

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :

Aude VIBERT

Soutenue le : **30 novembre 2009**

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

Discipline : Chimie Organique

**SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES DE
CHONDROITINES ET DE SULFATES DE
CHONDROITINES BIOTINYLES POUR L'ÉTUDE
DE LA BIOSYNTHESE DES
PROTEOGLYCANES DU CARTILAGE**

THÈSE dirigée par :

M. Jean-Claude JACQUINET Directeur de Recherche INSERM, Orléans

RAPPORTEURS :

M. David BONNAFFE Professeur, Université de Paris-Sud, Orsay

M. Vincent FERRIERES Professeur, ENSC, Rennes

JURY :

M. Olivier MARTIN Professeur, Orléans, Président du jury

M. David BONNAFFE Professeur, Université de Paris-Sud, Orsay

M. David CRICH Professeur, ICSN, Gif-sur-Yvette

M. Vincent FERRIERES Professeur, ENSC, Rennes

Mme Chrystel LOPIN-BON Maître de conférences, Orléans

M. Jean-Claude JACQUINET Directeur de Recherche INSERM, Orléans

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :
Aude VIBERT

Soutenue le : **30 novembre 2009**

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

Discipline : Chimie Organique

**SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES DE
CHONDROITINES ET DE SULFATES DE
CHONDROITINES BIOTINYLES POUR L'ÉTUDE
DE LA BIOSYNTHESE DES
PROTEOGLYCANES DU CARTILAGE**

THÈSE dirigée par :

M. Jean-Claude JACQUINET Directeur de Recherche INSERM, Orléans

RAPPORTEURS :

M. David BONNAFFE

Professeur, Université de Paris-Sud, Orsay

M. Vincent FERRIERES

Professeur, ENSC, Rennes

JURY :

M. Olivier MARTIN

Professeur, Orléans, Président du jury

M. David BONNAFFE

Professeur, Université de Paris-Sud, Orsay

M. David CRICH

Professeur, ICSN, Gif-sur-Yvette

M. Vincent FERRIERES

Professeur, ENSC, Rennes

Mme Chrystel LOPIN-BON

Maître de conférences, Orléans

M. Jean-Claude JACQUINET

Directeur de Recherche INSERM, Orléans

*A mes parents,
A mes soeurs,
A tous ceux qui m'ont soutenue.*

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein l'Institut de Chimie Organique et Analytique (UMR 6005) de l'Université d'Orléans, sous la direction du Docteur Jean-Claude Jacquinet et du Docteur Chrystel Lopin-Bon.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et l'ANR-05-BLAN (GAG-GT) pour leur soutien financier.

Je tiens à remercier Messieurs David Bonnaffé, Professeur à l'Université de Paris-Sud et Vincent Ferrières, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, d'avoir accepté de juger ce travail en étant rapporteurs.

Je remercie également Messieurs David Crich, Professeur à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette et Olivier Martin, Professeur à l'Université d'Orléans, d'avoir aimablement accepté de prendre part à mon jury de thèse.

Un grand merci à Monsieur Jean-Claude Jacquinet, Directeur de Recherche INSERM, pour ce sujet de thèse qui m'a tant apporté. Merci pour tous ses bons conseils et la pédagogie dont il m'a fait profiter, pour toutes nos discussions mais surtout d'avoir été un directeur de thèse si disponible et présent du début à la fin.

Un énorme Merci à Madame Chrystel Lopin-Bon, maître de conférences à l'Université d'Orléans, pour son aide et son soutien pendant mes quatre années au laboratoire. Merci d'avoir été si patiente et si disponible pour les nombreuses répétitions de mes communications orales, mes corrections, pour nos intenses séances d'analyses de spectres RMN, pour nos manipulations en duo (les bonnes et les mauvaises), pour ses conseils pour le présent et pour l'avenir et son soutien permanent. Merci d'avoir été une encadrante comme il en existe peu. Et un merci tout particulier à Franck d'avoir été si patient et compréhensif.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame Valérie Desvergnès, Chargée de Recherche CNRS, avec qui j'ai effectué mon premier stage à l'ICOA et qui a su me faire partager et me transmettre sa passion pour la recherche en chimie organique et qui m'a donné l'envie de faire une thèse.

Merci aussi à Monsieur Vincent Pomel, qui a été mon superviseur lors de mon stage en entreprise, pour avoir conforté cette envie.

Je n'oublie pas les anciennes du labo 8. Farah, ma collègue de laboratoire et de bureau pendant un an et demi et Caryn, avec qui j'ai passé de bons moments. Un merci plus particulier à Emmanuelle pour nos fous-rire parfois dus à sa maladresse au laboratoire et puis par la suite pendant nos séances de sport...

Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé une ou plusieurs années à l'ICOA. Mes compagnons du déjeuner à la tisanerie : Myriam (mon taxi lors de ma première année de fac), Arnaud, Nathalie, mais aussi Christelle (ma voisine), Virginie (ma voisine du labo 7, pour toutes nos discussions au labo, en congrès et lors de nos soirées), Ugo (avec qui j'ai découvert les joies de l'enseignement, les cours du CIES, la chimie générale,...), Catherine, Niko, Sylvestre, Matthieu, Ana Catarina, Sandrina, Sandrine, Deimante, Elise, Jérôme, Abdel, Laurent, Fred, Nico, Aurélien, Alexis, Monika, Fabien, Mathieu, Emeline, Sophie, Estelle, Franck, Raphaël, Emilie, Jean-Marie et tous les autres pour la bonne ambiance qui règne au sein de l'Institut.

Je tiens également à remercier les stagiaires qui sont passés au laboratoire, Claire, Rémi, Romain, Thomas et plus particulièrement Anne-Catherine (la championne du TCA).

Je remercie aussi Véronique avec qui les TP furent un réel plaisir, pour son aide précieuse et sa bonne humeur pendant ces séances. Un merci tout particulier à Hélène, en premier lieu pour nos premiers TP et surtout, par la suite, pour avoir été une collègue de laboratoire si agréable. Merci d'avoir été si enthousiaste et impliquée lorsque nous avons travaillé ensemble et puis pour toutes nos discussions chimiques et parfois (même souvent) culinaires!, pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble.

J'adresse un grand merci à mes amies Sophie et Camille pour nos escapades et toutes nos discussions, à Laetitia pour avoir été une oreille attentive pendant nos soirées.

Je remercie profondément Julien pour m'avoir toujours soutenue, pour avoir su m'encourager et trouver les mots justes à chaque instant.

Et enfin, je remercie de tout cœur mes parents (merci pour tout), mes sœurs Charlotte et Alice, ma grand-mère, mes grands-parents, ma famille pour leur soutien quotidien et leurs mots réconfortants et sans qui cette thèse n'aurait pu être accomplie.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	- 1 -
INTRODUCTION	-3-Erreur ! Signet non défini.
I- INTRODUCTION BIOLOGIQUE	- 4 -
I-1 L'ARTHROSE ET LE CARTILAGE.....	- 4 -
I-1.1 Arthrose : Généralités	- 4 -
I-1.2 Cartilage et articulation	- 5 -
I-1.3 Le processus arthrosique.....	- 6 -
I-2 LES PROTEOGLYCANES (PGs)	- 8 -
I-2.1 Définition	- 8 -
I-2.2 Structures et propriétés des protéoglycanes.....	- 11 -
I-3 LES SULFATES DE CHONDROITINES (CS).....	- 12 -
I-3.1 Définition et structure	- 12 -
I-3.2 Propriétés biologiques	- 13 -
I-4 BIOSYNTHESE DES PROTEOGLYCANES	- 15 -
I-4.1 Biosynthèse	- 15 -
I-4.2 Polymérisation des chaînes de sulfates de chondroïtines.....	- 16 -
I-4.3 Conclusion	- 17 -
I-5 NECESSITE DE LA SYNTHÈSE CHIMIQUE	- 17 -
II- TRAVAUX DE SYNTHÈSES DECRITS DANS LA LITTÉRATURE.....	- 18 -
II-1 SYNTHÈSES PAR VOIE CHIMIQUE.....	- 18 -
II-1.1 Première synthèse d'un disaccharide de sulfate de chondroïtine A.....	- 18 -
II-1.2 Synthèse de disaccharides de sulfates de chondroïtines A et C	- 20 -
II-1.3 Synthèse d'un trisaccharide de sulfate de chondroïtine A.....	- 21 -
II-1.4 Synthèse de di-, tri- et tétrasaccharides de chondroïtines et sulfates de chondroïtines A, C et E- 23 -	- 23 -
II-1.5 Synthèse de disaccharides réducteurs de sulfates de chondroïtines A et C	- 25 -
II-1.6 Synthèse de pentasaccharides de sulfates de chondroïtines A et C.....	- 27 -
II-1.8 Synthèse de di- et tétrasaccharide de sulfate de chondroïtine E	- 31 -
II-1.9 Synthèse d'un hexa- et d'un octasaccharide de sulfate de chondroïtine E.....	- 33 -
II-1.10 Synthèse d'oligomères de chondroïtines à partir d'un polymère.....	- 33 -
II-2 SYNTHÈSES PAR VOIE ENZYMATIQUE.....	- 36 -
II-2.1 Synthèse de 2000.....	- 36 -
II-2.2 Synthèse chimio-enzymatique à partir d'un intermédiaire oxazoline	- 37 -
II-2.1 Synthèse séquentielle d'oligosaccharides de chondroïtines via l'utilisation d'une chondroïtine polymérase mutante	- 39 -
II-3 SYNTHÈSE COMBINATOIRE	- 40 -
II-4 CONCLUSION.....	- 42 -
III- STRATEGIE DE SYNTHÈSE	- 43 -
III-1 STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES SYNTHETISES	- 43 -
III-2 BIOTINE/STREPTAVIDINE.....	- 44 -
III-3 STRATEGIE DE SYNTHÈSE	- 45 -

IV- SYNTHESE DES OLIGOSACCHARIDES NON SULFATES	- 48 -
IV-1 RETROSYNTHESE	- 48 -
IV-2 PREPARATION DE L'UNITE DISACCHARIDIQUE DE BASE 118_.....	- 50 -
IV-2.1 Dépolymérisation d'un polymère de sulfates de chondroïtines.....	- 50 -
IV-2.2 Hydrolyse du polymère de CS	- 52 -
IV-2.3 Protection de l'amine.....	- 53 -
IV-3 SYNTHESSES DU DISACCHARIDE DONNEUR CLE 88	- 56 -
IV-3.1 Protection des hydroxyles libres	- 56 -
IV-3.2 Activation de la position anomérique : synthèse du trichloroacétimide acétylé 88	- 57 -
IV-4 SYNTHESE DU DISACCHARIDE BIOTINYLE 122	- 60 -
IV-4.1 Glycosylation	- 60 -
IV-4.2 Réduction du groupement <i>N</i> -trichloroacétyle	- 60 -
IV-4.3. Déprotection des esters	- 61 -
IV-4.4 Couplage avec la biotine.....	- 61 -
IV-5 SYNTHESE DES BLOCS CLES 93 ET 121 ET STRATEGIE D'ELONGATION	- 65 -
IV-5.1 Synthèse du bloc donneur clé : le trichloroacétimide lévulinoylé 93.....	- 65 -
IV-5.2 Synthèse du bloc accepteur clé : le disaccharide 121	- 69 -
IV-5.3 Stratégie d'élongation.....	- 71 -
IV-6 SYNTHESSES DES OLIGOSACCHARIDES PROTEGES	- 72 -
IV-6.1 Synthèse du trisaccharide $n = 1, m = 0$	- 72 -
IV-6.2 Synthèse du tétrasaccharide $n = 1, m = 1$	- 72 -
IV-6.3 Synthèse du pentasaccharide ($n = 2, m = 0$) et de l'hexasaccharide ($n = 2, m = 1$).....	- 73 -
IV-6.4 Synthèse de l'heptasaccharide ($n = 3, m = 0$) et de l'octasaccharide ($n = 3, m = 1$)	- 74 -
IV-7 SYNTHESSES DES OLIGOMERES BIOTINYLES	- 76 -
IV-7.1 Réduction des groupements <i>N</i> -trichloroacétyle	- 76 -
IV-7.2 Déprotection des esters	- 79 -
IV-7.3 Couplage avec la biotine.....	- 80 -
IV-8 CONCLUSION	- 82 -
V- SYNTHESE DES OLIGOSACCHARIDES DE SULFATATION HOMOGENE EN POSITION 4 OU 6.....	- 83 -
V-1 PREMIERE STRATEGIE APPLIQUEE A LA SYNTHESE DE TETRASACCHARIDES.....	- 83 -
V-1.1 Synthèse du trichloroacétimide benzylidène 173.....	- 85 -
V-1.2 Glycosylations « push-pull »	- 85 -
V-1.3 Synthèse du disaccharide précurseur 100	- 87 -
V-1.4 Synthèse du tétrasaccharide : Glycosylation « push-pull ».....	- 89 -
V-2 SECONDE STRATEGIE.....	- 91 -
V-2.1 Stratégie divergente utilisant l'acétal benzylidène	- 93 -
V-2.2 Synthèse des blocs clés accepteurs 188 et donneurs 186 et 187.....	- 97 -
V-2.3 Synthèses des oligosaccharides protégés.....	- 101 -
V-2.5 Réduction des groupements <i>N</i> -trichloroacétyle	- 105 -
V-2.6 Réaction de sulfatation.....	- 113 -
V-2.7 Saponification des esters	- 116 -
V-2.8 Couplage avec la biotine	- 118 -
V-3 CONCLUSION	- 119 -
VI- SYNTHESE DES OLIGOSACCHARIDES DE SULFATATION HETEROGENE EN POSITION 4.....	- 120 -
VI-1 SYNTHESE DES TRISACCHARIDE ET TETRASACCHARIDE PROTEGES	- 120 -
VI-2 DECHLOROACETYLATION.....	- 121 -
VI-3 REDUCTION DES GROUPEMENTS N-TRICHLOROACETYLES.....	- 122 -

VI-4 REACTION DE SULFATATION.....	- 123 -
VI-5 SAPONIFICATION DES ESTERS.....	- 124 -
VI-6 COUPLAGE AVEC LA BIOTINE	- 125 -
VI-7 CONCLUSION.....	- 126 -
VII- CONCLUSION GENERALE	- 127 -
VIII- PARTIE EXPERIMENTALE.....	- 130 -
IX- ANNEXES.....	- 257 -
X- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 271 -

ABREVIATIONS

Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
ACS	(±) Acide camphre-10-sulfonique
AH	Acide hyaluronique
AIBN	α,α' -azobisisobutyronitrile
Ala	Alanine
Asn	Asparagine
Bu	Butyle
Bz	Benzoyle
CAN	Nitrate d'ammonium cérique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CS	Sulfate de chondroïtine
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DS	Sulfate de dermatane
EP	Ether de pétrole
eq	Equivalent molaire
Et	Ethyle
F	Température de fusion
GAG	Glycosaminoglycane
D-Gal	D-Galactose
D-GalN	D-Galactosamine
D-Glc	D-Glucose
D-GlcA	Acide-D-Glucuronique
Glu	Acide Glutamique
h	heure
Hep	Héparine
HS	Sulfate d'héparane
Hz	Hertz
L-IdoA	Acide-L-Iduronique
j	jour
J	Constante de couplage
kDa	Kilodalton
KS	Sulfate de kératane
Lev	Lévulinoyle
Me	Méthyle
min	minute

MMP	Métalloprotéinase
MP	4-méthoxyphényle
NAP	Naphtylméthyle
napht	Naphthyle
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
PG	Protéoglycane
Ph	Phényle
Phe	Phénylalanine
ppm	partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TA	Température ambiante
TBS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle
TCA	Trichloroacétyle
Tf	Acide triflique
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
UDP	Uracilyldiphosphate
Z	2-benzyloxycarbonyle

Numérotation des molécules

Dans la suite du manuscrit les positions des deux sucres seront numérotées comme indiquées sur la Figure 1 : la D-galactosamine de 1 à 6 et l'acide-D-glucuronique de 1' à 6'.

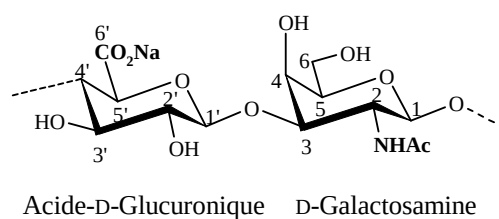


Figure 1

INTRODUCTION

Les travaux de thèse, présentés ici, ont été réalisés dans un programme collaboratif financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR 2005), intitulé Glycosyltransférases-Glycosaminoglycanes (GT-GAG). Le projet vise à étudier les mécanismes moléculaires régissant la spécificité de substrat des glycosyltransférases (GT) qui sont impliquées dans les voies de biosynthèse des protéoglycanes.

Dans le contexte des pathologies arthrosiques caractérisées par une dégradation précoce des glycosaminoglycanes du cartilage, et notamment des sulfates de chondroïtines, le but de ces études est de mettre en évidence des cibles enzymatiques permettant de restaurer qualitativement et quantitativement ces constituants cartilagineux. La conception de molécules capables d'initier la biosynthèse de ces sulfates de chondroïtines doit permettre l'identification et la caractérisation des enzymes clés qui pourraient servir de cibles thérapeutiques pour la conception de médicaments anti-arthrosiques. Cette stratégie constituerait une approche thérapeutique novatrice dans le traitement de l'arthrose.

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité des études effectuées au laboratoire depuis de nombreuses années focalisées sur la synthèse d'oligosaccharides, notamment de sulfates de chondroïtines, par voie chimique.

Dans le cadre du projet ANR, la synthèse des polysaccharides présents dans le cartilage a été confiée au laboratoire. Nous nous sommes, durant ces trois années de thèse, plus particulièrement intéressés à la synthèse des sulfates de chondroïtines, composants cartilagineux naturels.

La préparation d'oligosaccharides de chondroïtines et de sulfates de chondroïtines biotinylés (sulfatés en position 4 ou en position 6) sera présentée. Tous ces composés seront ensuite envoyés pour une évaluation biologique à nos partenaires biologistes.

I- INTRODUCTION BIOLOGIQUE

I- INTRODUCTION BIOLOGIQUE

I-1 L'ARTHROSE ET LE CARTILAGE

I-1.1 Arthrose : Généralités

L'arthrose est la plus fréquente des maladies articulaires. Elle touche six millions de Français¹ et 5% de la population mondiale. Due à une usure précoce du cartilage et pouvant toucher toutes les articulations, elle est alors à l'origine de douleurs et d'invalidités.

Il n'y a pas si longtemps, elle était encore considérée comme une simple conséquence du vieillissement, mais elle est aujourd'hui traitée comme une réelle pathologie.

L'arthrose ne touche que certaines articulations (avec par ordre approximatif de fréquence à 70 ans) : les mains (45%), les genoux (30-40%), le pouce (30%), la hanche (10%), le gros orteil, les épaules et les coudes (très rares). Le poignet et la cheville ne sont jamais touchés.

Les principaux facteurs de risques² suspectés sont :

- Généraux : âge, poids, ménopause...
- Génétiques : une arthrose familiale est démontrée pour les arthroses du genou, de la hanche et de la main
- Locaux :
 - traumatismes importants ou faibles mais répétés (sport, travaux pénibles...)
 - anomalie de position de l'articulation (scoliose)
 - autres maladies osseuses ou articulaires (séquelles de fracture...)

Statistiquement les femmes sont plus touchées que les hommes (ratio de prédominance féminine 2,6)³ et particulièrement après la ménopause. A l'heure actuelle, de plus en plus de jeunes en sont atteints du fait du phénomène d'obésité de plus en plus répandu.

Actuellement aucun traitement dit « anti-arthrosique », c'est-à-dire réparant le cartilage atteint, n'existe. Seuls des traitements symptomatique (antalgique, anti-inflammatoire), médical (infiltration) ou chirurgical (prothèse) sont prescrits.

¹ *Le Monde*, 24/02/09

² www.doctissimo.fr

³ Creamer P.; Hochberg M. C. *The Lancet*, **1997**, 350, 503-509

I-1.2 Cartilage et articulation

a. Le rôle du cartilage

Une articulation est composée de deux extrémités osseuses qui sont recouvertes de cartilage (Schéma I. 1). Au sein de cette articulation, une membrane synoviale produit un liquide artériel dénommé liquide synovial qui assure la lubrification du cartilage et le nourrit.

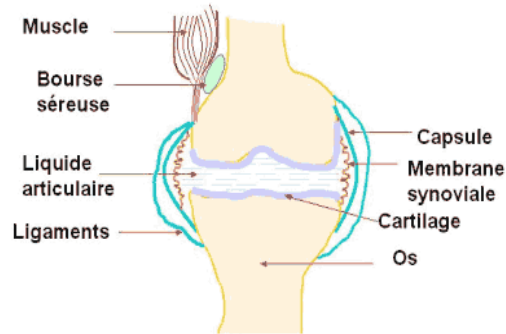


Schéma I. 1

Le cartilage est un tissu de quelques millimètres d'épaisseur, dépourvu de structure vasculo-nerveuse. Il joue un rôle primordial dans le bon fonctionnement de l'articulation en permettant le glissement des deux os l'un sur l'autre et assurant ainsi une bonne mobilité à l'articulation. Il doit réussir à dissiper les forces de compression, en se déformant en réponse à la charge exercée sur l'articulation.

b. Composition du cartilage

Le cartilage est composé d'un seul type de cellules, appelées chondrocytes, noyé au sein d'une matrice extracellulaire, formée principalement d'eau (70% du poids humide), de fibre de collagène et de protéoglycanes (PGs) (Schéma I. 2).

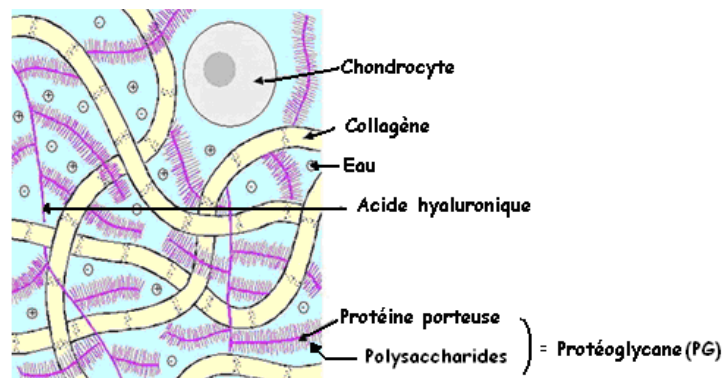


Schéma I. 2

- Les chondrocytes sont des cellules arrondies et volumineuses (20 à 40 μm), qui représentent 5 à 10% du volume total du tissu cartilagineux. Ces cellules assurent à la fois la synthèse et la dégradation de tous les composants matriciels. Le renouvellement

permanent des constituants (et par conséquent la survie du cartilage) n'est possible que si cet équilibre, entre les taux de synthèse (anabolisme) et de dégradation (catabolisme), est respecté.

- Les collagènes présents dans le cartilage sont majoritairement des collagènes de type II (80 à 90% du contenu collagénique), formés d'une triple hélice de trois chaînes identiques. Ils apportent la structure et la solidité au cartilage. Par ailleurs, il est admis que leur fabrication n'est réalisée que pendant les premières années de la vie, un chondrocyte adulte n'en produit plus.
- Les protéoglycanes sont formés d'une protéine axiale sur laquelle sont liés des polysaccharides. Ces imposantes molécules sont très fortement concentrées dans la matrice cartilagineuse (compressées à 20% de leur volume entre les fibres de collagène). Cette compression et leur caractère fortement anionique leur confèrent une élasticité unique. Ils vont ainsi remplir une fonction d'amortissement dans le cartilage, au prorata des molécules d'eau qu'ils peuvent très rapidement emprisonner ou relarguer (Schéma I. 3). Ces molécules seront plus largement détaillées dans le chapitre I-2.

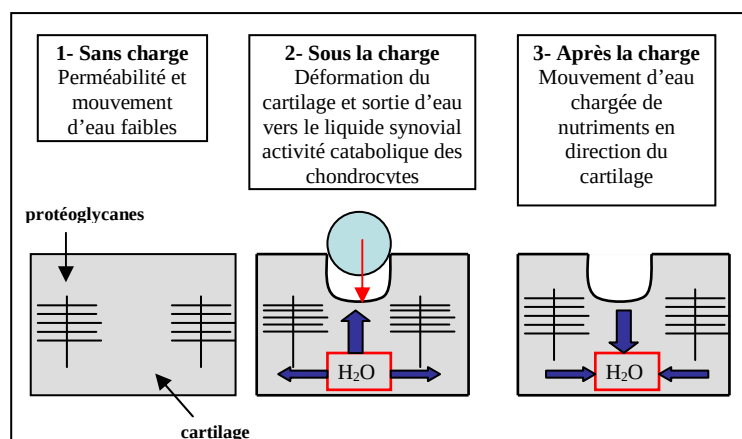


Schéma I. 3

I-1.3 Le processus arthrosique

Le processus arthrosique débute au niveau du cartilage et les aspects affectant les tissus avoisinants (os sous-chondral, liquide synovial) n'en sont que les conséquences pathologiques.

Ce processus va se déclencher en réponse à un excès de pression exercée sur le cartilage. Deux types de réactions sont alors observés :

- Une réaction **mécanique** : L'hyperpression induit une rupture du filet de collagène. Le cartilage se gonfle d'eau, se fissure, s'ulcère et finit par perdre de son volume, s'amincit et se fragmente. Des fragments de cartilage se retrouvent ainsi dans la cavité articulaire et provoquent une réaction inflammatoire.

- Une réaction **biologique** : Sous l'effet de l'hyperpression, les chondrocytes deviennent hyperactifs et sécrètent d'avantage de protéoglycanes et de collagène (tentative de réparation du cartilage, processus anabolique) et surtout d'avantage d'enzymes de destruction (processus catabolique). Les chondrocytes finissent par s'épuiser et mourir (Schéma I. 4).

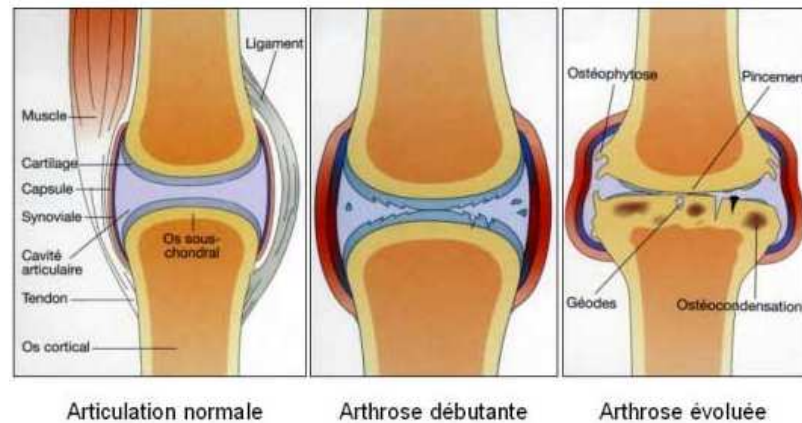


Schéma I. 4

Des études ont été menées afin de déterminer quelles étaient les enzymes responsables du catabolisme des aggrecanes, principaux protéoglycanes du cartilage⁴.

La présence de deux types de fragments (coupure de l'axe protéique) dans le liquide synovial a conduit les chercheurs à s'intéresser à deux enzymes : les métalloprotéinases (MMPs, coupure Asn³⁴¹-Phe³⁴²) et l'aggrecanase (coupure Glu³⁷³-Ala³⁷⁴). Il a ainsi été démontré que l'aggrecanase et non pas les MMPs, est responsable de la dégradation précoce des protéoglycanes du cartilage normal en présence de stimulus cataboliques tels que l'acide rétinoïque, l'interleukine-1 (IL-1) et le *tumor necrosis factor-α* (TNF-α).

Dans le processus arthrosique, l'équilibre synthèse-dégradation, existant dans un cartilage sain, n'est plus respecté. Le déséquilibre métabolique en faveur de la dégradation conduit à la destruction des composants matriciels et notamment des protéoglycanes.

⁴ Little C. B.; Flannery C. R.; Hugues C. E.; Mort J. S.; Roughley P. J.; Dent C.; Caterson B. *Biochem. J.*, **1999**, 344, 61-68

I-2 LES PROTEOGLYCANES (PGs)

I-2.1 Définition

Un protéoglycane appartient à la famille des glycoprotéines, qui par définition est la combinaison entre une chaîne protéique et une chaîne glucidique. Ces macromolécules sont caractérisées par l'attachement covalent sur une protéine porteuse d'une ou plusieurs chaînes de polysaccharides appelés glycosaminoglycans (GAGs) via une zone de liaison tétrasaccharidique commune à la majorité des PGs (Schéma I. 5).

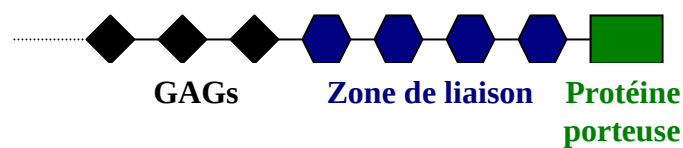


Schéma I. 5

L'aggrécane, un PG présent dans le cartilage (10% du poids sec) est présenté ci-dessous (Schéma I. 6). Trois types de GAGs sont présents : sulfates de chondroïtines (75 à 80%), sulfate de kératane (5 à 10%) et acide hyaluronique.

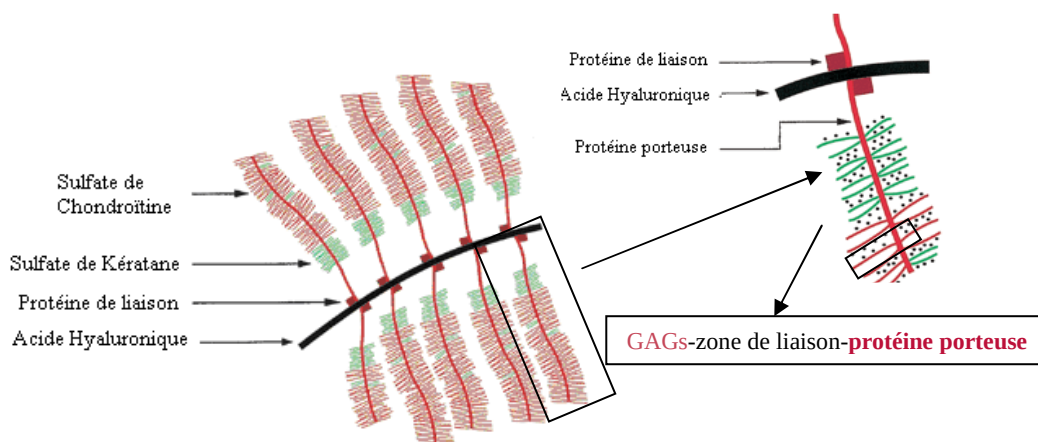


Schéma I. 6

a. La protéine porteuse (ou core protein)⁵

La protéine porteuse détermine la localisation et la distribution des PGs à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire. Chaque famille de PGs possède une protéine porteuse qui lui est propre. Elle est constituée de protéines de tailles variables allant de 10 à >500 kDa.

⁵ Thèse de Sandrine Gulberti, Université Henri Poincaré, Nancy I, 2003

Un résidu de L-sérine constituerait le site d'attachement potentiel des chaînes de GAGs. A partir de ce dernier, un motif [sérine-glycine-X-glycine], où X est un acide aminé quelconque, a été mis en évidence.

Les GAGs sont donc liés de façon covalente au résidu de L-sérine par une liaison O-ou N-glycosidique via une zone de liaison tétrasaccharidique.

b. La zone de liaison

La zone de liaison est commune à la majorité des GAGs. Elle initie la polymérisation des chaînes de GAGs. Elle est constituée d'une chaîne tétrasaccharidique possédant trois sucres différents : le D-Xylose (une unité), le D-Galactose (deux unités) et l'Acide-D-Glucuronique (une unité) (Schéma I. 7).

