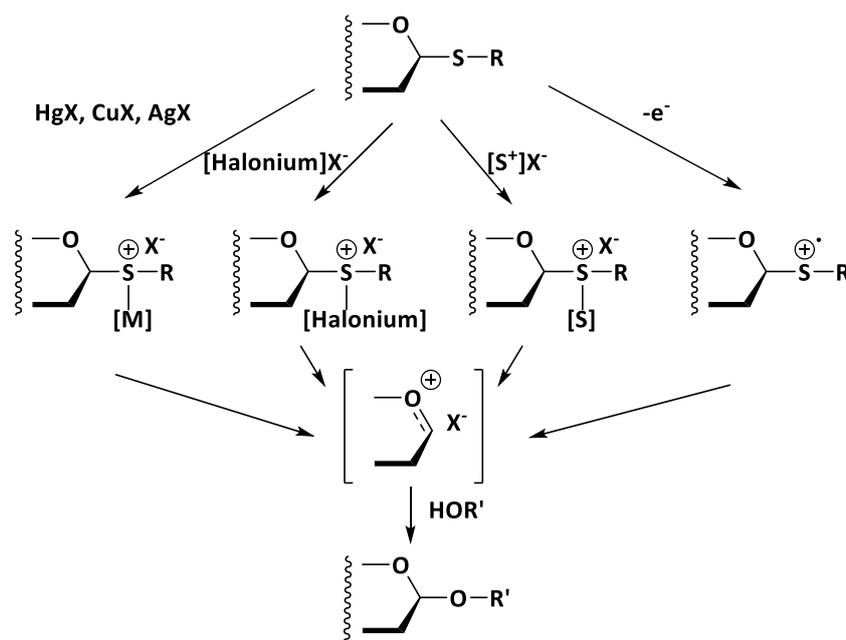


Figure 25: les différentes catégories de promoteurs pour l'activation des thioglycosides.

-Sels de métaux thiophiles:

Les métaux thiophiles comme de nombreux sels de mercure (Hg^{2+}), de cuivre (Cu^{2+}) ou d'argent (Ag^+) ont été les premiers promoteurs utilisés pour l'activation de thioglycosides. Ces métaux lourds sont toxiques et difficiles à éliminer. De plus une quantité stœchiométrique de métal est requise dans la glycosylation. Les conditions hétérogènes rendent aussi le traitement et la reproductibilité des réactions problématique. Ces métaux sont aujourd'hui occasionnellement utilisés comme promoteurs des thioglycosides.

- Electrophiles organosulfurés:

Les réactifs organosulfurés constituent un autre groupe de promoteurs de thioglycosides largement utilisés de nos jours. En 1986, Fügedi et Garegg ont introduit le dimethyl(thiomethyl)sulfonium

triflate²⁴ (DMTST) issu de la réaction entre le triflate de méthyl (TfOMe) et le diméthylsulfure²⁵ (Fig. 26).

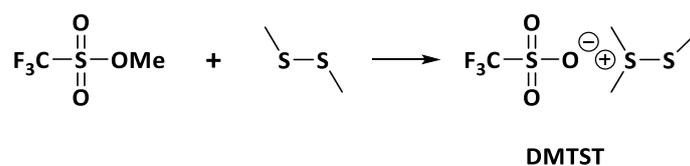


Figure 26 : formation du promoteur dimethyl(thiomethyl)sulfonium triflate (DMTST) pour l'activation des thioglycosides.

C'est un puissant promoteur mais néanmoins toxique en raison de l'agent méthyliant TfOMe et de l'odeur très désagréable du diméthylsulfure. La combinaison de dérivés sulfinyl avec l'anhydride triflique (Tf₂O) développé par Crich dans les années 2000 est l'une des méthodes d'activation des thioglycosides les plus efficaces par des promoteurs thiophiles^{26,27}. Cette méthode est très efficace pour la conversion de thioglycoside à un intermédiaire glycosyl triflate pour la formation de diverses liaisons glycosidiques (Fig 27). L'activation se fait à très basse température.

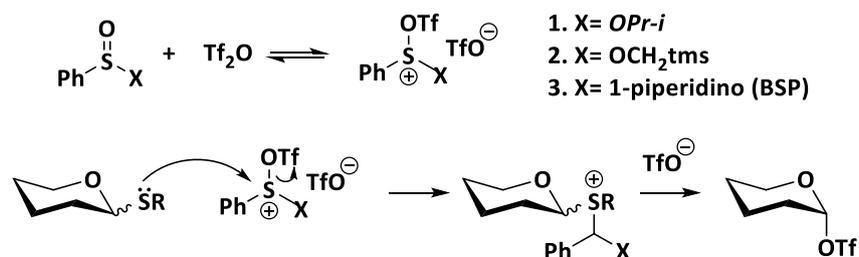


Figure 27: conversion des thioglycosides en glycosyl triflate développé par Crich.

-Méthodes de transfert d'électron SET (Single Electron Transfert):

L'activation oxydante des thioglycosides via un transfert d'électron a été décrite en 1990 par les groupes d'Amatore/Sinaÿ et puis par Lubineau^{28, 29}. L'oxydation d'un thiophenylglycoside (Ph-S-R) conduit au radical cation (Ph-S-R)^{•+} générant un radical thiyl (PhS[•]) et l'intermédiaire oxocarbenium (R⁺) de la glycosylation. Quelques réactifs chimiques de transfert d'électron comme le hexachloroantimonate de tris (4-bromophényl) aminium [(p-BrPh)₃N⁺SbCl₆⁻] (TBPA⁺SbCl₆⁻)³⁰ ou photochimique accepteur de radicaux comme le système 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ)/hν³¹ ont été utilisés depuis pour l'activation des thioglycosides (Fig. 28).

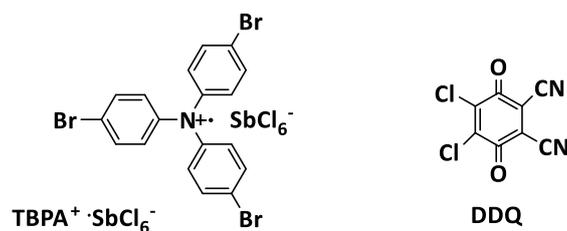


Figure 28: deux réactifs de transfert d'électron utilisés pour l'activation des thioglycosides.

- Les espèces halonium :

Les espèces halonium (bromonium et iodonium) sont également des espèces thiophiles activant les thioglycosides. Le premier thioglycoside activé par un bromonium issu du *N*-bromosuccinimide (NBS) a été décrit par Nicolaou³². L'activation des thioglycosides par un iodonium a été publiée par van Boom³³ et Fraser-Reid³⁴ avec le système NIS/TfOH ou NIS/AgOTf (Fig. 29). Ce mode d'activation a été une avancée majeure et reste aujourd'hui l'un des modes d'activation des thioglycosides les plus répandus.

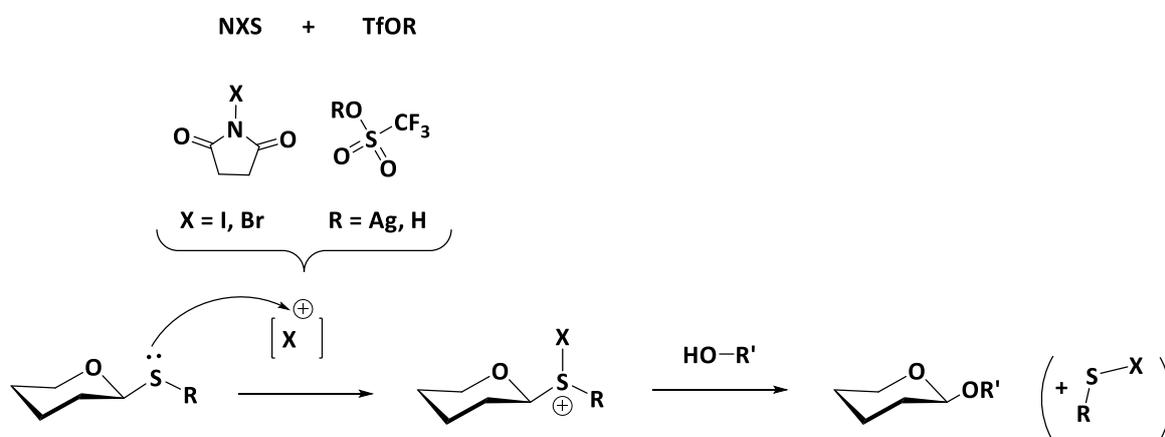


Figure 29: méthode d'activation des thioglycosides par le système *N*-halogénosuccinimide / dérivés triflate.

Cependant, ces promoteurs thiophiles peuvent s'additionner sur les liaisons π et sont généralement incompatibles avec les alcènes et / ou les alcynes. Cet inconvénient limite donc leur utilisation dans les synthèses présentant des doubles ou triples liaisons.

Tous ces dérivés énumérés précédemment font donc partie des quatre grandes catégories de promoteurs des thioglycosides. Depuis la première formation d'une liaison glycosidique par Ferrier en 1973 à partir d'un thioglycoside, Yu a répertorié en 2015, 66 promoteurs dérivés de métaux, d'halonium, de composés organosulfurés et de réducteurs³⁵, nécessitant parfois l'utilisation de

composés toxiques pour leur préparation. Ce sont aussi des composés parfois trop électrophiles qui ne peuvent pas être utilisés avec d'autres substrats nucléophiles. De nombreux promoteurs ont ainsi été développés dans le but d'être compatibles avec d'autres fonctions chimiques. Parmi les exemples cités de Yu, le promoteur thiophile triphénylbismuthdinitrate $\text{Ph}_3\text{Bi}(\text{OTf})_2$ avec le propanethiol comme additif développé par Pohl peut être mentionné³⁶. Ce promoteur présente l'avantage de glycosyler sur des donneurs désarmés des chaînes alkyls fluorés possédant une insaturation³⁷ (Fig. 30).

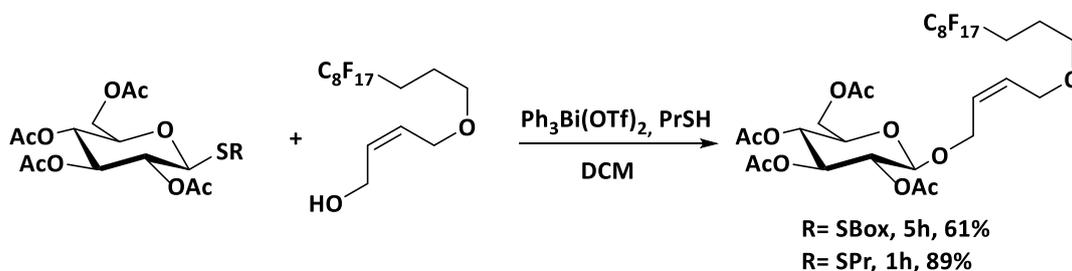


Figure 30: promoteur de thioglycosides dérivés du bismuth et compatibles avec des insaturations.

Un autre promoteur mentionné par Yu et mis au point par Wong est le *N*-(phenylthio)- ϵ -caprolactame³⁸. Ce composé permet de glycosyler des phénols (des composés difficiles à glycosyler en raison du caractère nucléophile du noyau aromatique) et d'éviter l'addition de substances électrophiles sur les liaisons π (Fig. 31).

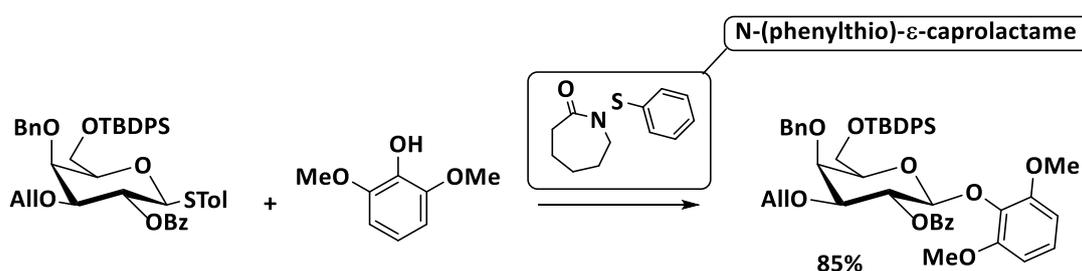


Figure 31: promoteur de thioglycoside développé pour la glycosylation de phénols.

D'autres inconvénients comme la décomposition des promoteurs ont incité le développement d'autres composés plus stables. Le très répandu NIS doit être ainsi conservé à 0 ° C, sous azote et protégé de la lumière et de l'humidité pour éviter sa décomposition³⁹. Benett a développé le sel de triflimide de phényl (trifluoroéthyl) –iodonium. Ce sel donne de très bons résultats de glycosylation et il présente l'avantage d'être stable pendant 5 jours à température ambiante et peut se conserver plus de 6 mois au réfrigérateur⁴⁰.

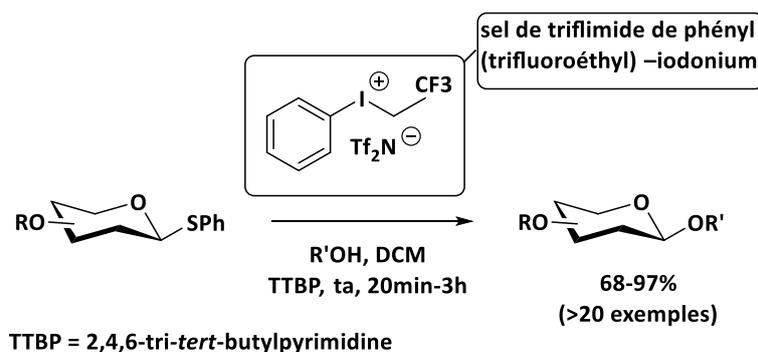


Figure 32: sel de iodonium stable développé pour l'activation des thioglycosides.

6.2.4 Réactions secondaires liées aux thioglycosides.

Malgré les avantages procurés par les thioglycosides, il existe trois réactions secondaires dont deux propres aux thioglycosides.

6.2.4.1 Hydrolyse.

Une réaction secondaire extrêmement courante observée dans les réactions de glycosylation est l'hydrolyse du donneur en hémiacétal correspondant et ce quel que soit le donneur utilisé (donneur de thioglycoside, trichloroacetimidate, halogénure, ...) (Fig. 33).



Figure 33: l'hydrolyse du donneur de glycosyle est une réaction secondaire courante.

L'hydrolyse est le résultat de la réaction entre le donneur activé et l'eau présente dans le mélange réactionnel, soit à partir de l'humidité présente dans le solvant ou l'atmosphère. L'hydrolyse parasite du donneur peut dans la plupart des cas être diminuée de manière significative en effectuant soigneusement la réaction de glycosylation dans des conditions anhydres (utilisation de solvants déshydratés, tamis moléculaire).

6.2.4.2 Transfert d'aglycone.

Pour les thioglycosides portant une fonction alcool libre, il est possible que ce thioglycoside accepteur puisse réagir avec des donneurs de glycosyls tels que les donneurs de trichloroacetimidates, d'halogénures et de sulfoxide. Dans la plupart des cas, le sulfide sert de groupement protecteur de la position anomère et le thioglycoside résultant peut être activé et servir de donneur pour la réaction suivante de glycosylation (stratégie dite orthogonale). Bundle a utilisé cette stratégie pour la première fois dans la synthèse d'un dirhamnoside⁴¹. Pour cela, les auteurs ont fait réagir un donneur de bromure sur un thioglycoside accepteur dans les conditions de Koenigs-Knorr. Le thioglycoside provenant du transfert d'aglycone a été formé et isolé comme l'un des sous-produits de cette réaction (Fig. 34) conduisant à synthétiser le dirhamnoside par une approche synthétique différente.

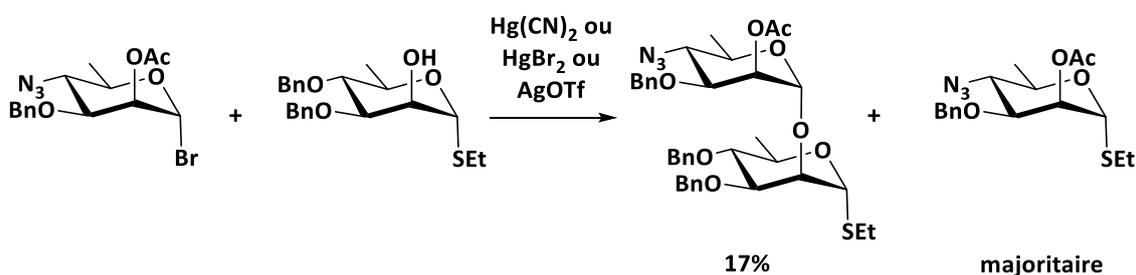


Figure 34: transfert d'aglycone observé dans la synthèse d'un dirhamnoside.

Ce type de transglycosylation des thioglycosides est maintenant bien connu et peut être maîtrisé en fonction des groupements protecteurs utilisés. Par exemple, des groupements électro attracteurs « désarmants » positionnés sur l'accepteur ne favoriseront pas le transfert d'aglycone. Le radical lié sur l'atome de soufre peut également influencer sur le transfert d'aglycone. Par exemple, en changeant l'accepteur éthyl thioglycoside par un accepteur plus encombré comme le 2,6-diméthylthiophenyl glycoside dans la synthèse d'oligofucose, Toshima n'a plus observé le transfert d'aglycone⁴² (Fig. 35).

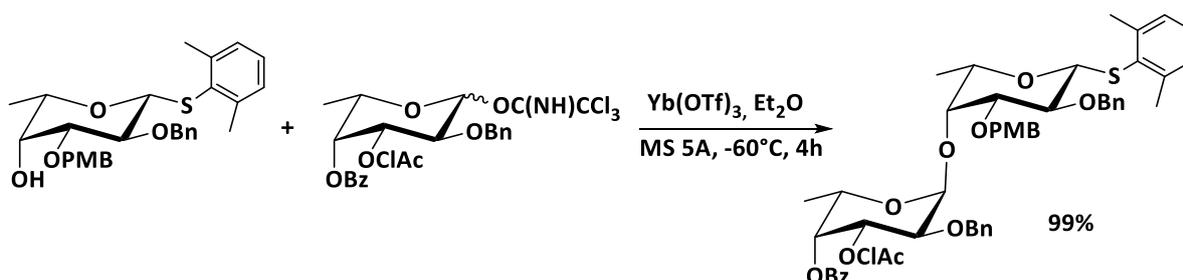


Figure 35: utilisation d'un thioglycoside « encombré » évitant le transfert d'aglycone.

6.2.4.3 Réactions secondaires liées aux promoteurs.

Le troisième type de réaction secondaire rencontrée lors de l'utilisation de thioglycosides est causé par la réactivité des promoteurs utilisés dans les glycosylations. En fonction de la réactivité du thioglycoside et de l'accepteur employés (concept « armé / désarmé »), les réactions indésirables des promoteurs seront plus ou moins notables. Ces réactions étant prévisibles, quelques exemples de la littérature peuvent être relevés et n'ont pourtant pas d'explications à fournir concernant les réactions secondaires observées. Ainsi, il a été impossible pour Gao de faire réagir le trisaccharide donneur sur le trisaccharide accepteur malgré l'emploi de promoteurs NIS/Tf(OH)⁴³. Gao a observé la formation du *N*-Succinyl glycoside qui est un sous-produit courant dans la glycosylation des accepteurs de faible réactivité en présence de NIS.

Pour éviter ce problème, Gao a alors choisi le DMTST comme promoteur. Ce dernier moins réactif que NIS n'est pas adapté pour les donneurs peu réactifs. Cependant le DMTST ne génère pas de nucléophile interférant avec la glycosylation et il est généralement employé pour éviter le sous-produit *N*-Succinyl glycoside⁴⁴. L'emploi du DMTST n'a pas non plus permis, dans ce cas, d'obtenir l'hexasaccharide attendu (Fig. 36).

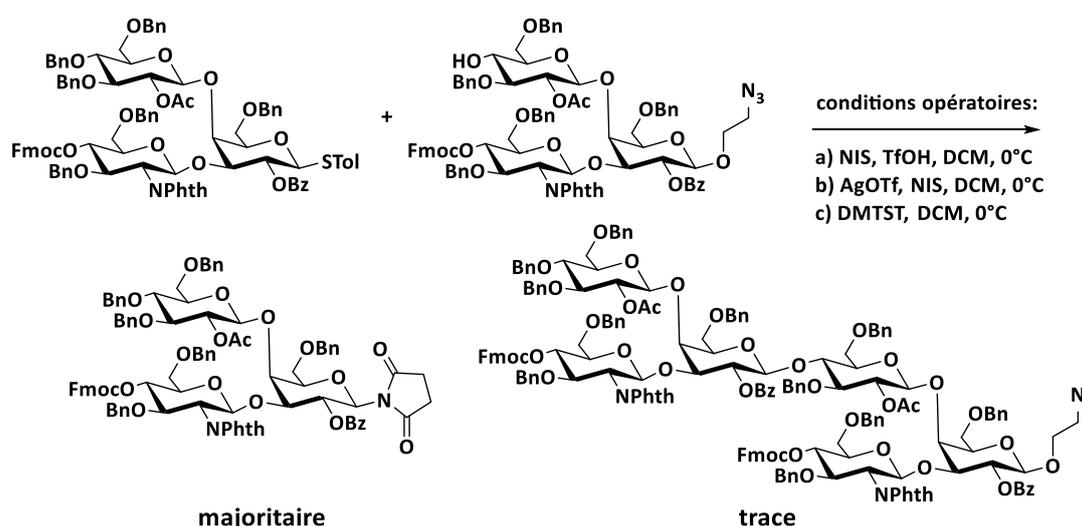


Figure 36: glycosylation impossible / formation majoritaire du *N*-Succinyl glycoside.

L'utilisation de promoteurs électrophiles peut également conduire à la formation de sous-produits. Dans la synthèse d'un disaccharide utilisant un 4-methoxy-phenyl glycoside comme accepteur et un thioglycoside comme donneur, Li a utilisé deux systèmes générant des ions halonium comme promoteur, l'un avec NBS et l'autre avec NIS⁴⁵. Le disaccharide a été obtenu avec succès, cependant il y a eu addition du brome sur le *p*-methoxyphenyl aglycone sous l'action du NBS. En revanche, l'iodation ne s'est pas produite avec l'utilisation de NIS (Fig. 37).

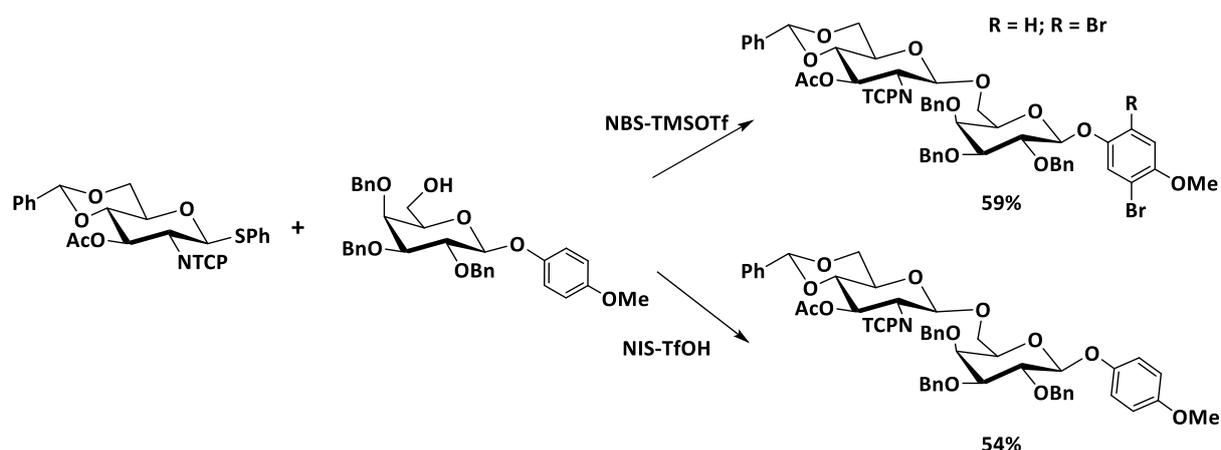


Figure 37: réaction secondaire liée à l'utilisation de promoteurs électrophiles.

D'après les travaux décrits précédemment, il est évident que la création d'une liaison glycosidique n'est pas une substitution nucléophile simple. Elle est en fait pilotée par des effets électroniques à longues distances, des participations de groupes protecteurs (due au caractère fortement cationique de l'intermédiaire) et de forts effets stériques (dus à la présence de groupes protecteurs encombrants). Ne pouvant ainsi se baser sur un protocole générique, cela demande donc une optimisation de tous les paramètres tels que le choix du groupe partant, du promoteur et des groupements protecteurs compatibles. Ces paramètres choisis, la construction de l'oligosaccharide reste ensuite un cycle de synthèse multi-étapes long se répétant jusqu'à ce que l'oligosaccharide désiré soit obtenu. Ce procédé devient inévitablement moins efficace quand la longueur de la chaîne oligosaccharidique augmente conduisant à un rendement global médiocre et au final une diminution de la quantité disponible de l'oligosaccharide. De nombreuses avancées dans le domaine de la synthèse chimique ont ainsi été développées ces vingt dernières années pour améliorer cette disponibilité avec l'arrivée des techniques de synthèses supportées. La synthèse supportée est très attractive : elle permet une synthèse rapide d'oligosaccharides sans la nécessité de chromatographier et de caractériser les intermédiaires. Un autre avantage de la synthèse supportée d'oligosaccharide est la simplicité d'élimination des réactifs en excès. Cela peut être effectué par filtration si le support est insoluble ou par extraction ou précipitation si le support utilisé est soluble.

7 Les différents supports utilisés dans la synthèse d'oligosaccharides.

La synthèse multi étape est aujourd'hui une science accomplie et un très grand nombre de molécules sont disponibles par synthèse chimique. Cependant, cette activité peut être tenue en échec par des problèmes de séparation, rendant pratiquement impossible la purification des produits et conduisant donc à une impasse. L'utilisation du support solide est aujourd'hui un outil populaire de synthèse des biopolymères tels que les peptides, l'ADN, l'ARN et plus récemment les oligosaccharides. Contrairement au support solide où la réaction se produit à l'interface entre une surface solide et la solution, le support soluble permet de procéder en phase homogène et devrait donc être plus efficace. Bien qu'elle puisse être avantageuse en termes de pureté et de quantités, la synthèse supportée en solution est beaucoup moins connue et moins standardisée.

7.1 Le support solide.

7.1.1 Introduction.

Introduite en 1963 par Merrifield⁴⁶, la synthèse sur support solide n'a été exploitée en synthèse organique qu'au cours des années 1990. Elle met en jeu un support constitué par de petites billes d'un polymère (P) insoluble, inerte dans les conditions de la synthèse. En revanche, ces polymères ont la particularité de gonfler dans les solvants utilisés (DCM, Toluène, DMF, THF, ...), ce qui assure une bonne pénétration des réactifs. L'un des partenaires (A) est fixé sur ces billes (P) par une liaison covalente. Le second partenaire (B) est alors ajouté en solution, souvent en large excès. Le produit de la réaction (A-B) reste lié au polymère insoluble et sera ainsi facilement séparé des excès de réactif et des solvants par simple filtration (Fig. 38). Ce processus peut être éventuellement répété jusqu'à ce que la molécule finale soit assemblée. La liaison qui la relie au polymère est alors clivée et le produit de la réaction récupéré dans le filtrat. La simplicité de cette méthode, qui facilite son automatisation, en a fait un outil précieux en chimie combinatoire classique comme en synthèse parallèle.

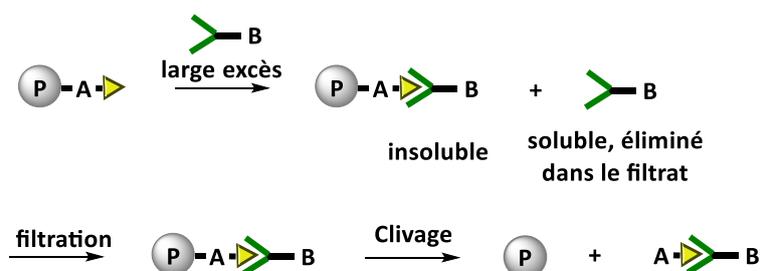


Figure 38: principe de la synthèse sur support solide.

Initialement inventé pour la synthèse de peptides, les résines ont rapidement été introduites pour la synthèse d'oligosaccharides. La première synthèse de ces biomolécules décrite sur support solide a été publiée par Fréchet et Schuerch⁴⁷. Cette synthèse a été réalisée sur un copolymère de polystyrène chlorométhylé et de divinylbenzène. Ces billes réticulées avec 1% de divinylbenzène sont largement utilisés dans tous les domaines de synthèse supportée depuis leur introduction par Merrifield (Fig. 39, résine A). Le haut degré de fonctionnalisation (charge) et la compatibilité avec de nombreuses réactions ont popularisé les résines à base de polystyrène qui sont les plus utilisées aujourd'hui. Différents supports solides avec différentes caractéristiques de gonflement ont été explorés depuis: le polystyrène greffé avec différentes longueurs de groupes de polyéthylène glycol (PEG) a conduit au développement des résines Tentagel (Fig. 39, résine B).

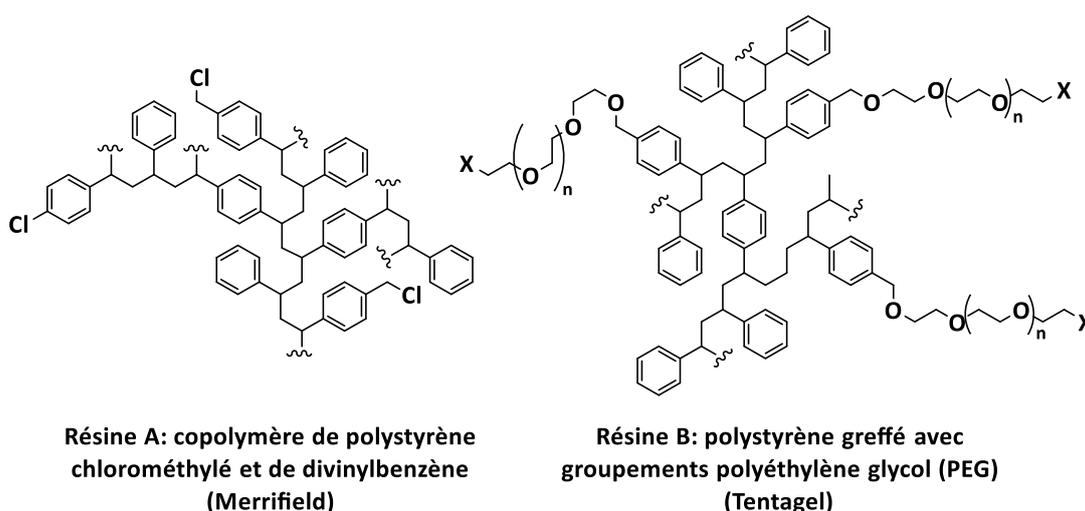


Figure 39: structure chimique des résines utilisées dans la synthèse sur support solide.

Il existe deux principales stratégies utilisées pour la synthèse en phase solide d'oligosaccharides. Dans une première approche (Fig. 40 voie A), le donneur peut être attaché directement sur le polymère. Après la réaction de glycosylation, le groupement temporaire sur l'accepteur est transformé en groupe partant approprié et les étapes d'allongement de chaîne peuvent être répétées. Cependant, le principal inconvénient de cette approche concerne le donneur lié sur le polymère. Les donneurs de glycosyl sont beaucoup plus sujets aux réactions secondaires que les accepteurs. Le donneur qui a subi une réaction secondaire, ou qui a simplement été hydrolysé, ne peut pas participer à un allongement de chaîne supplémentaire.

Dans une autre approche (Fig. 40 voie B), le polymère utilisé peut jouer le rôle d'accepteur et un donneur (construction d'oligosaccharide linéaire) ou plusieurs (construction d'oligosaccharide ramifié) doivent être synthétisés préalablement et séparément. Le donneur doit posséder des

groupements protecteurs permanents (OGP) (stables tout au long de la synthèse) et temporaires (OGP') qui après déprotection deviendront à leur tour les accepteurs de la synthèse. A la fin de la synthèse sur support solide, la liaison qui relie le premier sucre sur le polymère est alors clivée pour ainsi obtenir l'oligosaccharide désiré: Cette approche est la plus utilisée mais nécessite d'utiliser des donneurs de monosaccharides hautement réactif en solution pour augmenter les chances de formation de la liaison glycosidique avec la phase solide.

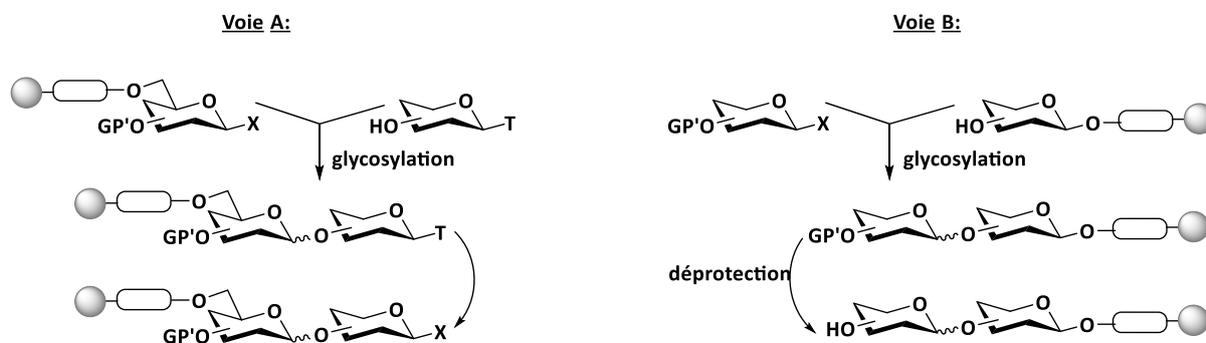


Figure 40: principe de la synthèse supportée d'oligosaccharides.

7.1.2 Bras espaceurs ou linker.

Avant de greffer le substrat désiré sur un support solide, il est souvent nécessaire d'introduire un bras espaceur ou *linker*. En effet, si le site actif est greffé directement sur le squelette du polymère, son accessibilité et donc sa réactivité peuvent être réduites par l'encombrement stérique du polymère. L'introduction d'un bras espaceur permet d'éloigner le site réactionnel supporté du réseau polymérique (Fig. 41). La préparation d'un support équipé d'un linker est indispensable dans le cas de la synthèse d'oligosaccharide en raison du poids moléculaire élevé et donc de l'encombrement stérique des donneurs protégés.

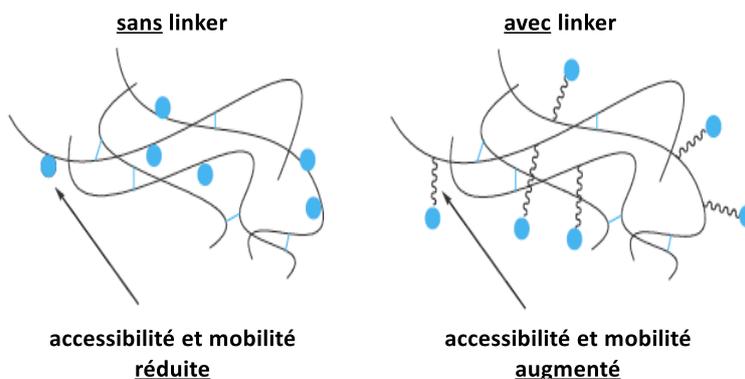


Figure 41: l'introduction d'un linker permet d'améliorer l'accessibilité des fonctions du support.

Il s'agit, le plus souvent, d'une chaîne linéaire plus ou moins fonctionnalisée qui doit être compatible avec les solvants permettant l'expansion de la maille du polymère et inerte chimiquement vis-à-vis des réactions de glycosylations.

Afin d'introduire ce bras espaceur sur le polymère, il est nécessaire d'utiliser une chaîne carbonée possédant deux groupements fonctionnels différents. L'une des deux fonctions réactives permet le greffage sur le polymère *via* la création d'une liaison covalente stable chimiquement (carbone-carbone, éther, thioéther...). La seconde fonction sert à fixer le substrat sur la résine *via* une fonction chimique plus sensible rendant possible la coupure du substrat modifié, tout en résistant aux transformations chimiques effectuées.

Le *linker* joue un rôle central dans la synthèse d'oligosaccharides sur support solide. En raison de sa nature labile, la réactivité du *linker* doit être prise en compte pour tenir compte de l'orthogonalité de tous les groupes protecteurs intervenant au cours des différentes étapes.

7.1.3 Exemple d'oligosaccharide synthétisé sur support solide.

Depuis le *linker* de Schmidt développé en 2002 pour la synthèse d'un hexasaccharide clivable en milieu basique⁴⁸ (Wu *et al.*), une nouvelle vague de *linkers* clivable par métathèse⁴⁹ (Plante *et al.*), hydrogénation⁵⁰ (Krock *et al.*) ou encore par photochimie⁵¹ (Eller *et al.*) ont vu le jour. Ces *linkers* présentent l'avantage de générer lors du clivage une nouvelle fonction permettant de fonctionnaliser l'oligosaccharide par un marqueur (biotine, peptide, sonde fluorescente, ...) pour les études biologiques ultérieures (Fig. 42).

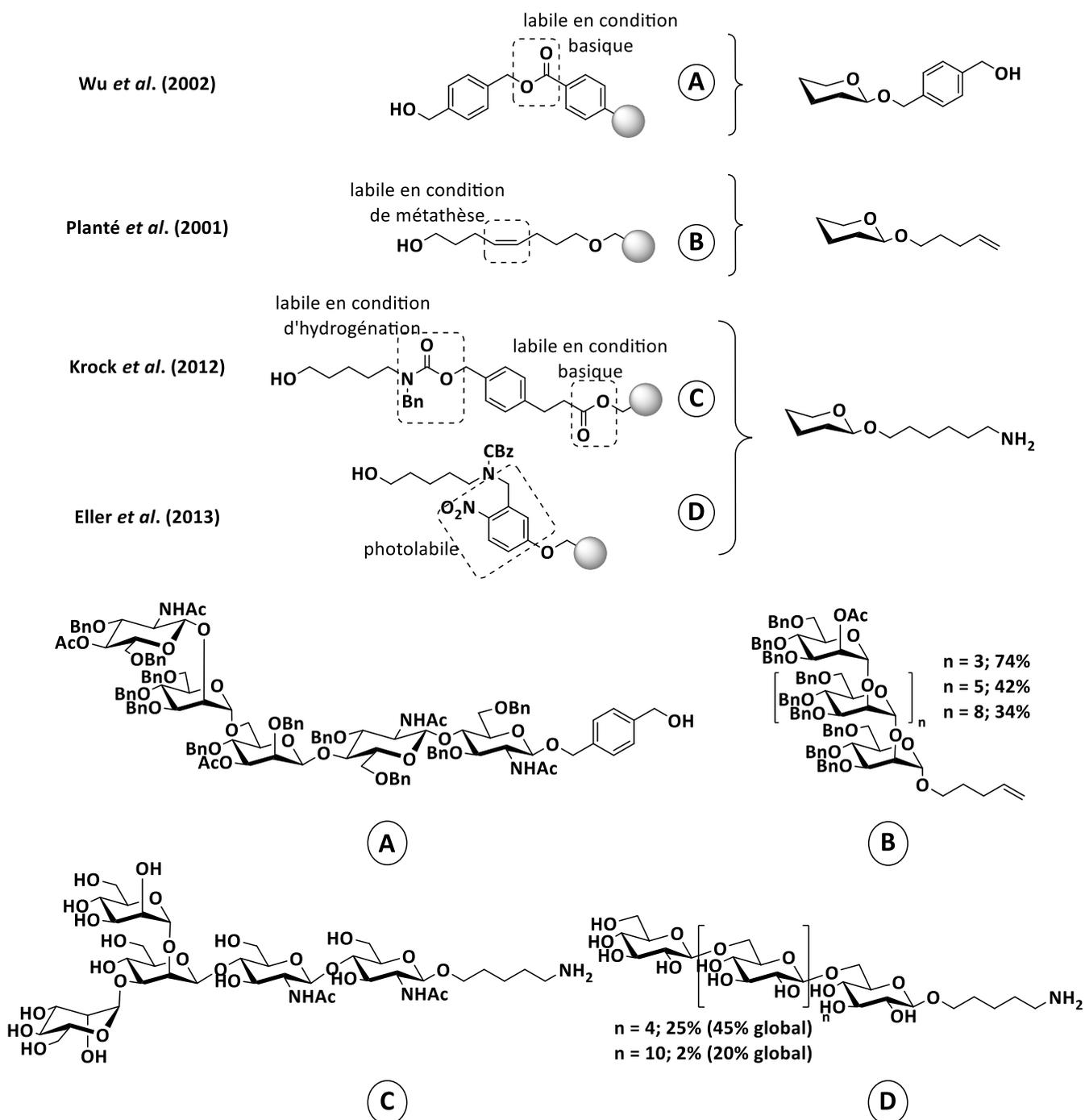


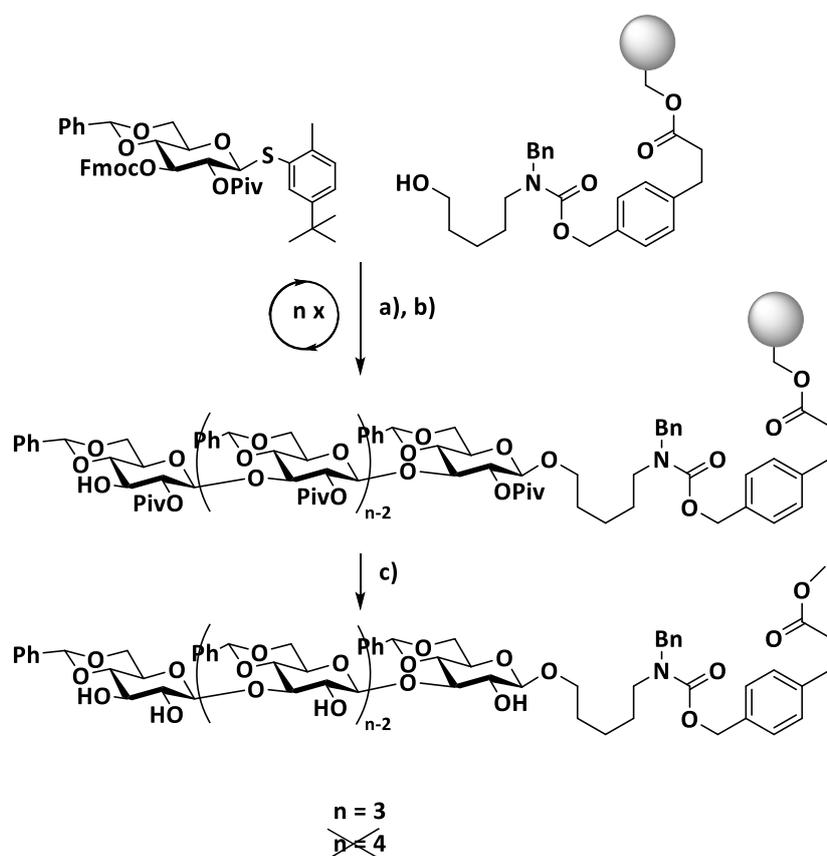
Figure 42: Exemples de linkers développés pour la synthèse supportée et oligosaccharides obtenus.

L'oligosaccharide (Fig. 42 structure D) de Seeberger a été mené en utilisant un donneur thioethyl glycoside comme bloc élongateur et le système NIS / Tf(OH) comme promoteur⁵².

Les thioglycosides sont donc appropriés dans la synthèse de longues chaînes oligosaccharidiques sur support solide. En revanche le choix du substituant lié à l'atome de soufre peut influencer sur la réactivité. Une étude parue en 2013 a montré que les thioglycosides préparés à partir du non

odorant 2-methyl-5-tert-butylphenylthiol (HSMbp) ne seraient pas adaptés aux longues séquences de synthèse sur support solide⁵³.

L'assemblage des $\beta(1 \rightarrow 3)$ glucanes a été réalisé en utilisant 3 équivalents du thioglycoside en présence de NIS / Tf(OH) avec 3 cycles de répétition pour chaque couplage. Les tentatives de synthèse du tétrasaccharide linéaire ou de glucanes plus longs n'ont cependant pas été couronnées de succès. Dans tous les cas, la structure la plus longue détectée par ESI-MS était un trisaccharide (Fig. 43).

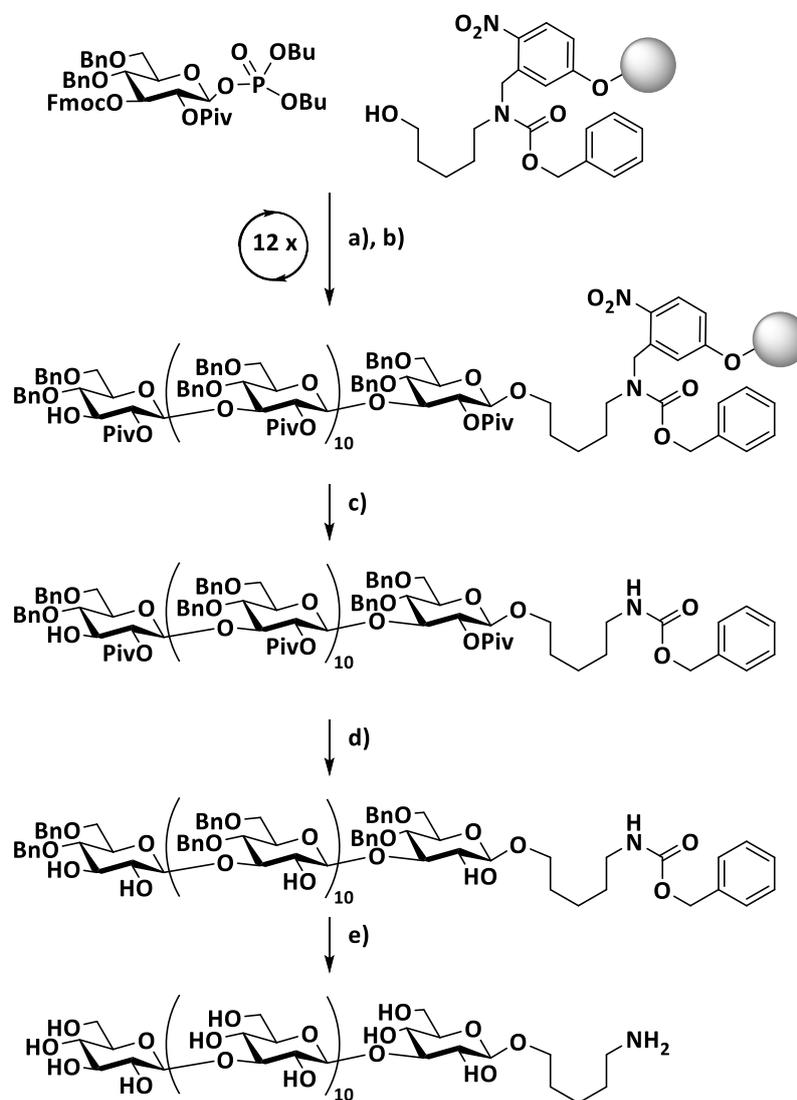


réactifs et conditions: a) 3 x 3 équiv thioglycoside, NIS, TfOH, DCM / dioxane, -40 °C (5 min) à -10°C (40 min); b) pipéridine (20% v/v), DMF, RT, 15min (3 x); c) NaOMe, MeOH, DCM.

Figure 43: synthèse supportée d'un $\beta(1 \rightarrow 3)$ glucane tétrasaccharide incompatible avec un donneur thioglycoside.

Les chromatogrammes HPLC des produits bruts correspondaient à ceux de la synthèse du trisaccharide et, par conséquent, cette approche a été abandonnée. Seeberger a supposé que le benzylidène, en combinaison avec l'encombrement stérique des autres groupes protecteurs engendre une distorsion conformationnelle sur le donneur de thioglycoside, ce qui empêche l'allongement de la chaîne après le stade trisaccharide. Le donneur de thioglycoside a été modifié en

remplaçant le rigide benzylidène par des groupements benzyle. Pour s'assurer d'une meilleure réactivité, le groupe anomérique partant du thioglycoside a été remplacé par le groupement plus réactif dibutylphosphate⁵⁴. Par ce procédé, Seeberger a synthétisé un $\beta(1 \rightarrow 3)$ glucane dodécasaccharide en 56 h avec un rendement moyen de 88% par étapes (Fig. 44).



réactifs et conditions: a) 3×3 équiv donneur phosphate, TMSOTf, DCM, -15°C (45 min) à 0°C (15 min); b) pipéridine (20% v/v), DMF, RT, 15min (3 x); c) *h* ν , DCM. d) NaOMe, MeOH, DCM. e) Pd(OH)₂, H₂, THF, H₂O, AcOH.

Figure 44: synthèse supportée d'un $\beta(1 \rightarrow 3)$ glucane dodécasaccharide avec un donneur phosphate.

7.1.4 Synthèse d'oligosaccharides assistée par HPLC

En 2012, Demchenko a développé un nouveau système expérimental basé sur un appareil HPLC⁵⁵ (Fig. 45). Dans cette configuration, le support utilisé est une colonne en verre remplie de billes de résines TentaGel-NH₂. La colonne est ensuite connectée au système HPLC composé d'une pompe à

piston, d'un détecteur UV et d'un ordinateur servant à piloter l'appareil via un logiciel de gestion HPLC standard. L'accepteur de glycosyl a préalablement été couplé à la résine avant l'insertion de cette dernière dans la colonne. Deux solutions différentes ont ensuite été préparées : l'une contenant le donneur de trichloroacetimidate et l'autre le triflate de triméthylsilyle TMSOTf. Les deux solutions ont ensuite été mélangées dans la tête de pompe puis le donneur activé résultant a été délivré dans la colonne. Le système est ensuite purgé avec un solvant laissant la résine propre avec le disaccharide attaché qui a été allongé par des cycles de déprotection-glycosylation.

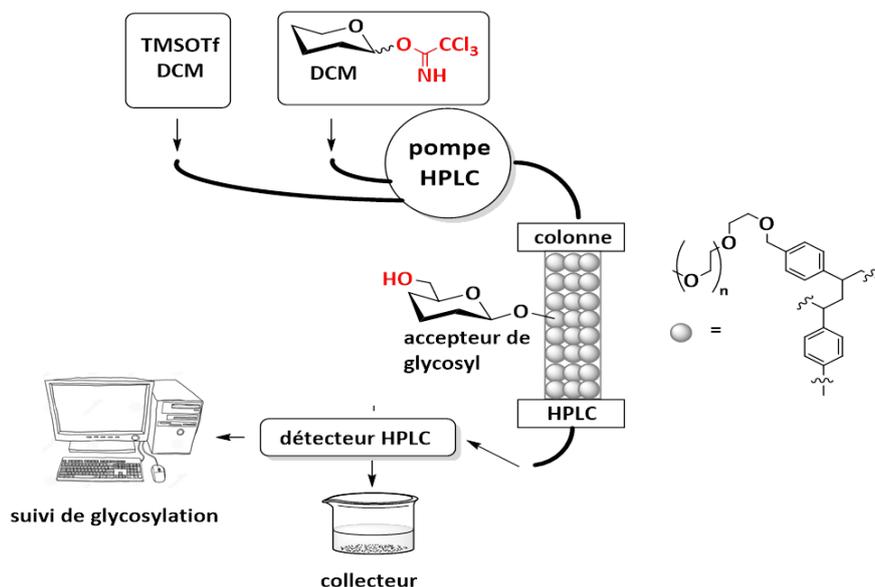


Figure 45 : principe de synthèse d'oligosaccharides assisté par HPLC développé par Demchenko.

Demchenko et ses collègues ont ainsi synthétisé de manière supportée un pentasaccharide. Le composé a ensuite été clivé du support solide en utilisant une solution de recirculation de méthanolate de sodium NaOMe dans du méthanol-dichlorométhane. Après acétylation, le pentasaccharide a ainsi été obtenu avec un rendement de 62% en 7 heures (Fig. 46).

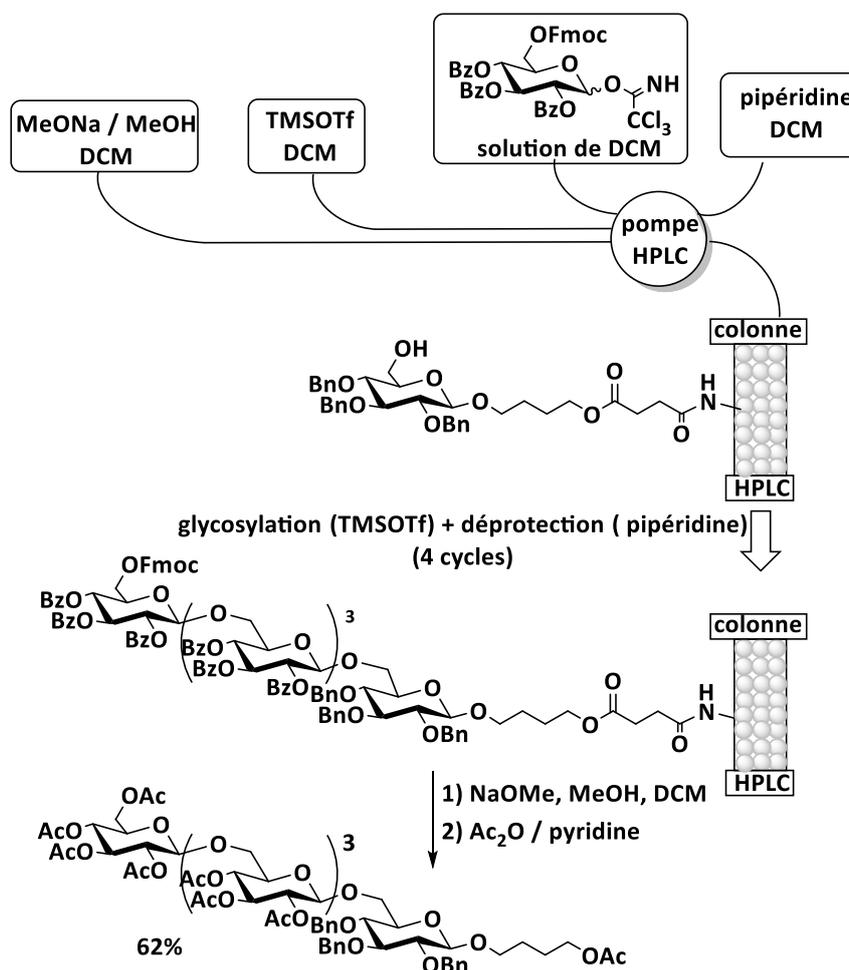


Figure 46: synthèse assistée par HPLC d'un tétrasaccharide.

Cette approche de synthèse supportée assistée par un système HPLC a été une première dans la synthèse d'oligosaccharides. Cette première application a révélé en 2013 son potentiel et en 2020 Demchenko a renouvelé une synthèse assistée par HPLC en optimisant le procédé⁵⁶. L'accepteur de glycosyl est toujours conjugué à la résine avant son introduction dans une colonne en verre et connexion au système HPLC. Contrairement au travail précédent de Demchenko, plusieurs vials HPLC contenant le donneur, le promoteur, la solution de déprotection et la solution de clivage ont été préparés. Ces vials contenant un volume de 3 à 6mL de solvant chacun sont ensuite disposés dans le plateau de l'échantillonneur automatique. Toutes les étapes suivantes sont automatisées en programmant le logiciel d'exploitation standard sans intervention manuelle. Les glycosylations sont divisées en deux interactions de 5 injections chacune. Le donneur et le promoteur sont prélevés des vials, mélangés dans le siège de l'aiguille et injectés. Une fois que le donneur activé a traversé la colonne, la même opération est répétée. La résine est lavée avec du DCM et du DMF et 5 autres injections sont effectuées. Les réactions de glycosylations sont ainsi répétées afin d'obtenir un maximum de taux de greffage et limiter les pertes de rendements. Après 4 étapes de glycosylations /

déprotection, le pentasaccharide supporté est clivé de la résine avec le passage d'une solution de méthanolate de sodium. Le composé est ensuite prélevé et manipulé à travers une série d'étapes de post-automatisation. Ces étapes comprennent l'acétylation avec de l'anhydride acétique dans la pyridine et la purification par chromatographie sur colonne jusqu'au pentasaccharide final avec un rendement global de 33%. Le résultat représente un rendement moyen de 86% par étape (Fig. 47).

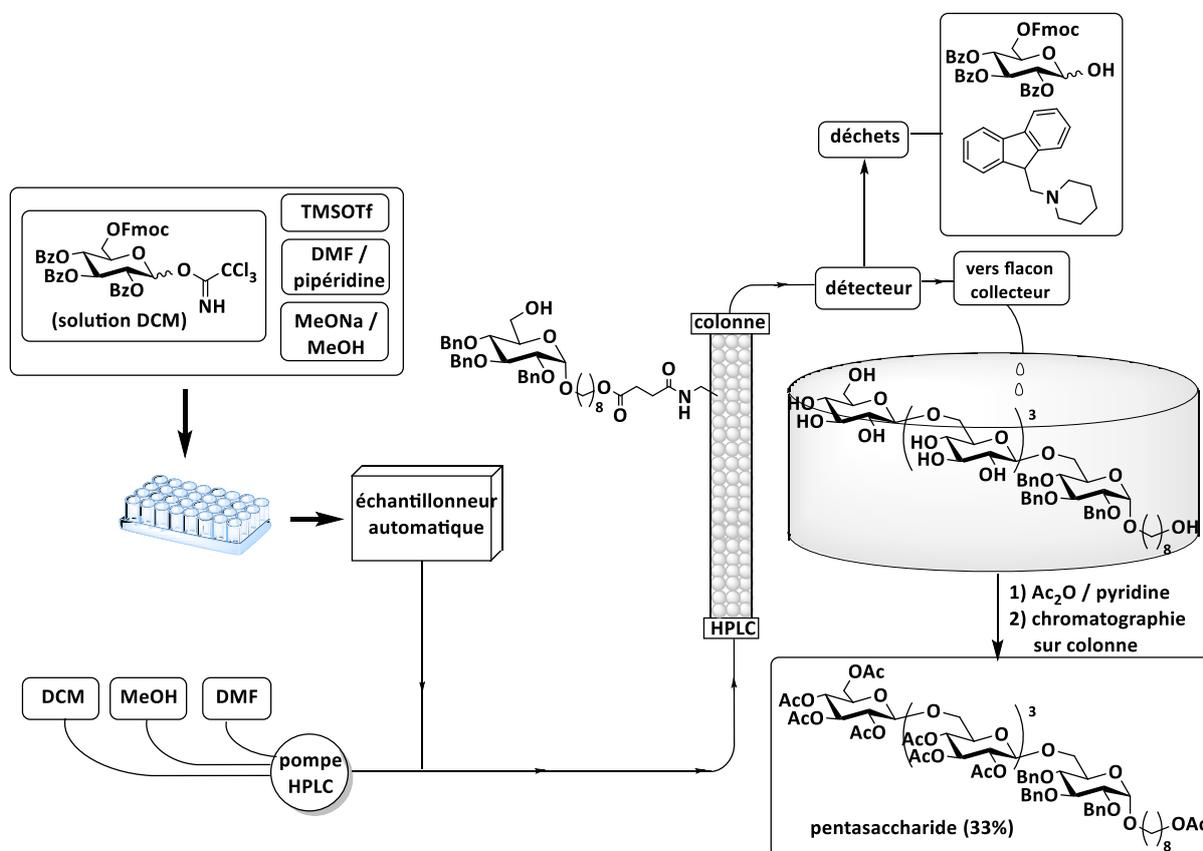


Figure 47: synthèse assistée par HPLC d'un pentasaccharide (les solvants et réactifs sont stockés dans des vials de 3 à 6 mL).

Ce procédé marque une avancée dans l'automatisation de synthèse d'oligosaccharide. En effet, la disposition d'une HPLC équipée d'un échantillonneur automatique est quelque chose de courant dans les laboratoires et le procédé ne nécessite pas de logiciel spécifique. Ainsi, un quelconque appareil HPLC peut être transformé en synthétiseur automatique d'oligosaccharides.

7.1.5 Bilan de la synthèse sur support solide.

Il est indéniable que la synthèse sur support solide est une technique qui a fait ses preuves dans la construction de très longues chaînes oligosaccharidiques.

La synthèse sur phase solide utilisant comme support un polymère insoluble a largement été utilisée dans la préparation de nombreuses molécules d'intérêt biologique. Ce procédé est maintenant mécanisé par Seeberger qui a décrit en 2012 le premier synthétiseur d'oligosaccharides en phase solide entièrement automatisé⁵⁰.

Toutefois son principal désavantage est que la réaction s'effectue sur une surface solide limitant l'accès des composés solubles aux fonctions réactives du support. Quelle que soit la stratégie envisagée sur support solide, les réactifs, donneur ou accepteur, doivent être ajoutés avec un large excès au cours de la réaction afin de favoriser la rencontre des sites réactionnels.

Dans le cas de la synthèse peptidique sur support, l'ajout de réactifs en excès n'est pas problématique en raison de la disponibilité et du faible coût des blocs aminoacides commerciaux. Les donneurs/accepteurs de glycosyl sont quant à eux obtenus via des synthèses multi étapes parfois coûteuses, ce qui implique d'obtenir des composés hautement réactifs pour la synthèse sur support solide afin d'en limiter les pertes (il y a souvent plus d'étapes pour faire les blocs que d'étapes dans la suite de la synthèse). Les conditions hétérogènes et l'accès difficile des sites réactionnels impliquant la synthèse à grande échelle des précurseurs ont limité l'utilisation de manière universelle le support solide dans la glycoscience. En remplaçant les résines réticulées insolubles par des supports solubles, les conditions de réaction habituelles de la chimie organique classique sont rétablies. Les supports solubles ont de cette manière trouvé leur application dans la synthèse d'oligosaccharides.

7.2 Le support soluble.

7.2.1 Introduction.

Les supports solubles peuvent être des polymères ou des petites molécules appelées *tags* (signifiant étiquette en anglais). Selon les conditions opératoires, ces supports possèdent des propriétés physico-chimiques différentes utilisées pour isoler les intermédiaires de synthèse. Par exemple, dans le cas des polymères solubles, la solution est diluée avec un solvant induisant la précipitation du support macromoléculaire. De manière analogue à la synthèse en phase solide, le mélange hétérogène résultant est filtré pour isoler le conjugué polymère-sucre tandis que les réactifs en excès et les impuretés sont éliminés par rinçage.

D'autres techniques de synthèse combinant les avantages des deux supports (synthèse en phase solide et phase liquide) utilisant des méthodes originales ont été développées pour la synthèse d'oligosaccharides. La synthèse supportée sur un polymère soluble, l'attache d'un tag fluoré, d'une

chaîne hydrophobe ou encore la synthèse supportée sur liquide ionique sont quelques exemples qui peuvent être cités. Toutes ces méthodes évitent ainsi l'étape de la chromatographie sur colonne.

7.2.2 Quelques exemples de synthèse supportée d'oligosaccharides en solution.

7.2.2.1 Synthèse supportée sur polymère de polyéthylène glycol (PEG).

Les premières tentatives de développement de la synthèse d'oligosaccharide sur un support soluble de type polymère ont été rapportées dans les années 1970⁵⁷.

Leur succès a été limité et seuls des di- et trisaccharides simples ont pu être obtenus. En 2003, Geert-Jan Boons a utilisé le pentaérythrytol et le tripentaérythrytol sur lesquels ont été greffées des chaînes polyéthylène glycol (PEG) comme support pour la synthèse de glucanes $\beta(1 \rightarrow 6)$ ⁵⁸. Ces polymères commerciaux (4ARM PEG et 8ARM PEG) sont solubles dans les conditions de glycosylation et peuvent être rendu insoluble par simple addition d'éther diéthylique ou de méthyl tert-butyl éther. Boons a préalablement greffé sur ces polymères le 4-hydroxybenzoate de méthyl comme *tag* UV puis saponifié l'ester méthylique. Ces 2 polymères dérivés du PEG ont ensuite été utilisés dans la synthèse supportée d'oligosaccharides. Boons a préalablement attaché par estérification le glucoside muni d'un ester levunoyl (OLev) en position C-6 et d'une partie *p*-hydroxybenzyl sur la position anomérique. Ensuite par un procédé itératif utilisant seulement 1.5 équivalent de donneur, les promoteurs NIS/Tf(OH) et l'hydrazine comme réactif de déprotection du Lev, Boons a synthétisé deux $\beta(1 \rightarrow 6)$ glucanes. Les intermédiaires de synthèse ont été purifiés par précipitation dans l'éther dans le cas du 4ARM PEG (Mw ~ 10.000 Da) et par nanofiltration dans le cas du 8ARM PEG (Mw ~ 40.000 Da) (Fig. 48)

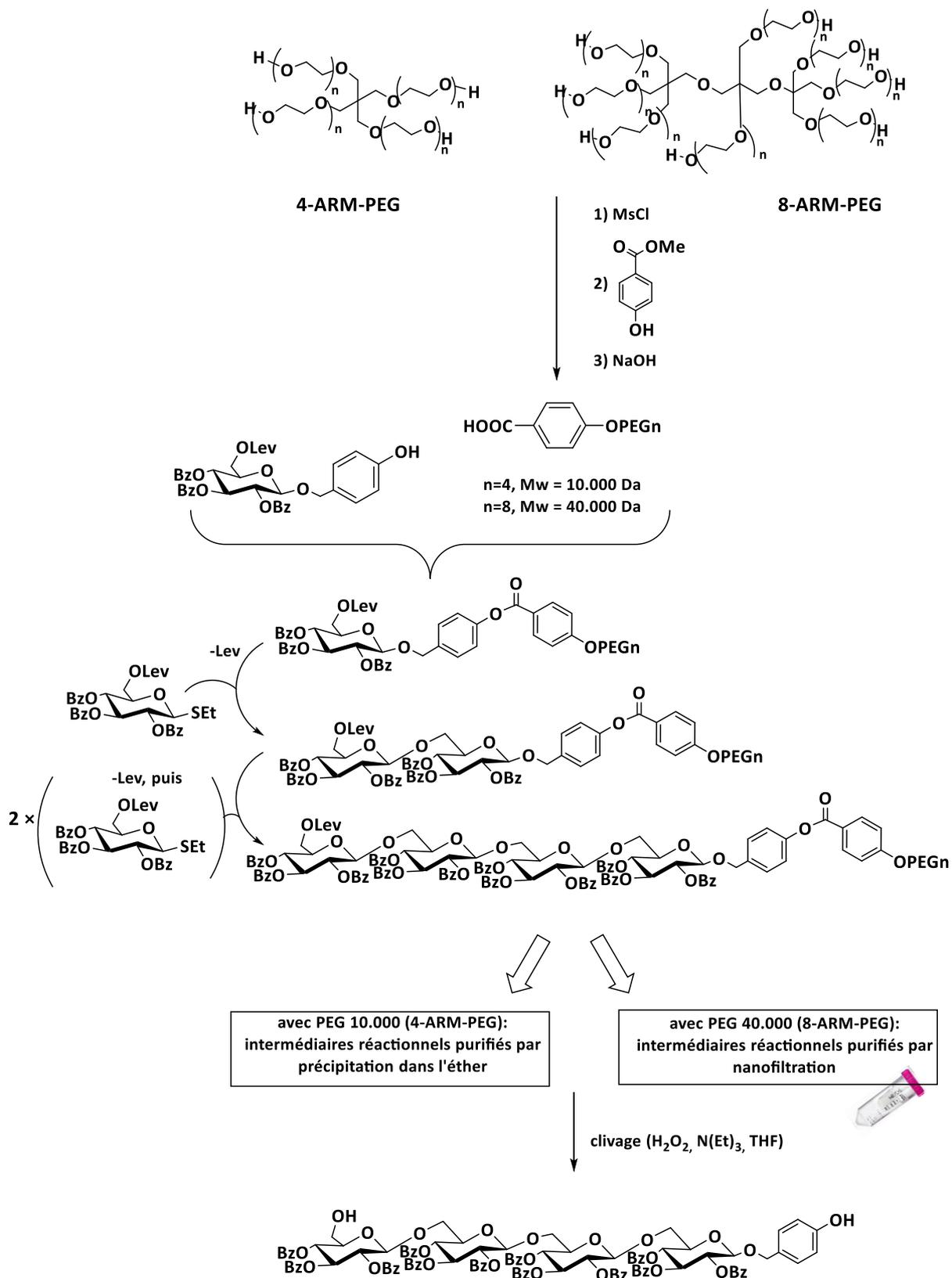


Figure 48: synthèse supportée d'un $\beta(1 \rightarrow 6)$ glucane tétrasaccharide sur chaines PEG.

7.2.2.2 Synthèse supportée sur polymère de poly(2-hydroxyéthylmethacrylate) (pHEMA).

En 2018, l'équipe de Steven J. Sucheck a utilisé le poly(2-hydroxyéthylmethacrylate) (pHEMA) comme polymère dans la synthèse supportée d'un trisaccharide présent chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁹. Le pHEMA a été utilisé dès 1960 pour la fabrication des lentilles de contact souples et hydrophiles⁶⁰ (Fig. 49).

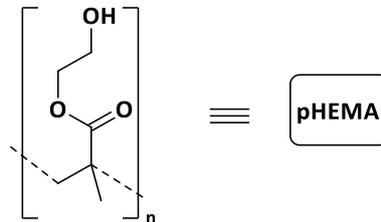


Figure 49: structure chimique du poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA).

Les auteurs de ce travail ont également utilisé un linker dérivé o-nitro benzylé qui a la propriété d'être photoclivable. Cette méthode liée à la photochimie présente l'avantage de se faire dans des conditions douces sans sous-produit généré. Le mécanisme de clivage est identifié comme étant une réaction de Norrish de type II décrite pour la première fois en 1935⁶¹. Norrish a expliqué qu'un photon incident rompt la liaison N = O dans le groupe nitro, amenant le substrat protégé dans un état excité biradical. Par la suite, le radical azote arrache un proton du carbone benzylique, formant un composé aci-nitro. Les électrons π de l'intermédiaire se réarrange par la suite favorisant la formation d'un anneau à cinq chaînons. Le clivage est alors possible formant du 2-nitrosobenzaldéhyde supporté facilement éliminable (Fig. 50).

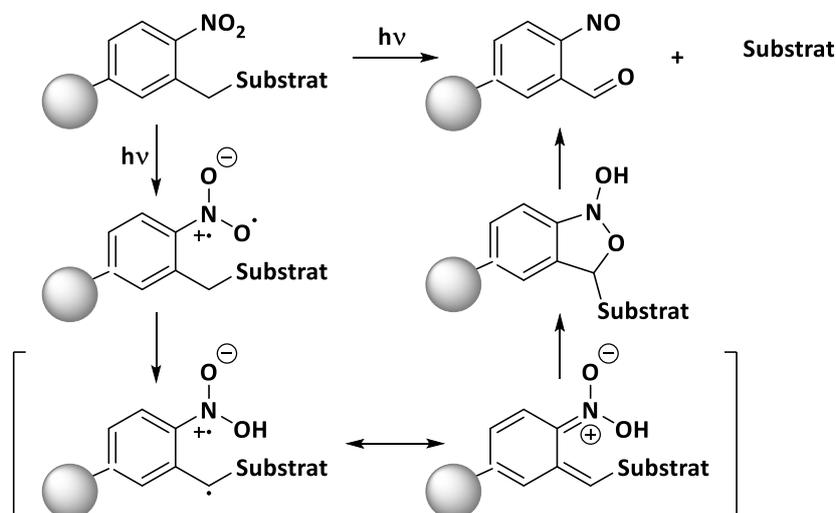


Figure 50: application de la réaction de Norrish dans le développement de *linker* photoclivable.