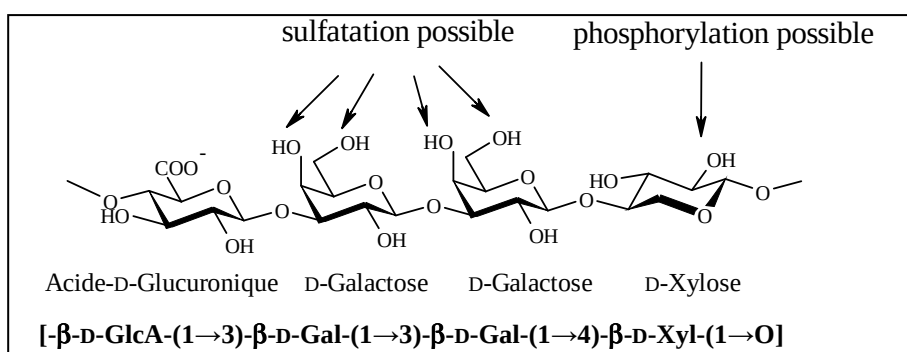


Schéma I. 7

Des études menées sur la zone de liaison des PGs ont montré que les positions 4 et/ou 6 des unités de D-Galactose pouvaient être sulfatées^{6,7,8,9,10} et que la position 2 du résidu de D-Xylose pouvait, quant à elle, porter un groupement phosphate^{11,12}. Le rôle de ces modifications n'est pas encore bien établi, mais il se pourrait qu'elles aient une influence sur l'orientation de la biosynthèse vers l'une ou l'autre des familles de GAGs.

c. Les Glycosaminoglycanes (GAGs)

Les glycosaminoglycanes sont de longs polysaccharides linéaires fortement polaires (sulfatés ou non) constitués d'une unité disaccharidique élémentaire, comportant le plus souvent une molécule d'hexosamine et une molécule d'acide hexuronique. Le nombre de ces unités varie de 10 (dans le sulfate de kératane) à 5000 ou plus (dans l'acide hyaluronique)¹³.

Les GAGs se différencient par la nature de l'hexosamine et sont ainsi répartis en deux catégories : les galactosaminoglycanes (possédant une D-Galactosamine GalN) et les glucosaminoglycanes (possédant une D-Glucosamine GlcN). Seul le sulfate de kératane (KS),

⁶ Sugahara K.; Yamashina I. *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 10168-10174

⁷ De Waard P.; Vliegthart J. F. G. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 6036-6043

⁸ Sugahara K.; Ohi Y.; Harada T. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 6027-6035

⁹ Yamada S.; Oyama M.; Yuki Y.; Kato K.; Sugahara K. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 233, 687-693

¹⁰ Kitagawa H.; Oyama M.; Masayama K.; Yamaguchi Y.; Sugahara K. *Glycobiology*, **1997**, 7, 1175-1180

¹¹ Oegama T. R. Jr.; Kraft E. L.; Jourdan G. W.; Van Valen T. R. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 1720-1726

¹² Fransson L.-A.; Silverberg I.; Carlstedt I. *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 14722-14726

¹³ L.-A. Fransson, *The Polysaccharides*, G.O. Aspinall. Ed., Academic Press, **1985**, 3, 337-415

ne possédant pas d'acide uronique, fait exception à cette classification. Leurs structures chimiques sont présentées ci-dessous (Schéma I. 8).

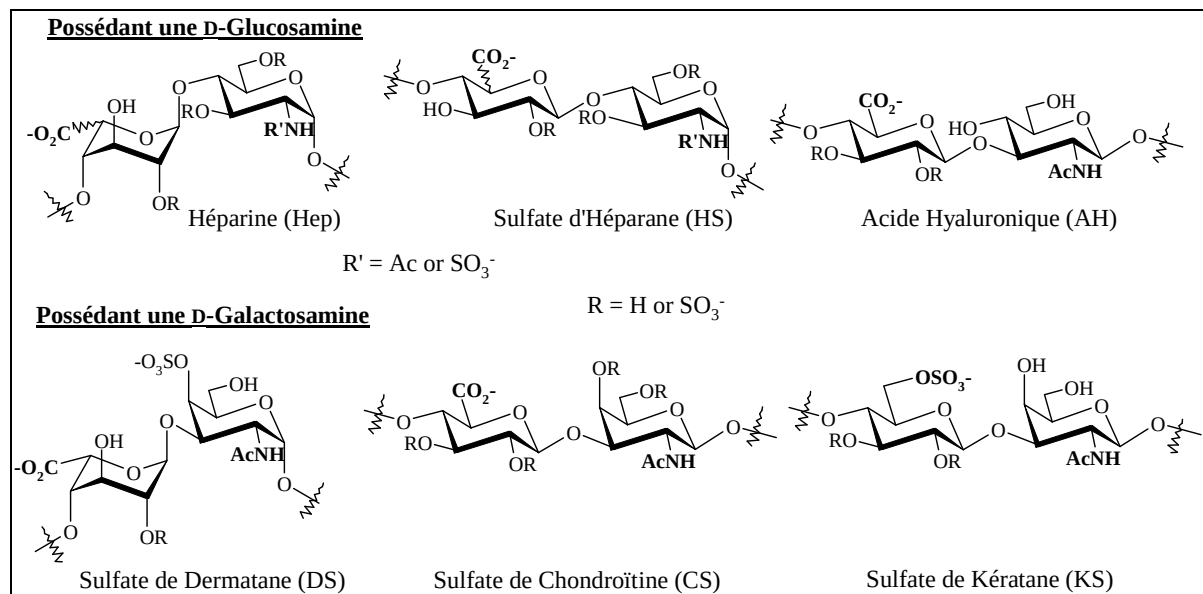


Schéma I. 8

Tous les GAGs sauf l'acide hyaluronique (AH) sont fixés de manière covalente à des protéines porteuses pour former des protéoglycanes, forme sous laquelle ces molécules sont fonctionnelles. Selon leur localisation, les GAGs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (Tableau I. 1).

GAGs	Acide Hexuronique (U) Sites de sulfatation possibles	Liaison U→A	Hexosamine (A) Sites de sulfatation possibles	Liaison A→U	Localisation	Implications biologiques
Galactosaminoglycanes						
Sulfate de Chondroïtine (CS)	D-GlcA 2-O, 3-O	β -1,3	D-GalN 4-O, 6-O	β -1,4	cartilage, os, derme, cornée	paludisme, rhumatologie, croissance neuronale
Sulfate de Dermatane (DS)	D-GlcA/ L-IdoA (majoritaire) 2-O	α -1,3	D-GalN 4-O	β -1,4	derme, ligament, cartilage	coagulation, thrombose
Glucosaminoglycanes						
Héparine (Hep)	D-GlcA/ L-IdoA (majoritaire) 2-O (IdoA)	α -1,4	D-GlcN 2-N, 3-O, 6-O	α -1,4	foie, poumon, aorte	coagulation, thrombose
Sulfate	D-GlcA/	α -1,4	D-GlcN	α -1,4	foie,	facteur de

d'Héparane (HS)	L-IdoA (majoritaire) 2-O (IdoA)		2-N, 3-O, 6-O		poumon, aorte	croissance, reconnaissance cellulaire
Acide Hyaluronique (AH)	D-GlcA	β -1,3	D-GlcN	β -1,4	cartilage, derme	cosmétologie (hydratation), angiogénèse, rhumatologie
Autre						
Sulfate de Kératane (KS)	D-Galactose	α -1,4	D-GlcN 6-O	α -1,4	cartilage, cornée	inconnue

Tableau I. 1

Les GAGs présentent beaucoup d'hétérogénéités, que ce soient de structure ou de fonctionnalisation. En effet, les DS, Hep ou HS possèdent à la fois des résidus de L-IdoA et de D-GlcA. Seuls les CS, AH et KS ont une unité disaccharidique répétitive homogène en structure. Ils possèdent un grand nombre de sites de sulfatation possibles aussi bien sur le sucre aminé que sur l'acide uronique. Ces sulfatations sont hétérogènes et toutes les combinaisons sont envisagées, même si les composés n'ont pas encore été isolés. Ces hétérogénéités sont aussi à l'origine de leurs propriétés biologiques.

I-2.2 Structures et propriétés des protéoglycanes

Les PGs se trouvent de façon ubiquitaire¹⁴ au sein de l'organisme, aussi bien à la surface des cellules, que dans la matrice extracellulaire ou encore à l'intérieur des cellules (principalement dans les granules de sécrétions) (Tableau I. 2). Ils sont synthétisés par tous types de cellules. Ils sont de taille et de structure variées rendant difficile leur classification. Leurs propriétés hautement diversifiées dépendent à la fois des parties protéique et glycosaminoglycanique. Ainsi, ils sont impliqués dans la prolifération ou l'adhésion cellulaire ou encore dans la différenciation et la morphogénèse des tissus.

Désignation	Source	Taille du squelette protéique (kDa)	Nombre et nature des GAGs	Localisation
aggrécane	cartilage	208-221	>100 CS, 20-30 KS	extracellulaire
serglycine	plaquettes	17-19	CS, DS, HS, Hep	intracellulaire
fibroglycane	fibroblastes	48(90)	HS	surface cellulaire
fibromoduline	tissus conjonctifs	41	1 KS	extracellulaire

Tableau I. 2

Comme l'indiquent les Tableau I. 1 et Tableau I. 2, les sulfates de chondroïtines, étant les principaux GAGs de l'aggrécane présent dans le cartilage, sont des cibles particulièrement intéressantes pour l'étude du phénomène arthrosique.

¹⁴ L. Kjellen; U. Lindhal *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, 60, 443-475

I-3 LES SULFATES DE CHONDROÏTINES (CS)

I-3.1 Définition et structure

L'unité disaccharidique de base des sulfates de chondroïtines, appelée chondrosine, est constituée de l'enchaînement de l'Acide-D-Glucuronique (GlcA) et de la N-acétyl-D-Galactosamine (GalNAc) dont la structure est présentée ci-dessous (Schéma I. 9).

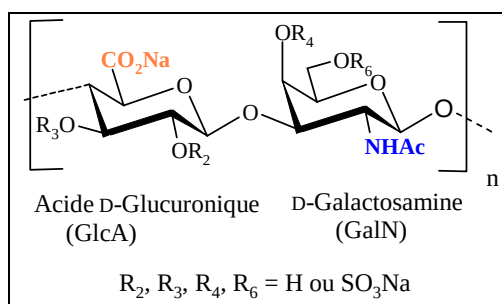


Schéma I. 9

Les différents types de CS se distinguent par la position et le nombre de groupements sulfates (Tableau I. 3).

dénomination	R ₂	R ₃	R ₄	R ₆	Origine du cartilage
CS A	H	H	SO ₃ Na	H	humaine, bovine, ovine, baleine
CS C	H	H	H	SO ₃ Na	humaine, aviaire, bovine,
CS D	SO ₃ Na	H	H	SO ₃ Na	requin
CS E	H	H	SO ₃ Na	SO ₃ Na	calamar
CS K	H	SO ₃ Na	SO ₃ Na	H	crabe royal
CS L	H	SO ₃ Na	H	SO ₃ Na	organismes marins
CS M	H	SO ₃ Na	SO ₃ Na	SO ₃ Na	organismes marins

Tableau I. 3

Il existe 14 combinaisons possibles de sulfatations (mono-, di-, tri- et tétrasulfates), ce qui confère une très grande diversité moléculaire et donc autant de propriétés biologiques potentielles définies par ce « code de sulfatation¹⁵ ».

Dans la nature, ces CS se trouvent sous la forme de copolymères hétérogènes en sulfatation. Dans le cartilage de requin, crabe royal et calamar¹⁶, par exemple, différents oligosaccharides ont été isolés après digestion par deux enzymes (une hyaluronidase testiculaire (donnant des composés saturés) et une chondroïtinase (produisant des composés insaturés)) : il a été trouvé des enchainements « homogènes », A-A, C-C, K-K, E-E (mais pas D-D) et hétérogènes A-C, A-D, A-C-D, K-A, E-A, L-A, M-A, C-E... Ces composés peuvent aussi présenter des alternances de motifs sulfatés et non sulfatés.

¹⁵ Gama C. I., Tully S. E., Sotogaku N., Clark P. M.; Rawat M.; Vaidehi N.; Goddard III W. A.; Nishi A.; Hsieh-Wilson L. C. *Nature Chem. Biol.*, **2006**, 2, 467-473

¹⁶ Sugahara K.; Yamada S. *Trends Glycosci. Glyc.*, **2000**, 12, 321-349

Le cartilage humain, quant à lui, possède des CSA et CSC et il a été démontré que le pourcentage de CSC augmente dans un cartilage arthrosique.

I-3.2 Propriétés biologiques¹⁷

Les sulfates de chondroïtines interviennent dans de nombreux et variés processus biologiques aussi bien à la surface des cellules que dans la matrice extracellulaire. Par exemple, ils interagissent avec les facteurs de croissance et les facteurs d'adhésion, stimulent la croissance neuronale, sont reconnus en tant que récepteurs par certains micro-organismes (infections virales (herpès HSV-1, paludisme)), ou encore sont impliqués dans les maladies articulaires et les cancers (Schéma I. 10).

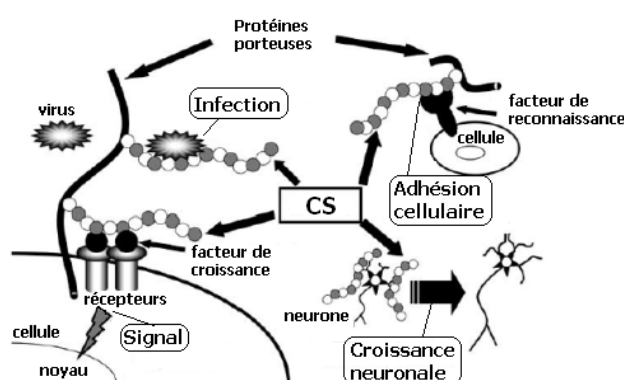


Schéma I. 10

Trois de ces propriétés biologiques sont détaillées ci-dessous.

a. Les sulfates de chondroïtines et le paludisme

Le paludisme (appelé aussi malaria) est une maladie parasitaire transmise à l'Homme par la piqûre d'un moustique femelle, provoquant de fortes fièvres intermittentes. Cette maladie cause 2 à 3 millions de décès par an, principalement en Afrique, où les traitements disponibles sont trop coûteux pour les populations. Elle est la première cause de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans. Les femmes enceintes sont aussi particulièrement touchées, le placenta constituant une cible de choix pour le parasite. En effet, il a été démontré que des récepteurs spécifiques aux érythrocytes sanguins infectés (IRBC = Infected Red Blood Cell) par le parasite *Plasmodium falciparum* se trouvent sur la paroi placentaire. D'après des études réalisées en 2000¹⁸, il a été mis en évidence que ces récepteurs seraient des CSA (4-sulfate). Ils ont aussi démontré que la meilleure adhérence cellulaire était observée, non pas avec des CS totalement 4-sulfatés mais avec des CS possédant une sulfatation hétérogène (soit 30 à 50% de 4-sulfatés et 50 à 70% de non sulfatés), la reconnaissance maximale ayant lieu avec un dodécasaccharide possédant deux ou trois groupements sulfates.

¹⁷ Yamada S.; Sugahara K. *Curr. Drug. Discov. Dev.*, **2008**, 5, 289-301

¹⁸ Alkhalil A.; Achur R. N.; Valiyaveetil M.; Ockenhouse C. F.; Gowda D. C. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 40357-40364

b. Les sulfates de chondroïtines et la croissance neuronale

Dans le but de mettre en évidence un « code de sulfatation » montrant que chaque sulfoforme de CS induirait une fonction biologique spécifique (tout comme les protéines et l'ADN), l'équipe de Hsieh-Wilson¹⁵ a essayé d'établir si les facteurs de croissance reconnaissent une unique séquence de sulfatation. Pour ce faire, quatre tétrasaccharides ont été préparés par synthèse chimique : un de CSA (4-sulfate), un de CSC (6-sulfate), un de CSE (4,6-disulfate) et un composé 2',3'-disulfaté (appelé CSR). Ils ont ainsi comparé l'influence de ces quatre sulfoformes sur la croissance neuronale et ont alors déterminé que seul le tétrasaccharide de CSE montrait une activité promouvant la croissance neuronale (développement des dendrites et de l'axone).

c. Les sulfates de chondroïtines et l'arthrose

L'apparition dans le commerce (notamment sur le marché américain) de composants cartilagineux tels que les sulfates de chondroïtines ou encore de cartilage lui-même (de requin par exemple) ont conduit des équipes à étudier leurs effets directs sur l'arthrose. En comparant les effets de ces CS et d'un placebo¹⁹ (par voie orale) sur deux groupes de patients atteints d'une arthrose du genou, il s'est avéré que les patients traités avec des CS ressentaient une diminution de la douleur. De plus, en mesurant la taille de l'espace inter-articulaire chez les deux groupes de patients²⁰, ils ont pu noter une diminution de cet espace chez les personnes prenant le placebo alors qu'aucune progression n'est observée dans le groupe traité avec les CS.

Le mode d'action des CS reste pour le moment à élucider, afin de donner des explications aux phénomènes physiques observés.

Cette pathologie (décrite en I-1) étant caractérisée par une destruction du cartilage et de ses composants matriciels, notamment les PGs, et sachant que dans le cartilage 80% des GAGs sont des CS, nous nous sommes intéressés à l'étude de leur biosynthèse.

¹⁹ Uebelhart D.; Malaises M.; Marcolongo R.; De Vathaire F.; Piperno M.; Mailleux E.; Fioravanti A.; Matoso L.; Vignon E. *Osteoarthritis Cartilage*, **2004**, 12, 269-276

²⁰ Michel B. A.; Stucki G.; Frey D.; De Vathaire F.; Vignon E.; Bruehlmann P.; Uebelhart D. *Arthritis Rheum.*, **2005**, 52, 779-786

I-4 BIOSYNTHESE DES PROTEOGLYCANES

I-4.1 Biosynthèse

A l'heure actuelle, la biosynthèse des PGs est encore mal connue. De nombreuses enzymes y sont impliquées et leur rôle n'est pas élucidé.

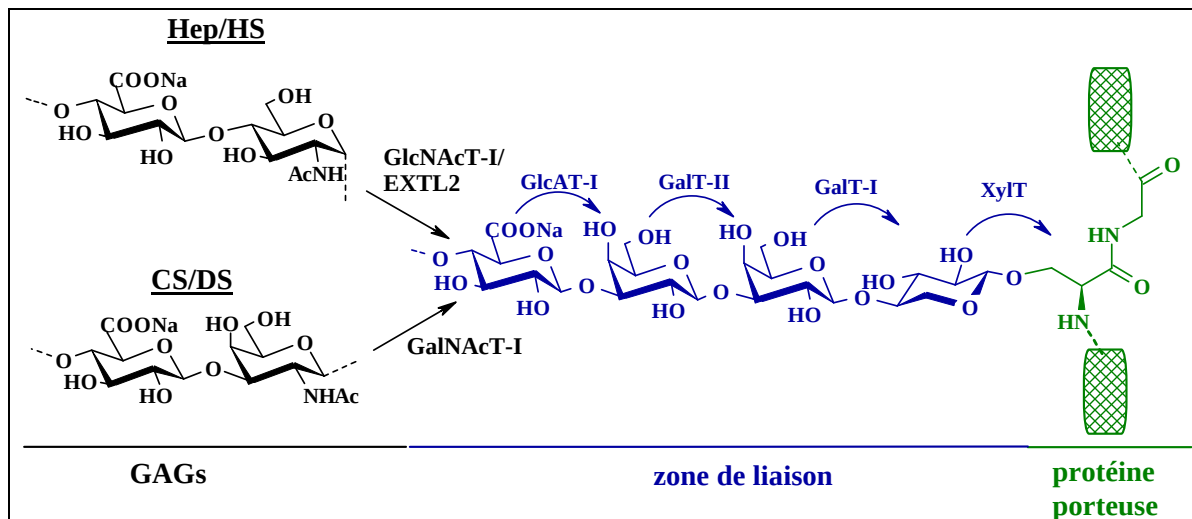


Schéma I. 11

La biosynthèse des PGs comprend plusieurs étapes²¹.

Elle commence par la formation de la protéine porteuse, synthétisée par des ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique.

La suite des étapes est réalisée dans le Golgi et procède par additions successives de monosaccharides à partir des UDP-sucres correspondants.

- La xylosylation du résidu de L-sérine est catalysée par une xylosyl-transférase (XylT).
- L'addition des deux unités galactose est réalisée successivement par deux enzymes, la galactosyl-transférase I (GalT-I) et la galactosyl-transférase II (GalT-II).
- L'ajout du dernier sucre formant la zone de liaison est réalisé par la glucuronyl-transférase I (GlcAT-I).
- L'orientation de la biosynthèse, suivant qu'elle conduise aux chaînes d'Hep/HS ou de CS/DS, se fait par l'intervention d'une N-acétylglucosaminyl-transférase (GlcNAcT-I) ou d'une N-acétylgalactosaminyl-transférase (GalNAcT-I) respectivement.

Les modifications chimiques (phosphorylation ou sulfatation) apparaissent de manière simultanée à la formation des chaînes, mais tous ces phénomènes sont encore indéterminés.

Par contre, il a été établi que la présence d'un groupement sulfate en position 6 du premier résidu de D-Galactose augmentait considérablement l'activité de transfert de la

²¹ Sugahara K.; Kitagawa H. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **2000**, 10, 518-527

GlcAT-I²². A contrario, si la deuxième unité de D-Galactose est 6-sulfatée ou 4,6-disulfatée, aucune activité de transfert n'est remarquée.

I-4.2 Polymérisation des chaînes de sulfates de chondroïtines

Après transfert du premier résidu de *N*-acétyl-D-Galactosamine sur la zone de liaison par la GalNAcT-I, deux autres enzymes sont nécessaires à l'élongation des chaînes de CS. Les sucres D-GlcA et D-GalNAc sont transférés un par un par une glucuronyl-transférase II (GlcAT-II) et une *N*-acétylgalactosaminyl-transférase II (GalNAcT-II) respectivement (Schéma I. 12).

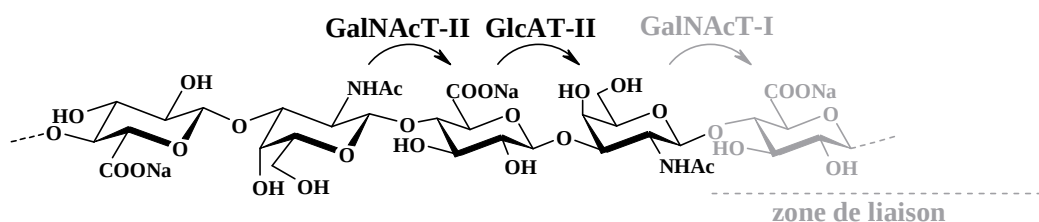


Schéma I. 12

Lors des recherches menées sur la biosynthèse des PGs et plus particulièrement sur les enzymes de polymérisation des chaînes de CS (GalNAcT-II et GlcAT-II), Sugahara et coll.²³ ont démontré que ces enzymes étaient coéluées et impossible à séparer, ils ont alors émis l'hypothèse d'un complexe enzymatique : la **chondroïtine synthase**. En 2001²⁴, cette même équipe a identifié et cloné la chondroïtine synthase humaine. Cette dernière exprime donc les activités des deux glycosyltransférases (GlcAT-II et GalNAcT-II) requises pour la polymérisation des chaînes. Ils ont, par la suite, démontré la nécessité d'un facteur de polymérisation²⁵, le chondroitin polymerizing factor (ChPF) concomittant à l'action de la chondroïtine synthase. En 2003²⁶, une autre équipe étudiant l'activité de chondroïtine synthases, a mis en évidence que les composés sulfatés et plus particulièrement les CSC augmentaient l'activité enzymatique et cette dernière était maximale avec un dodécasaccharide en tant que substrat.

Les réactions de sulfatation réalisées au cours de l'élongation des chaînes de GAGS sont catalysées par des sulfotransférases dont les mécanismes d'action restent à élucider.

²² Gulberti S.; Lattard V.; Fondeur M.; Jacquinet J.-C.; Mulliert G.; Netter P.; Magdalou J.; Ouzzine M.; Fournel-Gigleux S. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 1417-1425

²³ Tchukida K.; Lind T.; Kitagawa H.; Lindahl U.; Sugahara K.; Lidholt K. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, 264, 461-467

²⁴ Kitagawa H.; Uyama T.; Sugahara K. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 38721-38726

²⁵ Kitagawa H.; Izumikawa T.; Uyama T.; Sugahara K. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 23666-23671

²⁶ Yada T.; Masanori G.; Sato T.; Shionyu M.; Go M.; Kaseyama H.; Iwasaki H.; Kikuchi N.; Kwon Y.-D.; Togayachi A.; Kudo T.; Watanabe H.; Narimatsu H.; Kimata K. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 30235-30247

I-4.3 Conclusion

Chez les personnes atteintes d'arthrose, comme il l'a déjà été mentionné, le cartilage ainsi que ces composants, dont font partie les PGs, sont détruits. C'est pour cette raison, qu'au sein de l'équipe nous nous intéressons à leur biosynthèse.

Nous nous efforçons de répondre à la problématique suivante :

Est-il possible de relancer la biosynthèse des protéoglycanes ?

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la synthèse des CS pour l'étude de leur polymérisation, à savoir quelle taille serait nécessaire pour faire repartir la synthèse des chaînes de CS ? La sulfatation est-elle nécessaire à la reconnaissance enzyme-substrat ? Et si oui, quel type de sulfatation ?

I-5 NECESSITE DE LA SYNTHÈSE CHIMIQUE

Dans le cadre du projet ANR et dans le but de déterminer les enzymes cibles responsables de la polymérisation des chaînes de CS, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'oligosaccharides de chondroïtines sulfatés ou non sulfatés.

Afin d'élucider le mécanisme d'action de ces enzymes, il est important de déterminer leur spécificité de substrat. Nous avons alors choisi de préparer des oligosaccharides de chondroïtines et de sulfates de chondroïtines de tailles et de structures définies. Il est essentiel d'obtenir des composés dont la structure chimique est parfaitement certaine. La synthèse par voie chimique, nous permet de synthétiser des molécules avec une structure totalement analysée.

Le chapitre suivant présentera les différentes techniques d'obtention d'oligosaccharides de sulfates de chondroïtines référencées dans la littérature.

II- TRAVAUX DE SYNTHES DECRITS DANS LA LITTERATURE

II- TRAVAUX DE SYNTHESSES DECRITS DANS LA LITTERATURE

La principale difficulté rencontrée pour la synthèse des oligosaccharides de sulfates de chondroïtines repose sur l'obtention des deux sucres qui constituent l'unité répétitive à savoir un Acide-D-Glucuronique (D-GlcA) et une D-Galactosamine (D-GalN). En effet dans les différentes synthèses qui seront présentées ci-après, diverses stratégies ont été mises en œuvre afin de les préparer à partir de composés facilement accessibles.

II-1 SYNTHESSES PAR VOIE CHIMIQUE

Dans la littérature, il a été reporté la synthèse d'oligosaccharides de chondroïtines de sulfatation homogène A, C, D et E. Les oligosaccharides de sulfates de chondroïtines ont été synthétisés principalement par deux groupes dont la stratégie de synthèse adoptée est bien différente. L'équipe de J.-C. Jacquinet construit des séquences ayant le plus souvent pour unité répétitive β -GlcA-GalNTCA ou β -GlcA-GlcNTCA, tandis que l'équipe de J. I. Tamura synthétise des oligosaccharides de séquence inverse de type β -GalN₃-GlcA.

II-1.1 Première synthèse d'un disaccharide de sulfate de chondroïtine

A²⁷

En 1989, Marra *et coll.* décrivent la première synthèse d'un fragment disaccharidique de chondroïtine 4-sulfate **1** (Schéma II. 1).

²⁷ Marra A.; Dong X.; Petitou M.; Sinaÿ P. *Carbohydr. Res.* **1989**, 195, 39-50

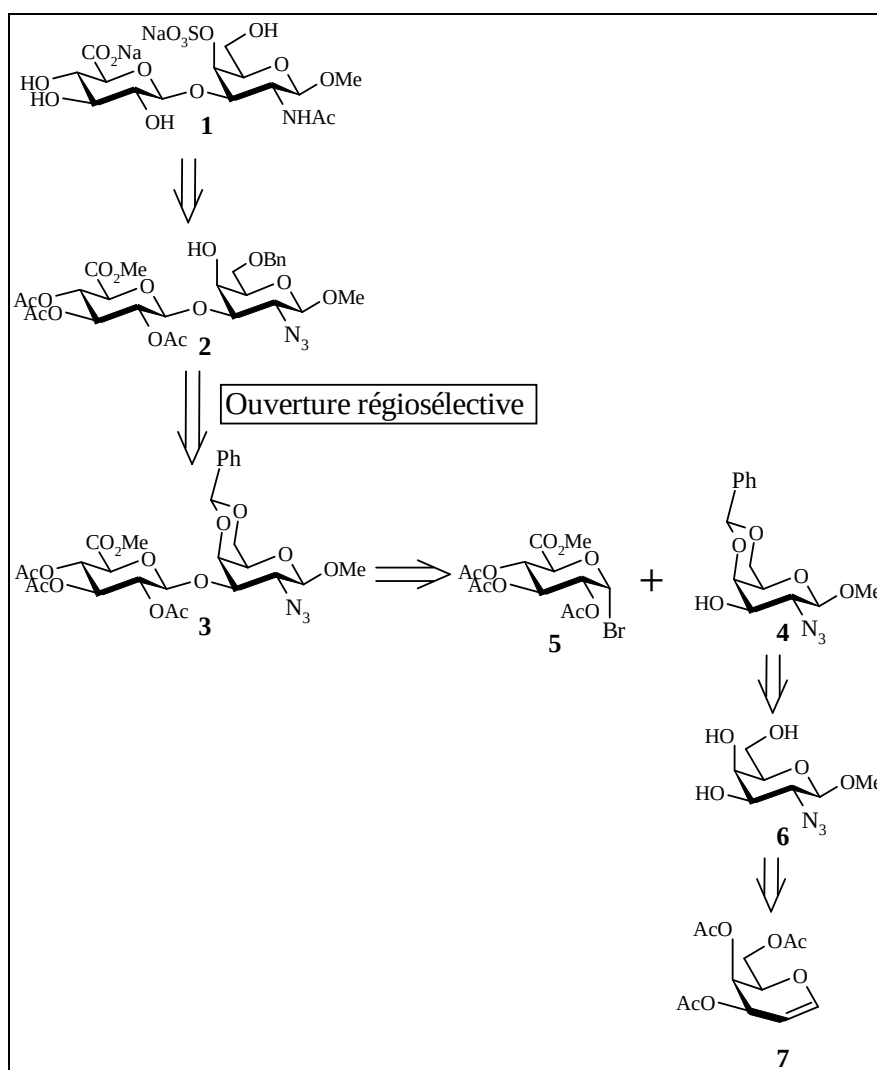


Schéma II. 1

Une des étapes clés de cette synthèse est la glycosylation entre un sucre donneur **5**, dérivé du D-GlcA et un sucre accepteur **4**, précurseur de la D-GalN. Ce sucre accepteur **4** est obtenu après protection sélective par un acétal benzylidène du composé **6**, lui-même préparé à partir du D-Galactal **7** par azidonitration²⁸. La réaction d'azidonitration permet d'introduire en position 2 un groupement azoture, par la suite facilement transformable en amide NHAc (fonction présente dans les molécules naturelles). La présence de l'acétal benzylidène permet d'isoler l'hydroxyle en C-3 et ainsi d'augmenter les rendements de glycosylation avec l'unité D-glucuronique **5** (comparés à la glycosylation avec le triol **7**) pour donner le disaccharide **3** (85%). D'autre part, il facilite l'accès au disaccharide **2**, en permettant d'isoler en une étape l'hydroxyle en position 4, par une ouverture réductrice régiosélective (NaBH₃CN, HCl) avec 73% de rendement. Le composé est ensuite sulfaté en position 4, puis saponifié et enfin hydrogénolysé et *N*-acétylé sélectivement pour donner le disaccharide **1** désiré (60%), unité de base des sulfates de chondroïtines A.

²⁸ Paulsen H.; Paal M. *Carbohydr. Res.* **1984**, 135, 53-69

II-1.2 Synthèse de disaccharides de sulfates de chondroïtines A et C²⁹

Dans le but d'étudier l'influence de la sulfatation sur les déplacements chimiques des protons et des carbones en RMN ¹H et ¹³C, J.-C. Jacquinet synthétise en 1990, les disaccharides de chondroïtines 4-sulfate et 6-sulfate ayant pour enchaînements GlcA-GalN (**8a** et **8b**) et GalN-GlcA (**13a** et **13b**) (Schéma II. 2).