Cette réaction photochimique a été utilisée par P. Seeberger dans la mise au pont d'un linker photoclivable et il est régulièrement utilisé depuis dans la synthèse d'oligosaccharide sur support solide. Basé sur le même principe, l'équipe de Steven J. Sucheck a mis au point un linker photoclivable à partir du *t*-butyl-4-(bromométhyl)-3-nitrobenzoate et de l'hydroquinone protégé par un groupement TBDPS en présence de K_2CO_3 et de TBAI. Le groupement TBDPS est ensuite enlevé avec de l'acide fluorhydrique dans la pyridine. La première glycosylation sur ce précurseur est ensuite effectuée dans les conditions classiques de synthèse avec un donneur de thioglycoside et le système NIS/Tf(OH) comme agent promoteur. L'ester tertbutylique est ensuite hydrolysé en présence de TFA pour fournir le dérivé glucoside fonctionnalisé par un acide (Fig. 51). Ce deuxième précurseur servant de point de départ dans la construction de l'oligosaccharide est ensuite couplé sur le pHEMA dans des conditions classiques de synthèse utilisant EDC-DMAP. La réactivité des fonctions alcools du pHEMA n'ayant pas réagi sont bloqués (*capping*) avec du chlorure d'acétyle (AcCl). L'intermédiaire de synthèse est facilement isolé par précipitation dans le méthanol. Les réactions suivantes pour la construction du trisaccharide (déprotection puis glycosylation) sont ensuite réalisées avec des thioglycosides et chaque intermédiaire de synthèse est isolé par précipitation dans le méthanol. L'oligosaccharide est ensuite clivé du support par photochimie et le trisaccharide protégé est ainsi obtenu avec un rendement global de 39% (Fig. 52).

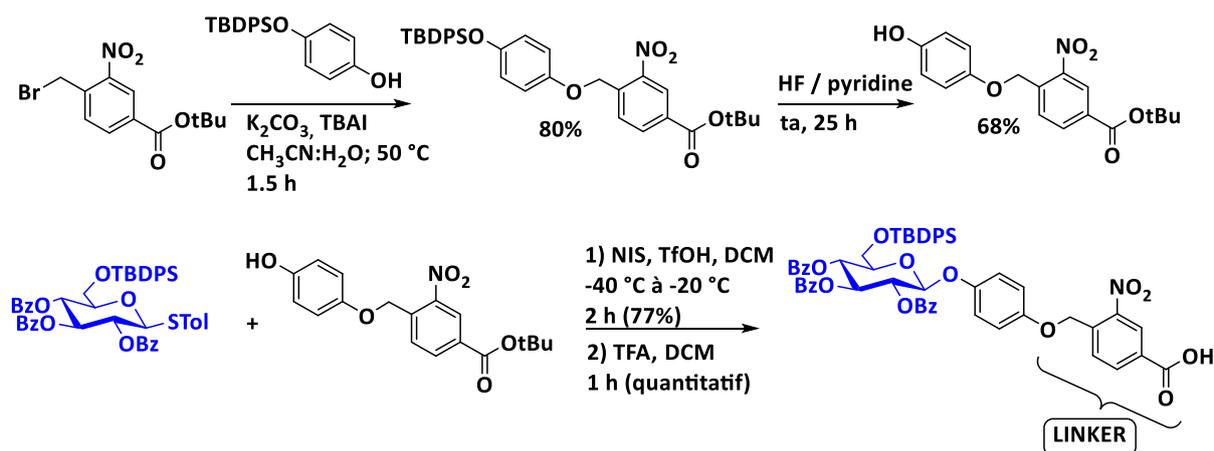


Figure 51: synthèse du monosaccharide précurseur équipé d'un linker photoclivable.

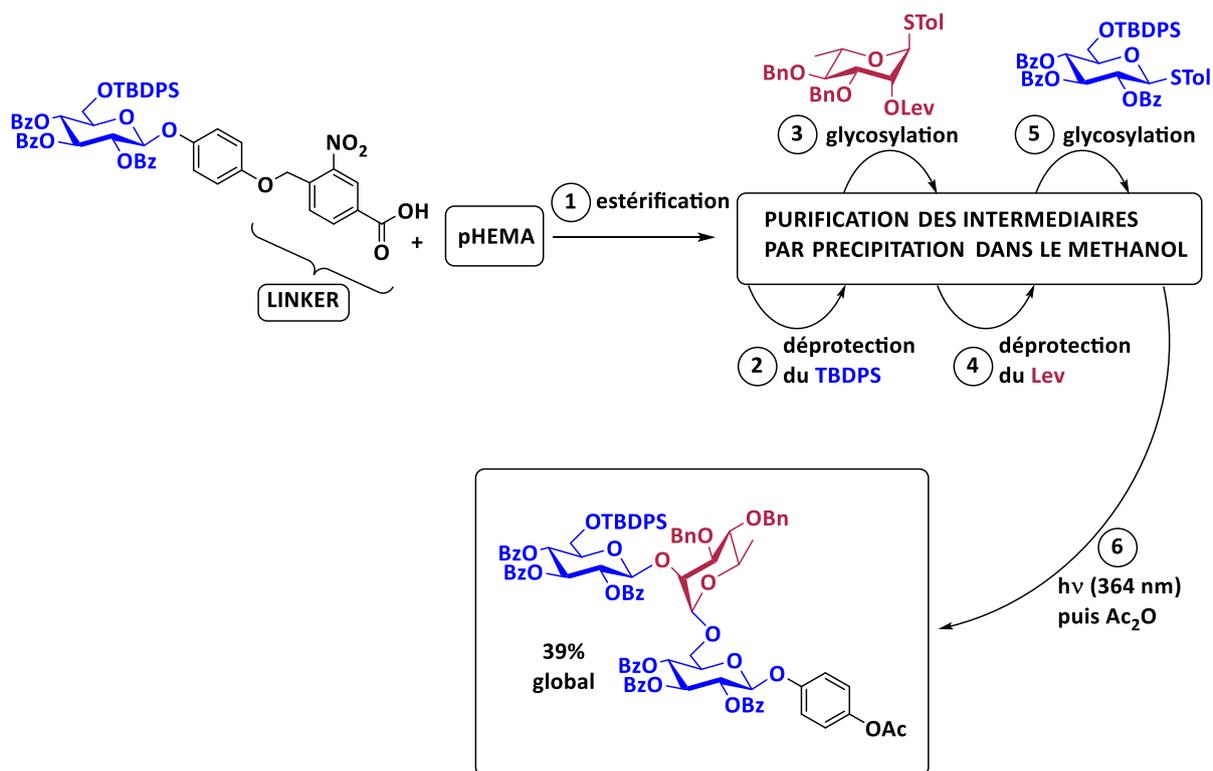


Figure 52: utilisation du précurseur de la fig 51 pour la synthèse supportée sur pHEMA d'un trisaccharide présent chez *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁹.

7.2.2.3 Synthèse d'oligosaccharides sur support fluoré.

Un solvant fluoré tel que le perfluorohexane est insoluble dans la plupart des solvants organiques et dans l'eau, et un mélange de ces trois types de solvants formera trois couches.

Depuis que Horváth et Rábai ont utilisé ces propriétés pour introduire le concept du système biphasique fluoré en 1994⁶², la chimie fluorée s'est beaucoup développée dans le domaine de la synthèse chimique. Un composé hautement fluoré est facilement séparé des composés non fluorés par une simple séparation de phase organique fluorée. Une des premières synthèses d'oligosaccharide utilisant ces propriétés a été rapportée en 2001 par Miura *et al.*⁶³. Les auteurs de cette étude ont introduit un *tag* fluoré à l'accepteur de glycosyle afin de synthétiser efficacement des oligosaccharides à longue chaîne. L'accepteur de glycosyle contenant le *tag* fluoré se couple avec le donneur de glycosyle pour donner le disaccharide fluoré. Après la séparation du mélange réactionnel avec des solvants organiques fluorés et normaux, le disaccharide fluoré et la quantité en excès du donneur de glycosyle sont extraits respectivement par la phase fluorée et la phase organique. Après déprotection sélective, la répétition de cette procédure donne l'oligosaccharide fluoré, qui est purifié par extraction liquide-liquide sans chromatographie sur colonne. Enfin, le *tag* fluoré est clivé pour

donner l'oligosaccharide souhaité extrait avec un solvant organique. Le tag quant à lui est extrait par un solvant fluoré et est recyclé (Fig. 53).

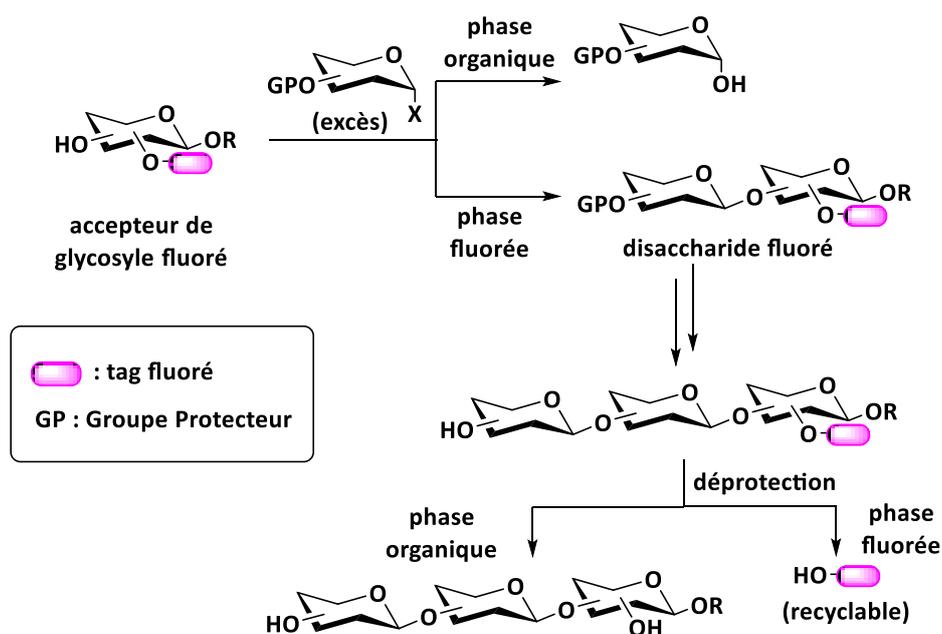


Figure 53: utilisation des interactions fluor-fluor dans la synthèse d'oligosaccharides.

Les auteurs ont utilisé cette méthode et attaché une chaîne bifluorée liée sur un groupement propanoyl (Bfp) utilisé comme groupement protecteur: Ce groupement Bfp a été attaché sur les 3 alcools secondaires de l' α -méthyl-D-Glucose. Cet accepteur a servi de point de départ dans la construction d'un tétrasaccharide. Chaque intermédiaire de synthèse a ainsi été purifié par simple extraction: Les composés fluorés ont été extraits avec le solvant FC72 (solvant fluorocarboné commercial composé d'isomères du perfluorohexane C_6F_{14}) et les autres composés avec des solvants organiques traditionnels (toluène, méthanol) (Fig. 54).

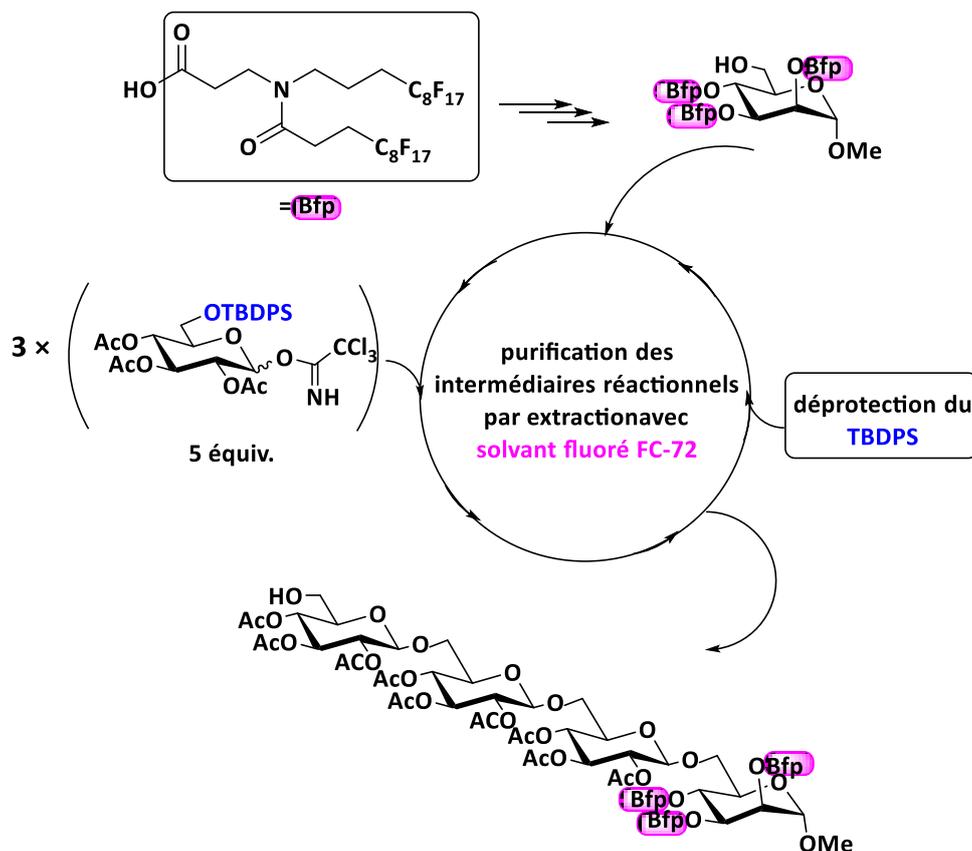


Figure 54: synthèse d'un $\beta(1 \rightarrow 6)$ glucane utilisant un groupement protecteur fluoré comme support.

Cette technique innovante utilisant un support fluoré a été avancée dans la synthèse d'oligosaccharide malgré la nécessité des 8 à 20 équivalents de donneurs nécessaires et le prix élevé du solvant FC72 utilisé. Les propriétés physico-chimiques des composés fluorés et la course à la purification idéale ont incité le développement de nouveaux moyens de purification telle que l'Extraction en Phase Solide Fluorée (FSPE). Introduite en 1997⁶⁴, son principe consiste à greffer des chaînes perfluorées de type dimethyl[2-(perfluorohexyl)ethyl]silyl sur les silanols Si-OH présents à la surface de gel de silice standard. Ce gel de silice fluoré est ensuite utilisé comme phase stationnaire en chromatographie liquide classique (Fig. 55).

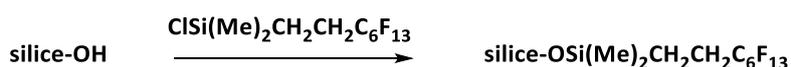


Figure 55: fonctionnalisation de silice par des chaînes perfluorées pour la purification par FSPE.

De cette manière en déposant un brut de glycosylation contenant un composé hautement fluoré sur ce gel modifié, un lavage fluorophobe, comme un mélange de 20% d'eau dans le méthanol, élimine seulement les molécules non fluorées. Les molécules fluorées sont retenues sur le gel de silice

modifié. Puis, un lavage fluorophile, comme le méthanol ou le THF, est utilisé pour éluer les molécules fluorées de la phase stationnaire (Fig. 56).

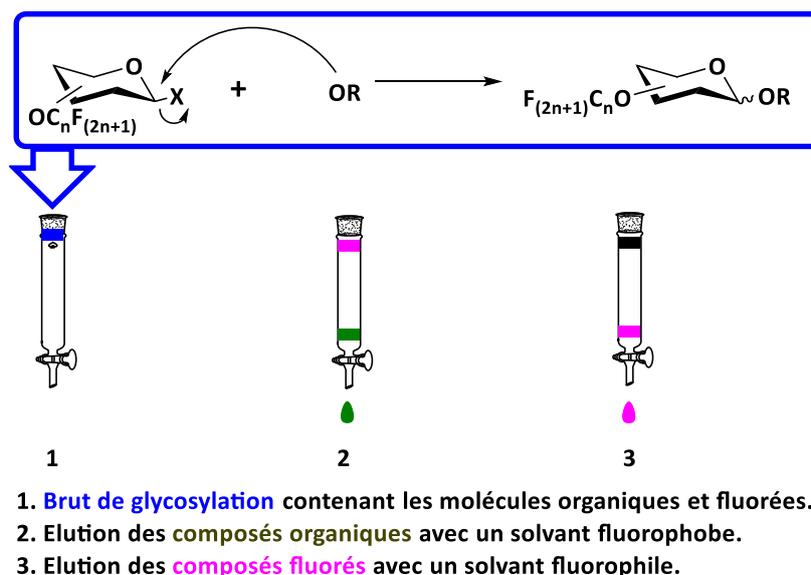


Figure 56: principe de purification par Extraction en Phase Solide Fluorée (FSPE).

La FSPE a été ensuite exploitée dans la synthèse d'oligosaccharide et le premier oligosaccharide synthétisé utilisant cette technique a été décrit par Nicola L. Pohl⁶⁵. Dans ce travail, Pohl a dans un premier temps préparé un *tag* fluoré⁶⁶ portant une fonction alcène (Fig. 57).

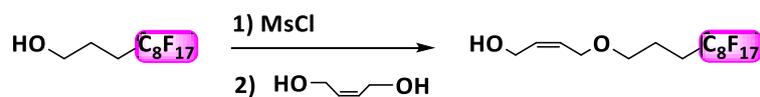


Figure 57: préparation d'un tag fluoré.

Pohl a ensuite glycosylé cette molécule fluorée sur un donneur de trichloroacétimidate benzylé. La fonction alcène permettra de cliver la chaîne fluorée de l'oligosaccharide et de générer une nouvelle fonction pour incorporer d'autres structures. Une fois le *tag* attaché, le sucre fluoré est purifié par FSPE. Le méthanol (solvant fluorophile) permettant d'éluer le composé est traité avec de la soude 0.5M pour déacétyler le composé et de limiter le nombre d'étapes. Les étapes de glycosylation et de déprotection ont été répétées pour respectivement obtenir le di-, tri- et tétrasaccharide linéaire (Fig. 58).

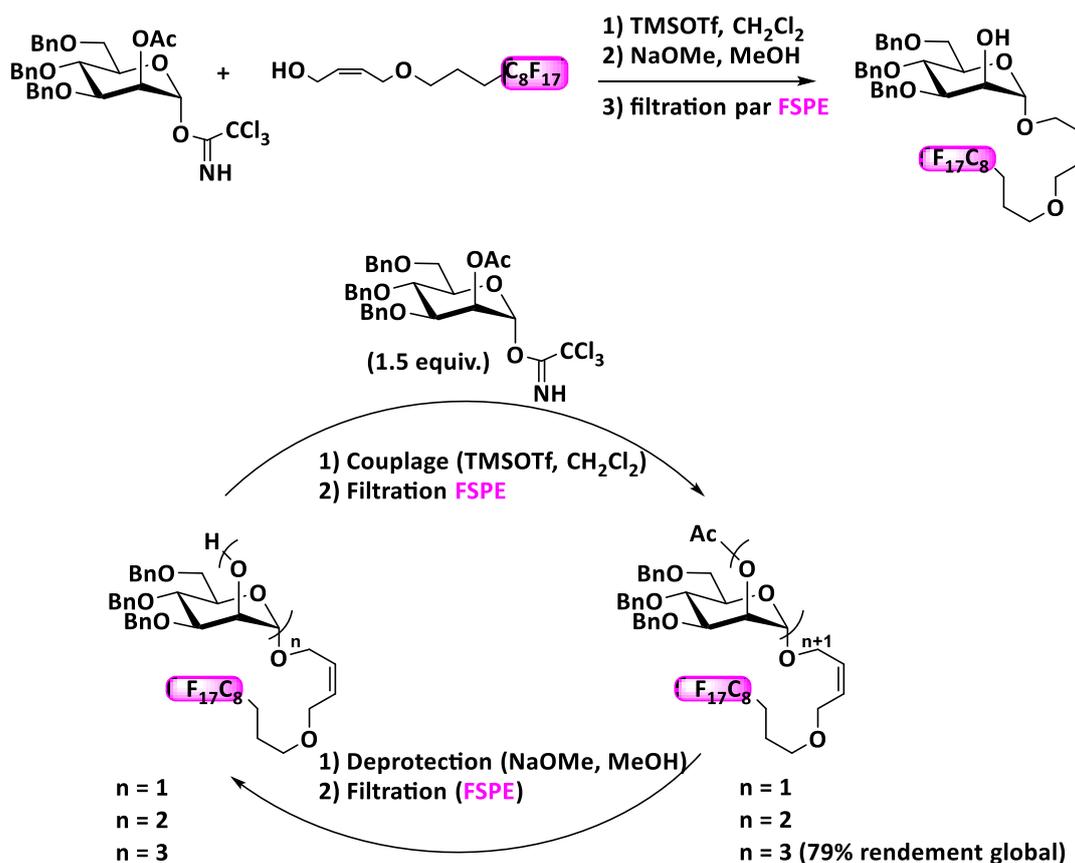


Figure 58: synthèse des $\alpha(1 \rightarrow 2)$ oligomannosides par FSPE.

Le $\alpha(1 \rightarrow 2)$ tétramannoside a été synthétisé avec un rendement global de 79% à partir du monosaccharide de départ utilisant 6 équivalents de donneurs et chaque intermédiaire a été purifié par FSPE. En comparaison, une des premières synthèses automatisées d'oligosaccharides sur support solide a produit un trimannoside linéaire avec 74% de rendement utilisant 60 équivalents au total de donneur de glycosyl⁴⁹. Nicola L. Pohl est depuis très active dans le domaine de synthèse des oligosaccharides utilisant les propriétés physico-chimiques du fluor. Ce procédé de synthèse et de purification par FSPE a été automatisé en 2015 dans son laboratoire et a permis la construction d'oligosaccharides plus complexes^{67, 68}.

Dans certains cas, la *tag* fluoré sur l'accepteur de glycosyle peut gêner les réactions et une alternative est d'introduire le *tag* après la glycosylation via une réaction réversible⁶⁹: l'introduction du tag fluoré a lieu entre une fonction cétone présente sur l'aglycone et une hydrazine fluorée. Les produits marqués par le tag fluoré sont ensuite séparés par FSPE. L'hydrazone est ensuite hydrolysée permettant de revenir au dérivé cétonique et l'hydrazine fluorée est récupéré par F-SPE (Fig 59).

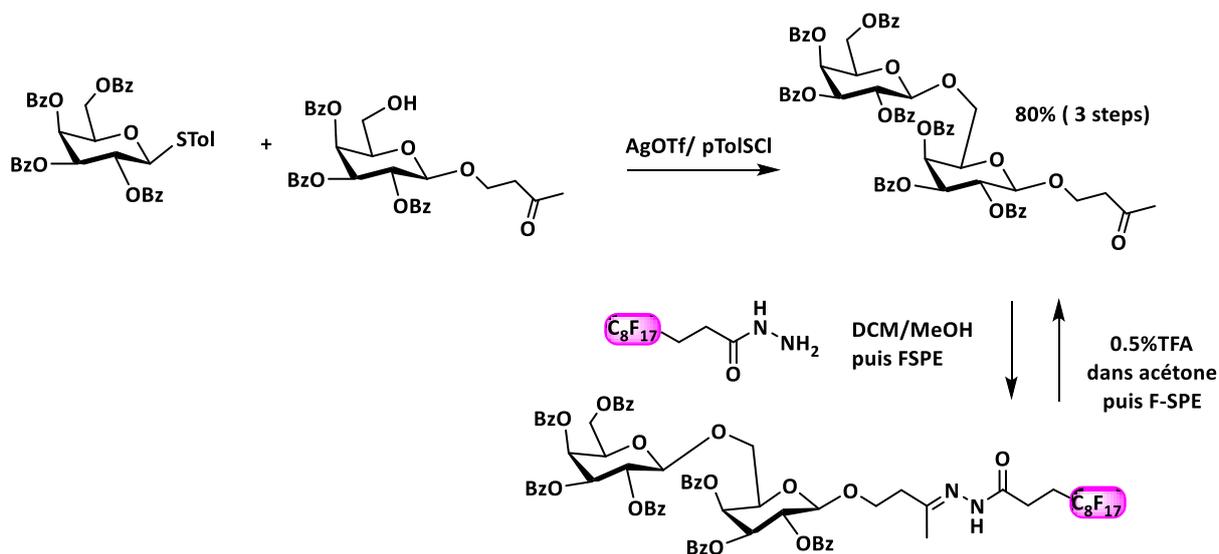


Figure 59 : marquage par un tag fluoré après glycosylation puis séparation par FSPE.

Plus récemment, des fragments complexes oligosaccharidiques de glycoaminoglycanes ont été assemblés avec un support fluoré par le groupe de N. Pohl⁷⁰ (Fig. 60 A) et celui de Nieto⁷¹ (Fig. 60 B), démontrant que la synthèse assistée par FSPE est également adaptée pour la synthèse de composés oligosaccharidiques polaires.

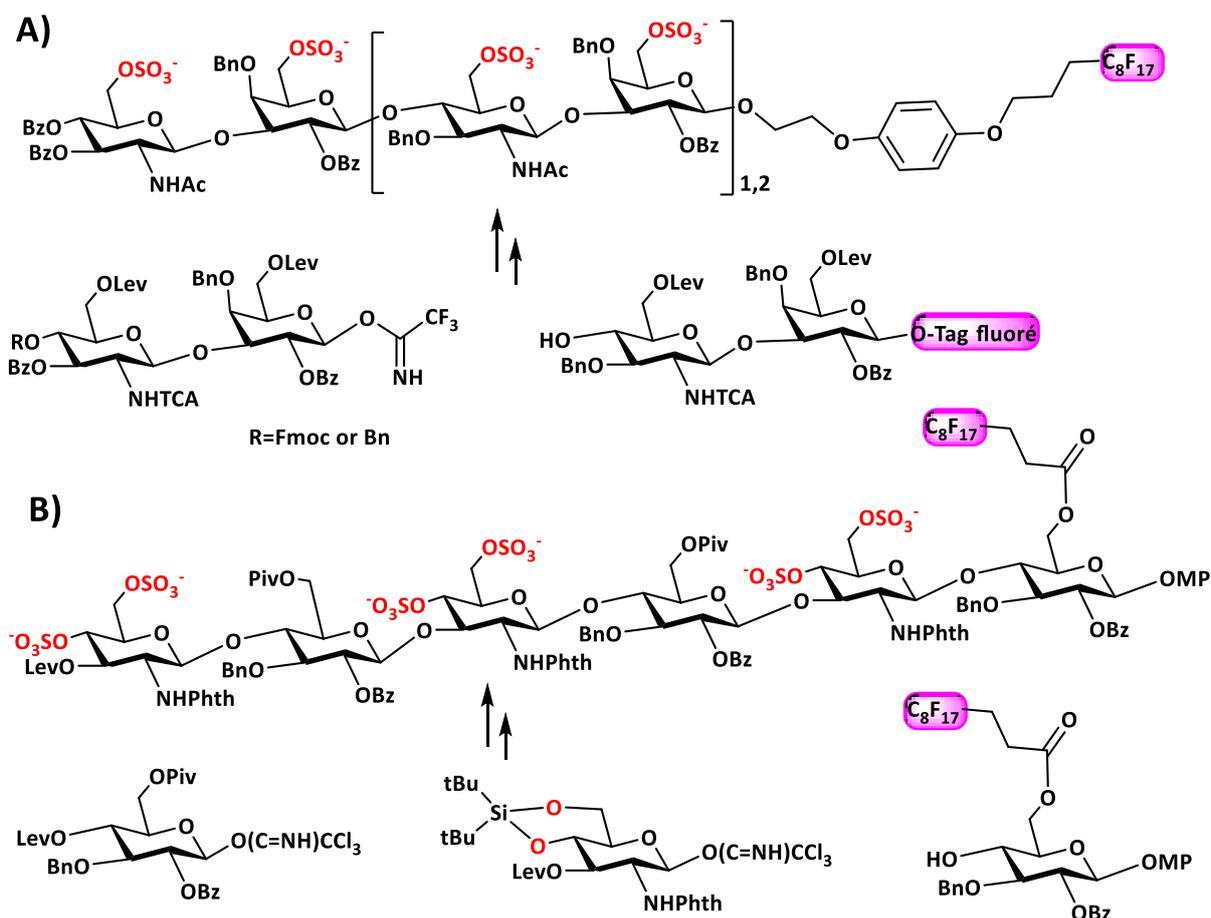
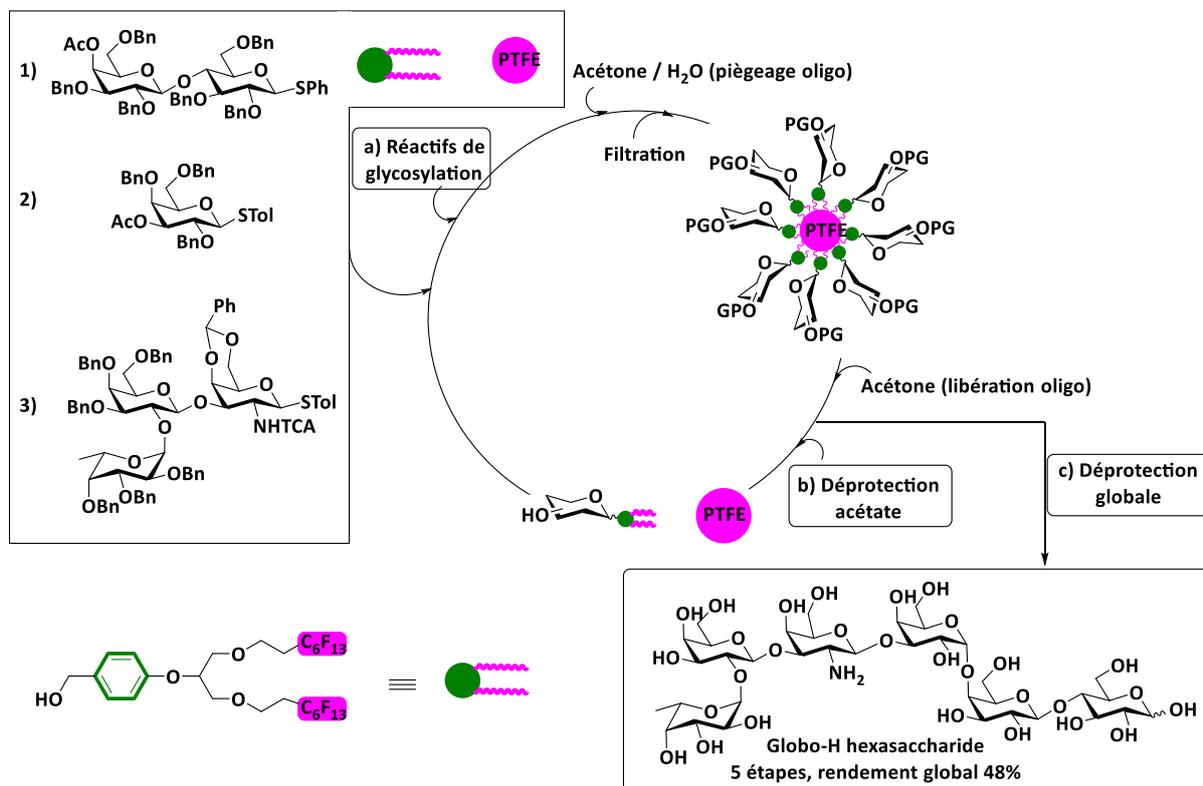


Figure 60 : synthèses de fragments de glycoaminoglycanes décrits par Pohl (A) et Nieto (B) assistée par FSPE.

7.2.2.4 Synthèse d'oligosaccharides combinant les avantages du support solide et fluoré.

Le support soluble permet de travailler dans des conditions homogènes de réaction tandis que le support solide permet de purifier les intermédiaires de synthèse par simple filtration. En 2020, Chen et Chai ont décrit une nouvelle méthode combinant les avantages des deux supports dans la synthèse de l'hexasaccharide antigénique Globo-H présent à la surface de certaines cellules cancéreuses⁷². Les réactions de glycosylation et déprotection sont effectuées en solution et les purifications par filtration. Dans cette stratégie, un linker type benzyl fluoré est attaché sur le premier sucre à allonger et les supports utilisés sont des particules commerciales de polytétrafluoroéthylène (PTFE). Le linker n'est pas attaché de manière covalente mais lié en utilisant les interactions fluor-fluor. Brièvement les réactions (glycosylation ou déprotection) sont effectuées classiquement en solution puis les particules de PTFE sont ensuite ajoutées dans le milieu réactionnel. Les interactions fluor-fluor entre le linker et le support sont ensuite favorisées par l'ajout d'un solvant polaire (acétone / H₂O). Cette étape permet de piéger l'oligosaccharide fluoré sur les

particules de PTFE et donc de le purifier par simple filtration. Le saccharide fluoré est ensuite décroché des particules de PTFE avec l'addition de solvant organique traditionnel (acétone) permettant d'effectuer les étapes suivantes de couplage ou de déprotection. Cette stratégie a permis d'obtenir l'hexasaccharide antigénique Globo-H en 5 étapes avec 48% de rendement global (Fig. 61).



Conditions réactionnelles: a) NIS, TfOH or TMSOTf, -30°C; b) MeONa, MeOH, THF; c) Pd/C, H₂, EtOAc/MeOH/AcOH/H₂O

Figure 61: synthèse de l'hexasaccharide Globo-H combinant les avantages du support solide et fluoré.

7.2.2.5 Synthèse d'oligosaccharides sur support hydrophobe (chaîne C18).

Une amélioration importante dans la synthèse supportée en solution est venue avec l'utilisation combinée d'une phase solide C18. En 1999-2000, Vince Pozsgay avaient réalisé deux synthèses d'oligosaccharides utilisant des groupes protecteurs hydrophobes. Dans son premier travail (Fig. 62 A), le *p*-dodecyloxybenzyle avait été utilisé comme marqueur lipophile⁷³. Ce groupe protecteur permet une adsorption sélective sur une colonne C18 dans du méthanol aqueux à 80%. L'éluion avec MeOH / H₂O 90 : 10 permet d'éliminer les produits secondaires puis l'éluion avec MeOH 100% permet d'obtenir l'ensemble lipophile avec une pureté supérieure à 95%. Dans ses travaux suivants (Fig. 62 B), Pozsgay avait utilisé quatre groupes d'esters gras comme marqueur hydrophobe sur un

accepteur de glycosyle tétrasaccharidique⁷⁴. En utilisant la séparation sur colonne C18, Pozsgay a préparé avec succès 10 mg d'un grand oligosaccharide (24 unités)

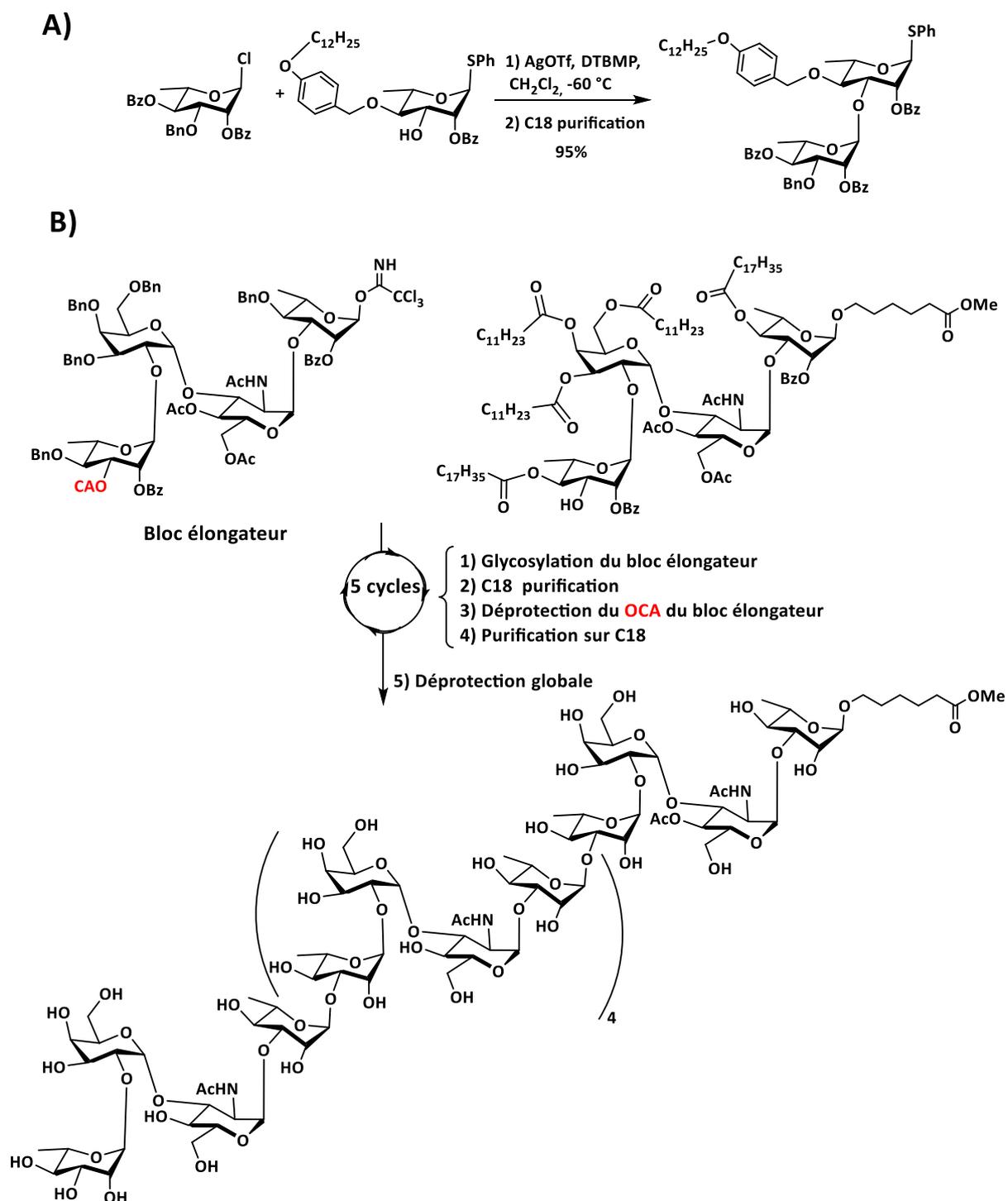


Figure 62 : groupement protecteur hydrophobe et purification sur colonne C18 : **A)** groupement dodecyloxybenzyl sur l'accepteur de glycosyl. **B)** Esters « gras » sur l'accepteur de glycosyl.

Cette technique appelée HASP (Hydrophobically Assisted Switching Phase) a été reprise par Bauer and Radermann en 2005⁷⁵ puis en 2016⁷⁶ par Li. Dans ce dernier travail, les auteurs glycosylent une chaîne thiocétyl (C16) sur deux donneurs modèle servant de point de départ dans la construction de l'oligosaccharide⁷⁶. De la même manière que la purification par FSPE, les auteurs utilisent les propriétés hydrophobes de la chaîne cétyl. Chaque brut de glycosylation est déposé sous forme de dépôt solide sur une colonne contenant du gel de silice en phase inverse, c'est-à-dire sur lequel ont été greffées des chaînes hydrophobes constituées de chaînes en C18. Les composés organiques et les sous-produits sont ainsi éliminés avec un solvant polaire comme du méthanol et le thioglycoside avec la chaîne cétyl apolaire est élué avec du DCM. Avec la technique HASP, le nona-mannoside associé à la protéine gp120 exprimée par le VIH a été synthétisé avec la faible quantité de 1.2 équivalent de donneur pour chaque glycosylation. Cette méthode a également permis d'effectuer la synthèse à l'échelle du gramme offrant donc des conditions pratiques pour la manipulations des composés. Il est également intéressant de noter que la chaîne thiocétyl est remplacée par glycosylation par une chaîne fonctionnalisée par un groupement azoture (Fig. 63). L'introduction de cette fonction permettra de fonctionnaliser l'oligosaccharide par une biomolécule ou une sonde fluorescente pour des études ultérieures.

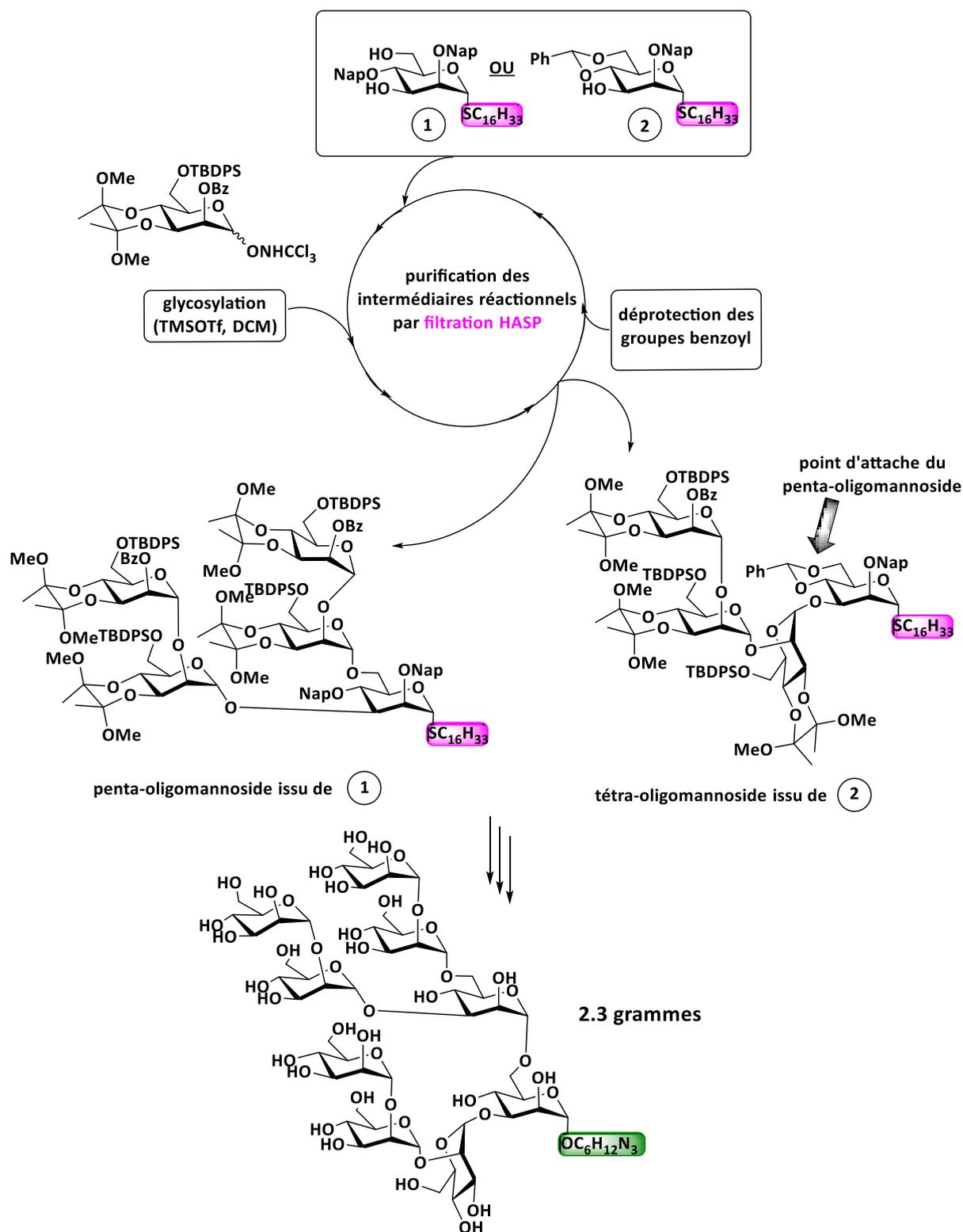


Figure 63: synthèse d'un nona-mannoside de la protéine gp120 par HASP.

7.2.2.6 Synthèse sur liquide ionique.

Depuis quelques années, les liquides ioniques (IL) sont le sujet d'études particulièrement importantes en raison de leurs caractéristiques inhabituelles pour des liquides et leurs propriétés de solvant

associées. Ce sont des sels constitués de cations organiques (imidazolium, ammonium, pyrrolidinium...) associés avec des anions inorganiques (Cl^- , AlCl_4^- , PF_6^- , BF_4^- , NTf_2^- , DCA^- ...) ou organiques (CH_3COO^- , CH_3SO_3^- ...) et qui ont la particularité d'être liquides autour de la température ambiante. Les liquides ioniques peuvent être attachés sur de petites molécules de manière covalente. Le caractère ionique de ces espèces les rend insoluble dans les solvants apolaires comme l'hexane et soluble dans les solvants organiques polaires comme le diméthylformamide. Ces propriétés physico-chimiques ont été utilisées dans la synthèse d'oligosaccharides de la même manière que la synthèse supportée sur polymère soluble décrite précédemment.

Les réactions de glycosylations sont effectuées en phase homogène avec un solvant adapté. Après la réaction, l'espèce supportée ionisée (au caractère polaire) peut-être précipitée par addition d'un solvant apolaire. L'espèce supportée ionisée peut ensuite être facilement récupéré et purifié par simple lavage de solvant apolaire.

La première synthèse utilisant les IL comme support soluble a été décrite en 2006 par Chan dans la synthèse d'un $\beta(1\rightarrow6)$ glucane⁷⁷. Dans cette étude, le tag ionique (IL) a été attaché sur la position en C-6 du donneur formant le précurseur de la synthèse supporté sur liquide ionique. Chaque intermédiaire de synthèse comportant le tag IL (composé polaire) a ainsi été purifié par précipitation dans le pentane, l'hexane et l'éther isopropylique. Cette stratégie utilise des sulfoxides comme donneur de glycosyle (Fig. 64 symbole X') activé avec le système 2,6-di-tertbutyl-4-méthylpyridine / Tf_2O dans le DCM. Le produit résultant possède un groupement thiophényl installé en position anomérique (Fig. 64 symbole X) converti à son tour en sulfoxide via une oxydation par de l'acide métachloroperbenzoïque (MCPBA). L'opération glycosylation-conversion X en X' est répétée et les intermédiaires réactionnels sont purifiés par précipitation conduisant au final à un trisaccharide.

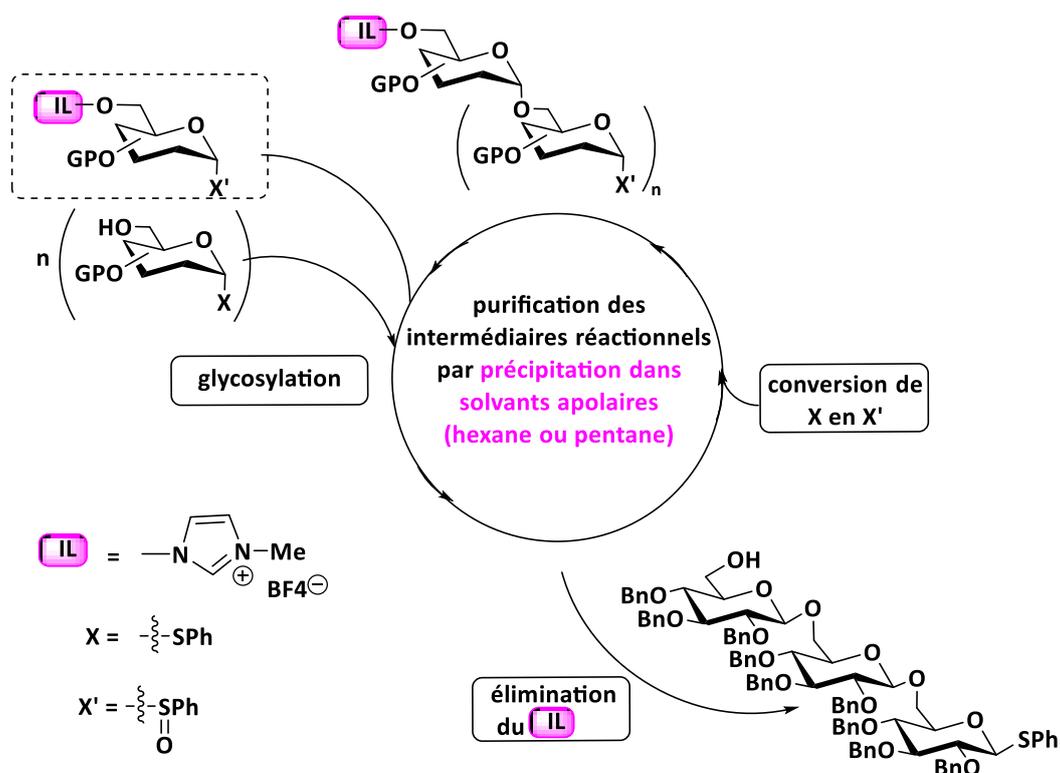


Figure 64: synthèse supportée sur *tag* ionique d'un $\beta(1\rightarrow6)$ glucane trisaccharide avec *tag* ionique attaché sur le donneur de glycosyle.

Dans une seconde approche développée par Pathak⁷⁸, un glycoside de *p*-thiotoyle a été utilisé en tant qu'accepteur et un glycoside de fluorure marqué par un tag ionique comme donneur. Ces deux structures ont permis la synthèse d'un thioglycoside de tétramannopyranoside linéaire. Le fluorure de glycosyle donneur a été attaché au support IL via une liaison ester. Après la réaction de glycosylation, le support IL est facilement détaché par action de bicarbonate saturé dans un mélange de solvants biphasiques H₂O / éther et l'accepteur est récupéré et isolé. Dans cette stratégie, seul les donneurs et accepteurs ont nécessité des purifications sur gel de silice. En revanche, chaque intermédiaire de construction de l'oligomannoside a été isolé par simples extractions avec l'utilisation de solvants appropriés. Cela a permis d'obtenir environ 800 mg d'oligosaccharide final protégé. Ce travail a été le premier rapporté dans la synthèse d'un tétrasaccharide synthétisé sur liquide ionique à grande échelle

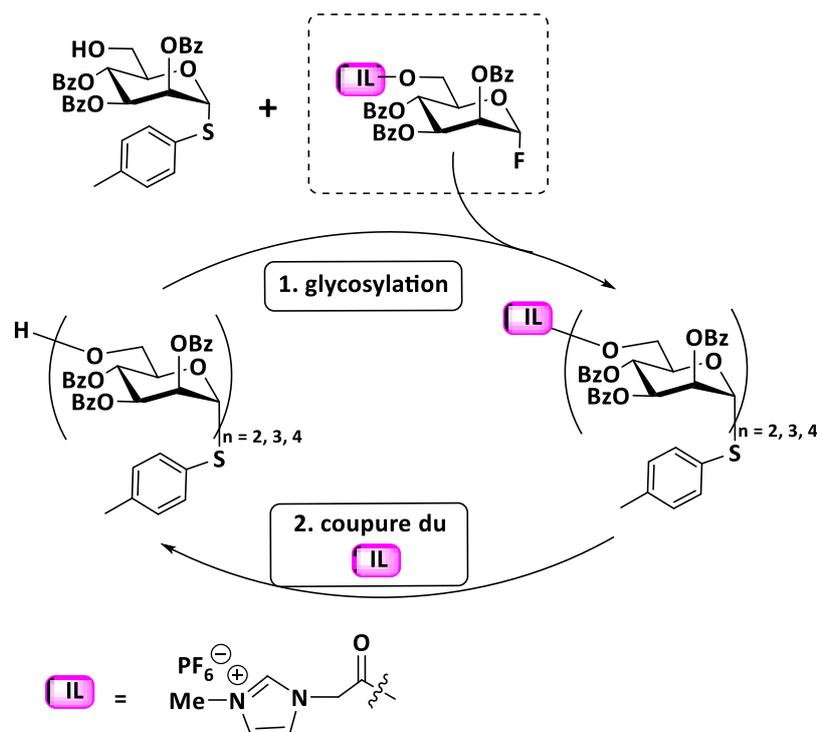


Figure 65: synthèse supportée sur *tag* ionique d'un $\alpha(1\rightarrow6)$ tetramannoside avec *tag* ionique attaché sur le donneur de glycosyle.

Cette méthode ne peut cependant pas s'appliquer aux synthèses générales d'oligosaccharides: le tag ionique a été incorporé sur le C-6 du donneur de glycosyle avec une fonction ester. Cette approche se limite à protéger les autres groupements protecteurs compatibles et orthogonaux à la fonction ester, connue pour être labile dans des conditions basiques. De plus dans une réaction de glycosylation classique, le donneur de glycosyle est requis en léger excès pour mener les réactions à terme.

L'hydrolyse du donneur de glycosyle est également connue pour être un produit secondaire indésirable. Ainsi incorporer le *tag* IL sur le donneur de glycosyle peut potentiellement conduire à des mélanges de *tags* IL, ce qui limite la construction de l'oligosaccharide supporté.

De nouvelles stratégies ont été développées depuis pour trouver le moyen et le plus efficace et le plus général pour incorporer les *tags* IL aux groupements glucidiques compatibles avec les groupements protecteurs couramment utilisés et adaptés à la libération finale de l'oligosaccharide. La position anomérique du saccharide terminal réducteur semble le lieu de fixation idéal pour le marqueur ionique: il peut être introduit au début de la synthèse et le produit peut être libéré une fois que la séquence d'oligosaccharide est construite (Fig. 66).

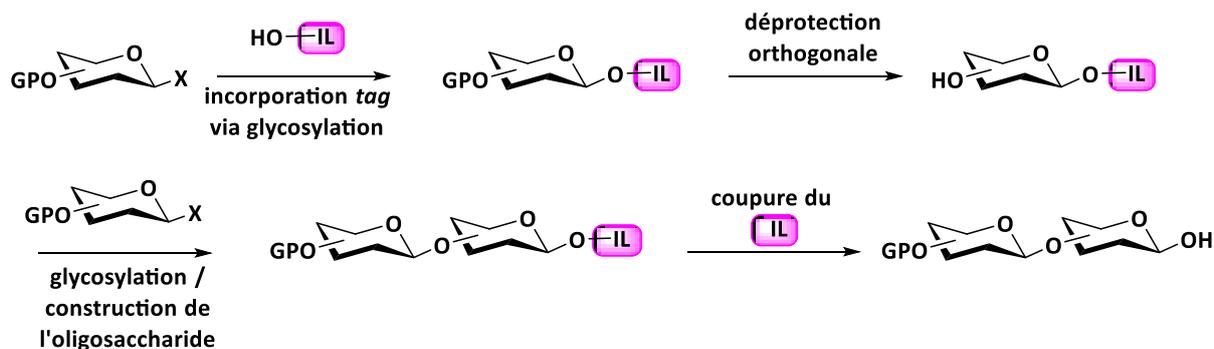
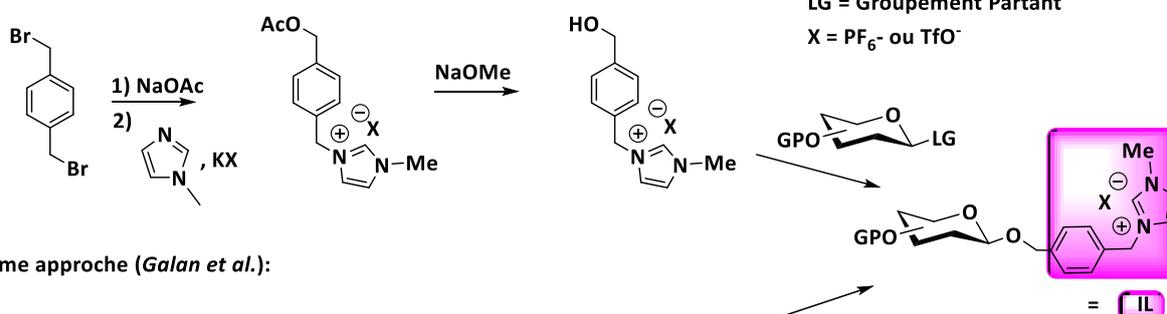


Figure 66: l'introduction du *tag* ionique sur l'accepteur est mieux adaptée pour la synthèse supportée.

Galan⁷⁹ et Li⁸⁰ ont ainsi développé en 2011 deux stratégies de synthèse d'un linker ionique de type benzyle utilisé comme point de départ dans la construction de l'oligosaccharide (Fig. 67).

1ère approche (Li *et al.*):



2ème approche (Galan *et al.*):

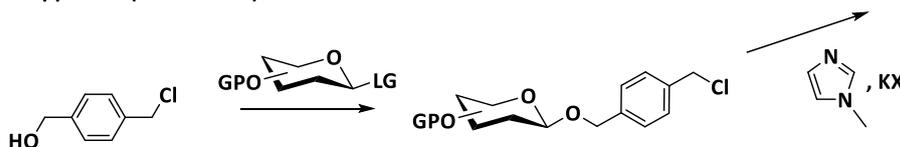


Figure 67: introduction d'un *tag* ionique de type benzyle sur accepteur de glycosyle en position anomérique.

La stratégie de Li utilise le dibromo-*p*-xylène sur lequel un des deux bromes est substitué par un acétate OAc et l'autre brome par le N-méthylimidazole formant le marqueur ionique. Cette seconde réaction s'effectue en présence de hexafluorophosphate de potassium KPF₆ permettant de substituer l'anion bromure Br⁻ par l'anion hexafluorophosphate PF₆⁻. Le sel avec contre ion PF₆⁻ est beaucoup moins soluble dans l'eau ce qui permet de limiter les pertes de composé oligosaccharidique lors des lavages et extractions. Le groupement acétate (Ac) est traité par du méthanolate générant la fonction hydroxyle. La molécule obtenue est ensuite glycosylée sur le donneur pour produire le précurseur servant de point de départ à la construction de l'oligosaccharide.

La stratégie de Galan est quelque peu différente mais le résultat est identique: le 4-(chlorométhyl) alcool benzylique est d'abord glycosylé sur le donneur et le chlore est ensuite substitué par le le N-méthylimidazole. La substitution a été réalisée en présence de trifluorométhylsulfonate de potassium (KOTf).

Cette stratégie permet d'attacher l'accepteur sur un linker benzylique ionique clivable par hydrogénation évitant les décompositions et les sous-produits indésirables. Puis un procédé itératif (glycosylation-purification-déprotection) a ensuite été mis en place en combinant les avantages de la précipitation et de l'extraction solide-liquide afin de réduire les pertes et le temps de purification. Cette approche a été utilisée avec succès pour l'assemblage rapide d'un $\alpha(1\rightarrow2)$ nonamannoside linéaire d'une part⁸⁰ (Li 2011) et d'un glucane $\beta(1\rightarrow6)$ tétrasaccharide d'autre part⁸¹ (Galan 2013) (Fig. 68).

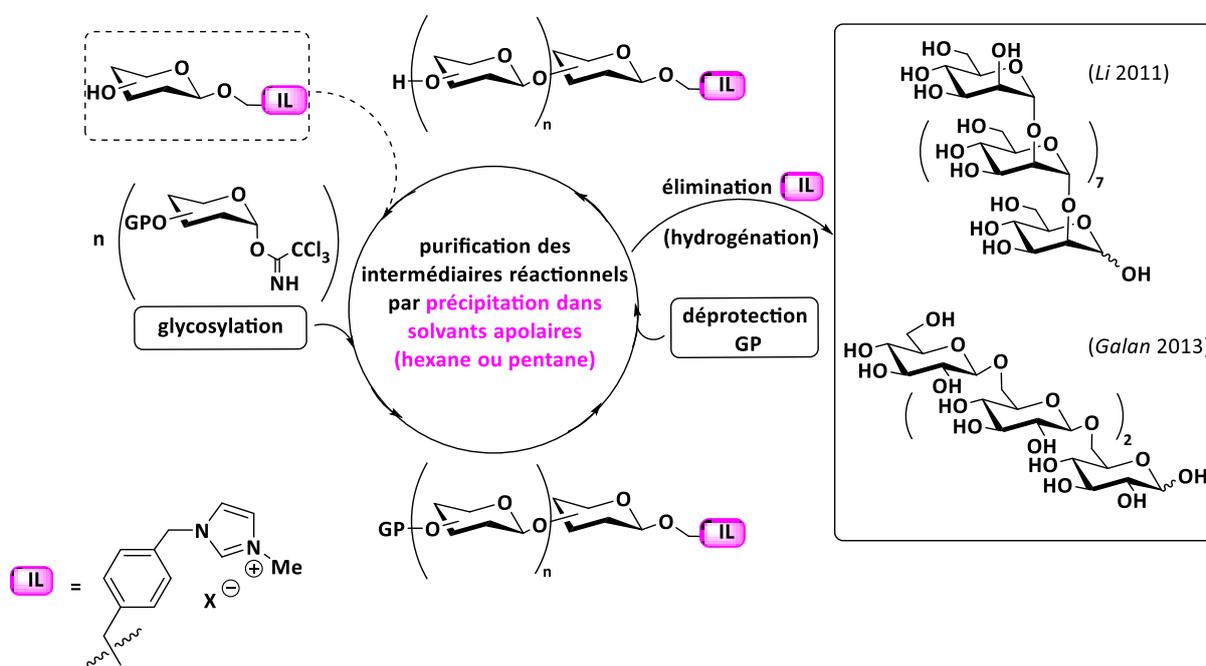


Figure 68: synthèse supportée sur *tag* ionique $\alpha(1\rightarrow2)$ nonamannoside ((Li 2011) et d'un $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide (Galan 2013).

Depuis d'autres oligosaccharides plus complexes utilisant le même bras ionique. La synthèse d'un chitoooligosaccharide précurseur de lipochitine peut être citée comme exemple. Ces lipochitines (LCO) sont des molécules naturelles impliquées dans les mécanismes de la communication bactéries/plantes⁸².

Dans cet exemple réalisé par l'équipe de Jean-Marie Beau, sept étapes à partir de thioglycosides précurseurs synthétisés à partir du HSMbp ont permis la construction de la structure sans purification par chromatographie. Les composés non ioniques ont été sélectivement éliminés avec des solvants appropriés et le chitooligosaccharide a été synthétisé avec un rendement global de 13% (60% par étapes)⁸³ (Fig. 69).

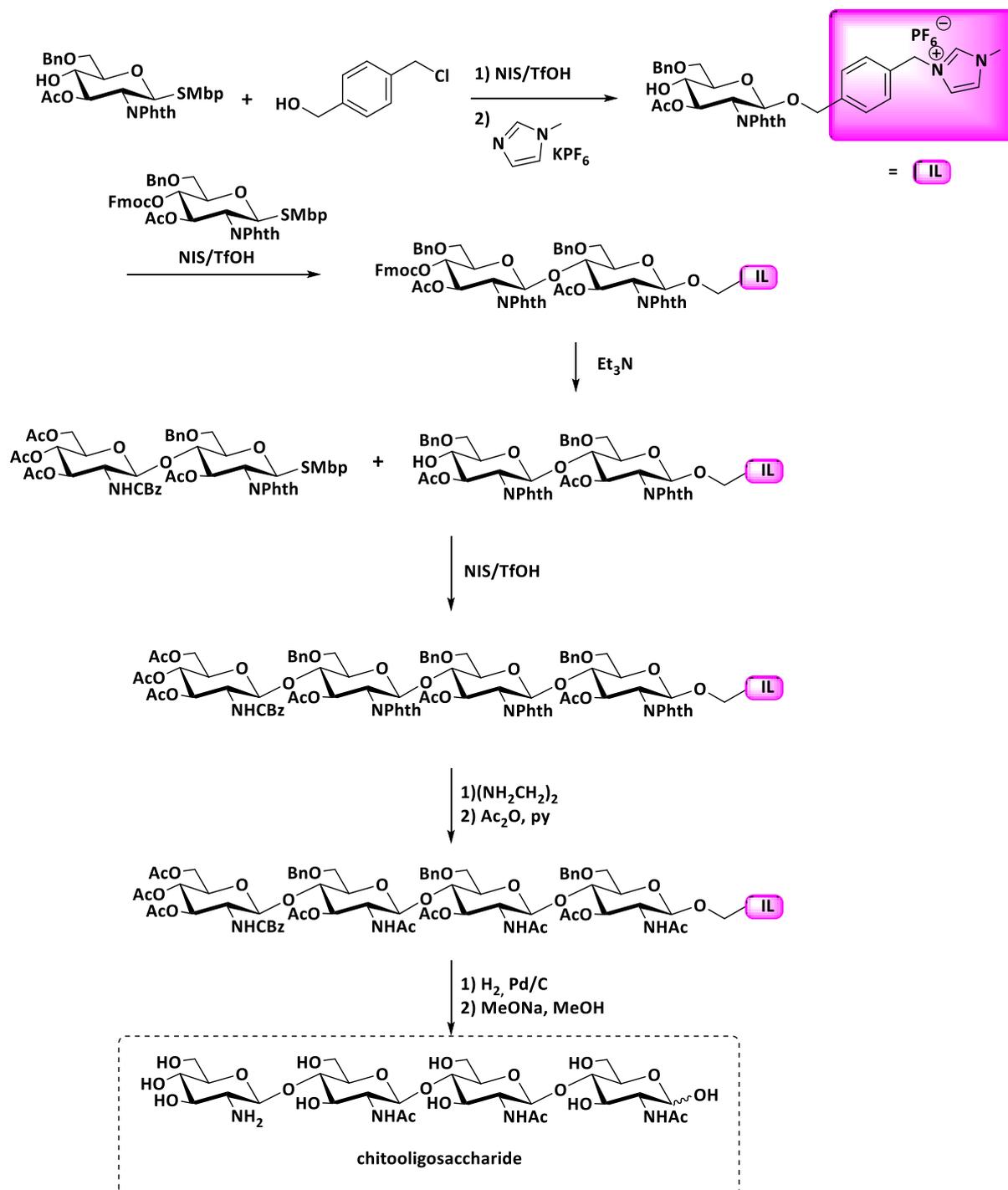


Figure 69: synthèse supportée sur *tag* ionique d'un chitooligosaccharide.

De la même manière et utilisant le même linker ionique, un oligosaccharide naturel relié en position $\beta(1\rightarrow3)$ composé de 6 unités glucose présent dans la laminarine a été synthétisé en 2017 par Li⁸⁴. Dans cette dernière synthèse, 2 à 4 équivalents de donneur ont été utilisés à chaque étape pour un rendement moyen de glycosylation de 90%. Les acétates et les benzylidènes ont été supprimés par méthanolyse suivi d'un traitement acide. L'oligosaccharide déprotégé a ensuite été clivé du linker ionique par hydrogénolyse et a été obtenu avec un rendement de 48% sur ces 3 dernières étapes (Fig. 70).

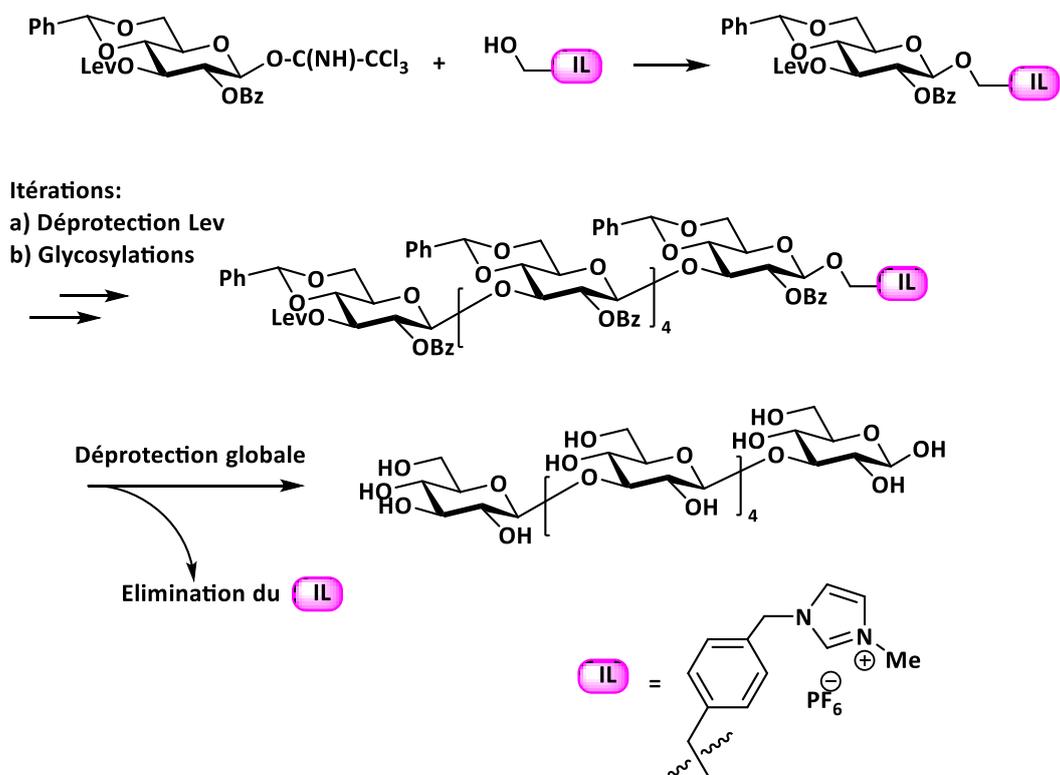


Figure 70: synthèse supportée sur tag ionique d'un $\beta(1\rightarrow3)$ glucane hexasaccharide.

Ce tag ionique semble pratique pour la synthèse supportée d'oligosaccharides à grande échelle et un protocole sur 10 grammes de matière a récemment été décrit⁸⁵ (Fig. 71). Les auteurs ont attaché le tag ionique sur la position O-6 du premier sucre via un linker labile dans des conditions d'oxydation.

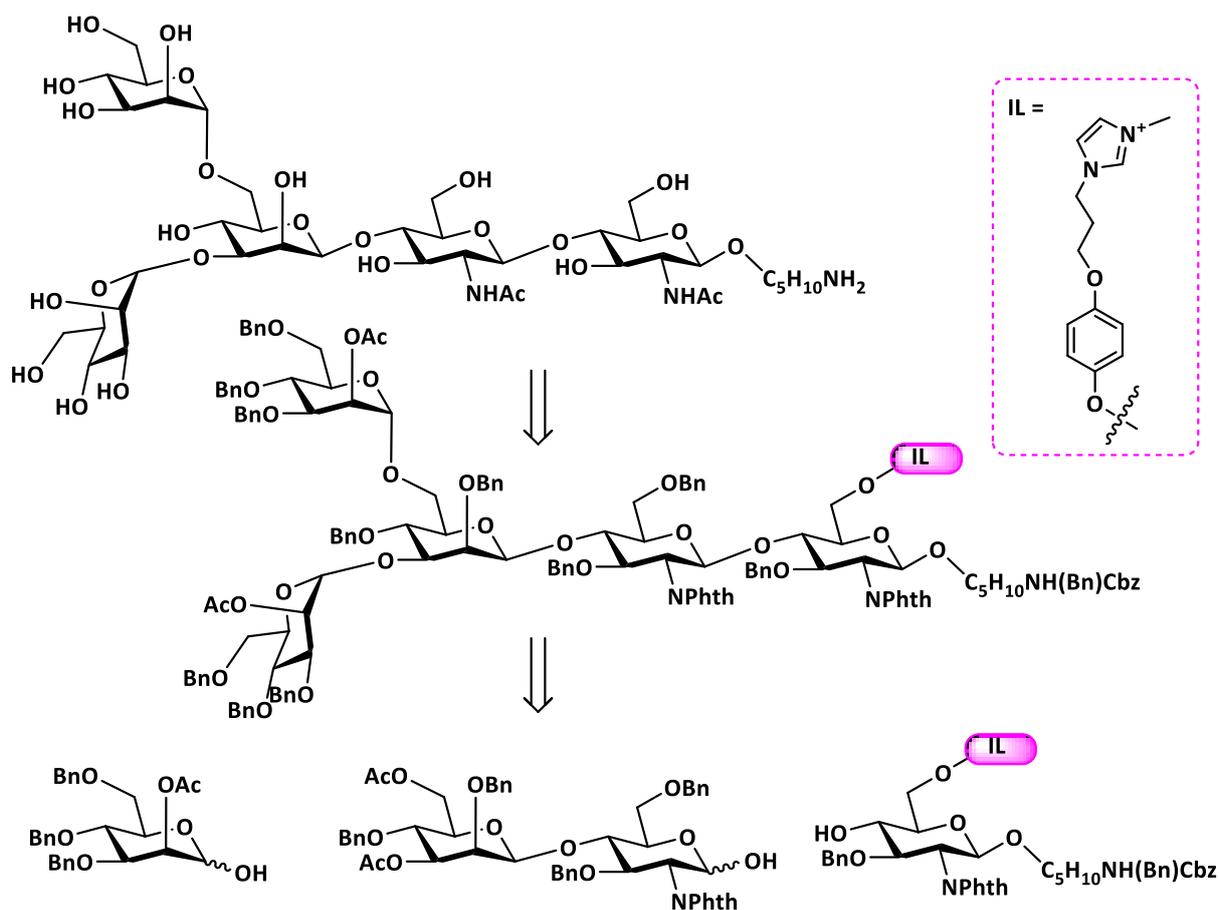


Figure 71 : synthèse supportée à grande échelle (10 g) d'un pentasaccharide utilisant un tag ionique.