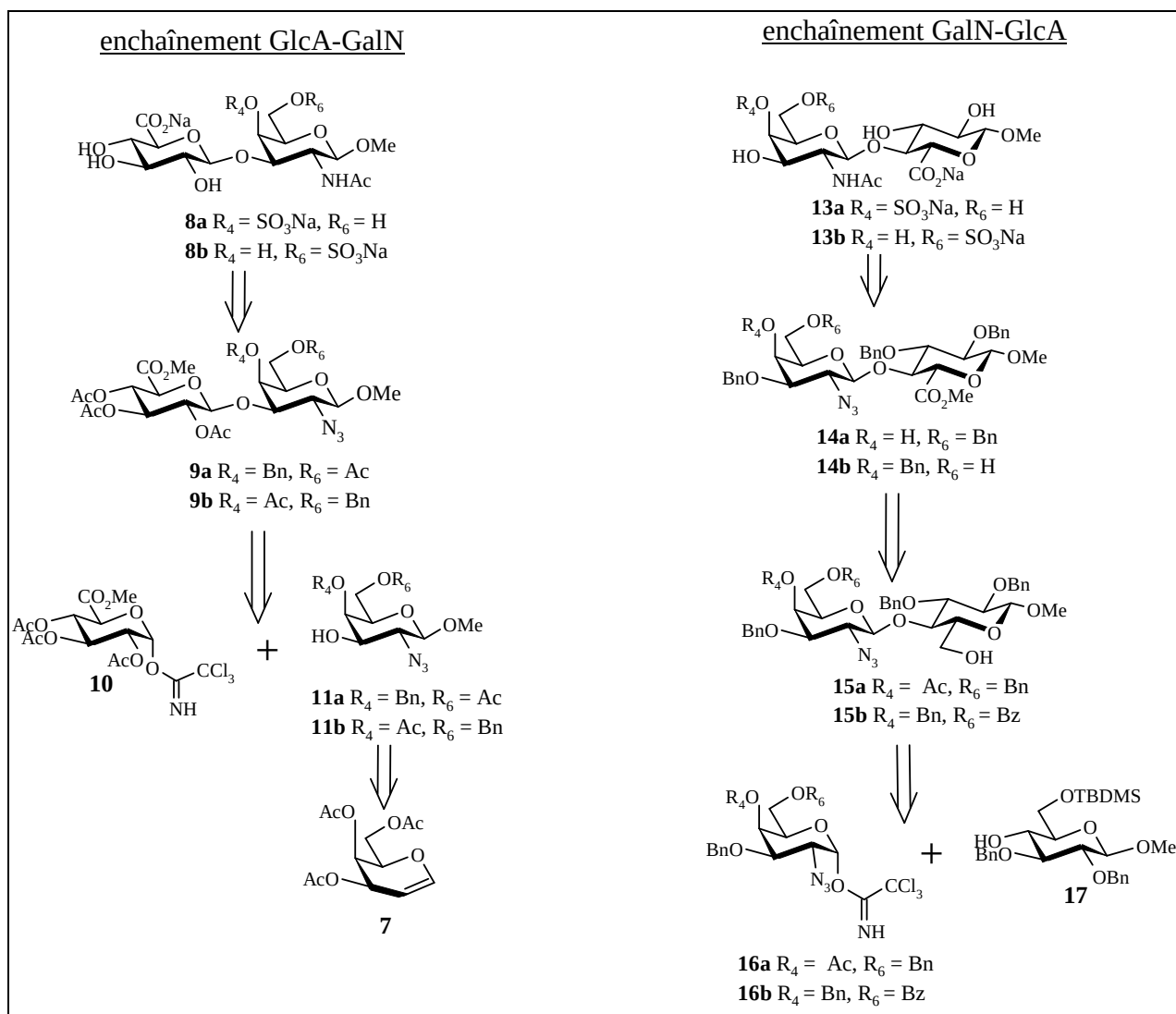


Schéma II. 2

La synthèse des composés d'enchaînement GlcA-GalN **8a** et **8b** débute par la préparation, à partir du D-Galactal **7**²⁸, des motifs D-GalN accepteurs **11a** et **11b**, protégés différemment selon qu'ils conduisent au composé 4- ou 6-sulfaté ; la future position sulfatée est temporairement protégée par un groupement benzyle tandis que l'autre est protégée par un ester acétate.

Les disaccharides **9a** et **9b** sont préparés par couplage entre les accepteurs D-GalN **11a** et **11b** et le dérivé D-GlcA **3** activé par un trichloroacétimide (72-75%) qui s'est avéré être un meilleur partenaire de glycosylation que son homologue α -bromé. Le groupement 2-azido

²⁹ Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **1990**, 199, 153-181

est ensuite transformé en 2-acétamido par de l'acide thioacétique. Une hydrogénolyse des groupements benzyle permet de libérer les hydroxyles qui sont ensuite sulfatés. La sulfatation est alors prouvée par analyse RMN ^1H qui montre un déplacement du signal des protons sur les carbones porteurs de groupements sulfates ($\Delta\delta$ 0.78 ppm pour le H-4, 0.47 ppm et 0.54 ppm pour H-6a et H-6b respectivement). Une étape finale de saponification mène aux disaccharides de sulfate de chondroïtine A **8a** (83%) et C **8b** (86%).

En ce qui concerne la synthèse des unités d'enchaînement inverse GalN-GlcA, la stratégie de protection du résidu de D-GalN sera inversée par rapport à celle précédemment réalisée. Ainsi, la position qui sera sulfatée est protégée par un ester et l'autre par un éther benzylique. Les trichloroacétimides **16a** et **16b** sont couplés avec l'accepteur **17** (50-60%), par un mécanisme « push-pull » ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), puis la déprotection en C-6 du motif D-Glucose permet de synthétiser les disaccharides **15a** et **15b**. L'oxydation de ces intermédiaires en présence de dichromate de pyridinium suivie d'une réaction avec du diazométhane permet d'obtenir les unités disaccharidiques (possédant l'unité uronique) **14a** et **14b** qui sont par la suite réduites puis *N*-acétylées. Une étape de saponification permet la libération des hydroxyles qui sont ensuite sulfatés. L'hydrogénolyse des groupements benzyle conduit aux disaccharides **13a** (87%) et **13b** (60%) désirés.

II-1.3 Synthèse d'un trisaccharide de sulfate de chondroïtine A³⁰

En 1995, l'équipe de J.-C. Jacquinet reporte la synthèse d'un trisaccharide de chondroïtine 4-sulfate. La stratégie utilisée par les auteurs est la préparation d'un trisaccharide **20** dérivé d'acide hyaluronique (enchaînement GlcN-GlcA) qui est ensuite transformé en motif chondroïtine (enchaînement GalN-GlcA) **19** par épimérisation en C-4 de l'unité D-Glucosamine pour donner une D-Galactosamine (Schéma II. 3).

³⁰ Coutant, C.; Jacquinet J.-C. *J. Chem. Soc. Prekin Trans. 1* **1995**, 1573-1581

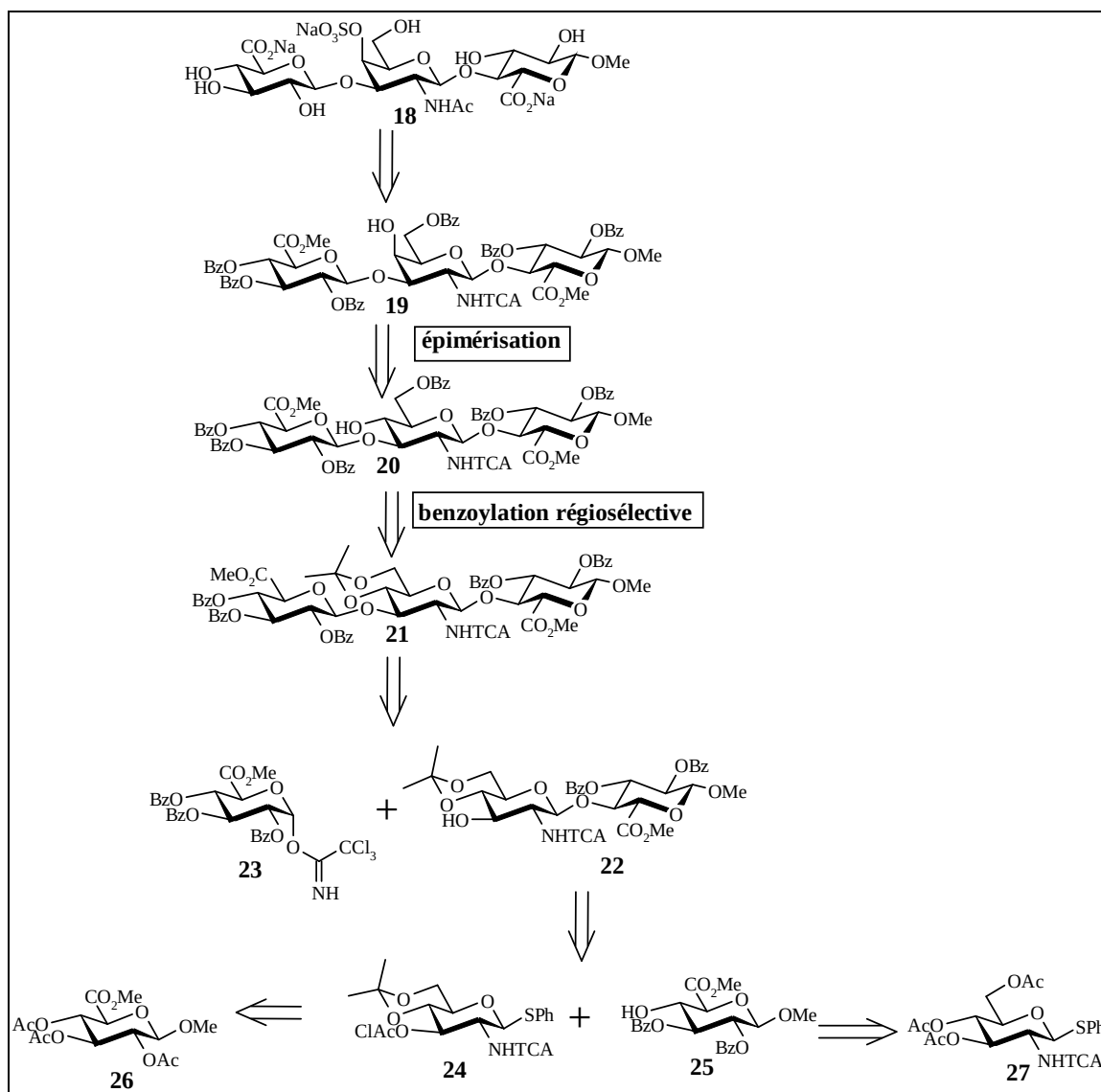


Schéma II. 3

Afin d'accéder au trisaccharide **20**, deux glycosylations successives ont été réalisées. La première fait intervenir, en tant que sucre donneur, une unité D-Glucosamine **24** portant un groupement *N*-trichloroacétyle (NHTCA). La présence de ce groupement trichloroacétamido permet d'augmenter la réactivité du sucre donneur et ainsi d'utiliser directement une unité D-glucuronique plutôt que d'oxyder l'hydroxyle en position 6 après glycosylation comme en 1990²⁹. De plus, ce groupement permet un très bon stéréocontrôle lors des réactions de glycosylations (formation exclusive de liaisons 1,2-*trans*) ainsi qu'un accès direct facile au dérivé 2-acétamido naturel, en conditions neutres (*n*-Bu₃SnH, AIBN)³¹.

La réaction de glycosylation entre le phénylthioglycoside **24** et l'accepteur D-GlcA **25** est réalisée en présence de NIS et de TMSOTf avec un rendement de 90%. La déchloroacétylation en C-4 par la thiourée conduit à l'intermédiaire **22** qui est ensuite glycosylé avec le trichloroacétimide **23** afin de donner le trisaccharide **21** (92%). L'hydrolyse en milieu acide de l'acétal isopropylidène suivie d'une réaction de benzoylation régiosélective en C-6 (BzCN) mène au composé **20** (90%). L'épimérisation de l'hydroxyle en

³¹ Blatter G.; Beau J.-M.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **1994**, 260, 189-202

position 4 (passage du D-Glucose au motif D-Galactose) est réalisée par trifluorométhanesulfonylation et déplacement du triflate intermédiaire par le nitrite de tétrabutylammonium (87%). Après réduction du groupement trichloroacétamido, puis sulfatation et saponification, le trisaccharide de sulfate de chondroïtine A **18** est alors obtenu (80% pour cette dernière étape).

II-1.4 Synthèse de di-, tri- et tétrasaccharides de chondroïtines et sulfates de chondroïtines A, C et E³²

En 1998, l'équipe d'Ogawa décrit la synthèse de di-, tri- et tétrasaccharides 4-, 6-, 4,6-sulfatés ainsi que leurs analogues non sulfatés de séquence GalN₃-GlcA (**28**, **35** et **37**). Pour la première fois une stratégie divergente est utilisée à partir d'un intermédiaire disaccharidique clé **32** décrit en 1995³³ (Schéma II. 4).

³² Tamura J. I.; Neumann K. W.; Kurov S.; Ogawa T. *Carbohydr. Res.* **1998**, 305, 43-63

³³ Tamura J. I.; Neumann K. W.; Ogawa T. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 1351-1354

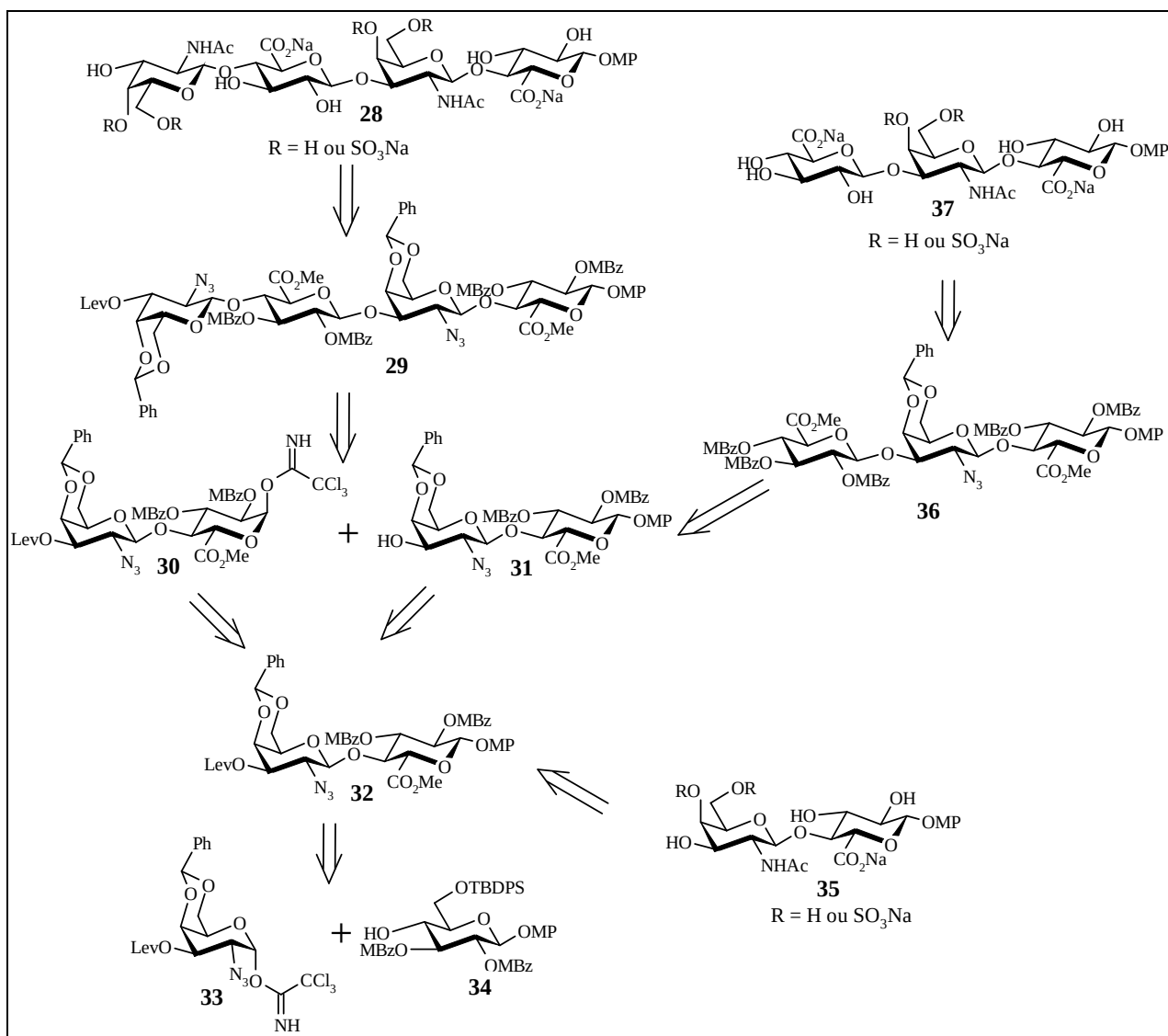


Schéma II. 4

L'intermédiaire clé **32** est le précurseur commun de tous les di-, tri- et tétrasaccharides. Il est obtenu après une réaction de glycosylation, entre les blocs **33** et **34** en présence de BF₃.Et₂O, suivie de la déprotection du groupement silylé (70% sur 2 étapes) afin d'oxyder et d'estérifier la position 6 de l'unité D-Glucose. Cet intermédiaire clé **32** permet l'accès direct au disaccharide final **35**.

Afin d'obtenir le squelette tétrasaccharidique, le disaccharide clé **32** est transformé soit en un bloc donneur **30**, après déprotection du groupement méthoxyphényle et imidoxylation, soit en un bloc accepteur **31** par déprotection quantitative du groupement lévulinoylé. La glycosylation de ces deux blocs conduit au tétrasaccharide **29** avec un rendement de 50%. Pour la préparation du trisaccharide **36**, le bloc disaccharidique accepteur **31** est glycosylé (39%) avec un dérivé monomérique de D-GlcA protégé par des fonctions esters et activé par un groupement trichloroacétimide. Afin d'accéder aux produits finaux, les différents dérivés 2-azido (**29**, **32** et **36**) sont ensuite transformés en dérivés 2-acétamido par hydrogénation catalytique suivie d'une étape d'acétylation.

Une saponification suivie d'une hydrogénolyse catalytique conduit aux composés non sulfatés désirés **28**, **35** et **37** (R = H).

La synthèse des analogues sulfatés est réalisée selon la stratégie suivante et ce, quelle que soit la taille de l'oligosaccharide (Schéma II. 5).

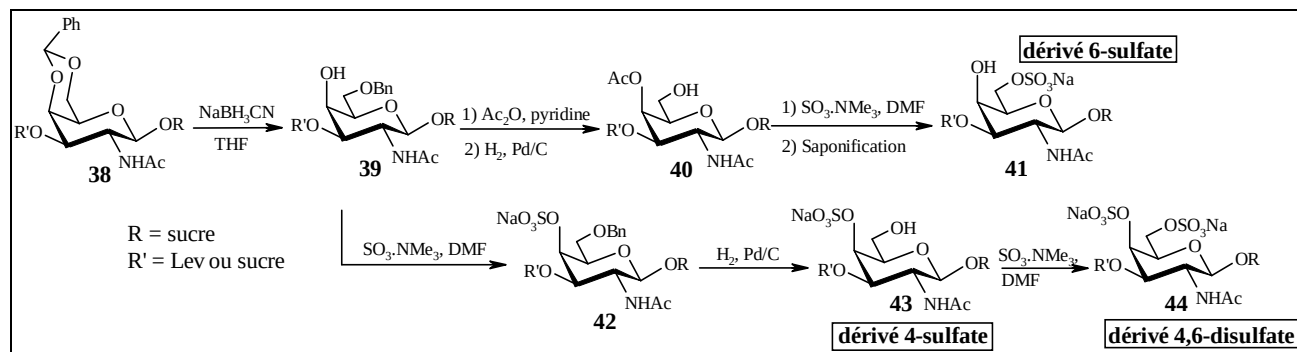


Schéma II. 5

Ainsi, pour commencer, l'acétal benzylidène est ouvert régiosélectivement donnant l'alcool 6-O-benzylé correspondant **39** (51 à 87%).

- L'hydroxyle en position 4 est alors libre et peut donc être sulfaté (**42**). Une réaction de saponification suivie d'une hydrogénolyse catalytique mène aux produits finaux 4-sulfatés **43**.
- Les produits 4,6-disulfatés **44** sont obtenus après sulfatation de l'hydroxyle libre restant en position 6 du dérivé 4-sulfaté et saponification des esters pour terminer.
- En ce qui concerne les produits 6-sulfatés, l'hydroxyle en C-4 de l'intermédiaire 6-O-benzylé est acétylé, puis le groupement benzyle hydrogéné (**40**). L'hydroxyle en position 6 est alors sulfaté, pour conduire après une étape finale de saponification aux composés 6-sulfatés attendus **41**.

Cette stratégie permet l'accès aux di-, tri- et tétrasaccharides sulfatés désirés à partir des intermédiaires **29**, **32** et **36**.

II-1.5 Synthèse de disaccharides réducteurs de sulfates de chondroïtines A et C ³⁴

En 1998, l'équipe de J.-C. Jacquinet reporte, pour la première fois, une stratégie de sulfatation régiosélective d'un diol menant à la synthèse de disaccharides de chondroïtine 6-sulfate **45b** possédant une extrémité réductrice. La synthèse de chondroïtine 4-sulfate **45a** est également décrite (Schéma II. 6).

³⁴ Jacquinet J.-C.; Rochepeau-Jobron L.; Combal J.-P. *Carbohydr. Res.* **1998**, 305, 43-63

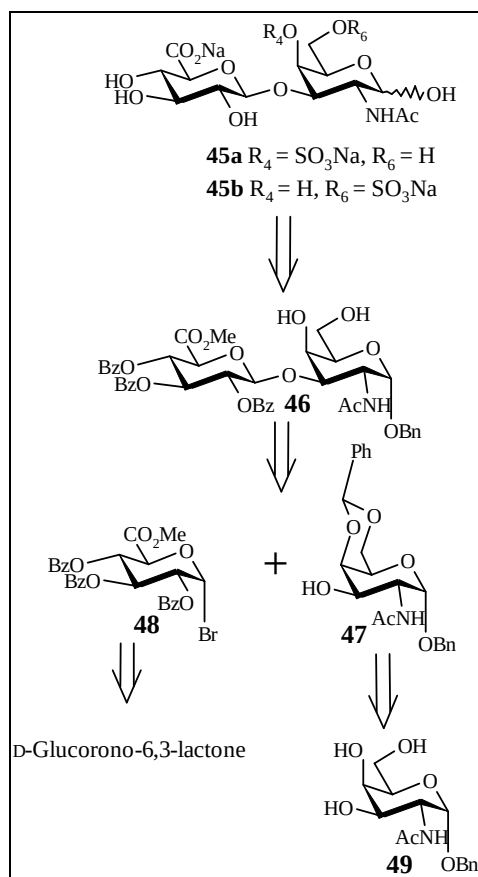


Schéma II. 6

Les deux disaccharides finaux sont préparés à partir d'un même diol intermédiaire **46**. Ce disaccharide **46** est obtenu par glycosylation entre le dérivé de D-GlcA donneur **48** et l'accepteur 4,6-O-benzylidène **47** en présence de triflate d'argent (70%), suivie d'une hydrolyse acide de l'acétal benzylidène. Les blocs **47** et **48** sont, quant à eux, obtenus respectivement à partir de **49** et de la D-Glucurono-6,3-lactone. A partir du diol **46**, deux stratégies sont alors entreprises afin de conduire aux composés 4- ou 6-sulfaté (Schéma II. 7).

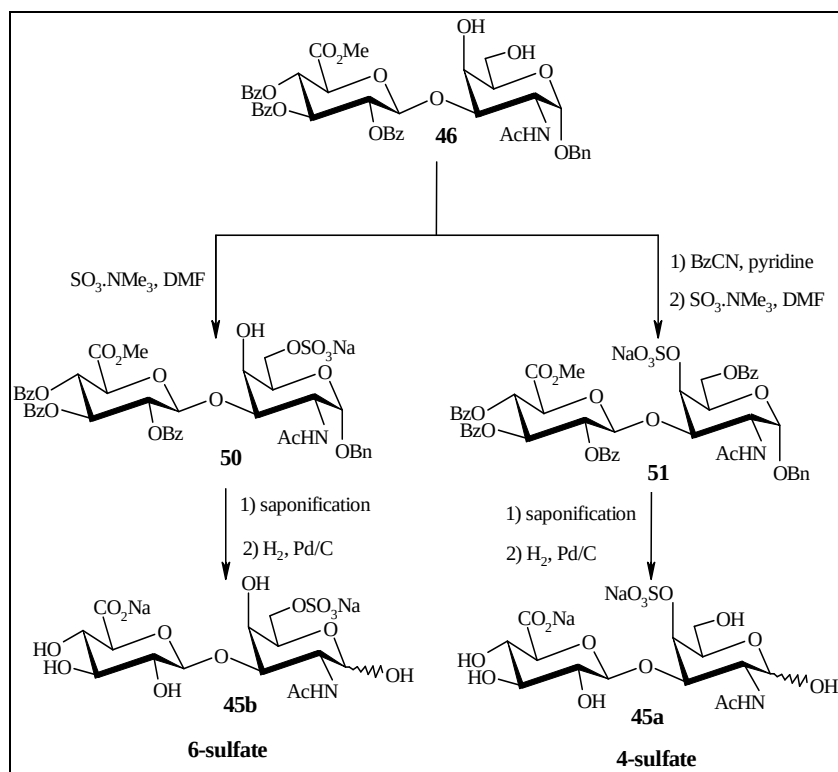


Schéma II. 7

• Ainsi, afin d'accéder au disaccharide 6-sulfaté **45b**, une sulfatation régiosélective en position 6 du diol **46** par un complexe de trioxyde de soufre-triéthylamine, suivie d'une chromatographie d'échange d'ions, est réalisée pour donner l'intermédiaire **50** avec un rendement de 90%. Cette dernière est prouvée par RMN ¹H avec un déplacement des signaux H-6a et H-6b et aucun changement au niveau du H-4, résultats en accord avec ceux énoncés en 1990²⁹. La molécule est ensuite saponifiée par de l'hydroperoxyde de lithium puis par de l'hydroxyde de sodium en présence de méthanol. L'hydrogénéolyse de l'éther benzylique conduit au disaccharide 6-sulfaté réducteur **45b** attendu.

• En ce qui concerne l'accès au composé **45a**, une protection régiosélective en position 6 par un groupement benzoyle (93%), suivie d'une sulfatation dans les mêmes conditions que celles décrites auparavant (90%) permet d'obtenir le composé sulfaté en position 4 **51**. Une réaction de saponification des esters et une étape finale d'hydrogénéolyse (97%) donnent le disaccharide 4-sulfaté **45a** désiré.

II-1.6 Synthèse de pentasaccharides de sulfates de chondroïtines A et

³⁵

En 2000 l'équipe de J.-C. Jacquinet décrit la synthèse de pentasaccharides 4-sulfaté (**52a**) et 6-sulfaté (**52b**) en série méthyle glycoside. Leur approche s'effectue à partir d'un tétrasaccharide **56** construit selon deux voies différentes, l'une par addition successive de monomères, l'autre par couplage de deux disaccharides (Schéma II. 8).

³⁵ Bélot F.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **2000**, 326, 88-97

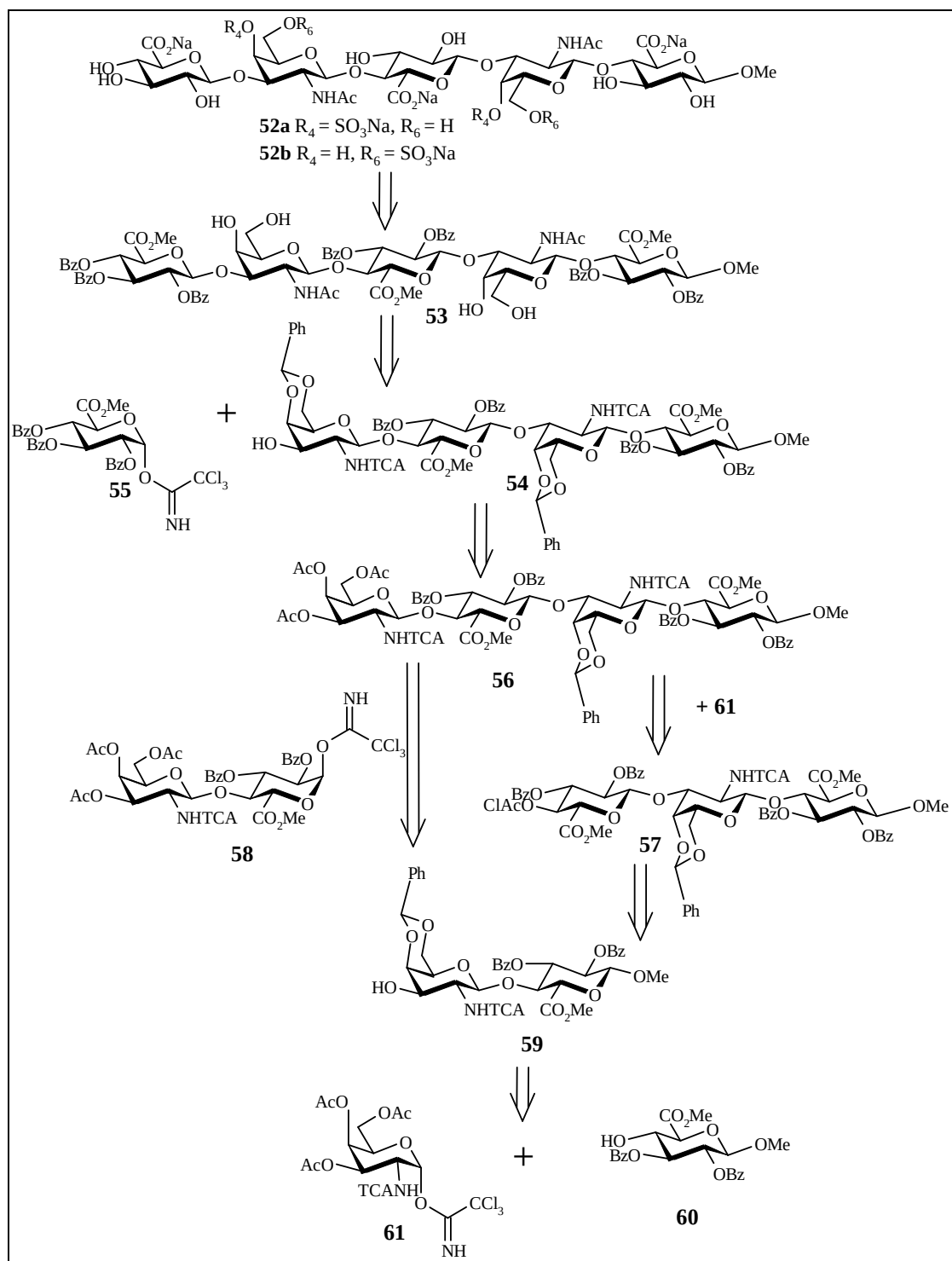


Schéma II. 8

Au cours d'une publication précédente³⁶, la synthèse du précurseur disaccharidique **59** a été décrite. Les auteurs ont notamment démontré que la réaction de glycosylation avec une unité 4,6-*O*-benzylidène-D-Galactosamine en tant que sucre donneur, bien que portant un groupement 2-trichloroacétamido, conduisait à un mélange de disaccharides α/β inséparables.

³⁶ Bélot F.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **2000**, 325, 93-106

Afin de préparer le disaccharide **59**, l'étape de glycosylation a donc été réalisée avec le trichloroacétimide **61**, possédant non plus un acétal benzylidène mais des esters acétates, et l'accepteur **60** (76%). Les groupements acétate du disaccharide obtenu sont transestérifiés et l'acétal 4,6-*O*-benzylidène est mis en place avec du benzaldéhyde en milieu acide pour donner le composé **59** désiré. Ce dernier est alors :

- Soit glycosylé avec une unité D-GlcA sélectivement protégée en C-3 afin de préparer le trisaccharide **57** (84%) qui est ensuite déchloroacétylé (87%), puis glycosylé avec le trichloroacétimide **61** (78%) pour conduire au tétrasaccharide **56** avec un rendement global de 57% pour cette voie.
- Soit glycosylé avec un trichloroacétimide disaccharidique **58** avec un rendement global de 50% pour donner le tétrasaccharide **56**.

Par la suite, comme pour la synthèse du disaccharide **59**, l'accepteur en C-4 **54** est obtenu après transestérification des esters acétates, protection des positions 4 et 6 par un acétal benzylidène (60%). Le couplage avec le trichloroacétimide **55** conduit à un pentasaccharide avec un rendement de 55%. Les groupements *N*-trichloroacétyles du pentasaccharide préparé sont alors réduits (79%) et les acétals benzylidènes hydrolysés (79%) donnant le tétrol **53**. Afin d'obtenir les composés finaux, la stratégie de sulfatation décrite en 1998³⁴ est alors adoptée (Schéma II. 7).

Ainsi les composés 6-sulfatés **52b** sont obtenus après sulfatation régiosélective (87%) et saponification (80%), et les composés 4-sulfatés **52a** après benzylation régiosélective en C-6, sulfatation en C-4 (88%) et saponification (78%).

II-1.7 Synthèse d'oligosaccharide de sulfates de chondroïtines D³⁷

Jusqu'alors aucune synthèse chimique d'oligosaccharides de sulfates de chondroïtines D n'avait été reportée. Seuls des fragments obtenus par action d'enzymes bactériennes (chondroïtinase, hyaluronidase) avaient été préparés^{38, 39, 40}, mais ces fragments n'étaient pas utilisables pour des essais de reconnaissance ou en tant que substrats pour les enzymes de biosynthèse.

Pour la première fois en 2000⁴¹, J.-C. Jacquinet et son équipe reportent la synthèse d'un disaccharide 2',6-disulfaté. Dans la continuité de leurs travaux sur ce type de chondroïtine, ils décrivent en 2002 la première synthèse d'un tétrasaccharide **62** et d'un hexasaccharide **63** (Schéma II. 9).

³⁷ Karst N.; Jacquinet J.-C. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 815-825

³⁸ Sugahara K.; Tanaka S.; Yamada S. *Glycoconjugate J.* **1996**, 13, 609

³⁹ Sugahara K.; Nakanaka S.; Takeda K.; Kojima T. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 871

⁴⁰ Nakanaka S.; Sugahara K. *Glycobiology* **1997**, 7, 253

⁴¹ Karst N.; Jacquinet J.-C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2709-2717

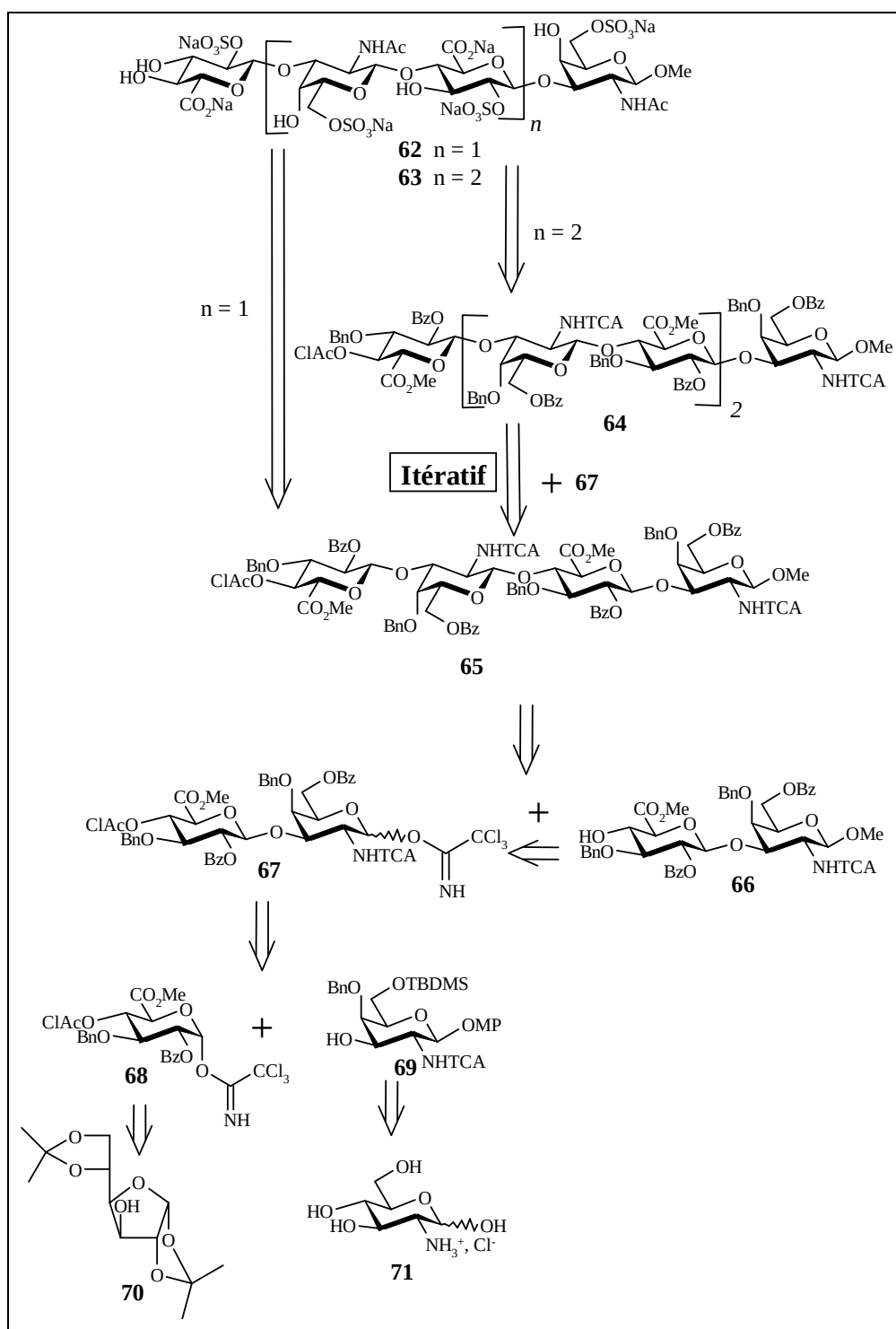


Schéma II. 9

La stratégie fixée par les auteurs était d'utiliser des groupements benzoylés comme protection temporaire des hydroxyles qui seront sulfatés (soit les positions 6 et 2') et des groupements hydrogénolysables en fin de synthèse comme protection permanente.

Le tétrasaccharide et l'hexasaccharide sont préparés, par une synthèse itérative, à partir de deux blocs disaccharidiques communs **67** et **66**. Le trichloroacétimidate clé **67** est obtenu à partir des unités D-GlcA **68** (bloc donneur) et D-GalN **69** (bloc accepteur), elles-mêmes préparées en 12 étapes chacune à partir des produits commerciaux **70** et **71**.

respectivement selon une stratégie décrite en 2000⁴¹ par les auteurs. La réaction de glycosylation en présence de TMSOTf des blocs **68** et **69** (71%) suivie de la désilylation donne un disaccharide portant un hydroxyle libre en position 6. La protection par un ester benzoate de ce C-6, puis le clivage oxydant du groupement méthoxyphényle et une réaction d'imidoxylation (64%) permet d'obtenir l'intermédiaire **67**. Ce composé peut alors conduire au disaccharide accepteur **66** après glycosylation avec du méthanol (86%) et déchloroacétylation (91%).

De façon itérative, le trichloroacétimide **67** est couplé avec l'accepteur disaccharidique **66** pour synthétiser le tétrasaccharide **65** qui va subir une déchloroacétylation (44% pour ces deux étapes), et peut alors de nouveau réagir avec le disaccharide donneur **64** pour donner l'hexasaccharide **64** qui sera lui aussi déchloroacétylé (46% pour ces 2 étapes). L'hydroxyle libre en C-4 du D-GlcA des tétra- et hexasaccharide obtenus est alors protégé par un groupement 4-méthoxybenzyle (hydrogénolysable en fin de synthèse comme prévu dans la stratégie de départ des auteurs).

Après réduction du groupement *N*-trichloroacétyl, saponification des esters benzoates, sulfatation des positions 6 et 2', et enfin hydrogénolyse, les produits finaux de sulfate de chondroïtine D **62** (93%) et **63** (68%) ont été obtenus.

II-1.8 Synthèse de di- et tétrasaccharide de sulfate de chondroïtine E⁴²

En 2004, l'équipe de Hsieh-Wilson publie la synthèse d'un disaccharide **77** et d'un tétrasaccharide **73** de chondroïtine 4,6-disulfate ainsi que l'homologue tétrasaccharidique non sulfaté **71** pour l'étude de la croissance neuronale (Schéma II. 10).

⁴² Tully S. E.; Mabon R.; Gama C. J.; Tsai S. M.; Liu X.; Hsieh-Wilson L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7736-7737

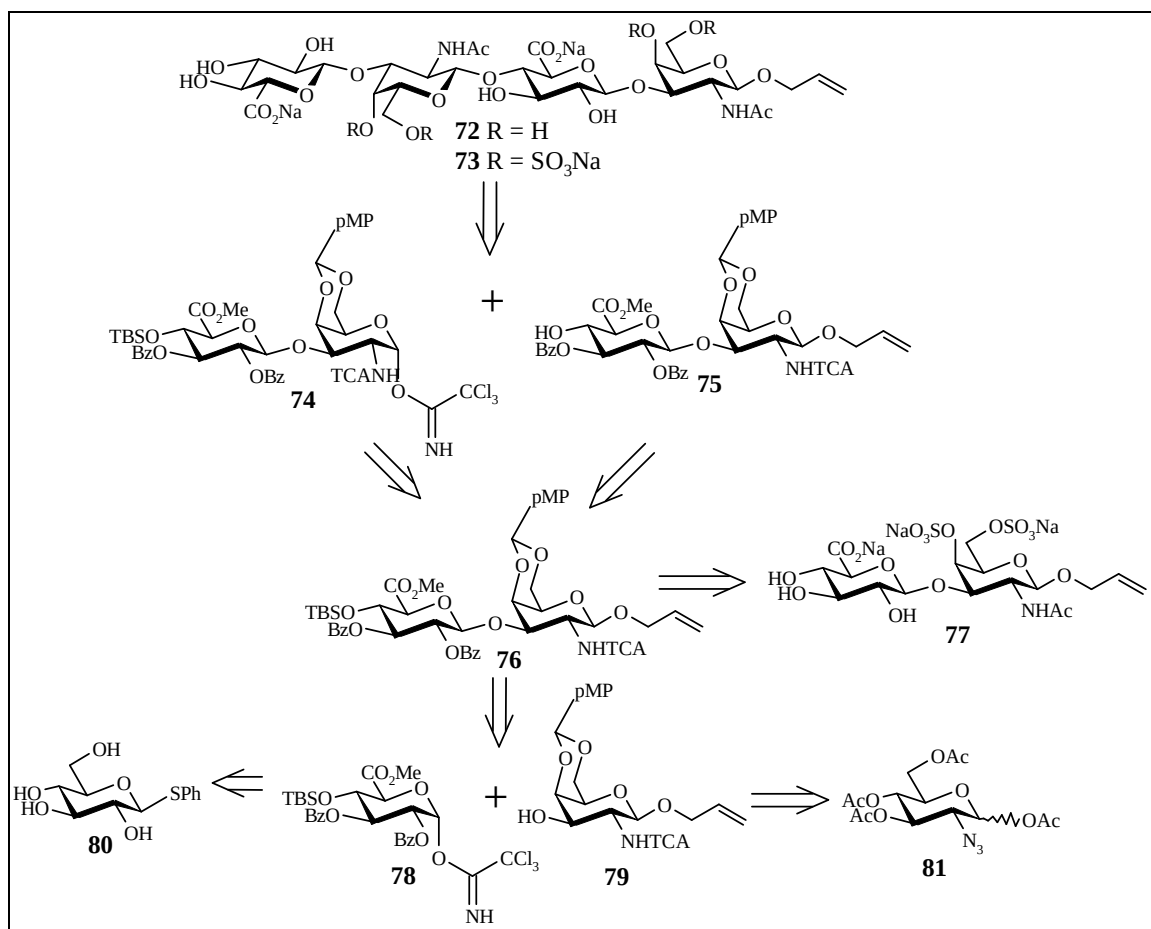


Schéma II. 10

Une stratégie divergente est envisagée à partir du disaccharide **76**. Ce dernier est obtenu par le couplage des blocs D-GlcA **78** et D-GalN **79** (74%) eux-mêmes préparés à partir des monomères commerciaux **80** et **81** en 8 et 9 étapes respectivement. L'intermédiaire clé **76** peut alors être transformé soit en un disaccharide donneur **74** après déprotection du groupement allyle par une hydrogénolyse en présence d'un catalyseur de Grubbs suivie d'une réaction d'imidoxylation, soit en un disaccharide accepteur **75** après désilylation en C-4'. La réaction de glycosylation entre ces deux unités donne un tétrasaccharide avec 30 à 40% de rendement. Afin d'obtenir les composés finaux, le(s) groupement(s) 2-trichloroacétamido sont réduits en groupements 2-acétamido, puis le(s) acétal(s) para-méthoxyphénylbenzylidène sont hydrolysés, libérant les hydroxyles des positions 4 et 6 qui sont ensuite sulfatés ou non. Les molécules sont enfin saponifiées et désilylées pour donner **72**, **73** et **77** avec 52%, 93% et 67% de rendements respectivement.

II-1.9 Synthèse d'un hexa- et d'un octasaccharide de sulfate de chondroïtine E

En 2004⁴³ et 2008⁴⁴ l'équipe de Tamura reporte successivement la synthèse d'un hexasaccharide **82** et d'un octasaccharide **83** de chondroïtine 4,6-disulfate (Schéma II. 11).

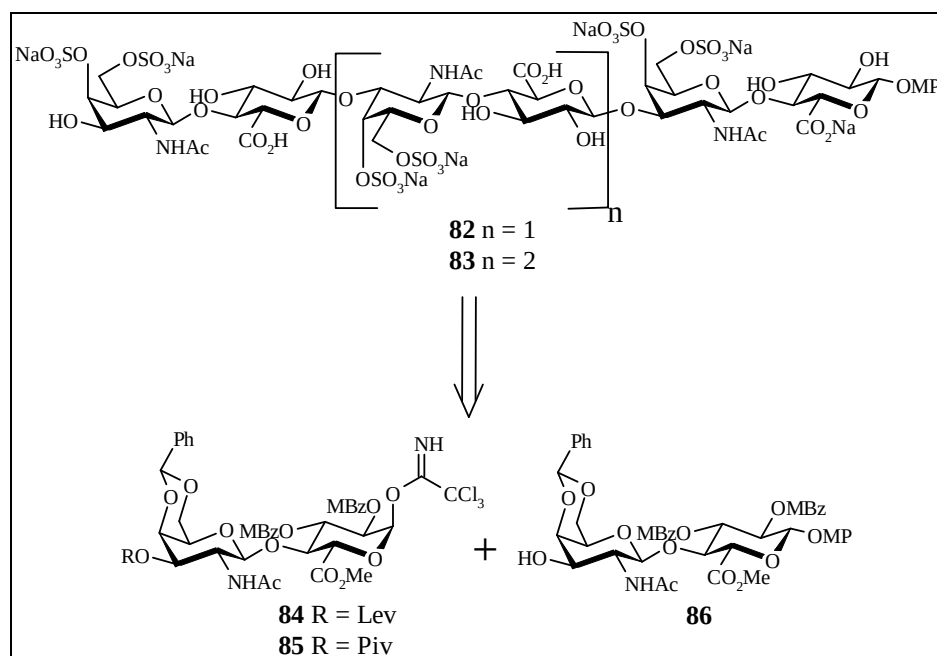


Schéma II. 11

Les intermédiaires disacchariques clés utilisés sont identiques à ceux décrits en 1998³² (Schéma II. 4) à la différence près que ces derniers ne sont plus 2-azido mais 2-acétamido. En effet, lors de la préparation de l'hexasaccharide, l'étape de réduction du groupement azoture ayant donné un rendement très faible (<10%), les auteurs ont choisi d'utiliser les blocs disaccharidiques accepteurs et donneurs *N*-acétylés. Le bloc accepteur **86** ainsi que le précurseur 1-*O*-méthoxyphényle du trichloroacétimide **84** avaient déjà été décrits en 1998³². L'hexa- et l'octasaccharide sont donc construits de façon itérative, par réactions successives de glycosylations du disaccharide **84** en présence de TMSOTf (64% de rendement pour la glycosylation de l'hexasaccharide) suivie de déprotections du groupement lévulinoyle jusqu'à l'hexasaccharide accepteur. L'étape de glycosylation menant à l'octasaccharide est réalisée avec le trichloroacétimide pivaloylé **85** (58%). Les acétals benzylidène sont hydrolysés par de l'ACS, les positions 4 et 6 sont sulfatées et pour terminer les composés sont saponifiés donnant l'hexasaccharide **82** et l'octasaccharide **83**.

II-1.10 Synthèse d'oligomères de chondroïtines à partir d'un polymère

En 2006⁴⁵, C. Lopin et J.-C. Jacquinet décrivent la synthèse d'oligosaccharides de chondroïtines non sulfatés (di-, tétra- et hexasaccharide) ainsi que la préparation de

⁴³ Tamura J.I.; Tokuyoshi M. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **2004**, 68, 2436-2443

⁴⁴ Tamura J.I.; Nakada Y.; Tanigushi K.; Yamane M. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 39-47

⁴⁵ Lopin C.; Jacquinet J.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2574-2578

disaccharides clés, précurseurs des différentes sulfoformes de chondroïtines. Pour ce faire, ils ont mis au point une préparation innovante de ces unités par hydrolyse acide d'un polymère de sulfates de chondroïtines commercial, permettant un accès rapide à l'intermédiaire clé **87** (Schéma II. 12).

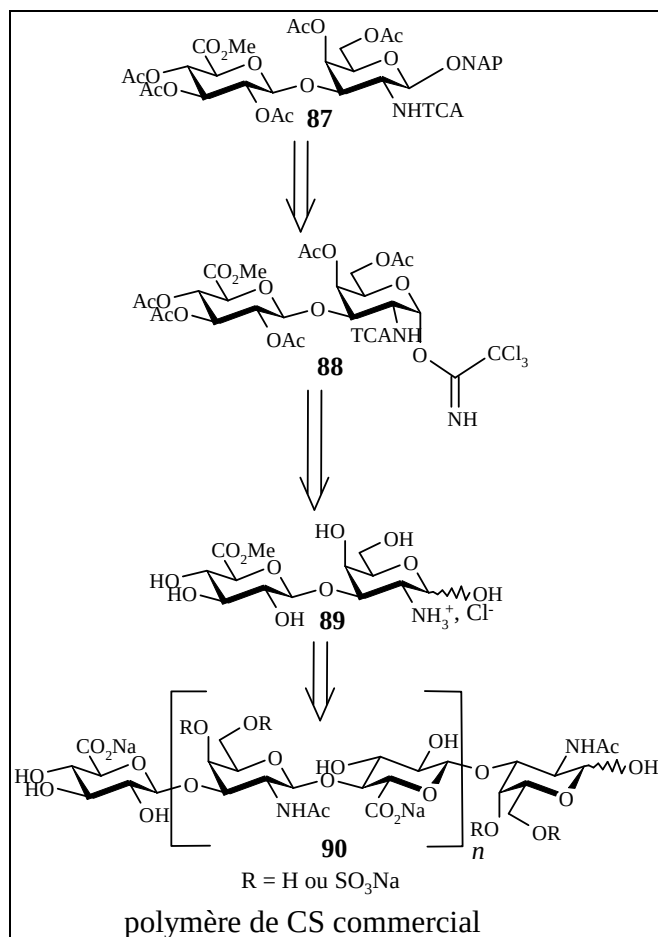


Schéma II. 12

L'hydrolyse acide du polymère de sulfates de chondroïtines **90** est basée sur les travaux antérieurs de Levene⁴⁶ et, de Davidson et Meyer⁴⁷ qui cherchaient à étudier la structure de base des unités répétitives de sulfates de chondroïtines, la chondrosine. Ainsi, cette hydrolyse conduit à un chlorhydrate d'amine disaccharidique hémiacétalique désulfaté et *N*-désacétylé d'enchaînement GlcA-GalN, qui, après estérification conduit à l'unité de base **89**. Le trichloroacétimide **88** *N*-trichloroacétylé est préparé à la suite de différentes étapes de protections/déprotections et d'une activation du carbone anomérique. Une étape de glycosylation avec le 2-naphtylméthanol conduit au composé **87**.

Ce disaccharide **87** est l'intermédiaire clé commun qui va permettre l'accès à tous les oligomères décrits dans cette publication (Schéma II. 13).

⁴⁶ Levene P. A. *J. Biol. Chem.* **1941**, 140, 267-277

⁴⁷ Davidson E. A.; Meyer K. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 5686-5689

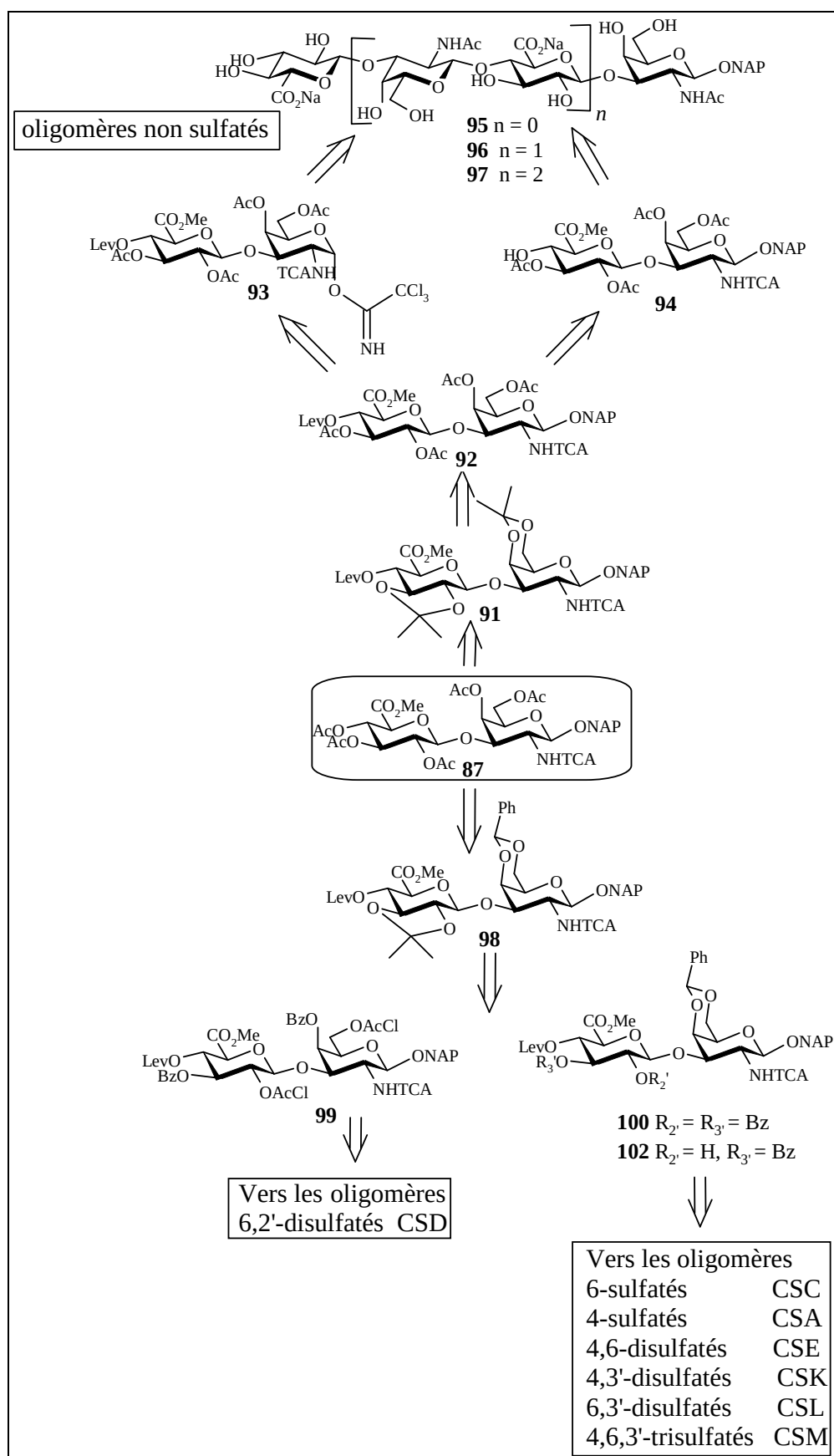


Schéma II. 13

En ce qui concerne la synthèse des oligomères non sulfatés, l'intermédiaire **91** est préparé à partir de **87** après une transestérification des esters acétates, protection des positions 2',3' et 4,6 par un acétal isopropylidène (67%) permettant la lévulinoylation en C-4'. Une hydrolyse des acétals isopropylidène et une étape d'acétylation conduit à l'intermédiaire **91**, qui peut alors être transformé soit en bloc accepteur **94** par délévulinoylation, soit en bloc donneur **93** par clivage oxydant du groupement naphthylméthyle et imidoylation. Le tétra- et l'hexasaccharide sont construits de manière itérative par glycosylations et délévulinoylations successives de ce trichloroacétimide lévulinoylé (57-65%). Les composés finaux **95**, **96** et **97** sont obtenus après réduction des groupements *N*-trichloroacétyles et saponification des esters.

Afin d'accéder aux précurseurs des sulfates de chondroïtines, les auteurs ont synthétisé, toujours à partir de l'intermédiaire **87**, le composé **98** possédant deux acétals différents. Ces deux acétals permettent, après une succession de protections/déprotections sélectives, de conduire à quatre composés disaccharidiques **99**, **100** et **102** qui sont les précurseurs des différentes sulfoformes de chondroïtines (A, C, D, E, K, L et M) naturels existants.

II-2 SYNTHÈSES PAR VOIE ENZYMATIQUE

II-2.1 Synthèse de 2000⁴⁸

En 2000, une synthèse enzymatique est reportée utilisant l'activité de transglycosylation d'une glycosidase (= hyaluronidase) ainsi que son activité inverse, l'hydrolyse (Schéma II. 14).

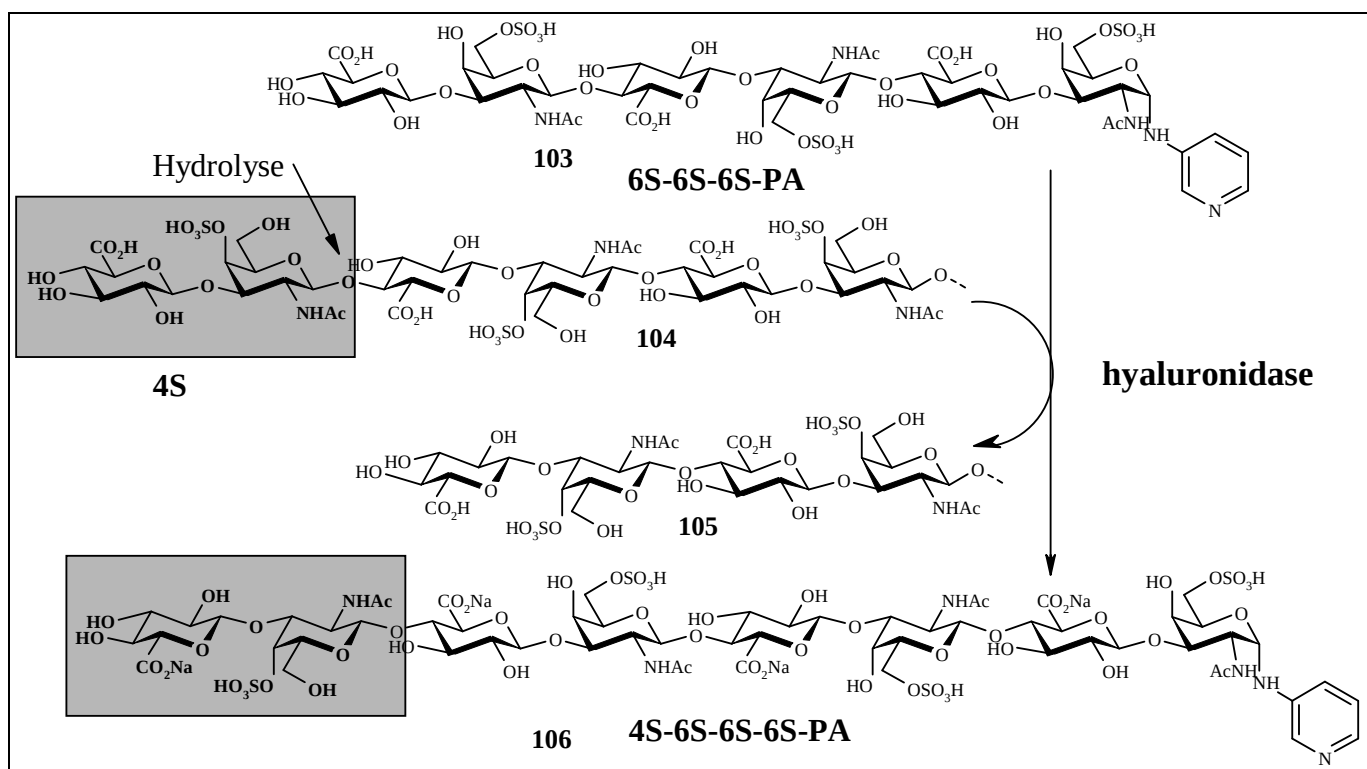


Schéma II. 14

⁴⁸ Keiichi T.; Keinosuke I. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2000**, 67, 295-306

L'hyaluronidase, après catalyse de l'hydrolyse d'un polymère de chondroïtines **104** va aussi catalyser la réaction de transglycosylation transférant ainsi le disaccharide terminal (**4S**) du donneur **104** sur l'accepteur **103**. L'oligomère **106** formé devient à son tour un accepteur pour une nouvelle réaction de transglycosylation.

Les réactions de transglycosylation sont réalisées à pH 7 pendant 1 heure à 37°C. Les oligomères de sulfates de chondroïtines **103** sont synthétisés avec à leurs extrémités réductrices un groupement 2-aminopyridine (PA). Ce dernier, en effet, facilite l'analyse des produits de réactions par spectrométrie de masse. La détermination de la masse moléculaire et de la sulfatation est donc réalisée par MS/MS.

Il a été montré que des oligomères avec des sulfatations hétérogènes pouvaient être préparés. En revanche les composés 2',6-disulfatés et 4,6-disulfatés ne peuvent pas être transférés comme blocs donneurs mais il est possible de les utiliser en tant que blocs accepteurs de départ. Plusieurs bibliothèques de composés ont été ainsi préparées avec diverses combinaisons de sulfatations.

II-2.2 Synthèse chimio-enzymatique à partir d'un intermédiaire oxazoline

L'équipe de S. Kobayashi reporte la synthèse enzymatique de chondroïtines⁴⁹ et de chondroïtine 4-sulfate⁵⁰ catalysée par une hyaluronidase à partir d'un intermédiaire oxazoline. En effet, ces intermédiaires sont des analogues de l'état de transition lors des réactions enzymatiques (= issu du clivage de la liaison (1→4) par une hyaluronidase) (Schéma II. 15).