7.3 Bilan sur la synthèse supportée d'oligosaccharides.

Toutes les liaisons glycosidiques des oligosaccharides décrits sont obtenues via des réactions stéréosélectives dites de glycosylations. Ces réactions reposent sur de nombreux facteurs tels que le choix du groupement partant, du promoteur et des groupements protecteurs compatibles.

Les techniques développées ont aidé à mieux comprendre la réactivité des donneurs et des accepteurs de glycosyle et ont offert un moyen solide pour traiter la synthèse complexe de divers oligosaccharides. De nouveaux systèmes de promoteurs ont également permis de former des liaisons glycosidiques avec une meilleure réactivité sans produit secondaire.

Toutefois, la synthèse des oligosaccharides offre d'autres défis pour limiter les manipulations supplémentaires entre chaque étape de glycosylation. De ce fait, la synthèse chimique de nombreux glycanes peut être standardisée en utilisant différentes méthodes et stratégies de purification.

Les synthèses en phase solide, sur polymère soluble ou assistées d'un *tag* (fluoré, liquide ionique, chaîne hydrophobe) facilitent ainsi les purifications et simplifient l'élimination des excès de réactifs.

Bien que la viabilité de ces nouvelles techniques ait été démontrée, elles ont encore besoin d'être affinées. Excepté la synthèse sur support solide, la plupart des méthodes décrites engendrent des oligosaccharides encore protégés et / ou ne possédant pas de nouvelles fonctions pour l'attache d'un nouveau *tag* (biotine, peptide, sonde fluorescente, ...). Par ailleurs les quantités d'oligosaccharides obtenus sur support solide varient de quelques milligrammes à quelques dizaines de milligrammes, ce qui est peu confortable pour des manipulations ultérieures.

De plus, une seule étude comparative de méthode de synthèse supportée d'oligosaccharides utilisant des thioglycosides a été rapportée à ce jour avec des rendements comparables dans les deux cas⁸⁶. Les auteurs ont toutefois mentionné quelques difficultés techniques inattendues liées au support solide (solubilité, problème de réactivité,...).

Ce travail a donc été l'occasion de réaliser une nouvelle étude comparative basée uniquement sur l'emploi de donneur de thioglycosides pour la synthèse d'oligosaccharides. L'emploi d'un nouveau linker dans le cas du support solide et une nouvelle approche de synthèse sur support soluble ont également pu être développées. Comparées aux méthodes de synthèse décrites précédemment, les approches abordées ci-après ont été conçues pour obtenir des oligosaccharides déprotégés et fonctionnalisés.

8 Objectif: synthèses supportées d'oligosaccharides utilisant des donneurs thioglycoside.

8.1 Structures / cibles envisagées : les $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et les $\alpha(1\rightarrow6)$ mannanes.

8.1.1 Les $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes : oligosaccharides immunostimulateurs.

Les β -glucanes sont des polysaccharides naturels omniprésents dans les parois cellulaires bactériennes, chez les champignons ou encore les céréales. Ces structures sont uniquement composées d'unités glucose liés par des liaisons β . Les β -glucanes dérivés des céréales sont majoritairement constitués de liaisons $\beta(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$ sans aucune liaison $\beta(1\rightarrow6)$ (Fig. 72).

Les β -glucanes provenant de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) et de champignons sont des mélanges de chaînes linéaires reliées en position $\beta(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow6)$ (Fig. 72).

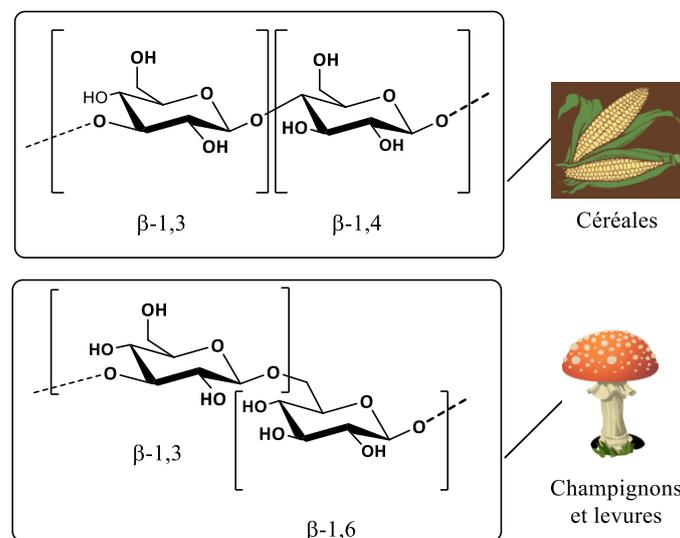


Figure 72: structures chimiques de β -glucanes issus de céréales, champignons et levures.

Ces composés possèdent de nombreuses propriétés biologiques et sont notamment impliqués dans la stimulation de la réponse immunitaire. Cette stimulation est notamment liée à l'interaction de ces composés sur plusieurs récepteurs dont la Dectine-1. La stimulation du système immunitaire est liée à l'enchaînement des liaisons $\beta(1\rightarrow3)$ ⁴. Le rôle des liaisons $\beta(1\rightarrow6)$ n'est quant à lui pas clairement établie. Le choix d'une séquence de glucanes $\beta(1\rightarrow6)$ s'est donc avéré favorable pour la construction supportée. Ces séquences sont aussi souvent choisies comme exemple de démonstration dans les synthèses supportées.

8.1.2 Les $\alpha(1\rightarrow6)$ mannanes : oligosaccharides présents chez *Candida Albicans*, champignon responsable de la candidose.

Candida albicans est une espèce de levure très importante, et la plus connue du genre *Candida*. Ce champignon est naturellement présent dans la flore des muqueuses et participe à l'équilibre du microbiote. Il peut toutefois se développer de manière excessive et déclencher la candidose, pathologie touchant surtout les personnes immunodéprimées. La paroi cellulaire de ce champignon est principalement constituée d'un enchainement d'unités mannose reliées en position $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow2)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ ⁵ (Fig. 73).

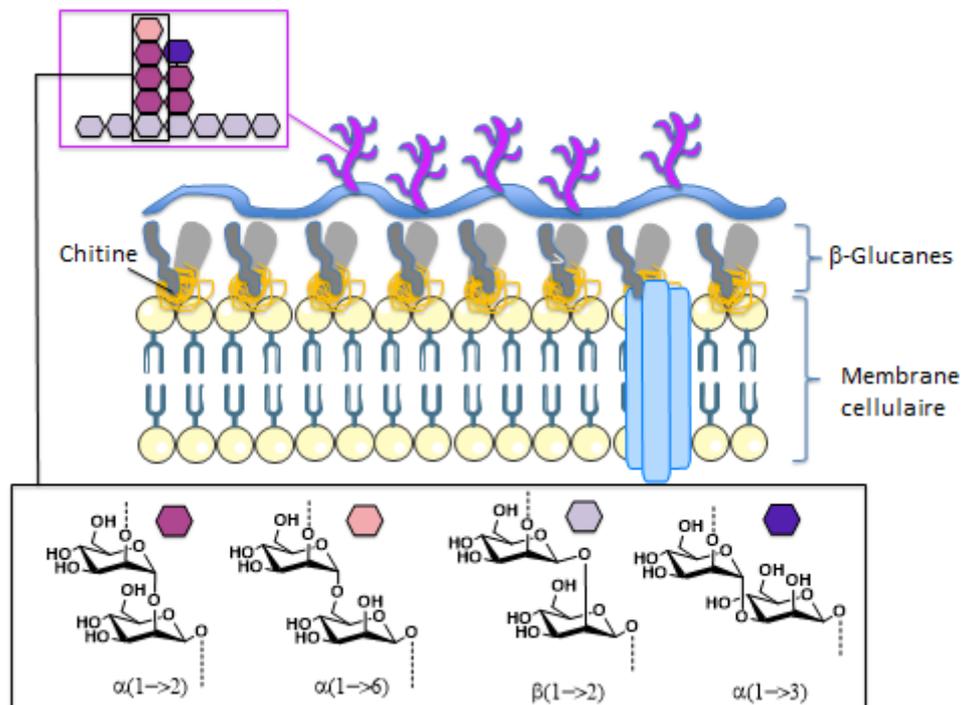


Figure 73: structures chimiques d'oligomannosides présents à la surface cellulaire de *Candida Albicans*.

Pour comprendre le mode de développement de *Candida Albicans*, le Laboratoire a synthétisé des séquences d'oligomannosides reliés en position $\alpha(1\rightarrow2)$ et $\beta(1\rightarrow2)$. Ces structures ont ensuite été testées par le Centre Hospitalier Régional de Lille qui a pu mettre en évidence le rôle des mannosyltransférases, enzymes responsables de la prolifération du champignon^{7, 87}.

L'implication des mannosyltransférases n'est toutefois pas clairement établie avec les mannosides liés en position $\alpha(1\rightarrow6)$. Le choix de cette séquence s'est donc avéré favorable pour une synthèse supportée.

8.2 Etudes préliminaires réalisées avant la synthèse supportée.

8.2.1 Etudes préliminaires réalisées avant synthèse sur support SOLIDE.

8.2.1.1 Synthèse d'un nouveau linker.

Un des désavantages du support solide réside dans l'utilisation d'un polymère insoluble, ce qui limite l'accès des composés solubles aux fonctions réactives du support. Pour améliorer l'accessibilité des fonctions, il est nécessaire d'éloigner les fonctions du polymère à l'aide d'un bras espaceur ou *linker*. En effet, il est connu que 90% des sites réactionnels sont à l'intérieur des pores et 10% en surface⁸⁸. Les fonctions proches et peu réactives sont ainsi éloignées de la maille polymérique, ce qui améliore leur accessibilité et donc leur réactivité. De nombreux *linkers* ont été utilisés dans la synthèse supportée d'oligosaccharides. Ces linkers permettent également après clivage de l'oligosaccharide du support de générer une nouvelle fonction permettant l'attache d'un *tag*.

La nouvelle approche du *linker* pour support solide envisagée est basée sur l'utilisation d'une longue chaîne alkyl hydrophobe afin d'éloigner les fonctions du support. Le choix pour la construction du futur *linker* s'est porté sur le dodécanediol (HO-(CH₂)₁₂-OH). Ce composé, l'un des plus longs diols disponible, a été estérifié en présence d'acide parahydroxybenzoïque. Pour synthétiser ce *linker* symétrique **2** décrit dans la littérature⁸⁹, la fonction alcool de l'acide parahydroxybenzoïque a d'abord été protégé par une fonction carbonate en présence d'éthyl chloroformiate⁹⁰. Ce produit **1** obtenu quasi quantitativement est ensuite transformé en chlorure d'acyle en présence de chlorure de thionyle. Le chlorure d'acyle obtenu **1a** étant difficilement isolable, le brut de réaction est directement engagé et la double acylation est effectuée en présence de DCM et de pyridine. Les fonctions carbonate sont ensuite hydrolysées en présence d'un léger excès de soude pour éviter l'hydrolyse des esters. Cette dernière réaction a nécessité quelques mises au point mais il a été possible par la suite d'obtenir sans purification sur gel de silice un premier *linker* symétrique. Ce composé **2** a été obtenu avec un rendement global de 65% sur 3 étapes (Fig. 74).

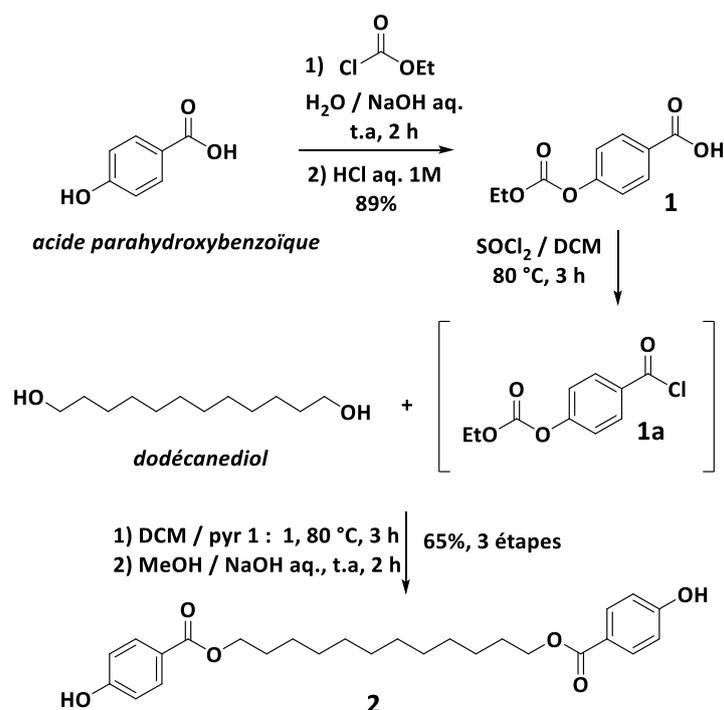


Figure 74: synthèse d'un linker symétrique⁸⁹.

Ce composé **2** muni de cette chaîne en C_{12} ne peut pas être utilisé pour la synthèse d'oligosaccharide sur support solide. D'une part, il n'est pas possible de faire réagir sélectivement l'une des deux fonctions phénol sur le support. D'autre part, l'effet inductif des phénols enrichit le cycle aromatique et risquerait d'entraîner la formation d'un C-glycoside au détriment d'un O-glycoside.

La stratégie a consisté à désymétriser le composé en alkylant un des deux phénols par déprotonation avec l'ajout d'un équivalent de K_2CO_3 en présence du 1-bromopropanol. Cette étape de monoprotection a sans surprise été réalisée avec un rendement modeste de 27% mais la quantité de produit obtenu a été suffisante pour la suite de la synthèse. Le *linker 3* désymétrisé obtenu, l'autre phénol pourra être alkylé sur le support solide et l'alcool primaire servira de point d'ancrage dans la construction de l'oligosaccharide (Fig. 75).

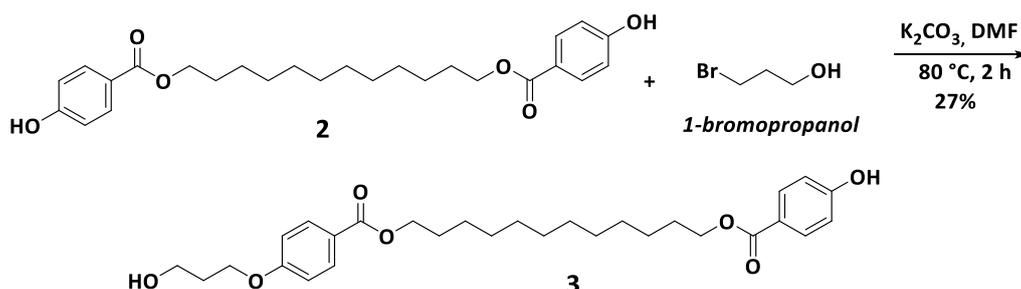


Figure 75: synthèse et dissymétrisation d'un nouveau linker pour la synthèse sur support solide.

De cette façon, ce nouveau linker **3** dispose de 3 avantages (Fig. 76) :

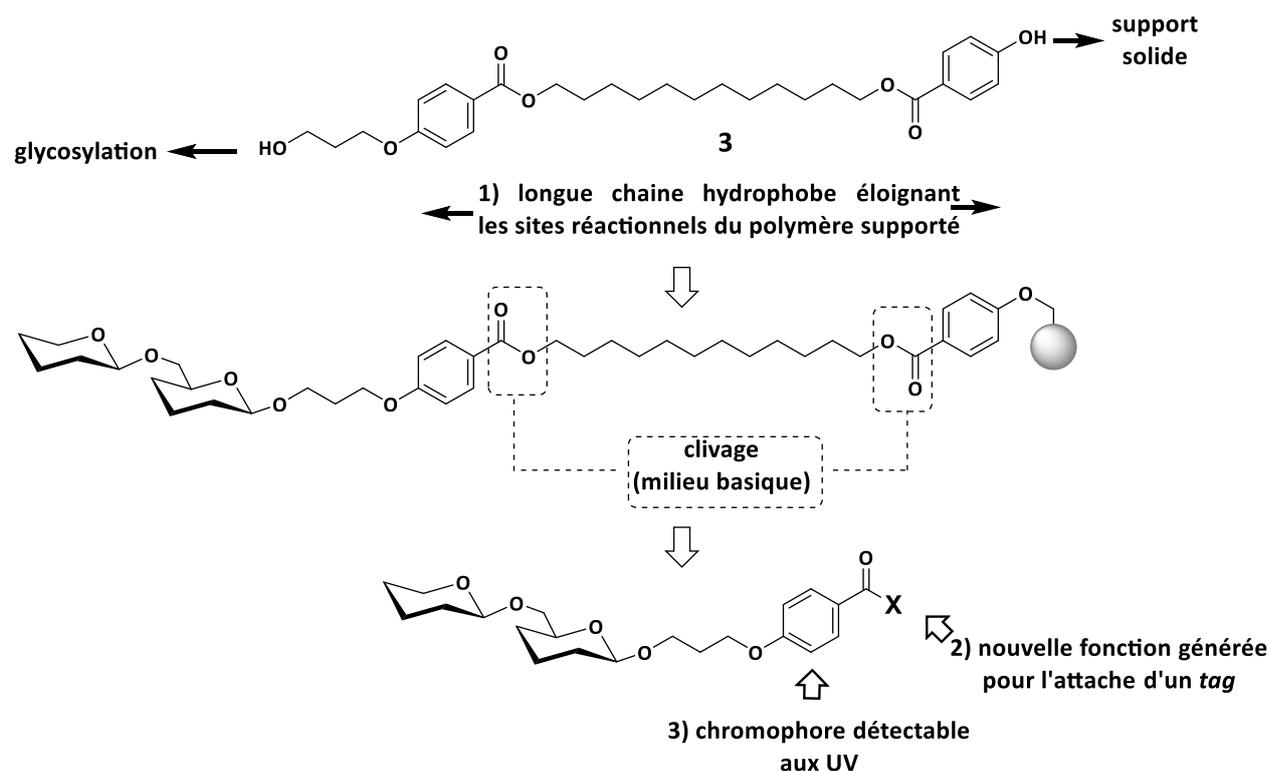


Figure 76: les 3 avantages du nouveau linker pour la synthèse sur support solide.

- 1) Une longue chaine hydrophobe permettant d'éloigner les sites réactionnels du polymère et d'améliorer leur accessibilité et leur réactivité.
- 2) Une fonction ester clivable en milieu basique générant une nouvelle fonction permettant la conjugaison de l'oligosaccharide.
- 3) Après clivage, l'oligosaccharide dispose d'un noyau aromatique comme *tag* UV, utile pour la détection du composé lors des purifications ou manipulations ultérieures.

8.2.1.2 Préparation du support solide.

8.2.1.2.1 Choix de la résine.

La résine de Merrifield, couramment utilisée dans la synthèse de peptides et d'oligosaccharides a été choisie comme support.

Ces résines sont commercialisées avec différentes charges [quantité de chlore (en mmol) par gramme de résine (mmol/g)] et selon leur granulométrie exprimée en « mesh ». Lors de leur

fabrication, les billes de résines sont séparées en fonction de leur taille à l'aide d'un tamis caractérisé par la taille en « mesh ». 200 mesh = 75 μm et 400 mesh = 37 μm sont les tailles classiques.

Ces données commerciales sont essentielles dans les synthèses sur support solide car les processus de diffusion peuvent jouer un rôle important. Cela conduit à des réactivités inégales entre les groupes situés près du noyau et ceux situés près de l'enveloppe extérieure. En moyenne, 50% des sites actifs se situent dans les 10 premiers μm de la couche externe⁹¹.

C'est pourquoi une résine faiblement chargée (0.8 mmol / g de résine) constituée de petites billes (200-400 mesh) a été choisie pour augmenter les chances de collisions entre réactifs⁹². Ces résines faiblement chargées à 0.8 mmol / g sont les plus couramment commercialisées.

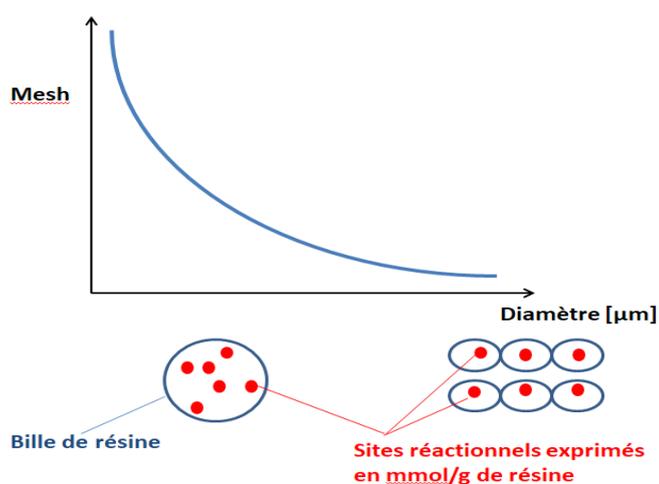


Figure 77 : Représentation du diamètre des billes de résines en fonction de leur mesh (graphique inspiré de Haag *et al*⁹².

8.2.1.2.2 Attache du linker **3** sur résine.

Cette étape se fait avec un excès de linker **3** dans le DMF en présence de carbonate de césium qui permet de déprotoner le phénol et d'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) (Fig. 78). Les chlores de la résine n'ayant pas réagi sont ensuite « cappés », c'est-à-dire que leur réactivité est bloquée, en présence d'acétate de césium (CsOAc)

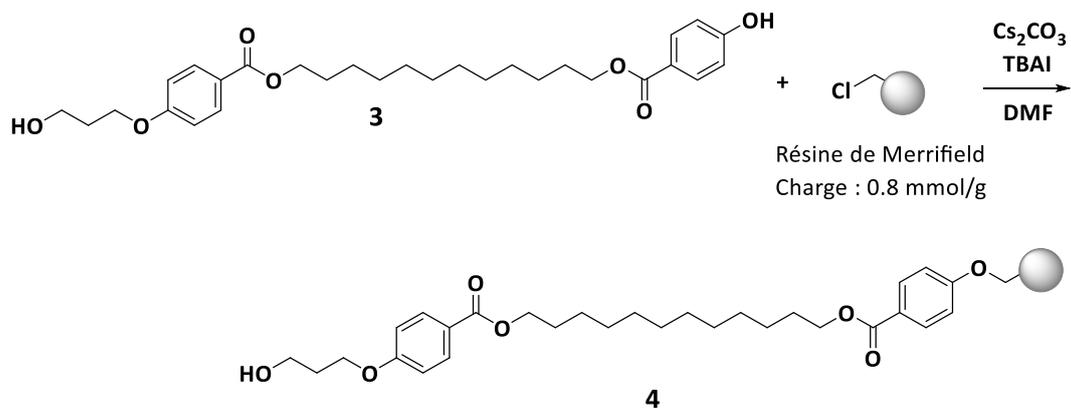


Figure 78: attache du linker **3** sur la résine de Merrifield.

Pour connaître le taux de greffage de linker sur le support **4**, un dosage UV est réalisé. Ce dosage consiste à protéger l'alcool primaire du support par un groupe fluorenylmethoxy carbonyl (Fmoc) en présence d'un large excès de FmocCl, puis après de copieux lavages, de cliver ce groupement protecteur avec une base. L'absorbance de la solution de déprotection est ensuite mesurée, ce qui permet de déterminer par le calcul avec la loi de Beer-Lambert la quantité de dibenzofulvène jaune (DBF) généré et donc la nouvelle charge de la résine. Cette méthode décrite dans la littérature⁹³ permet de déterminer une charge de 0.274 mmol/g équivalent à un taux de greffage de 50%, ce qui illustre bien la difficulté d'accessibilité des sites réactionnels. Cette nouvelle valeur de charge sera utilisée pour déterminer la quantité de donneur de thioglycoside nécessaire lors des réactions de glycosylation (Fig. 79).

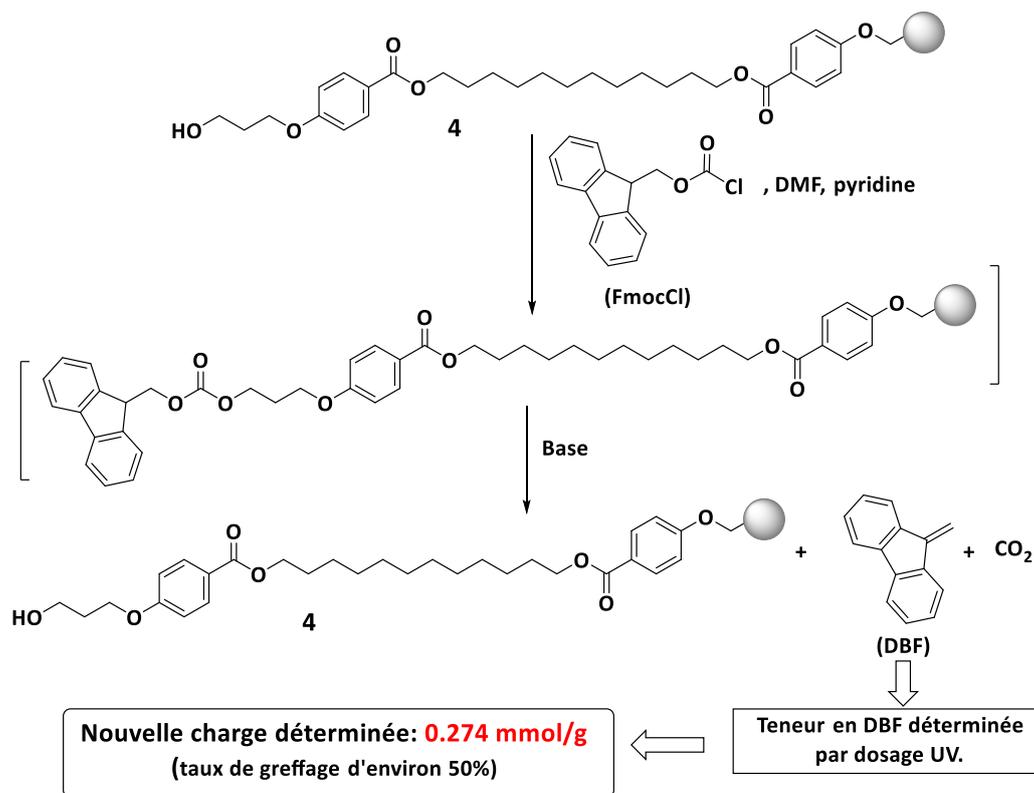


Figure 79: détermination de la charge de la résine après fixation du linker par dosage du DBF.

8.2.2 Etudes préliminaires réalisées avant synthèse sur support SOLUBLE.

8.2.2.1 Synthèse de noyaux solubles pour la synthèse supportée.

8.2.2.1.1 Stratégie de synthèse.

L'approche envisagée est d'attacher sur un noyau soluble une molécule dont la structure chimique est identique à celle de l'extrémité du linker utilisé pour le support solide. Les supports solides et solubles posséderont alors la même extrémité réactive. Les structures libérées des supports étant identiques, il sera ainsi facile de comparer les bruts réactionnels après clivage et ainsi de comparer les deux approches (Fig. 80).

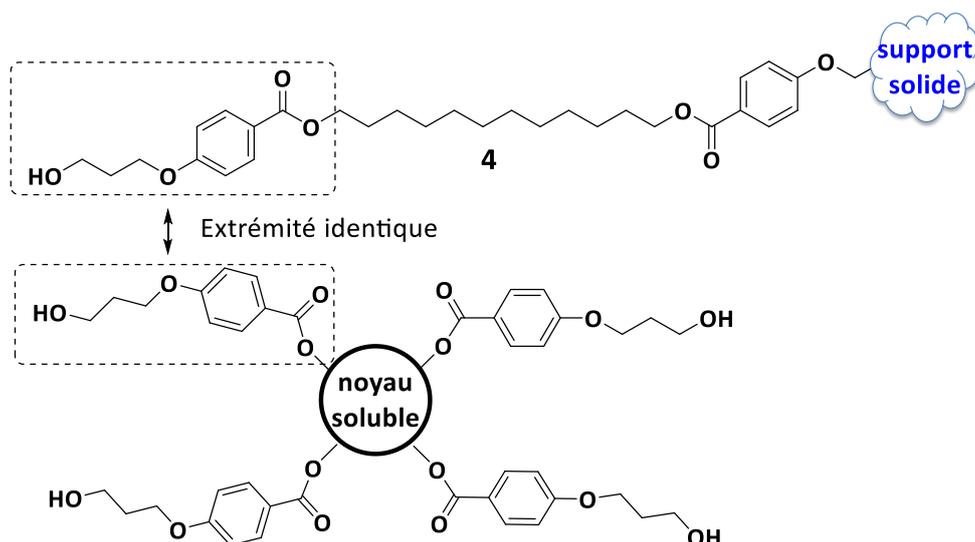


Figure 80: attache d'une molécule sur un noyau soluble comportant la même extrémité que le linker

4.

Les monosaccharides seront alors engagés et attachés dans des réactions classiques de glycosylation sur ce composé soluble polyfonctionnel. Le poids moléculaire des intermédiaires réactionnels augmentant considérablement, chaque intermédiaire de synthèse pourra alors facilement être purifié par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC) (Fig. 81).

Contrairement à la chromatographie sur gel de silice normale ou fonctionnalisée, la SEC ne purifie pas les molécules en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire mais en fonction de leur taille en solution (volume hydrodynamique). Cette technique est apparue en 1959⁹⁴ avec un produit nouveau : le Sephadex. C'est un gel de dextrane (polymère de glucose relié en position $\alpha(1\rightarrow6)$), auquel on fait subir une réticulation. Il se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Ces billes sont très hydrophiles et gonflent dans l'eau. Il en existe différents types en fonction de la taille des billes et de leur porosité.

Ce dextrane est destiné à la purification de molécules solubles dans les solvants très polaires comme l'eau, ce qui ne sera pas notre cas. L'utilisation d'une phase stationnaire lipophile de type Sephadex LH 20 est donc requise. Ces gels modifiés ont fait leur apparition en 1966 par hydropropylation de la Sephadex conférant à ce gel des propriétés de gonflement dans l'eau, les solvants et mélange de solvants organiques polaire⁹⁵. Ce gel est approprié aux structures abordées dans ce travail et sera donc utilisé dans la stratégie de synthèse supportée d'oligosaccharides en solution. D'une façon plus générale, lorsque la SEC sur gel de Sephadex LH-20 sera réalisée, Les oligosaccharides supportés dont les tailles sont supérieures à celles des pores des billes de Sephadex, sont totalement exclues du gel

et ne se répartissent que dans le volume extérieur aux billes, c'est-à-dire dans la phase mobile (éluant). ils sortiront les premiers, à un volume d'éluion V_0 appelé volume mort de la colonne (Fig. 82).

Les produits de la glycosylation dont les tailles sont inférieures à celles des pores des billes de Sephadex peuvent pénétrer librement dans les billes et se répartissent dans l'ensemble des liquides de la colonne. Les produits de la glycosylation autre que les intermédiaires supportés sortiront les derniers.

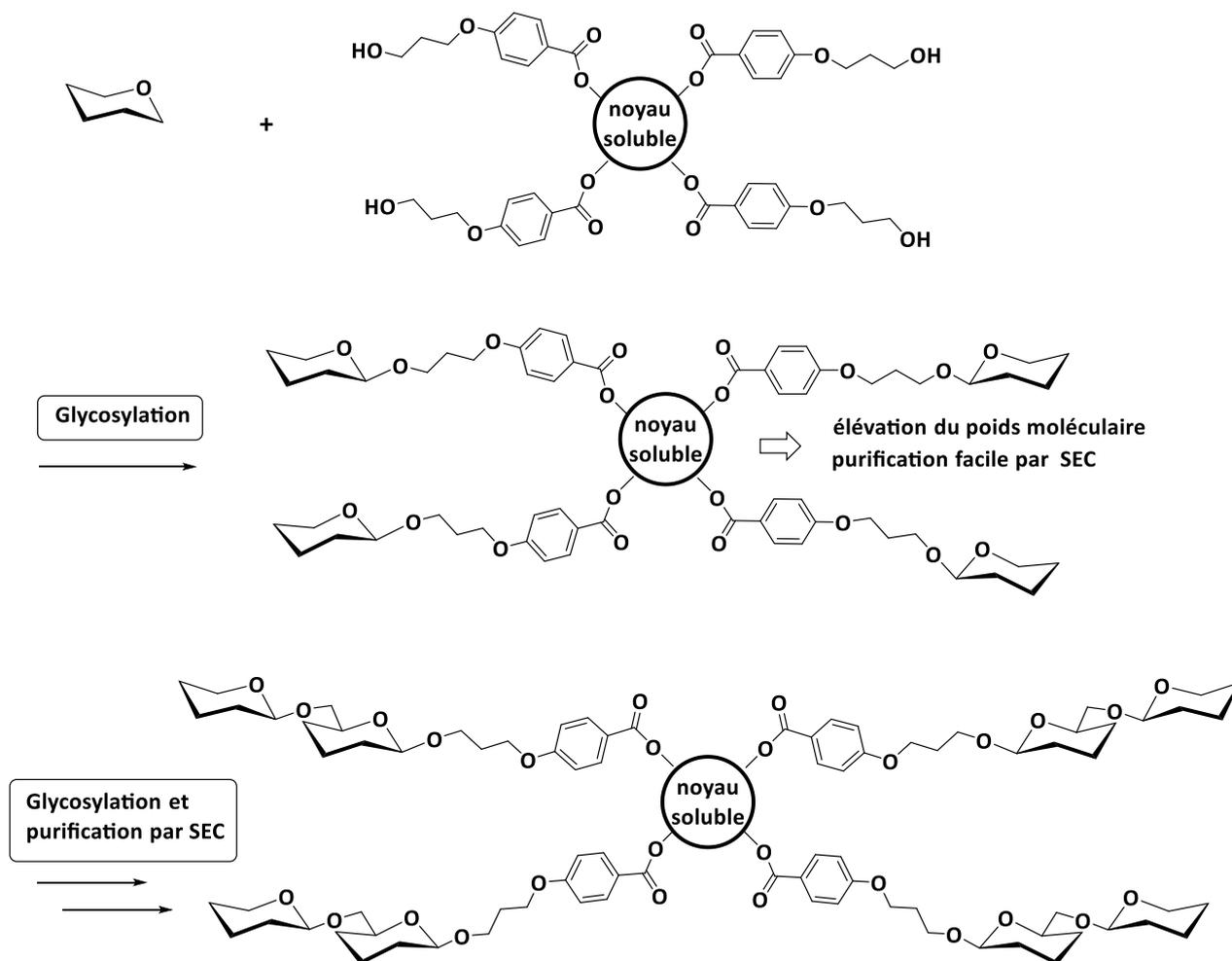


Figure 81: stratégie de synthèse d'oligosaccharides sur support soluble envisagée : purification des intermédiaires par SEC.

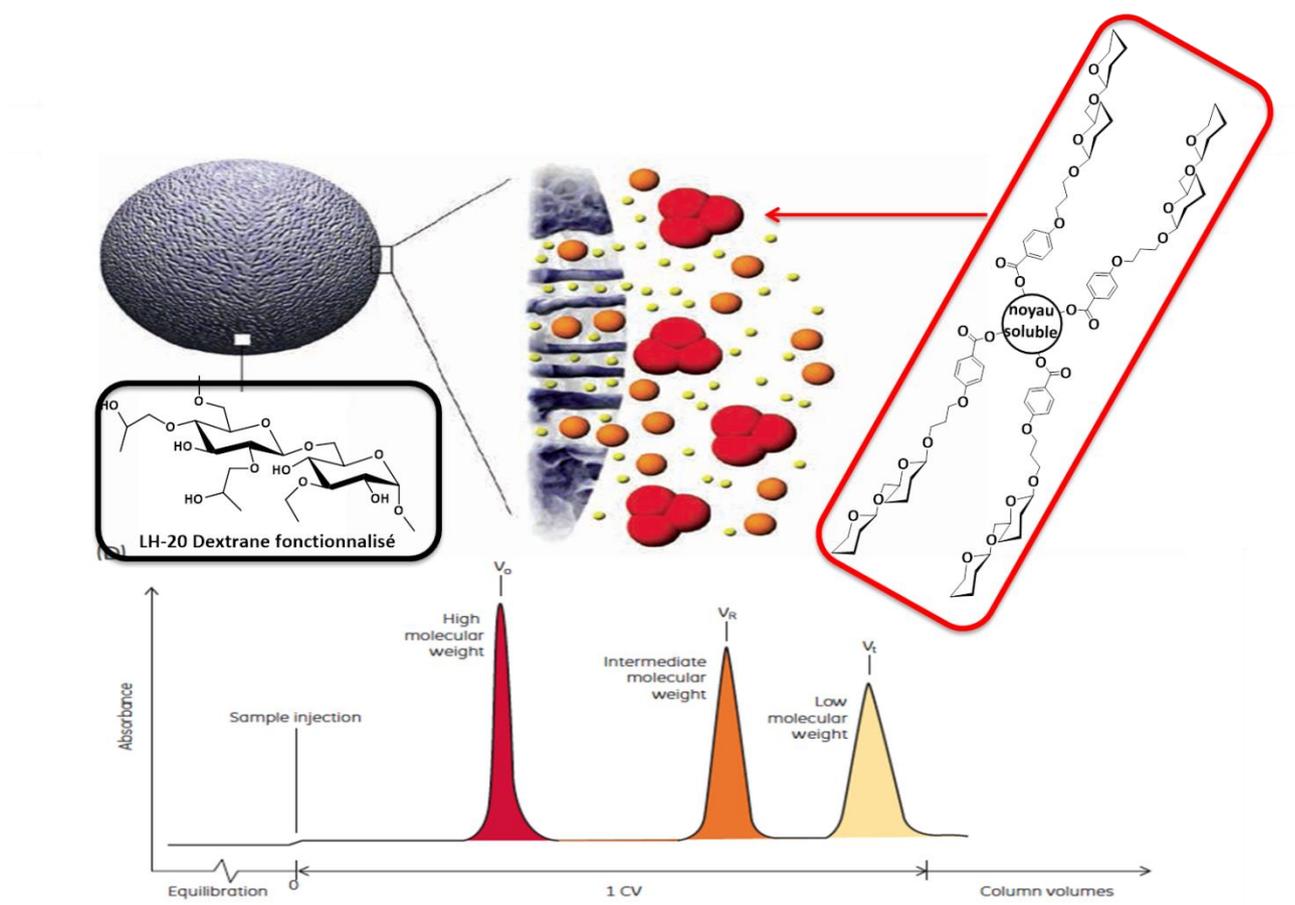


Figure 82: utilisation de la SEC pour la purification des intermédiaires dans la synthèse supportée d'oligosaccharides

8.2.2.1.2 Synthèse du précurseur **7** (tag UV).

La stratégie pour obtenir une structure identique à l'extrémité réactive du linker **4** utilise l'éthyl parabène comme précurseur. La première étape consiste à alkyler le phénol par une chaîne hydroxy-propyl en présence du 3-Chloro-1-propanol. Cette réaction est décrite dans la littérature^{96, 97}. La réaction se fait à reflux pendant 48h dans la butan-2-one en présence de K_2CO_3 et permet d'obtenir la structure **5**. La fonction ester de cette molécule est par la suite saponifiée de manière à attacher l'acide obtenu sur le noyau soluble et créer un lien ester clivable en milieu basique. Pour éviter d'estérifier les alcools de la chaîne hydroxy propyl de la structure **7**, ces derniers sont préalablement protégés sous forme de tétrahydropyranyl acétal (THP) conduisant à la structure **6**, clivable en milieu acide. Le précurseur **7** est ainsi facilement synthétisé et plusieurs grammes de ce composé ont été obtenus (Fig. 83).

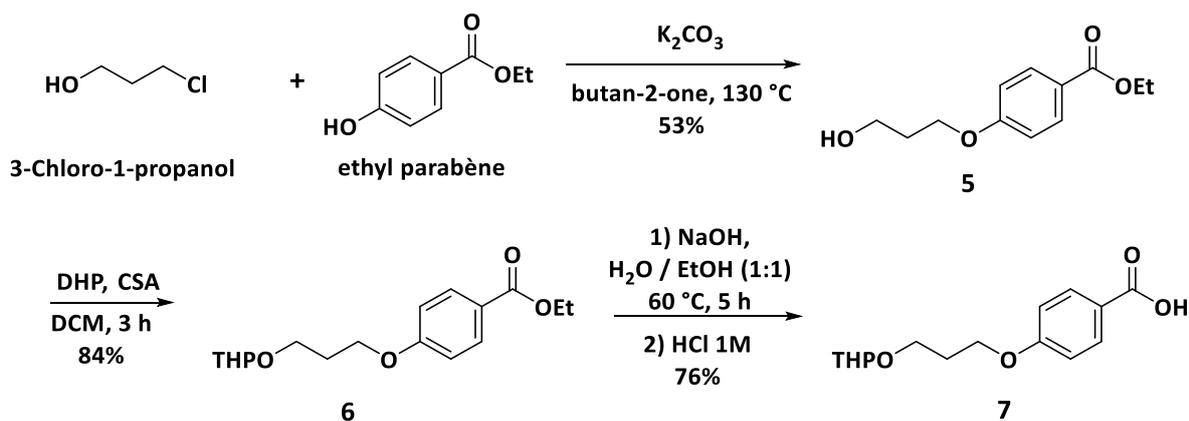


Figure 83: synthèse du précurseur 7 (tag UV).

8.2.2.1.3 Choix des supports.

Les diverses constructions des noyaux solubles se sont basées sur le pentaérythrytol et le dipentaérythrytol (Fig. 84). Ces composés commerciaux peu coûteux ont tous deux des structures symétriques, ce qui présente un avantage dans la caractérisation des intermédiaires réactionnels par RMN ^1H . De plus, les hauts poids moléculaires atteints après la première glycosylation (~3600 g/mol pour le pentaérythrytol et ~6000 g/mol pour le dipentaérythrytol) permettront de facilement purifier les intermédiaires par SEC.

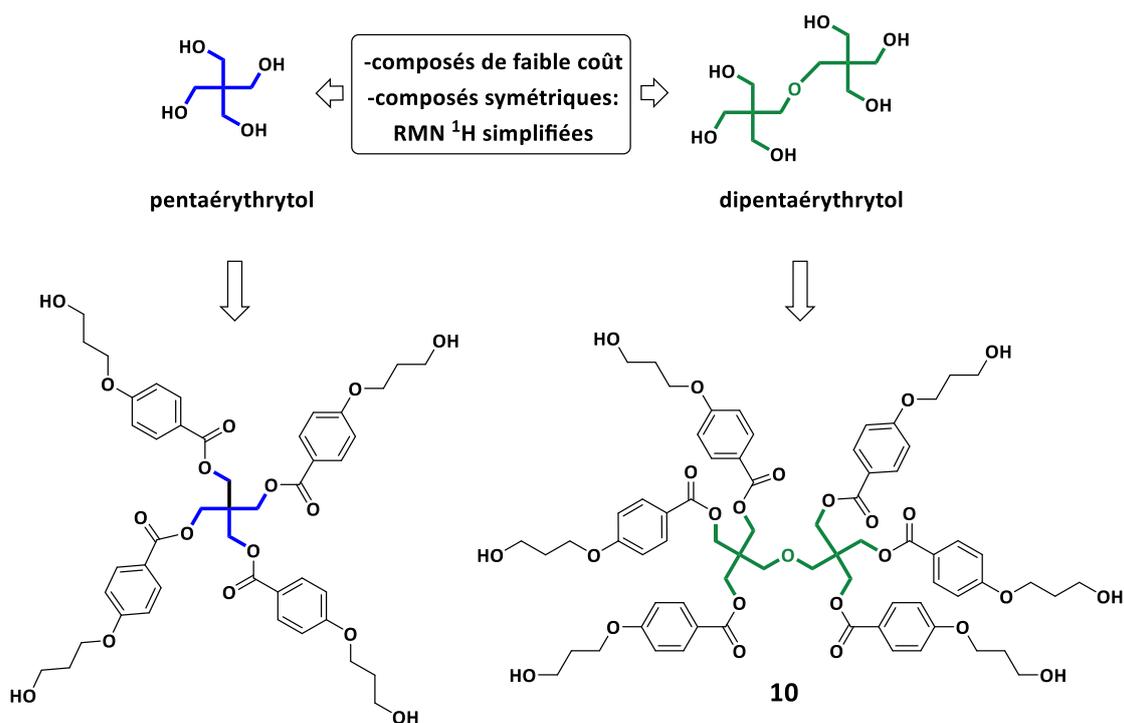


Figure 84: le pentaérythrytol et dipentaérythrytol comme précurseurs commerciaux dans la synthèse sur support soluble.

8.2.2.1.4 Synthèse des noyaux solubles : 1ère approche.

Le précurseur acide **7** synthétisé, la construction des noyaux solubles a débuté par la formation des esters entre **7** et le pentaérythrytol d'une part et le dipentaérythrytol d'autre part. C'est une estérification classique utilisant le système DCC/DMAP ou EDC/DMAP dans un mélange de DCM et DMF. Les alcools sont ensuite déprotégés en milieu acide conduisant aux deux noyaux utilisés pour la construction d'oligosaccharide sur support soluble (Fig. 85).

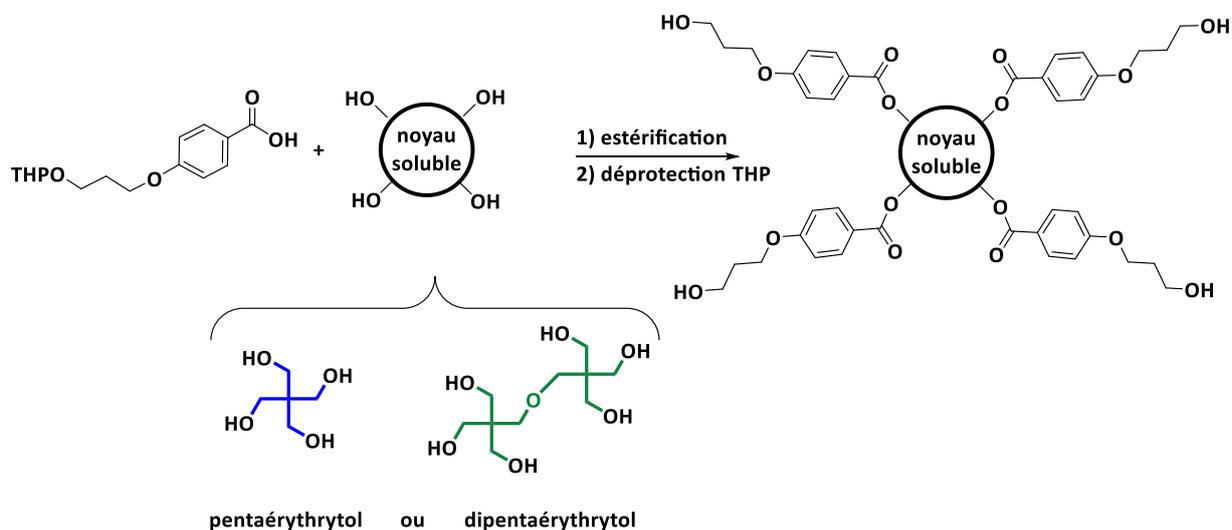
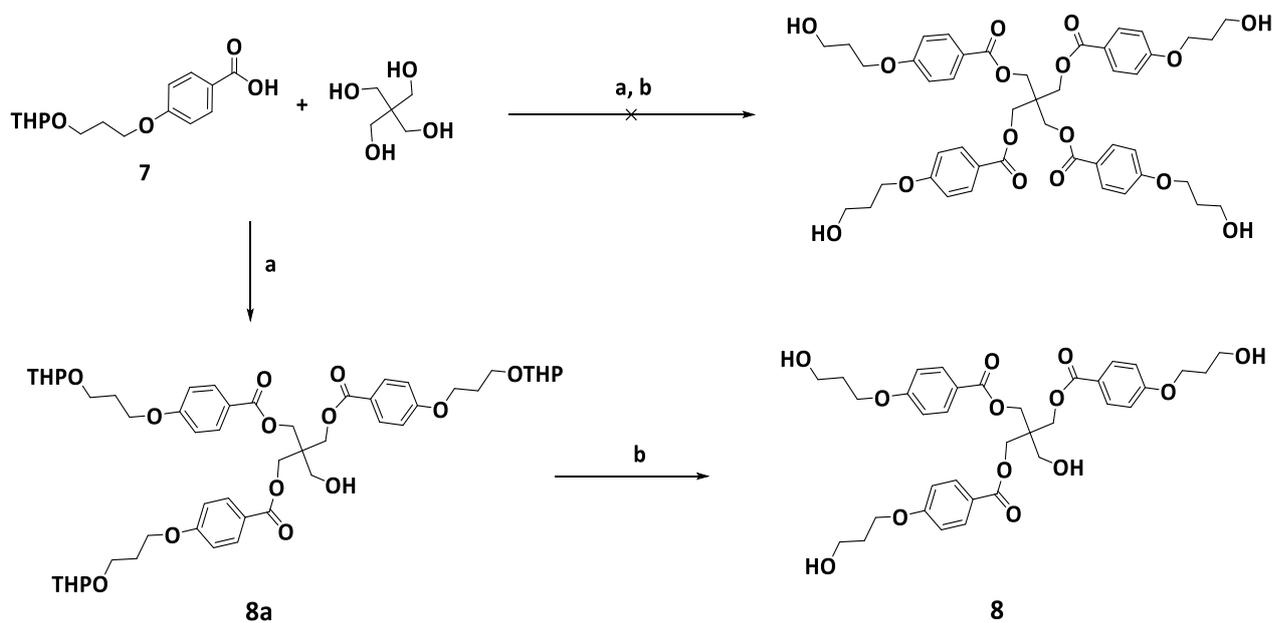


Figure 85: construction des supports solubles sur le pentaérythrytol et le dipentaérythrytol pour la synthèse supportée.

Dans le cas du pentaérythrytol, il a été impossible d'estérifier les quatre fonctions alcool probablement lié aux gênes stériques. Le clivage des THP de la structure **8a** et conduisant au composé **8** a été réalisée en présence d'acide paratoluènesulfonique (APTS) dans un mélange de DCM et de méthanol (MeOH). Le spectre RMN ¹H, plus facile à interpréter sans les groupes THP, a ainsi confirmé la structure partiellement estérifiée (Fig. 86).



réactifs et conditions: a) DCC / DMAP, DCM/DMF 1:1; b) APTS DCM/MeOH 1 : 1

Figure 86: estérification partielle observée du pentaérythrytol.

Dans un travail similaire, l'équipe de Mülhaupt a réalisé la transestérification de polyols avec l'éthyl-4-hydroxybenzoate (éthylparabène) en présence de dilaurate de dibutylétain (DBTDL) pour produire des poly(4-hydroxybenzoates)⁹⁸ (Fig. 87).

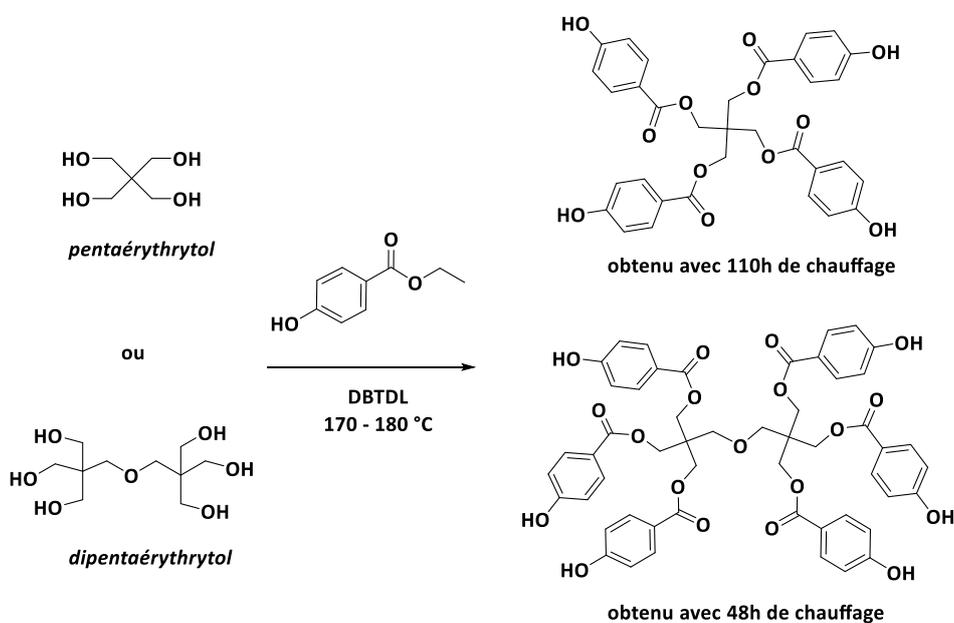


Figure 87: estérification du pentaerythrytol et dipentaerythrytol par chauffage en présence de DBTDL.

Le pentaérythrytol et le dipentaérythrytol figurent parmi les polyols estérifiés. Les conditions opératoires ont nécessité un chauffage de 110 h dans le cas du pentaérythrytol contre 48 h pour le dipentaérythrytol. En raison de ces difficultés d'estérification, la synthèse du noyau soluble s'est uniquement focalisée sur le dipentaérythrytol et la stratégie avec le pentaérythrytol a été provisoirement écartée.

Parallèlement, l'estérification des alcools du dipentaérythrytol a été réalisée sans difficulté et la structure **9** obtenue. Le clivage des groupements THP a été ensuite effectuée et la structure **10** obtenue et caractérisée (Fig. 88). Toutefois, un autre contretemps a été constaté: la structure **10** s'est montrée très peu soluble dans les solvants couramment utilisés dans les réactions de glycosylations comme le DCM ou l'acétonitrile (CH₃CN). Les raisons de ce caractère peu soluble de la structure **10** sont probablement liées à la rigidité du squelette dipentaérythrytol.

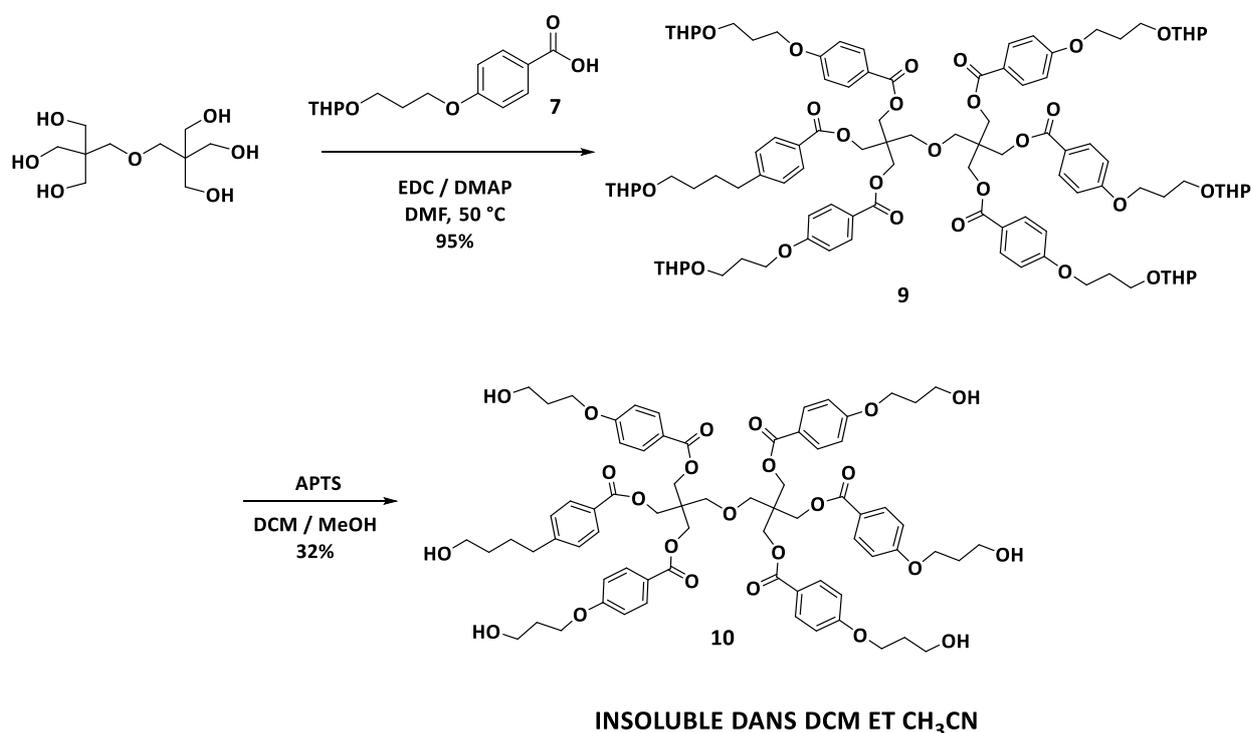


Figure 88: estérification du précurseur **7** sur le dipentaérythrytol et clivage des groupes THP : insolubilité de la structure **10** dans les solvants de glycosylation.

8.2.2.1.5 Synthèse des noyaux solubles : 2^{ème} approche.

Pour contourner les problèmes d'insolubilité, une seconde approche a été envisagée et réalisée. Cette alternative consiste à dériver les fonctions alcool du dipentaérythrytol par des fonctions hydroxy-propyl. Ces fonctions aux propriétés lipophiles modifient les propriétés physicochimiques du

dipentaerythrytol pour le rendre plus soluble. La méthode pour greffer ces fonctions hydroxy-propyl s'est basée sur une stratégie développée par Lindhorst. Dans ses travaux, Lindhorst a testé différentes méthodes de dérivatisation des groupements hydroxyles du D-Glucose. Lindhorst avait au préalable tenté de faire réagir sans succès le 3-bromopropan-1-Boc-amine. Elle a montré par la suite que la meilleure méthode de dérivatiser des alcools en diverses fonctions chimiques, dont des fonctions hydroxy-propyl, est d'utiliser le dérivé per-allylé correspondant (Fig. 89)⁹⁹.

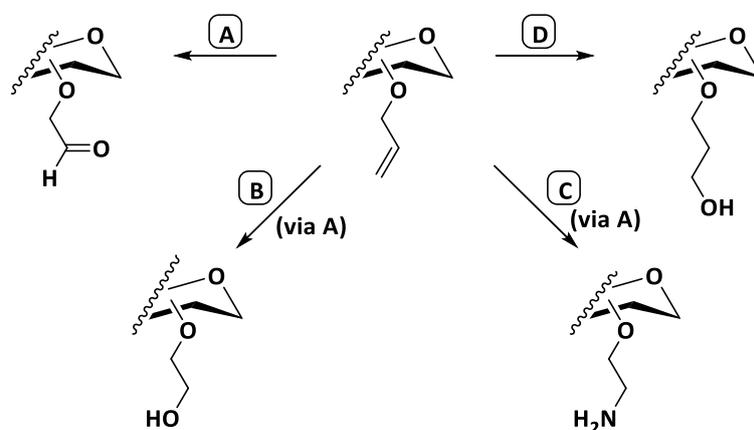


Figure 89: les groupements O-allyl sont intéressants pour générer d'autres fonctions.

Par exemple, l'ozonolyse génère une fonction aldéhyde (Fig. 89 voie A) qui peut être ensuite réduit en alcool (Fig. 89 voie B) ou subir une amination réductrice (Fig. 89 voie C). Les éthers allyliques peuvent également subir l'hydroboration régiosélective en présence de 9-BBN. La réaction est suivie d'une oxydation en présence d'eau oxygénée et de soude conduisant à un bras espaceur hydroxy-propyl (Fig. 89 voie D). Cette dernière méthode s'est avérée efficace pour Lindhorst, puis au Laboratoire dans la construction de glycodendrimères^{100,101} et la stratégie a ainsi été reprise sur le dipentaerythrytol per-allylé.

La per-O-allylation du dipentaerythritol avec du bromure d'allyle en présence de NaH dans le DMF a fourni le dérivé **11** avec un rendement de 74%. L'allylation complète, conforme à la littérature¹⁰², est clairement confirmée par l'analyse RMN ¹H montrant les signaux allyliques caractéristiques compris entre 5.90 et 5.08–5.34 ppm et la disparition des signaux OH. Le composé **11** est ensuite traité en présence de 9-BBN à reflux dans le THF suivi de l'oxydation effectuée en présence d'un mélange d'eau oxygénée H₂O₂ et de soude concentrée NaOH. L'hydroboration du composé **11** permet ainsi de fournir **12** avec un rendement de 63%. L'hydroboration complète est confirmée avec la disparition des signaux allyliques et l'apparition de signaux OH. L'estérification de **12** avec le composé **7** en présence du système EDC/DMAP a été réalisée et la structure **13** obtenue avec un rendement de 95%. La présence des groupes THP compliquant la caractérisation RMN de la structure **13**, leur

clivage en milieu acide a été effectué. Le spectre RMN ^1H simplifié (Fig. 91) ainsi que l'analyse HRMS ont confirmé la structure **14** avec l'estérification complète de toutes les branches sans autre sous-produit. La structure **14** a été obtenue avec un rendement de 82% (Fig. 90).

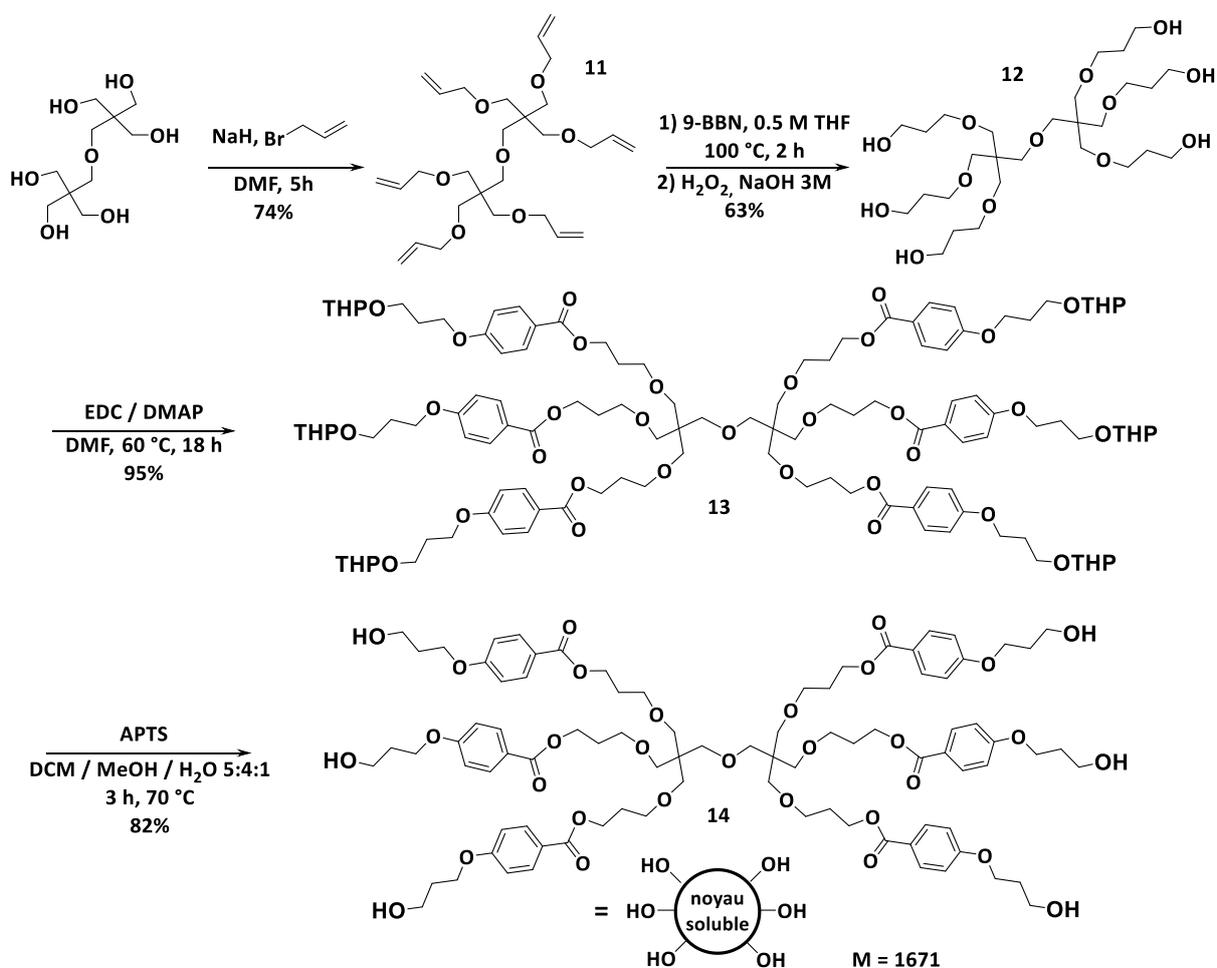


Figure 90 : synthèse du noyau soluble symétrique utilisée dans la synthèse supportée.

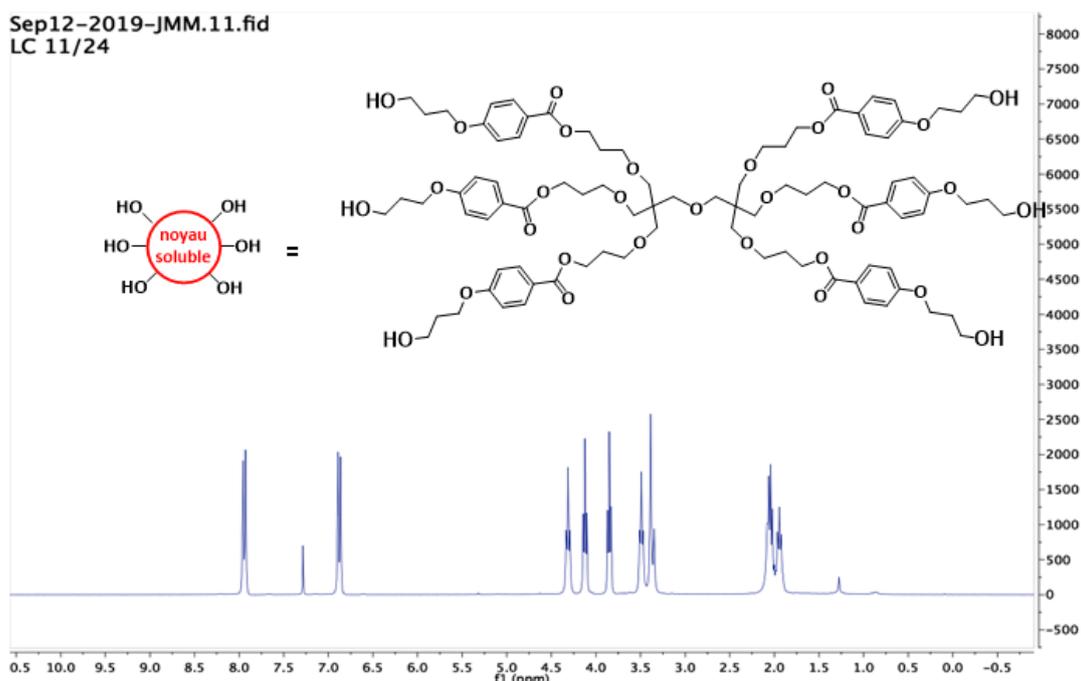


Figure 91 : RMN ¹H simplifiée du noyau soluble symétrique **14**.

Cette seconde approche a ainsi permis d'obtenir le dérivé **14** synthétisé à partir du dipentaérythrytol. La structure soluble dans le DCM avec un spectre RMN simple (Fig. 91), conforte l'idée d'utiliser le composé comme support soluble dans la construction d'oligosaccharide.

La même stratégie peut également être utilisée avec le pentaérythrytol. Cependant les potentiels problèmes d'encombrement stérique rencontrés ont écarté provisoirement l'utilisation de ce support pour la synthèse d'oligosaccharide.

8.2.2.1.6 Synthèse d'un traceur coloré **16** facilitant les purifications par exclusion stérique

Pour faciliter les purifications par exclusion stérique, un traceur coloré a été incorporé dans les bruts réactionnels de glycosylation. Le choix du traceur s'est porté sur la *N*-(-2-Nitrophenyl)proline **15** facilement obtenu par SNAr du fluor du 2-Fluoro-Nitrobenzène par l'amine de la L-Proline¹⁰³. Le produit de la réaction forme un chromophore push-pull, c'est-à-dire avec des groupements à la fois capables d'attirer et de donner des électrons. Cette circulation d'électron rend la *N*-(-2-nitrophenyl)proline **15** fortement colorée ($\epsilon_{416nm} = 2.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans un mélange de DCM/MeOH 1 : 1 v/v) et ce composé **15** a aussi l'avantage d'être inerte chimiquement vis-à-vis des conditions de réactions engagées (glycosylation et déprotection) (Fig. 92). Le choix de la proline (vs glycine par

exemple) est motivée par l'absence de N-H dans la molécule finale. Ce N-H est potentiellement acide et pourrait perturber la glycosylation.

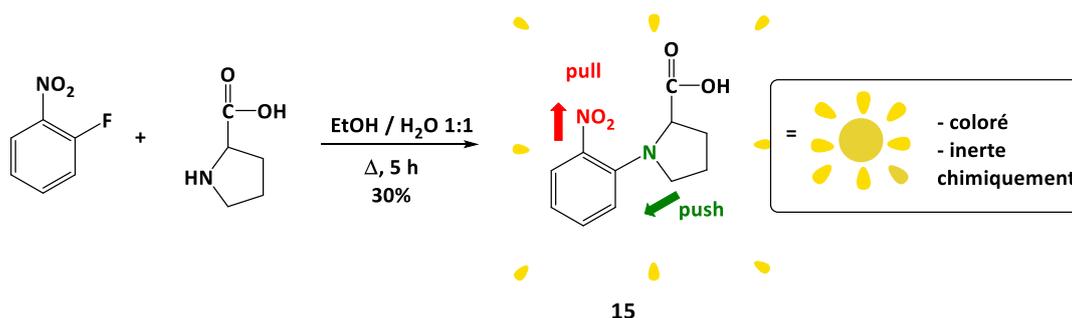


Figure 92: synthèse du chromophore push-pull **15** utilisé pour faciliter les purifications.

Le *tag* **15** est ensuite attaché sur le noyau soluble **14** par estérification classique utilisant le système EDC/DMAP pour conduire au traceur **16** (Fig. 93). Ce traceur extrêmement coloré avec aussi une masse moléculaire d'environ 3000 Da sera ajouté au brut réactionnel de la 1^{ère} glycosylation (Fig. 94). Le haut poids moléculaire du traceur ainsi que celui des structures oligosaccharidiques attachées sur le noyau soluble font que ces composés ne seront pas retenus dans les purifications sur la phase stationnaire dans les SEC. Il sera facile de détecter et de collecter uniquement les intermédiaires de synthèse supportée lorsque du solvant coloré coulera en sortie de colonne. Les fractions colorées contiendront uniquement le traceur coloré **16** et les intermédiaires de synthèse supportée (Fig. 94).