⁴⁹ Kobayashi S.; Fujikawa S. I.; Ohmae M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14357-14369

⁵⁰ Fujikawa S. I.; Ohmae M.; Kobayashi S. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2935-2942

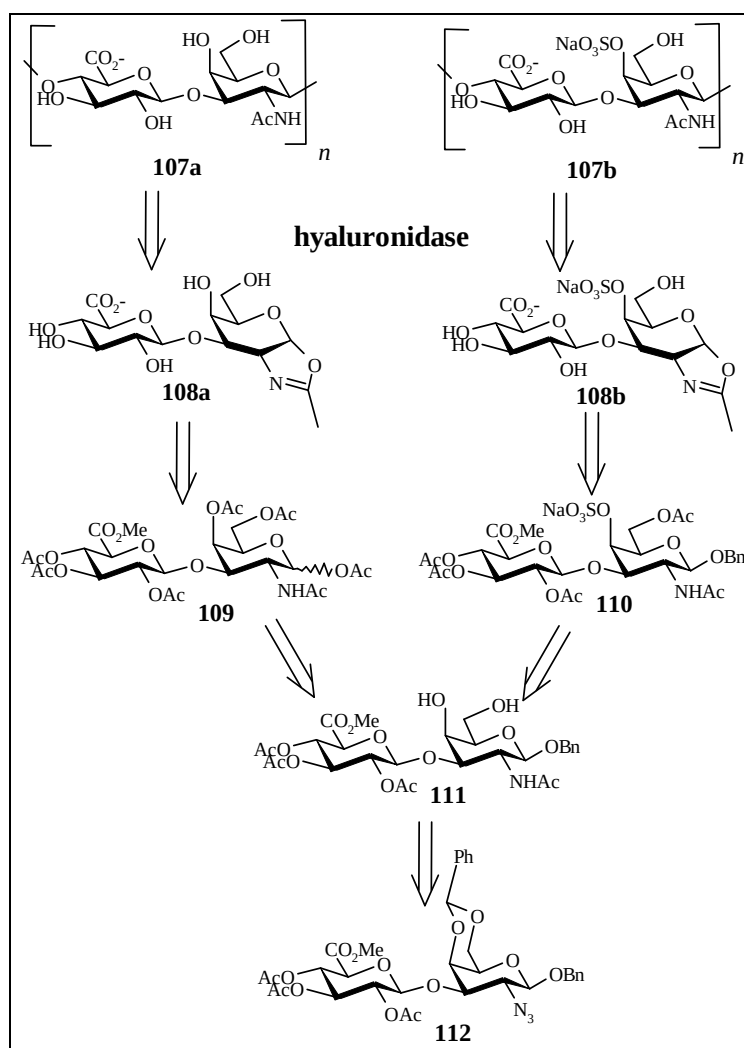


Schéma II. 15

La préparation des deux oxazolines désirées (sulfatées ou non) est réalisée à partir de l'intermédiaire **111**. Ainsi, le groupement 2-azido du disaccharide **112** est transformé en groupement 2-acétamido (participant) par de l'acide thioacétique (86%), puis l'acétal benzylidène est hydrolysé conduisant au diol **111**. L'intermédiaire **109**, précurseur des composés non sulfatés, est obtenu après acétylation du diol, hydrogénolyse puis acétylation de la position anomérique. L'intermédiaire **110**, précurseur des composés 4-sulfatés, est préparé à partir de ce même diol **111** par acétylation régiosélective en position 6 puis sulfatation en position 4 (54%).

Afin d'accéder aux oligomères **107a** et **107b**, les oxazolines **108a** et **108b** ont été synthétisées.

Ainsi, l'oxazoline **108a** est obtenue après réaction de **109** en présence de TMSOTf (89%), puis transestérification des groupements acétates par méthanolysse.

L'oxazoline **108b**, quant à elle, est obtenue après hydrogénolyse de l'éther benzylque anomérique, estérification puis activation par du chlorure de tosyte en présence de diméthylaminopyridine (54%).

La polymérisation de ces deux oxazolines est ensuite réalisée par une hyaluronidase de testicules de moutons (H-OTH= Ovine testicular HAase). Les oligomères de chondroïtines **107a** sont ainsi obtenus avec un rendement de 50% et une masse moléculaire (M_n) de 2100 (M_w 2500, décasaccharide principalement). En changeant les conditions de réaction (temps de

réaction, pH, tampon, enzyme H-BTH), des oligomères ayant des masses de 1600 (octasaccharide) à 4800 (24-saccharide) sont obtenus.

Dans le cas de l'oxazoline **108b**, la polymérisation par H-OTH donne des oligomères **107b** dont la plus haute masse moléculaire est de 18400 (M_n) pour 64% de rendement ce qui correspond à 72-74 unités saccharidiques.

II-2.1 Synthèse séquentielle d'oligosaccharides de chondroïtines via l'utilisation d'une chondroïtine polymérase mutante⁵¹

En 2008, la synthèse d'oligosaccharides de chondroïtines (de 7 à 16 sucres) a été réalisée de manière séquentielle en utilisant deux enzymes mutantes-immobilisées sur billes (Schéma II. 16).

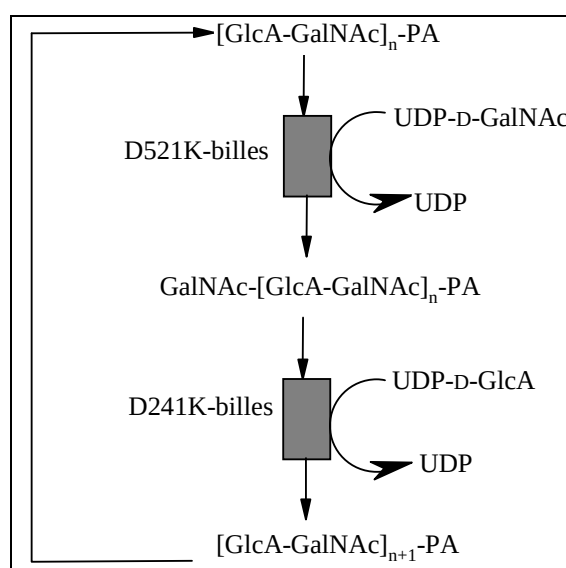


Schéma II. 16

L'enzyme K4CP, exprimée chez *Escherichia Coli*, est une chondroïtine polymérase qui possède deux activités de type transférase. Ainsi cette enzyme transfère alternativement l'unité D-GlcA et l'unité D-GalNAc à partir des sucres donneurs UDP-D-GlcA et UDP-D-GalNAc sur un oligosaccharide de chondroïtine accepteur.

Afin de synthétiser séquentiellement les oligosaccharides de chondroïtines, les auteurs ont réalisé des mutations sur cette enzyme permettant d'annuler l'activité de l'une des deux transférases tout en maintenant l'activité de la seconde. Deux enzymes mutantes greffées sur billes ont ainsi été préparées : D-241K (GlcA-T) qui transfère l'unité D-GlcA et D-251K (GalNAc-T) qui transfère l'unité D-GalNAc.

La synthèse séquentielle des oligosaccharides (CH-PA) est réalisée à partir de l'hexasaccharide portant le groupement 2-aminopyridine (CH6-PA) comme substrat accepteur initial. Le groupement pyridylamine (PA) permet de faciliter la détection par fluorescence. Les composés de motifs impairs sont obtenus par réaction avec l'UDP-D-GalNAc et D521K-immobilisée sur billes dans 1mL de tampon (pH 7.2) 1 à 2 heures à 30°C. Le filtrat contenant CH7-PA est séparé des billes d'enzymes et utilisé sans purification pour la synthèse des motifs pairs. Il est, ensuite, mélangé avec l'UDP-D-GlcA et l'enzyme D421K-immobilisée sur

⁵¹ Sugiura N.; Shimokata S.; Minamisawa T.; Hirabayashi J.; Kimata K.; Watanabe H. *Glycoconj. J.*, **2008**,

billes, agité à 30°C, jusqu'à complète élongation. CH8-PA est alors obtenu. Ces deux étapes sont répétées jusqu'à l'obtention de la taille désirée (CH-7 à CH-16). Les différents oligosaccharides sont analysés par MALDI-TOF MS/MS.

II-3 SYNTHÈSE COMBINATOIRE⁵²

En 1999, A. Lubineau et D. Bonnaffé publient une librairie de 8 formes de sulfates de chondroïtines obtenues par une approche combinatoire. Cette méthodologie permet d'obtenir les composés en 13 étapes par un protocole « split and pool » contre 25 pour une synthèse multiparallèle. Pour la première fois l'unité D-Galactosamine est préparée à partir d'une unité D-Glucosamine **116** par oxydation puis réduction sélective en C-4 (Schéma II. 17).

⁵² Lubineau A.; Bonnaffé D. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2523-2532

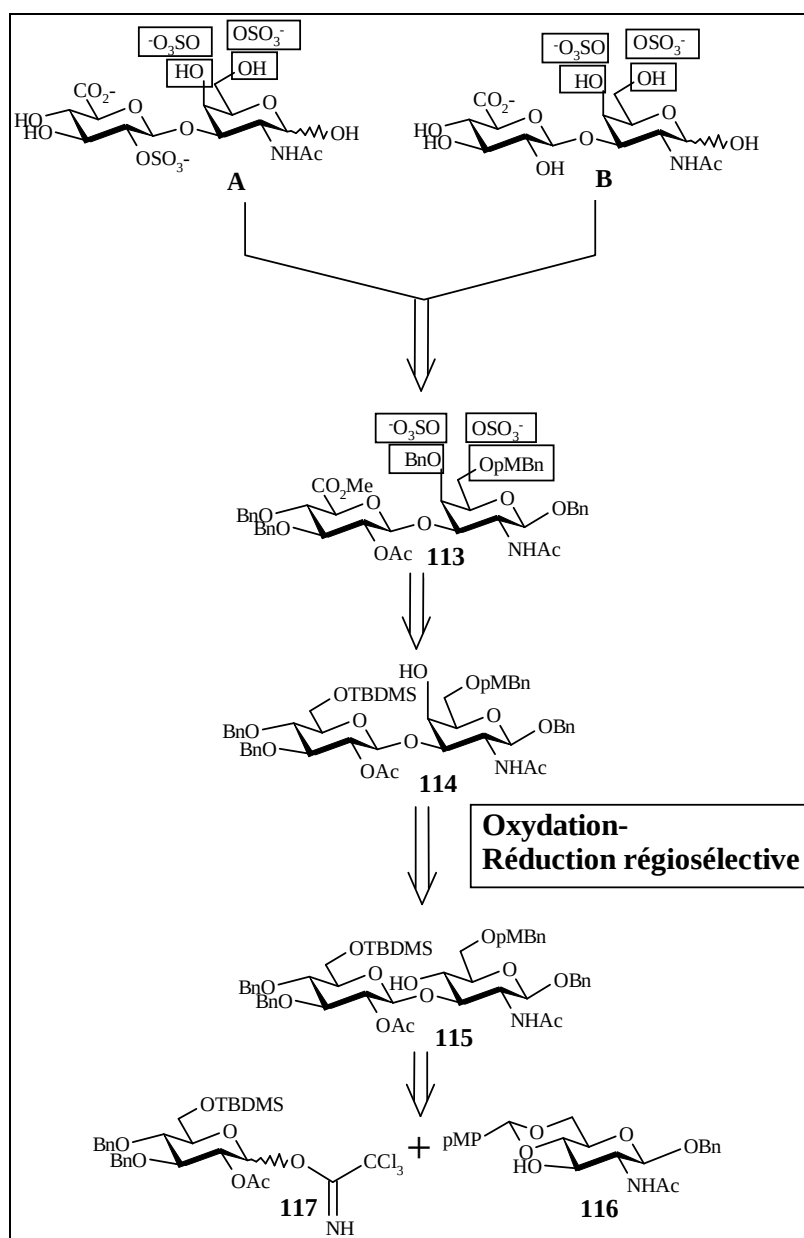


Schéma II. 17

Une réaction de glycosylation entre les unités D-Glucose **116** et **117** suivie de différentes étapes de protections conduit au disaccharide **115**. Afin d'obtenir le motif D-GalN désiré, la position 4 de l'unité D-Glucosamine est oxydée dans des conditions de Swern puis réduite sélectivement par du K-Sélectride pour donner l'épimère D-Galactosamine (88%) et conduire ainsi au disaccharide clé **114**. Par la suite, chacune des étapes est suivie par HPLC en phase inverse. Les librairies sont purifiées sous forme de sels de tétrabutylammonium sur LH-20, le sel facilitant la quantification des sulfatations en analyse RMN.

Le disaccharide clé **114** est tout d'abord diversement sulfaté ou benzylé en C-4 (92% et 90% respectivement). Les produits sont ensuite réunis pour être désilylés quantitativement en C-6, afin d'être oxydés dans des conditions de Swern, puis estérifiés par du méthanol en présence de potasse et de diiode, la position 2' est réacétylée (92%). Les composés sont à nouveau divisés en deux parties, puis sont soit déprotégés en C-6 par du DDQ et sulfatés, soit laissés tels quels pour ensuite être rassemblés en une librairie **113** de 4 composés. Cette dernière est alors séparée en deux pour donner une librairie **A** de composés sulfatés en

position 2' après désacétylation, sulfatation, saponification (80% pour ces 3 étapes) et hydrogénolyse, et une librairie **B** de composés non sulfatés en position 2' après saponification et hydrogénolyse.

Contrairement aux synthèses décrites auparavant, où les groupements sulfates étaient introduits à la fin de la synthèse, ils sont ici positionnés au début et les auteurs soulignent que ces esters sulfates sont donc stables sous des conditions de réactions variables.

II-4 CONCLUSION

Comme évoqué au début de ce chapitre, les différents auteurs de ces synthèses ont dû trouver des moyens efficaces pour préparer leurs blocs de départ. Trois méthodes peuvent être recensées pour la préparation de la D-GalN : l'azidonitration d'une unité D-Galactal, l'épimérisation en C-4 à partir d'une unité D-Glucosamine (soit par déplacement d'un triflate intermédiaire, soit par oxydation suivie de la réduction sélective par du K-Sélectride). En ce qui concerne le D-GlcA il est préparé par oxydation d'un D-Glucose. On comprend donc très vite l'intérêt d'une synthèse basée sur l'obtention rapide d'un intermédiaire disaccharidique GlcA-GalN de départ qui permet de s'affranchir d'un bon nombre d'étapes.

Cette technique, développée au sein de notre laboratoire (décrite en section II-1.10), a donc servi de point de départ à la synthèse des oligosaccharides de chondroïtines désirés. La stratégie de synthèse envisagée sera décrite dans le chapitre suivant.

III- STRATEGIE DE SYNTHESE

III- STRATEGIE DE SYNTHÈSE

III-1 STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES SYNTHETISES

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, la biosynthèse des CS est encore mal connue. Dans le cadre d'une collaboration avec une équipe de biologistes située à Nancy (UMR 7561)⁵³, nous nous intéressons à l'étude de cette biosynthèse et plus particulièrement aux enzymes impliquées dans cette biosynthèse.

Cette étude a été focalisée sur la polymérisation des chaînes de sulfates de chondroïtines (Schéma I. 12) et plus particulièrement sur la détermination du rôle et du mécanisme d'action de la chondroïtine synthase, enzyme responsable de cette polymérisation et des sulfotransférases intervenant au cours de cette élongation. Pour ce faire, nous avons envisagé durant ce travail de thèse, la synthèse d'oligosaccharides de chondroïtines de tailles et de structures définies. En accord avec l'équipe de biologistes qui effectuent les tests enzymatiques, les différents oligomères porteront une molécule de biotine *via* un bras espaceur sur le carbone anomère du premier résidu de D-GalN (Figure III. 1).

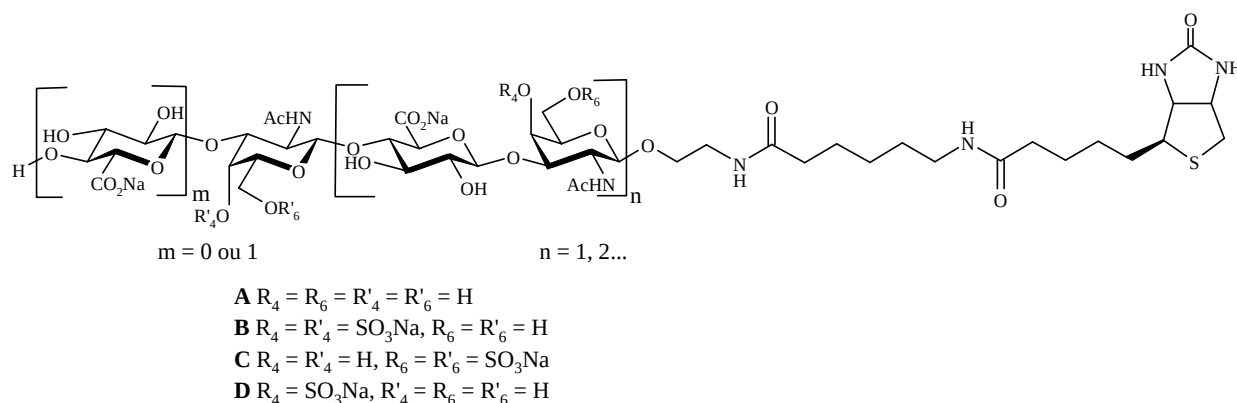


Figure III. 1

Dans le but de déterminer le point de départ de la polymérisation des chaînes de CS, des oligosaccharides de chondroïtines (non sulfatés) **A** de différentes tailles vont être préparés. Ainsi, ils nous permettront de déterminer la taille minimale nécessaire à l'initiation de l'élongation. Les motifs pairs (dernier sucre = D-GlcA) et impairs (dernier sucre = D-GalN) sont envisagés pour les tests de transferts enzymatiques. En effet, ces structures nous aideront dans l'identification du premier sucre transféré par la chondroïtine synthase.

Le deuxième point étudié est la spécificité de substrat de la chondroïtine synthase. En effet, jusqu'à présent nous ignorons si la présence ou non de fonctions sulfates a une importance sur la reconnaissance enzyme-substrat et donc sur la polymérisation. Sachant que le cartilage humain contient des CSA (4-sulfate) et des CSC (6-sulfate), des oligosaccharides

⁵³ ANR-05-BLAN-0198-02 « GT-GAG »

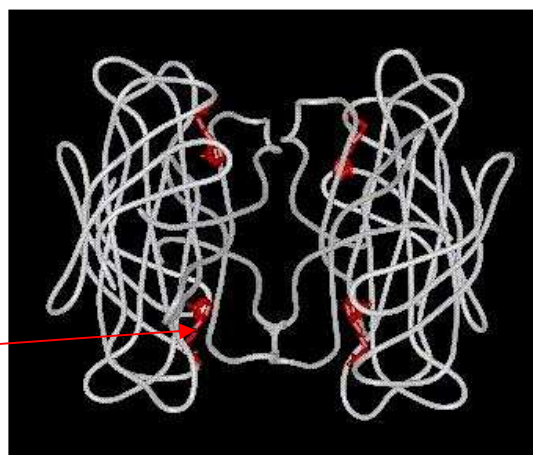
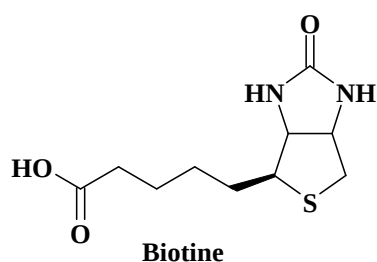
de CSA **B** et de CSC **C** vont être synthétisés. De plus, ces analogues sulfatés seront utiles à l'élucidation du mécanisme d'action des sulfotransférases intervenant lors de l'élongation.

Pour la première fois, la préparation d'oligomères de CSA présentant une sulfatation hétérogène **D**, sera décrite. Ces molécules serviront, elles-aussi, à l'analyse de la spécificité de substrat de la chondroïtine synthase et des sulfotransférases.

III-2 BIOTINE/STREPTAVIDINE

La molécule de biotine a été choisie pour faciliter la détection de l'activité enzymatique.

En effet, la biotine (ou vitamine H) est connue pour sa très forte affinité de liaison non covalente pour la streptavidine (PM 60000). La streptavidine est une protéine tétramérique possédant quatre sites de fixation pour la biotine (Figure III. 2) conférant à ce complexe une des constantes d'association les plus fortes existantes, 10^{15} M.



Complexe biotine/streptavidine

Figure III. 2

Une fois les composés biotinylés préparés, ils seront envoyés à nos collaborateurs biologistes pour mesurer l'activité enzymatique.

Afin de tester l'activité enzymatique d'une enzyme de transfert telle que la chondroïtine synthase, l'oligosaccharide biotinylé sera mis en présence d'UDP-D-GalN et d'UDP-D-GlcA marqués au ^{14}C et de l'enzyme de transfert correspondante. Puis la streptavidine complexée sur des billes magnétiques sera ajoutée dans le milieu afin que la biotine se place dans le site actif. Les différents lavages qui suivront, élimineront tous les produits non retenus par la streptavidine. Pour finir, seules les molécules marquées et accrochées à la streptavidine seront détectées, ce qui permettra de quantifier l'activité enzymatique (Schéma III. 1).

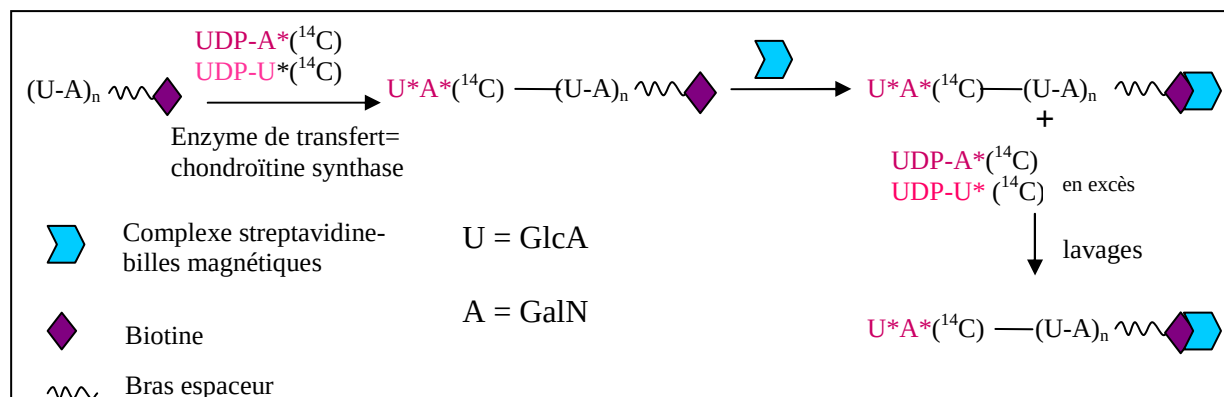


Schéma III. 1

Cette méthodologie présente plusieurs avantages. Pour des enzymes de faible activité, le marquage au ^{14}C est le plus adapté et le complexe streptavidine/billes magnétiques permet de s'affranchir des problèmes de radioactivité résiduelle rencontrés avec d'autres méthodes de détection. De plus, lorsque la méthodologie choisie est une détection par HPLC ou par électrophorèse capillaire, il est nécessaire de synthétiser le produit d'arrivée afin que les biologistes aient une référence. Un travail de synthèse supplémentaire est alors requis, ce qui n'est pas le cas avec la technique de biotinylation.

Cette méthodologie de marquage est déjà très largement utilisée en biologie, notamment en immunologie, mais très peu appliquée à des structures saccharidiques. La synthèse de sulfates de chondroïtines biotinylés n'a jamais été reportée dans la littérature.

III-3 STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Afin d'accéder aux différents oligosaccharides de chondroïtines biotinylés, la stratégie de synthèse choisie est basée sur un disaccharide, représentant l'unité répétitive de base des CS, obtenu directement d'un polymère de CS, méthodologie développée au laboratoire⁴⁵.

En ce qui concerne les composés non sulfatés, le disaccharide intermédiaire clé sera judicieusement protégé afin qu'il conduise à tous les oligomères désirés (Figure III. 3).

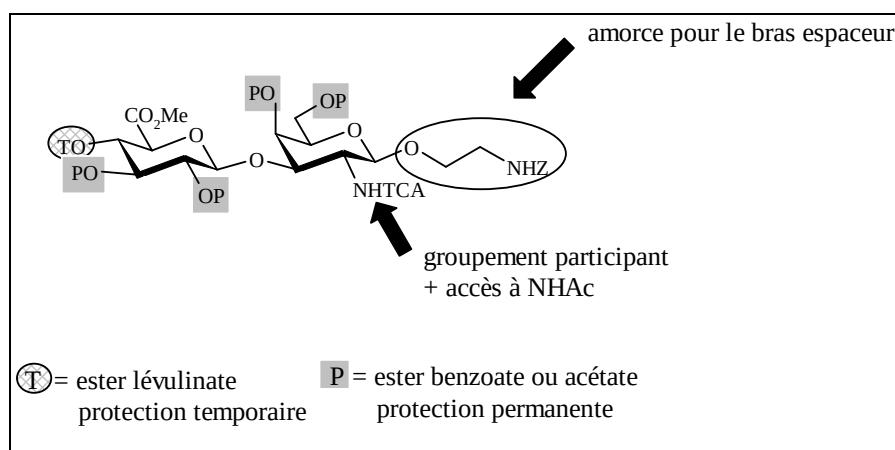


Figure III. 3

La position anomérique portera une chaîne aminoéthyle protégée par un groupement benzyloxycarbonate, qui servira ainsi d'amorce pour le futur bras espaceur couplé à la biotine (Figure III. 3).

La fonction amine du résidu de D-Galactose sera protégée par un groupement trichloroacétyl, qui sera très utile lors des réactions de glycosylation et permettra d'accéder aux molécules *N*-acétylées désirées (Figure III. 3). Les détails relatifs au choix de ce groupement seront donnés dans le chapitre IV-2.

L'acide carboxylique du résidu de D-GlcA sera, quant à lui, masqué par un ester méthylique (Figure III. 3). La présence de cet acide uronique va limiter les conditions de réaction en excluant les milieux basiques. En effet, le proton en position 5', étant en α de l'acide, est extrêmement labile en milieu basique (mécanisme E1_{cb}) (Schéma III. 2).

Les protections temporaires (T) devront donc être des fonctions clivables en milieu neutre.

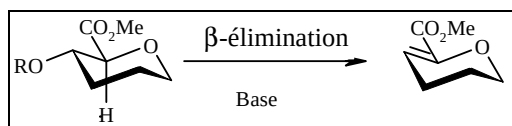


Schéma III. 2

Pour permettre la création de liaisons 1→4 en allongeant les chaînes de chondroïtines, une protection temporaire (T) devra être introduite en position 4', nous avons choisi le groupement lévulinoyl (Figure III. 3).

Les autres groupements hydroxyle, pour leur part, seront protégés par des groupements permanents (P), des esters acétate ou benzoate, permettant leur déprotection en fin de synthèse.

Afin d'obtenir des composés sulfatés, l'introduction d'un autre groupement temporaire (T₂) et orthogonal aux autres protections sera nécessaire. La future position sulfatée sera, par conséquent, protégée par un ester chloroacétate (Schéma III. 3).

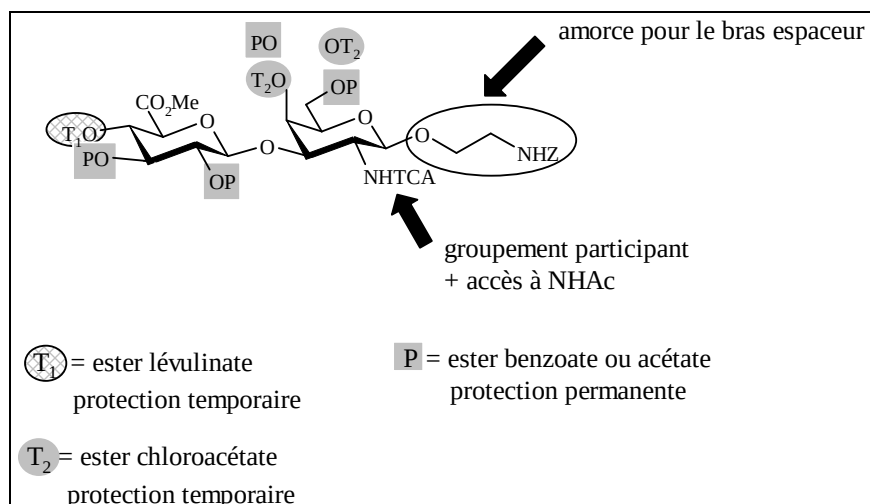


Schéma III. 3

La synthèse des oligosaccharides de chondroïtines sera décrite dans les chapitres suivants selon la stratégie de synthèse établie ci-dessus.

IV- SYNTHESE DES OLIGOSACCHARIDES NON SULFATES

IV- SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES NON SULFATES

Cherchant à étudier la polymérisation des chaînes de CS, une première famille d'oligosaccharides de chondroïtines biotinylés a été préparée. Désirant déterminer la taille minimale de l'oligomère pouvant relancer l'élongation, des molécules non sulfatées allant du disaccharide à l'octasaccharide (motifs pairs et impairs) ont été synthétisées.

IV-1 RETROSYNTHÈSE

Afin de synthétiser les différents oligosaccharides de chondroïtines biotinylés de tailles désirées, la rétrosynthèse suivante a été envisagée (Schéma IV. 1).

Les oligosaccharides biotinylés **I** (trisaccharide à l'octasaccharide) seront préparés à partir d'oligomères de mêmes tailles **II**, totalement protégés possédant en position anomérique une amine protégée. Ces composés **II**, quelles que soient leurs tailles, seront obtenus à partir d'un oligosaccharide accepteur **III** et des blocs donneurs **88** (pour les unités paires) ou **61** (pour les unités impaires). Les oligosaccharides **III** seront, quant à eux, synthétisés par glycosylation entre deux blocs disaccharidiques clés : le bloc donneur **93** et le bloc accepteur **121**. Il est à noter que le disaccharide accepteur **121** est également issu du bloc donneur **93**, lui-même obtenu à partir du bloc clé donneur **88**. Cet intermédiaire clé provient d'une unité disaccharidique de base **118** issue d'un polymère de CS commercial servant de produit de départ.

La synthèse du disaccharide biotinylé final **122**, pour sa part, sera réalisée directement à partir du disaccharide clé **88**.

Certains des composés clés utilisés au cours de cette stratégie ont déjà été décrits dans une publication précédente⁴⁵ (Schéma II. 12 et Schéma II. 13)

Nous allons, dans un premier temps, décrire la synthèse des précurseurs clés, puis exposer la stratégie d'élongation des oligosaccharides.

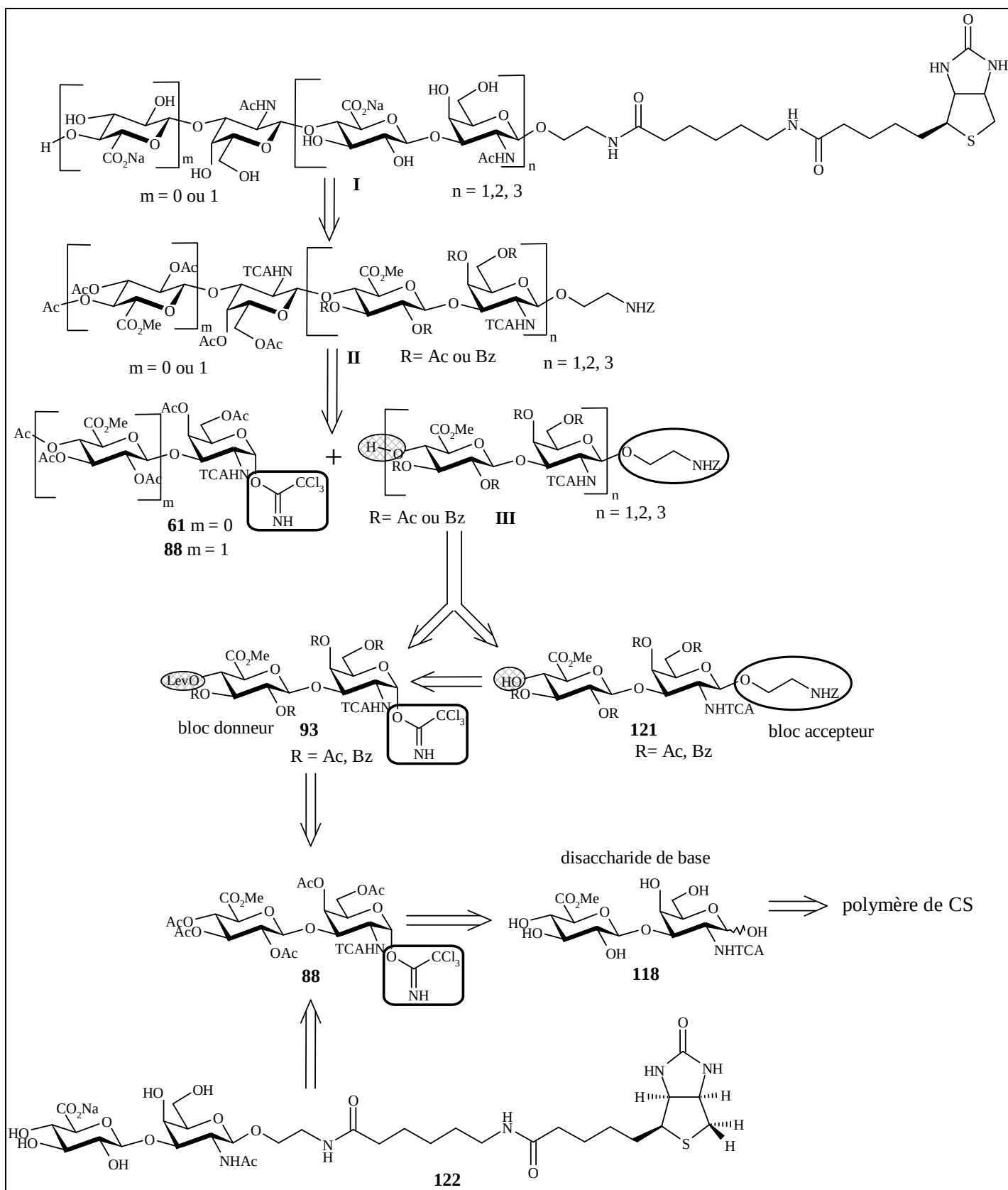


Schéma IV. 1

IV-2 PREPARATION DE L'UNITE DISACCHARIDIQUE DE BASE 118

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la synthèse chimique d'oligomères de CS se révèle longue et délicate. En 2006⁴⁵, il a été démontré que l'obtention en une étape d'un disaccharide de base possédant déjà une unité D-GlcA et une unité D-GalN en partant d'un polymère de CS diminue considérablement le nombre d'étapes de synthèse, et apporte un gain de temps précieux (voir section II-1.10).