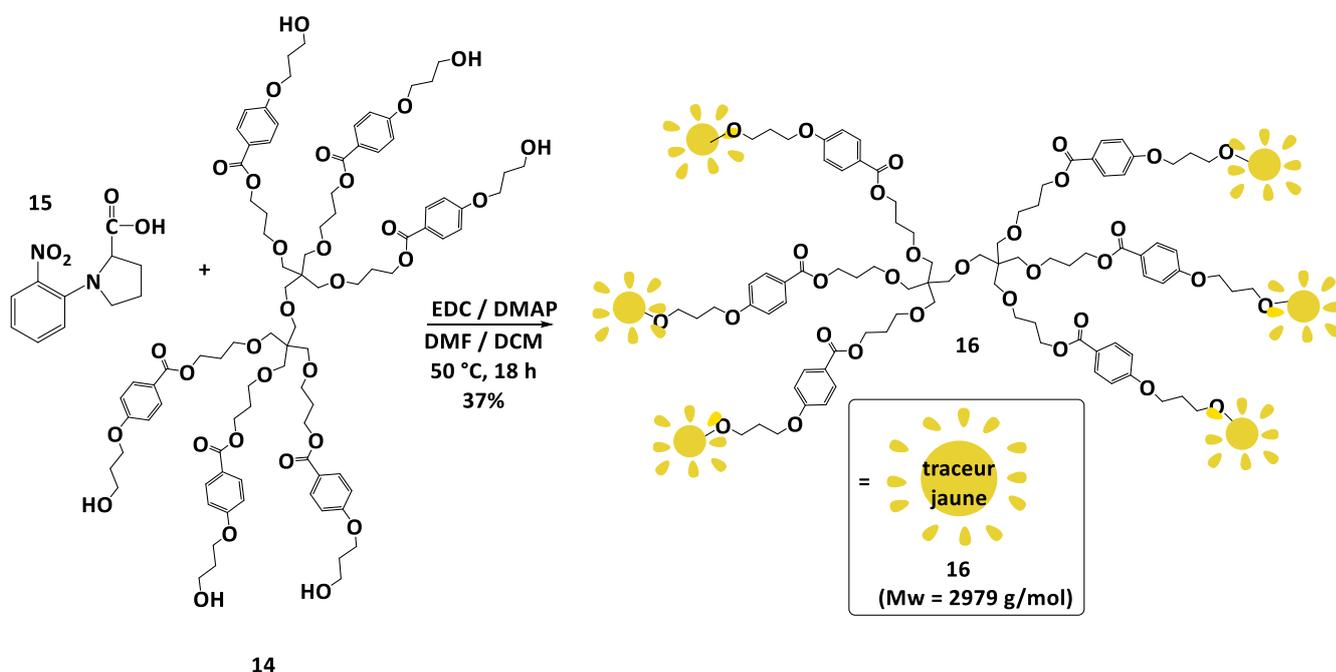


Figure 93: synthèse du traceur pour faciliter les purifications par SEC.

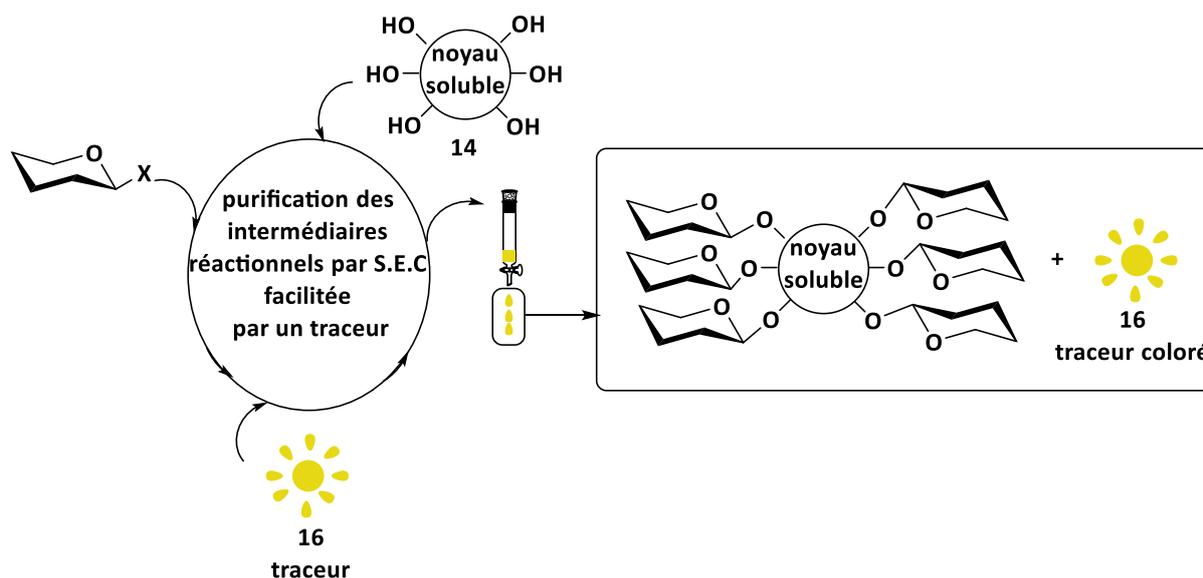


Figure 94 : principe de synthèse supportée facilitée par le traceur **16**

Le coefficient d'extinction molaire du traceur **16** a été déterminé expérimentalement. La valeur trouvée ($\epsilon_{411\text{nm}} = 8.0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans un mélange DCM/MeOH 1:1 v/v) montre que ce composé peut être utilisé comme traceur détectable à l'oeil nu. A titre comparatif, la 2-nitroaniline de couleur jaune-orange a un coefficient d'extinction molaire ϵ voisin de $3.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. (Fig. 95)

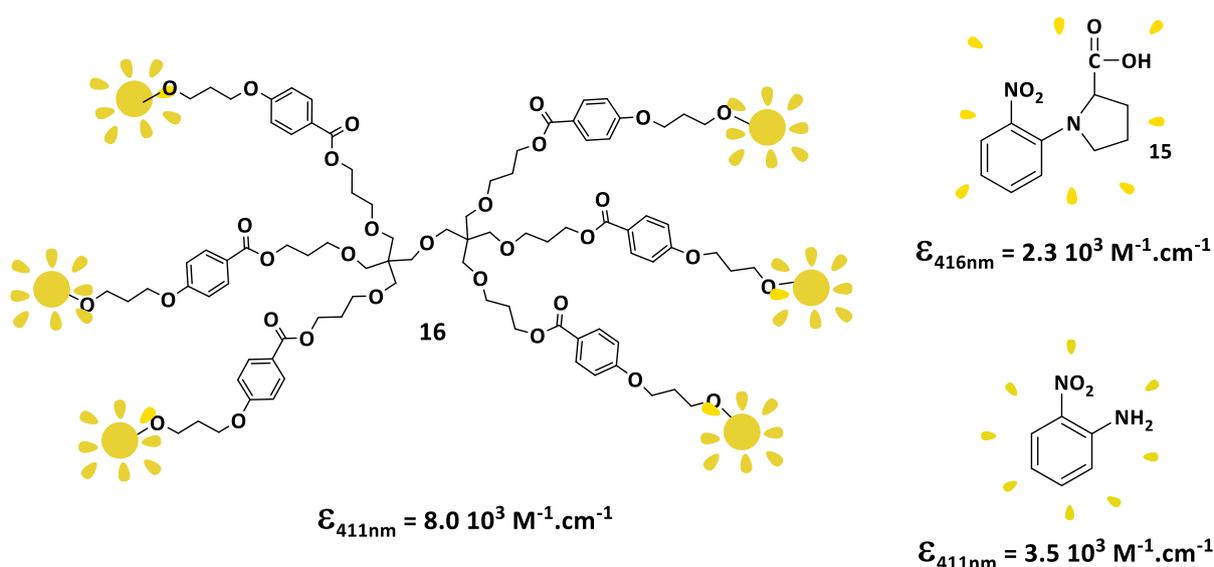


Figure 95 : coefficient d'extinction molaire des composés **15**, **16** et de la 2-nitroaniline

Pour citer un autre exemple de détecteur coloré, le PNPP (para-nitrophénylphosphate) est un substrat largement utilisé pour détecter la phosphatase alcaline dans les applications ELISA¹⁰⁴.

Lorsque la phosphatase alcaline et le PNPP réagissent, le *p*-nitrophénol jaune détectable à l'oeil nu ($\epsilon = 1.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pH basique) se forme et absorbe la lumière à 405 nm. (Fig. 96)

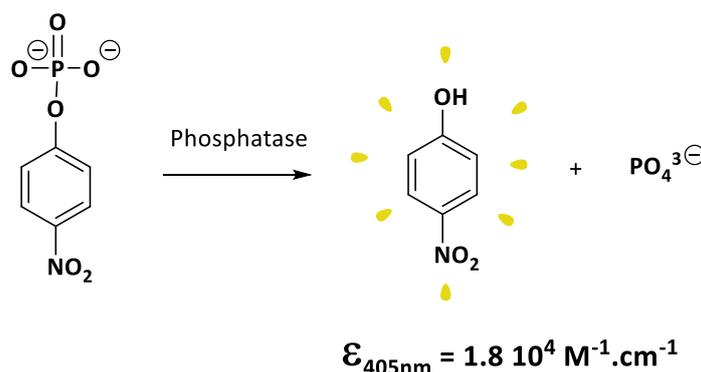


Figure 96 : le PNPP (para-nitrophénylphosphate) est un substrat pour détecter l'activité des phosphatases.

8.3 Synthèse et utilisation du *p*-alkoxy-thiophénol pour la construction supportée d'oligosaccharide.

Le 2-méthyl-5-*tert*-butylphénylthiol (HSMbp) a été utilisé dans le Laboratoire des Biomolécules²² comme thiol précurseur dans la synthèse de thioglycosides, dans la construction complexe d'oligosaccharides^{7,23} et ce composé a depuis été utilisé par d'autres groupes de glycochimistes^{83,53}. Ce produit commercial présente l'avantage d'être non odorant et peu toxique contrairement au thiophénol. De plus, les groupements inductifs donneurs (effet +I) du Méthyl (Me) et du *tert*-Butyl (*t*Bu) enrichissent le noyau aromatique et rendent l'atome de soufre plus nucléophile. Les rendements rapportés dans la littérature variant entre 60 à plus de 90% (selon les groupements protecteurs choisis et la nature de l'accepteur) démontrent que le HSMbp est approprié pour la construction complexe d'oligosaccharides. Les thioaryls glycosides sont aussi préférés par rapport aux thioalkyls glycosides pour des raisons basées sur nos constatations expérimentales. En effet, le Laboratoire avait sélectionné le lauryl mercaptan $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}]$ dans la construction d'oligomannosides présents sur la paroi cellulaire du champignon *Candida Albicans*⁸⁷. Les rendements de glycosylations obtenus ont plutôt été décevants (de 60 à 70%) avec ce thioalkyl censé être réactif en raison du caractère inductif donneur de la chaîne en C_{12} .

L'hypothèse envisagée pour expliquer ces modestes rendements de glycosylation réside dans la possibilité de fragmentation des thioalkylglycosides. En effet, quand l'atome de soufre réagit sur le promoteur, l'espèce chargée résultante peut se fragmenter pour générer le carbocation le plus stable, offrant alors 2 possibilités (Fig. 97):

- 1) la fragmentation a lieu côté saccharide avec formation du carbocation stabilisé par différents éléments (groupements électrodonneurs, participation de la position C-2, oxygène en α du carbocation,...) (Fig. 97 voie a)
- 2) La fragmentation a lieu côté alkyle. Cette possibilité est d'autant plus envisageable que le carbocation généré sera stabilisé par un groupement alkyl comme une chaîne lauryl et avec des glycosides désarmés (Fig. 97, voie b).
- 3) L'élimination d'un proton H^+ en α du sulfonium est également une possibilité conduisant à une espèce stable donnant une fragmentation type Pummerer (Fig. 97, voie c).

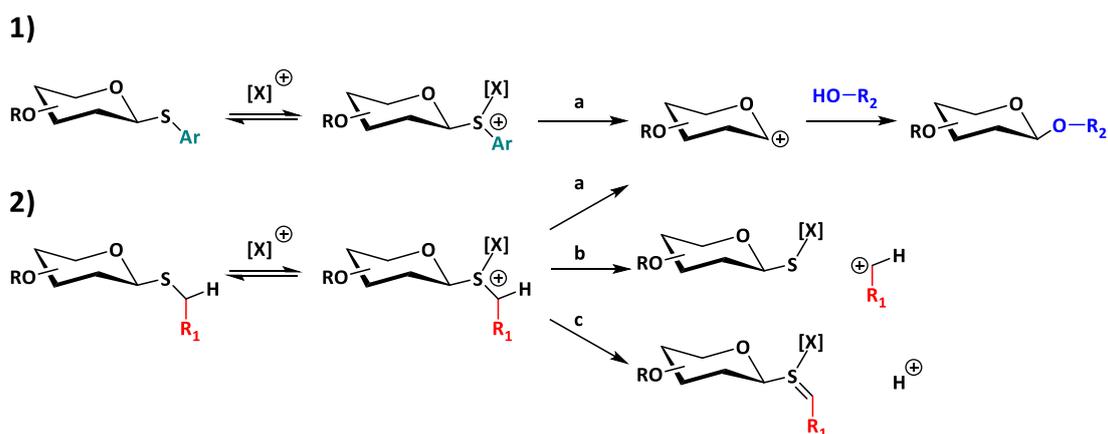


Figure 97 : possibilité de fragmentation des thioalkylglycosides après activation.

Ces réactions secondaires envisageables avec les thioalkyls glycosides ne sont que des hypothèses et non jamais été prouvées. Toutefois les résultats obtenus au Laboratoire avec les lauryls thioglycosides, rapportés comme être de très bons donneurs de glycosides^{18, 105} n'ont pas été concluants. Cela laisse donc penser que des réactions secondaires peuvent avoir lieu et c'est pourquoi, en version désarmée, les thioaryls glycosides seront préférés aux thioalkyls glycosides.

Plus récemment, nous nous sommes orientés vers les dérivés *p*-alkoxy-thiophénols totalement inodores et a priori plus réactifs que le HSMbp. En effet, l'effet mésomère donneur (+M) des chaînes alkoxy étant supérieur aux effets inductifs donneurs des groupements Me et *t*Bu, le noyau aromatique sera plus enrichi et le soufre sera plus réactif (Fig. 98).

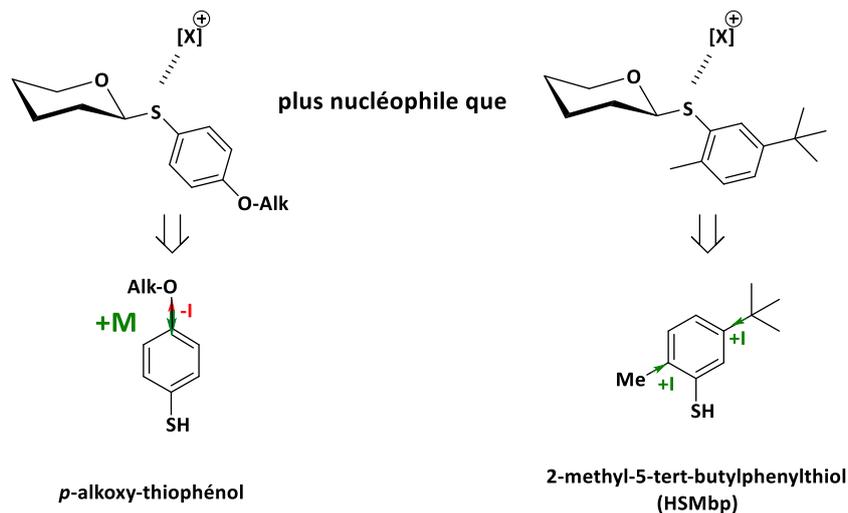


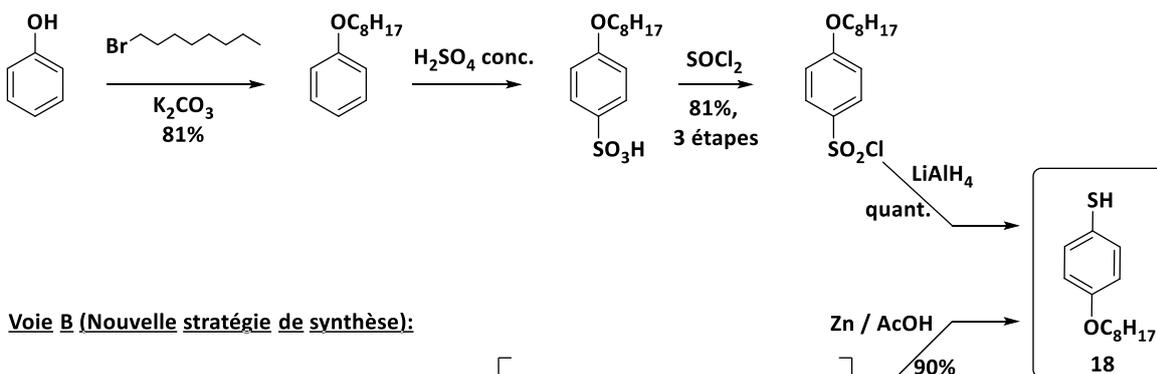
Figure 98: effet mésomère +M de la chaîne alkoxy renforçant la nucléophilie du soufre.

Les dérivés *p*-alkoxy thiophénol ont déjà été développés par Node pour l'utilisation de thiol non odorant dans la synthèse de thioglycoside. Ces dérivés sont complètement inodores mais, n'étant pas commerciaux, doivent être préparés. Dans la synthèse originale de Node, le phénol est alkylé avec du bromure d'octyle en présence de carbonate de potassium (K_2CO_3) fournissant l'octyl phényl éther. Ce composé est ensuite traité avec de l'acide sulfurique à température ambiante. L'acide *p*-octyloxybenzenesulfonique obtenu est transformé en chlorure de sulfonyle correspondant avec du chlorure de thionyle ($SOCl_2$) suivi d'une réduction avec de l'aluminohydru de lithium ($LiAlH_4$) fournissant le *p*-octyloxybenzenethiol complètement inodore. Le composé est obtenu avec un rendement global de 59% sur 4 étapes¹⁰⁶ (Fig. 99, voie A).

Dans une autre approche plus rapide, nous avons préparé le *p*-octyloxybenzenethiol à partir du Bis(4-hydroxyphenyl) disulfide commercial. De la même manière que la stratégie de Node, le biphérol est doublement alkylé avec du bromure d'octyle en présence d'hydru de sodium dans le diméthylformamide (DMF) (L'emploi d'une base moins forte comme K_2CO_3 avait été testée mais nécessitait plus de quantité de base pour une alkylation totale). Après évaporation du solvant et lavage par extraction, le brut est repris dans une solution de DCM et d'acide acétique (AcOH). La réduction du disulfure **[17]** se fait par l'ajout de zinc (Zn) en poudre¹⁰⁷.

Après suivi de la réaction en Chromatographie sur Couche Mince (CCM) détecté avec le réactif d'Ellman, le zinc est filtré, les solvants sont évaporés et le composé final est purifié sur gel de silice. Il a ainsi été facile de préparé 8.6 g de *p*-octyloxybenzenethiol **18** à partir de 5.0 g de Bis(4-hydroxyphenyl) disulfide, soit un rendement de 90% sur 3 étapes (Fig. 99, voie B).

Voie A (Synthèse originale de Node):



Voie B (Nouvelle strat\u00e9gie de synth\u00e8se):

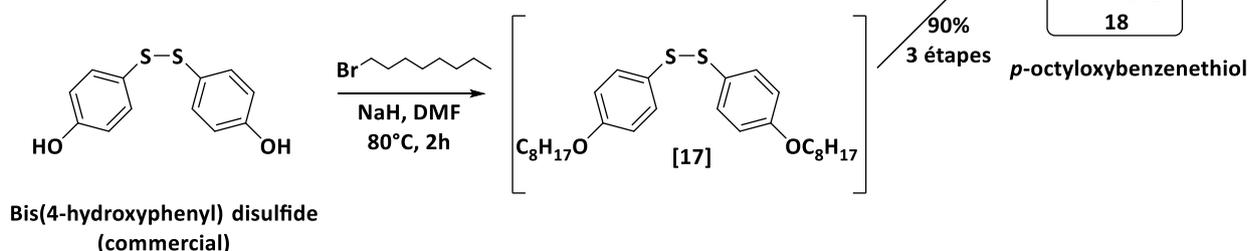


Figure 99 : synth\u00e8se originale de Node (voie A) et nouvelle strat\u00e9gie de synth\u00e8se (voie B) du *p*-Octyloxybenzenethiol **18.**

Remarque: Le r\u00e9actif d'Ellman (5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzo\u00efque ou DTNB) est un produit utilis\u00e9 pour quantifier le nombre ou la concentration en thiol dans un \u00e9chantillon. Les thiols r\u00e9agissent avec le DTNB en clivant la liaison disulfure pour donner le 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB). Ce compos\u00e9 s'ionise en milieu basique et prend une couleur jaune (Fig. 100).

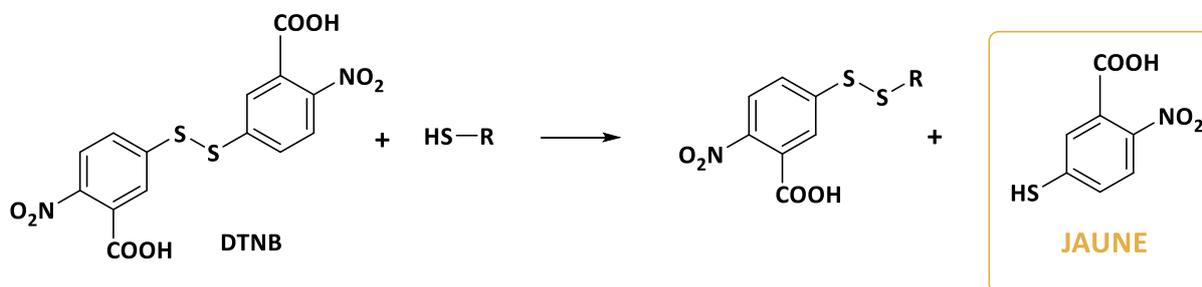
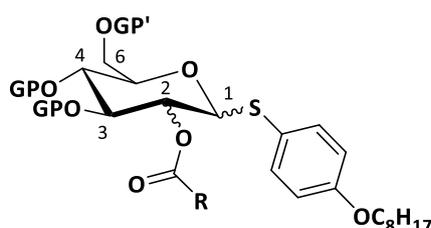


Figure 100: m\u00e9canisme r\u00e9actionnel du r\u00e9actif d'Ellman pour la d\u00e9tection en CCM des thiols R-SH.

8.4 Strat\u00e9gie de synth\u00e8se pour l'\u00e9laboration des $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et $\alpha(1\rightarrow6)$ mannanes.

La conception des donneurs de thioglycosides pour la construction it\u00e9rative $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et $\alpha(1\rightarrow6)$ mannosides repose sur la strat\u00e9gie g\u00e9n\u00e9rale suivante (Fig. 101):

- 1) Le *p*-octyloxybenzenethiol est installé sur la position anomérique. Ce thiol pourra être activé sous l'action de promoteurs tel que le système NIS / Tf(OH).
- 2) Un groupement ester type benzoate assurant la bêta sélectivité (pour la construction de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes) ou l'alpha sélectivité (pour la construction des $\alpha(1\rightarrow6)$ mannosides) est installé sur la position C-2.
- 3) Des groupements protecteurs permanents sont situés sur les positions C-3 et C-4. Ces groupements pourront être enlevés pendant ou après le clivage de l'oligosaccharide.
- 4) Un groupement protecteur temporaire assurant la liaison $\beta(1\rightarrow6)$ ou $\alpha(1\rightarrow6)$ est installé sur la position C-6. La position C-6 comportant un alcool primaire plus réactif, il est possible de faire réagir régiosélectivement cet alcool.



OGP': groupement protecteur temporaire
OGP: groupement protecteur permanent

Figure 101 : structure générale des donneurs de thioglycoside employés pour la synthèse de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et $\alpha(1\rightarrow6)$ mannanes.

Le fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc) a été choisi comme groupement protecteur temporaire. Ce groupement protecteur volumineux pourra être installé de manière régiosélective sur l'alcool primaire de la position C-6 en faisant réagir du chlorure de fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc-Cl). Le Fmoc s'enlève dans des conditions basiques douces, il est ainsi compatible avec les fonctions chimiques qui composent la structure oligosaccharidique (ester, liaison glycosidique, ..).

Toutes ces structures auront également un ester de type benzoate installé sur la position O-2 assurant la bêta (ou l'alpha) sélectivité. D'autres esters auraient pu être choisis (pivalate, acétate), cependant les esters type benzoate sont connus pour être de très bons groupements participants contrairement aux esters de type acétate. Ils présentent également l'avantage de se cliver dans des conditions standard contrairement aux esters encombrés de type pivalate, nécessitant parfois des conditions plus dures.

Les esters sont des groupements protecteurs très usités en glycochimie en raison de leur facilité d'introduction et de leur simple suppression sous conditions acides ou basiques. Pour cette raison les

positions O-3 et O-4 seront ainsi protégées par ces fonctions. Toutefois il est bien établi dans la littérature que les esters ont la tendance aux migrations intramoléculaires en condition neutre ou acide mais particulièrement en conditions basiques. Le Laboratoire a déjà observé ces phénomènes de migration dans des dérivés mannosides, ce qui a clairement limité l'intérêt des ester de type benzoate comme groupe protecteur⁷. Pour anticiper les éventuelles migrations des fonctions benzoate, la position C-4 sera protégée par une fonction éther type benzyl, compatible et clivable par hydrogénation catalytique.

8.4.1 Donneurs de thioglycosides synthétisés et étudiés.

Les donneurs synthétisés ou envisagés résultants des paramètres décrits précédemment sont représentés dans le tableau suivant (Tableau 1) :

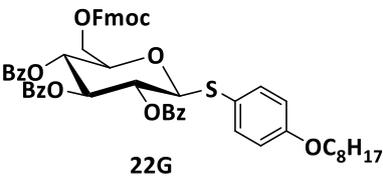
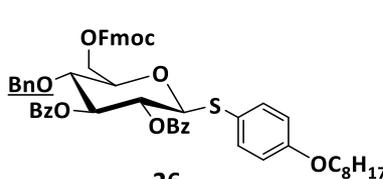
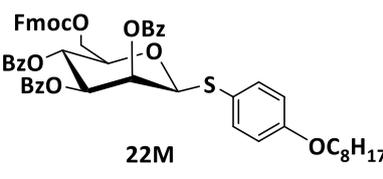
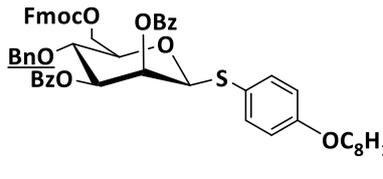
<p>Précurseurs thioglycosides pour la synthèse des $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes Série D-Glucose (Glc)</p>	 <p>22G</p>	 <p>26</p>
<p>Précurseurs thioglycosides synthétisés pour la synthèse des $\alpha(1\rightarrow6)$ mannanes Série D-Mannose (Man)</p>	 <p>22M</p>	

Tableau 1 : donneurs synthétisés ou envisagés pour les synthèses de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et $\alpha(1\rightarrow6)$ mannosides.

8.4.1.1 Synthèse des donneurs de thioglycoside (Série Glucose et série Mannose) (fonction Benzoyl (Bz) installée en position O-4).

Les composés **22G** et **22M** ont été préparés respectivement à partir du D-Glucose et D-Mannose peracétylés. L'acétate anomérique de ces deux composés a été activé en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ puis substitué par le *p*-octyloxybenzenethiol fournissant les composés **19G**¹⁰⁸ et **19M**. Les groupements acétate sont ensuite clivés par du méthanolate de sodium dans les conditions de Zemplén¹⁰⁹ permettant de fournir les composés **20G** et **20M**. L'étape suivante est la protection régiosélective de l'alcool primaire par le Fmoc générant **21G** et **21M**. Ce type de réaction initialement décrite par Yamamoto¹¹⁰ a déjà été réalisé au Laboratoire¹¹¹. La réaction de protection est réalisée en présence

de sym-Collidine utilisé comme base et catalyseur. C'est un composé dérivé de la pyridine avec trois groupements méthyl. Les groupements méthyl augmentent l'encombrement et rendent le réactif plus sélectif (vs pyridine). L'azote réagit sur le chloroformiate formant un intermédiaire réactif chargé et encombré qui ne peut être attaqué par l'alcool primaire, moins encombré que les autres alcools (Fig. 102).

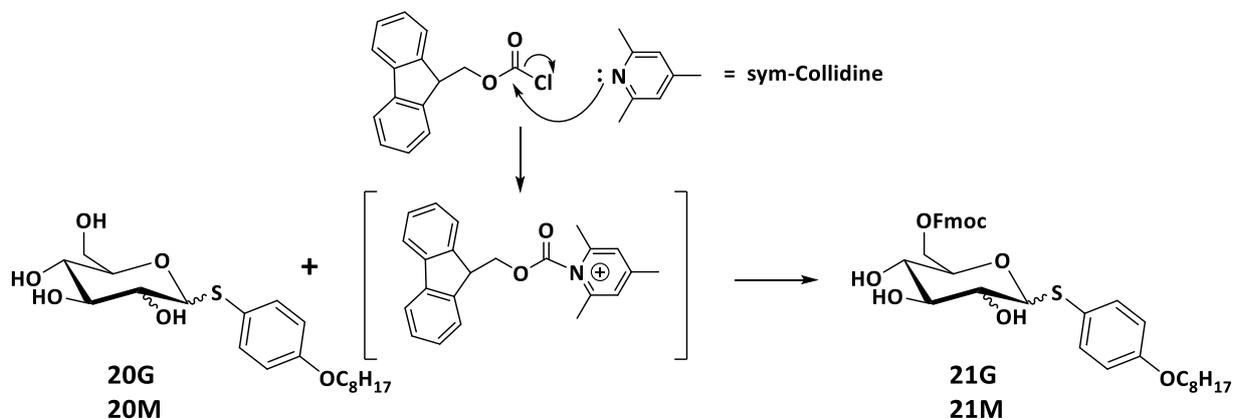


Figure 102: protection régioselective de la position O-6 par le Fmoc en présence de sym-Collidine.

L'étape suivante est la protection des alcools secondaires par des groupements benzoate. La réaction s'effectue en présence de chlorure de benzoyle dans un mélange de DCM et de pyridine conduisant aux structures finales **22G** et **22M**. Cette stratégie a permis de synthétiser **22G** avec un rendement global de 38% pour 4 étapes à partir du monosaccharide peracétylé (Fig. 103).

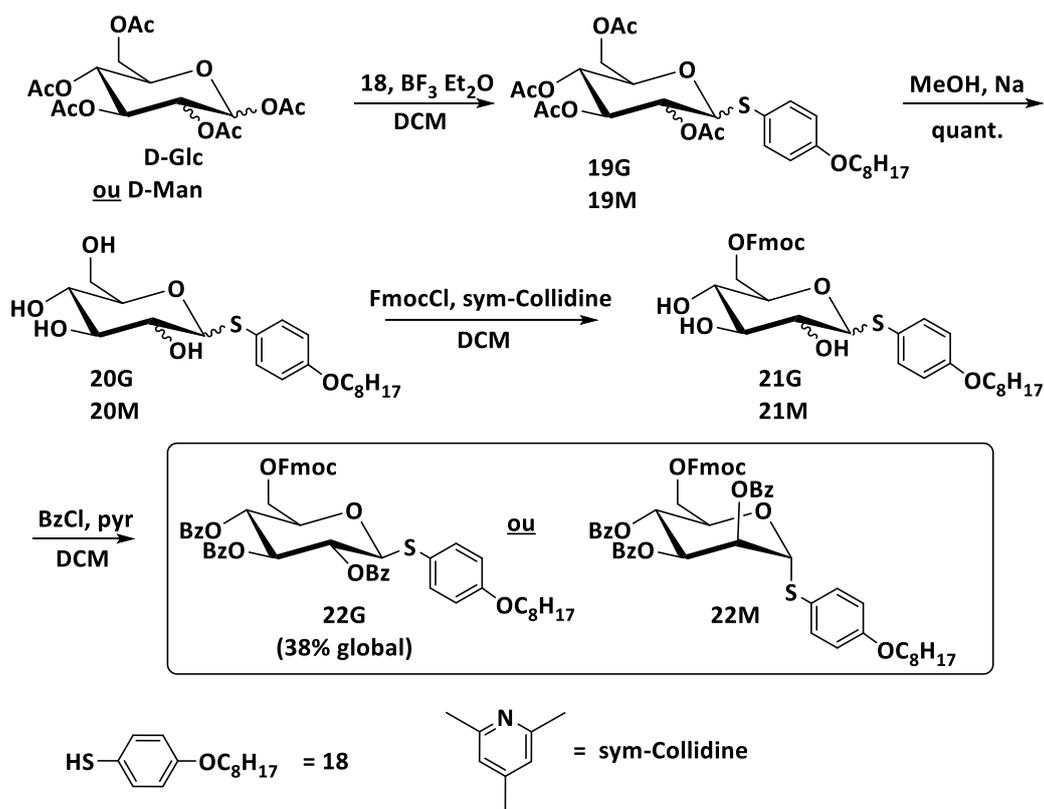


Figure 103: synthèse des donneurs de thioglycoside **22G** (Glc) et **22M** (Man) (Fonction Benzoyl (Bz) en position O-4).

8.4.2 Synthèse du donneur de thioglycoside **26** (Série Glucose) (Fonction Benzyl (Bn) en position O-4).

La stratégie consiste à protéger les positions O-4 et O-6 du composé **20G** (série Glucose) sous forme de benzylidène en présence diméthyl acétal de benzaldéhyde en milieu acide. Après purification sur gel de silice, les positions O-2 et O-3 du composé **23** sont estérifiées en présence d'anhydride benzoïque en présence de triéthylamine (NEt_3) et de 4-diméthylaminopyridine (DMAP). Cette réaction d'estérification avait initialement été réalisée avec le chlorure de benzoyle mais ne permettait pas d'isoler le produit **24** par précipitation.

L'étape clé de cette synthèse pour introduire un groupement benzyl en position O-4 réside dans l'ouverture régiosélective du benzylidène. Cette étape génère l'alcool libre en position O-6 et un groupement benzyl protégeant la position O-4. Divers systèmes de réactifs ont été introduits pour ce type de clivage régiosélectif. La récente et pratique méthode développée par Fügedi¹¹² utilisant le système $\text{TMSOTf} / \text{BH}_3\text{-THF}$ a permis d'obtenir le composé **25**. Cette étape est ensuite suivie de l'introduction du groupement Fmoc fournissant le donneur de thioglycoside **26** (Fig. 104).

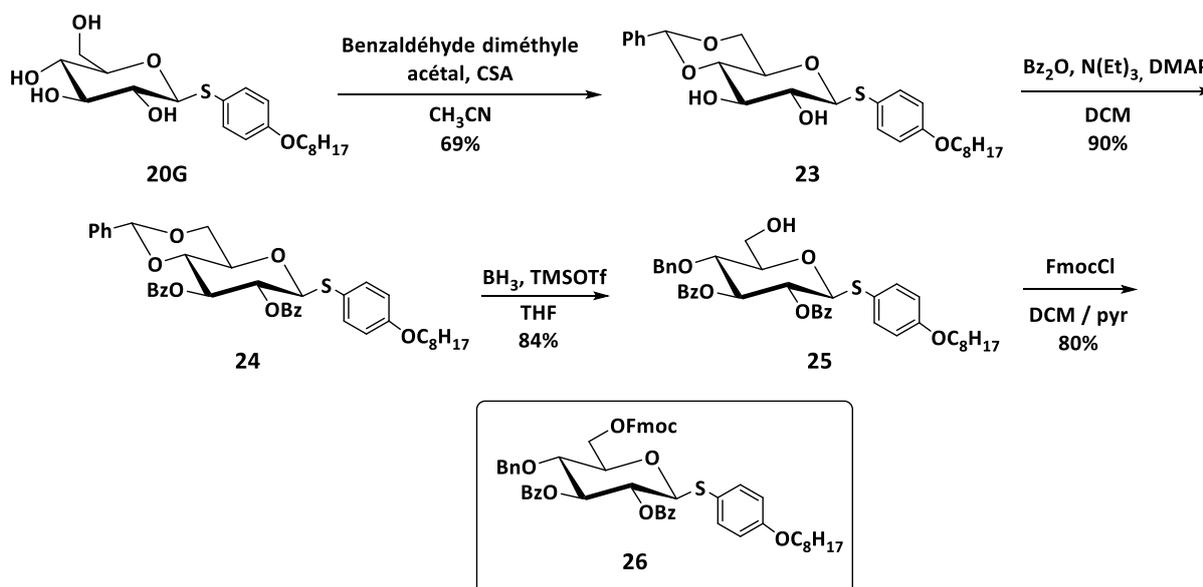


Figure 104 : synthèse du donneur de thioglycoside **26** (Série Glucose) (Fonction Benzyl (Bn) en position O-4).

Cette stratégie de synthèse devait également s'appliquer à la série D-Mannose. Le risque était de former les deux benzylidènes sur les positions O4-O6 et sur les diols vicinaux *cis* portés par les O2-O3. La littérature décrivant la possibilité de former uniquement le benzylidène sur les hydroxyles portés par les C4-C6 en série mannose^{105, 113}, ce risque a été écarté. Cette synthèse n'a cependant pas pu être menée dans le temps imparti en raison de la crise sanitaire liée au coronavirus et du confinement strict imposé au printemps 2020.

8.4.3 Comparaison de la réactivité des thioglycosides issus des 2-methyl-5-tert-butylphenylthiol (HSMbp) et *p*-octyloxybenzenethiol.

8.4.3.1 Introduction.

La figure 105 décrit le mécanisme d'activation des thioarylglycosides et montre les deux points clé dans la réaction : la nucléophilie du soufre pour la 1^{ère} étape et la stabilité de l'oxocarbénium pour la 2^{nde}.

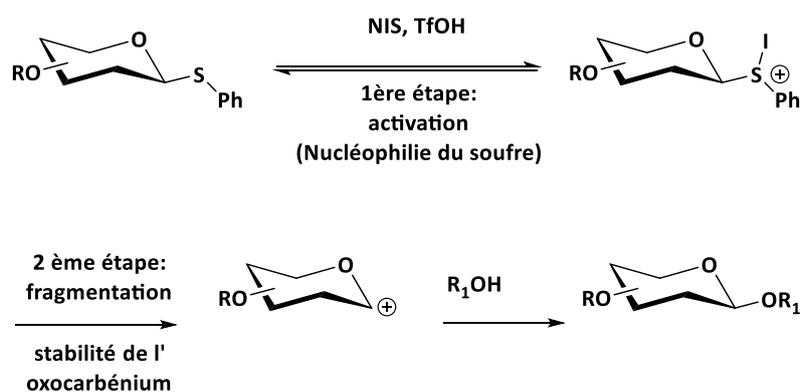


Figure 105 : mécanisme d'activation des thioaryl glycosides.

Diverses études ont été menées sur les thioglycosides afin de prévoir leur réactivité. En jouant avec la nature du promoteur et la température, il est ainsi possible d'activer sélectivement les glycosides thioalkyl en présence de glycoside thiophenyl. Lahman et Oscarson ont comparé en 2002 quelques thio alkyl perbenzoylés activé par le DMTST¹¹⁴. Les thioglycosides alkyls ramifiés (isopropyl et cyclohexyl) ont été les plus réactifs que les thioglycosides éthyl, propyl et butyl. Dans les mêmes conditions les thiophenyls et leurs dérivés se sont avérés être les moins réactifs car ils n'ont pas été activés par le DMTST mais par le système NIS / TfOH (Fig. 106).

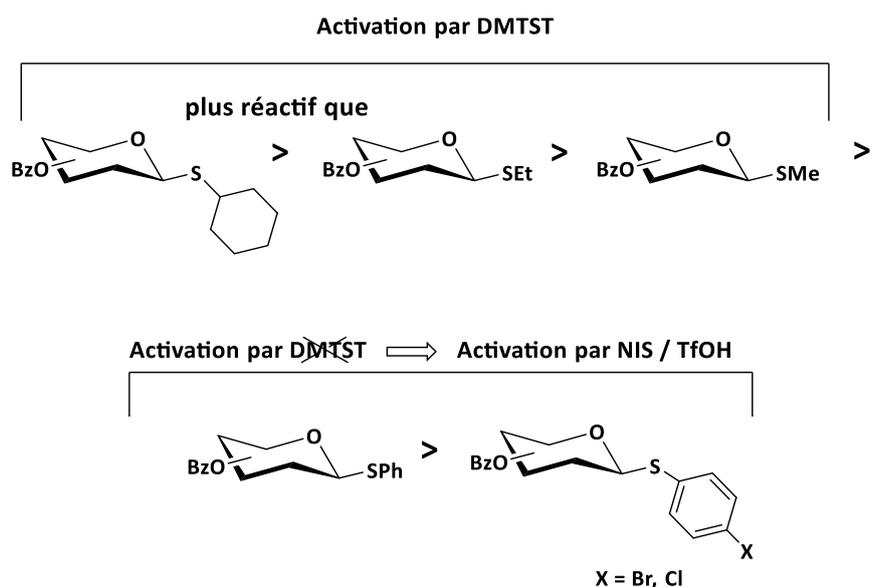


Figure 106: la réactivité des thioglycosides dépend du radical porté par le soufre.

Plus récemment, de nouvelles investigations sur les thiophényles substitués et par activation sélective ont été décrites utilisant des systèmes variés¹¹⁵. Les réactivités sont régies par la nucléophilie de l'atome de soufre et cette nucléophilie dépend des substituants de la position *para* : *p*-OMe > *p*-Br >

p-NO₂ (Le *p*-nitrophenyl thioglycoside peut seulement être activé avec le système NIS / TfOH) (Fig. 107).

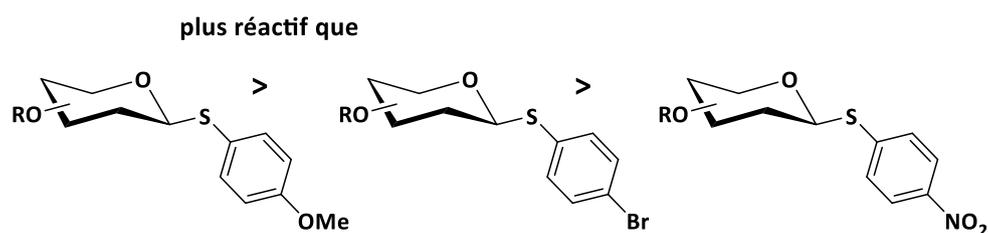


Figure 107: la réactivité des thioarylglycosides dépend des substituants portés par l'aryl.

La nature des groupements protecteurs a également un impact sur la réactivité. CH Wong a utilisé le tolyl thioglycoside comme donneur en modulant sa réactivité avec les groupements protecteurs installés⁴⁴. Il a été montré comme prévu que les groupements électroattracteurs (esters) réduisent la réactivité (donneur désarmé) alors que les groupements électrodonneurs (benzyls) augmentent la réactivité (armé) (Fig. 108).

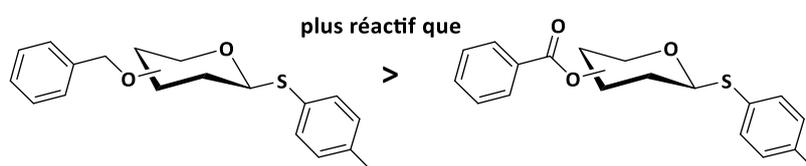


Figure 108: les groupements protecteurs influencent la réactivité des thioglycosides.

La réactivité des *p*-alkyloxy thiophenyl glycosides synthétisés précédemment a été l'occasion de les comparer à la première génération de thioglycosides synthétisés au Laboratoire à partir du HSMbp²².

8.4.3.2 Méthode utilisée pour comparer les réactivités des thioglycosides.

Dans le but de comparer les réactivités des thioglycosides, deux donneurs ont été mis en compétition en quantité équimolaire (1 mmol chacun) avec une quantité limitée de promoteurs (1 mmol). Le promoteur choisi pour ces compétition est le système NIS / TfOH, puissant promoteur universel des thioglycosides depuis son introduction en 1990³³. Un seul paramètre entre deux thioglycosides a été changé dans chaque réaction de compétition pour comparer la réactivité des donneurs. Ces paramètres ont été :

- 1) le radical porté par l'atome de soufre (*p*-alkyloxy thiophenyl vs 2-Methyl-5-tertbutyl-phenyl).
- 2) La variation du groupement protecteur (Benzyl vs Benzoyl).

Le choix de l'accepteur s'est quant à lui porté sur la structure **5** (1 mmol). L'extrémité réactive identique aux structures utilisées en synthèse supportée fait de cette structure **5** un modèle idéal d'étude pour valider les stratégies de synthèse envisagées (Fig. 109).

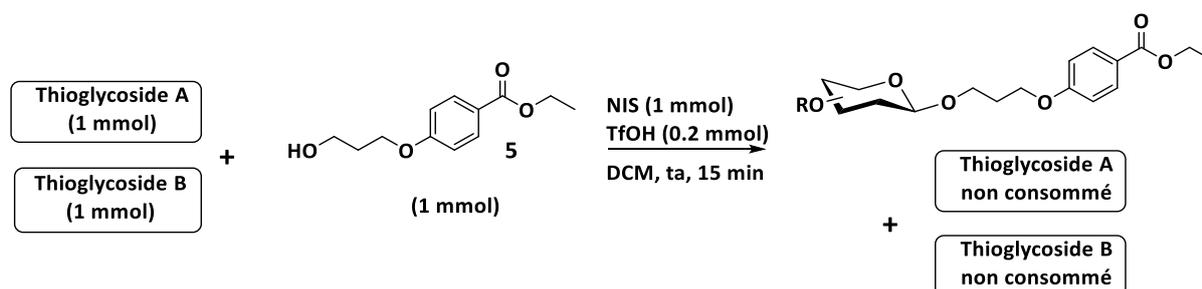


Figure 109: schéma réactionnel des compétitions réalisées pour l'étude de la réactivité des thioglycosides.

Les réactions de compétitions ont été engagées dans du DCM fraîchement distillée à température ambiante pendant 15 min. Ensuite la réaction est neutralisée avec un excès de pipéridine puis évaporée à sec. Les bruts réactionnels de compétition sont ensuite analysés en RMN ^{13}C afin d'évaluer le ratio de thioglycosides consommés par intégration des signaux correspondants aux C-1 des thioglycosides restants. Ces carbones anomères ont un déplacement chimique de l'ordre de 85 ppm et ce sont très souvent les seuls signaux à être détectés dans cette zone. En revanche, les signaux des carbones anomères peuvent être confondus avec d'autres massifs en RMN ^1H . Pour cette raison, l'évaluation du ratio de thioglycosides consommés par RMN ^1H a été écartée car non générale. La viabilité de la technique d'évaluation par intégration de l'intensité des signaux des carbones anomères en RMN ^{13}C a été testée préalablement sur un mélange équimolaire de deux donneurs de thioglycosides. Les spectres ont été réalisés avant et après glycosylation (Fig. 110).

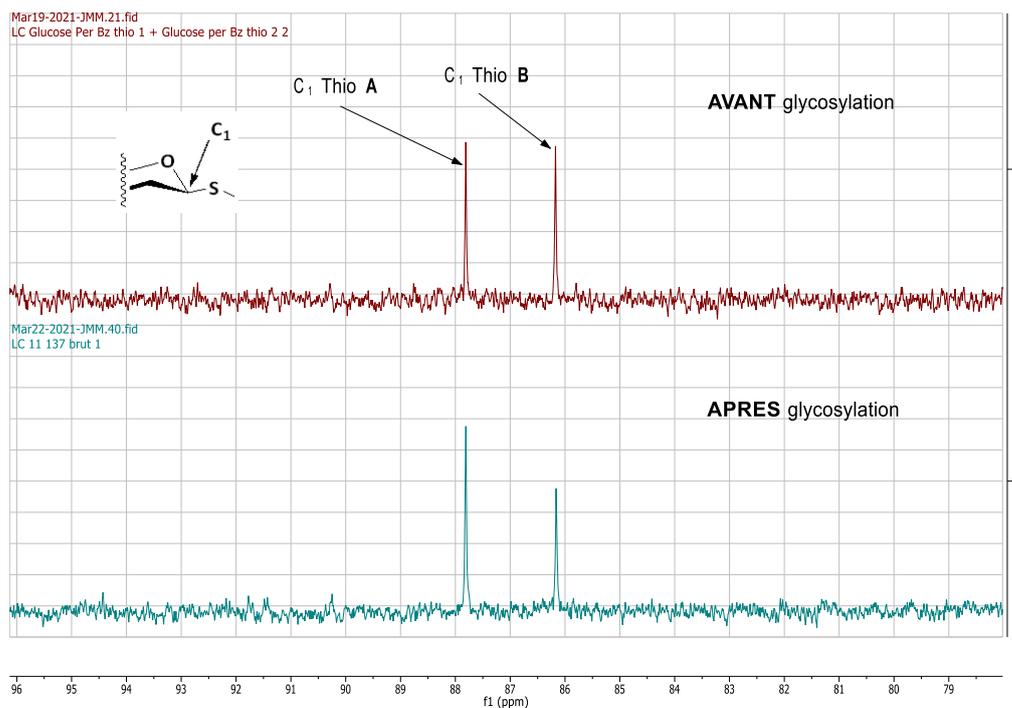


Figure 110: RMN ¹³C d'un mélange équimolaire de deux thioglycosides avant et après glycosylation.

Les signaux correspondants aux carbones anomères d'un mélange équimolaire de deux thioglycosides ont bien la même intensité avant compétition. En déterminant l'intensité par intégration des carbones anomères des deux thioglycosides restants après compétition, il a été possible de déterminer le ratio de thioglycosides consommé. Les résultats figurent dans le tableau suivant (Tableau 2)

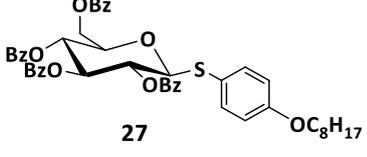
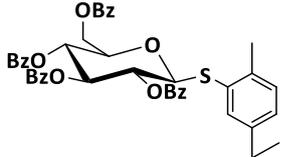
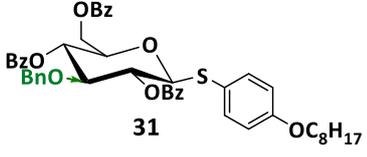
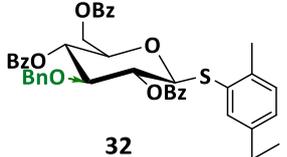
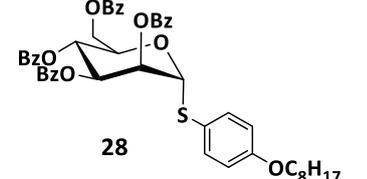
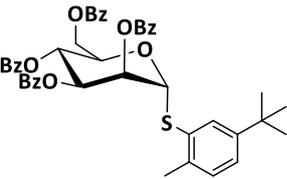
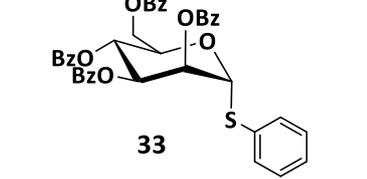
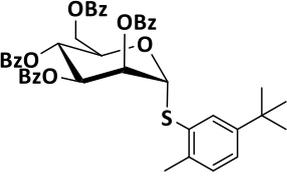
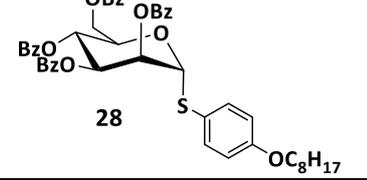
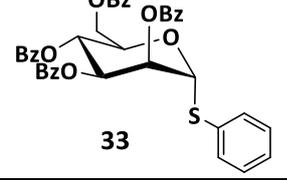
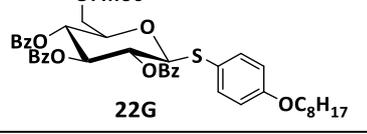
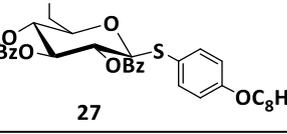
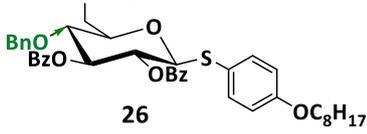
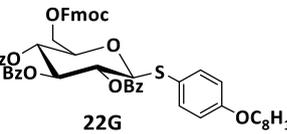
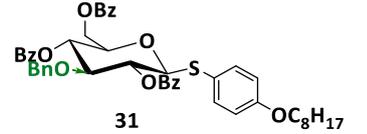
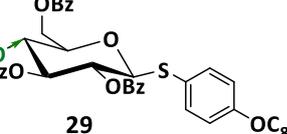
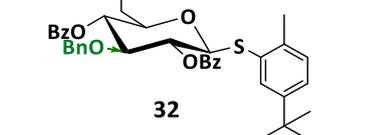
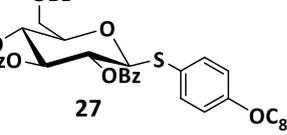
données	dérivés	variation	Donneur A (plus réactif)	Donneur B (moins réactif)	Ratio de thioglycosides consommés
1	Glucose	Thiol	 27	 32	1.5
2	Glucose	Thiol	 31	 32	1.4
3	Mannose	Thiol	 28	 33	2.4
4	Mannose	Thiol	 33	 33	1.13
5	Mannose	Thiol	 28	 33	1.3
6	Glucose	6 Fmoc vs 6 Bz	 22G	 27	1.4
7	Glucose	4 Bn vs 4 Bz	 26	 22G	4.8
8	Glucose	3 Bn vs 4 Bz	 31	 29	1.9
9	Glucose	3 Bn vs 3Bz	 32	 27	4.8

Tableau 2 : tableau récapitulatif des réactions de compétition entre deux donneurs de thioglycoside.

Les dérivés octyloxy thiophenyl sont plus réactifs que les methyl tertbutyl thiophenyl ($\times 1.4$ en série glucose et $\times 2.4$ en série mannose) d'après les données n°1, n°2 et n°3 et les methyl tertbutyl thiophenyl et thiophenyl ont présenté des reactivités similaires d'après la donnée n° 4. Un effet plus prononcé sur la réactivité est venu des groupements protecteurs: le remplacement d'un benzoyl par un Fmoc augmente la réactivité ($\times 1.4$ – donnée n°6) et le remplacement d'un benzoyl par un benzyl sur les position C-3 ou C-4 augmente également la réactivité ($\times 1.4$ – donnée n°7, n°8 et n°9). L'installation d'un benzyl semble être le facteur déterminant dans la réactivité d'un thioglycoside même avec un thiol moins nucléophile installé sur la position anomère ($\times 4.8$ – donnée n°9).

Ces résultats concordent avec les études décrites précédemment^{114,115} et la réactivité des aryl thioglycosides utilisés au Laboratoire peut être prévisible selon 2 paramètres :

- 1) Plus la nucléophilie du soufre sera élevée, plus la formation de l'ion iodosulfonium sera favorisé.
- 2) La fragmentation de cet ion iodosulfonium est contrôlée par la stabilité de l'oxocarbénium qui est favorisé par les groupes électrodonneurs proches de la position anomérique. Cette fragmentation abordée précédemment ne peut avoir lieu que du côté « saccharide » avec l'emploi de thioaryl glycoside. L'installation d'un groupement benzyl joue significativement sur la stabilité et donc sur la réactivité.

Pour ces deux raisons, les dérivés octyloxy thiophenyl ont ainsi été sélectionnés pour la construction supportée d'oligosaccharides.

8.4.3.3 Synthèse des thioglycosides utilisés dans les réactions de compétition.

8.4.3.3.1 Synthèse des thioglycosides issus du *p*-octyloxybenzenethiol **18.**

Les thioglycosides **27** (série glucose) et **28** (série mannose) ont été obtenus respectivement à partir des intermédiaires **19G** et **19M** synthétisés pour l'élaboration des $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes et $\alpha(1\rightarrow6)$ mannosides. Les fonctions acétate des produits **19G** et **19M** ont d'abord été clivés dans les conditions de Zemplén puis les structures obtenues ont été benzoylées en présence de chlorure de benzoyle dans la pyridine générant les composés **27** et **28** (Fig. 111).

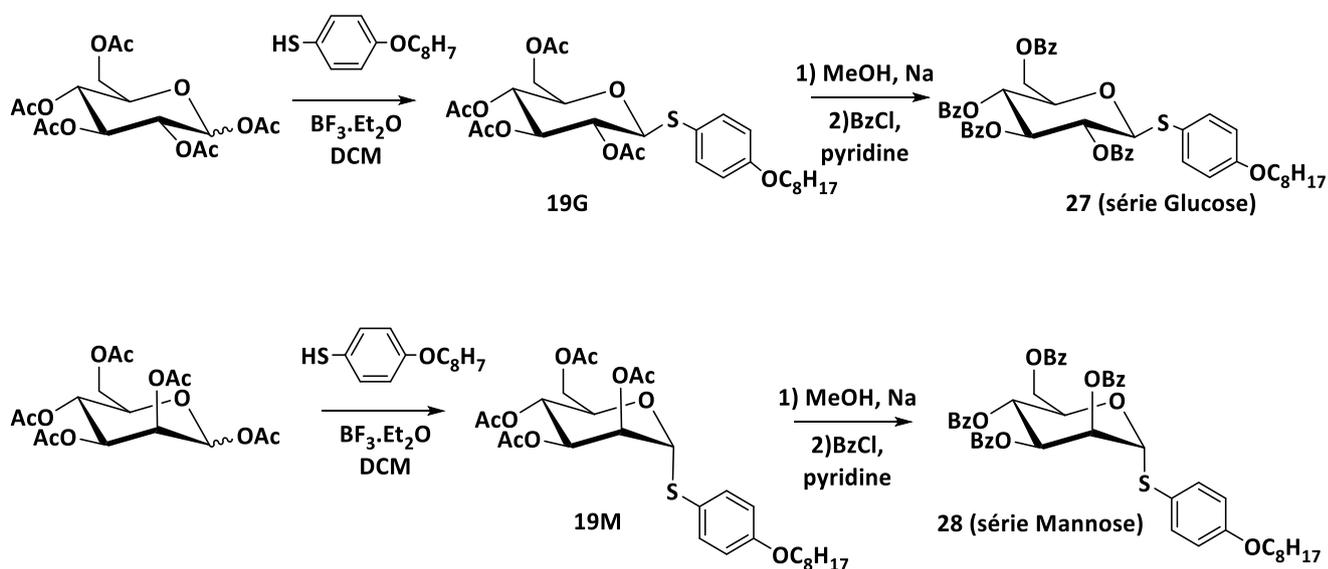


Figure 111: schéma réactionnel de synthèse des donneurs **27** (série Glucose) et **28** (série Mannose).

Le thioglycoside **29** (série glucose) est issu de l'intermédiaire **25** sur lequel l'alcool primaire est protégé par un groupement benzoyl. La réaction se fait en présence de chlorure de benzoyle dans la pyridine (Fig. 112).

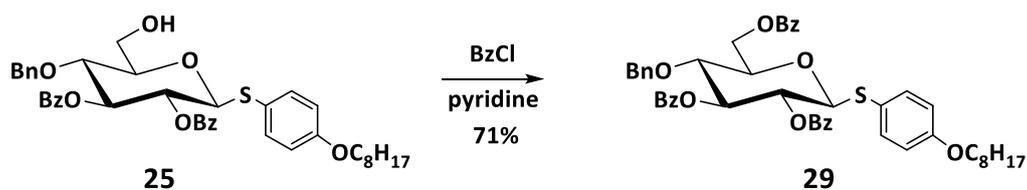


Figure 112: schéma réactionnel de synthèse du donneur de thioglycoside **29**.

Le thioglycoside **31** a été préparé à partir de l'intermédiaire **30**¹¹⁶. Ce dernier est préparé à partir du diacétone-D-Glucose sur lequel l'hydroxyl est protégé par une fonction benzyl. La réaction se fait en présence de bromure de benzyl et de NaH dans le DMF. Les isopropylidènes sont ensuite hydrolysés en milieu acide puis le composé déprotégé est benzoylé en présence de chlorure de benzoyle dans la pyridine conduisant à l'intermédiaire **30**. Le groupement benzoate anomère de ce dernier est ensuite activé en présence de BF₃ Et₂O puis substitué par le du *p*-octyloxybenzenethiol **18** conduisant au composé **31** (Fig. 113).

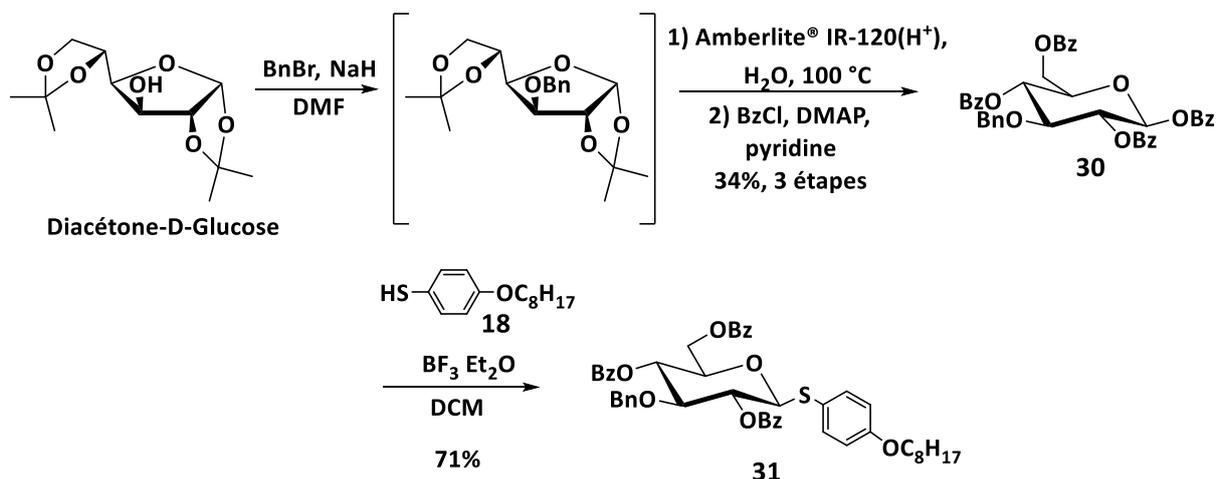


Figure 113 : schéma réactionnel de synthèse du donneur **31**.

8.4.3.3.2 Synthèse des thioglycosides issus du 2-methyl-5-tert-butylphenylthiol (HSMbp).

Les stratégies pour installer le 2-methyl-5-tert-butylphenylthiol utilisent les mêmes précurseurs et les mêmes conditions que pour l'installation du *p*-octyloxybenzenethiol **18**. Par exemple, le donneur **32** est préparé à partir de l'intermédiaire **30** décrit précédemment en activant puis en substituant le benzoate anomère avec BF₃ Et₂O (Fig. 114).

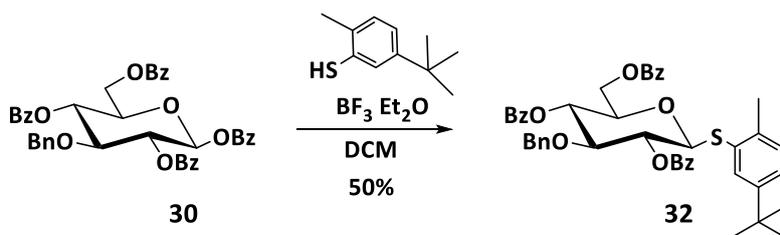


Figure 114: schéma réactionnel de synthèse du donneur **32**.

Les donneurs de thioglycoside perbenzoylés issus du 2-methyl-5-tert-butylphenylthiol en série glucose et série mannose avaient déjà synthétisés et étaient disponibles au Laboratoire. Ces composés sont respectivement préparés à partir du D-Glucose et D-Mannose peracétylés. La première étape consiste à activer puis de substituer l'acétate anomérique des deux dérivés par le HSMbp en présence de l'acide de Lewis. Les deux dérivés obtenus sont ensuite déacétylés dans les conditions de Zemplén puis benzoylés en présence de chlorure de benzoyle dans la pyridine. Cette dernière réaction permet d'obtenir les donneurs de thioglycoside perbenzoylés en composés en série glucose et série mannose connus de la littérature²² et disponibles au Laboratoire (Fig. 115).

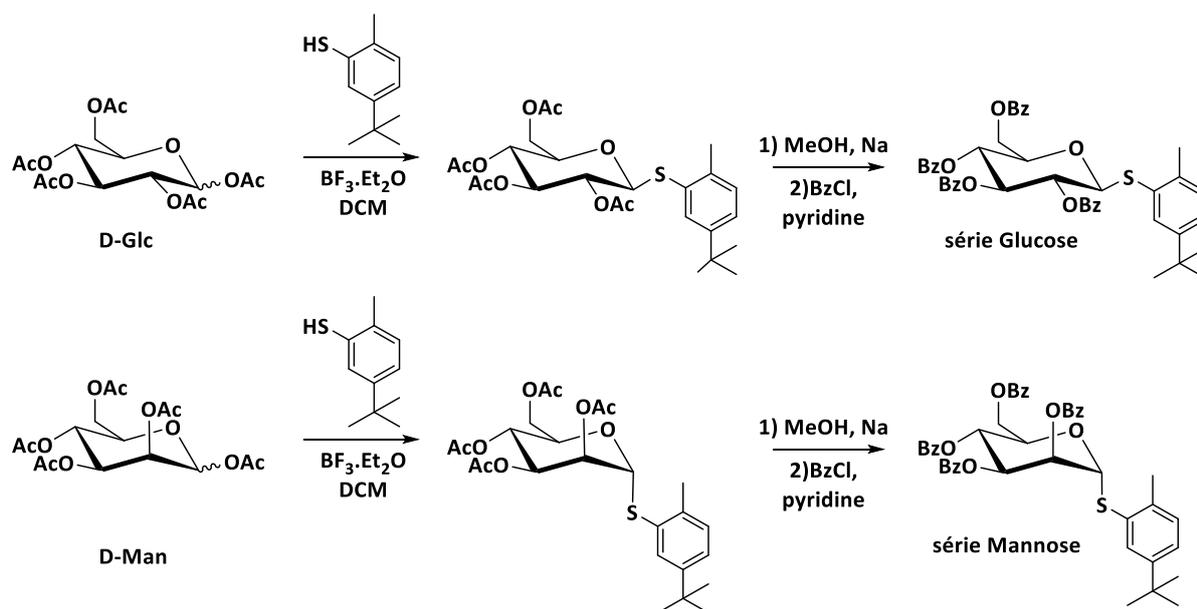


Figure 115: schéma réactionnel de synthèse des donneurs de thioglycoside perbenzoylés (série Glucose et Mannose) issu du 2-methyl-5-tert-butylphenylthiol.

8.4.3.3 Synthèse du thioglycoside **33** issu du thiophénol.

La synthèse du thioglycoside dérivé du mannose **33** a été préparé à partir du précurseur disponible au laboratoire¹¹⁷. Le benzylidène a initialement été clivé par hydrolyse acide puis le composé déprotégé obtenu a directement été benzoylé dans la pyridine en présence de chlorure de benzoyle. Le thioglycoside **33** a ainsi été obtenu sa caractérisation en RMN-¹H est conforme à la littérature¹¹⁸ (Fig. 116).

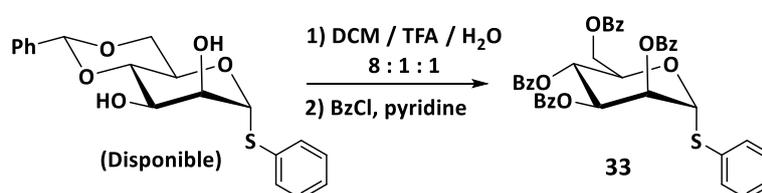


Figure 116: schéma réactionnel de synthèse du donneur **33**.

8.5 Etudes préliminaires de conditions réactionnelles

8.5.1 Synthèse des glycosides modèles **34** et **35**

Diverses études ont été menées afin de définir les paramètres de déprotection du Fmoc et de fonctionnalisation. Ces études ont été menées sur deux glycosides modèles obtenus par glycosylation de l'accepteur modèle **5** sur les donneurs **22G** et **27** issus des études de compétition. La

synthèse de ces modèles **34** et **35** (Fig. 117) offre l'avantage de travailler sur des structures relativement peu élaborées et moins précieuses que les β -glucanes envisagés.

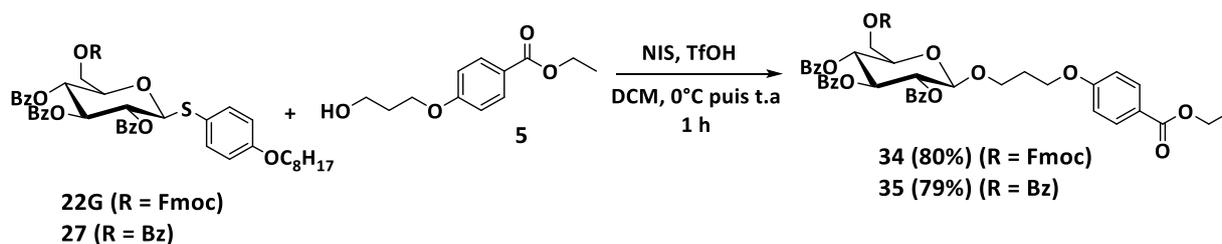


Figure 117: synthèse des glycosides modèles **34** et **35**

Le glycoside **34** a été utilisé pour mettre au point les conditions de déprotection du groupement Fmoc et le glycoside **35** pour les conditions de fonctionnalisation (Fig. 118).

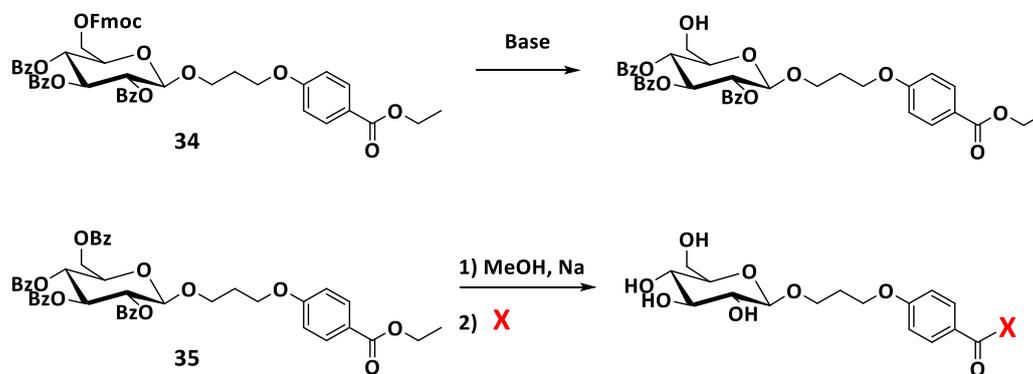


Figure 118: glycosides modèles **34** et **35** utilisés pour études préliminaires des conditions de déprotection et de fonctionnalisation par un groupement **X**

8.6 Etude des conditions réactionnelles de déprotection du groupement Fmoc

Les groupements acyles sont couramment utilisés en glycochimie en raison de leur facilité d'introduction et de suppression. Cependant ces groupements sont sujets aux réactions de migrations intramoléculaires. La migration des groupements acyles se produit via un cycle type orthoester de 5 ou 6 atomes. Ce mécanisme est probablement catalysé en milieu basique par déprotonation de l'hydroxyle voisin (Fig. 119).

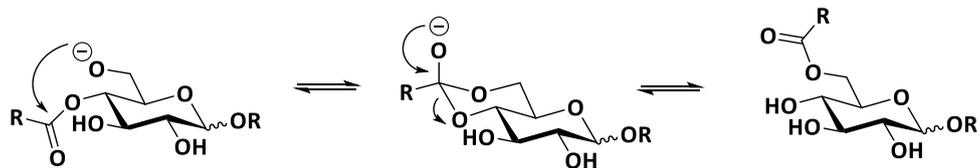


Figure 119 : mécanisme réactionnel illustrant les phénomènes de migration.

Cette migration peut être un atout lorsqu'elle est contrôlée. En 2008, Palomo et Terreni ont développé cette approche pour la conversion de monosaccharides peracétylés en accepteur de glycosyle¹¹⁹. Leur protocole utilise différentes lipases supprimant régiosélectivement le groupe acétyle positionné en O-6. Les réactions enzymatiques se font à pH 5 pour éviter la migration des groupes acétyles du substrat. Après la suppression de l'acétyle sur le O-6, les auteurs ont observé la migration de l'acétyle positionné sur le O-4 vers le O-6 et vers le O-3 à pH basique et à 4 °C (Fig. 120). De cette manière ils ont ainsi détaillé les meilleures conditions pour avoir le maximum de conversion de l'acétyle positionné sur le O-4 vers le O-6. Seuls sont représentés les résultats effectués sur la série α -D-glucose (Fig. 120) mais les auteurs ont également réalisées des manipulations sur les séries D-glucosamine et D-galactosamine.

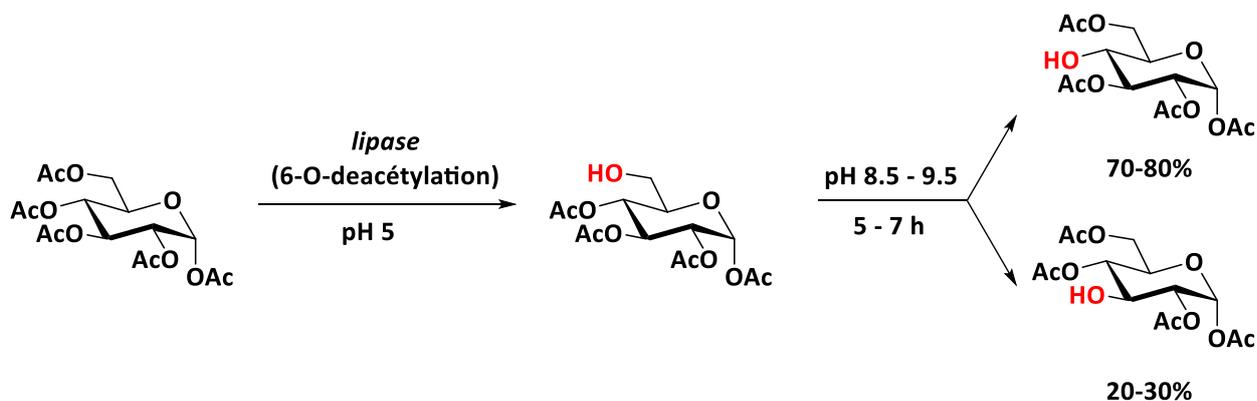


Figure 120 : contrôle des phénomènes de migration d'après Palomo et Terreni¹¹⁹.

D'après les résultats obtenus par Palomo et Terreni, il est clairement établi que la migration d'un acyle positionné en O-4 est inévitable, même à pH faiblement basique ($\text{pH} \approx 9$). La cinétique de ces migrations étant toutefois relativement longue (de 5 à 7h).

En tenant compte de ces observations, la déprotection du Fmoc dans le cas du précurseur choisi **22G** doit s'effectuer en milieu acide ou relativement basique. Le glycoside déprotégé doit aussi être rapidement engagé dans l'étape suivante pour éviter les migrations. Bien que la plupart des donneurs de glycosyle impliqués dans la construction de β -glucanes utilisent souvent les benzoyles sur la position O-4, les problèmes de migration ne sont jamais évoqués avec ce type d'acyle.

Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses de migration des benzoates, le glycoside modèle **37** a été engagé dans différentes conditions opératoires de déprotection du Fmoc. Des réactifs tels que la pipéridine et le fluorure de tétra-n-butylammonium¹²⁰ (TBAF) ont été testés. La déprotection avec le TBAF se faisant dans l'acide acétique (milieu acide), la charge négative générée lors du clivage devrait être neutralisée et la migration ainsi évitée (Fig. 121 voie a).

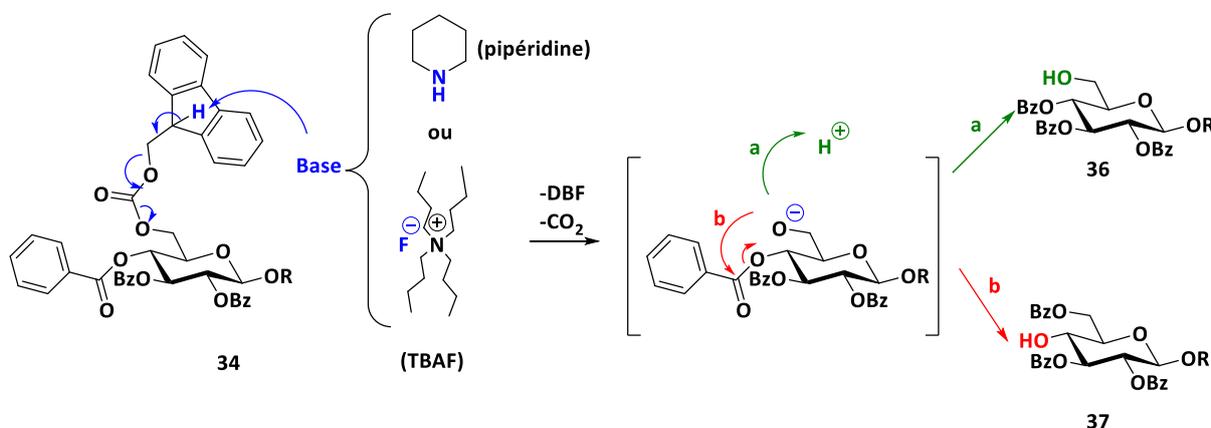


Figure 121 : les conditions basiques favorisent le phénomène de migration (voie b) contrairement aux conditions acides (voie a)

Données	Réactifs de Déprotection*	Durée	Suivi par CCM et observations :		Remarques
1	TBAF (4 équiv.) / AcOH (5équiv.)	1 h	DéTECTÉ	Non détecté	Réaction incomplète
2	TBAF (4 équiv.) / AcOH (5équiv.)	18 h	Majoritaire	Traces	Produit 36 isolé (78%). Traces de 37 observées. Réaction incomplète.
3	Pipéridine (10 équiv.)	18 h	DéTECTÉ	Majoritaire	Produit 37 isolé (75%)

*Les déprotections ont toutes été réalisées dans le THF.

Tableau 3 : différentes conditions de suppression du Fmoc du glycoside **34**.

Les conditions de déprotection utilisant le système TBAF / AcOH permettent d'obtenir la structure **36** avec un rendement de 78%. Le temps de réaction doit être prolongé jusqu'à 18 h pour une déprotection quasi complète mais avec en contrepartie la formation du produit de migration **37** en très faible quantité (Tableau 3, donnée 2). Ce sous-produit est exclusivement formé lorsqu'un excès de pipéridine est utilisé comme base sur un temps de réaction relativement long (Tableau 3 donnée 3).

Pour différencier la position du groupement benzoate sur le O-6 ou sur le O-4, les structures **36** et **37** ont été caractérisées par RMN. Quand le benzoate est sur la position O-6, les doublets de doublet (dd) caractéristiques des H₆-OBz sont plus déblindés (≈ 4.6 ppm) contrairement au H₆-OH (Fig. 122).

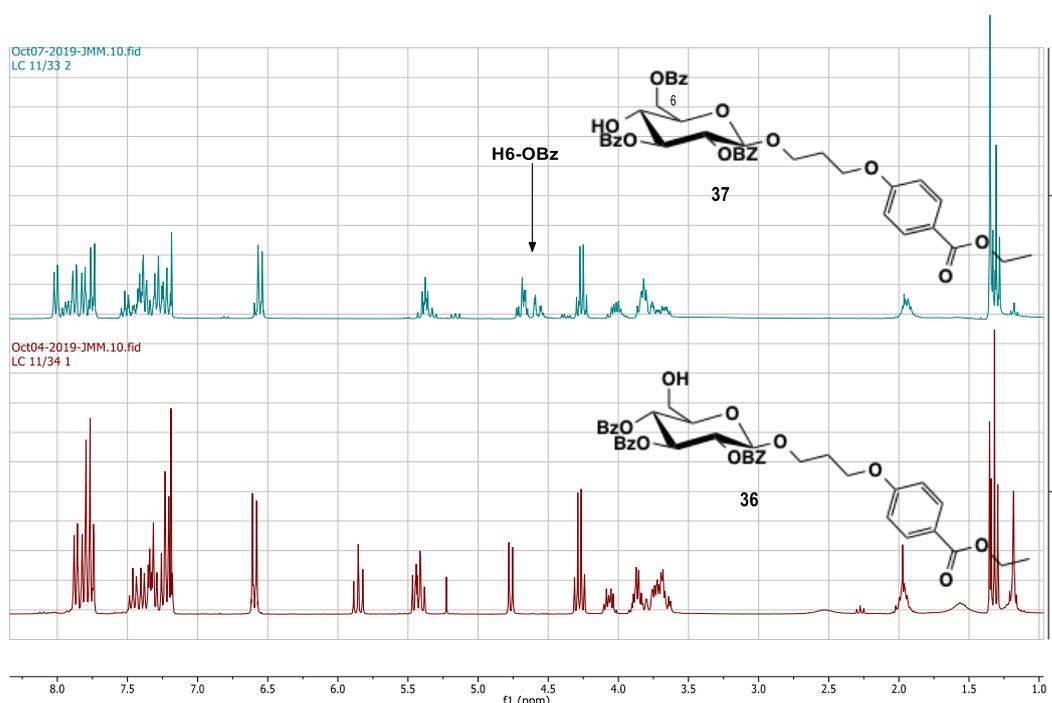


Figure 122 : RMN 1H des glycosides déprotégés **36** et **37** (H₆-OBz plus déblindé que H₆-OH).

Ainsi, quel que soit les conditions utilisées, les résultats observés confirment que la position O-4 protégée par un groupement benzoate est propice à la migration.

Même si le produit de migration **37** est formé en faible proportion (Tableau 3, donnée 2), la synthèse supportée utilisant des donneurs avec des esters installés en position O-4 n'est pas jouable si à chaque étape on accumule ces migrations. Le mode opératoire de déprotection aurait pu être optimisé mais les conditions liées à la crise sanitaire du COVID-19 ont ralenti considérablement ce travail. Pour plus de sûreté, nous avons choisi le donneur de thioglycoside **26** où le benzoyle a été remplacé par un benzyle et éviter ainsi la migration.

8.7 Etude des conditions de fonctionnalisation.

Les *linkers* utilisés pour la synthèse supportée possèdent des fonctions ester, les conditions de Zemplén permettront de cliver l'oligosaccharide. Il est ensuite possible d'agir sur l'ester méthylique pour générer une nouvelle fonction chimique. Cette fonction permettra l'attache d'un *tag* (peptide, sonde fluorescente, biotine,...) et de tester ces nouvelles molécules lors de manipulations ultérieures. Le *tag* pourra être couplé via un lien amide (dans le cas de l'introduction d'une fonction acide ou amine) ou bien par « chimie click » via un lien triazole (dans le cas de l'introduction d'une fonction alcyne ou azoture.).

La première option serait de saponifier le bras et d'utiliser l'acide formé dans une réaction d'estérification ou d'amidification. Notre expérience a montré que cela était difficile car il faut reprotéger les alcools des sucres. Les rendements modestes de formation d'une liaison amide observés au Laboratoire ont montré que ces fonctions sont peu réactives pour l'attache d'un *tag*²³. A ce stade avancé de synthèse, il s'avère judicieux d'installer une fonction beaucoup plus réactive pour une conjugaison et c'est pourquoi les fonctions amine, alcyne et azoture ont été retenues via le passage de l'ester méthylique (Fig. 123 voie b, c et d).

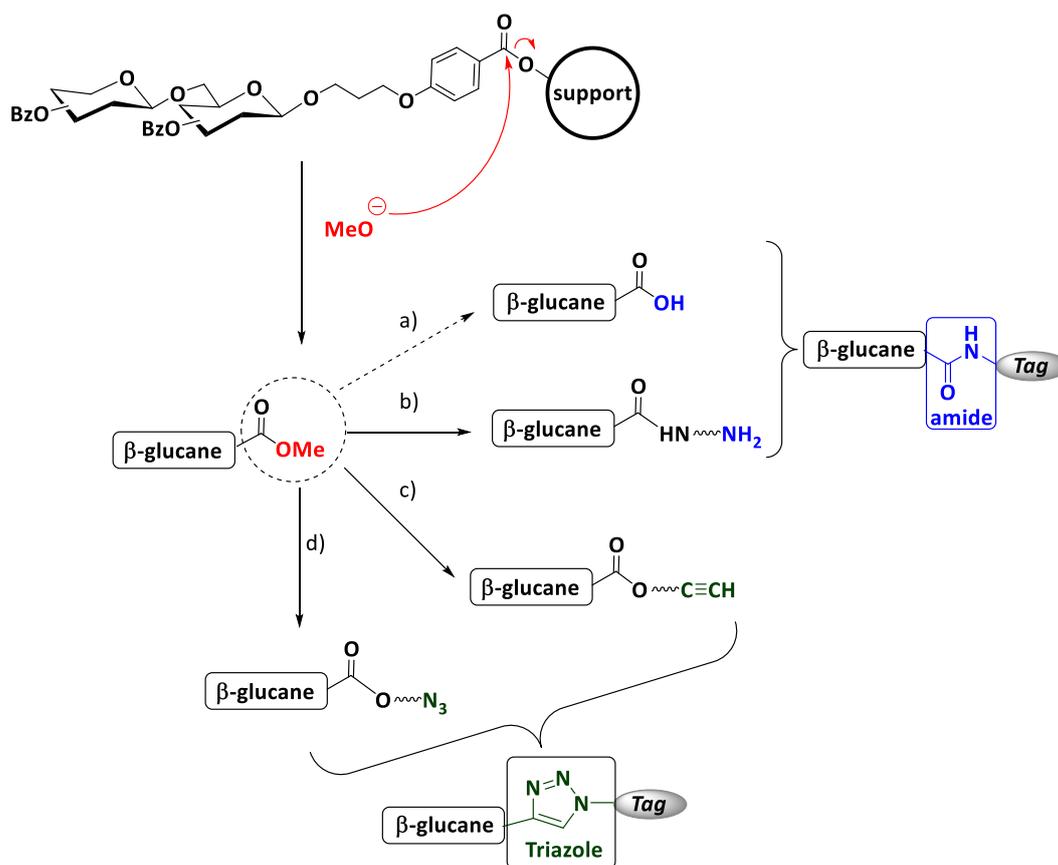


Figure 123: possibilité de fonctionnaliser l'oligosaccharide par différentes fonctions après clivage.

Les fonctions amines pourront être utilisées dans un couplage type peptidique avec l'introduction d'une fonction amide. Les fonctions azotures et alcyne seront utilisées pour l'introduction d'un 1,4-triazole disubstitué obtenu par cycloaddition 3+2 type chimie click catalysé par le cuivre (I). Les essais d'introduction de ces fonctions se sont ainsi concentrés sur le glycoside modèle **35** afin de déterminer les meilleures conditions opératoires pour les appliquer sur les β -glucanes.

8.7.1 Mises au point des conditions de débenzylation et transestérification.

Cette étape de déprotection des benzoates dans les conditions de Zemplén permet de mettre au point les conditions de clivage du futur β -glucane supporté.

Les meilleures conditions trouvées pour transestérifier totalement l'ester éthylique en ester méthylique ont été un chauffage léger de 40 °C pendant 18h en présence de méthylate de sodium (Fig. 124).

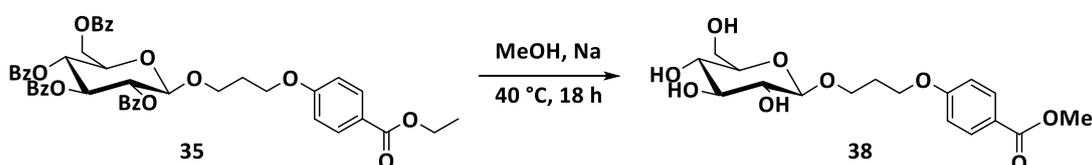


Figure 124 : conditions de Zemplén mises au point pour la suppression des benzoates et la transestérification.

Le contrôle de la transestérification du composé **38** se fait par RMN avec l'apparition du singulet (s) caractéristique du CH_3 de l'ester méthylique vers 3.8 ppm et la disparition à 1.3 ppm du triplet (t) du CH_3 de l'ester éthylique.

Les conditions de débenzylation et de transestérification étant mises au point, elles permettront également de réaliser le clivage total du β -glucane supporté.

8.7.2 Introduction de la fonction amine primaire.

Les amines primaires (R-NH_2) peuvent se montrer suffisamment réactives avec de hautes températures pour attaquer et substituer un ester méthylique aryle. La stratégie consiste donc à utiliser une diamine $\text{H}_2\text{N-R-NH}_2$ et faire réagir une des deux fonctions sur l'ester. La diamine est utilisée comme réactif et comme solvant afin de d'augmenter la cinétique de réaction. La température d'ébullition de ces diamines ne devra pas être élevée afin d'en faciliter leur élimination par évaporation.

L'éthylène diamine (T_{eb} : 116 °C, 1 atm) et la 1,3-diaminopropane (T_{eb} : 139 °C, 1 atm) ont été les diamines envisagées pour la réaction de fonctionnalisation après suppression des groupements benzoate.

Les premiers essais de fonctionnalisation d'une fonction amine sur le composé **38** ont été réalisés avec la diaminopropane. Divers essais ont été réalisés avec un léger puis large excès de diamine. La présence de monosaccharide fonctionnalisé n'a pas été détectée même avec un chauffage de 90 °C pendant 3 jours avec un très large excès de diamine. En revanche, un chauffage à reflux (T_{eb} : 139 °C) a montré la formation de deux produits pouvant être détectés par analyse RMN- ^1H du brut réactionnel. La présence de deux couples de doublets dans la zone de détection des aromatiques (7.00 – 8.00 ppm) avec un couplage de spin AB (couplage fort) montre que la transformation a eu lieu sur l'ester (Fig. 125).

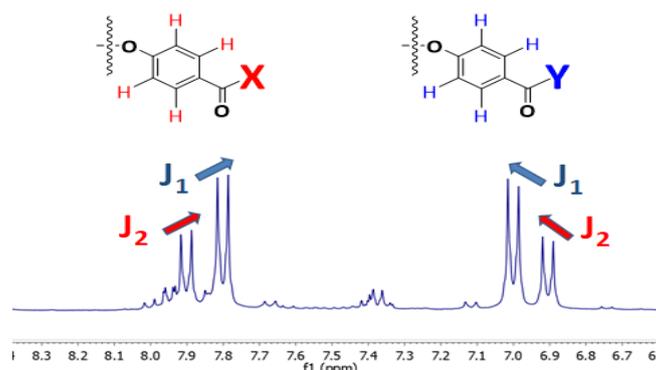


Figure 125: deux produits formés détectés par RMN lors de la fonctionnalisation du composé [38] par la diaminopropane.

Le produit fonctionnalisé attendu en présence de produit saponifié semble être une hypothèse envisageable car la réaction a été réalisée avec de la 1,3 diaminopropane non séchée. La présence d'eau dans ce milieu basique a donc pu favoriser les conditions de saponification et conduire à l'acide carboxylique correspondant (Fig. 126).

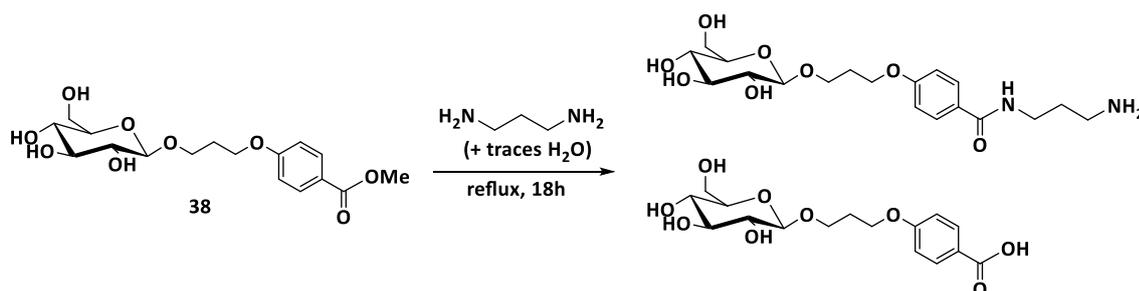


Figure 126 : la présence d'eau favorise les conditions de saponification.

Pour connaître l'identité des deux composés formés, le brut réactionnel a subi l'acétylation des fonctions chimiques susceptibles de réagir en présence d'anhydride acétique dans la pyridine. Les produits issus de cette réaction étant moins polaires, ils sont ainsi facilement purifiés sur gel de silice et l'interprétation des spectres RMN ¹H des produits peracétylés en est également facilitée (Fig. 127).

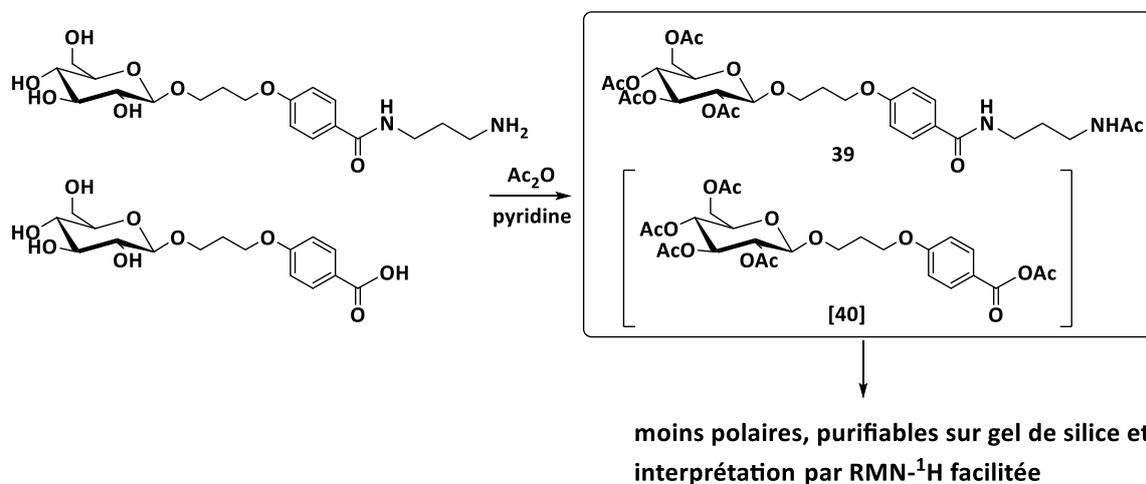


Figure 127 : peracétylation du mélange d'amidification pour mieux purifier et caractériser les composés.

Après peracétylation, le composé **39** a été chromatographié et caractérisé en RMN-¹H et HRMS. Concernant le deuxième produit récupéré et analysé en RMN-¹H, il semblerait que la fonction acide carboxylique ait réagi sur l'anhydride mixte formé conduisant à un intermédiaire symétrique stable (Fig. 128).

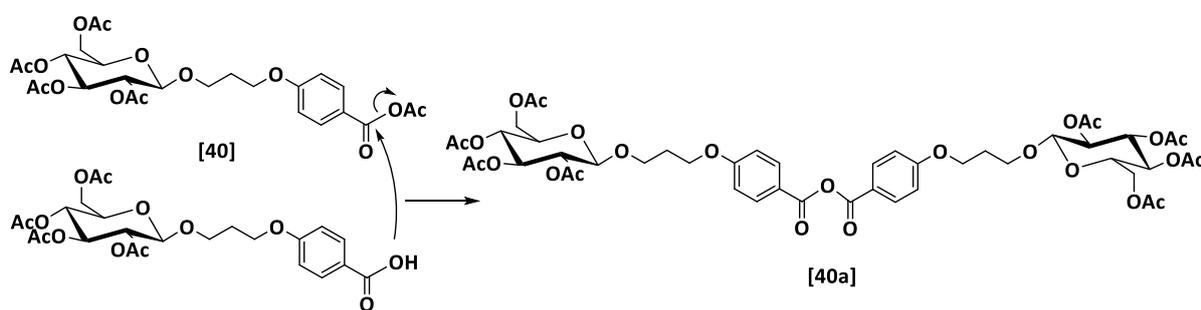


Figure 128 : sous-produit envisagé lors de la peracétylation après réaction utilisant la diaminopropane.

Cette structure **[40a]** n'a pas clairement été identifiée mais les résultats obtenus montrent que le travail dans des conditions non anhydres pourrait entraîner l'hydrolyse de l'ester méthylique. L'obtention du produit **39** montre cependant que l'introduction de la 1,3 diaminopropane reste possible par cette méthode.

Pourtant, l'utilisation de la 1,3 diaminopropane séchée sur KOH et fraîchement distillée n'a pas non plus donné de meilleurs résultats et l'hydrolyse de l'ester a toujours été observée. La 1,3 diaminopropane étant un composé hygroscopique et un distillat contenant moins de 1% d'eau dans 2 mL de diaminopropane (c.a.d ≈ 1 mmol d' H_2O) reste suffisant pour observer l'hydrolyse.

L'utilisation de cette diamine hygroscopique a pour cette raison été écartée de même que l'utilisation de l'éthylène diamine. Une cyclisation intramoléculaire à 5 chaînons (produit cinétique) est possible dans le cas de cette diamine. Cette réaction est décrite dans la littérature en faisant réagir l'éthylène diamine à reflux avec le méthyl 4-hydroxybenzoate conduisant au produit cyclisé avec un rendement de 78%¹²¹ (Fig. 129). Le groupement phénolate généré ayant le même caractère électrodonneur qu'un groupement O-Alk et la possibilité de cyclisation est donc tout à fait envisageable dans le cas de la molécule **38**.

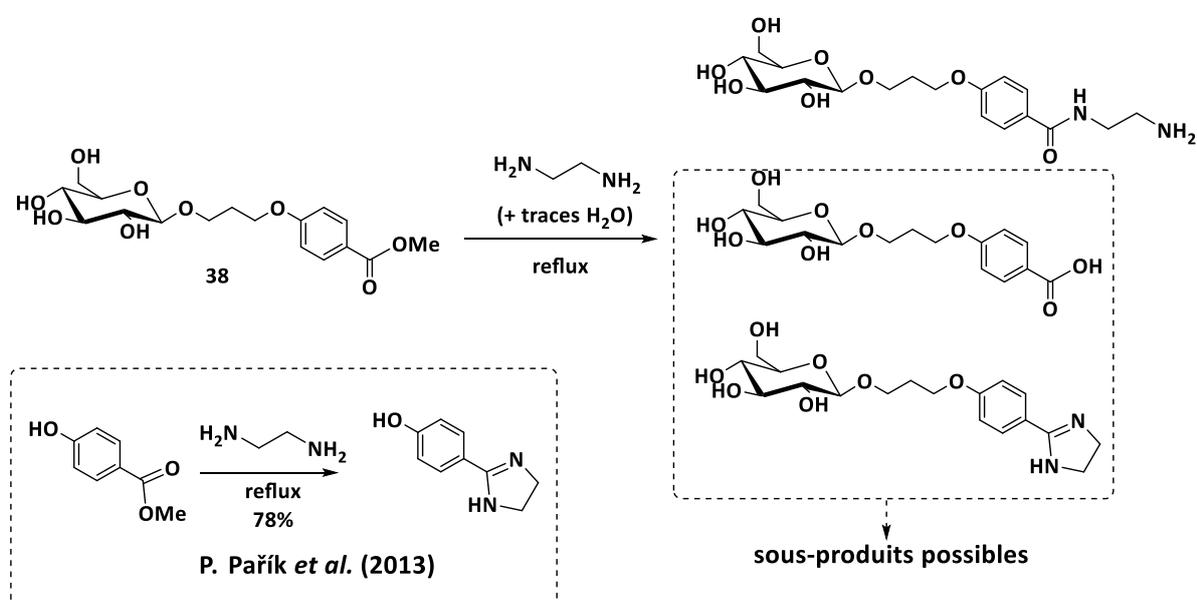


Figure 129: réaction parasite possible avec utilisation de l'éthylènediamine.

En raison de de ces diverses réactions secondaires observées (hydrolyse) et possibles (cyclisation), l'introduction d'une amine primaire sur l'ester méthylique a été écartée.

8.7.3 Introduction de la fonction alcyne.

L'introduction d'un ester propargylique a été réalisée en reprenant les conditions de fonctionnalisation décrites précédemment. L'alcool propargylique a été substitué aux diamines et sera utilisé comme réactif et comme solvant, facilement évaporable sous vide (T_{eb} : 114 °C, 1 atm).

Après élimination des groupements benzoate dans les conditions de Zemplen, le méthanol est évaporé sans neutralisation du méthylate de sodium.

Le composé débenzoylé est ensuite solubilisé dans l'alcool propargylique. Le méthylate résiduel permet de déprotoner la fonction alcool le rendant plus nucléophile catalysant ainsi la réaction de transestérification. Cette méthode est rapide et permet donc d'introduire une fonction alcyne sur le composé **35** pour obtenir le composé **41** avec un rendement de 69% après purification sur gel de silice (Fig. 130). Ce protocole sera ainsi appliqué en synthèse supportée et permettra de fonctionnaliser les β -glucanes.

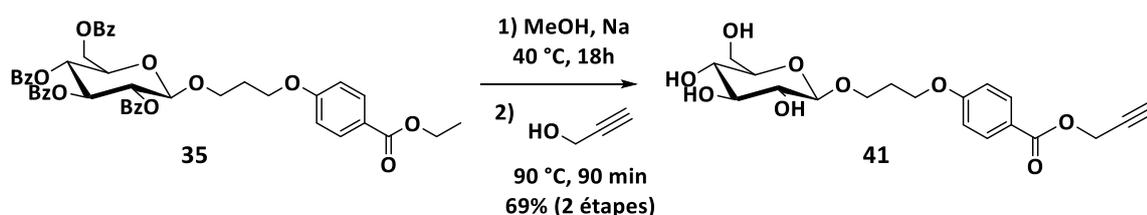


Figure 130: fonctionnalisation de l'ester méthylique par une fonction alcyne en présence d'alcool propargylique.

8.8 Bilan.

Ces études préliminaires ont donc permis d'établir les faits suivants qui seront utilisés dans les stratégies de synthèse supportée:

- 1) L'installation d'un groupement benzoyle en position O-4 est propice à une réaction de migration quelque soit les conditions envisagées. Même si le produit de migration se forme dans d'infimes proportions, l'utilisation du donneur **22G** n'est pas envisageable en synthèse supportée, au risque d'obtenir un mélange d'isomères difficilement séparable. Ce donneur **22G** a donc été remplacé par le donneur **26** où le groupement benzoyle en position O-4 a été remplacé par un groupement benzyl. L'installation de cette fonction nécessitera une étape de déprotection supplémentaire mais offrant toutefois l'avantage suivant : les dérivés de NIS utilisés lors des glycosylations seront neutralisés avec un large excès de pipéridine permettant également le clivage du Fmoc. Le remplacement du groupement benzoyle par un groupement benzyl permet donc la réalisation des réactions de glycosylation et de déprotection *one-pot* (Fig. 131).

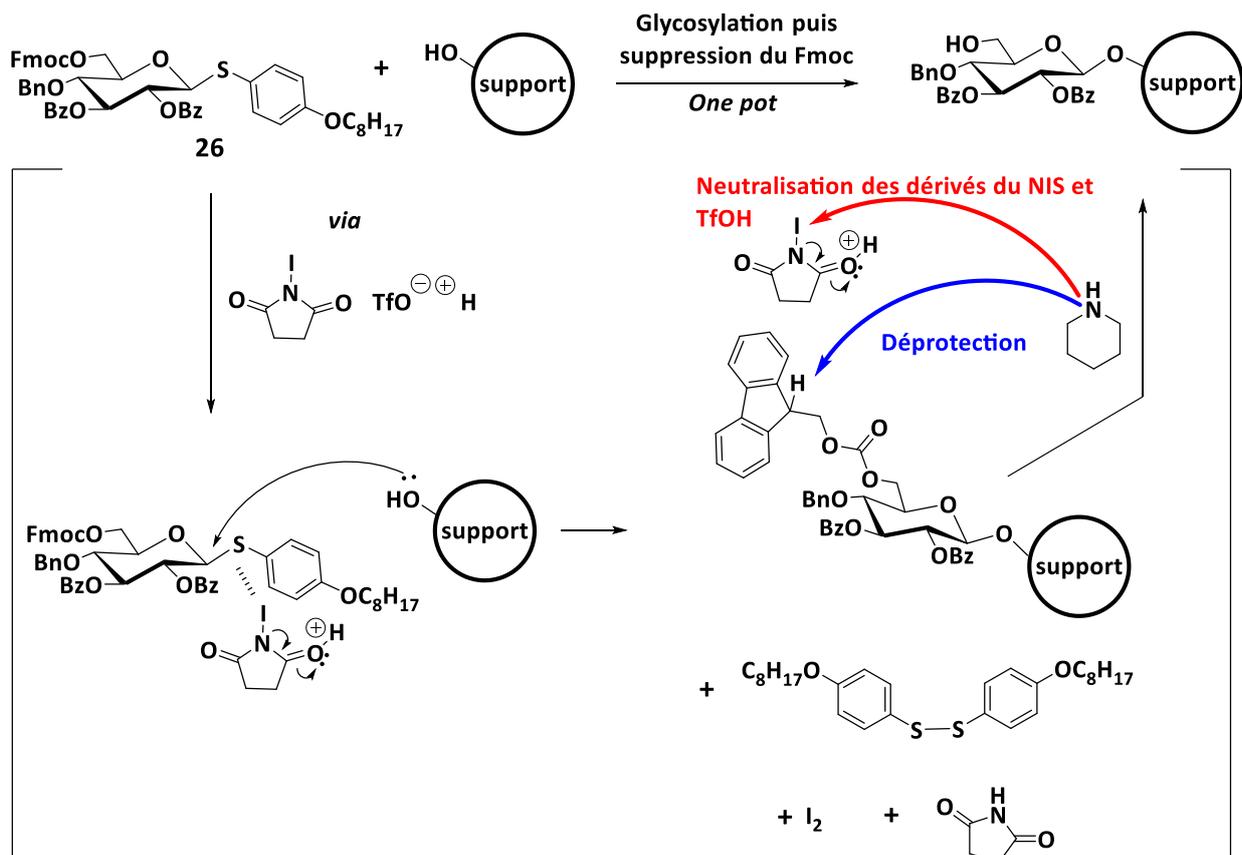


Figure 131 : schéma réactionnel des conditions de glycosylation-déprotection *one-pot* utilisées dans la synthèse supportée de β -glucanes.

- 2) L'oligosaccharide final sera fonctionnalisé, après le clivage du support et suppression des groupements benzyl, par un alcyne. Cette réaction se fera dans l'alcool propargylique utilisé comme réactif et comme solvant. La fonctionnalisation par un alcyne permettra de conjuguer par chimie click l'oligosaccharide avec une nouvelle molécule (peptide, biotine, sonde fluorescente,...) (Fig. 132)

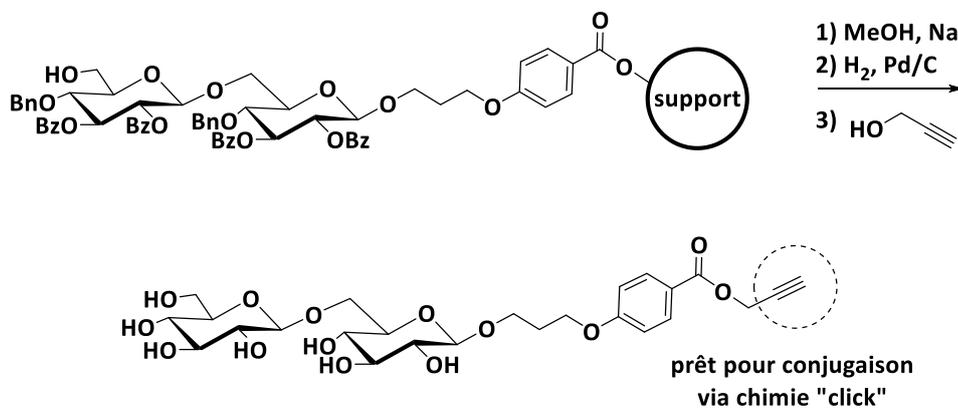


Figure 132: schéma réactionnel des conditions générales de clivage et de fonctionnalisation des β -glucanes.

8.9 Synthèse de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes sur support solide.

8.9.1 Mode opératoire.

La construction supportée de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes s'est basée sur toutes les études préliminaires établies: la synthèse sur support solide utilise la résine modifiée **4** (chapitre 6.2.1) et le donneur de thioglycoside **26**. La quantité de thioglycosides ajoutée dans les glycosylations a été calculée à partir de la charge de la résine déterminée par dosage UV du DBF.

L'un des inconvénients majeurs de la synthèse d'oligosaccharides sur support solide est l'impossibilité de suivre les réactions et savoir si la totalité des hydroxyles de la résine a réagi. Il n'existe pas à ce jour de tests fiables pour les détecter contrairement à la synthèse peptidique où ce sont des amines présentes sur le support et révélables par des tests colorimétriques (test de Kaiser¹²², à l'isatine¹²² et au chloranil¹²³). En raison de ces incertitudes de couplages liés à des réactions faites en milieu hétérogène, de larges excès de réactifs doivent donc être ajoutés. Un excès arbitraire de 5 équivalents de donneurs **26** a ainsi été ajouté à chaque glycosylation afin d'augmenter la probabilité de collisions entre les sites réactionnels.

Le promoteur utilisé a été le système NIS/TfOH et chaque réaction a été faite dans du DCM fraîchement distillé puis refroidi dans un bain de glace avant ajout sur résine. Le temps de réaction pour chaque glycosylation était de 20 minutes puis après filtration et divers lavage de la résine, les conditions de suppression du Fmoc ont immédiatement été engagées sans *capping*.

En synthèse supportée, un « *capping* » est parfois réalisé après chaque couplage afin de masquer la réactivité des fonctions qui n'ont pas réagi. Le choix de ne pas réaliser le *capping* a été décidé pour les raisons suivantes:

- 1) La réaction de *capping* introduit une réaction supplémentaire dont la nécessité peut être évaluée. Le thioglycoside **26** est un donneur très réactif selon les paramètres décrits précédemment (nature du thiol installé sur la position anomérique et groupement protecteur benzyl armé) et ajouté en large excès. Ces 2 paramètres font que les fonctions hydroxyle accessibles du support sont supposées toutes réagir.
- 2) Dans le cas où des fonctions du support n'auraient pas réagi, leur accessibilité est probablement limitée en raison des gênes stériques du donneur de thioglycoside **26** et de la résine. Les fonctions n'ayant pas réagi ne devraient pas non plus réagir avec la glycosylation suivante faite avec le même donneur dans les mêmes conditions. Cette hypothèse de non-réactivité liée à l'encombrement sera donc permanente.

Ce mode opératoire a ainsi permis de synthétiser le tétrasaccharide en répétant 4 fois le cycle glycosylation / déprotection à raison de 1 cycle par jour (excepté le dernier cycle de déprotection qui n'a pas été réalisé) (Fig. 133).

Le clivage et la déprotection ont ensuite été réalisés dans les conditions classiques de Zemplén. La solution est neutralisée avec de l'acide acétique puis le brut obtenu est purifié sur gel d'exclusion stérique sephadex LH-20.

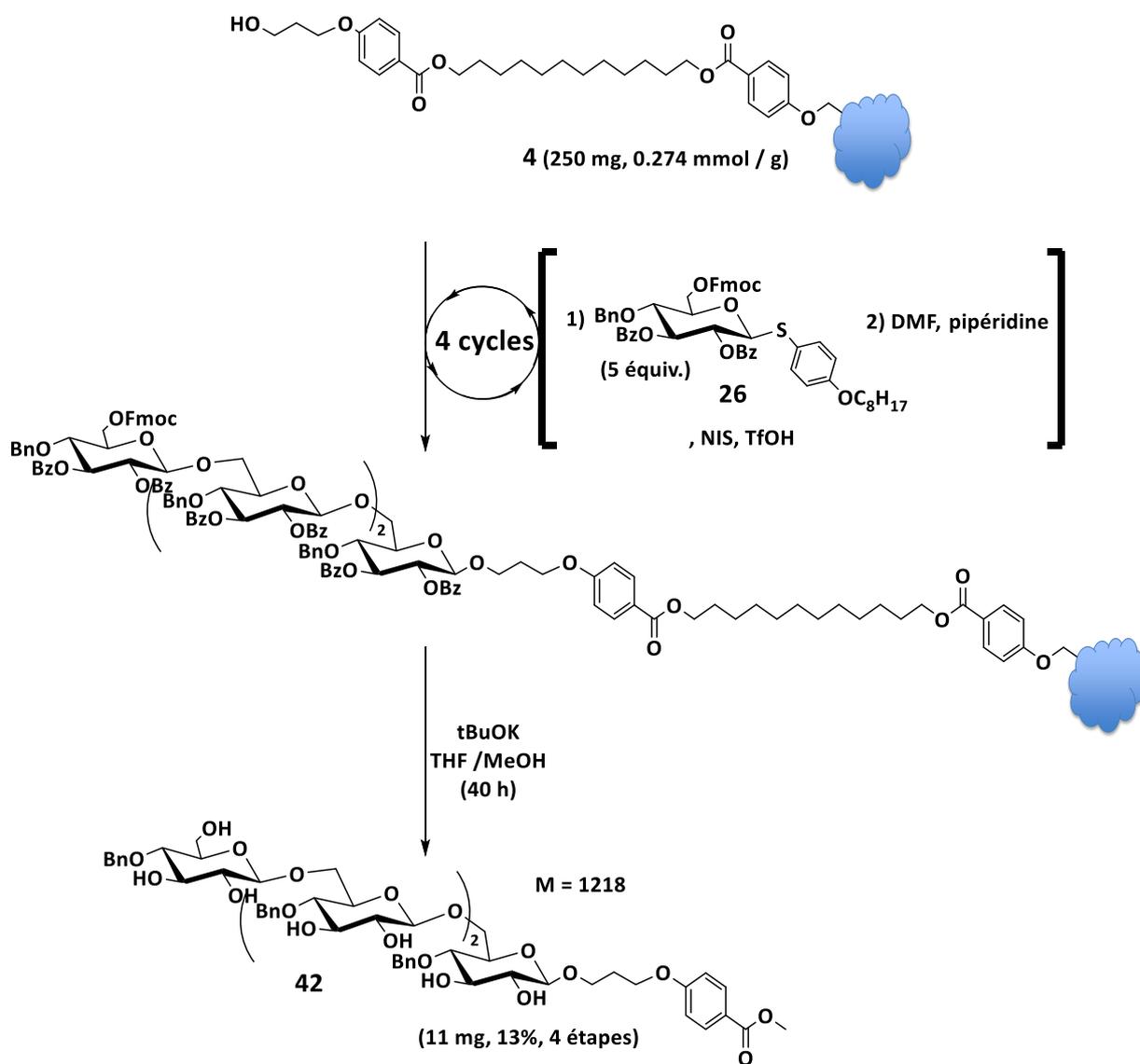


Figure 133 : schéma de synthèse du $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide réalisé sur support solide.

8.9.2 Analyse après purification sur gel d'exclusion stérique.

Les fractions issues de la chromatographie sur gel d'exclusion stérique sont ensuite déposées sur plaque CCM. L'élution a révélé la présence contenant un produit majoritaire pur dans les premières fractions, suivi de fractions contenant d'autres oligosaccharides. Toutes ces fractions ont été récupérées, évaporées, analysées et caractérisées. Une analyse du brut a également été réalisée.

Le tétrasaccharide majoritaire **42** a ainsi été synthétisé et caractérisé (RMN et HRMS) dans les premières fractions avec un rendement global de 13% (établi à partir de la résine modifié **4**). Les autres fractions analysées par spectrométrie de masse MALDI ont confirmé la présence de di- et trisaccharide. Seules les fractions contenant des oligosaccharides ont été récupérées et permettent de dresser le bilan massique de composés oligosaccharidiques obtenus (Tableau 4).

	Tétra- 42	Tétra- 42 + Tri-	Tétra- 42 + Tri- + Di-	Di-	Mono-
Masse d'oligosaccharides obtenus après purification (mg)	11	4	2	8	traces

Tableau 4 : bilan massique des composés obtenus après purification par SEC.

Le tétrasaccharide **42** a bien été synthétisé sur support solide avec un rendement global modeste de 17%. Le « capping » n'ayant pas été réalisé, le trisaccharide a été récupéré sans surprise constituant environ 15% de la masse de composés récupérés. De manière étonnante, le disaccharide a également été récupéré. Pour expliquer sa présence, une analyse HPLC du brut réactionnel juste après clivage a été réalisée. La majorité des pics a pu être identifiée en co-injectant les composés récupérés par exclusion stérique (Fig. 134).

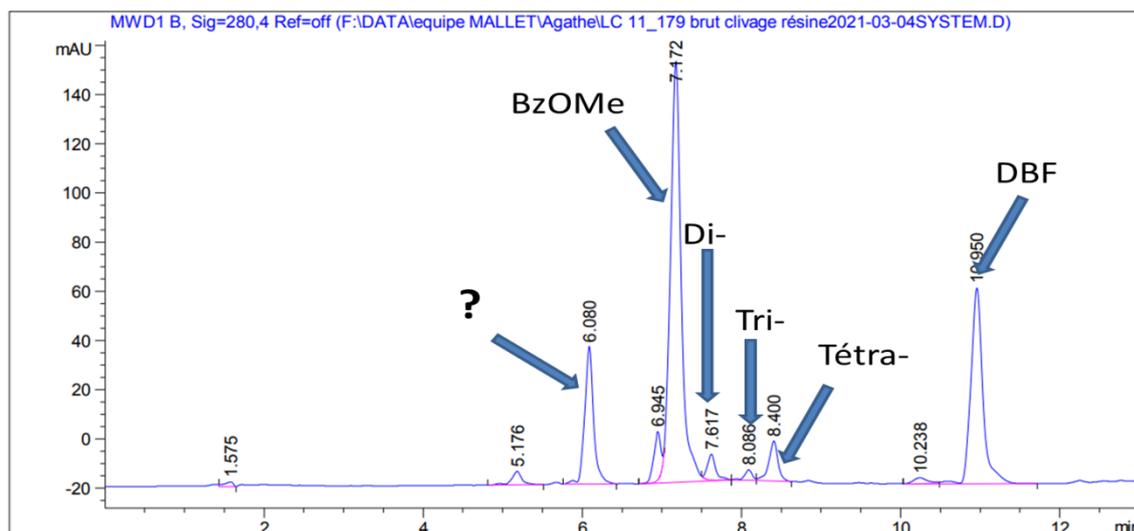


Figure 134 : chromatogramme HPLC du brut réactionnel juste après clivage du support solide.

Les di-, tri- et tétrasaccharides sont clairement identifiés tout comme l'adduit dibenzofulfène (DBF) et le benzoate de méthyle (BzOMe) issus de la déprotection au méthylate. En revanche un pic d'intensité non négligeable et non identifié à attirer notre attention (Fig. 134 T_R : 6.08). L'hypothèse envisagée pour expliquer ce pic inconnu serait la partie (Hydroxypropyloxy)benzoate **43** issu du linker attaché sur la résine (Fig. 135). Cette hypothèse sous entend qu'une partie du linker attachée sur la résine reste inaccessible même avec la chaîne alkyl en C_{12} censée améliorer l'accessibilité des fonctions.

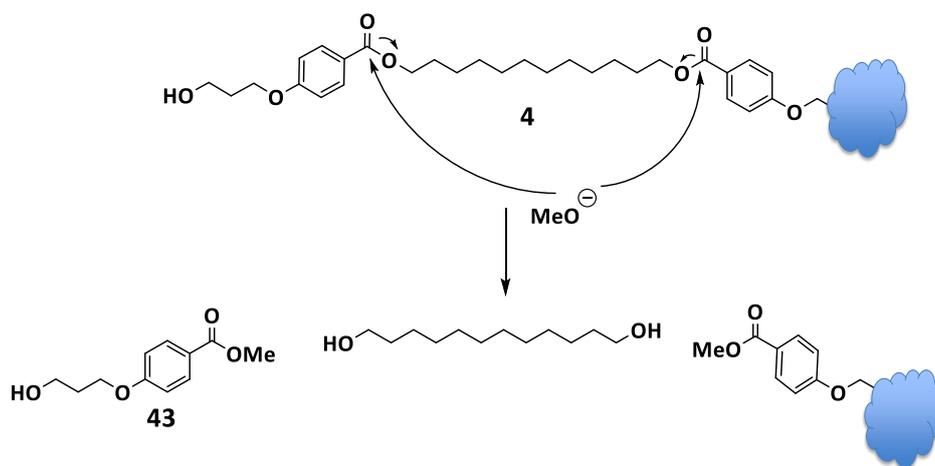


Figure 135 : Structure générées après clivage du support solide dans le cas où aucun substrat n'est attaché à la résine.

Pour confirmer cette hypothèse, la structure **5** utilisée pour la synthèse du noyau soluble a été transestérifiée dans le méthylate conduisant à la structure **43** connue de la littérature¹²⁴ (Fig. 136)

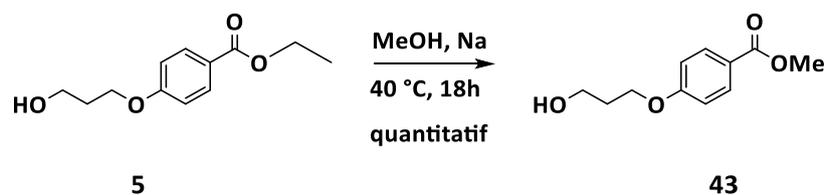


Figure 136 : transestérification de l'ester éthylique du composé 5 en ester méthylique.

Le produit de transestérification a ensuite été injecté en HPLC et comparé au chromatogramme obtenu lors du clivage sur support solide (Fig. 137)

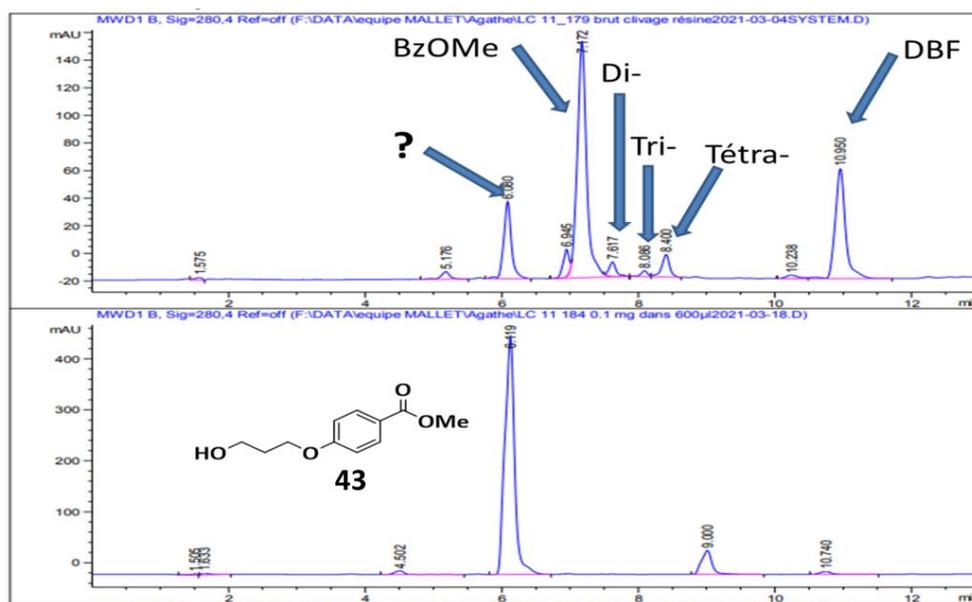


Figure 137 : comparaison des chromatogrammes HPLC du brut réactionnel de clivage et de la structure 43.

D'après la superposition des chromatogrammes, la structure transestérifiée **43** est bien présente lors du clivage de la synthèse supportée. Cela conforte l'hypothèse de la difficulté du donneur de thioglycoside **26** à atteindre certains hydroxyles dues aux gênes stériques de la maille polymérique. Ainsi, une grande partie des alcools du linker ne sont pas et ne seront jamais glycosylés. Les réactions de glycosylation ont également été répétées 4 fois avec 5 équivalents de donneurs. La probabilité de rencontre des sites réactionnels est alors augmentée à chaque couplage, ce qui peut expliquer la présence de disaccharide.

8.9.3 Conclusion.

Un $\beta(1\rightarrow6)$ glucane constitué de 4 unités glucose **42** a été synthétisé sur le support solide **4** avec le donneur de thioglycoside **26** avec un rendement global de 13%. Le support solide **4** a été élaboré en

utilisant un nouveau linker **3** caractérisé par un longue chaîne alkyl en C₁₂. 5 équivalents de donneurs **26** ont été utilisés à chaque couplage réalisé sans « capping ». Par ce procédé, du trisaccharide a été récupéré mais aussi de manière plus surprenante du disaccharide. Les analyses du brut après clivage ont montré la présence de l' (Hydroxypropyloxy)benzoate de méthyle **43**, ce qui montre la difficulté d'accès aux sites réactionnels de la résine malgré les 5 équivalents de donneurs ajoutés. Ces donneurs ont de plus été conçus comme étant très réactifs, l'ajout d'un tel excès reste problématique pour de telles synthèses avec ces modestes rendements globaux. En remplaçant la résine insoluble par le nouveau support soluble **14** construit à partir du dipentaérythrytol, les conditions habituelles de la chimie organique classique sont rétablies. C'est pourquoi le même $\beta(1\rightarrow6)$ glucane **42** avec le même donneur **26** sera synthétisé sur support soluble, ce qui permettra de comparer les deux approches.

8.10 Synthèse de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes sur support soluble.

8.10.1 Essais préliminaires avec le donneur **22G** / preuve du phénomène de migration.

L'un des principaux avantages de cette approche est la possibilité d'analyser les intermédiaires de synthèse. Le donneur de thioglycoside **22G** était le précurseur initialement prévu pour la synthèse supportée de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes. Cependant les phénomènes de migration des groupements benzoates nous ont fortement incités à remplacer le benzoyl installé sur le O-4 par un benzyl. La disponibilité du donneur **22G** a permis néanmoins de vérifier le comportement de réactivité du noyau soluble **14** et des thioglycosides d'une part ainsi que les potentiels phénomènes de migration d'autre part.

Un premier essai qualitatif de glycosylation supportée a ainsi été réalisé sur le noyau soluble **14** (Fig. 138). La réaction a été réalisée à raison de 1.2 équiv. de donneur **22G** par fonction hydroxyle soit un total de 7.2 équiv. La réaction a été réalisée dans du DCM sec sans présence de tamis moléculaire puis le NIS (1.25 équiv. / donneur) et le TfOH (0.4 équiv. / donneur). Après réaction, traitement et purification sur Sephadex LH-20, le monosaccharide supporté est récupéré puis analysé en RMN ⁻¹H. Les spectres RMN-¹H du monosaccharide supporté et du modèle **34** déjà caractérisé sont ensuite comparés (Fig. 139).

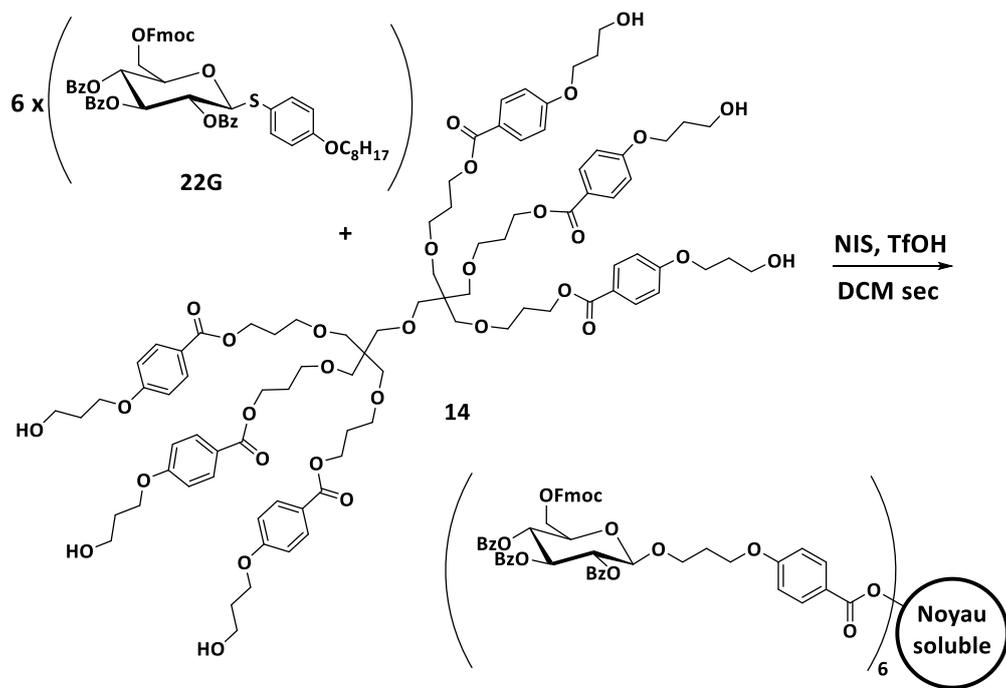


Figure 138 : structure du monoglycoside supporté après glycosylation du donneur **22G**

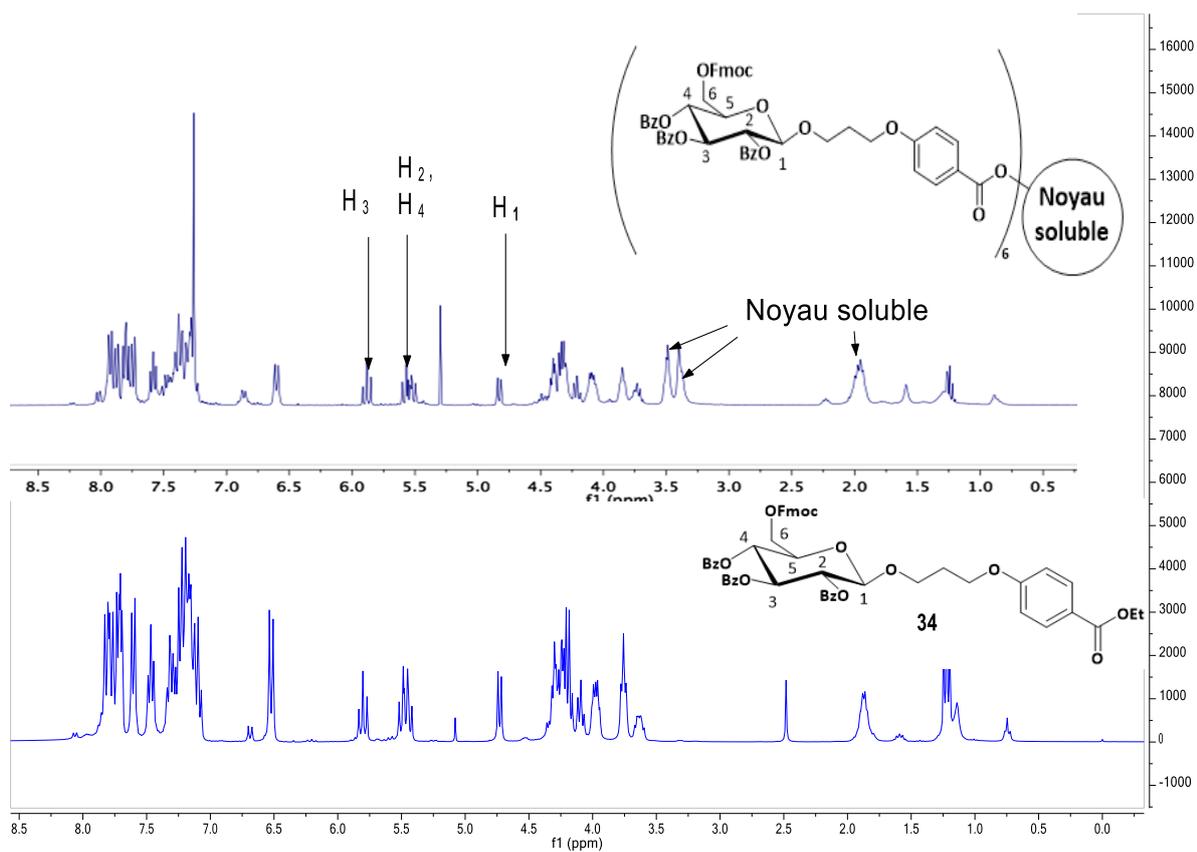


Figure 139 : comparaison en RMN ¹H du monosaccharide supporté avec le glycoside modèle **34**.

La structure de la structure obtenue étant symétrique, la localisation des signaux caractéristiques du glycoside sont facilement détectés en RMN-¹H. Ainsi il est très facile de détecter le doublet du proton anomérique H₁ vers 4.75 ppm, les protons H₂ et H₄ vers 5.50 ppm, le triplet H₃ vers 5.80 ppm ainsi que les signaux du noyau soluble (Fig. 139). L'analyse par spectrométrie de masse MALDI a également confirmé la présence du monosaccharide supporté (Fig. 140).

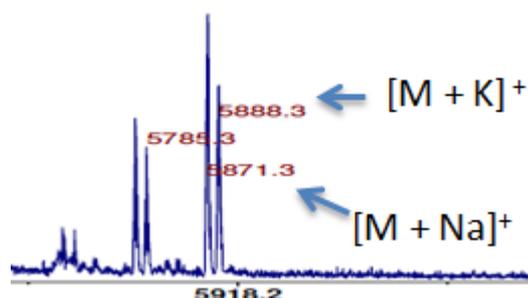


Figure 140 : spectre de masse MALDI du monoglycoside supporté après glycosylation du donneur

22G

Après cet essai de glycosylation supporté concluant, le clivage du groupement Fmoc a été réalisé. Le monosaccharide supporté a été dissout dans du DCM, puis de la pipéridine (10 équiv. / Fmoc) a été ajoutée. Après 30 minutes de réaction et de traitement post-réactionnel, le composé déprotégé est purifié sur gel d'exclusion stérique. Après récupération et évaporation des fractions d'intérêt, le monosaccharide est analysé en RMN-¹H. Le spectre obtenu est comparé avec la structure **37** dont le phénomène de migration avait été observé (Fig. 141).

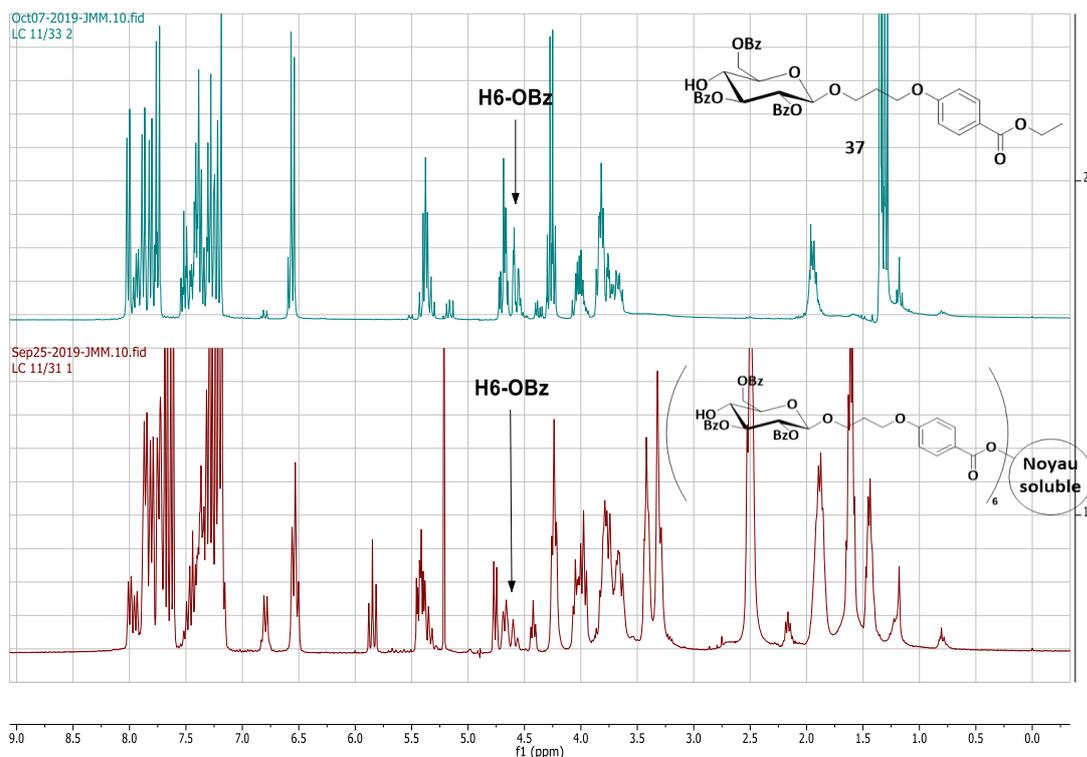


Figure 141 : RMN-1H après déprotection du monosaccharide supporté / comparaison avec la structure 37.

Un doublet de doublet (dd) caractéristique des H₆ est apparu. Ce signal déblindé par rapport à un H₆-OH montre que ce dernier est probablement benzoylé et a subi la migration du benzoate porté par le H₄. Ce dernier est majoritairement présent ce qui laisse penser que la migration est partielle. Même si le phénomène a lieu dans d'infimes proportions, cela n'est pas acceptable en synthèse supportée au risque d'obtenir un mélange d'isomères difficile à purifier en fin de synthèse. Le choix d'utiliser le donneur **26** avec le groupement benzyl installé sur la position O-4 est donc justifié.

8.10.2 Synthèse supportée de β(1→6) glucanes avec le donneur **26** / analyse des intermédiaires de synthèse par RMN.

8.10.2.1 Synthèse du tétrasaccharide supporté utilisant 1.2 équiv. de donneur par fonction hydroxyle.

La construction supportée de β(1→6) glucanes s'est basée sur toutes les études préliminaires établies: la synthèse utilise le noyau soluble polyhydroxylé **14** et le donneur de thioglycoside **26** activé par le système NIS / TfOH. Après neutralisation du milieu glycosylant et déprotection *one-pot* avec la pipéridine, quelques milligrammes de traceur coloré **16** sont introduits dans le brut réactionnel. Celui-ci est ensuite déposé et purifié sur gel d'exclusion Sephadex LH-20 conditionnée dans un mélange DCM / MeOH 1 : 1 v/v. Après élution, les premières fractions colorées contenant le

traceur **16** et le glycoside supporté sont récupérées. Le cycle est répété 4 fois et chaque intermédiaire est analysé en RMN. Une attention particulière s'est portée sur l'attache de la première unité glucose pour contrôler que la totalité des hydroxyles présents a réagi et éviter le *capping*. Les spectres RMN ont ainsi été comparés avant et après la première glycosylation. Alors que le domaine de résonance de la RMN-¹H est de 15 ppm environ, les déplacements chimiques du ¹³C couvrent une échelle nettement plus importante d'environ 250 ppm. C'est pourquoi il a été plus facile de détecter des signaux caractéristiques et de comparer les étapes avec des spectres provenant de la RMN-¹³C (Fig. 142).

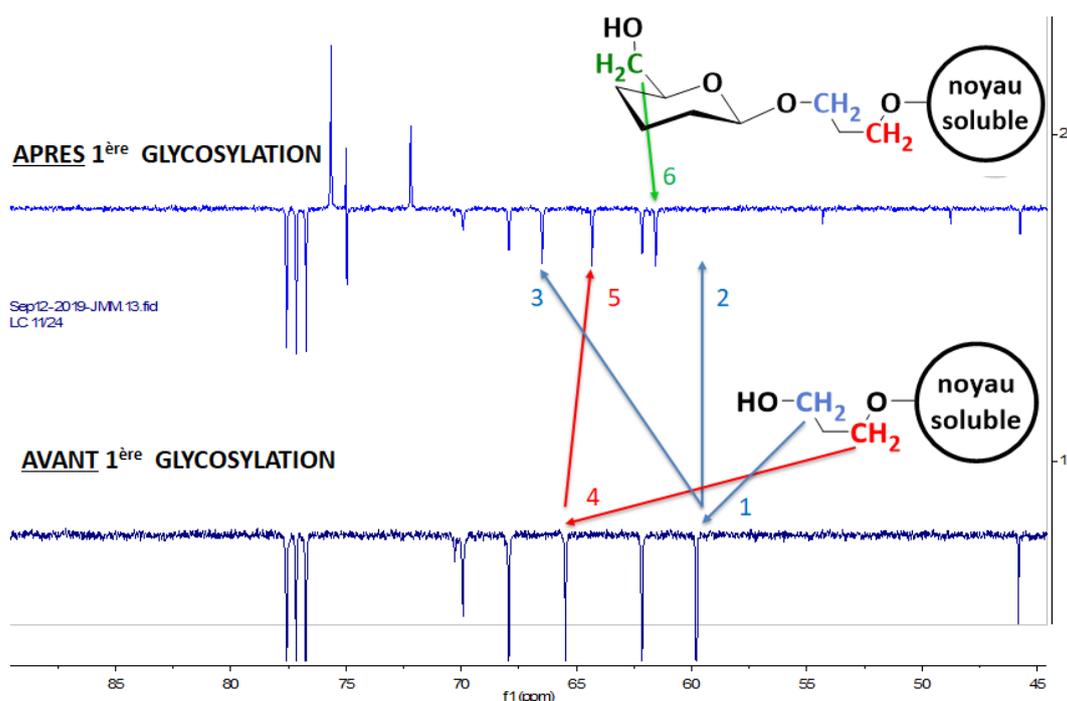
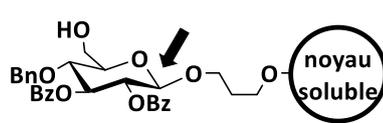
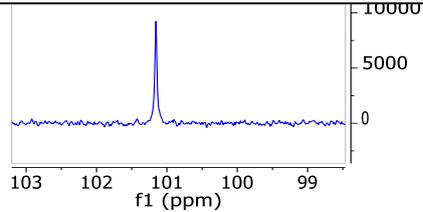
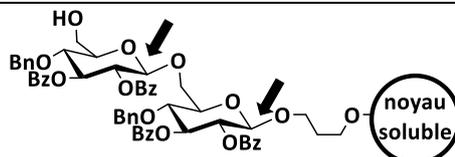
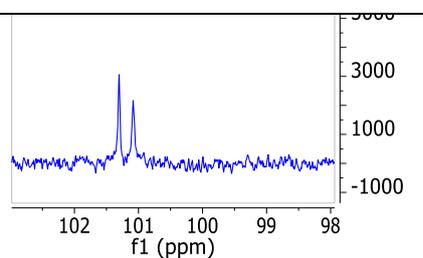
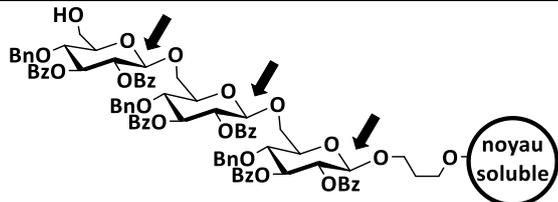
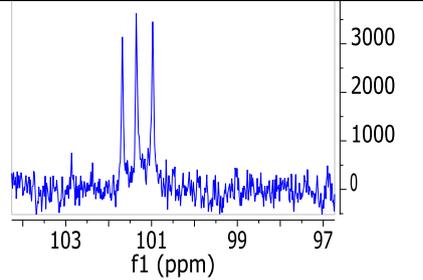


Figure 142: comparaison des spectres RMN-13C avant et après la première glycosylation supportée.