Depuis de nombreuses années, plusieurs équipes ont travaillé sur différentes techniques visant la dépolymérisation des chaînes de CS.

IV-2.1 Dépolymérisation d'un polymère de sulfates de chondroïtines

a. Solvolyse

L'équipe de Nagasawa a beaucoup travaillé sur la solvolyse des GAGs. En 1976⁵⁴, ils ont obtenu la désulfatation des sels de pyridinium de CSA et CSC après traitement dans le DMSO avec 10% d'eau pendant 5 heures à 80°C. En 1980⁵⁵, toujours à partir des sels de pyridinium de CSA et CSC, une solvolyse dans le DMSO contenant 10% de MeOH conduit à des composés méthylglycosides désulfatés, *N*-désacétylés de tailles variées (di-, tri et tétrasaccharides). En 1981⁵⁶, partant de CSC sous formes de sels de pyridinium, de sodium ou sous forme d'acide libre, ils ont préparé des sucres réducteurs *N*-acétylés et désulfatés de tailles variables (Schéma IV. 2).

Plus récemment, Linhardt et son équipe ont appliqué une solvolyse dans le DMSO avec 10% de MeOH à 80°C à des chondroïtines désulfatées⁵⁷. Une analyse RMN ¹H des composés obtenus après cette dépolymérisation montre que tous les oligosaccharides présentent trois signaux caractéristiques : un CH₃ provenant du 2-acétamido, un COOCH₃ issu de l'esterification de l'acide uronique du côté non réducteur et un H-1 spécifique d'une unité furanique méthylée. Les produits issus de cette dépolymérisation ne sont donc pas utilisables en tant que structure de base d'une synthèse puisqu'ils comportent une première unité furanique non réductrice.

b. Dépolymérisation par le diazométhane⁵⁸

Nagasawa et son équipe a aussi étudié la dépolymérisation des chaînes de CSC par du diazométhane en présence d'eau, qui a conduit à un mélange d'oligomères 4',5'-insaturés, de sulfatation hétérogène dont la moitié possède une D-Galactosamine-*N*-méthylée (Schéma IV. 2).

⁵⁴ Nagasawa K.; Inoue Y.; Kamata T. *Carbohydr. Res.*, **1977**, 58, 47-55

⁵⁵ Inoue Y.; Nagasawa K. *Carbohydr. Res.*, **1980**, 85, 107-119

⁵⁶ Inoue Y.; Nagasawa K. *Carbohydr. Res.*, **1981**, 97, 263-278

⁵⁷ Toida T.; Sato K.; Sakamoto N.; Sakai S.; Hosoyama S.; Linhardt R. J. *Carbohydr. Res.*, **2009**, 344, 888-893

⁵⁸ Inoue Y.; Nagasawa K. *Carbohydr. Res.*, **1986**, 146, 263-278

c. Dégradation enzymatique

➤ Par une chondroïtinase⁵⁹

L'objectif des auteurs était de vérifier l'existence de sulfatation hétérogène au sein d'une même chaîne de sulfates de chondroïtines. Pour ce faire, une chondroïtinase ABC est incubée à 37°C avec 12 mM de tampon Tris (pH 8) avec un polymère de CS. La détection est réalisée par absorbance à 232 nm de la double liaison des disaccharides réducteurs 4',5'-insaturés, *N*-acétylés. Ils ont pu observer que ces chondroïtines possédaient soit un groupement 4-sulfate, soit un groupement 6-sulfate ou encore qu'ils ne possédaient aucune fonction sulfatée. La structure de ces composés n'est donc pas homogène. De plus, l'absence d'hydroxyle en 4', due à l'insaturation, en font des composés inutilisables en tant qu'accepteurs et donc en tant que produits de départ d'une synthèse (Schéma IV. 2).

➤ Par une hyaluronidase⁶⁰

La digestion de CS par une hyaluronidase testiculaire (β -endo hexosaminidase) donne des disaccharides *N*-acétylés non désulfatés (Schéma IV. 2).

d. Hydrolyse acide

En 1941⁴⁶, dans le but de déterminer la structure de la chondrosine, unité répétitive de base des CS, Levene a appliqué une méthodologie d'hydrolyse acide d'un polymère de CS. Pour ce faire, le polymère est tout d'abord préparé sous forme de sel de baryum, puis il est hydrolysé dans l'acide chlorhydrique à 10% à 100°C pendant 1 heure. Il a ainsi obtenu un disaccharide réducteur désulfaté et *N*-désacétylé. En 1954⁴⁷, Davidson et Meyer reprenant l'hydrolyse décrite par Levene ont démontré que quatre produits pouvaient être isolés (disaccharide et oligosaccharides de tailles plus importantes), tous possédant une amine libre. La *N*-désacétylation par cette technique est certaine. Ils ont, pour leur part, mis au point une hydrolyse dans l'acide sulfurique. Ainsi, un polymère de CS est transformé en sel de baryum correspondant, qui est ensuite hydrolysé dans l'acide sulfurique 1N 4 heures à 100°C. Ils ont pu observer qu'en laissant l'hydrolyse un temps plus court, les produits n'étaient pas totalement *N*-désacétylés et en laissant un temps trop long, un monosaccharide de D-GalN était formé. Le disaccharide de chondrosine est obtenu avec un rendement de 67% (Schéma IV. 2).

⁵⁹ Faltynek C. R.; Silbert J. E. *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 7646-7649

⁶⁰ Cowman M. K.; Balazs E. A.; Bergmann C. W.; Meyer K. *Biochemistry*, **1981**, 20, 1379-1385



Les différentes techniques de dépolymérisation décrites ci-dessus engendrent bien souvent des composés hétérogènes en taille ou en structure qui constitueraient de mauvais produits de départ. La seule méthodologie menant à un intermédiaire homogène est l'hydrolyse acide décrite par Levene puis par Davidson et Meyer. Ainsi, cette procédure a été adaptée au laboratoire et constitue la première étape de notre synthèse.

Dans le but, d'accéder rapidement à des intermédiaires de taille et de structure définies, une méthodologie d'hydrolyse acide de polymères naturels de sulfates de chondroïtines, se basant sur les travaux précédemment décrits par Levene⁴⁶ et, Davidson et Meyer⁴⁷, a été optimisée au laboratoire⁴⁵.

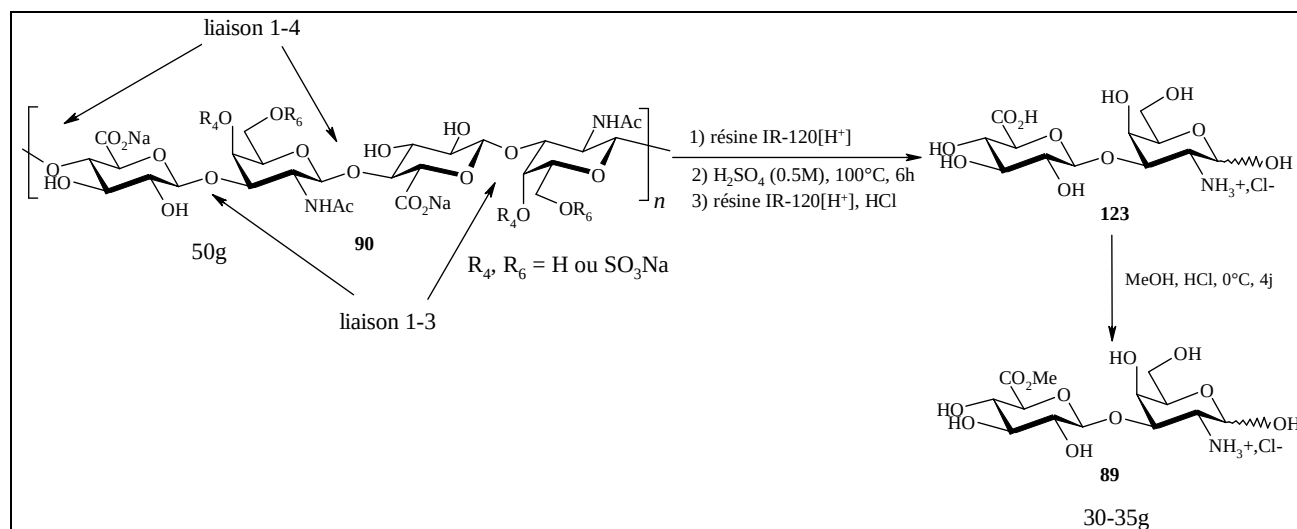


Schéma IV. 3

Le polymère de CSA **90** (majoritairement $R_4 = \text{SO}_3\text{Na}$), commercial sous la forme d'un sel de sodium, est issu de trachée bovine. Dans un premier temps, les ions sodiums sont échangés par des protons sur une résine acide. L'hydrolyse en milieu acide sulfurique⁴⁵, suivie d'une purification sur résine acide, conduit à un disaccharide hémiacétalique, désulfaté et *N*-désacétylé, formé d'un D-GlcA et d'une D-GalN. La coupure interglycosidique a lieu uniquement entre le résidu de D-GalN et le résidu de D-GlcA (liaisons 1→4), conséquence de l'effet électroattracteur de l'acide carboxylique en position 5 du D-GlcA. Cette technique d'hydrolyse acide permet, en une étape à partir d'un polymère hétérogène en taille et en structure (sulfatation en C-4 ou en C-6), d'obtenir le disaccharide **123**, de taille et de structure définies, possédant les fonctions essentielles (un acide carboxylique en C-5' sur le D-Glc et une amine en C-2 sur le D-Gal). La présence de l'amine libre en C-2 de la D-GalN est essentielle, puisqu'elle va permettre l'introduction d'un groupement participant choisi.

L'estérification du produit⁶¹ par du MeOH en présence de HCl formé *in situ* par du chlorure d'acétyle, conduit au composé **89** (Schéma IV. 3).

IV-2.3 Protection de l'amine

Le substituant en C-2 de la D-GalN joue un rôle primordial lors des réactions de glycosylations puisque, selon sa nature, il va orienter la liaison formée soit en 1,2-*trans* soit en 1,2-*cis* (Schéma IV. 4).

⁶¹Jansen E. F.; Jang R. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68, 1475-1477

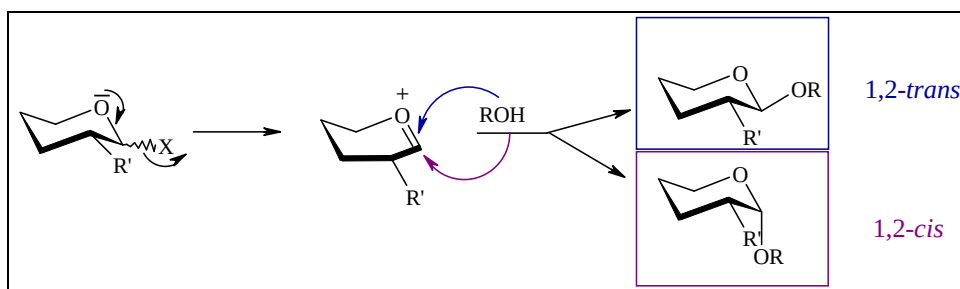


Schéma IV. 4

Dans les chondroïtines naturels, les liaisons interglycosidiques sont toujours des liaisons 1,2-*trans* (soit liaisons β dans le cas d'un D-Galactose). Le groupement en C-2 doit donc être participant, permettant ainsi une assistance anchimérique lors de la réaction de glycosylation (Schéma IV. 5). Sans cette participation, la liaison formée serait majoritairement d'anométrie α , stabilisée par effet anomère.

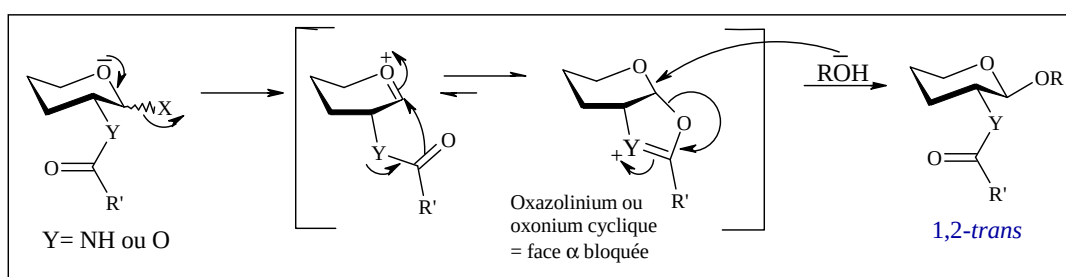


Schéma IV. 5

Les CS à l'état naturel possèdent un groupement *NH*-acétyle (*NH*-Ac), qui n'est pas un bon auxiliaire de glycosylation. En effet, l'acétamide est un bon groupement participant formant une oxazoline intermédiaire qui donne de bons rendements de couplage uniquement avec des accepteurs réactifs et en chauffant⁶². Par contre, dans un cas comme le nôtre, avec un accepteur en position 4', position la moins réactive du sucre, la glycosylation est extrêmement difficile. Par conséquent, le groupement protecteur choisi devra donc être un bon groupement participant, formant une oxazoline intermédiaire réactive, et être un précurseur de la fonction *NHAc*.

Plusieurs groupements correspondent à ces deux critères, les plus connus sont les suivants : *N*-Phtaloyle (*N*-Phth)⁶³, *N*-Tétrachlorophthaloyle (*N*-TCP)⁶⁴, *N*-(1,3-diméthyl-2,4,6(1H, 3H, 5H)-trioxypyrimidin-5-ylidène)méthyle (*N*-DTPM)⁶⁵, *NH*-Chloroacétyle, (*NH*-AcCl)⁶⁶, *NH*-Dichloroacétyle (*NH*-AcCl₂)⁶⁷, *NH*-Trichloroacétyle (*NH*-TCA)³¹ et *NH*-Trifluoroacétyle (*NH*-TFA)⁶⁸ (Figure IV. 1).

⁶² Zurabyan S. E.; Antonenko T. S.; Khorlin A. Ya. *Carbohydr. Res.*, **1970**, 15, 21-27

⁶³ Lemieux R. U.; Takeda M. T.; Chung B. Y. *ACS Symp. Ser.*, **1976**, 39, 90-115

⁶⁴ Castro-Palomino J. C.; Schmidt R. R. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 5343-5346

⁶⁵ Deckany G.; Bornaghi L.; Papageorgiou J.; Taylor S. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 3129-3132

⁶⁶ Dagsupta F.; Anderson L. *Carbohydr. Res.*, **1990**, 202, 239-255

⁶⁷ Shapiro D.; Acher A. J.; Rachaman E. S. *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 3767-3771

⁶⁸ Meyer zu Reckendorf W.; Wassiliadou-Micheli N. *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 1792-1796

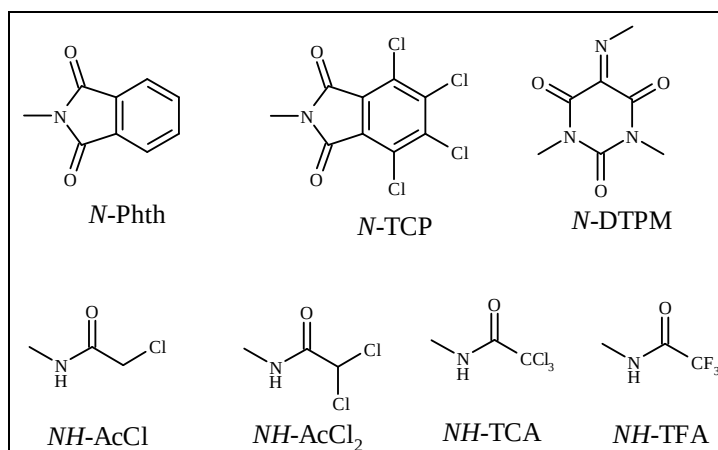


Figure IV. 1

Le groupement phtalimido est l'un des plus anciens et des plus utilisés. Ce dernier et son dérivé tétrachloré sont de très bons partenaires de glycosylation, mais leur déprotection requiert des conditions basiques incompatibles avec la présence d'un ester uronique (risque de β -élimination), ils ont donc été éliminés.

Notre choix, guidé par le savoir-faire du laboratoire concernant son utilisation³¹, s'est porté sur le groupement trichloroacétyle (TCA). Ce dernier est un très bon auxiliaire de stéréocontrôle pendant les réactions de glycosylation, en formant un ion oxazolinium intermédiaire très réactif grâce aux effets électroattracteurs des 3 atomes de chlore (Figure IV. 2). De plus, il permet d'accéder en une seule étape au produit *N*-acétylé dans des conditions neutres.

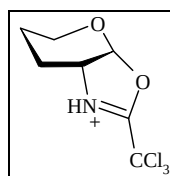


Figure IV. 2

Dans un premier temps, le composé **89** est mis en solution dans la pyridine avec du chlorure de trichloroacétyle, qui réagit avec l'amine mais aussi avec les hydroxyles libres de la molécule. Dans un deuxième temps, les esters formés sont transestérifiés par un mélange méthanol/pyridine⁶⁹ et le disaccharide **118** est obtenu avec un rendement de 66% (Schéma IV. 6).

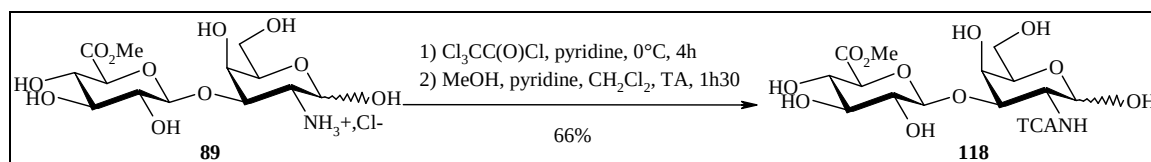


Schéma IV. 6

⁶⁹Dupeyre D.; Excoffier G.; Utille J-P. *Carbohydr. Res.*, **1984**, 135, C1-C4

➤ Le composé **118** constitue ainsi le disaccharide de base dont les fonctions principales (acide carboxylique et amine) sont protégées par des groupements permanents résistants aux étapes qui suivront.

IV-3 SYNTHÈSES DU DISACCHARIDE DONNEUR CLE 88

Afin de synthétiser les oligosaccharides désirés, la préparation de trois blocs clés **88**, **93** et **121** doit être réalisée (Schéma IV. 1). Ces derniers sont issus du disaccharide de base **118** obtenu précédemment.

IV-3.1 Protection des hydroxyles libres

L'unité disaccharidique de base **118** possède des hydroxyles libres qui doivent être protégés temporairement. Des groupements de type esters, et plus précisément des acétates, ont alors été introduits. Une péracétylation directe de la molécule par le chlorure d'acétyle en présence de pyridine conduit à un mélange de composés sous forme pyranoïde **124** (désirée, 60%) et furanique **125** (non désirée, 40%)⁴⁵ (Schéma IV. 7). La formation du cycle furanique n'est pas surprenante dans le cas d'un résidu de D-Gal dont l'hydroxyle en position 4 est libre. Tout comme lors d'une réaction de type Fischer, cet hydroxyle en position axiale va tendre à former un cycle à cinq chaînons. Une autre voie de synthèse a été développée afin d'obtenir exclusivement la forme pyranoïde.

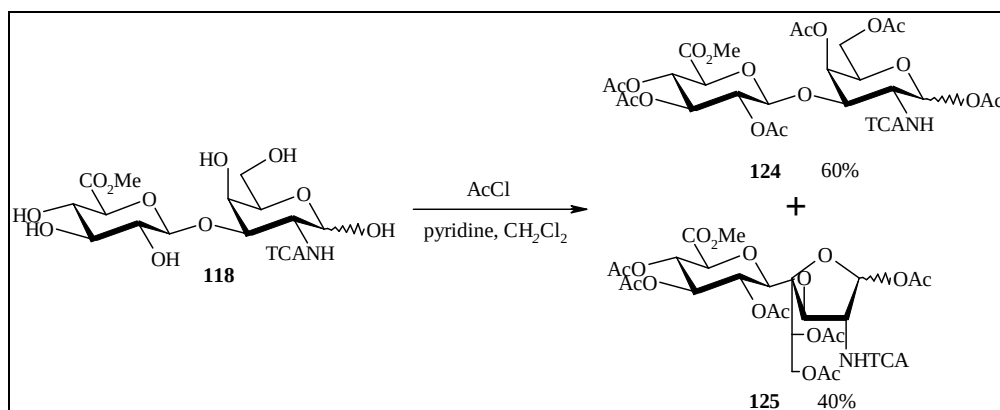


Schéma IV. 7

Ainsi, la réaction du produit **118** en présence de benzaldéhyde et de TFA conduit, dans des conditions thermodynamiques, à la formation d'un acétal benzylidène entre les positions 4 et 6 de la D-GalN, et permet de bloquer la structure sous forme pyranoïde. L'anhydride acétique en présence de pyridine conduit à l'acétylation des hydroxyles restants et donne un mélange d'isomères α et β **126** avec une majorité de composé d'anométrie α , cet isomère satisfaisant l'effet anomère (Schéma IV. 8).

Une hydrolyse acide de l'acétal benzylidène suivie d'une acétylation par l'anhydride acétique en présence de pyridine donne le disaccharide péracétylé **124** à nouveau sous la forme d'un mélange des deux isomères α et β , toujours avec une prédominance de l'isomère α (Schéma IV. 8).

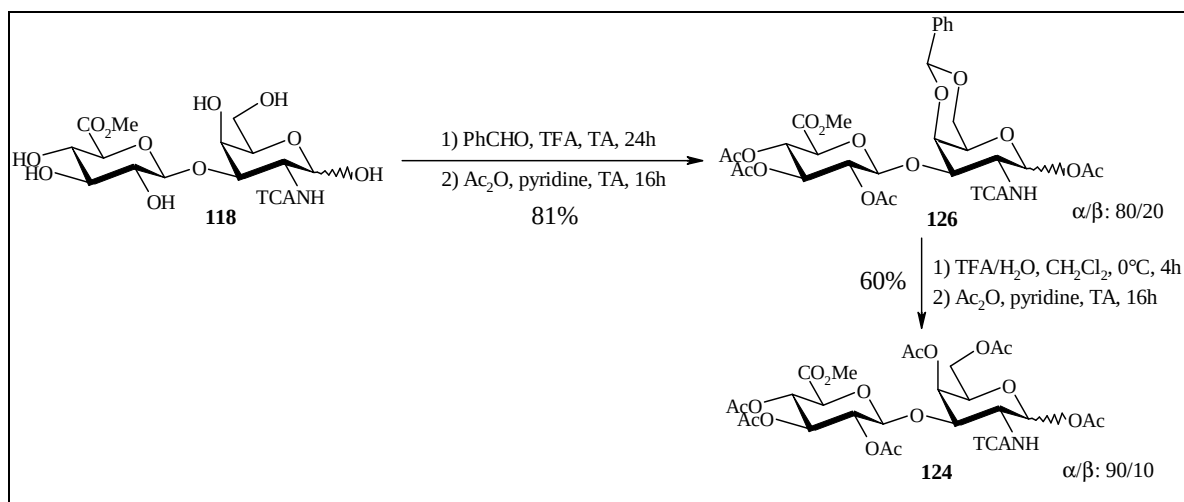


Schéma IV. 8

IV-3.2 Activation de la position anomérique : synthèse du trichloroacétimide acétylé 88

a. Méthodes d'activation

Il existe de nombreux modes d'activation donnant lieu à des sucres donneurs^{70,71} à partir d'un dérivé hémiacétalique. Les principaux modes d'activation sont résumés dans le schéma ci-dessous (Schéma IV. 9).

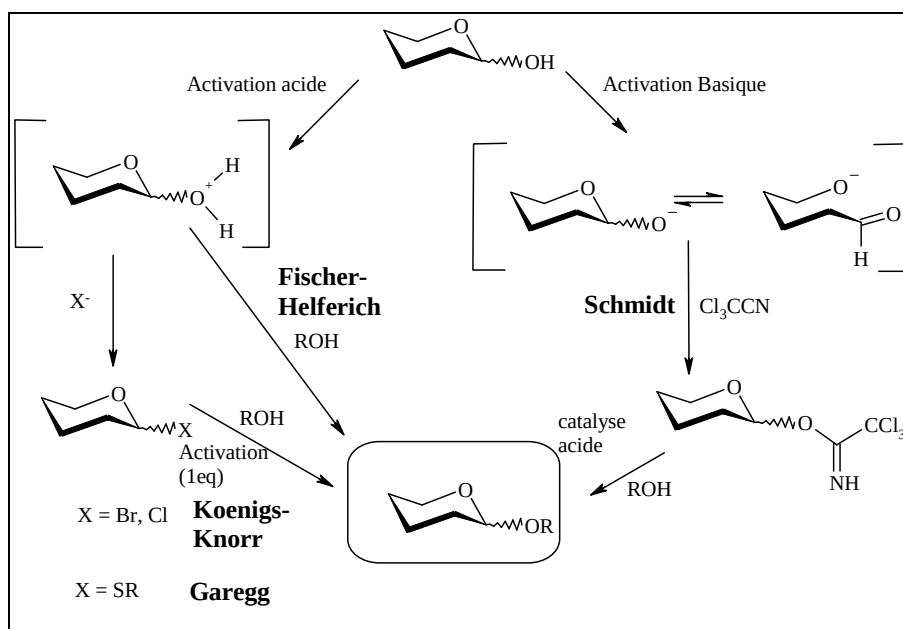


Schéma IV. 9

⁷⁰ Schmidt R. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212-235

⁷¹ Zhu X.; Schmidt R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 1900-1934

➤ Fischer-Helferich :

La création d'un glycoside selon la méthode de Fischer-Helferich est la plus ancienne. Elle est effectuée en milieu acide anhydre avec un alcool qui sert aussi de solvant (MeOH, EtOH, BnOH...). Initialement l'acide était du HCl gazeux, mais pour des raisons pratiques, il est aujourd'hui remplacé par des résines acides de type ambérlite ou dowex. Cette méthode ne permet pas le couplage entre deux unités sucres.

➤ Koenigs-Knorr :

Cette méthode classique de glycosylation date de 1901. A partir d'un sucre halogéné sur sa position anomérique (Brome ou Chlore), une activation par un sel d'argent (type AgOTf ou Ag₂CO₃) en présence d'un alcool, conduit à la formation d'un glycoside. Cette technique nécessite deux étapes, dont la formation préalable du dérivé halogéné dans des conditions acides (HBr, HCl) parfois incompatibles avec les fonctionnalités du saccharide mis en jeu. Le deuxième inconvénient de ce type d'activation est l'utilisation d'une quantité stœchiométrique de sel d'argent qui demeure très onéreux.

➤ Garegg :

La glycosylation selon la méthode de Garegg est similaire à celle de Koenigs-Knorr. Elle requiert la préparation antérieure d'un thioglycoside, très stable, qui présente l'énorme avantage d'être une fonction inerte jusqu'au moment où elle doit réagir. Contrairement aux autres techniques, où une fois les composés préparés avec la fonction activante, l'étape suivante est la glycosylation, le groupement soufré peut servir de protection de la position anomérique. L'activation par un acide mou de type Cu(OTf)₂ ou plus souvent par du *N*-iodosuccinimide activé *in situ* par de l'acide triflique, en présence d'un alcool permet la formation de liaisons glycosidiques. Malheureusement l'utilisation de thioglycosides a montré ses limites en produisant parfois des réactions secondaires de transfert de thioglycoside du sucre accepteur sur le donneur⁷².

➤ Schmidt :

La méthode des trichloroacétimides de Schmidt est aujourd'hui très largement utilisée. Elle consiste en la formation d'un oxy-anion intermédiaire, sous catalyse basique (K₂CO₃, NaH, DBU), qui réagit ensuite avec le trichloroacétonitrile pour donner le trichloroacétimide. La formation des deux anomères α (II) et β (I) est contrôlée par la nature de la base utilisée (Schéma IV. 10). En 1986⁷⁰, une étude comparative de deux bases a montré que le trichloroacétimide β I était formé préférentiellement, voire même exclusivement, *via* une réaction rapide et une addition réversible (produit cinétique). Cependant ce produit s'anomérise pendant une lente réaction baso-catalysée (*via* une rétro-réaction, anomérisation de l'oxy-anion, nouvelle addition de trichloroacétonitrile) pour donner le trichloroacétimide α II (axial, satisfaisant l'effet anomère) thermodynamiquement le plus stable.

⁷² Bélot F.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.*, **1996**, 290, 79-86

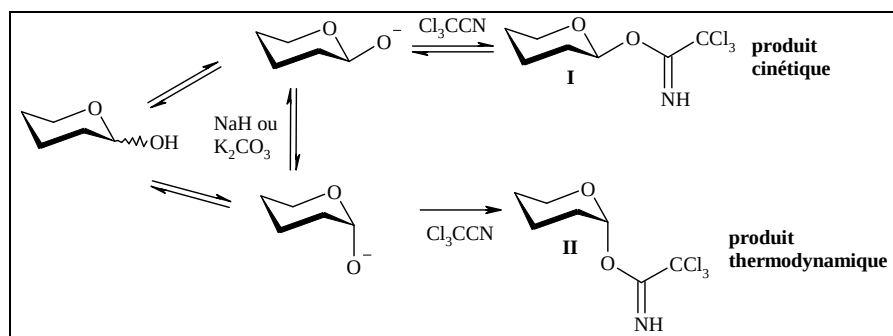


Schéma IV. 10

Une étude cinétique a mis en évidence, que quel que soit le temps de réaction avec NaH, seul le composé α II était obtenu. Par contre avec K₂CO₃, en 2h seul le composé β I est observé, en 6h, un mélange α/β I/II et en 48h α II uniquement.

L'activation de ces composés est réalisée par un acide de Lewis, le plus souvent triflate de triméthylsilyle (TMSOTf) ou trifluoroborane diéthyléthérate (BF₃.Et₂O). Les trifluoroacétimidates ont aussi été étudiés, mais ils n'ont pas montré être de meilleurs partenaires de glycosylation que leurs analogues trichlorés. Le trichloroacétimide α présente également l'avantage d'être bien plus stable que son analogue activé par un brome.

➤ Pour nos réactions de glycosylations, nous avons ainsi choisi l'activation de nos blocs donneurs par un trichloroacétimide selon la méthode décrite par R. Schmidt.

b. Synthèse du trichloroacétimide acétylé 88

Le carbone anomérique est, tout d'abord, sélectivement déprotégé par de l'acétate d'hydrazine dans le DMF⁷³. L'acétate porté par le carbone anomère est attaqué plus rapidement par l'acétate d'hydrazine que sur les autres positions. Au cours de la mise au point de cette déprotection⁷³, d'autres solvants ont été examinés mais la réaction semblait moins sélective et en tous cas moins rapide. De plus, les auteurs ont ajouté que l'utilisation d'acétate d'hydrazine cristallin était préférable à une solution d'acétate d'hydrazine dans le DMF, nous avons suivi ces indications pour préparer l'hémiacétal.