Ainsi, le déplacement chimique du $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-OH}$ porté par le support soluble est d'environ 60 ppm (Fig. 142 flèche 1). Lorsque la première glycosylation est effectuée sur le support soluble, ce carbone a complètement disparu de la RMN-¹³C (Fig. 142 flèche 2), ce qui démontre que la glycosylation est totale et est effectuée sur les 6 branches. Ce $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ subit alors l'environnement électronique du glycoside et se retrouve plus déblindé à environ 67 ppm (Fig. 142 flèche 3). De cette première réaction de glycosylation-déprotection *one-pot* résulte l'apparition du $\text{CH}_2\text{-OH}$ du glycoside (Fig. 142 flèche 6) et le CH_2 en α du noyau soluble subit quant à lui très peu l'environnement électronique du glycoside (Fig. 142 flèche 4 et 5). Cette comparaison des spectres RMN ¹³C avant et après première glycosylation permet de confirmer que les 6 branches du noyau soluble ont réagi et que le *capping* n'est pas nécessaire. De plus, un léger excès de 1.2 équiv. de donneur par fonction hydroxyle a été

utilisé pour réaliser l'attache du premier glycoside. Cette quantité de donneur s'étant avérée suffisante pour la 1^{ère} glycosylation, le donneur **26** a donc été ajouté à raison de 1.2 équiv par fonction –OH à chaque étape de la construction du β -glucane.

La méthode de comparaison des spectres RMN ^{13}C ne peut s'appliquer que sur l'attache du premier glycoside. Il serait difficile de contrôler la disparition d'un C6-OH et l'apparition d'un autre C6-OH avec le même environnement chimique. Notre attention s'est donc portée sur les déplacements chimiques des carbones anomères qui sont de l'ordre de 100 ppm. Un mono-, di-, tri- et tétrasaccharide porte respectivement un, deux, trois et quatre carbones facilement détectables en RMN- ^{13}C . La structure de chaque glycoside supporté a été analysée en RMN- ^{13}C avec une attention particulière dans la zone de déplacement chimique des carbones anomères. Un premier essai de synthèse d'un β -glucane a été réalisé et chaque intermédiaire isolé après chromatographie par exclusion a été analysé en RMN- ^{13}C . Les résultats sont consignés dans le tableau ci dessous (tableau 5 où chaque glycosylation a été réalisée avec 1.2 équiv. de donneur **26** par fonction hydroxyle porté par le noyau.

	Structure*	Agrandissement de la zone des déplacements chimiques des carbones anomères en RMN ^{13}C
Mono-	 <p>M = 4431</p>	
Di-	 <p>M = 7192</p>	
Tri-	 <p>M = 9953</p>	

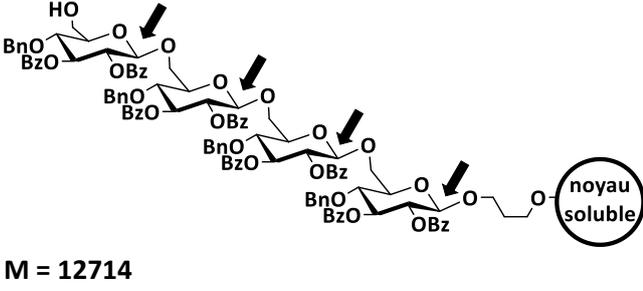
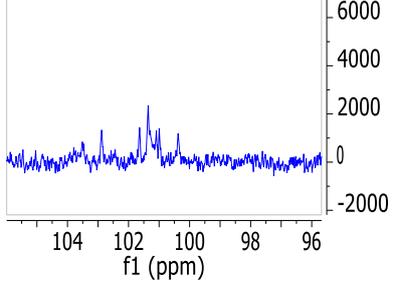
Tétra-	 <p>M = 12714</p>	
*Utilisation de 1.2 équiv. de donneur 26 par hydroxyle et par glycosylation.		

Tableau 5: contrôle des glycosylations supportées avec l'apparition des carbones anomères détectés en RMN-¹³C.

Les spectres RMN-¹³C sont en accord avec les résultats attendus : chaque réaction de glycosylation-déprotection avec 1.2 équiv. de donneur / OH montre la présence de un, deux et trois carbones anomères correspondant au mono-, di- et trisaccharide supporté.

En revanche, il semble difficile de prouver la présence du tétrasaccharide par RMN-¹³C en raison du nombre de pics supérieurs à 4. La structure très encombrée et volumineuse du trisaccharide supporté (Mw ≈ 9900 g/mol) montre sans doute ses limites pour réagir avec 1.2 équiv. de donneur.

8.10.2.2 Synthèse du tétrasaccharide supporté utilisant 1.5 à 2.0 équiv. de donneur par fonction hydroxyle.

Afin d'avoir un maximum de taux de conversion, une deuxième synthèse d'un tétrasaccharide a été réalisée avec 1.5 équiv. de donneur jusqu'au trisaccharide, puis avec 2.0 équiv. de donneur pour la synthèse du tétrasaccharide. Les intermédiaires supportés sont également analysés en RMN-¹³C. Les spectres obtenus du mono-, di-, et trisaccharide sont identiques à ceux issus du premier essai de synthèse supportée (tableau 5) et ont été obtenus avec les rendements respectifs de 86%, 91% et 92%. Il n'y a également plus aucun doute de formation du tétrasaccharide avec les nouvelles quantités de donneurs utilisés. Les 4 pics détectés dans la zone des déplacements chimiques des carbones anomères confirment la présence du tétrasaccharide supportée obtenu avec 94% de rendement (tableau 6).

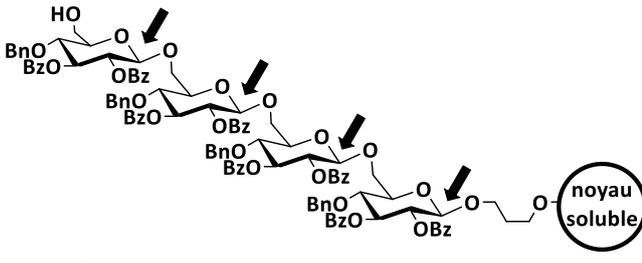
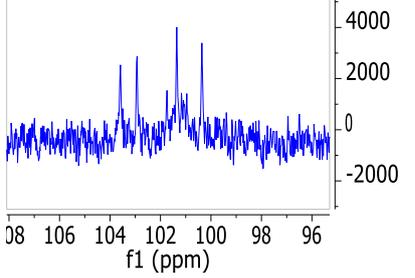
	Structure*	Agrandissement de la zone des déplacements chimiques des carbones anomères en RMN ¹³ C
Tétra-	 <p>M = 12714</p>	
<p>* utilisation de 1.5 équiv. de donneur 26 par hydroxyle jusqu'au trisaccharide puis 2 équiv. par hydroxyle pour la synthèse du tétrasaccharide.</p>		

Tableau 6 : contrôle de l'apparition des carbones anomères par RMN-13C pour la synthèse du tétrasaccharide supporté.

Cette dernière analyse du tétrasaccharide supporté en RMN-¹³C validée, les conditions de clivage établies ont ensuite été appliquées. Le tétrasaccharide a été clivé et débenzoylé dans les conditions de Zemplén à 40 °C pendant 18 h afin de favoriser les conditions de transestérification (Fig. 143).

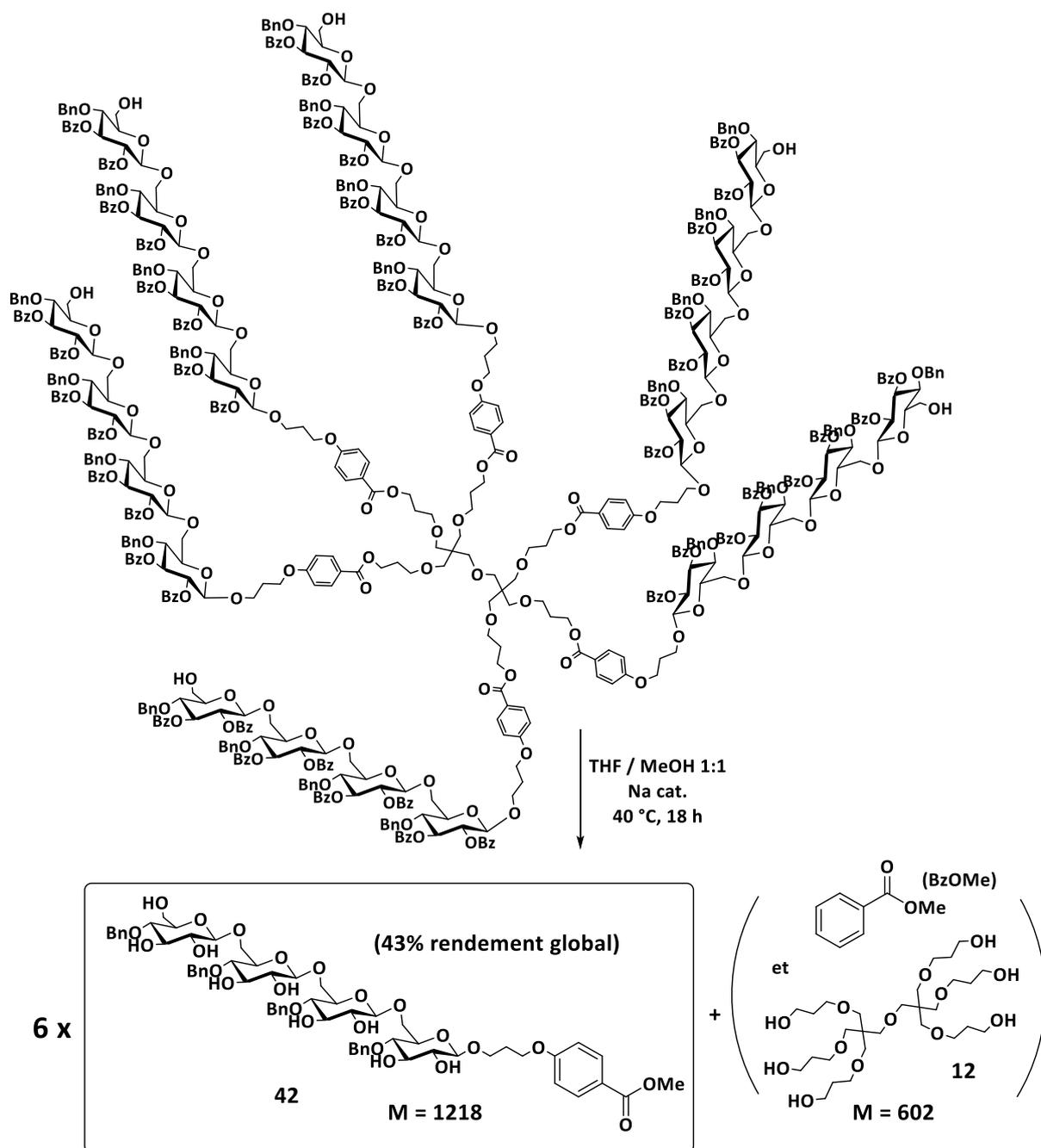


Figure 143 : clivage et débenzoylation du $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide.

Après traitement de la réaction, le brut est purifié sur gel d'exclusion stérique de type Sephadex LH-20.

8.10.3 Analyse après purification sur gel d'exclusion stérique.

Le protocole d'analyse est le même que celui décrit après clivage du tétrasaccharide sur support solide. Le tétrasaccharide majoritaire a été récupéré et caractérisé (RMN et HRMS) dans les premières fractions. 76 mg de composé **42** ont ainsi été récupéré pour 40 mg (23.94 μmol) de

support soluble engagé **14**. Les autres fractions analysées par MALDI et HPLC ont confirmé la présence de di- et trisaccharide. Toutes les fractions où des composés ont été détectés par CCM ont été récupérées, ce qui permet de dresser le bilan massique suivant (tableau 7):

	Tétra- 42	Tri-	Di-	Mono-	Dérivé pentaérythrytol 12	Autres dérivés (BzOMe, ...)
masse (mg)	76	12	traces	traces	9	5

Tableau 7: bilan massique des composés récupérés après clivage et purification par SEC du $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide supporté **42**

Le tétrasaccharide **42** a bien été synthétisé sur support soluble et ce composé a été le constituant majoritaire du brut réactionnel après clivage du support. 76 mg de tétrasaccharide **42** ont été récupérés portant le rendement global de synthèse à 43%. Sans *capping* effectué, le trisaccharide (12 mg, 6 % de rendement global) a sans surprise été récupéré. Des traces de mono- et disaccharide ont aussi récupérées ainsi que le dérivé pentaérythrytol et d'autres composés non caractérisés. Ces derniers issus de la déprotection et clivage pourraient être le benzoate de méthyl (BzOMe) et la partie (Hydroxypropyloxy)benzoate **43** resté inaccessible. Il semble donc que la dernière glycosylation soit plus difficile que les trois premières (qui se sont très bien passées au vu de la RMN). Cette difficulté peut venir de la grande taille atteinte par les molécules (masse molaire vers 10 kDa). Une version supportée comme celle avec le pentaérythrytol envisagée initialement pourrait être proposée pour monter moins vite en masse molaire tout en restant au delà de la limite d'exclusion de la LH20.

8.11 Comparaison des deux approches de synthèse de $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes

Les deux bruts issus du clivage au méthylate des deux synthèses ont été analysés en HPLC et comparés entre eux pour avoir une idée de la composition du milieu (Fig. 144). Dans les deux synthèses supportées réalisées (solide et soluble), les di-, tri- et tétrasaccharides sont bien identifiés mais à des proportions, donc quantités différentes (chromatogrammes 1 et 3, Fig. 144). Excepté le pic correspondant au BzOMe, le tétrasaccharide est l'un des composés majoritairement présents dans la synthèse en solution (chromatogramme 3 Fig. 144). L'(Hydroxypropyloxy)benzoate de méthyle **43** a également été identifié sur le chromatogramme 3 (Fig. 144) par comparaison avec le chromatogramme 2 (Fig. 144). La récupération de cette structure laisse supposer que la chaîne oligosaccharidique n'a pas poussé malgré la répétition des réactions. Une potentielle gêne stérique

doit donc se créer lorsque les premiers glycosides sont attachés et empêcher la chaîne oligosaccharidique de grandir.

En revanche, la présence non négligeable de l'((Hydroxypropyloxy)benzoate de méthyle **43** issu du clivage du support solide illustre les difficultés d'accès aux sites réactionnels. Cette inaccessibilité est probablement causée par l'encombrement stérique de la maille polymérique et cela malgré l'introduction de la chaîne lauryl (C12) du linker. La piste de l'inaccessibilité est d'autant privilégiée vu le nombre d'équivalents de donneur engagé (20 équivalents au total) pourtant conçus pour être très réactifs.

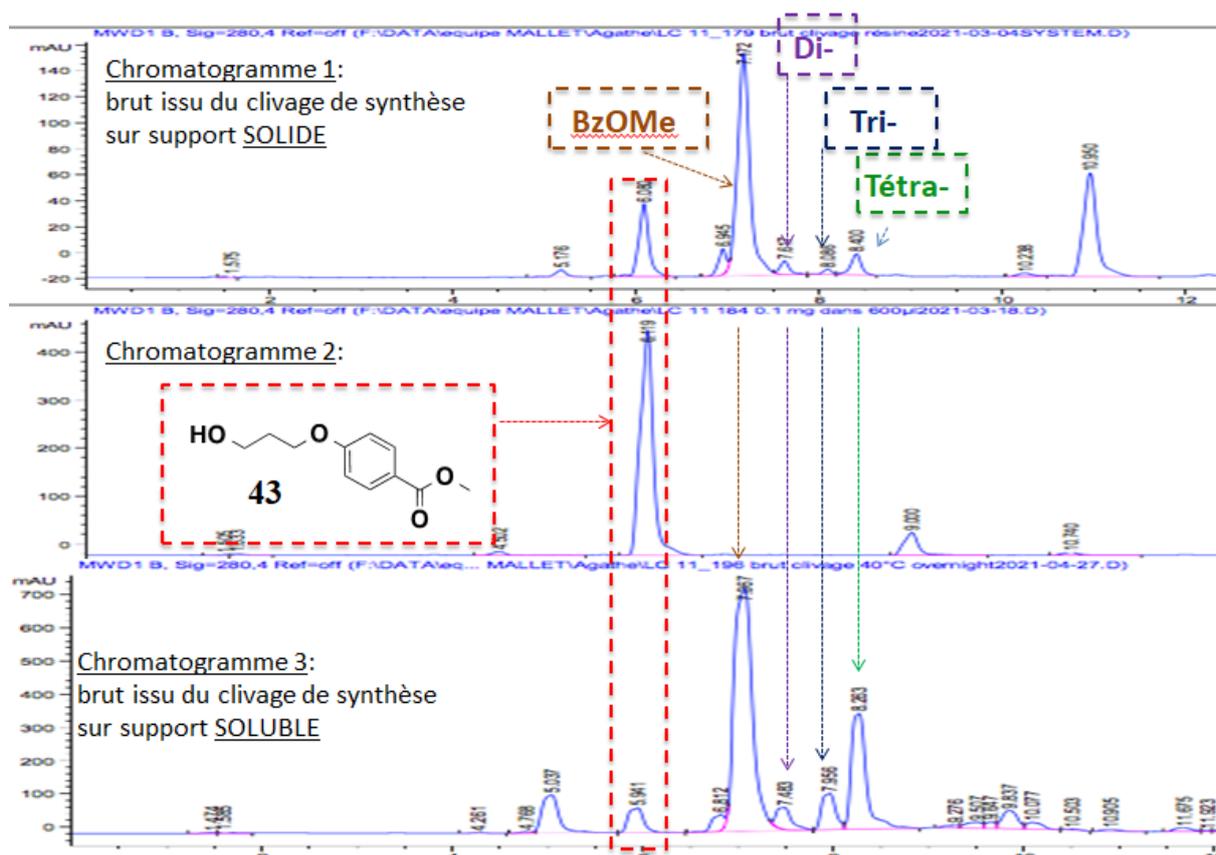


Figure 144 : comparaison des chromatogrammes réalisés après clivage des synthèses supportées avec le chromatogramme de ((Hydroxypropyloxy)benzoate de méthyle **43**.

La synthèse du même tétrasaccharide sur deux supports différents a ainsi permis de tester les deux approches. Ce sont deux techniques complémentaires qui ont permis d'enchaîner rapidement les réactions de glycosylations et de purifier aisément les intermédiaires de synthèse. Le tableau suivant dresse un récapitulatif des conditions opératoires utilisées avec les deux approches (structures des supports utilisés, rendements, nombre d'équivalent,..) (Tableau 8)

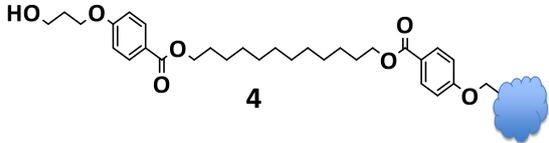
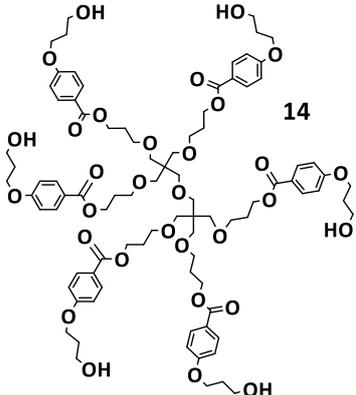
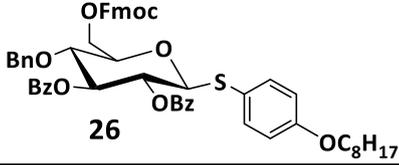
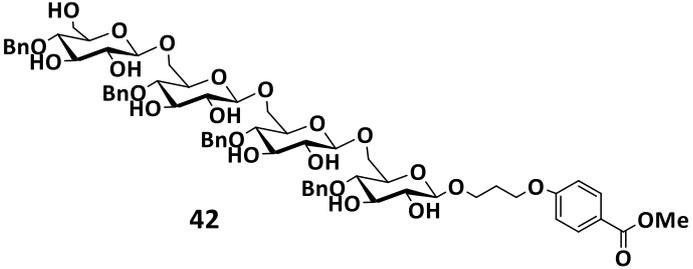
	Support SOLIDE	Support SOLUBLE
Nature du support	Résine de Merrifield (0.8 mmol / g, 200-400 Mesh)	Noyau symétrique polyhydroxylé
Structure chimique après synthèse et/ou modification		
Moyen de purification des intermédiaires de synthèse	filtration	Purification sur gel exclusion stérique type LH-20 facilitée par le traceur coloré 16
Quantité initiale de fonction hydroxyle engagée (mmol)	0.0688 (établi par dosage UV ⁹³)	0.1436
Quantité totale de donneur de thioglycosides engagés (mmol)	1.376	0.773
Nombre total d'équivalents de thioglycoside ajouté	<u>20.0</u>	<u>5.4</u>
Masse de tétrasaccharide 42 obtenue (mg)	14	76
Rendement global	17%	43%
Structure du donneur de thioglycoside		
Structure du tétrasaccharide après clivage		

Tableau 8 : tableau comparatif des synthèses réalisées sur support SOLIDE et support SOLUBLE.

En se focalisant uniquement sur les rendements globaux et sur les quantités de donneurs de thioglycosides **26** utilisées, il est indéniable que la synthèse d'oligosaccharide supportée en solution présente des avantages incontestables. La synthèse du tétrasaccharide **42** a été obtenue avec un rendement global de 43% sur support soluble avec 5.4 équivalents de donneurs de thioglycoside **26** utilisé au total. Ce même tétrasaccharide a été obtenu avec 13% de rendement global pour un total de 20.0 équivalents dans le cas de la synthèse sur support solide.

Ce support soluble purifiable par chromatographie d'exclusion stérique assisté par colorimétrie et étudié dans ce projet a fait ses preuves dans la synthèse d'oligosaccharides.

Ces atouts sont:

- 1) La possibilité de contrôler par RMN les intermédiaires de synthèse et d'ajuster le nombre d'équivalent ou les conditions réactionnelles. En synthèse supportée de peptide, les acides aminés ont des reactivités similaires et les protocoles sont les mêmes quelque soit la séquence et le résidu - La réaction sur proline (amine secondaire) a son protocole particulier . Dans le cas des blocs oligosaccharidiques les reactivités sont tres variées et doivent entre adaptées apres contrôle de la réaction sur le support.
- 2) la technique est adaptée sur des quantites moyenne (100 mg -1 g) sans problème et l'objectif d'une glycosylation (ou même 2) par jour est réaliste.
- 3) En modifiant un peu le linker (par exemple substituer le lien ester par un lien amide) , on peut ne pas cliver le support et avoir directement un dendrimère et utiliser la multivalence (effet "cluster") pour le ciblage de protéine ou de lectine.

Une limite possible, à vérifier expérimentalement, est l'effet de la masse molaire de l'oligosaccharide supporté sur les rendement de couplage, les grosses molécules sont moins mobiles et plus lentes a réagir. Dans ce cas, un noyau avec 3 ou 4 bras au lieu de 6, sera plus adapté à la synthèse de chaines longues, tout en restant audela de la limite d'exclusion de la LH20.

Cette technique n'en est qu'à ses débuts mais les résultats prometteurs obtenus nous permettent d'envisager la synthèse d'oligosaccharides plus complexes.

8.12 Fonctionnalisation du $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide.

Afin de pouvoir conjuguer le tétrasaccharide **42** par chimie click avec une molécule d'intérêt (biotine, peptide, sonde fluorescente, ...) ce dernier a été fonctionnalisé par un alcyne sans difficulté selon les conditions établies. Pour cela, les groupements protecteurs installés sur la position O-4 ont été

supprimés par hydrogénation catalytique. Cette réaction classique en synthèse chimique a été réalisée sous atmosphère de dihydrogène en présence de palladium sur charbon et sous une pression de 5 bars. Le tétrasaccharide complètement déprotégé **44** a de cette manière été obtenu avec 80% de rendement (Fig. 145):

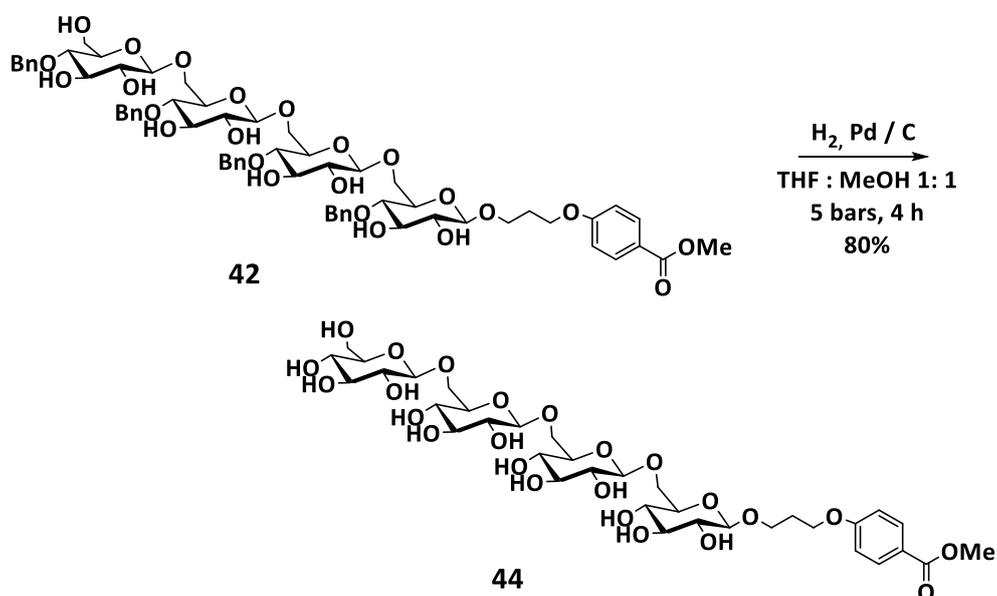


Figure 145 : suppression des groupements benzyles du tétrasaccharide **43** par hydrogénation catalytique.

Les conditions de fonctionnalisation établies ont permis l'introduction d'un alcyne sans problème sur le tétrasaccharide **44**. Pour cela, le tétrasaccharide **44** est solubilisé dans de l'alcool propargylique préalablement séché sur tamis moléculaire. Une quantité catalytique de sodium est ensuite introduite dans le milieu puis la réaction est chauffée pendant 90 minutes sous atmosphère inerte. La réaction peut être suivie par HPLC grâce au chromophore porté par le tétrasaccharide **44**. Quand l'ester méthylique est totalement transestérifié, la réaction est concentrée à sec puis le résidu obtenu est purifié sur HPLC préparative. Les fractions pures ont été lyophilisées permettant d'obtenir le $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide **45** avec un rendement de 58% (Fig. 146) et complètement caractérisé par RMN et HRMS.

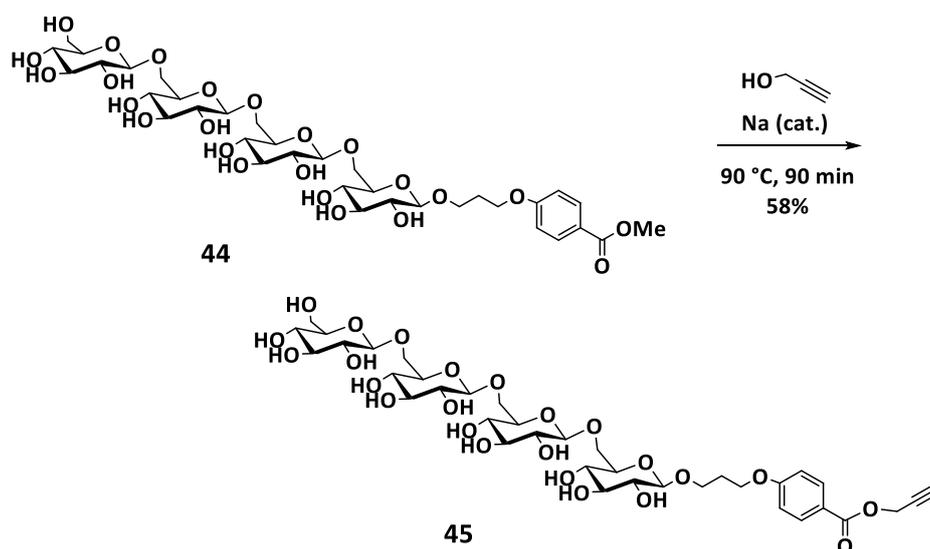


Figure 146 : fonctionnalisation du $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide **44** par un alcyne.

9 Conclusions et perspectives

Ce travail réalisé avait pour objectif la synthèse supportée d'oligosaccharides construits avec des thioglycosides comme précurseurs. Les synthèses ont été réalisées sur un support afin d'éviter les étapes d'extraction, d'évaporation et de purification et pour améliorer la disponibilité de l'oligosaccharide final. Pour cela, 3 points clé pour augmenter la réactivité / accessibilité des réactifs ont été abordés:

- 1) La synthèse originale et l'utilisation du *p*-octyloxythiophénol **18**.
- 2) L'utilisation d'un nouveau linker **3** pour la synthèse sur support SOLIDE.
- 3) La synthèse d'un noyau polyhydroxylé symétrique **14** utilisée comme support SOLUBLE où le suivi réactionnel peut être réalisé et où chaque intermédiaire réactionnel est isolé par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC). Les purifications ont également été facilitées par l'utilisation d'un traceur coloré **16**.

Le *p*-octyloxythiophénol **18** complètement inodore a été choisi en raison de la chaîne alkyl en C8 qui de part son effet mésomère renforce la nucléophilie du soufre et donc la réactivité des thioglycosides. Les réactivités des thioglycosides issus du *p*-octyloxythiophénol **18** ont été comparées avec les thioglycosides issus du 2-méthyl-5-tert-butylphénylthiol (HSMbp) initialement développés et utilisés au Laboratoire. Les réactions de compétition mises en jeu entre les différents thioglycosides ont démontré une meilleure réactivité des thioglycosides issus du thiol **18** justifiant l'utilisation de ce composé pour la synthèse supportée (Fig. 147).

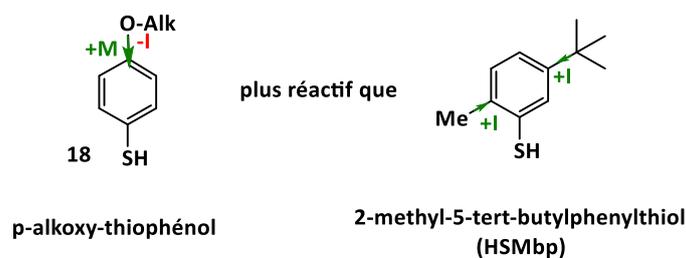


Figure 147 : utilisation des dérivés *p*-alkoxy-thiophénol plus réactifs que le HSMbp.

Concernant le nouveau linker **3** développé pour le support solide, celui-ci présente 3 avantages (Fig. 148) :

- a) Une longue chaîne hydrophobe permettant d'éloigner les sites réactionnels du polymère et d'améliorer leur accessibilité et leur réactivité.
- b) Une fonction ester clivable en présence de méthylate permettant l'introduction d'une nouvelle fonction par transestérification.
- c) Après clivage, l'oligosaccharide dispose d'un noyau aromatique comme tag UV, utile pour la détection du composé lors des purifications ou manipulations ultérieures.

L'utilisation de ce nouveau linker **3** et l'utilisation de thioglycosides issu du *p*-octyloxythiophénol **18** ont permis la synthèse sur support solide du $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide **42** obtenu avec un rendement global très modeste de 13% . La présence de l'(Hydroxypropyloxy)benzoate de méthyle **43** après clivage de l'oligosaccharide démontre la difficulté d'accès des sites réactionnels de la résine malgré la chaîne alkyl en C12 du linker et les 5 équivalents de donneurs ajoutés à chaque couplage. Ces donneurs ont de plus été conçus comme étant très réactifs, l'ajout d'un tel excès reste problématique pour de telles synthèses avec ces modestes rendements globaux.

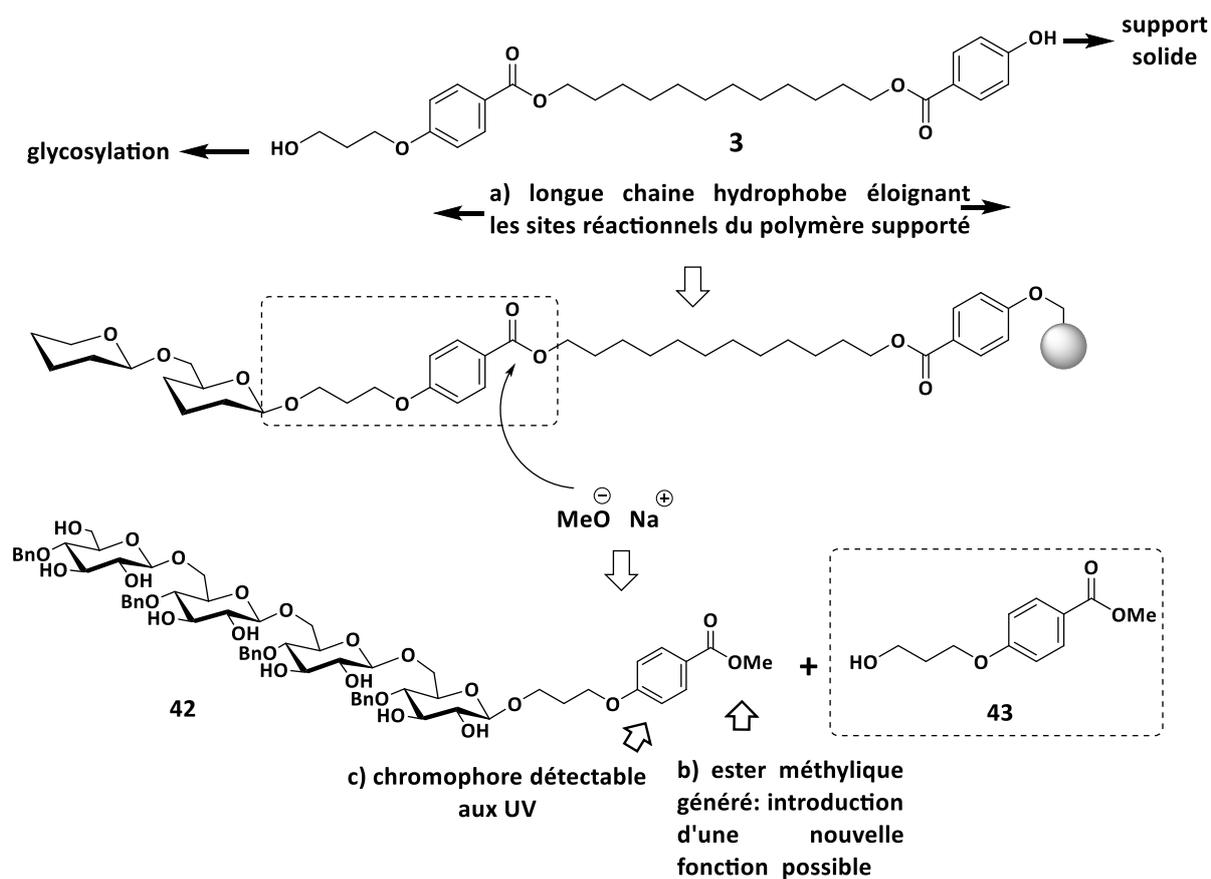


Figure 148 : Des fonctions du support solide restent inaccessibles malgré les avantages du nouveau linker 3.

En remplaçant les supports insolubles par des supports solubles, les conditions de réaction habituelles de la chimie organique classique sont rétablies. Ce point a permis d'aborder la synthèse d'un nouveau noyau soluble polyhydroxylé **14** utilisable dans la construction d'oligosaccharides et possédant la même extrémité réactive que le linker **3**. Ce nouveau support soluble **14** a permis d'isoler chaque intermédiaire supporté par SEC grâce à l'augmentation importante du poids moléculaire des intermédiaires réactionnels après chaque couplage. La synthèse du traceur coloré **16** dérivé du noyau soluble **14** a également permis de faciliter visuellement les purifications. Cette méthode de synthèse supportée basée sur le thioglycoside **26** a ainsi permis d'obtenir le $\beta(1\rightarrow6)$ glucane tétrasaccharide **42** avec un rendement global de 43%. Ce tétrasaccharide **42** a ensuite été fonctionnalisé par une triple liaison afin d'obtenir une molécule cible **45** prête à être conjuguée par chimie click à une autre molécule d'intérêt (Fig. 149) (peptide, biotine, sonde fluorescente, ...).

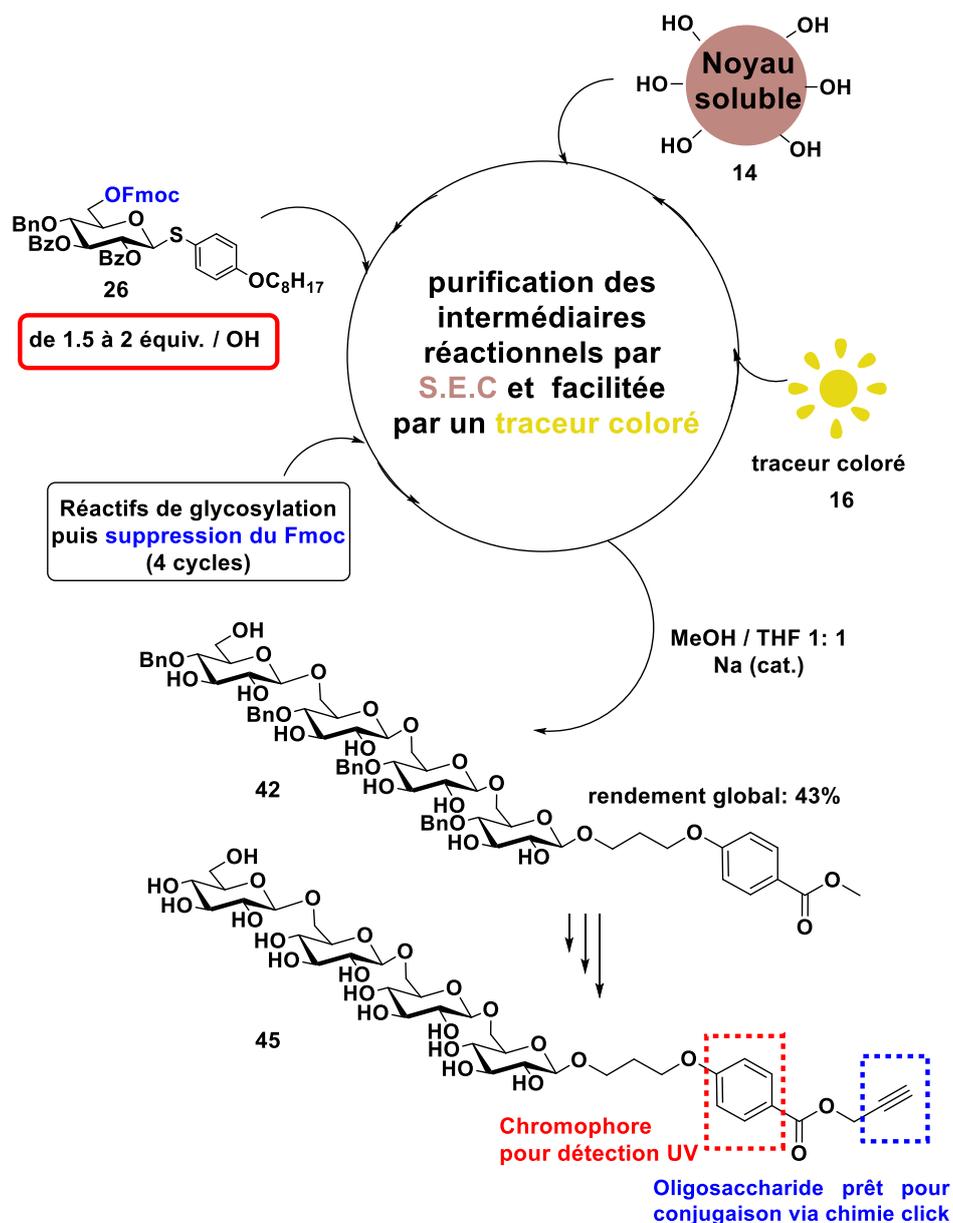


Figure 149: schéma global du principe de synthèse supportée des $\beta(1\rightarrow6)$ glucanes sur le noyau soluble **14** assistée par SEC et facilitée par le traceur **16**

Les esters sont sensibles à l'hydrolyse et l'introduction d'une telle fonction sur une molécule cible peut être risquée. Des études montrent pourtant que les esters propargyliques peuvent être utilisés pour la chimie click afin d'obtenir des molécules finales utilisées dans des tests biologiques. Par exemple, le groupe de Luxmi a synthétisé une série de 1,4- disubstitués 1, 2, 3 – bistriazoles testés *in vitro* et ayant une activité antimicrobienne sur des pathogènes comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*¹²⁵ (Fig. 150). L'illustration de cet exemple, parmi d'autres travaux où le même type d'ester

propargylique est utilisé pour la chimie click^{126,127}, conforte l'idée que ce type d'ester peut être utilisé dans notre cas.

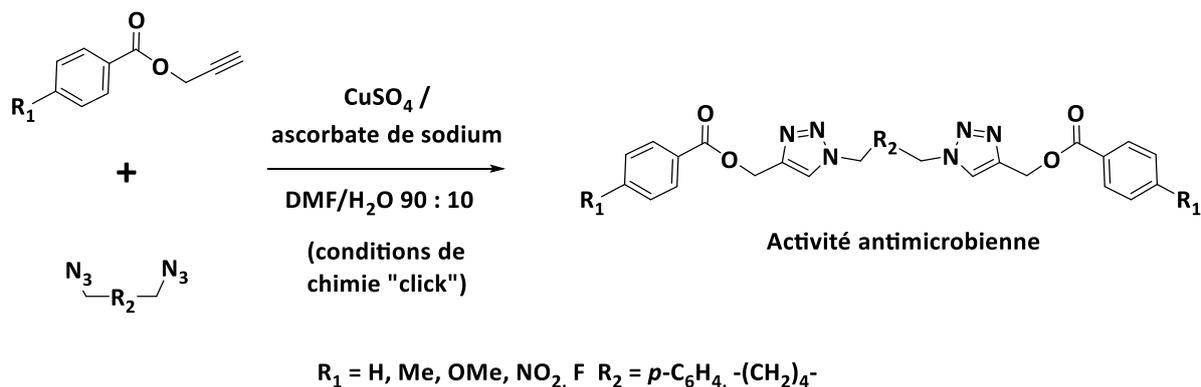


Figure 150 : divers esters propargyliques utilisés pour la chimie « click » et test *in vitro* des produits obtenus.

Il est également envisageable d'introduire d'une fonction azoture (-N₃) à la place d'une triple liaison (-C≡CH) après le clivage de l'oligosaccharide supporté. Dans un autre projet développé au Laboratoire, des essais ont été réalisés sur un dérivé mannoside comportant le même linker de type (Hydroxypropyloxy)benzoate de méthyle (Fig. 151). Ce dernier a été transestérifié en présence d'azidopropan-1-ol utilisé comme solvant avec un rendement encourageant de 38%. Cette réaction est actuellement en cours d'optimisation et à terme il sera possible de fonctionnaliser les oligosaccharides par des azotures. Le choix d'introduction de l'une ou l'autre fonction augmentera ainsi la diversité des molécules conjuguées faisant de cette stratégie une innovation dans la synthèse supportée et la fonctionnalisation d'oligosaccharides.

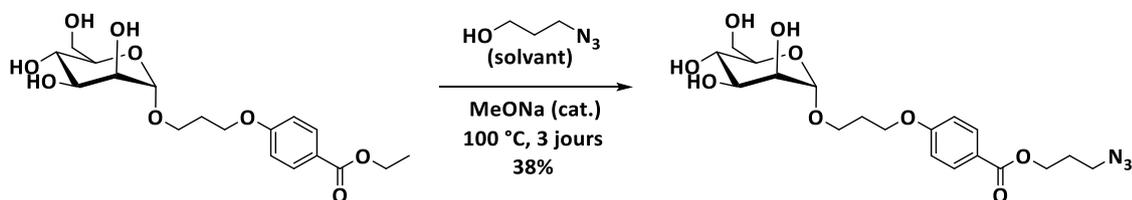


Figure 151 : fonctionnalisation par transestérification d'un dérivé mannoside par un azoture réalisé au Laboratoire

Il semble cependant que la quatrième glycosylation soit plus difficile que les trois premières (qui se sont très bien passées d'après les RMNs obtenues). Cette difficulté peut venir de la grande taille atteinte par les molécules dont les masses molaires sont proches des 10 kDa. Une version supportée comme celle avec le pentaérythrytol envisagée initialement avec 4 branches pourrait être proposée

pour monter moins vite en masse molaire tout en restant au delà de la limite d'exclusion de la LH20. Par exemple, la synthèse du tétrasaccharide supporté atteindrait ≈ 9.7 kDa avec cette version (Fig. 152) contre ≈ 13 kDa avec la version actuelle.

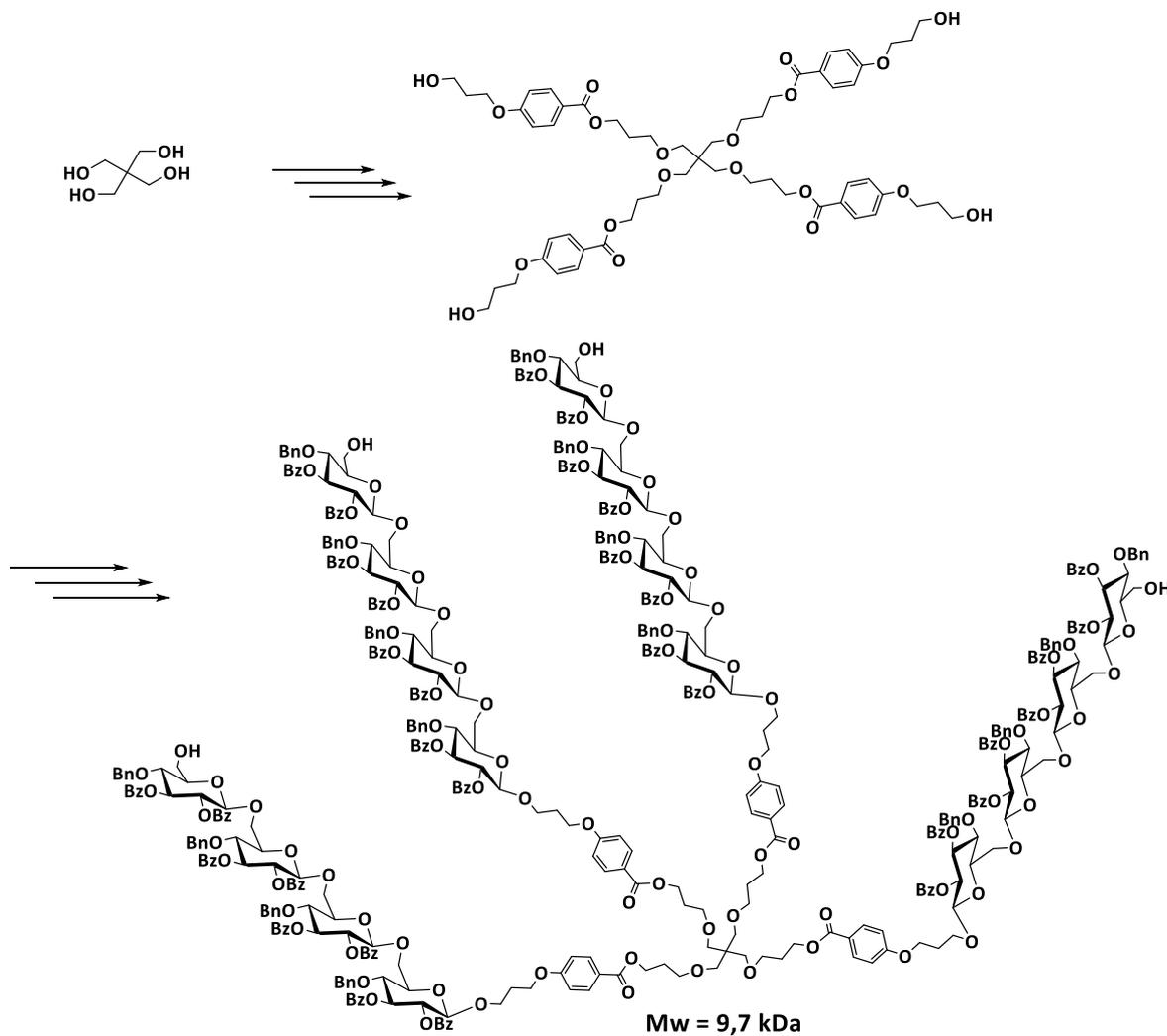


Figure 152 : La version pentaérythrytol du support soluble (4 branches) permettrait d'avoir des poids moléculaires moins élevés améliorant la mobilité et donc la réactivité du support soluble

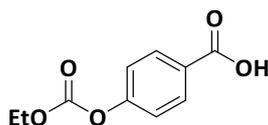
10 Experimental.

10.1 General procedure and numbering for assigning NMR spectra

All compounds were homogeneous by TLC analysis and had spectral properties consistent with their assigned structures. Compound purity was checked by TLC on Silica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck) with UV and detection by charring with sulfuric acid or *p*-anisaldehyde. The columns chromatography were performed on Silicagel 60 (E. Merck) with flash chromatography instrument (Armen Spot 2 model) using cyclohexane (CyHex), dichloromethane (DCM), methanol (MeOH) and ethyl acetate (AcOEt). Compounds were analyzed by ESI-MS for HRMS (Thermo Scientific, LTQ Orbitrap XL) or MALDI-MS (Applied Biosystems, De-PRO) with a matrix containing 2,5-dihydroxybenzoic acid. Analytical HPLC was performed on an Agilent 1200 series equipped with a quaternary pump using a Proto 200 C18 from Higgins Analytical Inc (particles size 3 μm, 100 x 4.6 mm column). Preparative HPLC was performed on an Agilent 1260 Infinity using a Nucleodur C18 Htech column from Macherey-Nagel Inc. (particles size 5 μm, 250 x 16 mm column) with a gradient of 30 min or 50% to 100% acetonitrile (0.1% TFA) / water (0.1% TFA) at 280 nm. Loading determination of functionalized resins and molar extinction coefficients were obtained on a Cary 300 spectrophotometer (Agilent technologies). Scanning was set at 600 nm / min with a step of 1 nm. ¹H NMR spectra were recorded with Brüker AM 300 (300 MHz), AM 400 (400 MHz) and AM 600 (600 MHz) instruments in CDCl₃ or CD₃OD with chemical shifts referenced to internal standards (CDCl₃: 7.26 ppm ¹H, 77.0 ppm ¹³C; CD₃OD: 4.87 or 3.13 ppm ¹H, 49.0 ppm ¹³C). Splitting patterns are indicated as s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; brs, broad singlet for ¹H-NMR data. NMR chemical shifts (δ) are reported in ppm and coupling constants (*J*) are reported in Hz. In the NMR data, H₁, H₂, H₃, H₄ H₅ and H₆ refer to the protons at the sugar unit; C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ and C₆ refer to the corresponding carbons.

10.2 Experimental section.

p-(Ethoxycarbonyloxy)benzoic acid⁹⁰ **1** :

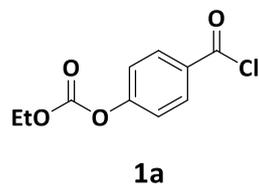


1

To a solution of sodium hydroxide (4.46 g, 161.5 mmol, 2.23 equiv.) in water (150 mL) was added 4-Hydroxybenzoic acid (10.0 g, 72.4 mmol, 1 equiv). When the benzoic acid derivative was solubilized, ethyl chloroformate (8.3 mL, 86.9 mmol, 1.2 equiv.) was slowly added and the mixture was stirring at

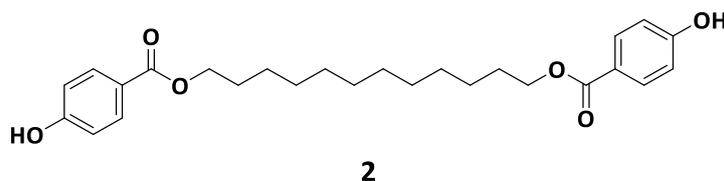
room temperature for 3 h. A solution of HCl 1M was then added and the precipitate formed was filtered and washed with HCl 1M. The precipitate was dissolved in acetone and concentrated to dryness on rotary evaporation to give *p*-(Ethoxycarbonyloxy)benzoic acid **1** (14.2 g, 93%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.07 (s, 1H; COOH), 8.10 – 7.89 (m, 2H, H ar), 7.49 – 7.24 (m, 3H), 4.28 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

p-(Ethoxycarbonyloxy)benzoyl chloride⁸⁹ **1a**:



To a solution of thionyl chloride (30 mL) and dry DCM (15 mL) was added under argon *p*-(Ethoxycarbonyloxy)benzoic acid **1** (8.28 g, 39.41 mmol, 2.7 equiv.). The mixture was heated under reflux under argon for 5 h and concentrated to dryness on rotary evaporation to get *p*-(Ethoxycarbonyloxy)benzoyl chloride **1a**. This compound was directly used in the next step without purification or characterization.

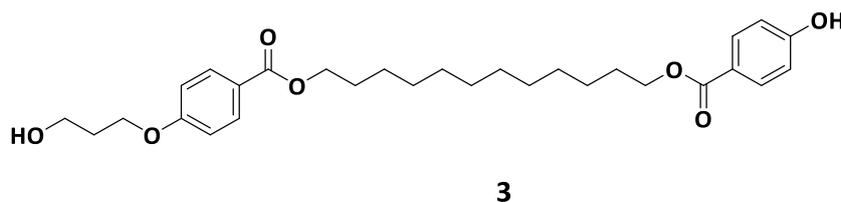
Dodecane-1,12-diyl bis(4-hydroxybenzoate)⁸⁹ **2**:



The previous residue containing **1a** (39.41 mmol, 2.7 equiv.) was taken in a dry solution of DCM / pyridine 1 / 1 v : v (60 mL) and dodecandiol (2.95 g, 14.58 mmol, 1 equiv.) was added. The mixture was heated at 80 °C for 4 h and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was taken in DCM, washed with a solution of HCl 1M (150 mL), then with a saturated solution of sodium bicarbonate (150 mL) and finally with a saturated solution of sodium chloride. The final organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated under reduced pressure. The previous crude containing the protected linker was taken in methanol (300 mL) and water (30 mL) containing sodium hydroxide (4.73 g, 118.2 mmol, 8 equiv) were added. The mixture was stirring overnight at room temperature. The resulting insoluble compound was discarded and the soluble part was neutralized with a solution of HCl 1M (130 mL). The maximum of methanol was then evaporated under reduced pressure and the deprotected linker was extracted with ether (3 x 100

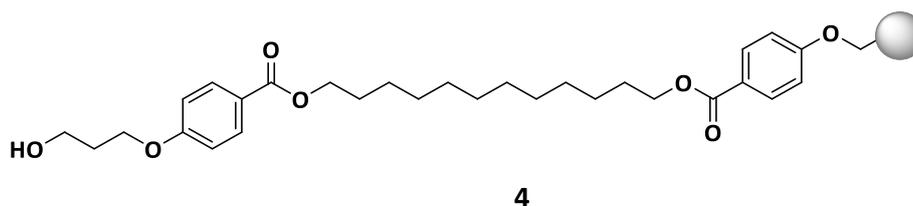
mL). The final organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated to dryness to give pure dodecane-1,12-diyl bis(4-hydroxybenzoate) **2** (4.2 g, 65%, 3 steps) as a white powder. ESI-HRMS m/z $[M+H]^+$ calculated for $C_{26}H_{35}O_6$: 443.2428, found: 443.2429. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 – 7.82 (m, 4H, H ar), 6.95 – 6.81 (m, 4H, H ar), 4.30 (t, J = 6.6 Hz, 4H, $2 \times O-CH_2$), 1.91 – 1.61 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 1.55 – 1.10 (m, 16H, $8 \times CH_2$). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 167.2 (CO ester), 160.4 (C_q ar), 132.0 (C ar), 122.8 (C_q ar), 115.4 (C ar), 65.3 ($O-CH_2$), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.2 (CH_2), 28.8 (CH_2), 26.2 (CH_2).

12-((4-hydroxybenzoyl)oxy)dodecyl 4-(3-hydroxypropoxy)benzoate **3** (Or assymmetric linker **3** attached on solid support):



To a solution of dodecane-1,12-diyl bis(4-hydroxybenzoate) **2** (1.00 g, 2.262 mmol, 1 equiv.) and cesium carbonate (737 mg, 2.262 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (30 mL) was added bromopropanol (1.2 mL, 11.31 mmol, 5 equiv.). The mixture was heated at 80 °C for 2 h then concentrated to dryness. The crude was then taken up in DCM (40 mL) and washed with water (2 x 20 mL). The organic layer was dried over sulfate magnesium, filtered off and concentrated. The crude was purified by column chromatography on silica gel using CyHex and AcOEt. After collection of fractions and evaporation of solvents 12-((4-hydroxybenzoyl)oxy)dodecyl 4-(3-hydroxypropoxy)benzoate **3** (302 mg, 27%) was obtained as a white powder. ESI-HRMS m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{29}H_{40}NaO_7$: 523.2672, found : 523.2668. 1H NMR (300 MHz, Acetone) δ 9.11 (br s, 1H, OH phenol), 8.00 – 7.93 (m, 2H, H ar), 7.93 – 7.87 (m, 2H, H ar), 7.10 – 6.99 (m, 2H, H ar), 6.98 – 6.86 (m, 1H, H ar), 4.25 (td, J = 6.6, 4.4 Hz, 4H, $2 \times CH_2OCO$), 4.19 (t, J = 6.4 Hz, 2H, $CH_2O\phi$), 3.74 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH_2OH), 2.03 – 1.94 (m, 2H, CH_2 propyl), 1.81 – 1.67 (m, 4H, $2 \times CH_2CH_2OCO$), 1.64 – 1.13 (m, 16H, $8 \times CH_2$ dodecyl). ^{13}C NMR (75 MHz, Acetone) δ 166.7 (CO ester), 166.6 (CO ester), 164.0 (C_q ar), 162.6 (C_q ar), 132.5 (C ar), 132.3 (C ar), 123.7 (C_q ar), 122.9 (C_q ar), 116.1 (C ar), 115.2 (C ar), 66.0 ($CH_2O\phi$), 65.3 (CH_2OCO), 65.1 (CH_2OCO), 59.0 (CH_2OH), 33.3 (CH_2 propyl), 30.4 (CH_2 dodecyl), 30.1 (CH_2 dodecyl), 29.7 (CH_2 dodecyl), 29.6 ($2 \times CH_2CH_2OCO$), 26.9 (CH_2 dodecyl).

Modified resin 4 using assymmetric linker 3:

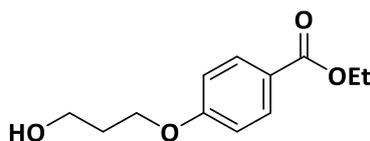


Merrifield resin chloromethylated (1.010 g, loading: 0.8 mmol / g, 0.808 mmol, 1 equiv. from TCI chemicals ref: C1746) was previously weighted in a 50 mL round bottom flask and dried overnight under P₂O₅. Dry DCM was then added and the flask was slowly shaken for 20 minutes to swell resin. A suspension containing assymmetric linker **3** (485 mg, 0.970 mmol, 1.2 equiv.) Cs₂CO₃ (395mg, 1.212 mmol, 1.5 equiv.) and TBAI (447mg, 1.212 mmol, 1.5 equiv.) in dry DMF (20 mL) was added to the swollen resin and the flask was then immersed in the bath of evaporator at 60 °C. A softly rotation was then engaged for 12 hours at 200 mBar and resin was then transferred in a solid phase synthesis syringe. The resin was washed successively with DMF/water 1/1 v:v, DMF, MeOH, DCM, MeOH, DCM (3 × 1 min each washing) and then swollen in DCM for 1 h. The resin was placed in a flask with DMF (20 mL) and CsOAc (310 mg, 1.616 mmol, 2 equiv.). The suspension was stirred overnight on a rotavap at 60 °C and 200 mbar for 12 hours. The resin was then transferred in a solid phase synthesis syringe, washed successively with DMF/water 1/1 v:v, DMF, MeOH, DCM, MeOH, DCM (3 × 1 min each washing) and the resin was finally dried under vacuum.

-Loading Determination of 4:

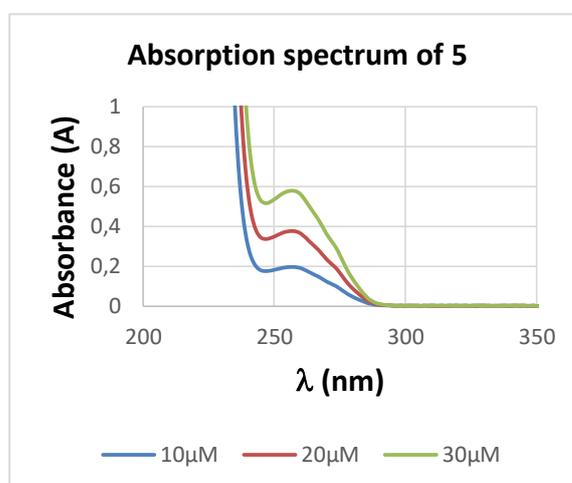
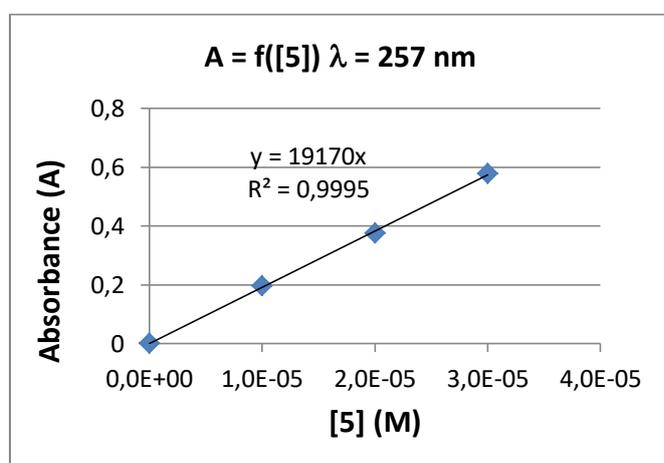
The loading was determined according to the procedure described in the litterature⁹³. Dry resin **4** (46 mg, theoretical loading: 0.583 mmol/g, 0.03696 mmol) was placed in a syringe (5 mL) equipped with a frit. DCM (2-3 mL) was added to swell the resin for 1 h. The DCM was drained and a solution of FmocCl (96 mg, 0.36 mmol, 10 equiv.) and pyridine (0.1 mL) in DCM (1 mL) was added to the resin. The reaction mixture was shaken for 6 h, the solution was drained and the resin was washed with DCM, MeOH and DCM (3 × 1 min each washing). A DBU solution (2% in DMF, v/v; 2 mL) was added and the resin was shaken for 1 h. The solution was drained in a vial. An aliquot of this solution (160 µL) was diluted with acetonitrile to a total volume of 10 mL and the UV absorption of this solution was measured at 294 and 304 nm. The loading of the resin was calculated as an average of the values resulting from the formulas : $\text{Absorption}_{304 \text{ nm}} \times 16.4 / \text{mass of resin used in mg}$ (for 304 nm) and $\text{Absorption}_{294 \text{ nm}} \times 14.2 / \text{mass of resin used in mg}$ (for 294 nm). Loading of **4** found: 0.274 mmol/g.

Ethyl 4-(3-Hydroxypropyloxy)benzoate **5**^{96, 97}:

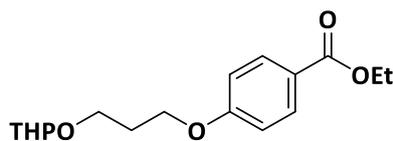


5

A solution of ethyl 4-hydroxy-benzoate (10.0 g, 60.24 mmol, 1 equiv.), 3-chloro-1-propanol (5.04 mL, 60.24 mmol, 1 equiv.) and anhydrous potassium carbonate (12.5 g, 90.36 mmol, 1.5 equiv.) in methyl ethyl keton (75 mL) was refluxed for 2 days. The mixture was cooled down at room temperature then water was added (75 mL). The mixture was extracted with DCM (2 x 50mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (Cyhex 100% then CyHex/AcOEt 70 : 30) to give ethyl 4-(3-Hydroxypropyloxy)benzoate **5** (7.2 g, 53%) as a white solid. ESI-HRMS m/z $[M+H]^+$ calculated for $C_{12}H_{17}O_4$: 225.1121, found: 225.1122. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.08 – 7.88 (m, 2H, H ar), 7.00 – 6.80 (m, 2H, H ar), 4.33 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2 ethyl), 4.16 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH_2 , CH_2 -O- ϕ), 3.86 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH_2 -OH), 2.19 – 1.95 (m, 2H, CH_2 propyl), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3 Ethyl). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.5 (CO ester), 162.6 (C_q ar), 131.7 (C ar), 123.1 (C_q ar), 114.3 (C ar), 65.6 (CH_2 -O-), 60.8 (CH_2 ethyl), 60.1 (CH_2 -OH), 32.0 (CH_2 propyl), 14.5 (CH_3 ethyl). The molar extinction coefficient ϵ was determined using the Beer-Lambert law. The absorbance A of different Ethyl 4-(3-Hydroxypropyloxy)benzoate **5** was measured at the maximum absorption wavelength (257 nm). The line $A = f([5])$ was then plotted and the slope provides the value of the molar extinction coefficient ϵ expressed in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. ϵ (257 nm) found : $1.9 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ in H_2O/CH_3CN 1/1 v:v.



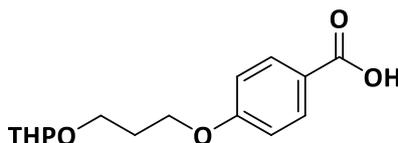
Ethyl 4-(3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoate 6:



6

To a solution of Ethyl 4-(3-Hydroxypropoxy)benzoate **5** (3.15 g, 14.04 mmol, 1 equiv.) and 3,4-Dihydro-2H-pyran (3.9 mL, 42.13 mmol, 3 equiv) in freshly distilled DCM (35mL) was added CSA (326mg, 1.40 mmol, 0.1 equiv.) under argon. The reaction was stirred for 3 hours at room temperature under argon then CSA was neutralized with N(Et)₃ (390 μl, 2.80 mmol, 0.2 equiv.). The solution was diluted with DCM then washed with water and a saturated solution of sodium bicarbonate. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated under vacuum. The residue obtained was purified by column chromatography on silica gel (Cyhex 100% then CyHex/AcOEt 95 : 5) to give pure ethyl 4-(3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoate **6** (3.63 g, 84%) as a clear white oil. *R*_f: 0.18 (CyHex/AcOEt 95 : 5). APCI-HRMS *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₂₅O₅: 309.1697, found: 309.1696. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.07 – 7.91 (m, 2H, H ar), 6.99 – 6.85 (m, 2H, H ar), 4.59 (t, *J* = 3.4 Hz, 1H, CH₂ THP), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂ ethyl), 4.13 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-O-φ), 3.93 (dt, *J* = 9.8, 6.1 Hz, 1H, CH₂H_b-OTHP), 3.88 – 3.78 (m, 1H, CH₂H_b THP), 3.57 (dt, *J* = 9.8, 6.1 Hz, 1H, CHaH_b-OTHP), 3.53 – 3.43 (m, 1H, CHaH_b THP), 2.09 (p, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂ propyl), 1.91 – 1.44 (m, 6H, 3 × CH₂ THP), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃ ethyl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.5 (CO ester), 162.9 (C_q ar), 131.6 (C ar), 122.9 (C_q ar), 114.2 (C ar), 99.1 (CH THP), 65.3 (CH₂-O-φ), 64.0 (CH₂ THP or CH₂-OTHP), 62.5 (CH₂ THP or CH₂-OTHP), 60.7 (CH₂ ethyl), 30.8 (CH₂ propyl), 29.7 (CH₂ THP), 25.6 (CH₂ THP), 19.7 (CH₂ THP), 14.5 (CH₃ ethyl).

4-(3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoic acid 7:

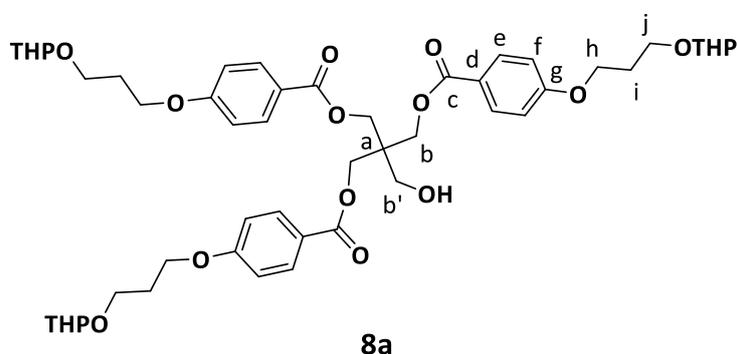


7

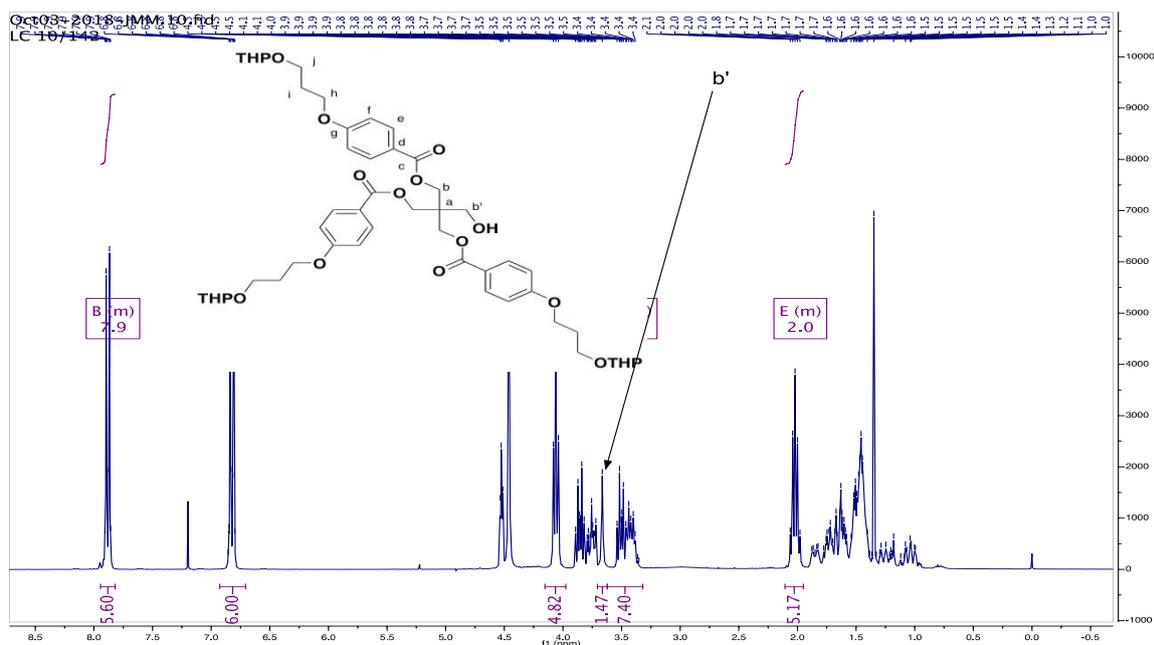
To a solution of ethyl 4-(3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoate **6** (1.34 g, 4.344 mmol, 1 equiv.) in a mixture of H₂O / EtOH 1 : 1 (20 mL) was added sodium hydroxide (868 mg, 21.42 mmol, 5 equiv.). The reaction was heated at 60 °C for 5 hours then the pH was adjusted around 6-7 with an

aqueous solution of HCl 1M. EtOH was removed under vacuum and the resulting solution was extracted with DCM (5 × 20 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated to furnish pure 4-(3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoic acid **7** (924 mg, 76%) as a white solide. ESI-HRMS m/z $[M-H]^-$ calculated for $C_{15}H_{19}O_5$: 279.1238, found: 279.1240. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.05 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H ar), 6.94 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H ar), 4.61 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H, CH THP), 4.16 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, $CH_2-O-\phi$), 3.94 (dt, $J = 9.9, 6.1$ Hz, 1H, CH_2H_b -OTHP), 3.90 – 3.79 (m, 1H, CH_aH_b THP), 3.59 (dt, $J = 9.9, 6.1$ Hz, 1H, $CHaH_b$ -OTHP), 3.55 – 3.46 (m, 1H, $CHaH_b$ THP), 2.22 – 2.04 (m, 2H, CH_2 propyl), 1.93 – 1.67 (m, 2H, CH_2 THP), 1.67 – 1.46 (m, 4H, 2 × CH_2 THP). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 171.7 (COOH), 163.7 (C_q ar), 132.5 (C ar), 121.7 (C_q ar), 114.4 (C ar), 99.1 (CH THP), 65.4 ($CH_2-O-\phi$), 63.9 (CH_2 THP or CH_2-OTHP), 62.6 (CH_2 THP or CH_2-OTHP), 30.8 (CH_2 propyl), 29.7 (CH_2 THP), 25.6 CH_2 THP), 19.7 (CH_2 THP).

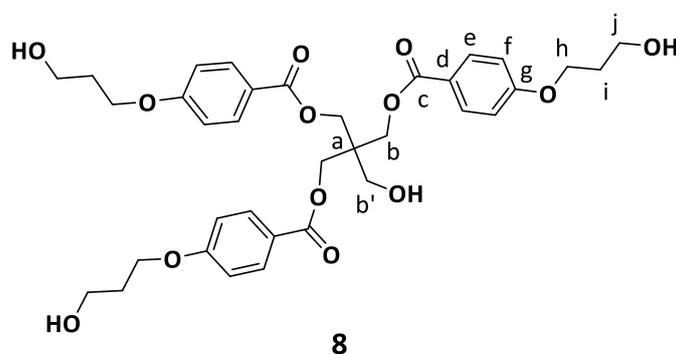
Synthesis of compound **8a**:



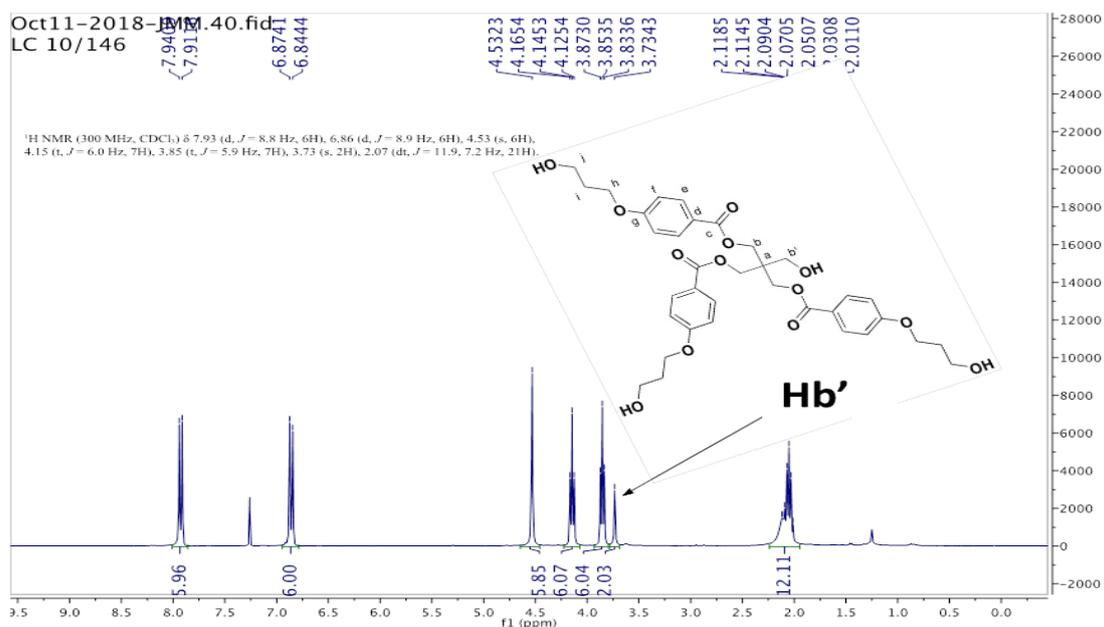
To a solution of 4-(3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoic acid **7** (924 mg, 3.30 mmol, 6 equiv.) and DCC (681 mg, 3.30 mmol, 6 equiv.) in dry DCM (5 mL) was added pentaerythritol (75 mg, 0.55 mmol, 1equiv.) previously solubilized in hot DMF. The mixture was stirred overnight at room temperature and the precipitate was filtered off. The filtrate was concentrated and the residue was then purified by column chromatography under silica gel (CyHex/AcOEt 60 : 40) to give compound **8a** as a transparent oil (160 mg, 32%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.95 – 7.81 (m, 6H, H ar), 6.92 – 6.73 (m, 6H, Har), 4.52 (t, $J = 3.4$ Hz, 3H, CH THP), 4.46 (s, 6H, H_b), 4.06 (t, $J = 6.3$ Hz, 6H, H_h), 3.86 (dt, $J = 9.9, 6.1$ Hz, 3H, H_j), 3.76 (ddd, $J = 11.0, 7.7, 3.3$ Hz, 3H, 3 × CH_aH_b THP), 3.66 (s, 2H, $H_{b'}$), 3.50 (dt, $J = 9.9, 6.1$ Hz, 3H, H_j), 3.40 (ddt, $J = 14.7, 9.9, 4.5$ Hz, 3H, 3 × $CHaH_b$ THP), 2.11 – 1.95 (m, 6H, H_i), 1.93 – 0.89 (m, 18H, 9 × CH_2 THP).



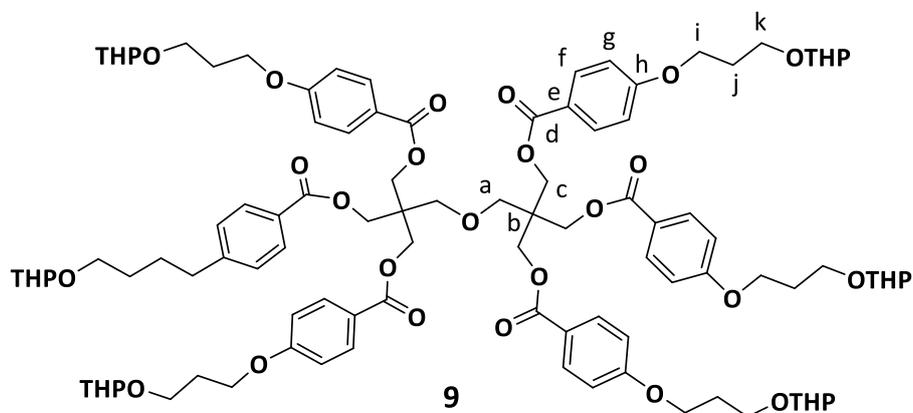
Synthesis of compound 8:



To a solution of protected compound **8a** (122 mg) in a mixture of DCM / MeOH 1: 1 v:v (2 mL) was added *p*-toluene sulfonic acid monohydrate (8 mg). The mixture was stirred overnight, neutralized with triethylamine (6 μ l) and finally concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt 100%) to give compound **8** (47mg). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.93 (d, J = 8.8 Hz, 6H, H ar), 6.86 (d, J = 8.9 Hz, 6H, H ar), 4.53 (s, 6H, H_b), 4.15 (t, J = 6.0 Hz, 6H, H_h), 3.85 (t, J = 5.9 Hz, 6H, H_j), 3.73 (s, 2H, $\text{H}_{b'}$), 2.21 – 1.95 (m, 10H, H_i , 4 \times OH).



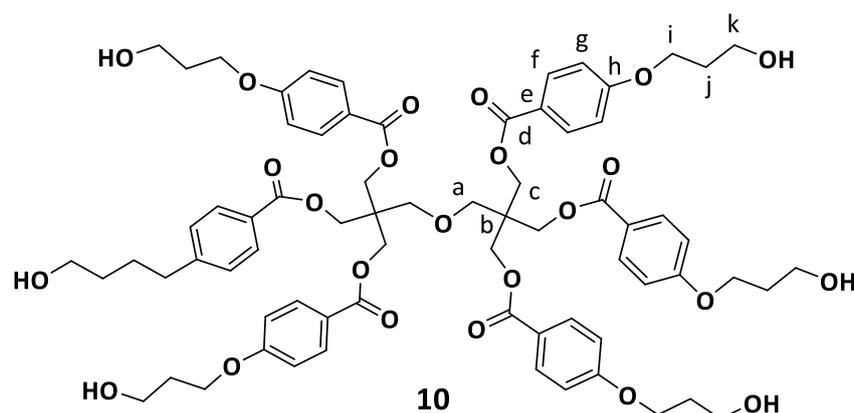
Synthesis of compound **9**:



A solution containing 4-(3-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoic acid **7** (1.525 g, 5.446 mmol, 12 equiv), EDC HCl (870 mg, 4.539 mmol, 10 equiv.) and DMAP (554 mg, 4.539 mmol, 10 equiv.) in dry DMF (10 mL) was firstly prepared. This solution was stirred and heated (40°C) until solubilization of compounds. A second solution containing dipentaerythritol (115 mg, 0.4539 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (10 mL) was meantime prepared and heated until solubilization. Once solubilized the second solution was cool down at room temperature and added to the solution of activated acid. The final solution was stirred overnight at 50°C under argon then concentrated. H₂O (20 mL) was added to the residue and the mixture was extracted with DCM (5 x 10 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex / AcOEt 60 : 40) to give pure compound **9** as a beige solid (574 mg, 70%). *R*_f: 0.15 (CyHex / AcOEt 60 : 40). ESI-HRMS *m/z* [M+NH₄]⁺ calculated for

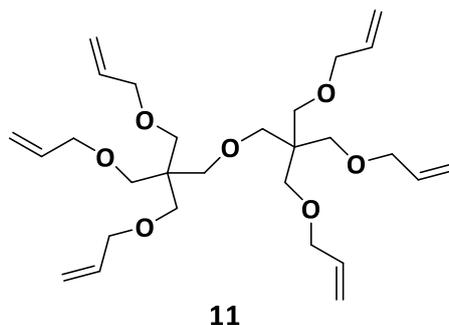
$C_{100}H_{134}NO_{31}$: 1844.8934, found: 1844.8927. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.93 – 7.81 (m, 12H, H_f), 6.92 – 6.71 (m, 12H, H_g), 4.64 – 4.56 (m, 6H, CH_2 THP), 4.52 (s, 12H, H_c), 4.09 (t, $J = 6.4$ Hz, 12H, H_i), 3.92 (dt, $J = 9.8, 6.1$ Hz, 6H, H_k'), 3.82 (ddd, $J = 11.1, 7.8, 3.4$ Hz, 6H, 6 \times CH_2H_2 THP), 3.71 (s, 4H, H_a), 3.56 (dt, $J = 10.1, 6.2$ Hz, 6H, H_k''), 3.52 – 3.44 (m, 6H, 6 \times CH_2H_2 THP), 2.13 – 2.02 (m, 12H, H_j), 1.87 – 1.64 (m, 12H, 6 \times CH_2 THP), 1.64 – 1.44 (m, 24H, 12 \times CH_2 THP). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.8 (C_d), 163.0 (C_e), 131.7 (C_f), 122.0 (C_h), 114.3 (C_g), 99.1 (CH THP), 70.6 (C_a), 65.3 (C_i), 63.9 (C_k or CH_2H_2 THP), 63.3 (C_c), 62.4 (C_k or CH_2H_2 THP), 44.0 (C_b), 30.8 (6 \times CH_2 THP), 29.6 (C_j), 25.6 (6 \times CH_2 THP), 19.7 (6 \times CH_2 THP).

Synthesis of compound 10:



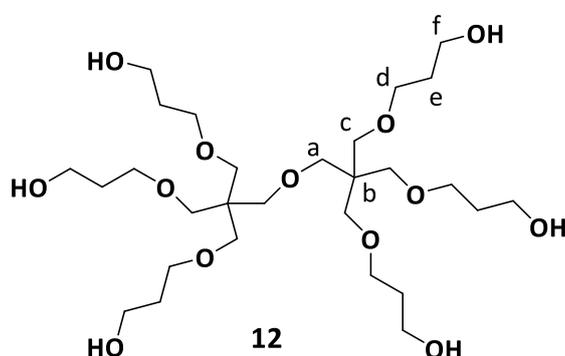
To a solution of compound **9** (574 mg, 0.3143 mmol, 1 equiv.) in a mixture of DCM / MeOH 1 : 1 (10 mL) was added APTS (30 mg, 0.1572 mmol, 0.5 equiv.). The reaction was stirred at room temperature for 3 hours. The solvents were evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM / MeOH 90 : 10) to give pure compound **10** as a clear white oil (334mg, 80%). R_f : 0.35 (DCM / MeOH 90:10). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 12H, H_f), 6.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 12H, H_g), 4.51 (s, 12H, H_c), 4.10 (t, $J = 6.0$ Hz, 12H, H_i), 3.85 (t, $J = 5.8$ Hz, 12H, H_k), 3.71 (s, 4H, H_a), 2.13 (br s, 6H, OH), 2.09 – 1.98 (m, 12H, H_j). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.8 (C_d), 162.8 (C_e), 131.8 (C_f), 122.2 (C_h), 114.2 (C_g), 70.5 (C_a), 65.6 (C_i), 63.6 (C_c), 59.9 (C_k), 44.0 (C_b), 32.0 (C_j).

Synthesis of compound **11**¹⁰²:



To a solution of dipentaerythritol (2.00 g, 7.87 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (30 mL) was slowly added at 0°C sodium hydride 60% dispersion in mineral oil (3.15 g, 78.7 mmol, 10 equiv.). After addition of sodium hydride the solution was stirred at 0°C for 20 minutes. It was followed by the slowly addition of allyl bromide (8.2 mL, 94.4 mmol, 12 equiv.) at 0°C. The reaction was cooled down at room temperature and stirred for 5 hours. The reaction mixture was then quenched with methanol and solvents were evaporated. The residue was dissolved in AcOEt (50 mL) and washed with water (2 x 25 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated under reduced pressure. The residue was then per allylated dipentaerythritol **11** as a colorless oil (2.91 g, 75%). The compound was analyzed by NMR and the resulting spectrum was in accordance with the literature¹⁰². ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.87 (ddt, *J* = 17.2, 10.5, 5.3 Hz, 6H), 5.31 – 5.02 (m, 12H), 3.93 (dt, *J* = 5.3, 1.5 Hz, 12H), 3.43 (s, 12H), 3.39 (s, 4H).

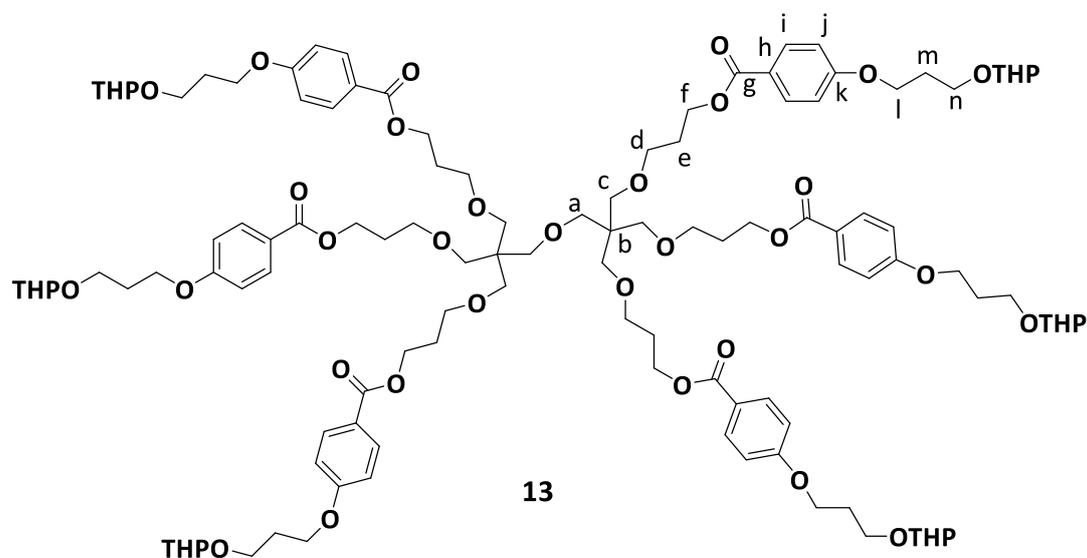
Synthesis of compound **12**:



Per allylated dipentaerythritol **11** was hydroborated according to the procedure described in literature⁹⁹. Briefly, per allylated dipentaerythritol **11** (2.89 g, 5.843 mmol, 1 equiv.) was dissolved in commercial THF containing 9-BBN (0.5M) (140 mL, 70.1 mmol, 2 eq / All). The solution was heated under reflux for 2 hours under argon. Then, the solution was cooled at 0 °C and the excess of 9-BBN

was quenched with cooled water (45 mL). Then, sodium hydroxide 3M (150 mL) and hydrogen peroxide 35% wt (150 mL) were added carefully at 0°C. The mixture was stirred from 0°C to room temperature overnight and K₂CO₃ was added until saturation. The top layer was then discarded and the saturated layer of K₂CO₃ was extracted with THF (3 × 100 mL). The resulting organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated. The crude was purified by column chromatography on silica gel (DCM / MeOH 90:10) to get compound **12** (2.22 g, 63%) as a colorless oil. *R*_f: 0.15 (CyHex/AcOEt 60 : 40). ESI-HRMS *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₂₈H₅₈NaO₁₃ : 625.3770, found: 625.3768. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.70 (t, *J* = 5.5 Hz, 12H, H_f), 3.54 (t, *J* = 5.6 Hz, 12H, H_d), 3.36 (s, 12H, H_c), 3.32 (s, 4H, H_a), 3.23 (br s, 6H, OH), 1.84 – 1.71 (m, 12H, H_e). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 70.9 (C_c), 70.8 (C_a), 70.3 (C_d), 61.2 (C_f), 45.2 (C_b), 31.9 (C_e).

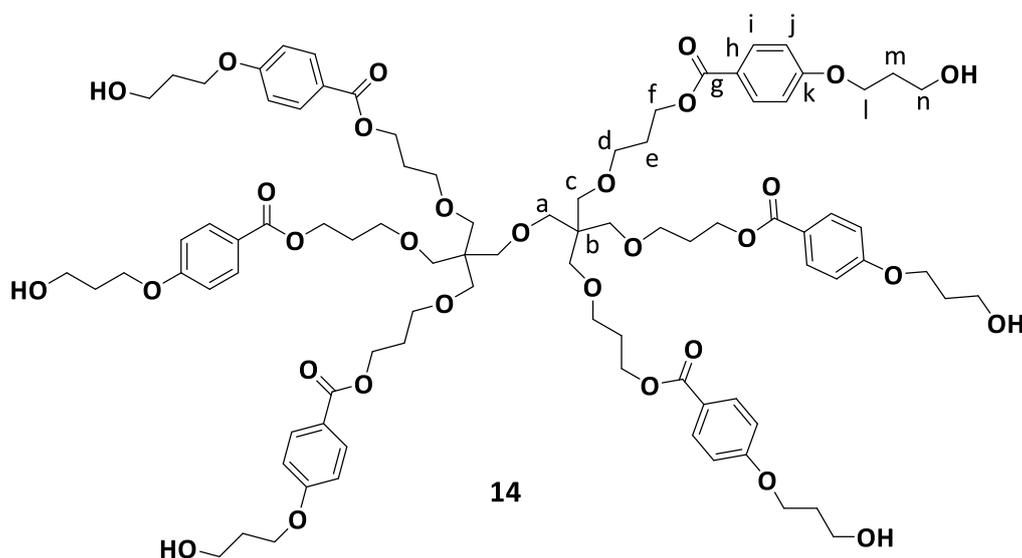
Synthesis of compound 13:



A solution containing 4-(3-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)propoxy)benzoic acid **7** (541 mg, 1.934 mmol, 12 equiv), EDC HCl (309 mg, 1.611 mmol, 10 equiv.) and DMAP (197 mg, 1.611 mmol, 10 equiv.) in dry DMF (3 mL) was firstly prepared. This solution was stirred and heated (40 °C) until solubilization of compounds. A second solution containing modified dipentaerythrytol **12** (115 mg, 0.4539 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (1 mL) was meantime prepared and heated until solubilization. Once solubilized the second solution was cool down at room temperature and added to the solution of activated acid. The final solution was stirred overnight at 50 °C under argon then concentrated. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex/AcOEt 60:40) to get **13** as clear white oil (310 mg, 88%). *R*_f: 0.45 (CyHex/AcOEt 60 : 40). APCI-HRMS *m/z* [M+NH₄]⁺ calculated for C₁₁₈H₁₇₀NO₃₇ : 2193.1446, found: 2193.1428. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.01 – 7.87 (m, 12H, H_i), 6.97 – 6.81 (m, 12H, H_j), 4.65 – 4.55 (m, 6H, CH THP), 4.31 (t, *J* = 6.5 Hz, 12H, H_f), 4.10 (t,

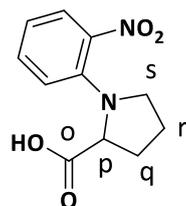
$J = 6.3$ Hz, 12H, H_i), 3.91 (dt, $J = 9.9, 6.2$ Hz, 6H, H_n), 3.82 (ddd, $J = 11.1, 7.8, 3.4$ Hz, 6H, CH THP), 3.56 (dt, $J = 9.9, 6.2$ Hz, 6H, H_n), 3.52 – 3.43 (m, 18H, 6 × CH THP, H_d), 3.38 (s, 12H, H_c), 3.34 (s, 4H, H_a), 2.17 – 2.00 (m, 12H, H_m), 2.02 – 1.87 (m, 12H, H_e), 1.88 – 1.62 (m, 22H), 1.62 – 1.44 (m, 24H, 12 × CH_2 THP). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.4 (C_g), 162.9 (C_h or C_k), 131.6 (C_i), 122.8 (C_h or C_k), 114.2 (C_j), 99.1 (CH THP), 70.4 (C_a), 70.0 (C_c), 68.0 (H_d), 65.2 (C_i), 63.9 (C_n), 62.5 (CH THP), 62.2 (H_f), 45.8 (C_b), 30.8 (CH THP), 29.7 (C_m), 29.3 (C_e), 25.6 (CH THP), 19.7 (CH THP).

Synthesis of compound 14:



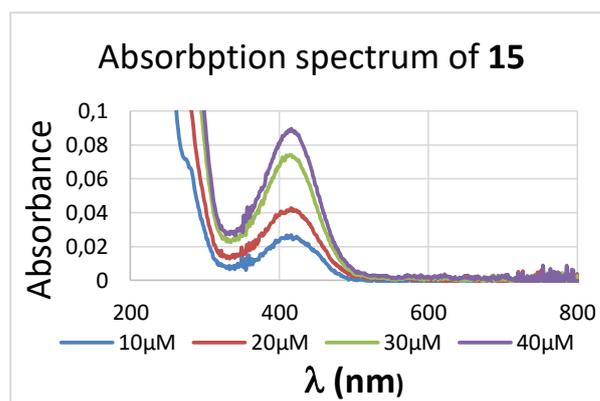
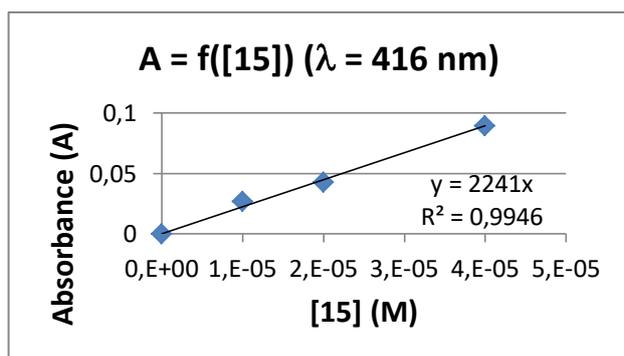
To a solution of protected compound **13** (238 mg, 0.1094 mmol, 1 equiv.) in a mixture of DCM / MeOH 1 : 1 (10 mL) was added APTS (10 mg, 0.0547 mmol, 0.5 equiv.). The reaction was stirred at room temperature for 3 hours. The solvents were evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM / MeOH 90:10) to give pure compound **14** as a beige solid (150mg, 82%). Rf: 0.39 (DCM / MeOH 90 : 10). ESI-HRMS m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{88}H_{118}NaO_{31}$: 1693.7549, found: 1693.7547. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 12H, H_i), 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 12H, H_j), 4.31 (t, $J = 6.3$ Hz, 12H, H_f), 4.12 (t, $J = 6.0$ Hz, 12H, H_i), 3.85 (t, $J = 5.8$ Hz, 12H, H_n), 3.49 (t, $J = 5.9$ Hz, 12H, H_d), 3.39 (s, 12H, H_c), 3.35 (s, 4H, H_a), 2.16 – 1.99 (m, 12H, H_m or H_e), 1.99 – 1.87 (m, 12H, H_m or H_e). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.5 (C_g), 162.8 (C_h or C_k), 132.7 (C_i), 123.0 (C_h or C_k), 114.2 (C_j), 70.3 (C_a), 70.0 (C_c), 67.9 (C_d), 65.5 (C_i), 62.2 (C_f), 59.8 (C_n), 45.8 (C_b), 32.0 (C_m or C_e), 29.24 (C_m or C_e).

N-(2-Nitrophenyl)proline 15:

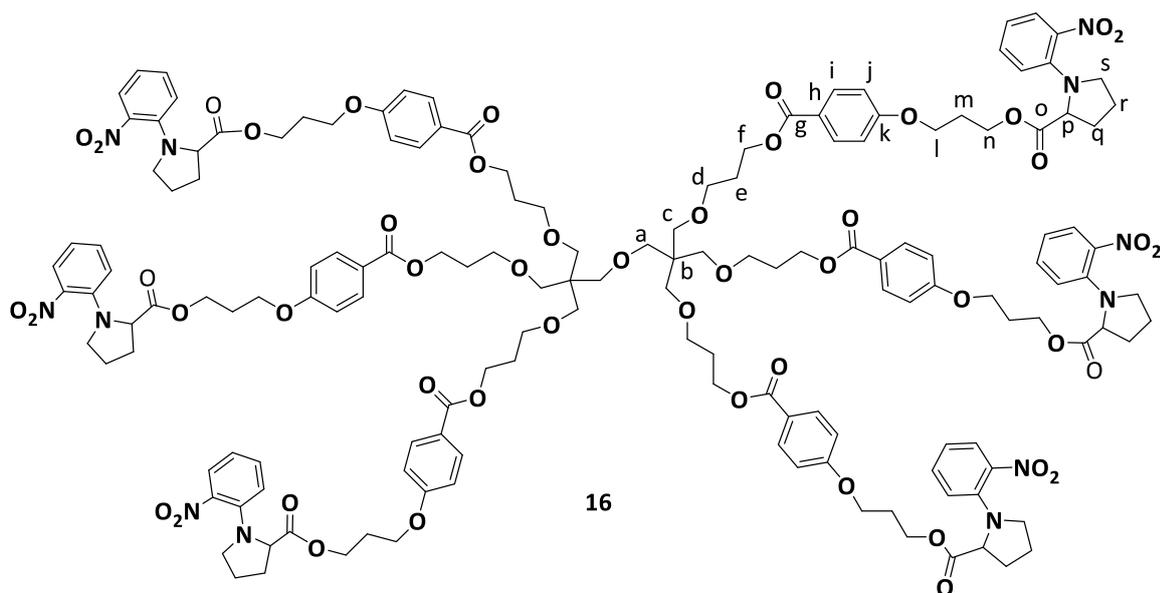


15

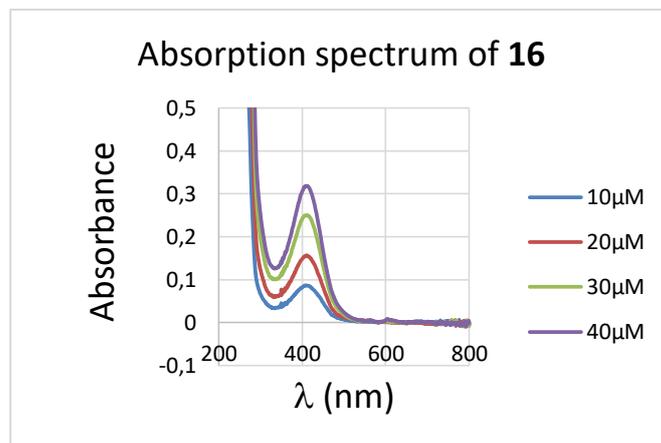
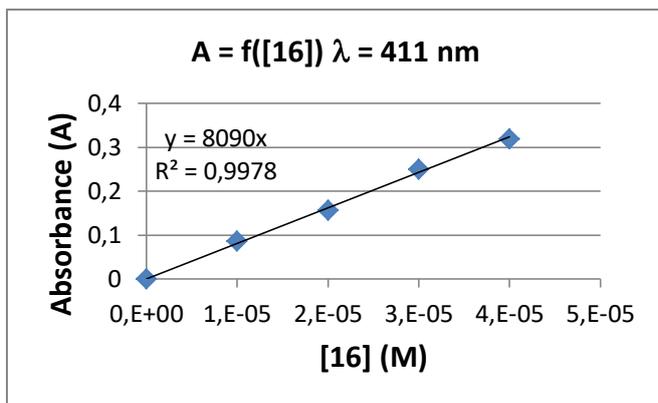
Compound 15 was prepared according to a procedure described in the literature¹⁰³. Briefly, L-Proline (1.05 g, 9.0 mmol, 1 equiv.) was dissolved in a mixture of H₂O / EtOH 1:1 v/v. Then NaHCO₃ (1.90 g, 22.5 mmol, 2.5 equiv.) and 1-fluoro-2-nitrobenzene (0.96 mL, 9.0 mmol, 1 equiv.) were added and the resulting mixture was refluxed for 5 h. The solution was cooled down at room temperature and EtOH was removed by evaporation under vacuum. The remaining solution was acidified (pH \approx 2-3) with an aqueous solution HCl 1M and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered off and concentrated under vacuum. The obtained crude was purified by flash chromatography on silica gel (DCM / EtOH / AcOH 98 : 2 : 0.025) to give pure (S)-N-(2-nitrophenyl)proline (634 mg, 30%) as a red syrup. APCI-HRMS m/z [M+H]⁺ calculated for C₁₁H₁₃N₂O₄: 237.0870, found: 237.0869. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H, H_{ar}), 7.44 – 7.32 (m, 1H, H_{ar}), 6.93 – 6.79 (m, 2H, H_{ar}), 4.42 (t, J = 7.1 Hz, 1H, H_p), 3.61 – 3.46 (m, 1H_{s'}), 3.14 – 2.98 (m, 1H, H_{s''}), 2.56 – 2.39 (m, 1H, H_{q'}), 2.23 – 2.01 (m, 2H, H_{q''}, H_{r'}), 2.01 – 1.84 (m, 1H, H_{r''}). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 178.1 (C_o), 141.4 (C_q ar), 139.0 (C_q ar), 133.3 (C ar), 126.7 (C ar), 118.2 (C ar), 117.0 (C ar), 61.8 (C_p), 51.9 (C_s), 31.0 (C_q), 24.9 (C_r). The molar extinction coefficient ϵ was determined using the Beer-Lambert law. The absorbance A of different concentrations of N-(2-Nitrophenyl)proline 15 was measured at the maximum absorption wavelength (416 nm). The line A = f([15]) was then plotted and the slope provides the value of the molar extinction coefficient ϵ expressed in M⁻¹.cm⁻¹. ϵ (416 nm) found: 2.3 10³ M⁻¹.cm⁻¹ in DCM/MeOH 1 : 1 v/v.



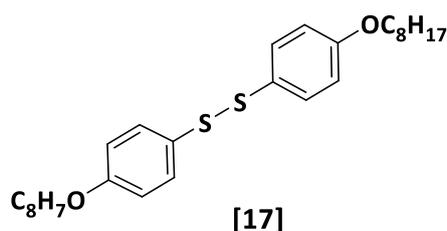
Synthesis of yellow tracer **16**:



A solution of EDC HCL (35 mg, 180 μ mol, 10 equiv.) and DMAP (22 mg, 180 μ mol, 10 equiv.) in dry DMF (500 μ L) was previously heated until solubilization of compounds. Then the resulting solution was added to a solution of compound **14** (30 mg, 18 μ mol, 1 equiv.) and (S)-N-(2-nitrophenyl)proline **15** (51 mg, 215 μ mol, 12 equiv.) in dry DMF (500 μ L). The reaction was heated overnight at 50 $^{\circ}$ C under argon and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex / AcOEt 50 : 50) to give pure yellow tracer **16** (20 mg, 37%). ESI-HRMS m/z $[M+H]^{2+}$ calculated for $C_{154}H_{179}N_{12}O_{49}$: 1490.0936, found: 1490.0945. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98 – 7.87 (m, 12H, H_i), 7.62 (dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 6H, H ar), 7.31 – 7.18 (m, 6H, H ar), 6.85 – 6.74 (m, 18H, H_j , Har), 6.69 (ddd, $J = 8.2, 7.2, 1.1$ Hz, 6H, H ar), 4.44 – 4.37 (m, 6H, H_p), 4.32 (t, $J = 6.5$ Hz, 12H, H_f), 4.29 – 4.17 (m, 12H, H_n), 3.97 – 3.79 (m, 12H, H_l), 3.56 – 3.44 (m, 18H, H_d , H_s), 3.40 (s, 12H, H_c), 3.36 (s, 4H, H_a), 3.17 – 3.08 (m, 6H, $H_{5''}$), 2.48 – 2.35 (m, 6H, H_q), 2.14 – 1.85 (m, 42H, H_e , H_m , $H_{q'}$, H_r). The molar extinction coefficient ϵ was determined using the Beer-Lambert law. The absorbance A of different concentrations of yellow tracer **16** was measured at the maximum absorption wavelength (411 nm). The line $A = f([\mathbf{16}])$ was then plotted and the slope provides the value of the molar extinction coefficient ϵ expressed in $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. ϵ (411 nm) found: $8 \cdot 10^3 M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

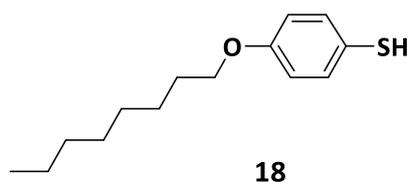


Bis(4-octyloxyphenyl) Disulfide [17]:



To a solution of Bis(4-hydroxyphenyl) Disulfide (5.0, g, 19.97 mmol, 1 equiv.) and octyl bromide (10.3 mL, 59.91 mmol, 3 equiv.) in dry DMF was added portionwise sodium hydride 60% (1.76g, 43.93 mmol, 2.2 equiv.). The mixture was heated at 80 °C for 2 hours under argon then sodium hydride was quenched with MeOH (50mL). The solvents were evaporated and the crude was diluted with AcOEt (100mL). The solution was washed with H₂O (2 × 50mL) and brine (1 × 50mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate and filtered off. The solvent was removed by using a rotary evaporator then the obtained residue **[17]** was dried overnight under P₂O₅ and used without any purifications or characterizations.

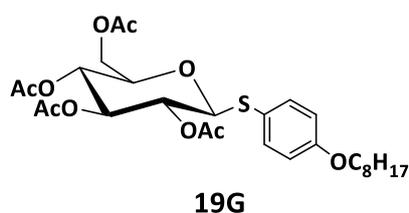
p-Octyloxybenzenethiol **18** :



The previous crude containing **[17]** was dissolved under argon in a mixture of DCM (60 mL) and AcOH (120 mL) then zinc powder (32g, 500 mmol, 25 equiv.) previously activated by washing with HCl 10%, H₂O, EtOH and Et₂O was added. The mixture was heated at 60 °C for 1 hour and filtrated on Celite. The filtrate was evaporated and the obtained residue was purified by column chromatography

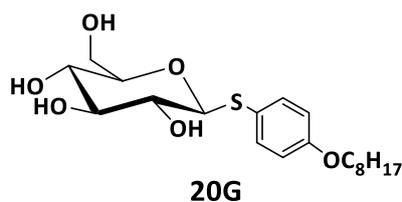
on silica gel (CyHex 100%) to get *p*-Octyloxybenzenethiol **18** (9.1g, 96%) as a pale yellow oil. APCI-HRMS m/z $[M]^+$ calculated for $C_{14}H_{22}OS$: 238.1391, found: 238.1386. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.28 (dd, $J = 6.9, 1.6$ Hz, 2H, Har), 6.92 – 6.75 (m, 2H, Har), 3.94 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH_2), 3.37 (s, 1H, SH), 1.79 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.56 – 1.22 (m, 10H, $5 \times CH_2$), 1.03 – 0.82 (m, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.1 (C_q ar), 132.5 (C ar), 119.5 (C_q ar), 115.3 (C ar), 68.1 (OCH_2), 31.9 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.3(CH_2), 29.3 (CH_2), 26.1 (CH_2), 22.7 (CH_2), 14.2 (CH_3).

p-octyloxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **19G**¹⁰⁸:



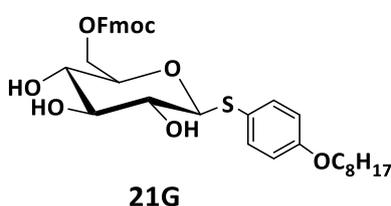
To a solution of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (9.61 g, 24.64 mmol, 1 equiv.) and *p*-octyloxybenzenethiol **18** (8.50 g, 36.96 mmol, 1.5 equiv.) in dry DCM (25 mL) at 0°C was added boron trifluoride etherate (15.5 mL, 123 mmol, 5 equiv.). The mixture was stirred for 1h30 at room temperature, diluted with DCM (75mL), washed with water (1× 50 mL) and a saturated solution of sodium bicarbonate (2 × 50 mL).The organic layer was dried over magnesium sulfate,filtered off and concentrated under vacuum.The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 80:20) to get *p*-octyloxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **19G** (11.90 g, 85%) as a white solid. R_f : 0.47 (CyHex/AcOEt 70: 30).ESI-HRMS m/z $[M+NH_4]^+$ calculated for $C_{28}H_{44}NO_{10}S$: 586.2680, found: 586.2683. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.52 – 7.36 (m, 2H, H ar thioaryl), 6.91 – 6.72 (m, 2H, H ar thioaryl), 5.19 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H_3), 4.98 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H_4), 4.88 (dd, $J = 9.9, 9.3$ Hz, 1H, H_2), 4.54 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H_1), 4.22 – 4.14 (m, 2H, H_6), 3.94 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH_2), 3.66 (ddd, $J = 10.0, 4.2, 3.2$ Hz, 1H, H_5), 2.09 (s, 3H, CH_3 Ac), 2.07 (s, 3H, CH_3 Ac), 2.00 (s, 3H, CH_3 Ac), 1.97 (s, 3H, CH_3 Ac), 1.77 (dt, $J = 14.5, 6.6$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 1.51 – 1.21 (m, 10H, $5 \times CH_2$), 0.93 – 0.83 (m, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.7 (CO Ac), 170.3 (CO Ac), 169.5 (CO Ac), 169.3 (CO Ac), 160.2 (C_q ar), 136.6 (Car), 120.7 (C_q ar), 115.0 (Car), 85.9 (C_1), 75.9 (C_5), 74.2 (C_3), 70.0 (C_2), 68.3 (C_4), 68.3 (OCH_2), 62.2 (C_6), 31.9 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.3 (CH_2), 26.2 (CH_2), 22.8 (CH_2), 20.9 (CH_3 Ac), 20.9 (CH_3 Ac), 20.7 (CH_3 Ac), 20.7 (CH_3 Ac), 14.2 (CH_3).

p-octyloxyphenyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **20G** :



To a solution of *p*-octyloxyphenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **19G** (11.85 g, 20.86 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (230 mL) at 0°C was added carefully sodium (108 mg, 4.68 mmol, 0.2 equiv.). The mixture was let at 0°C until stopping the release of dihydrogene. The reaction was stirred at room temperature overnight then neutralized by Amberlyte IR 120 H⁺ resin. The resin was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum to get after drying pure *p*-Octyloxyphenyl-1-thio- α -D-glucopyranoside **20G** as a white solid (7.91 g, 95%). ESI-HRMS *m/z* [M+NH₄]⁺ calculated for C₂₀H₃₆NO₆S: 418.2258, found: 418.2258. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.41 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, H ar thioaryl), 6.75 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, thioaryl), 4.51 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H₁), 3.83 (br s, 4H, OCH₂, H₆), 3.59 (br s, 2H, H₃, H₄), 3.47 – 3.36 (m, 1H, H₂), 3.32 (br s, 1H, H₅), 1.81 – 1.66 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.49 – 1.22 (m, 10H, 5 \times CH₂), 0.95 – 0.81 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.7 (C_q ar), 135.5 (C ar), 122.3 (C_q ar), 115.3 (C ar), 89.1 (C₁), 79.5 (C₅), 78.0 (C₃ or C₄), 72.4 (C₂), 69.6 (C₃ or C₄), 68.3 (OCH₂), 61.9 (C₆), 32.0 (CH₂), 29.6 (OCH₂CH₂), 29.4 (2 \times CH₂), 26.2 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).

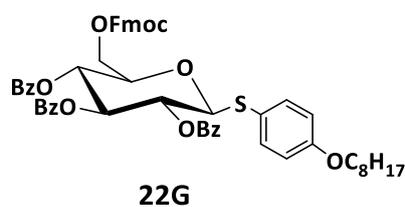
p-octyloxyphenyl-6-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **21G** :



To a solution of *p*-octyloxyphenyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **20G** (4.82 g, 12.04 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (40 mL) was added 2,4,6-collidine (7.9 mL, 60.2 mmol, 5 equiv.). The mixture was heated slightly to promote the solubilization of reagents then Fmoc-Cl (4.65 g, 18.06 mmol, 1.5 equiv.) was added. The reaction was stirred 2 hours at room temperature then diluted with DCM, washed with a solution of HCl 1M, a saturated solution of sodium bicarbonate and brine. The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated *under vacuum*. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 20:80) to get *p*-octyloxyphenyl-

6-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **21G** (5.03 g, 66%) as a white foam. R_f : 0.35 (AcOEt 100%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.62 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H ar Fmoc), 7.49 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H ar Fmoc), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H ar thioaryl), 7.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H ar Fmoc), 7.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H ar Fmoc), 6.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H ar thioaryl), 4.57 – 4.18 (m, 5H, H_1 , H_6 , CH_2 Fmoc), 4.12 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3.65 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, OCH_2), 3.60 – 3.24 (m, 3H, H_2 , H_3 , H_4), 1.71 – 1.47 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.14 (br s, 10H, $5 \times \text{CH}_2$), 0.78 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 159.8 (CO Fmoc), 155.6 (C_q ar), 143.4 (C_q ar), 143.4 (C_q ar), 141.3 (C_q ar), 135.5 (C_{ar}), 132.8 (C ar), 127.9 (C ar), 127.3 (C ar), 125.3 (C ar), 121.6 (C_q ar), 120.1 (C ar), 115.4 (C ar), 115.3 (C ar), 115.2 (C ar), 88.4 (C_1), 77.8 (C_{Glc}), 77.5 (C_{Glc}), 72.0 (C_{Glc}), 70.3 (CH_2 Fmoc), 70.0 (C_{Glc}), 68.1 (OCH_2), 67.3 (C_6), 46.8 (CH Fmoc), 31.9 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.3 (CH_2), 26.1 (CH_2), 22.7 (CH_2), 14.2 (CH_3).

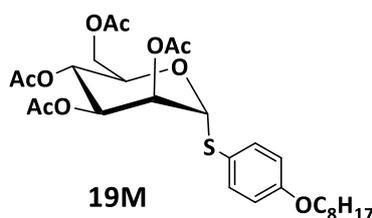
p-octyloxyphenyl-2-3-4-*O*-tribenzoyl-6-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **22G**:



To a solution of *p*-Octyloxyphenyl-6-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside (5.03 g, 8.073 mmol, 1 equiv.) in a mixture of DCM/pyridine 75 : 25 v : v (106 mL) at 0°C was added benzoyl chloride (9.4 mL, 80.73 mmol, 10 equiv.). The solution was stirred from 0°C to room temperature for 1h30 then MeOH was carefully added. The solvents were removed and the residue obtained was dissolved in DCM (100mL). The solution was washed with an aqueous 1M HCl solution (1 \times 50 mL) and a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (2 \times 50 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated *under vacuum*. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 90:10). The fractions containing the protected sugar were collected and the solvents were removed. The residue was taken in cyclohexane and the mixture was let overnight at room temperature. The formed precipitate was filtered off and dried under P_2O_5 to get *p*-octyloxyphenyl-2-3-4-*O*-tribenzoyl-6-*O*-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside (5.46 g, 71%) as a white solid. ESI-HRMS m/z $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ calculated for $\text{C}_{56}\text{H}_{58}\text{NO}_{11}\text{S}$: 952.3725, found: 952.3717. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.08 – 7.24 (m, 25H, Har), 6.87 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H ar thioaryl), 5.91 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, H_3), 5.60 – 5.40 (m, 2H, H_2 , H_4), 4.93 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H_1), 4.55 – 4.34 (m, 4H, CH_2 Fmoc, H_6), 4.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH Fmoc), 4.12 (dt, $J = 9.3, 4.3$ Hz, 1H, H_5), 3.92 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, OCH_2), 1.85 – 1.69 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.50 – 1.22 (m, 10H, $5 \times \text{CH}_2$), 0.91 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 165.9 (CO Bz),

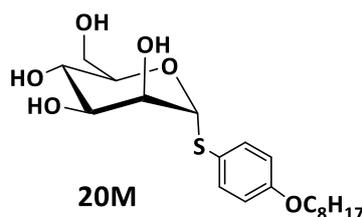
165.4 (CO Bz), 165.1 (CO Bz), 160.2 (CO Fmoc), 155.0 (C_q ar), 143.5 (C_q ar), 143.4 (C_q ar), 141.4 (C_q ar), 141.4 (C_q ar), 136.6 (C ar), 133.7 (C ar), 133.4 (C ar), 133.4 (C ar), 130.0 (C ar), 130.0 (C ar), 129.9 (C ar), 129.4 (C_q ar), 128.9 (C_q ar), 128.8 (C_q ar), 128.6 (C ar), 128.6 (C ar), 128.4 (C ar), 128.0 (C ar), 127.4 (C ar), 125.4 (C ar), 125.4 (C ar), 120.9 (C_q ar), 120.2 (C ar), 115.1 (C ar), 86.5 (C₁), 76.2 (C₅), 74.3 (C₃), 70.5 (C₂), 70.4 (CH₂ Fmoc), 69.5 (C₄), 68.2 (OCH₂), 66.6 (C₆), 46.8 (CH Fmoc), 31.9 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3(OCH₂CH₂), 26.1 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.3 (CH₃).

p-octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranoside:



To a solution of 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α,β -D-mannopyranoside (6.40 g, 16.4 mmol, 1 equiv.) and *p*-octyloxybenzenethiol **18** (5.16 g, 21.7 mmol, 1.3 equiv.) in freshly distilled DCM (160 mL) cooled in an ice bath was slowly added under argon BF₃·Et₂O (10.3 mL, 82 mmol, 5 equiv.). The solution was then warmed up at room temperature and stirred overnight under argon. The reaction was diluted with DCM, washed with water then with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated under vacuum. The residue was finally purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 90:10) giving a mixture of *p*-octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-Acetyl-1-thio-D-mannopyranoside anomers (6.02 g) and pure *p*-octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **19M** (2.53 g), both as a white solid (92%). ESI-HRMS *m/z* [M+NH₄]⁺ calculated for C₂₈H₄₄NO₁₀S : 586.2680, found : 586.2683. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) (anomer α) δ 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H ar), 6.82 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H ar), 5.53 – 5.44 (m, 1H, H_{Man}), 5.36 – 5.27 (m, 3H, H₁, 2 × H_{Man}), 4.56 (m, 1H, H₅), 4.29 (dd, *J* = 12.2, 5.9 Hz, 1H, H_{6a}), 4.10 (dd, *J* = 12.2, 2.4 Hz, 1H, H_{6b}), 3.91 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 2.12 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.06 (s, 6H, 2 × CH₃ Ac), 2.00 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.84 – 1.68 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.37 – 1.19 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.97 – 0.78 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.6 (CO Ac), 170.0 (CO Ac), 169.9 (CO Ac), 169.8 (CO Ac), 159.9 (C_q ar), 135.2 (C ar), 122.4 (C_q ar), 115.4 (C ar), 86.7 (C₁), 70.9 (C_{Man}), 69.5 (C_{Man}), 68.2 (OCH₂), 66.6 (C_{Man}), 62.7 (C₆), 31.9 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.1 (CH₂), 22.7 (CH₂), 21.0 (CH₃ Ac), 20.8 (CH₃ Ac), 20.7 (CH₃ Ac), 14.2 (CH₃).

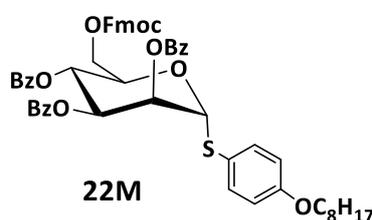
p-octyloxyphenyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **20M**:



To a suspension of *p*-Octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **19M** (2.53 g, 4.45 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (45 mL) at 0 °C was carefully added sodium (2 × 10 mg, 0.89 mmol, 0.2 equiv.). After release of dihydrogen, the mixture was stirred at room temperature for 2 h under argon. The reaction was neutralized with Amberlyst IR 120 (H⁺) resin and the resin was filtered off. The filtrate was concentrated under vacuum and dried over P₂O₅ giving *p*-octyloxyphenyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **20M** (952 mg, 94%) as a white solid. APCI-HRMS *m/z* [M]⁺ calculated for C₂₀H₃₂O₆S: 400.1920, found : 400.1913. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H ar), 6.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H ar), 5.34 (s, 1H, H₁), 4.18 (s, 1H, H_{Man}), 4.09 – 3.91 (m, 3H, 2 × H_{Man}, H_{6a}), 3.89 – 3.66 (m, 4H, H_{Man}, H_{6b}, OCH₂), 1.70 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.46 – 1.21 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.87 (app. t, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.44 (C_q ar), 134.79 (2 × C ar), 123.58 (C_q ar), 115.33 (2 × C ar), 89.47 (C₁), 73.39 (C_{Man}), 72.65 (C_{Man}), 72.15 (C_{Man}), 68.19 (OCH₂), 66.46 (C_{Man}), 61.11 (C₆), 31.99 (CH₂), 29.57 (OCH₂CH₂), 29.41 (2 × CH₂), 26.19 (CH₂), 22.81 (CH₂), 14.25 (CH₂).

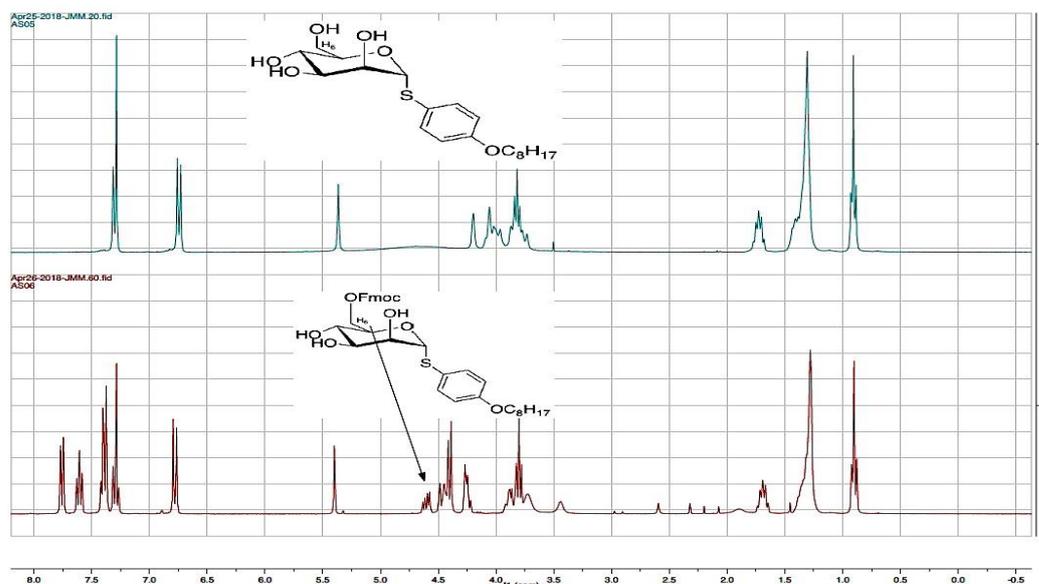
p-octyloxyphenyl-6-O-fluorenylmethoxycarbonyl-2-3-4-O-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside

22M:



Sym collidine (2.43 mL, 18.3 mmol, 5 equiv.) was firstly added to *p*-octyloxyphenyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **20M** (1.47 g, 3.67 mmol, 1 equiv.) in order to promote the solubilization. Then dry DCM (18.3 mL) was added followed by FmocCl (1.419g, 5.50 mmol, 1.5 equiv.) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 2 hours then washed with an aqueous HCl 1M solution (10 mL) and with a saturated solution of NaHCO₃ (10 mL). The final organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated *under vacuum*. The obtained residu was purified on silica gel (CyHex 100% then CyHex / AcOEt 20 : 80) giving compound protected by the Fmoc group at

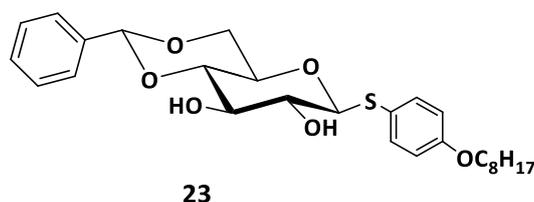
O-6 position (1.63 g, 72%). The protected compound was not characterized but a $^1\text{H-NMR}$ was done to determine the presence of Fmoc group at O-6 position ($\delta \text{H}_6\text{-OFmoc} \approx 4.60 \text{ ppm}$).



This compound (1.33 g, 2.14 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DCM (10 mL) at 0 °C then pyridine (5 mL) and benzoyl chloride (2.49 mL, 21.4 mmol, 10 equiv.) was added under argon. The reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 1 h and benzoyl chloride was neutralized with an excess of MeOH. The solvents were then evaporated and the residue was dissolved in DCM (50 mL) then washed with a with an aqueous HCl 1M solution (25 mL) and with a saturated solution of NaHCO_3 (25 mL). The organic layer was dried over sulfate magnesium, filtered off and concentrated *under vacuum*. The obtained residue was purified on silica gel (CyHex 100% then CyHex / AcOEt 95 :5) to give *p*-octyloxyphenyl-6-O-fluorenylmethoxycarbonyl-2-3-4-O-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **22M** (1.44g, 72%) as a white foam. Rf: 0.14 (CyHex/AcOEt 50: 50). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H, H ar), 8.05 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H, H ar), 7.88 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H, H ar), 7.79 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H, H ar), 7.68 – 7.38 (m, H ar), 7.38 – 7.24 (m, H ar), 6.87 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H, H ar), 6.11 – 5.96 (m, 2H, $2 \times \text{H}_{\text{Man}}$), 5.90 (dd, $J = 9.9, 3.0 \text{ Hz}$, 1H, H_{Man}), 5.62 (s, 1H, H_1), 5.02 (m, 1H, H_5), 4.57 (dd, $J = 11.8, 6.1 \text{ Hz}$, 1H, H_{6a}), 4.51 – 4.33 (m, 3H, $\text{CH}_2 \text{ Fmoc}$, H_{6b}), 4.27 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, CH Fmoc), 3.87 (t, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 1H, OCH_2), 1.73 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.50 – 1.21 (m, 10H, $5 \times \text{CH}_2$), 0.90 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 165.7 (CO Bz), 165.5 (CO Bz), 165.5 (CO Bz), 160.0 (C_q ar), 155.1 (CO Fmoc), 143.5 (C_q ar), 143.4 (C_q ar), 141.4 (C_q ar), 141.4 (C_q ar), 135.6 (C ar), 133.7 (C ar), 133.4 (C ar), 130.0 (C ar), 129.9 (C ar), 129.4 (C_q ar), 129.0 (C_q ar), 129.0 (C_q ar), 128.8 (C ar), 128.7 (C ar), 128.5 (C ar), 128.0 (C ar), 127.4 (C ar), 125.4 (C ar), 125.4 (C ar), 122.4 (C_q ar), 120.2 (C ar), 115.6 (C ar), 87.1

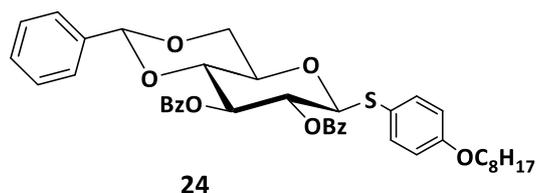
(C₁), 71.9 (C_{Man}), 70.4 (C_{Man}), 70.3 (CH₂ Fmoc), 69.8 (C₅), 68.2 (OCH₂), 67.4 (C_{Man}), 66.6 (C₆), 46.9 (CH Fmoc), 31.9 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 26.1 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).

p-octyloxyphenyl-4,6-O-benzylidene-1-thio-β-D-glucopyranoside **23** :



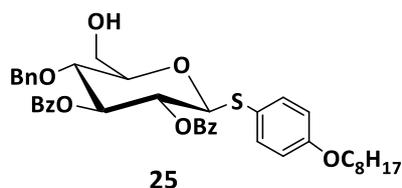
To a solution of *p*-Octyloxyphenyl-2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio-α-D-glucopyranoside **19G** (12.50g, 20.01 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (100 mL) at 0°C was added carefully sodium (101 mg, 4.40 mmol, 0.2 equiv.). The reaction was stirred at room temperature overnight then neutralized by Amberlyte IR 120 (H⁺) resin. The resin was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum to get after drying pure *p*-Octyloxyphenyl-1-thio-α-D-glucopyranoside **20G**. The compound was dissolved in acetonitrile (110 mL) then camphorsulfonic acid (1.68 g, 8.804 mmol, 0.4 equiv.) and benzaldehyde dimethyl acetal (10 mL, 66.04 mmol, 3 equiv.). The mixture was refluxed for 3 hours then triethylamine (1.5 mL, 11.00 mmol, 0.5 mmol) was added. The solvents were evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex / AcOEt 70 :30) to give pure *p*-Octyloxyphenyl-4,6-O-benzylidene-1-thio-β-D-glucopyranoside **23** as a white solid (7.70 g, 72%, 2 steps). APCI-HRMS *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₇H₃₇O₆S : 489.2305, found: 489.2305. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.56 – 7.40 (m, 4H, H ar), 7.40 – 7.31 (m, 3H, H ar), 6.93 – 6.81 (m, 2H, H ar), 5.49 (s, 1H, H benzylidene), 4.45 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H₁), 4.35 (dd, *J* = 10.5, 4.3 Hz, 1H, H_{6a}), 3.95 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂), 3.84 – 3.67 (m, 2H, H₄, H_{6b}), 3.50 – 3.41 (m, 2H, H₅, H₃), 3.36 (dd, *J* = 9.6, 8.5 Hz, 1H, H₂), 2.96 (br s, 2H, OH), 1.79 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.55 – 1.22 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.98 – 0.82 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 160.1 (C_q ar), 137.0 (C_q ar), 136.3 (C ar), 129.4 (C ar), 128.5 (C ar), 126.4 (C ar), 120.5 (C_q ar), 115.3 (C ar), 102.0 (C benzylidene), 88.8 (C₁), 80.4 (C₃ or C₅), 74.6 (C₄), 72.4 (C₂), 70.6 (C₃ or C₅), 68.7 (C₆), 68.3 (OCH₂), 31.9 (CH₂), 29.5 (OCH₂CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 26.2 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).

p-octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4,6-O-benzylidene-1-thio-β-D-glucopyranoside **24** :



To a solution of pure *p*-Octyloxyphenyl-4,6-O-benzylidene-1-thio-β-D-glucopyranoside **23** (7.70 g, 15.77 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (80 mL) under argon were added benzoic anhydride (15.85 g, 47.31 mmol, 3 equiv.), triethylamine (8.8 mL, 63.08 mmol, 4 equiv.) and DMAP (385 mg, 3.154 mmol, 0.2 equiv.). The reaction was stirred at room temperature overnight, diluted with DCM, washed with an aqueous solution of HCl 1M and a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated. The residue was taken in 300 mL of MeOH then sonicated for 10 minutes. Then the mixture was kept at 7 °C for 1 hour and the resulting precipitate was filtered off and dried under vacuum giving pure *p*-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4,6-O-benzylidene-1-thio-β-D-glucopyranoside **24** as a white solid (7.96 g, 73%). APCI-HRMS *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₄₁H₄₅O₈S : 697.2830, found: 697.2833. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H ar), 7.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H ar), 7.60 – 7.28 (m, 13H, H ar), 6.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H ar), 5.77 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H₃), 5.52 (s, 1H, H benzylidene), 5.41 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H₂), 4.88 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H₁), 4.45 (dd, *J* = 10.4, 4.6 Hz, 1H, H_{6a}), 3.95 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.91 – 3.79 (m, 2H, H₄, H_{6b}), 3.79 – 3.64 (m, 1H, H₅), 1.88 – 1.73 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.54 – 1.19 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.99 – 0.84 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.7 (CO Bz), 165.3 (CO Bz), 160.2 (C_q ar), 136.9 (C_q ar), 136.6 (C ar), 133.4 (C ar), 133.2 (C ar), 130.7 (C ar), 130.0 (C ar), 129.9 (C ar), 129.6 (Cq ar), 129.5 (Cq ar), 129.2 (C ar), 128.5 (C ar), 128.4 (C ar), 128.3 (C ar), 126.3 (C ar), 121.1 (C_q ar), 115.1 (C ar), 101.6 (C benzylidene), 87.4 (C₁), 78.7 (C₄), 73.5 (C₃), 71.2 (C₂ or C₅), 71.0 (C₂ or C₅), 68.7 (C₆), 68.3 (OCH₂), 32.0 (CH₂), 29.5 (OCH₂CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 26.2 (CH₂), 22.8(CH₂), 14.2 (CH₃).

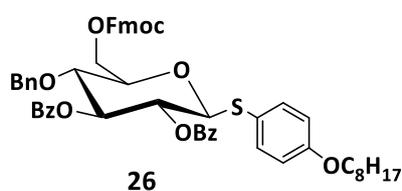
p-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-1-thio-β-D-glucopyranoside **25** :



p-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4,6-O-benzylidene-1-thio-β-D-glucopyranoside **24** (4,00 g, 5.747 mmol, 1 equiv.) was dissolved under argon in a borane tetrahydrofuran complex solution 1.0 M in THF

(29 mL, 28.74 mmol, 5 equiv.) followed by the addition of TMSOTf (156 μ L, 0.862 mmol, 0.15 equiv.). The reaction was stirred for 5 hours at room temperature under argon then neutralized with triethylamine (240 μ L, 1.724 mmol, 0.3 equiv.) followed by the slowly and carefully addition of methanol until the release of hydrogen has stopped. The mixture was concentrated and the residue was coevaporated with MeOH (5 \times 50 mL). The final residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex / AcOEt 85 :15) to give pure *p*-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **25** (3.23 g, 84%) as a clear white oil. ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₄₁H₄₆NaO₈S : 721.2806, found: 721.2806. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.00 – 7.94 (m, 2H, Har), 7.94 – 7.87 (m, 2H, Har), 7.57 – 7.45 (m, 2H, Har), 7.44 – 7.32 (m, 6H, Har), 7.19 – 7.09 (m, 5H, Har), 6.87 – 6.80 (m, 2H, Har), 5.72 (t, J = 9.4 Hz, 1H, H₃), 5.36 – 5.22 (m, 1H, H₂), 4.81 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H₁), 4.57 (s, 2H, CH₂ Bn), 4.02 – 3.91 (m, 3H, OCH₂, H_{6a}), 3.87 (t, J = 9.5 Hz, 1H, H₄), 3.83 – 3.73 (m, 1H, H_{6b}), 3.67 – 3.56 (m, 1H, H₅), 1.97 (br s, 1H, OH), 1.78 (p, J = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.54 – 1.21 (m, 10H, 5 \times CH₂), 0.97 – 0.84 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.8 (CO Bz), 165.4 (CO Bz), 160.1 (C_q ar), 137.2 (C_q ar), 136.3 (C ar), 133.3 (C ar), 133.3 (C ar), 130.0 (C ar), 129.8 (C ar), 129.5 (C_q ar), 129.5 (C_q ar), 128.5 (C ar), 128.3 (C ar), 128.1 (C ar), 121.3 (C_q ar), 115.2 (C ar), 86.5 (C₁), 79.6 (C₅), 76.4 (C₃), 75.5 (C₄), 75.0 (CH₂ Bn), 71.0 (C₂), 68.2 (OCH₂), 61.9 (C₆), 31.9 (CH₂), 29.5 (OCH₂CH₂), 29.3 (CH₂), 26.2 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).

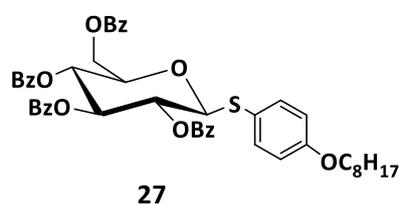
p-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-6-O-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **26** :



To a solution of *p*-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **25** (3.23 g, 4.64 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (30 mL) and dry pyridine (3 mL) at 0°C under argon was added Fmoc chloride (1.44 g, 5.55 mmol, 1.2 equiv.). Then the reaction was cool down at room temperature and stirred for 3 hours. The mixture was diluted with DCM (20 mL) then washed with a aqueous solution of 1M HCl (2 \times 20 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2 \times 20 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex / AcOEt 95:5) to give pure *p*-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-6-O-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **26** (3.07 g, 72%) as a white foam. APCI-HRMS m/z [M+H]⁺ calculated for C₅₆H₅₇O₁₀S : 921.3667, found: 921.3679. ¹H NMR (300

MHz, CDCl₃) δ 8.04 – 7.92 (m, 4H, H ar), 7.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H ar), 7.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H ar), 7.59 – 7.34 (m, 10H, H ar), 7.23 – 7.11 (m, 5H, H ar), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H ar), 5.77 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, H₃), 5.36 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H₂), 4.82 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H₁), 4.66 – 4.30 (m, 7H, CH₂ Bn, CH Fmoc, CH₂ Fmoc, H₆), 3.96 – 3.76 (m, 4H, OCH₂, H₄, H₅), 1.74 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.48 – 1.21 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.97 – 0.86 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.7 (CO Bz), 165.3 (CO Bz), 159.9 (C_q ar), 155.0 (CO Fmoc), 143.4 (C_q ar), 143.3 (C_q ar), 141.3 (C_q ar), 136.9 (C_q ar), 136.3 (C ar), 133.3 (C ar), 133.3 (C ar), 129.9 (C ar), 129.8 (C ar), 129.4 (C_q ar), 129.4 (C_q ar), 128.5 (C ar), 128.4 (C ar), 128.4 (C ar), 128.3 (C ar), 128.1 (C ar), 128.0 (C ar), 127.3 (C ar), 125.3 (C ar), 125.2 (C ar), 121.3 (C_q ar), 120.1 (C ar), 114.9 (C ar), 86.5 (C₁), 77.1 (C₅), 76.5 (C₃), 75.6 (C₄), 74.9 (CH₂ Bn), 70.7 (C₂), 70.2 (CH₂ Fmoc), 68.1 (OCH₂), 66.3 (C₆), 46.8 (CH Fmoc), 31.8 (CH₂), 29.4 (OCH₂CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 26.0 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14.2 (CH₃).

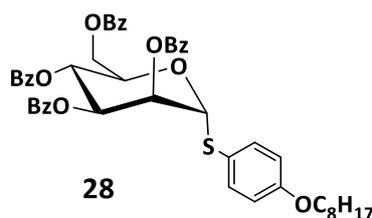
p-octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-benzoyl-1-thio-β-D-glucofuranoside **27**



To a suspension of *p*-octyloxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucofuranoside **19G** (1.12 g, 1.86 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (10 mL) at 0 °C was added carefully sodium (9 mg, 0.394 mmol, 0.2 equiv.). The mixture was let at 0°C until stopping the release of dihydrogen. The reaction was stirred at room temperature overnight then neutralized by Amberlyte IR 120 H⁺ resin. The resin was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum to get after drying the deacetylated compound **20G**. The white solid was dissolved in dry pyridine (10 mL) under argon and benzoyl chloride (1.38 mL, 11.83 mmol, 6 equiv.) was slowly added at 0 °C. The mixture was stirred 4 hours at room temperature under argon then pyridine was evaporated under vacuum. The residue was taken up in DCM (20 mL), washed with a HCl 1M solution (10 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered off and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 90:10) to give pure *p*-octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-benzoyl-1-thio-β-D-glucofuranoside **27** (732 mg, 45%) as white foam. ESI-HRMS *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₄₈H₄₈NaO₁₀S: 839.2860, found: 839.2861. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.07 – 8.02 (m, 2H, H ar), 8.02 – 7.96 (m, 2H, H ar), 7.93 – 7.86 (m, 2H, H ar), 7.83 – 7.77 (m, 2H, H ar), 7.62 – 7.22 (m, 14H), 6.71 – 6.62 (m, 2H, H ar), 5.89 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H₃), 5.58 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H, H₄), 5.42 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H₂), 4.91 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H₁), 4.69 (dd, *J* = 12.2, 2.8 Hz, 1H,

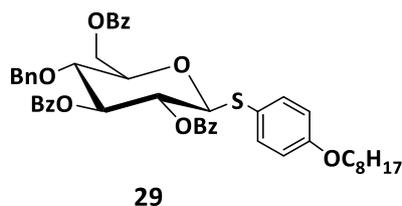
H_{6a}), 4.47 (dd, *J* = 12.2, 5.5 Hz, 1H, H_{6b}), 4.21 – 4.11 (m, 1H, H₅), 3.84 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.83 – 1.68 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.51 – 1.26 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.97 – 0.83 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.2 (CO Bz), 166.0 (CO Bz), 165.3 (CO Bz), 165.2 (CO Bz), 160.1 (C_q ar), 136.6 (C ar), 133.6 (C ar), 133.4 (C ar), 133.3 (C ar), 133.2 (C ar), 130.0 (C ar), 130.0 (C ar), 129.9 (C ar), 129.8 (C_q ar), 129.5 (C_q ar), 129.0 (C_q ar), 128.9 (C_q ar), 128.6 (C ar), 128.4 (C ar), 120.8 (C_q ar), 115.0 (C ar), 86.4 (C₁), 76.4 (C₅), 74.4 (C₃), 70.6 (C₂), 69.5 (C₄), 68.2 (OCH₂CH₂), 63.2 (C₆), 32.0 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (OCH₂CH₂), 26.2 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).

p*-octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **28*



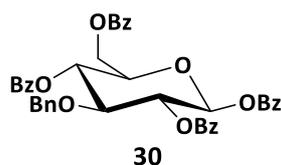
To a solution of *p*-octyloxyphenyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **20M** (242 mg, 0.605 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine (4 mL) was added under argon benzoyl chloride (420 μ l, 3.63 mmol, 6 equiv.). The reaction was stirred overnight at room temperature then pyridine was removed under vacuum. The residue was taken up in DCM (5 mL) and washed with a 1M HCl aqueous solution (2 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (2 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated. The obtained residue was then purified by column chromatography on silica gel (CyHex/Et₂O 95:5 then CyHex/AcOEt 9:1) to give pure *p*-octyloxyphenyl-2-3-4-6-O-benzoyl-1-thio- α -D-mannopyranoside **28** as a beige solid. APCI-HRMS *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₄₈H₄₉O₁₀S : 817.3041, found : 817.3046. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.10 – 8.03 (m, 3H, H ar), 8.03 – 7.98 (m, 2H), 7.89 – 7.84 (m, 2H, H ar), 7.65 – 7.35 (m, 12H, H ar), 7.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H ar), 6.77 – 6.70 (m, 2H, H ar), 6.12 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H₄), 5.97 (dd, *J* = 3.2, 1.7 Hz, 1H, H₂), 5.88 (dd, *J* = 10.1, 3.2 Hz, 1H, H₃), 5.62 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H₁), 5.12 – 5.00 (m, 1H, H₅), 4.67 (dd, *J* = 12.2, 2.5 Hz, 1H, H_{6a}), 4.58 (dd, *J* = 12.2, 5.3 Hz, 1H, H_{6b}), 3.87 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂), 1.84 – 1.69 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.50 – 1.23 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.88 (app. t, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.17 (CO Bz), 165.54 (CO Bz), 165.46 (CO Bz), 165.35 (CO Bz), 159.77 (C_q ar), 135.16 (C ar), 133.53 (C ar), 133.29 (C ar), 133.06 (C ar), 129.90 – 129.79 (C ar), 129.31 (C_q ar), 128.96 (C_q ar), 128.92 (C_q ar), 128.62 – 128.36 (C ar), 122.37 (C_q ar), 115.43 (C ar), 86.89 (C₁), 71.86 (C₂), 70.42 (C₃), 69.75 (C₅), 68.12 (OCH₂), 67.27 (C₄), 63.20 (C₆), 31.82 (CH₂), 29.34 (CH₂), 29.25 (CH₂), 29.15 (OCH₂CH₂), 26.02 (CH₂), 22.67 (CH₂), 14.11 (CH₃).

p-Octyloxyphenyl-2-3-6-Tri-O-Benzoyl-4-O-Benzyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **29** :



To a solution of *p*-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **25** (119 mg, 0.1705 mmol, 1 equiv.) in dry pyridine was added benzoyl chloride (30 μ l, 0.2557 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 2h then concentrated *under vacuum*. The obtained residue was taken in DCM (5 mL), washed with a 1M HCl solution (2 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated *under vacuum*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 90:10) to give pure *p*-octyloxyphenyl-2-3-6-tri-O-benzoyl-4-O-benzyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **29** as a white solid (97 mg, 71%). ESI-HRMS m/z [M+NH₄]⁺ calculated for C₄₈H₅₄NO₉S : 820.3514, found : 820.3515. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.14 – 7.84 (m, 6H, H ar Bz), 7.70 – 7.30 (m, 11H, H ar), 7.19 – 7.05 (m, 5H, H ar), 6.65 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H ar), 5.76 (t, J = 9.2 Hz, 1H, H₃), 5.30 (t, J = 9.7 Hz, 1H, H₂), 4.80 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H₁), 4.77 – 4.67 (m, 1H, H_{6a}), 4.67 – 4.41 (m, 3H, CH₂ Bn, H_{6b}), 3.96 – 3.75 (m, 4H, OCH₂CH₂, H₅, H₄), 1.85 – 1.65 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.52 – 1.24 (m, 10H, 5 \times CH₂), 0.90 (app. t, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.19 (CO Bz), 165.79 (CO Bz), 165.40 (CO Bz), 159.96 (C_q ar), 136.84 (C_q ar), 136.60 (C ar), 133.35 – 133.29 (C ar), 130.00 – 129.89 (C ar), 129.55 (C_q ar), 129.48 (C_q ar), 128.60 – 128.20 (C ar), 120.98 (C_q ar), 114.94 (C ar), 86.07 (C₁), 77.45 (C₄ or C₅), 76.68 (C₃), 75.77 (C₄ or C₅), 74.97 (CH₂ Bn), 70.72 (C₂), 68.11 (OCH₂CH₂), 63.25 (C₆), 31.97 (CH₂), 29.51 (CH₂), 29.40 (OCH₂CH₂), 29.35 (CH₂), 26.20 (CH₂), 22.81 (CH₂), 14.25 (CH₃).