L'hémiacétal obtenu est ensuite activé en trichloroacétimide par le trichloroacétonitrile en présence de DBU⁷⁰. Ainsi, le trichloroacétimide **88** est formé avec 65 % de rendement sur les deux étapes et seul l'anomère α est obtenu (Schéma IV. 11) prouvé par la RMN ¹H $J_{1,2} = 3.5\text{Hz}$ (constante 1,2-*cis*).

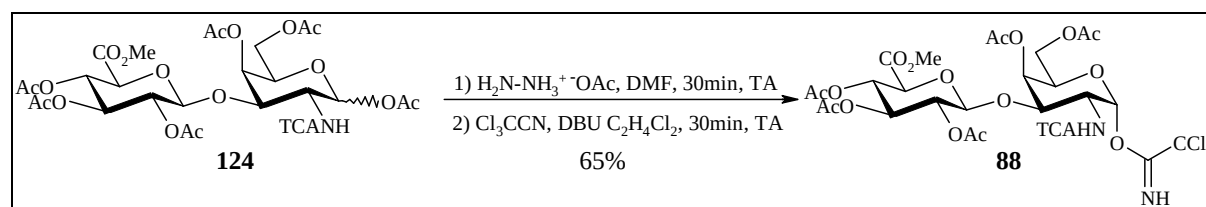


Schéma IV. 11

⁷³Excoffier G.; Gagnaire D.; Utile J-P. *Carbohydr. Res.*, **1975**, 39, 3668-3672

Ce trichloroacétimide **88** va être utilisé de nombreuses fois dans la préparation des oligosaccharides. Il va notamment servir à la préparation des intermédiaires **93** et **121** mais aussi de disaccharide terminal dans la dernière étape de glycosylation donnant ainsi lieu à l'oligomère de taille paire désirée. Il permet aussi l'accès direct à un tout premier composé final, le disaccharide biotinylé (Schéma IV. 1).

IV-4 SYNTHÈSE DU DISACCHARIDE BIOTINYLE **122**

IV-4.1 Glycosylation

Dans l'optique de coupler, dans une étape finale, le disaccharide avec un réactif biotinylé activé par un ester succinimidyle, l'amorce, pour le bras espaceur choisi, doit être une amine. L'alcool choisi pour la glycosylation avec le bloc donneur **88** est donc du 2-aminoéthanol protégé sur sa fonction amine par un groupement benzyloxycarbonyle (Z).

La réaction de glycosylation a lieu en milieu parfaitement anhydre, dans le dichlorométhane en présence de TMSOTf (catalyseur) et de tamis moléculaire 4Å. L'assistance anchimérique du groupement trichloroacétyle en C-2 de la D-GalN permet de former exclusivement la liaison 1,2-*trans* attendue, confirmée par analyse RMN ^1H donnant une constante de couplage $J_{1,2}$ égale à 8.5 Hz caractéristique. Le composé **127** est obtenu avec un rendement de 90% (Schéma IV. 12).

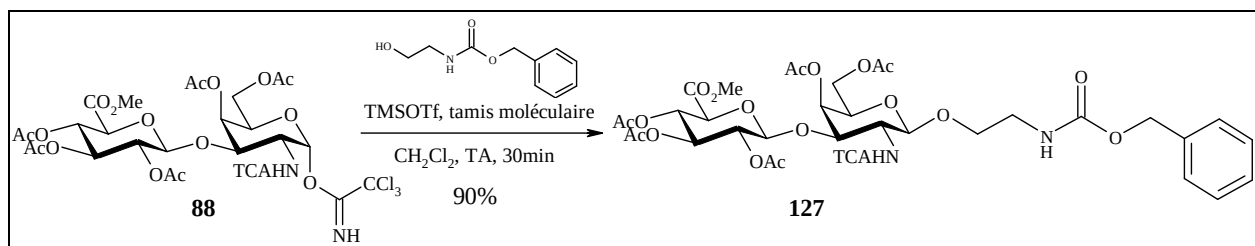


Schéma IV. 12

IV-4.2 Réduction du groupement *N*-trichloroacétyle

Afin d'obtenir une fonction *N*-acétylée comme dans les chondroïtines naturels, le groupement trichloroacétyle est transformé en groupement acétyle. Cette réaction de réduction est réalisée sous atmosphère inerte, en conditions radicalaires, par du *n*-Bu₃SnH et de l'AIBN, initiateur de la réaction (Schéma IV. 13)³¹. Le disaccharide désiré **128** est obtenu avec 53% de rendement. L'apparition d'un pic à 23.43 ppm en RMN du ^{13}C caractéristique du méthyle NHCOCH₃ prouve la réduction.

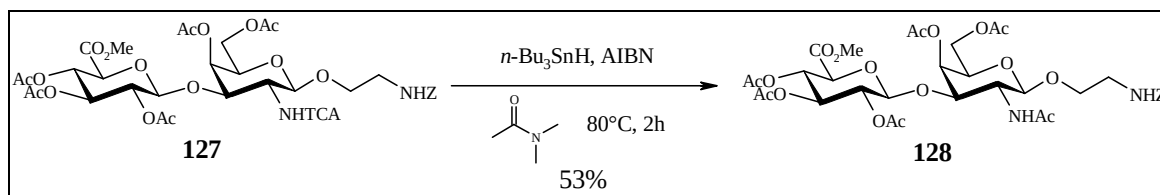


Schéma IV. 13

IV-4.3. Déprotection des esters

Afin de déprotéger les esters présents sur la molécule, une réaction de saponification doit être réalisée. Cependant, une réaction de saponification directe, en milieu basique, conduirait à une β -élimination sur le D-GlcA. C'est pourquoi la déprotection est menée en deux temps. Tout d'abord par une solution de LiOOH est préparée à partir de LiOH et H₂O₂^{74,75}. La formation de HOO⁻, plus nucléophile et surtout moins basique (pKa HOOH/HOO⁻ = 11.6) que HO⁻ (pKa H₂O/HO⁻ = 15.8), permet la saponification de l'ester méthylique en évitant le risque de β -élimination. Ce risque étant écarté, les acétates sont, à leur tour, saponifiés par une solution de soude en présence de méthanol. Une purification par exclusion stérique sur LH-20 permet d'accéder, avec un rendement de 67%, au disaccharide totalement déprotégé **129** sous la forme d'un sel de sodium (Schéma IV. 14).

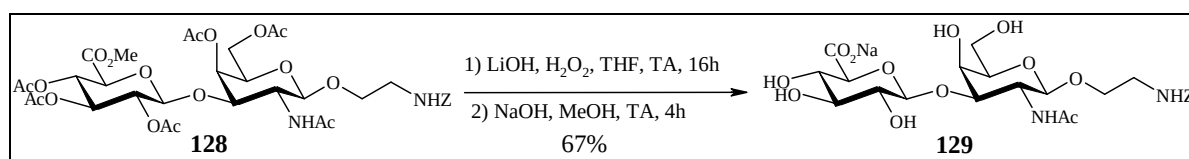


Schéma IV. 14

IV-4.4 Couplage avec la biotine

Afin de conduire au disaccharide biotinylé, le groupement benzyloxycarbonyle est, dans un premier temps, hydrogénolysé en présence de catalyseur de Pd activé sur charbon, pour donner le composé **130** (avec un rendement brut de 88%) portant une amine primaire libre qui servira d'amorce au futur bras espaceur.

Le réactif biotinylé, commercial sous la forme d'un dérivé succinimique, réagit rapidement avec l'amine primaire de l'intermédiaire **130** pour donner le disaccharide de chondroïtines biotinylé désiré **122** avec un bon rendement de 67% sur les deux étapes (Schéma V. 16). Cette étape finale de biotinylation est effectuée dans un mélange de DMF (pour solubiliser le réactif biotinylé) et d'eau (pour solubiliser le sucre déprotégé). Le dérivé succinimique de biotine s'hydrolyse rapidement au contact de l'eau formant l'acide correspondant, c'est pourquoi plusieurs équivalents sont nécessaires. La présence de triéthylamine évite la protonation de l'amine par cet acide libéré qui empêcherait la réaction de couplage.

La compétition entre la réaction de couplage et l'hydrolyse du réactif biotinylé a demandé une optimisation du nombre d'équivalents de ce réactif. Ainsi nous avons pu constater qu'avec 4 équivalents la réaction était terminée au bout d'1 heure, ce qui n'est pas le cas en présence de 3 équivalents. Dans ce dernier cas, seul l'ajout d'un équivalent supplémentaire de réactif suivi de 2 heures d'agitation permet à la réaction de se terminer.

⁷⁴ Evans D. A.; Britton T. C.; Ellman J. A. *Tetrahedron Letters*, **1987**, 28, 6141-6144

⁷⁵ Lucas H.; Basten J. E. M.; van Dinther T. G.; Meuleman D. G.; van Aelst S. F.; van Boeckel C. A. A. *Tetrahedron* **1990**, 46, 8207-8228

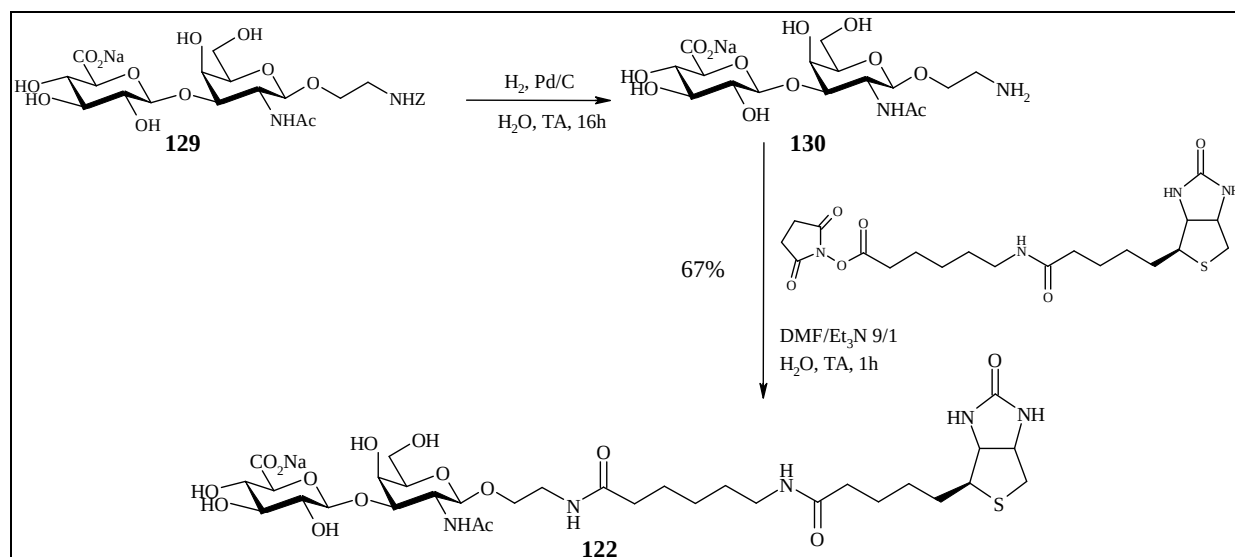


Schéma IV. 15

Nous avons ainsi synthétisé le premier oligosaccharide de chondroïtines biotinylé en 9 étapes à partir du disaccharide de base **118**.

Afin de pouvoir parfaitement interpréter les spectres RMN ^1H et ^{13}C de nos molécules biotinylées, qui n'avaient pas encore été décrits dans la littérature, nous avons préalablement procédé à l'analyse RMN ^1H et ^{13}C de la biotine. Pour ce faire nous avons préparé le sel de sodium du composé biotinylé relié au bras espaceur (Figure IV. 3).

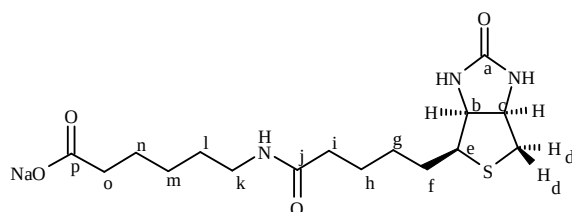


Figure IV. 3

Le spectre RMN ^1H ainsi que l'attribution réalisée sont présentés ci-après (Figure IV. 4 et Tableau IV. 1 respectivement).

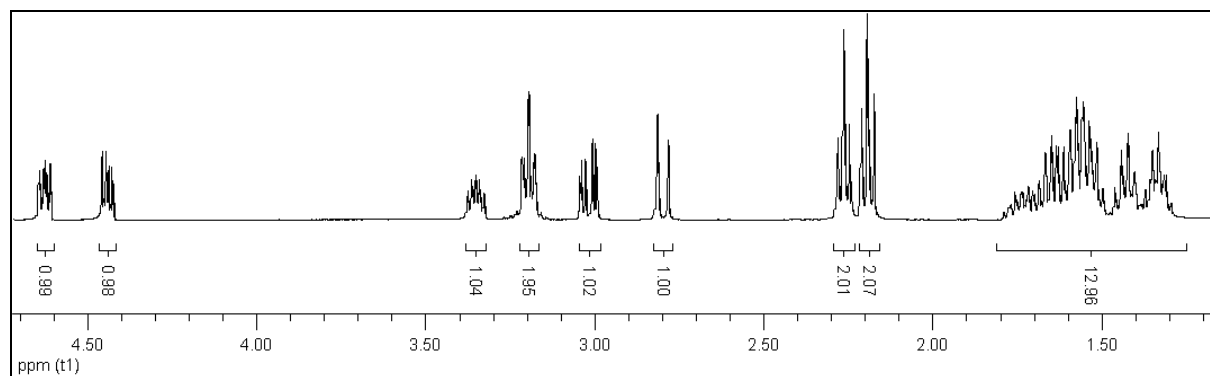


Figure IV. 4

Déplacement chimique (ppm)	Multiplicité observée	Nombre de protons	Constante de couplage	Attribution
4.62	ddd	1H	$J_{c,d} < 1\text{Hz}$ $J_{c,d'} = 5\text{Hz}$ $J_{b,c} = 8\text{Hz}$	H-c
4.44	dd	1H	$J_{b,e} = 5\text{ Hz}$ $J_{b,c} = 8\text{Hz}$	H-b
3.35	dd	1H	$J_{e,f} = 5.5\text{Hz}$ $J_{e,f'} = 1\text{Hz}$	H-e
3.19	dd	2H	$J_{k,k'} = J_{k,l} = 7\text{Hz}$	CH ₂ -k
3.01	dd	1H	$J_{d,d'} = 13\text{Hz}$ $J_{c,d'} = 5\text{Hz}$	H-d'
2.80	dd	1H	$J_{d,d'} = 13\text{Hz}$ $J_{c,d} < 1\text{Hz}$	H-d
2.26 et 2.19	2dd	2 x 2H	$J_{i,i'} = J_{i,l} = 7\text{Hz}$ $J_{o,o'} = J_{o,n} = 7\text{Hz}$	H-i et H-o
1.80-1.29	m	12H		CH ₂ -f, CH ₂ -g, CH ₂ -h, CH ₂ -l, CH ₂ -m, CH ₂ -n

Tableau IV. 1

Le spectre RMN ¹³C (Figure IV. 5) et son analyse (Tableau IV. 2) figurent ci-dessous.

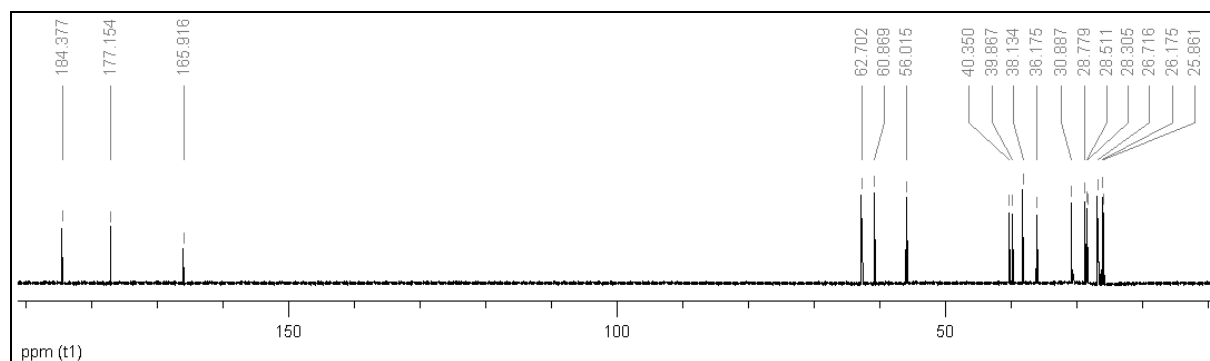


Figure IV. 5

Déplacement chimique (ppm)	Attribution
184.38 et 177.15	C-j et C-p
165.92	C-a
62.70	C-b
60.87	C-c
56.01	C-e
40.35	C-d
39.87	C-k
38.13 et 36.17	C-i et C-o
28.78, 28.51, 28.31, 26.72, 26.18, 25.86	C-f, C-g, C-h, C-l, C-m, C-n

Tableau IV. 2

Grâce à ces analyses, le spectre de la biotine liée au bras espaceur peut être superposé au spectre du disaccharide biotinylé et ainsi les protons et les carbones appartenant au sucre lui-même peuvent être attribués (Figure IV. 6 et Figure IV. 7).

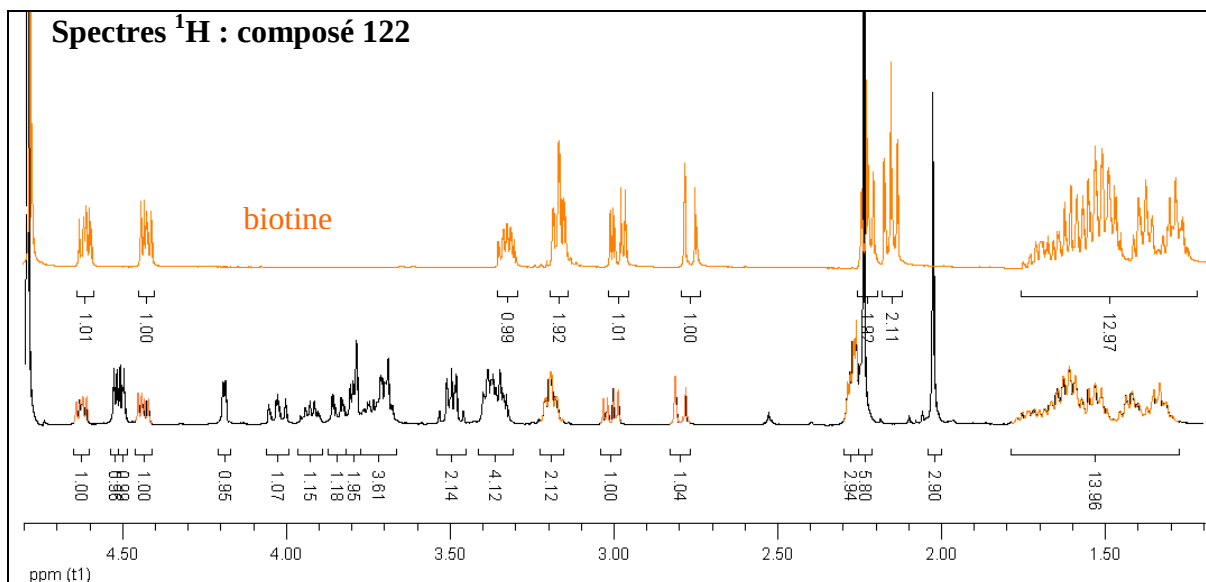


Figure IV. 6

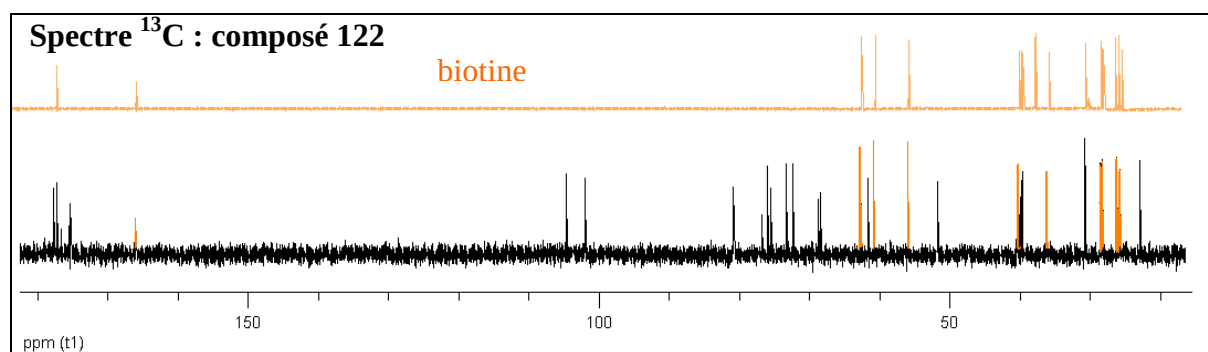


Figure IV. 7

Les produits finaux ont ainsi été parfaitement caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C (voir chapitre VIII, partie expérimentale)

La synthèse d'oligosaccharides de tailles plus importantes nécessite la préparation des deux autres blocs clés, les disaccharides **93** et **121** (Schéma IV. 1).

IV-5 SYNTHÈSE DES BLOCS CLES 93 ET 121 ET STRATÉGIE D'ÉLONGATION

IV-5.1 Synthèse du bloc donneur clé : le trichloroacétimide lévulinoylé 93

Le trichloroacétimide 93 est préparé à partir du trichloroacétimide 88 (Schéma IV. 1). Afin de synthétiser ce trichloroacétimide 93, élongateur de chaînes, des protections sélectives en position anomérique et en C-4' du D-GlcA doivent être introduites.

a. Glycosylation

Pour commencer, la position anomérique doit temporairement être protégée par un groupement orthogonal permettant une déprotection sélective avant son activation.

Ainsi, le trichloroacétimide clé 88 est glycosylé avec du 2-naphtylméthanol⁴⁵, selon les mêmes conditions que celles décrites pour le disaccharide 127, pour donner le composé 87 attendu avec 78% de rendement (Schéma IV. 16). La liaison glycosidique formée est uniquement d'anométrie β comme le prouve la RMN du ^1H $J_{1,2} = 8.5\text{Hz}$. Le groupement 2-naphtylméthyle avait déjà été utilisé au laboratoire pour la synthèse de chondroïtines en tant que groupement fluorophore⁴⁵, mais également pour sa facilité de déprotection par hydrogénéolyse⁷⁶ dans l'eau donnant accès aux sucres réducteurs correspondants. Dans notre cas, il a été choisi comme protection temporaire du carbone anomère, pour sa déprotection tout à fait sélective en milieu oxydant.

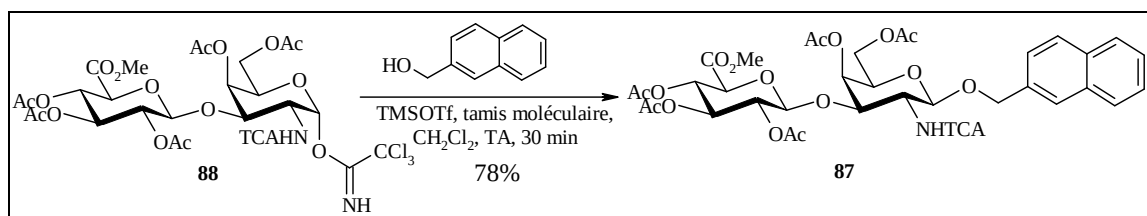


Schéma IV. 16

b. Protection sélective de l'hydroxyle en C-4' du D-GlcA

Afin de pouvoir libérer en temps voulu l'hydroxyle en position 4' du D-GlcA, une protection orthogonale doit y être introduite⁴⁵, un ester lévulinate a été choisi.

Dans une première étape, les acétates sont transestérifiés par une solution de méthanolate de sodium, en présence de méthanol (conditions de Zemplén) conduisant ainsi à un pentol. Ces conditions basiques conduisent à la formation inévitable d'un sous-produit due à la β -élimination (10 à 20%). Une déprotection en conditions acides (MeOH, HCl) a été testée mais elle a conduit à un mélange difficilement séparable de composés furaniques et méthylés sur la position anomérique. Une deuxième étape consiste en la protection par un

⁷⁶ Gaunt M. J.; Yu J.; Spencer J. B. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 4172-4173

acétal isopropylidène, des positions 4 et 6 de la D-GalN et, 2' et 3' du D-GlcA, au moyen de 2-méthoxypropène et d'ACS (intermédiaire **131**). La formation préférentielle de cet acétal (60% de rendement) est certainement due à la désactivation de l'hydroxyle en C-4', proche de la fonction ester. 8 à 10% d'acétal isopropylidène formé entre les positions 3' et 4' du D-GlcA ont tout de même été isolés⁴⁵. Ce dernier est recyclable, grâce à une hydrolyse suivie de l'isopropylidénation.

La présence de ces deux acétals laisse alors libre l'hydroxyle en position 4' et facilite ainsi sa protection par un groupement lévulinoyle, après activation de l'acide lévulinique par la DCC en présence de DMAP. Cette réaction de type couplage peptidique est réalisée avec un rendement de 91% et donne le composé **91**. Le groupement lévulinoyle a été choisi pour sa facilité de déprotection en milieu neutre et son orthogonalité avec les autres esters.

Dans une dernière étape, les acétals sont hydrolysés en milieu acide acétique et les quatre hydroxyles libres sont, à nouveau, protégés par des esters acétates en présence d'anhydride acétique dans la pyridine pour donner le composé **92a** avec un rendement de 61% (Schéma IV. 17).

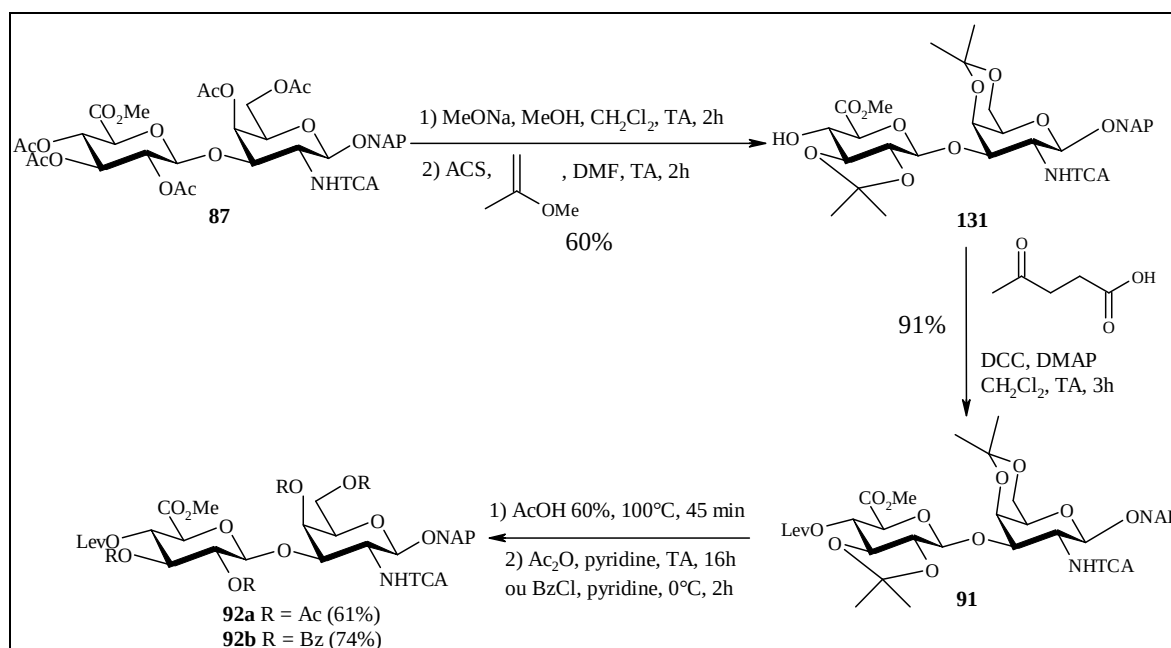


Schéma IV. 17

Le composé **91** a, par la suite, été préparé sous une forme benzoylée **92b** par du chlorure de benzoyle dans la pyridine avec un rendement de 74%.

Des travaux de recherches menés en parallèle au laboratoire par Chrystel Lopin-Bon, ont montré que des blocs accepteurs protégés par des esters benzoates augmentaient les rendements lors des étapes de glycosylation (comparés aux esters acétates).

En effet, la réaction de glycosylation entre le trichloroacétimidate **88** et un accepteur protégé par des esters acétates **132a** conduit à la formation d'un tétrasaccharide peracétylé **133a** avec 55% de rendement, alors qu'avec un accepteur protégé par des esters benzoates **132b** le rendement est de 63% (Schéma IV. 18).

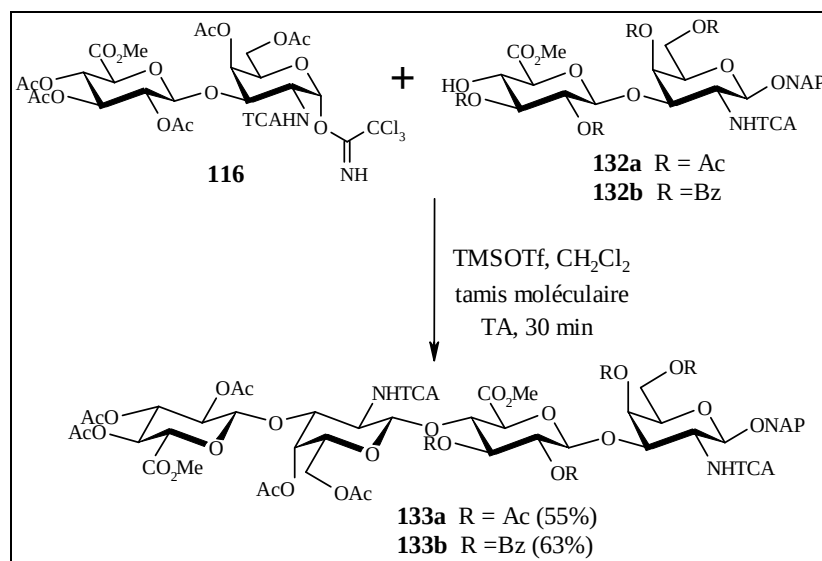


Schéma IV. 18

Cette observation a ensuite été confirmée par la synthèse d'un hexasaccharide. En comparant la réaction de glycosylation en série acétylée **a** et en série benzoylée **b** le rendement est supérieur de 20% avec les composés benzoylés (Schéma IV. 19).

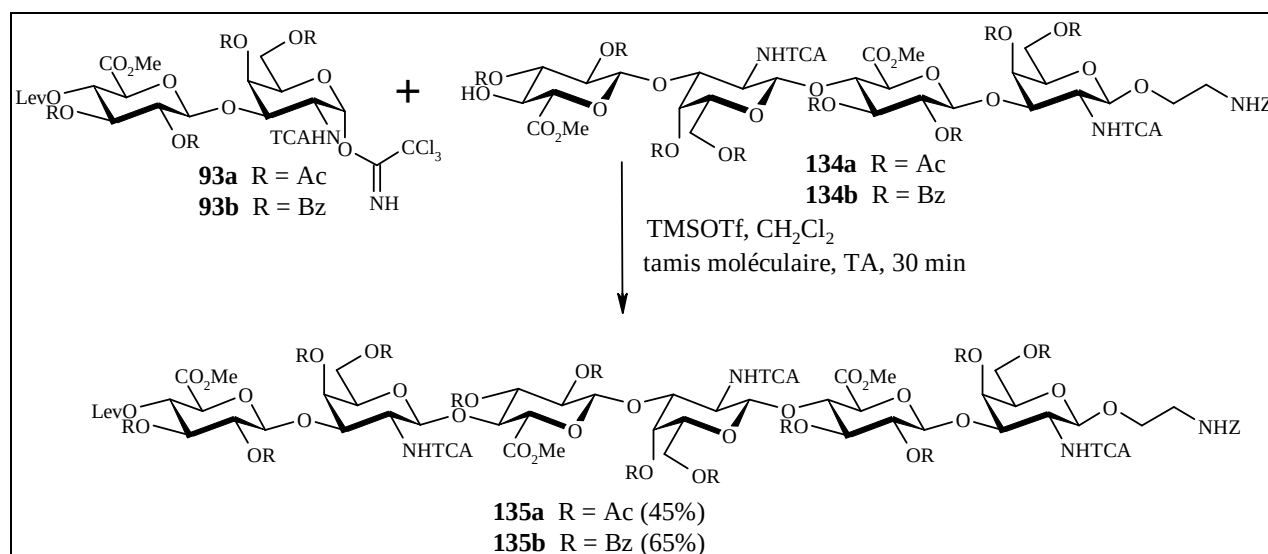


Schéma IV. 19

Afin de conduire au bloc donneur désiré **93**, la position anomérique doit ensuite être activée.

c. Synthèse du trichloroacétimide lévulinoylé **93**

Le groupement 2-naphtylméthyle est clivé par coupure oxydante au moyen de DDQ en présence de dichlorométhane et de méthanol⁷⁷. La réaction est totale après 24 heures d'agitation et l'hémiacétal, obtenu avec de bons rendements, peut alors être imidoylé par le trichloroacétonitrile en présence de DBU afin d'obtenir les trichloroacétimides **93a** et **93b** avec 63% et 77% de rendement respectivement, exclusivement sous forme d'anomères α (Schéma IV. 20).