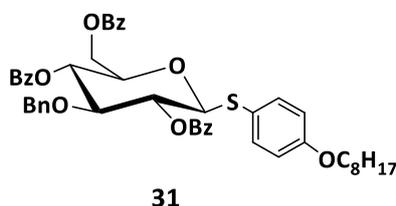
1, 2, 4, 6-tetra-O-benzoyl-3-O-benzyl- β -D-glucopyranose **30** ¹¹⁶



To a solution of 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose (40 g, 0.1538 mol, 1 equiv) in dry DMF (500 mL) was added under argon benzyl bromide (28 mL, 0.230 mol, 1.5 equiv). Sodium hydride 60% in mineral oil (12.3 g, 0.3076 mol, 2 equiv) was added portionwise over a period of 45 minutes

and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. Sodium hydride was then carefully neutralized with MeOH (100 mL) and the solvents were removed under reduced pressure. The residue obtained was dissolved in DCM (400 mL), washed with water (200 mL) and the organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated. The previous crude was taken in H₂O (400 mL) and Amberlyst IR-120 H⁺ resin (80 g) was added. The mixture was stirring under reflux overnight and the resin was filtered off under Celite. The filtrate containing the 3-O-benzyl- α,β -D-glucopyranose was concentrated and the residue was drying overnight under phosphorous pentoxide. The orange solid obtained was dissolved in pyridine (300 mL) and benzoyl chloride (107 mL, 0.923 mol, 6 equiv) and cat. DMAP were slowly added under argon at 0 °C. The benzylation reaction was then stirred for 3 h at room temperature and the solvents were removed under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in DCM (400 mL), washed with a solution of HCl 1M (2 × 200 mL) and a saturated solution of sodium bicarbonate (2 × 200 mL). The final organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated *under vacuum*. Ethanol was added to the obtained residue to precipitate compound which after filtration and drying gives 1, 2, 4, 6-tetra-O-benzoyl-3-O-benzyl- β -D-glucopyranose **30** as a white powder (37.5 g, 36% (3 steps)). ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₄₁H₃₄NaO₁₀: 709.2050, found: 709.2045. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 8.09 – 7.95 (m, 8H, H ar), 7.68 – 7.33 (m, 12H, H ar), 7.03 (app. s, 5H, H ar), 6.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁), 5.84 – 5.66 (m, 2H, H₂, H₄), 4.66 (s, 2H, CH₂), 4.62 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H_{6a}), 4.45 (dd, *J* = 12.2, 4.9 Hz, 1H, H_{6b}), 4.34 – 4.23 (m, 1H, H₅), 4.23 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₃). ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 166.3 (CO Bz), 165.1 (CO Bz), 164.9 (CO Bz), 137.1 – 127.9 (C ar), 92.7 (C₁), 79.3 (C₃), 74.4 (CH₂), 73.2 (C₅), 72.2 (C₂), 70.4 (C₄), 63.0 (C₆).

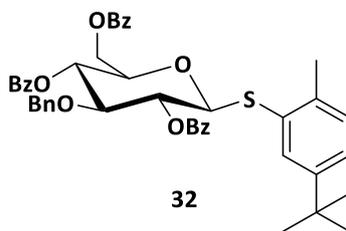
p-octyloxyphenyl-2-4-6-O-tribenzoyl-3-O-benzyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **31**:



To a solution of 1, 2, 4, 6-tetra-O-benzoyl-3-O-benzyl- β -D-glucopyranose **30** (294 mg, 0.4277 mmol, 1 equiv.) and *p*-octyloxybenzenethiol **18** (153 mg, 0.6415 mmol, 1.5 equiv.) in dry DCM (5 mL) was added under argon at 0°C BF₃ etherate (107 μ L, 0.8554 mmol, 2 equiv.). The reaction was stirred from 0 °C to room temperature under argon for 3 h and water (3 mL) was added to the solution. The mixture was stirred vigorously and the aqueous layer was discarded. The resulting organic layer was washed with a saturated solution of bicarbonate of sodium (3 mL), dried over MgSO₄, filtered off and

concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt/Et₂O 80:10:10) to give pure *p*-octyloxyphenyl-2-4-6-*O*-tribenzoyl-3-*O*-benzyl-1-thio-β-*D*-glucopyranoside **31** (170 mg, 50%) as white foam. ESI-HRMS *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₄₈H₅₀NaO₉S: 825.3068, found: 825.3052. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.14 – 7.94 (m, 6H, H ar), 7.66 – 7.35 (m, 12H, H ar), 7.06 – 6.89 (m, 4H, H ar), 6.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H ar), 5.47 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H₄), 5.31 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H₂), 4.77 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H₁), 4.65 (dd, *J* = 12.1, 2.1 Hz, 1H, H_{6a}), 4.53 (s, 2H, CH₂ Bn), 4.38 (dd, *J* = 12.1, 5.7 Hz, 1H, H_{6b}), 4.07 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H₃), 4.05 – 3.94 (m, 1H, H₅), 3.80 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, -OCH₂CH₂), 1.82 – 1.67 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.49 – 1.22 (m, 10H, 5 × CH₂), 0.89 (app. t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.2 (CO Bz), 165.1 (CO Bz), 165.1 (CO Bz), 159.9 (C_q ar), 137.2 (C_q ar), 136.3 (C ar), 133.6 (C ar), 133.4 (C ar), 133.2 (C ar), 130.0 (C ar), 130.0 (C ar), 130.0 (C ar), 129.9 (C_q ar), 129.4 (C_q ar), 128.6 (C ar), 128.5 (C ar), 128.3 (C ar), 128.2 (C ar), 127.8 (C ar), 121.4 (C_q ar), 115.0 (C ar), 86.5 (C₁), 81.2 (C₃), 76.3 (C₅), 74.5 (CH₂ Bn), 72.4 (C₂), 70.9 (C₄), 68.1 (OCH₂CH₂), 63.4 (C₆), 32.0 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (OCH₂CH₂), 26.2 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).

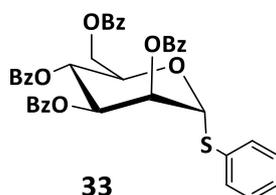
(2-Methyl-5-*tert*-butylphenyl) 2, 4, 6-tri-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-1-thio-β-*D*-glucopyranose **32**:



To a solution of 1, 2, 4, 6-tetra-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-β-*D*-glucopyranose **30** (30g, 43.7 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (300 mL) were added under argon at 0°C 2-Methyl-5-*tert*-butylthiophenol (12 mL, 65.6 mmol, 1.5 equiv) and slowly BF₃ etherate (11mL, 87.4 mmol, 2 equiv). The reaction was stirred from 0°C to room temperature under argon for 4 h and water (100 mL) was added to the solution. The mixture was stirred vigorously and the aqueous layer was discarded. The resulting organic layer was washed with a saturated solution of bicarbonate of sodium (100 mL), dried over MgSO₄, evaporated and the residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 90:10) containing first fractions with the 2 anomers (2.9 g) following by pure fractions containing only the β anomer **32** as a white powder (20.5 g, 63%). ESI-HRMS *m/z* [M+NH₄]⁺ calculated for C₄₅H₄₈NO₈S : 762.3095, found : 762.3097. ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 8.17 – 7.96 (m, 6H, Har), 7.71 – 6.94 (m, 17H, Har), 5.63 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H₄), 5.52 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H₂), 4.89 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, H₁), 4.69 – 4.54 (m, 3H, CH₂, H_{6a}), 4.46 (dd, *J* = 12.2, 5.2 Hz, 1H, H_{6b}), 4.13 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H₃), 4.08 – 3.97 (m, 1H, H₅), 2.29 (s, 3H, CH₃ thio), 1.25 (s, 9H, *t*Bu). ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 166.3 (CO Bz), 165.0 (2 × CO Bz) , 149.6 (C_q ar), 138.0 (C_q ar), 137.1 (C_q ar), 133.4 (C ar), 133.3 (C ar), 133.0 (C ar),

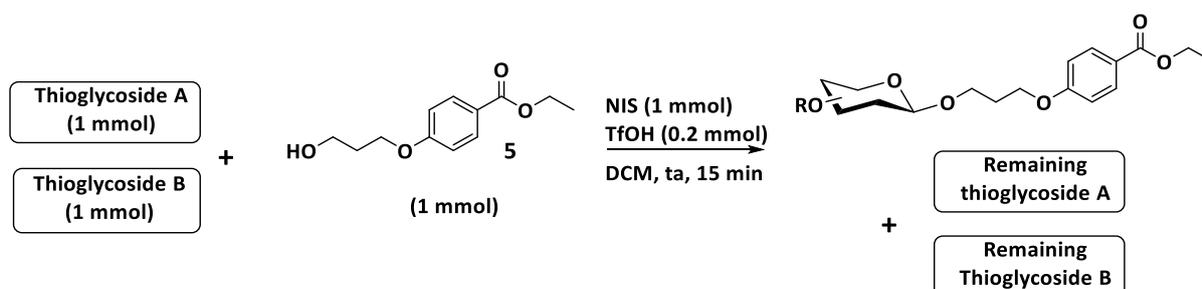
131.8 (C_q ar), 131.0 (C ar), 130.0 (C ar), 129.9 (C ar), 129.8 (C ar), 129.8 (C ar), 129.3 (C_q ar), 128.5 (C ar), 128.3 (C ar), 128.1 (C ar), 128.1 (C ar), 127.7 (C ar), 125.7 (C ar), 87.9 (C₁), 80.9 (C₃), 76.1 (C₅), 74.2 (CH₂), 72.5 (C₂), 70.9 (C₄), 63.6 (C₆), 34.4 (C_q tBu), 31.2 (tBu), 20.5 (CH₃ thio).

2-3-4-6-tetra-O-benzoyl-1-thiophenyl- α -D-mannopyranoside¹¹⁸ **33**:



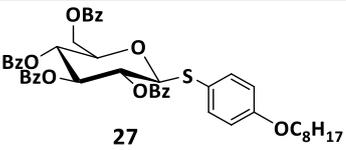
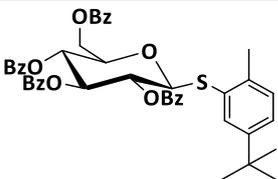
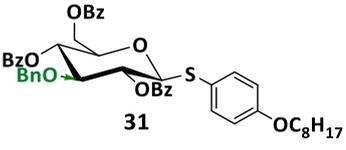
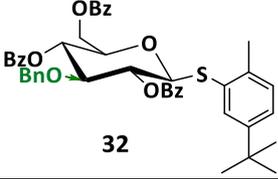
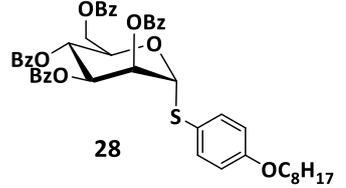
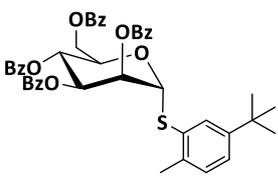
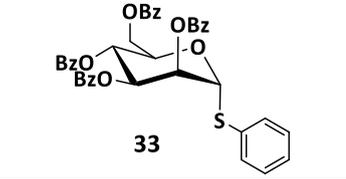
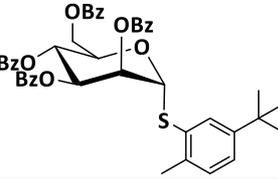
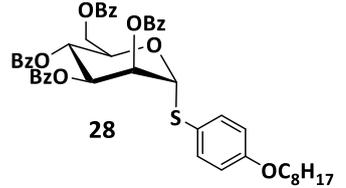
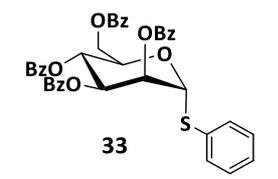
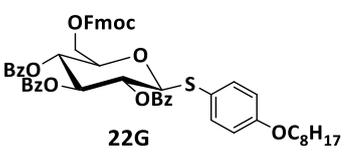
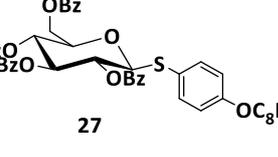
To a mixture of DCM / H₂O / TFA 80: 10: 10 v/v/v (10 mL) was added 4,6-O-benzylidene-1-thiophenyl- α -D-glucopyranoside¹¹⁷ (500 mg, 1.389 mmol, 1 equiv.). The reaction was then stirred at 60 °C for 1 h and solvents were evaporated under vacuum. Pyridine (5 mL) and benzoyl chloride (968 μ L, 8.33 mmol, 6.0 equiv.) were then added to the residue. The reaction was stirred for 3 h at 60 °C then pyridine was evaporated. The residue was dissolved in DCM (20 mL), washed with an aqueous solution of 1M HCl (10 mL) and a saturated solution of sodium bicarbonate (10 mL). The final organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex /Et₂O/ Toluene 80: 10: 10 v/v/v) to give pure 2-3-4-6-tetra-O-benzoyl-1-thiophenyl- α -D-mannopyranoside¹¹⁸ **33** (205 mg, 22%). ¹H NMR was in accordance with literature : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.12 – 7.72 (m, H ar), 7.57 – 6.99 (m, H ar), 6.08 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H₄), 5.91 (dd, *J* = 3.2, 1.6 Hz, 1H, H₂), 5.81 (dd, *J* = 10.1, 3.2 Hz, 1H, H₃), 5.70 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₁), 4.93 (ddd, *J* = 10.0, 5.2, 2.4 Hz, 1H, H₅), 4.59 (dd, *J* = 12.2, 2.5 Hz, 1H, H_{6a}), 4.48 (dd, *J* = 12.2, 5.3 Hz, 1H, H_{6b}).

General method for competition reaction using various thioglycoside donors:



To a solution containing **thioglycosides A** and **B** (1 mmol each) and Ethyl 4-(3-Hydroxypropoxy)benzoate **5** (1 mmol) in dry DCM (5 mL) at 0 °C under argon were added NIS (1

mmol) and TfOH (0.2 mmol). The reaction was then stirred at room temperature for 15 minutes and an excess of piperidine was added. The solvents were removed until completely dryness and the crude was analyzed by ^{13}C -NMR. Signals of anomer carbons of remaining thioglycosides were integrated (values **A** and **B**) then added giving **C** (**C** = **A** + **B** and the value 1.00 was always given to the least reactive thioglycoside (value **B**)). The values of these integrations (**A** and **B**) correspond to the number of consumed equivalent (**a** and **b**) and ratio of thioglycosides consumed was determined by the following formula $a/b = (C - A) / (C - B)$. The results of integrations and ratio of thioglycosides consumed are shown in the following table:

Entry	Thioglycoside A (<u>More</u> reactive)	A (Value of the integration of C_1A in ^{13}C -NMR)	Thioglycoside B (<u>Less</u> reactive)	B (Value of the integration of C_1B in ^{13}C -NMR)	Ratio of thioglycosides consumed: $(a/b) = (C - A) / (C - B)$
1	 27	0.67		1.00	1.5
2	 31	0.69		1.00	1.4
3	 28	0.41		1.00	2.4
4*	 33	0.82		1.00	1.2
5	 28	0.76		1.00	1.3
6	 22G	0.71	 27	1.00	1.4

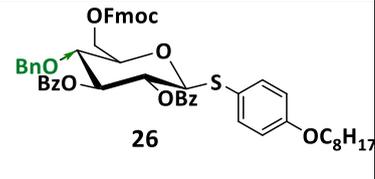
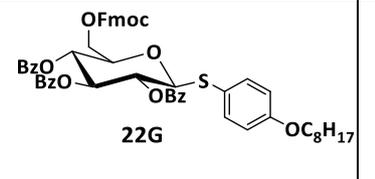
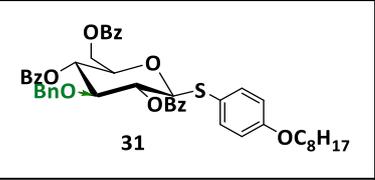
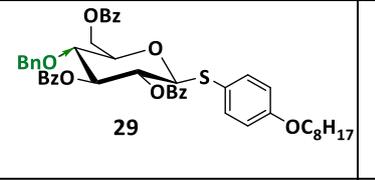
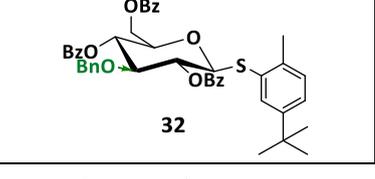
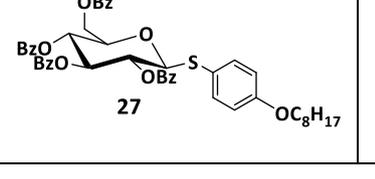
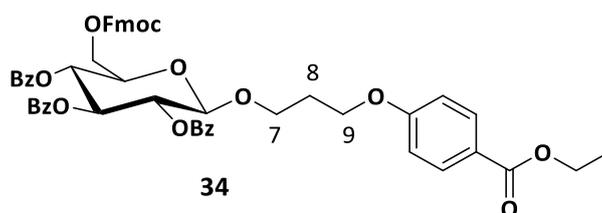
7		0.21		1.00	4.8
8		0.53		1.00	1.9
9		0.21		1.00	4.8
*Signals of anomer carbons were difficult to integrate; integrations were established on the C ₂ .					

Tableau 9 : summary table of competition reactions between two thioglycoside donors.

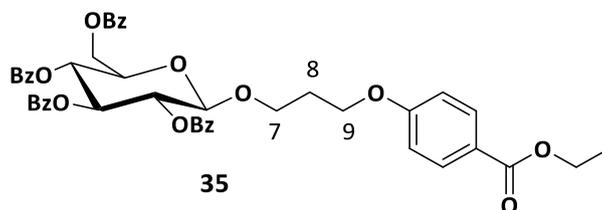
Glycoside 34:



To a solution of ethyl 4-(3-Hydroxypropoxy)benzoate **5** (100 mg, 0.4464 mmol, 1 equiv.) and *p*-octyloxyphenyl-2-3-4-O-tribenzoyl-6-O-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **22G** (501 mg, 0.5357 mmol, 1.2 equiv.) in dry DCM (5 mL) at 0 °C under argon were added NIS (150 mg, 0.6696 mmol, 1.5 equiv.) then TfOH (20 μ L, 0.2232 mmol, 0.5 equiv.). The reaction was stirred from 0 °C to room temperature under argon for 10 minutes and diluted with DCM (5 mL). The mixture was then washed with a saturated solution of sodium thiosulfate (5 mL) and with a saturated solution of bicarbonate (5 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated. The residue was then purified by column chromatography on silica gel to give pure glycoside **34** (404 mg, 80%) as a white foam. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.90 – 7.02 (m, 25H, H ar), 6.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H ar), 5.80 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H₃), 5.54 – 5.40 (m, 2H, H₂, H₄), 4.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₁), 4.37 – 4.14 (m, 6H, CH₂ Fmoc, CH₂ Ethyl, H₆), 4.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, CH Fmoc), 4.04 – 3.90 (m, 2H, H_{7a}, H₅), 3.76 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H₉), 3.69 – 3.57 (m, 1H, H_{7b}), 2.01 – 1.73 (m, 2H, H₈), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃ Ethyl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.3 (CO), 165.7 (CO), 165.2 (CO), 165.0 (CO), 162.4

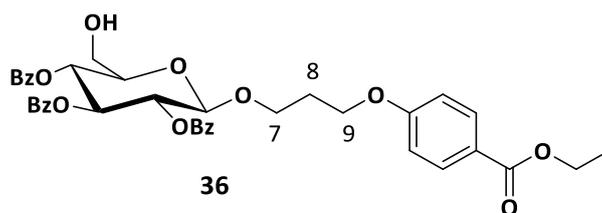
(CO Fmoc), 154.8 (C_q ar), 143.3 (C_q ar), 143.2 (C_q ar), 141.2 (C_q ar), 141.2 (C_q ar), 133.5 (C ar), 133.2 (C ar), 131.4 (C ar), 129.8 (C ar), 129.7 (C ar), 129.6 (C ar), 129.0 (C_q ar), 128.7 (C_q ar), 128.4 (C ar), 128.4 (C ar), 128.3 (C ar), 127.9 (C ar), 127.2 (C ar), 125.2 (C ar), 125.2 (C ar), 122.6 (C_q ar), 120.0 (C ar), 113.8 (C ar), 101.2 (C₁), 72.8 (C₃), 72.2 (C₅), 71.8 (C₂ or C₄), 70.1 (CH₂ Fmoc), 69.6 (C₂ or C₄), 66.4 (C₇), 66.2 (C₆), 64.2 (C₉), 60.5 (CH₂ Ethyl), 46.6 (CH Fmoc), 29.2 (C₈), 14.4 (CH₃ Ethyl).

Glycoside 35:



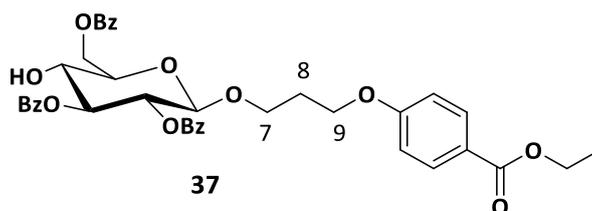
To a solution of ethyl 4-(3-Hydroxypropyloxy)benzoate **5** (100 mg, 0.4464 mmol, 1 equiv.) and *p*-octyloxyphenyl-2-3-4-6-tetra-O-benzoyl-1-thio-β-D-glucopyranoside **27** (437 mg, 0.5357 mmol, 1.2 equiv.) in dry DCM (5 mL) at 0°C under argon was added NIS (151 mg, 0.6696 mmol, 1.5 equiv.) then Tf(OH). The reaction was stirred at 0°C for 1 h then diluted with DCM (5 mL). The solution was washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (5mL) and with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered off and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 70:30) to give pure compound **35** as a white foam (273 mg, 79%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.13 – 7.72 (m, 10H, H ar), 7.64 – 7.20 (m, 12H), 6.73 – 6.58 (m, 2H, H ar), 5.90 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H₃), 5.68 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H₄), 5.53 (dd, *J* = 9.8, 7.9 Hz, 1H, H₂), 4.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁), 4.64 (dd, *J* = 12.1, 3.3 Hz, 1H, H_{6a}), 4.50 (dd, *J* = 12.2, 5.2 Hz, 1H, H_{6b}), 4.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂ Ethyl), 4.23 – 4.05 (m, 2H, H_{7a}, H₅), 3.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H₉), 3.84 – 3.72 (m, 1H, H_{7b}), 2.12 – 1.95 (m, 2H, H₈), 1.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃ Ethyl). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.49 (CO), 166.23 (CO), 165.90 (CO), 165.31 (CO), 165.17 (CO), 162.58, 133.56, 133.38, 133.35, 133.26, 131.54, 129.94, 129.85, 129.78, 129.72, 129.19, 128.91, 128.50, 128.41, 113.91, 101.50 (C₁), 72.94 (C₃), 72.39 (C₅), 72.00 (C₂), 69.8 (C₄), 66.54 (C₇), 64.37 (C₉), 63.22 (C₆), 60.67 (CH₂ Ethyl), 29.36 (C₈), 14.52 (CH₃ Ethyl).

Glycoside 36:



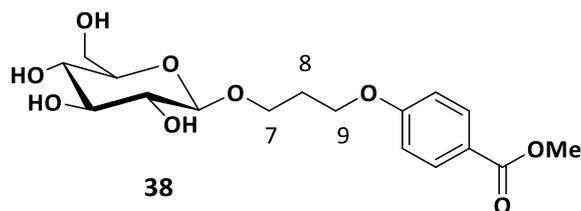
To a solution of glycoside **34** (78 mg, 86.09 μmol , 1 equiv.) in dry THF (200 μl) was added under argon TBAF (in solution in THF 1M) (345 μl , 0.344 mmol, 4 equiv.) and AcOH (25 μl , 0.43 mmol, 5 equiv.). The reaction was then stirred overnight at room temperature under argon and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 60:40) to give pure glycoside **36** as a colourless oil (47 mg, 78%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.96 – 7.69 (m, H ar), 7.58 – 7.18 (m, H, H ar), 6.67 – 6.54 (m, 2H, H ar), 5.85 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, H_3), 5.53 – 5.33 (m, 2H, H_2 , H_4), 4.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_1), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 Ethyl), 4.06 (dd, $J = 9.8, 4.6$ Hz, 1H, H_{7a}), 3.86 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H, H_9), 3.80 – 3.61 (m, 4H, H_5 , H_6 , H_{7b}), 2.07 – 1.89 (m, 2H, H_8), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3 Ethyl).

Glycoside 37:



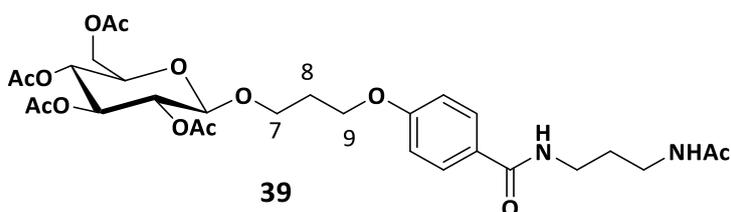
To a solution of glycoside **34** (68 mg, 0.075 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (4 mL) was added piperidine (75 μl , 0.75 mmol, 10 equiv.). The reaction was then stirred overnight at room temperature then neutralized with AcOH (430 μl , 7.5 mmol, 100 equiv.). The mixture was then concentrated and the obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (CyHex 100% then CyHex/AcOEt 70:30) to give pure glycoside **37** as a colourless oil (39 mg, 75%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13 – 7.78 (m, H ar), 7.64 – 7.24 (m, H ar), 6.63 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H ar), 5.53 – 5.38 (m, 2H, H_2 , H_3), 4.84 – 4.69 (m, 2H, H_1 , H_{6a}), 4.65 (dd, $J = 12.2, 2.2$ Hz, 1H, H_{6b}), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 Ethyl), 4.09 (dt, $J = 9.9, 4.7$ Hz, 1H, H_{7a}), 3.99 – 3.68 (m, 5H, H_4 , H_5 , H_{7b} , H_9), 2.10 – 1.94 (m, 2H, H_8), 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 Ethyl).

Glycoside 38:



The Zemplén deacylation was classically applied to get the debenzoylated compound **38**. Briefly to a suspension of compound **35** (122mg, 0.1574 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (1mL) was added sodium (0.7 mg, 31 μ mol, 0.2 equiv.). After the release of hydrogen has ceased, the solution was heated at 50°C for 3h and neutralized by Amberlyst IR-120 (H⁺). The resin was filtered off and the solvent was evaporated. The residual oil was dried under vacuum overnight and given in quantitative yield (56 mg) a light brown solid **38** directly used to the next step. The compound was not fully characterized however an ¹H NMR was done in order to check that all benzoate groups were removed and ethyl ester was replaced by methyl ester. ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.99 – 7.93 (m, 2H, H ar), 7.06 – 6.95 (m, 2H, H ar), 4.29 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H₁), 4.21 (td, J = 6.4, 1.9 Hz, 2H, H₉), 4.09 (dt, J = 10.0, 6.1 Hz, 1H, H_{7a}), 3.90 – 3.81 (m, 4H, OMe, H_{6a}) 3.77 (dt, J = 10.0, 6.2 Hz, 2H, H_{7b}), 3.71 – 3.63 (m, 1H, H_{6b}), 3.37 – 3.26 (m, 3H, H₃, H₄, H₅), 3.23 – 3.15 (m, 1H, H₂), 2.11 (p, J = 6.3 Hz, 2H, H₈).

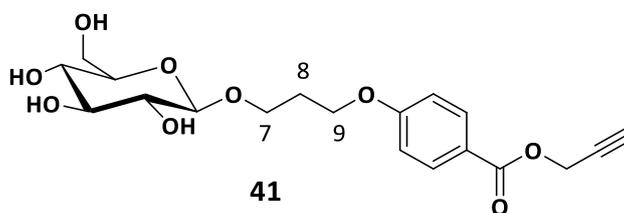
Glycoside 39:



Glycoside **38** (15 mg, 40 μ mol) was introduced in a sealed tube and freshly distilled 1,3-diaminopropane (1 mL) was added. The sealed tube was heated overnight at 130 °C and 1,3-diaminopropane was evaporated. The residue was dissolved in a mixture of pyridine / anhydride acetic 1 : 1 v/v (1 mL) and the reaction was stirred overnight a room temperature. The solvents were removed and the residue was dissolved in DCM (2 mL), washed with a HCl 1M solution then with a saturated solution of NaHCO₃. The resulting organic layer was dried over MgSO₄, filtered off and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM 100% then DCM/isopropanol 90 : 10) providing the acylated compounds **39** (5 mg) [ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₂₉H₄₀N₂NaO₁₃: 647.2423, found: 647.2417. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 8.9

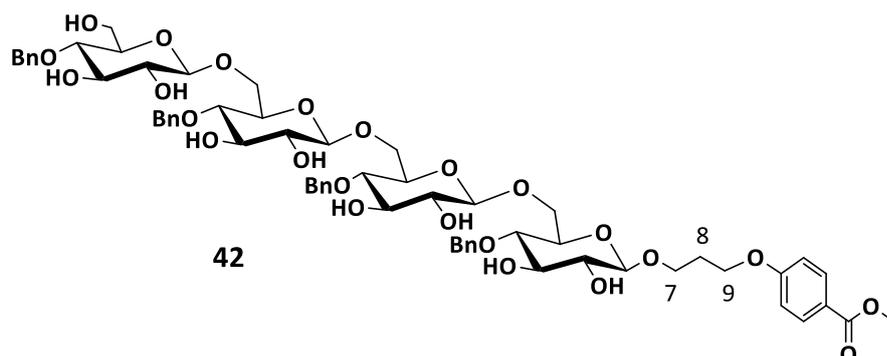
Hz, 2H, H ar), 7.08 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, NH), 6.91 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H ar), 6.19 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH), 5.19 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H₃), 5.07 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H₄), 4.98 (dd, $J = 9.5, 8.0$ Hz, 1H, H₂), 4.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H₁), 4.24 (dd, $J = 12.3, 4.7$ Hz, 1H, H_{6a}), 4.13 – 3.97 (m, 4H, H₉, H_{7a}, H_{6b}), 3.79 – 3.64 (m, 2H, H₅, H_{7b}), 3.48 (q, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH₂NHCO), 3.35 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH₂NHAc), 2.07 (app. s, 5H, H₈, CH₃ Ac), 2.03 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.01 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.99 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.91 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.77 – 1.67 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.3 (CO), 170.8 (CO), 170.4 (CO), 169.5 (CO), 169.4 (CO), 167.4 (CO), 161.6 (C_q ar), 128.9 (C ar), 126.9 (C_q ar), 114.4 (C ar), 101.1 (C₁), 72.9 (C₃), 72.0 (C₅), 71.4 (C₂), 68.6 (C₄), 66.5 (C₇), 64.4 (C₉), 62.1 (C₆), 36.2 (CH₂NHCO), 36.0 (CH₂NHAc), 30.0 (CH₂), 29.5 (C₈), 23.5 (CH₃ Ac), 20.9 (CH₃ Ac), 20.7 (2 \times CH₃ Ac), 20.6 (CH₃ Ac).] and what appears to be the mixed anhydride **[40]** (2 mg).

Glycoside **41**:



The Zemplen's conditions were firstly applied to compounds **35**. Briefly to a suspension of compound **35** (32 mg, 41mmol, 1equiv.) in dry MeOH (1 mL) was added under argon sodium (less than 1mg). The mixture was then heated at 40 °C overnight then MeOH was evaporated to dryness. The residue was taken up in propargyl alcohol (1 mL) previously dried under molecular sieves 4 Å. The mixture was then heated at 90°C for 90 minutes and the reaction was neutralized with Amberlist IR 120 (H⁺) resin. The mixture was filtered off then concentrated. The residue was finally purified by column chromatography on silica gel (DCM 100% then DCM/MeOH 90 : 10) providing after drying compound **41** as a clear transparent oil (11mg, 69%, 2 steps). ESI-HRMS m/z [M+Na]⁺ calculated for C₁₉H₂₄NaO₉: 419.1313, found: 419.1315. ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.13 – 7.88 (m, 2H, H ar), 7.17 – 6.94 (m, 2H, H ar), 4.91 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, CH₂), 4.30 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H₁), 4.22 (td, $J = 6.4, 2.0$ Hz, 2H, H₉), 4.10 (dt, $J = 10.1, 6.1$ Hz, 1H, H_{7a}), 3.93 – 3.84 (m, 1H, H_{6a}), 3.78 (dt, $J = 10.0, 6.2$ Hz, 1H, H_{7b}), 3.72 – 3.63 (m, 1H, H_{6b}), 3.41 – 3.27 (m, 3H, H₃, H₄, H₅), 3.24 – 3.17 (m, 1H, H₂) 2.97 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, C≡CH), 2.13 (p, $J = 6.2$ Hz, 2H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 167.0 (CO ester), 164.8 (C_q ar), 132.7 (C ar), 122.8 (C_q ar), 115.5 (C ar), 104.5 (C₁), 79.0 (C≡CH), 78.0 (C_{Glc}), 77.9 (C_{Glc}), 76.2 (C≡CH), 75.1 (C₂) 71.6 (C_{Glc}), 67.3 (C₇), 66.3 (C₉), 62.7 (C₆), 53.0 (CH₂), 30.7 (C₈).

Benzylated $\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide **42**:



Synthesis of benzylated $\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide **42** on SOLID support:

1) Swelling of functionalized resin **4**:

The dry functionalized resin **4** (251 mg, loading: 0.274 mmol/g, 68.8 μ mol) was placed in a syringe (5 mL) equipped with a frit. Freshly distilled DCM (3 mL) was then added to swell the resin and the syringe was shaken for 20 min.

2) Glycosylation step:

The resin was filtered off then freshly distilled DCM (3 mL) cooled down at 0 °C was added. *p*-Octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-6-O-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **26** (316 mg, 0.344 mmol, 5 equiv.) was then added to the resin followed by NIS (97 mg, 0.43 mmol, 6.25 equiv.) and TfOH (6 μ l, 68.8 μ mol, 1 equiv.). The syringe containing the glycosylation reaction was then shaken for 20 minutes at room temperature. The resin was filtered off then washed with MeOH, a saturated solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, a saturated solution of NaHCO_3 , H_2O , MeOH, and DCM (3 \times 3 min each washing).

3) Deprotection step:

The resin from the glycosylation step was swollen in a DBU solution (2% in DMF, v/v, 2 mL). The syringe containing the deprotection reaction was shaken for 1 h and the resin was then filtered off. The resin was then washed with DMF (3 \times 3 min), DCM (5 \times 3 min), dried overnight under P_2O_5 and swolled with freshly distilled DCM for 20 min. The glycosylation step 2) and deprotection 3) was then repeated 3 times allowing to get the supported tetrasaccharide.

4) $\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide cleavage.

The resin with attached tetrasaccharide was swollen in dry THF (4 mL) then tBuOK (40 mg, 0.357 mmol) in solution in dry MeOH (1 mL) was added. The syringe containing the resin with the cleavage solution was shaken for 42 h. The resin was then filtered off and the filtrate was recovered. The resin was then washed with THF/MeOH 80 : 20 v:v (2 \times 5 mL) and filtrates were recovered and combined with the previous one. The final filtrate was neutralized with AcOH (1 mL) and the solvents were removed under vacuum. The residue was dissolved in a minimum of DCM/MeOH 1 : 1 v:v then purified on a Sephadex LH 20 column chromatography with DCM/MeOH 1 : 1 v:v as eluent giving pure benzylated $\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide **42** (11 mg, 13% global yield) as a transparent syrup. ESI-HRMS m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{63}H_{78}NaO_{24}$: 1241.4775, found: 1241.4786. 1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.96 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H ar), 7.44 – 7.22 (m, 20H, H ar), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 5.02 – 4.88 (m, 4H, CH Bn), 4.75 – 4.58 (m, 4H, CH Bn), 4.38 – 4.27 (m, 3H, 3 \times H₁), 4.25 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H₁), 4.24 – 4.12 (m, 3H, H₉, 1 \times CH_{6a}OGlc), 4.14 – 3.99 (m, 3H, H_{7a}, 2 \times CH_{6a}OGlc), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.83 – 3.71 (m, 5H, 3 \times CH_{6b}OGlc, CH_{6a}OH, H_{7b}), 3.66 (dd, J = 12.4, 5.1 Hz, 1H, CH_{6b}OH), 3.64 – 3.19 (m, 16H, 4 \times H₂, 4 \times H₃, 4 \times H₄, 4 \times H₅), 2.20 – 2.03 (m, 2H, H₈). ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.5 (COOMe), 164.6 (C_q ar), 140.1 (C_q ar), 140.1 (C_q ar), 132.6 (C ar), 129.4 (C ar), 129.3 (C ar), 129.3 (C ar), 129.2 (C ar), 129.2 (C ar), 129.1 (C ar), 129.1 (C ar), 128.7 (C ar), 128.6 (C ar), 123.4 (C_q ar), 115.5 (C ar), 105.2 (C₁), 105.0 (C₁), 105.0 (C₁), 104.4 (C₁), 79.6 (C_{Glc}), 79.6 (C_{Glc}), 79.4 (C_{Glc}), 79.2 (C_{Glc}), 78.5 (3 \times C_{Glc}), 78.4 (C_{Glc}), 77.1 (C_{Glc}), 76.1 (C_{Glc}), 76.0 (C_{Glc}), 75.8 (C_{Glc}), 75.8 (C_{Glc}), 75.7, 75.7 (2 \times CH₂ Bn), 75.4 (C_{Glc}), 75.3 (2 \times C_{Glc}), 75.3 (C_{Glc}), 70.3 (C₆), 70.2 (C₆), 69.8 (C₆), 67.6 (C₇), 66.5 (C₉), 62.4 (C₆ OH), 52.3 (OMe), 30.7 (C₈).

Synthesis of benzylated $\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide **42** on SOLUBLE support:

1.5 equiv. of donor **26** were used for synthesis of supported mono-, di-, and tri- saccharide. 2.0 equiv. were then used in order to promote total formation of supported tetrasaccharide. 2.0 mg of “yellow tracer” **16** were added in the crude after first glycosylation. The yellow color was always visible during purification on size exclusion and there was no need to add supplementary yellow tracer in the following steps. The procedure for every glycosylation-deprotection step and purification on S.E.C for oligosaccharide construction was homogeneous according to the procedure described below:

1) *One-pot* glycosylation / deprotection steps and purification on S.E.C

A solution of soluble polyol core **14** (1 equiv.) and *p*-octyloxyphenyl-2-3-O-dibenzoyl-4-O-benzyl-6-O-fluorenylmethoxycarbonyl-1-thio- β -D-glucopyranoside **26** (1.5 equiv. up to 2.0 equiv. / hydroxyl group) in dry DCM ([donor] = 0.1M) under argon was previously cooled down in an ice bath. Then NIS (1.2 equiv. / donor) was added followed by TfOH (0.3 equiv. / donor). The reaction was stirred under argon for 1 h at room temperature then neutralized with piperidine (0.5 mL). The mixture was then stirred for 1 h and solvents were removed under vacuum to dryness. The residue was taken up in a minimum of a solution of DCM / MeOH 1: 1 v/v then dropped on a column chromatography (length: 400 mm, diameter: 35 mm) filled with Sephadex LH20 previously conditioned with DCM / MeOH 1:1 v/v. The crude was eluted with DCM / MeOH 1:1 v/v with a flow of around 2 mL.min⁻¹ and fraction volumes not exceeding 2 mL. The first colored fractions are kept and spotted on a TLC plate. The TLC is then immersed in EtOH containing H₂SO₄ (10%), burned with a heat gun and only fractions with dark spots revealing the presence of oligosaccharide are kept. This TLC control is not mandatory and used only here for control.

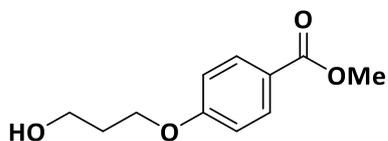
The protocol was repeated 4 times from 40 mg (23.94 μ mol) of soluble polyol core **14** made it possible to obtain after solvents evaporation 91 mg, 134 mg, 170 and 205 mg corresponding respectively to supported mono- (86%), di- (91%), tri- (92%) and tetrasaccharide (94%). Every supported intermediate oligosaccharide was analyzed on NMR ¹³C with special attention around area of 100 ppm to identify formation of anomer carbons.

2) Tetrasaccharide cleavage.

To a suspension of supported tetrasaccharide (205 mg, 16.12 μ mol) in a mixture of dry MeOH / THF 1 : 1 v/v (1.5 mL) at 0 °C under argon was added carefully sodium (4mg). The mixture was let at 0 °C until stopping the release of dihydrogen then was heated at 40 °C overnight under argon. The reaction was then neutralized with Amberlyst IR 120 (H⁺) resin, filtered off and solvents were evaporated under vacuum. The residue was then solubilized in the minimum of a mixture of DCM / MeOH 1:1 v/v then dropped on a column chromatography filled with Sephadex LH20 conditioned with DCM / MeOH 1:1 v/v. The compounds were then eluted with a flow rate of DCM / MeOH 1 : 1 of approximately 2 mL.min⁻¹ with volume of the fractions not exceeding 2 mL. Fractions were then spotted on TLC plate and eluted with DCM / MeOH 90 : 10. The TLC is then immersed in EtOH containing H₂SO₄ (10%), burned with a heat gun and only first fractions revealing the presence of

tetrasaccharides are kept. The solvents were then removed under vacuum allowing to benzylated $\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide **42** as a transparent syrup (76 mg, 43% overall yield).

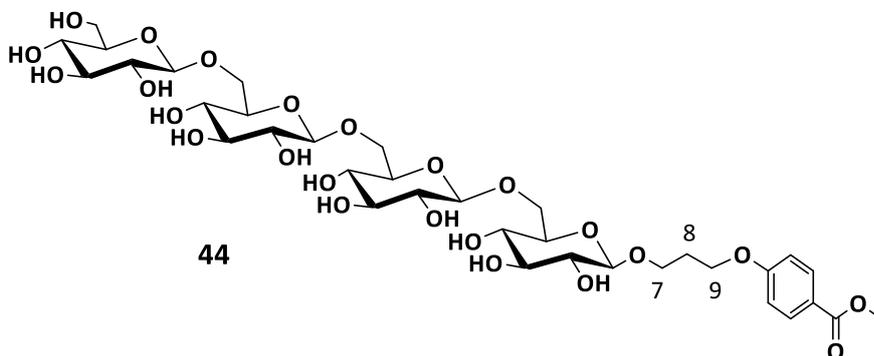
Benzoic acid, 4-(3-hydroxypropoxy)-, methyl ester **43**



43

To a suspension of ethyl 4-(3-Hydroxypropoxy)benzoate **5** (100 mg, 0.4464 mmol, 1 equiv.) in dry MeOH (5 mL) at 0 °C under argon was added sodium (2 mg, 0.089 mmol, 0.2 equiv.). After releasing of dihydrogen, the reaction was stirred at 40 °C overnight. The mixture was then neutralized with Amberlyst IR 120 (H⁺) resin. The resin was filtered off and the filtrate was evaporated under vacuum to give pure Methyl 4-(3-Hydroxypropoxy)benzoate **43** (87 mg) in a quantitative yield. NMR characterization was in accordance with the literature¹²⁴. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.09 – 7.90 (m, 2H, H ar), 6.99 – 6.84 (m, 2H, H ar), 4.17 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂), 3.94 – 3.77 (m, 5H, CH₂, OMe), 2.17 – 1.96 (m, 2H, CH₂).

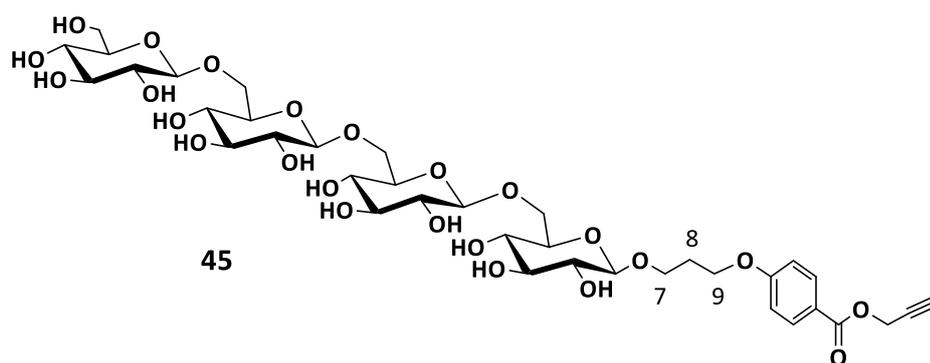
$\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide **44**:



To a solution of benzylated $\beta(1\rightarrow6)$ glucan tetrasaccharide **42** (65 mg, 53.37 μ mol) in a mixture of dry THF / MeOH 1: 1 v/v (2 mL) was added palladium on carbon 10% weight (30 mg). The reaction was exposed to a dihydrogen atmosphere at 5 bars for 4 h. The reaction mixture was then filtered through a Celite[®] pad and the solvents were removed under vacuum. The residue was then purified by preparative HPLC (column: C18-Nucleodur (21 \times 250 mm; 5 μ m); flow rate: 14 mL \cdot min⁻¹; eluents: H₂O + 0.1% TFA v/v and MeCN + 0.1% TFA) then freeze-dried to afford fully deprotected

tetrasaccharide **44** as a white foam (37 mg, 80%). ESI-HRMS m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{35}H_{54}NaO_{24}$: 881.2897, found: 881.2899. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.02 – 7.84 (m, 2H, H ar), 7.08 – 6.91 (m, 2H, H ar), 4.42 – 4.36 (m, 3H, 3 \times H₁), 4.32 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H₁), 4.24 – 4.12 (m, 5H, 3 \times CH_{6a}OGlc, H₉), 4.06 (dt, J = 10.1, 6.0 Hz, 1H, H_{7a}), 3.86 (app. s, 4H, OMe, CH_{6a}OH), 3.82 – 3.74 (m, 4H, 3 \times CH_{6b}OGlc, H_{7b}), 3.70 (dd, J = 11.8, 5.0 Hz, 1H, CH_{6b}OH), 3.56 – 3.43 (m, 3H, 3 \times H₅), 3.42 – 3.17 (m, 13H, 4 \times H₂, 4 \times H₃, 4 \times H₄, 1 \times H₅), 2.16 – 2.05 (m, 2H, H₈). ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.5 (COOMe), 164.5 (C_q ar), 132.6 (C ar), 123.3 (C_q ar), 115.4 (C ar), 104.9 (1 \times C₁), 104.9 (2 \times C₁), 104.4 (1 \times C₁), 77.9 (4 \times C₃ or 4 \times C₄), 77.0 (C₅), 76.9 (C₅), 76.8 (C₅), 75.0 (4 \times C₂), 71.6 (C₅), 71.5 (4 \times C₃ or 4 \times C₄), 70.4 (C₆), 70.3 (C₆), 70.0 (C₆), 67.5 (C₇), 66.4 (C₉), 62.7 (C₆OH), 52.4 (OMe), 30.7 (C₈).

β (1 \rightarrow 6) glucan tetrasaccharide **45**:



β (1 \rightarrow 6) glucan tetrasaccharide **44** (20 mg, 23 μ mol) was solubilized in propargyl alcohol (2mL) previously dried over molecular sieves 4 \AA . The mixture was then cooled down at 0 $^{\circ}C$ in an ice bath then sodium (2mg) was added. After stop of the release of dihydrogen the mixture was heated at 90 $^{\circ}C$ for 90 minutes under argon. The reaction was neutralized with Amberlyst IR 120 (H⁺) resin, filtered off and propargyl alcohol was evaporated under vacuum. When the residue has been completely free of propargyl alcohol, the resulting transesterified tetrasaccharide was purified by preparative HPLC (column: C18-Nucleodur (21 \times 250 mm; 5 μ m); flow rate: 14 mL \cdot min⁻¹; eluents: H₂O + 0.1% TFA v/v and MeCN + 0.1% TFA) then freeze-dried to afford β (1 \rightarrow 6) glucan tetrasaccharide **45** as a white foam (12 mg, 58%). APCI-HRMS m/z $[M+NH_4]^+$ calculated for $C_{37}H_{58}NO_{24}$: 900.3343, found: 900.3351. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H ar), 7.06 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H ar), 4.92 (d, J = 2.4 Hz, 2H, CH₂), 4.45 – 4.37 (m, 3H, 3 \times H₁), 4.33 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H₁), 4.29 – 4.14 (m, 5H, 3 \times CH_{6a}OGlc, H₉), 4.09 (dt, J = 10.4, 6.0 Hz, 1H, H_{7a}), 3.92 – 3.86 (m, 1H, CH_{6a}OH), 3.85 – 3.76 (m, 4H, 3 \times CH_{6b}OGlc, H_{7b}), 3.70 (dd, J = 11.9, 5.0 Hz, 1H, CH_{6b}OH), 3.56 – 3.45 (m, 3H, 3 \times H₅), 3.43 – 3.19 (m, 13H, 4 \times H₂, 4 \times H₃, 4 \times H₄, 1 \times H₅), 2.97 (t, J = 2.4 Hz, 1H, C \equiv CH), 2.20 – 2.08 (m, 1H, H₈). ^{13}C NMR (151 MHz, MeOD) δ 167.0 (CO ester), 164.9 (C_q ar), 132.8 (C ar), 122.8 (C_q ar), 115.6 (C ar), 105.0 (C₁), 104.9 (C₁), 104.9

(C₁), 104.5 (C₁), 78.0 – 77.9 (4 × C₃ or 4 × C₄), 77.1 (C₅), 77.0 (C₅), 76.9 (C₅), 76.2 (C≡CH), 75.1–75.0 (4 × C₂, 1 × C₅), 71.7 (C₃ or C₄), 71.7 (C₃ or C₄), 71.6 (C₃ or C₄), 71.6 (C₃ or C₄), 70.5 (C₆), 70.4 (C₆), 70.0 (C₆), 67.5 (C₇), 66.5 (C₉), 62.7 (C₆OH), 53.0 (CH₂), 30.7 (C₈).

11 Bibliographie

- 1 W. Vollmer, D. Blanot and M. A. De Pedro, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, **32**, 149–167.
- 2 A. Varki, *Glycobiology*, 2017, **27**, 3–49.
- 3 R. Kaur, M. Sharma, D. Ji, M. Xu and D. Agyei, *Fibers*, 2020, **8**, 1–29.
- 4 N. Dalonso, G. H. Goldman and R. M. M. Gern, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, **99**, 7893–7906.
- 5 M. G. Netea, G. D. Brown, B. J. Kullberg and N. A. R. Gow, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, **6**, 67–78.
- 6 M. C. Hewitt and P. H. Seeberger, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 4233–4243.
- 7 M. Pourcelot, L. Cattiaux, G. Sfihi-Loualia, E. Fabre, F. Krzewinski, C. Fradin, D. Poulain, F. Delplace, Y. Guérardel and J.-M. Mallet, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 22560–22571.
- 8 A. Gucchait, A. Ghosh and A. K. Misra, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2019, **15**, 431–436.
- 9 B. Fraser-Reid, U. E. Udodong, Z. Wu, H. Ottosson, J. R. Merritt, C. S. Rao, C. Roberts and R. Madsen, *Synlett*, 1992, **1992**, 927–942.
- 10 Y. Yang, X. Zhang and B. Yu, *Nat. Prod. Rep.*, 2015, **32**, 1331–1355.
- 11 R. R. Schmidt and J. Michel, *Angew. Chem.*, 1980, **92**, 763–764.
- 12 B. Yu and H. Tao, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 2405–2407.
- 13 R. J. Ferrier, R. W. Hay and N. Vethaviasar, *Carbohydr. Res.*, 1973, **27**, 55–61.
- 14 F. Barresi and O. Hindsgaul, *J. Carbohydr. Chem.*, 1995, **14**, 1043–1087.
- 15 M. Jacobsson, J. Malmberg and U. Ellervik, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 1266–1281.
- 16 H. Dohi and Y. Nishida, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2014, **26**, 119–130.
- 17 G. Magnusson, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 913–914.
- 18 H. Matsui, J. Furukawa, T. Awano, N. Nishi and N. Sakairi, *Chem. Lett.*, 2000, **29**, 326–327.
- 19 Z. Li and J. C. Gildersleeve, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 11612–11619.
- 20 J. Hasegawa, M. Hamada, T. Miyamoto, K. Nishide, T. Kajimoto, J. Uenishi and M. Node, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 2360–2368.
- 21 H. Dohi, Y. Nishida, H. Tanaka and K. Kobayashi, *Synlett* 2001, No. **9**, 1446–1448
- 22 M. Collot, J. Savreux and J.-M. Mallet, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 1523–1535.
- 23 L. Cattiaux, B. Sendid, M. Collot, E. Machez, D. Poulain and J.-M. Mallet, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 547–555.
- 24 P. Fügedi and P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.*, 1986, **149**, C9–C12.
- 25 M. Ravenscroft, R. M. G. Roberts and J. G. Tillett, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1982, 1569–1572.
- 26 D. Crich and M. Smith, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 4067–4069.
- 27 D. Crich and M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 9015–9020.
- 28 C. Amatore, A. Jutand, J.-M. Mallet, G. Meyer and P. Sinay, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 718–719.
- 29 G. Balavoine, A. Gref, J.-C. Fischer and A. Lubineau, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 5761–5764.
- 30 A. Marra, J.-M. Mallet, C. Amatore and P. Sinaÿ, *Synlett*, 1990, **10**, 572–574.
- 31 M. Nakanishi, D. Takahashi and K. Toshima, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 5079–5082.

- 32 K. C. Nicolaou, S. P. Seitz and D. P. Papahatjis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 2430–2434.
- 33 G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen and J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 1331–1334.
- 34 P. Konradsson, D. R. Mootoo, R. E. McDevitt and B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 270–272.
- 35 G. Lian, X. Zhang and B. Yu, *Carbohydr. Res.*, 2015, **403**, 13–22.
- 36 M. Goswami, A. Ellern and N. L. B. Pohl, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 8441–8445.
- 37 D. E. K. Kabotso and N. L. B. Pohl, *Org. Lett.*, 2017, **19**, 4516–4519.
- 38 S. G. Durón, T. Polat and C.-H. Wong, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 839–841.
- 39 S. C. Virgil, Y. Zeng, F. Kong, J. A. Pigza, S. J. S. Roy and S. Mukherjee, in *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, American Cancer Society, 2018, 1–10.
- 40 A.-H. A. Chu, A. Minciunescu, V. Montanari, K. Kumar and C. S. Bennett, *Org. Lett.*, 2014, **16**, 1780–1782.
- 41 J. Kihlberg, E. Eichler and D. R. Bundle, *Carbohydr. Res.*, 1991, **211**, 59–75.
- 42 S. Arafuka, N. Koshihara, D. Takahashi and K. Toshima, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 9831–9834.
- 43 H. Zhang, S. Zhou, Y. Zhao and J. Gao, *Org. Biomol. Chem.*, 2019, **17**, 5839–5848.
- 44 Z. Zhang, I. R. Ollmann, X.-S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov and C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 734–753.
- 45 Z.-H. Qin, H. Li, M.-S. Cai and Z.-J. Li, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 31–36.
- 46 R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2149–2154.
- 47 C. Schuerch and J. M. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 492–496.
- 48 X. Wu, M. Grathwohl and R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, **41**, No. 235, 4489–4493.
- 49 O. J. Plante, E. R. Palmacci and P. H. Seeberger, *Science*, 2001, **291**, 1523–1527.
- 50 L. Kröck, D. Esposito, B. Castagner, C.-C. Wang, P. Bindschädler and P. H. Seeberger, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 1617.
- 51 S. Eller, M. Collot, J. Yin, H. S. Hahm and P. H. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 5858–5861.
- 52 M. Delbianco, A. Kononov, A. Poveda, Y. Yu, T. Diercks, J. Jiménez-Barbero and P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 5421–5426.
- 53 M. W. Weishaupt, S. Matthies and P. H. Seeberger, *Chem. - Eur. J.*, 2013, **19**, 12497–12503.
- 54 E. R. Palmacci, O. J. Plante and P. H. Seeberger, *Eur J Org Chem*, 2002, **12**, 595–606.
- 55 N. V. Ganesh, K. Fujikawa, Y. H. Tan, K. J. Stine and A. V. Demchenko, *Org Lett*, 2012, **14**, 4.
- 56 M. Panza, K. J. Stine and A. V. Demchenko, *Chem. Commun.*, 2020, **56**, 1333–1336.
- 57 H. M. I. Osborn and T. H. Khan, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 1807–1850.
- 58 D. Majumdar, T. Zhu and G.-J. Boons, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 3591–3594.
- 59 A. Vartak, S. Thanna, K. Meyer, M. Dermanelian and S. J. Sucheck, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 41612–41619.
- 60 R. A. Kyle, D. P. Steensma and M. A. Shampo, *Mayo Clin. Proc.*, 2016, **91**, e45–e46.
- 61 C. H. Bamford and R. G. W. Norrish, *J Chem Soc*, 1935, 1504–1511.

- 62 I. T. Horváth and J. Rábai, *Science*, 1994, **266**, 72–75.
- 63 T. Miura, Y. Hirose, M. Ohmae and T. Inazu, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 3947–3950.
- 64 D. P. Curran, S. Hadida and M. He, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 6714–6715.
- 65 F. A. Jaipuri and N. L. Pohl, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 2686.
- 66 S. K. Mamidyala, K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, G. Park and N. L. Pohl, *J. Fluor. Chem.*, 2006, **127**, 571–579.
- 67 S.-L. Tang and N. L. B. Pohl, *Org. Lett.*, 2015, **17**, 2642–2645.
- 68 S.-L. Tang and N. L. B. Pohl, *Carbohydr. Res.*, 2016, **430**, 8–15.
- 69 B. Yang, Y. Jing and X. Huang, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, **2010**, 1290–1298.
- 70 S. Bhaduri and N. L. B. Pohl, *Org. Lett.*, 2016, **18**, 1414–1417.
- 71 S. Maza, N. Gandia-Aguado, J. L. de Paz and P. M. Nieto, *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, **26**, 1076–1085.
- 72 Y. Feng, J. Wu, G. Chen and Y. Chai, *Org. Lett.*, 2020, **22**, 2564–2568.
- 73 V. Pozsgay, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 477–480.
- 74 V. Pozsgay, *Tetrahedron Asymmetry*, 2000, **11**, 151–172.
- 75 J. Bauer and J. Rademann, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 7296–7297.
- 76 S. Meng, T. Tian, Y.-H. Wang, X.-B. Meng and Z.-J. Li, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 7722–7730.
- 77 X. He and T. Chan, *Synthesis*, 2006, **2006**, 1645–1651.
- 78 A. K. Pathak, C. K. Yerneni, Z. Young and V. Pathak, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 145–148.
- 79 A.-T. Tran, R. Burden, D. T. Racys and M. Carmen Galan, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 4526.
- 80 Q. Ma, S. Sun, X.-B. Meng, Q. Li, S.-C. Li and Z.-J. Li, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 5652–5660.
- 81 I. Sittel, A.-T. Tran, D. Benito-Alifonso and M. C. Galan, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 4217.
- 82 M. A. Djordjevic, A. Bezos, Susanti, L. Marmuse, H. Driguez, E. Samain, B. Vauzeilles, J.-M. Beau, F. Kordbacheh, B. G. Rolfe, R. Schwörer, A. M. Daines, P. M. Gresshoff and C. R. Parish, *PLOS ONE*, 2014, **9**, e112635.
- 83 L. Gillard, A.-T. Tran, F.-D. Boyer and J.-M. Beau, *Eur. J. Org. Chem.*, 2016, 1103–1109.
- 84 Y. Wang, X. Zhao, Q. Kong, J. Yao, X. Meng and Z. Li, *Tetrahedron Lett.*, 2017, **58**, 1655–1658.
- 85 W. Li, Y. Gao, Q. Li and Z.-J. Li, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 4720–4727.
- 86 K. Ágoston, L. Kröger, Á. Ágoston, G. Dékány and J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 1428–1433.
- 87 L. Cattiaux, A. Mée, M. Pourcelot, G. Sfihi-Loualia, T. Hurtaux, E. Maes, C. Fradin, B. Sendid, D. Poulain, E. Fabre, F. Delplace, Y. Guérardel and J.-M. Mallet, *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**, 1362–1368.
- 88 M. A. Tilak and C. S. Hollinden, *Org. Prep. Proced. Int.*, 1971, **3**, 183–186.
- 89 G. Galli, P. Nieri, C. K. Ober and E. Chiellini, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, 1982, **3**, 543–548.
- 90 J. M. G. Cowie and H. H. Wu, *Macromolecules*, 1988, **21**, 2865–2869.
- 91 V. K. Sarin, S. B. H. Kent and R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 5463–5470.
- 92 R. Haag, A. Hebel and J.-F. Stumbé, in *Handbook of Combinatorial Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2002, 24–58.
- 93 M. Gude, J. Ryf and P. D. White, *Lett. Pept. Sci.*, 2002, **9**, 203–206.

- 94 E. B. Lindner, A. Elmqvist and J. Porath, *Nature*, 1959, **184**, 1565–1566.
- 95 M. Joustra, B. Söderqvist and L. Fischer, *J. Chromatogr. A*, 1967, **28**, 21–25.
- 96 L. Andruzzi, G. Galli and B. Gallot, *Macromolecules*, 2001, **34**, 7707–7714.
- 97 T. Iwata, K. Suzuki, N. Amaya, H. Higuchi, H. Masunaga, S. Sasaki and H. Kikuchi, *Macromolecules*, 2009, **42**, 2002–2008.
- 98 D. Fourcade, B. S. Ritter, P. Walter, R. Schönfeld and R. Mülhaupt, *Green Chem.*, 2013, **15**, 910.
- 99 M. Dubber and T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.*, 1998, **310**, 35–41.
- 100 M. Dubber, O. Sperling and T. K. Lindhorst, *Org Biomol Chem*, 2006, **4**, 3901–3912.
- 101 L. Cattiaux, V. Porkolab, F. Fieschi and J.-M. Mallet, *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, **26**, 1006–1015.
- 102 R. Sharma, N. Kottari, Y. M. Chabre, L. Abbassi, T. C. Shiao and R. Roy, *Chem Commun*, 2014, **50**, 13300–13303.
- 103 H. C. Ahn and K. Choi, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 3853–3855.
- 104 U. Lorenz, *Curr. Protoc. Immunol.*, 2011, **93**, 11.7.1-11.7.12.
- 105 S.-H. Son, C. Tano, T. Furuike and N. Sakairi, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5289–5292.
- 106 T. Kajimoto, Y. Ishioka, T. Katoh and M. Node, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 5736–5739.
- 107 F. Vibert, S. R. A. Marque, E. Bloch, S. Queyroy, M. P. Bertrand, S. Gastaldi and E. Besson, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 5434–5439.
- 108 T. Kajimoto, K. Arimitsu, M. Ozeki and M. Node, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2010, **58**, 758–764.
- 109 Z. Wang, American Cancer Society, 2010, 3123–3128.
- 110 K. Ishihara, H. Kurihara and H. Yamamoto, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3791–3793.
- 111 G. Despras, C. Bernard, A. Perrot, L. Cattiaux, A. Prochiantz, H. Lortat-Jacob and J.-M. Mallet, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 531–540.
- 112 K. Daragics and P. Fügedi, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 2914–2916.
- 113 M. Yun, S. Yoon, Y. Shin, K. H. Chun and J. E. N. Shin. *Arch Pharm Res*, 2004, Vol 27, No 2, 143–150.
- 114 M. Lahmann and S. Oscarson, *Can. J. Chem.*, 2002, **80**, 889–893.
- 115 T. C. Shiao and R. Roy. *Reactivity Tuning in Oligosaccharide Assembly*, eds. B. Fraser-Reid and J. Cristóbal López, Springer, Berlin, Heidelberg, 2011, 69–108.
- 116 F. W. Lichtenthaler and B. Werner, *Carbohydr. Res.*, 1998, **305**, 293–303
- 117 R. Chevalier, J. Esnault, P. Vandewalle, B. Sendid, J.-F. Colombel, D. Poulain and J.-M. Mallet, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 7669–7677.
- 118 O. Arjona, A. de Dios, C. Montero and J. Plumet, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 9191–9200.
- 119 M. Filice, T. Bavaro, R. Fernandez-Lafuente, M. Pregnolato, J. M. Guisan, J. M. Palomo and M. Terreni, *Catal. Today*, 2009, **140**, 11–18.
- 120 M. Ueki and M. Amemiya, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 6617–6620.
- 121 P. Pařík, J. Jansa, S. Holešová, A. Marek and V. Klimešová, *J. Heterocycl. Chem.*, 2013, **50**, 903–910.

- 122 D. A. Wellings and E. Atherton, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1997, vol. **289**, 44–67.
- 123 T. Vojkovsky, *Pept. Res.*, 1995, **8**, 236–237.
- 124 C. Cavedon, A. Madani, P. H. Seeberger and B. Pieber, *Org. Lett.*, 2019, **21**, 5331–5334.
- 125 C. P. Kaushik, K. Kumar, D. Singh, S. K. Singh, D. K. Jindal and R. Luxmi, *Synth. Commun.*, 2015, **45**, 1977–1985.
- 126 K. Upadhyaya, H. Hamidullah, K. Singh, A. Arun, M. Shukla, N. Srivastava, R. Ashraf, A. Sharma, R. Mahar, S. K. Shukla, J. Sarkar, R. Ramachandran, J. Lal, R. Konwar and R. P. Tripathi, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 1338–1358.
- 127 A. Kiss, J. Wölfling, E. Mernyák, É. Frank, Z. Benke, S. Ashkan Senobar Tahaei, I. Zupkó, S. Mahó and G. Schneider, *Steroids*, 2019, **152**, 108500.

RÉSUMÉ

Les oligosaccharides sont des molécules omniprésentes dans le monde vivant et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (marqueurs de reconnaissance cellulaire, tumoraux, antigéniques, ...). Ces mécanismes biologiques ont incité les chimistes à développer de nouvelles méthodologies de synthèse pour obtenir rapidement cette classe de biomolécules. L'objectif de ce projet a été d'adapter la synthèse classique d'oligosaccharides à la synthèse supportée comme la synthèse peptidique où chaque intermédiaire est purifié par simple filtration. Pour cela, un nouveau support soluble construit sur un noyau symétrique a été synthétisé permettant d'isoler facilement les intermédiaires par chromatographie d'exclusion stérique. La construction des oligosaccharides s'est quant à elle basée sur les thioglycosides comme précurseurs. Ces derniers ont également fait l'objet d'une synthèse originale d'un thiol sans odeur permettant d'élaborer des thioglycosides encore plus réactifs que ceux développés au Laboratoire. Cette méthode de synthèse supportée basée sur des thioglycosides a ainsi permis d'obtenir un tétrasaccharide avec un rendement global de 43%. Ce tétrasaccharide a ensuite été fonctionnalisé afin d'obtenir une molécule cible prête à être conjuguée à une autre molécule d'intérêt (peptide, biotine, sonde fluorescente, ...)

MOTS CLÉS

Oligosaccharide, thioglycoside, synthèse supportée

ABSTRACT

Oligosaccharides are ubiquitous molecules in the living world and are involved in many biological processes (cell recognition markers, tumors, antigens, etc.). These biological mechanisms have prompted chemists to develop new synthetic methodologies to quickly obtain this class of biomolecules. The goal of this project was therefore to adapt the classical synthesis of oligosaccharides to the synthesis supported such as peptide synthesis where each intermediate is purified by simple filtration. For this, a new soluble support built on a symmetrical nucleus was synthesized allowing easy isolation of the intermediates by size exclusion chromatography. The construction of the oligosaccharides was based on thioglycosides. The latter have also been the subject of an original synthesis of an odorless thiol making it possible to produce thioglycosides that are even more reactive than those developed in the Laboratory. This supported synthesis method based on thioglycosides thus made it possible to obtain a tetrasaccharide with an overall yield of 43%. This tetrasaccharide was then functionalized in order to obtain a target molecule ready to be conjugated to another molecule of interest (peptide, biotin or fluorescent probe)

KEYWORDS

Oligosaccharide, thioglycoside, supported synthesis