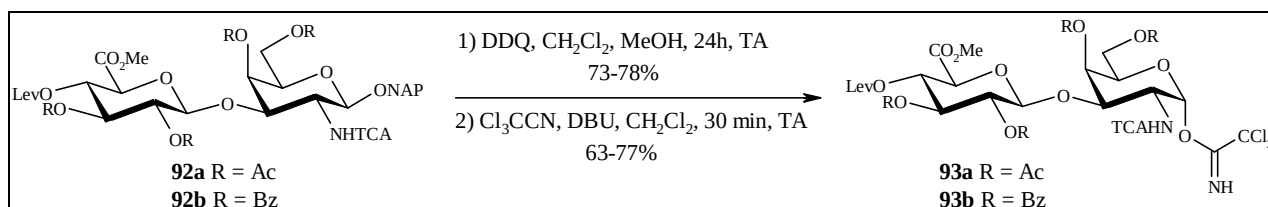


Schéma IV. 20

Lors de la formation de ces trichloroacétimides **93a** et **93b**, nous avons pu isoler un sous-produit récurrent, un trichloroacétimide monomérique. Le spectre RMN ¹H de ce trichloroacétimide monomérique **136** benzoylé est présenté ci-dessous (Figure IV. 8).

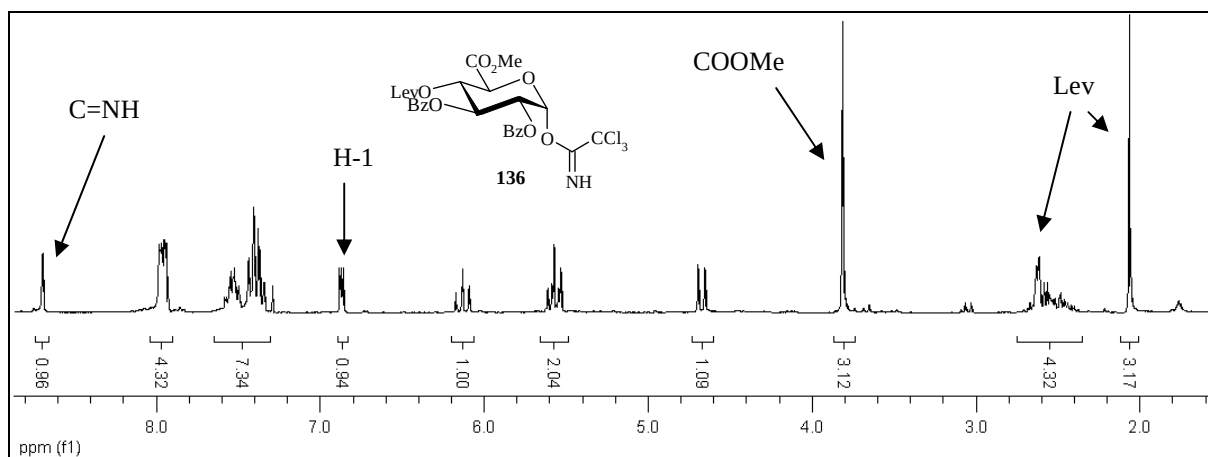


Figure IV. 8

Sa formation peut être expliquée par la déprotonation en α de l'aldéhyde (équilibre aldéhyde-hémiacétal) entraînant l'élimination de la partie D-glucuronique sous forme d'un hémiacétal, qui en présence de DBU et de trichloroacétonitrile conduit au trichloroacétimide monomérique (Schéma IV. 21). La proportion de ce produit monomérique dépend de la quantité de DBU ajoutée. En effet, en passant de 0.20 à 0.15 équivalent de DBU, la quantité de composé **136** formée a été diminuée.

⁷⁷ Xia J.; Abbas S. A.; Locke R. D.; Piskorz C. F.; Alderfer J. L.; Matta K. L. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 169-173

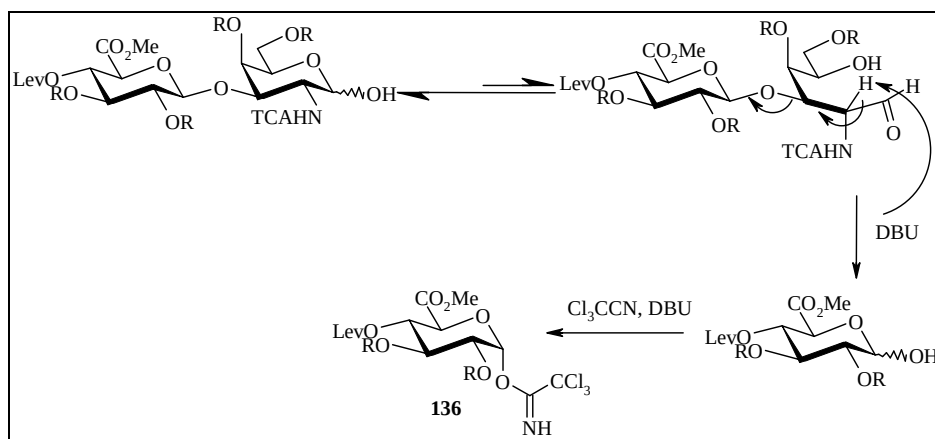


Schéma IV. 21

Les trichloroacétimidates **93a** et **93b** vont servir de disaccharides élongateurs.

- Le groupement donneur en C-1 de la D-GalN permet de le glycosyler et ainsi d'allonger les chaînes de sucres.
- Le groupement lévulinoyle en C-4' du D-GlcA permet une déprotection sélective, donnant alors un bloc accepteur, qui pourra être glycosylé à son tour.

De plus, ces trichloroacétimidates permettent l'accès au troisième et dernier bloc clé, le disaccharide accepteur **121**.

IV-5.2 Synthèse du bloc accepteur clé : le disaccharide **121**

Par analogie avec la synthèse du disaccharide biotinylé, les disaccharides **93a** et **93b** ont été glycosylés avec le 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol pour conduire aux composés **137a** et **137b** avec respectivement 54% et 89% de rendement (Schéma IV. 22).

Dans le cas du composé acétylé **137a**, la séparation du disaccharide et de l'alcool en excès est difficile sur colonne chromatographique. C'est pourquoi le mélange de ces deux composés a été engagé dans une réaction de silylation par du chlorure de *tert*-butyl(diméthylsilyle) dans la pyridine. L'alcool ainsi silylé est beaucoup moins polaire et se sépare parfaitement du disaccharide désiré sur colonne chromatographique.

En stratégie benzoylée, ces problèmes de purification n'ont pas été rencontrés. Les esters benzoates étant moins polaires que les esters acétates, ils vont migrer un peu plus sur silice et se séparer plus facilement de l'alcool en excès. L'utilisation de ce trichloroacétimidate benzoylé **93b** présente ici un avantage supplémentaire.

La déprotection sélective du groupement lévulinoyle par l'acétate d'hydrazine formé *in situ* en milieu tamponné, conduit aux disaccharides accepteurs attendus **121a** et **121b**, avec respectivement 80% et 75% de rendement (Schéma IV. 22).

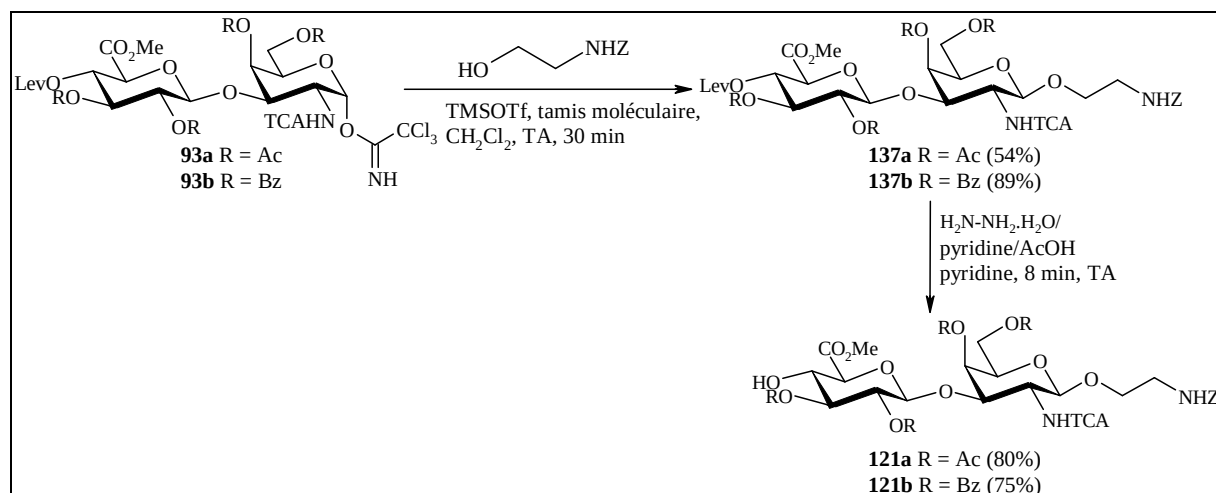


Schéma IV. 22

Les quatre blocs clés nécessaires à la synthèse de tous les oligosaccharides de tailles désirées sont maintenant disponibles (Figure IV. 9).

- Le bloc accepteur **121** portant en position anomérique l'amorce aminée pour le couplage avec le réactif de biotine
- Le bloc donneur élongateur **93** (Schéma IV. 23)
- Le bloc donneur terminateur disaccharidique **88**, qui glycosylé en dernière étape mène à l'oligosaccharide de taille paire attendue (Schéma IV. 23)
- Le bloc terminateur monomérique **61**, qui glycosylé en dernière étape mène à l'oligosaccharide de taille impaire attendue (Schéma IV. 23). Ce trichloroacétimide monomérique **61** avait été préalablement synthétisé³⁶ et était encore disponible au laboratoire.

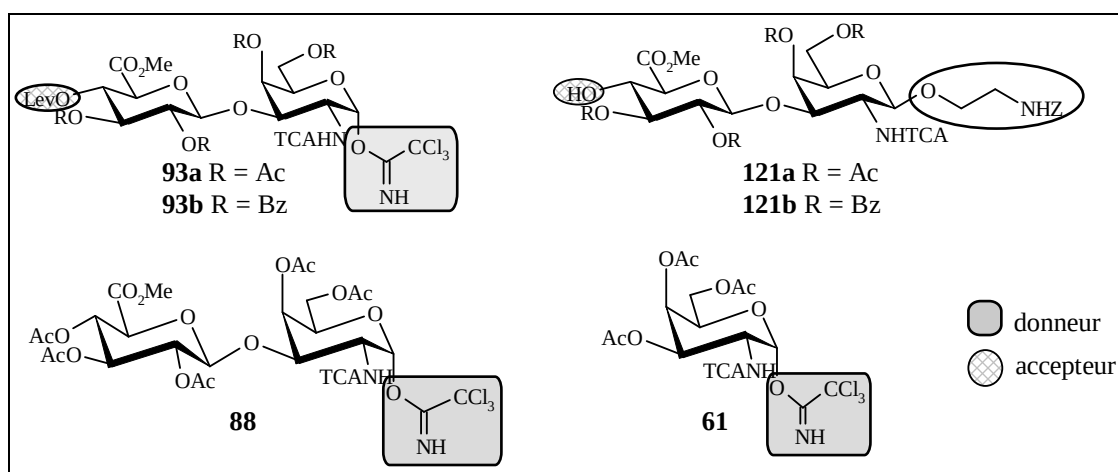


Figure IV. 9

IV-5.3 Stratégie d'élargissement

Grâce aux trois blocs clés **88**, **93** et **121**, tous les oligosaccharides de tailles désirées pourront être obtenus selon la stratégie suivante (Schéma IV. 23).

Le disaccharide accepteur **121** pourra être glycosylé avec le trichloroacétimidate **93** pour donner un oligomère **A** possédant le groupement lévulinoylé en C-4'. Après délévulinoylation un nouveau bloc accepteur **B** sera préparé. Une succession de couplage avec **93** et délévulinoylation conduira à un nouveau bloc accepteur **C** de taille n . Pour atteindre la taille désirée, le bloc **C** sera couplé dans une dernière étape avec le bloc donneur **93** ou **61** pour préparer un oligomère **D** de taille paire ou impaire respectivement.

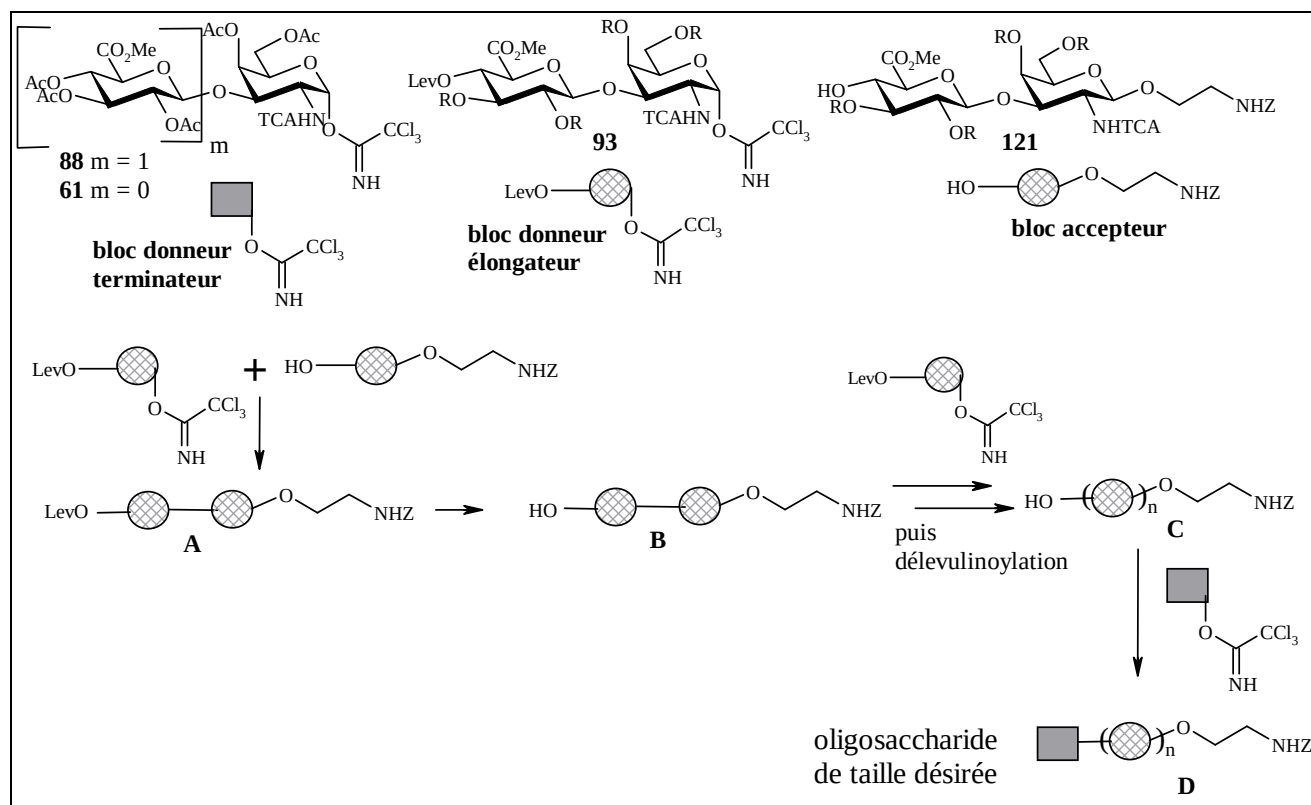


Schéma IV. 23

Les oligosaccharides désirés sont alors construits selon cette stratégie.

IV-6 SYNTHÈSES DES OLIGOSACCHARIDES PROTEGES

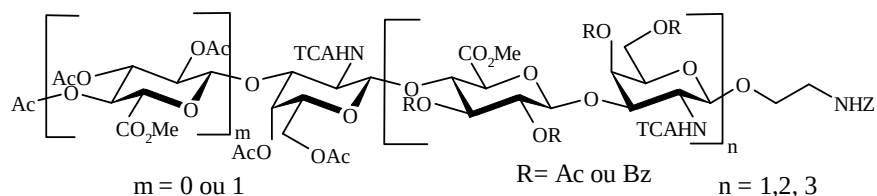


Figure IV. 10

IV-6.1 Synthèse du trisaccharide $n = 1$, $m = 0$

Afin de préparer le trisaccharide, le disaccharide accepteur **121b** est glycosylé avec le trichloroacétimide monomérique **61**, toujours selon les mêmes conditions de glycosylation. Le trisaccharide désiré **138** est obtenu avec 55% de rendement (Schéma IV. 24) avec formation de la liaison β uniquement (RMN ^1H $J_{1,2} = 8\text{Hz}$).

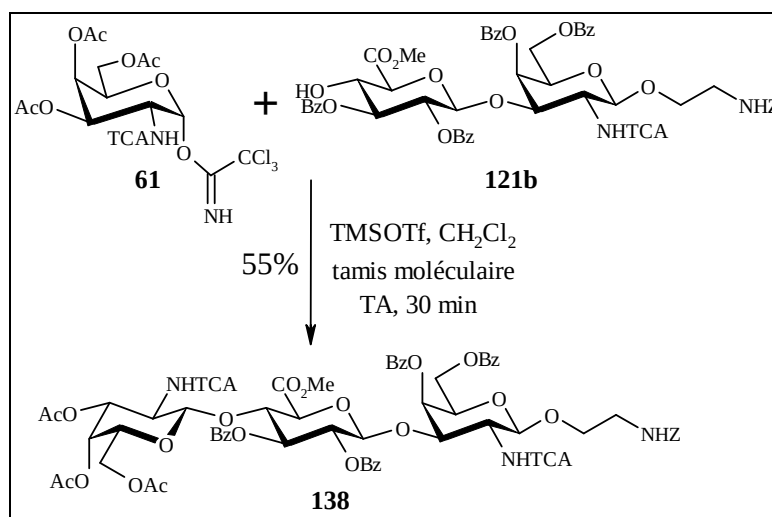


Schéma IV. 24

IV-6.2 Synthèse du tétrasaccharide $n = 1$, $m = 1$

Le tétrasaccharide **139** est préparé avec un rendement de 67% par glycosylation entre le trichloroacétimide acétylé **88** et le bloc accepteur **121a** (Schéma IV. 25). Seule la liaison β est formée (RMN ^1H $J_{1,2} = 8\text{Hz}$). Il est à noter que le tétrasaccharide ayant été préparé avant la mise au point de la stratégie benzoylée, il a été synthétisé à partir des blocs acétylés.

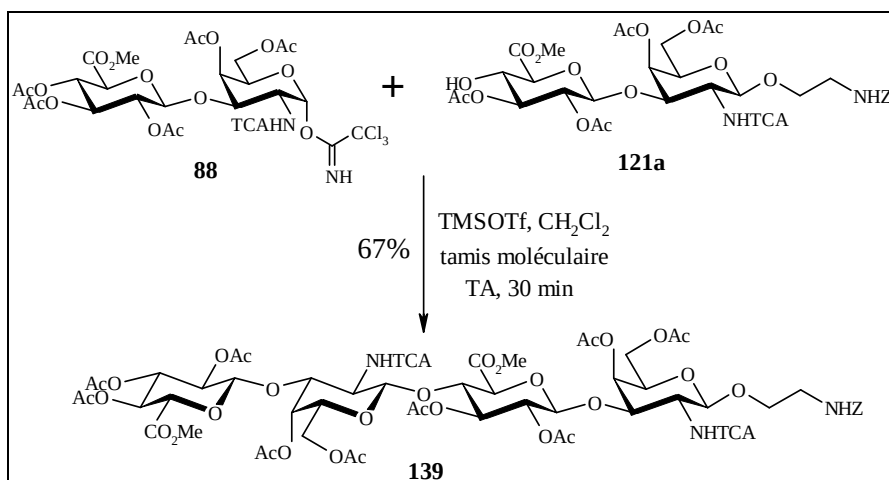


Schéma IV. 25

IV-6.3 Synthèse du pentasaccharide ($n = 2$, $m = 0$) et de l'hexasaccharide ($n = 2$, $m = 1$)

Pour la synthèse d'oligomères de tailles supérieures, il est nécessaire d'utiliser le bloc élongateur **93** (Schéma IV. 23).

Ainsi, pour la préparation du pentasaccharide et de l'hexasaccharide ($n = 2$), le bloc accepteur **121b** est glycosylé avec le trichloroacétimidate **93b** (bloc élongateur) pour donner le tétrasaccharide **140** (RMN ¹H $J_{1,2} = 8$ Hz) avec 87% de rendement.

La délévulinoylation du tétrasaccharide **140** conduit au tétrasaccharide accepteur **141** (75%) (Schéma IV. 26).

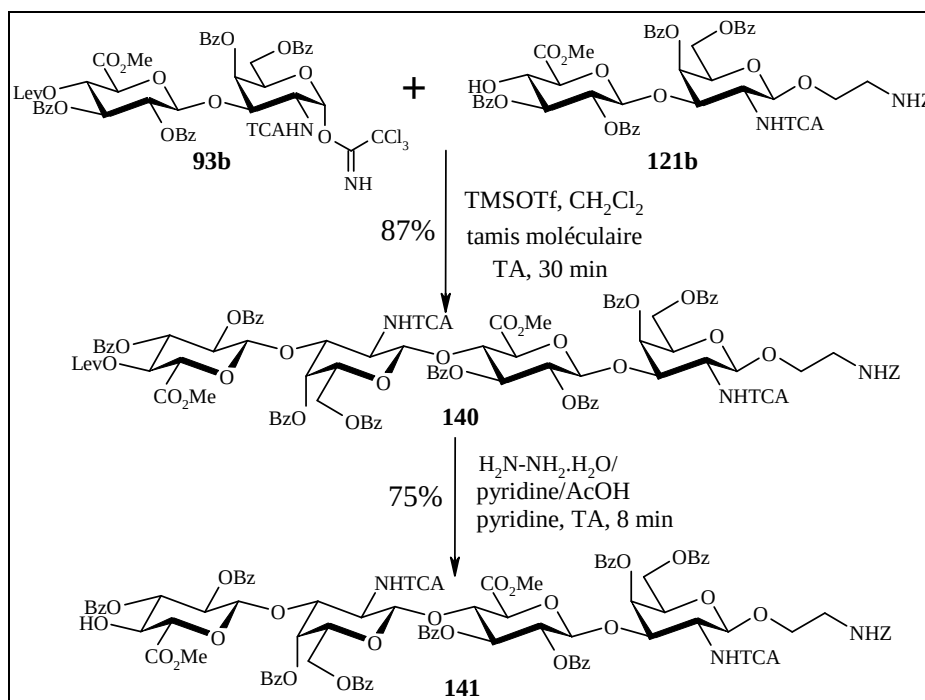


Schéma IV. 26

Le tétrasaccharide accepteur **141** peut ainsi conduire à la synthèse du pentasaccharide **142** (66%) (RMN ^1H $J_{1,2} = 8.5\text{Hz}$) et de l'hexasaccharide **143** (55%) (RMN ^1H $J_{1,2} = 8.5\text{Hz}$) après glycosylation avec les trichloroacétimidates **61** et **88** respectivement, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (Schéma IV. 27).

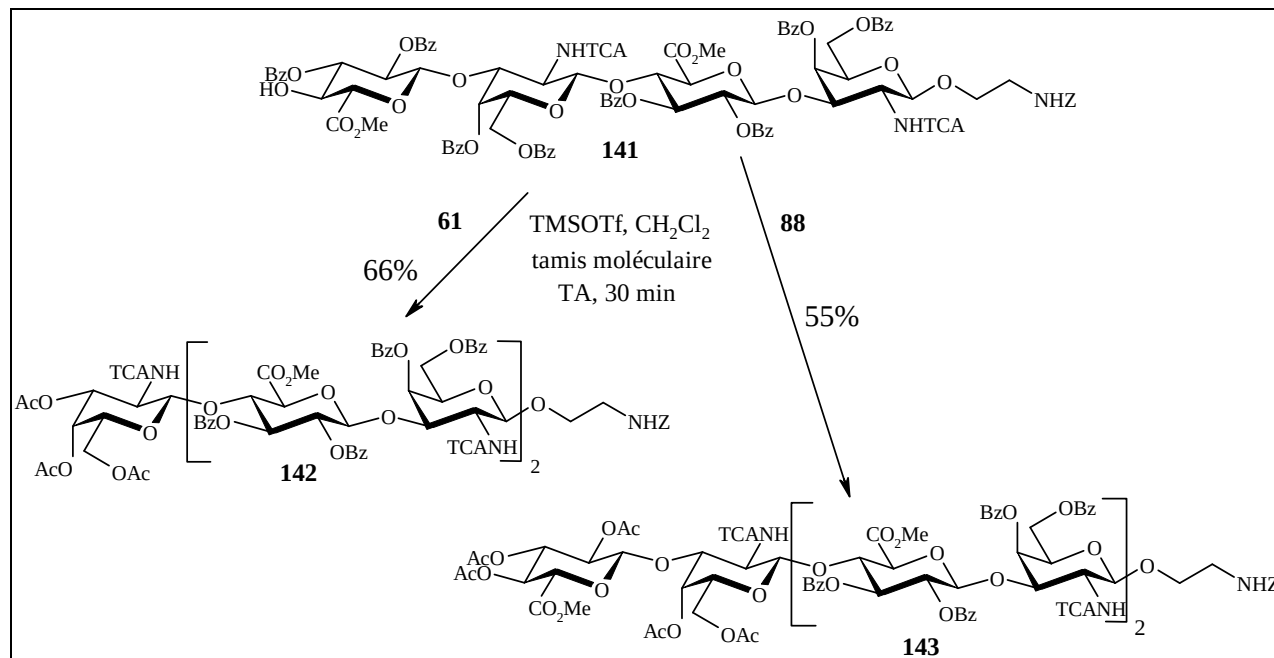


Schéma IV. 27

IV-6.4 Synthèse de l'heptasaccharide ($n = 3$, $m = 0$) et de l'octasaccharide ($n = 3$, $m = 1$)

Afin de synthétiser l'heptasaccharide et l'octasaccharide ($n = 3$), deux séries successives de glycosylation (avec le bloc élongateur **93b**) et de délévulinoylation sont nécessaires. La première conduisant au tétrasaccharide **141** précédemment obtenu, la deuxième à l'hexasaccharide **144'** (avec 66% et 83% de rendements pour le couplage et la délévulinoylation respectivement) (Schéma IV. 28).

Ce dernier est glycosylé avec les trichloroacétimidates **61** et **88** pour donner respectivement l'heptasaccharide **145** (67%) et l'octasaccharide **146** (65%) (RMN ^1H $J_{1,2} = 8.5\text{Hz}$ voir Annexe 1) (Schéma IV. 28).

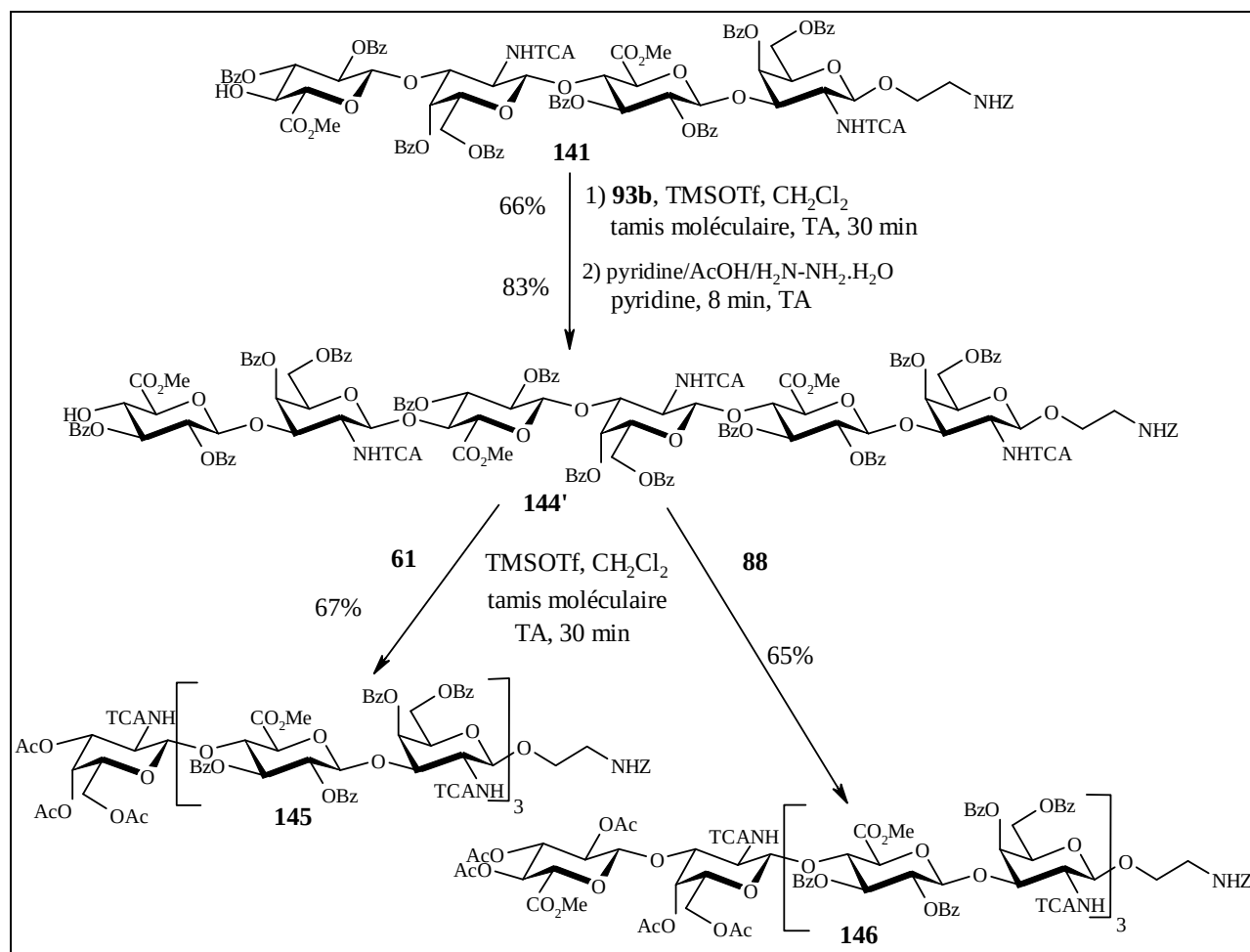


Schéma IV. 28

Lors des réactions de glycosylation un sous-produit est formé en faible quantité. Il s'agit en fait du produit d'homocouplage du trichloroacétimide 93b. Ce produit n'étant formé qu'en très faible quantité, il n'a pu être caractérisé que lors de la préparation d'accepteurs intermédiaires nécessaires en quantité importante. Ce composé n'a été clairement identifié qu'après une réaction de délevulinoylation. Son spectre RMN ¹H est présenté ci-après (Figure IV. 11). Ce composé ne possède pas de glycoside en position anomérique.

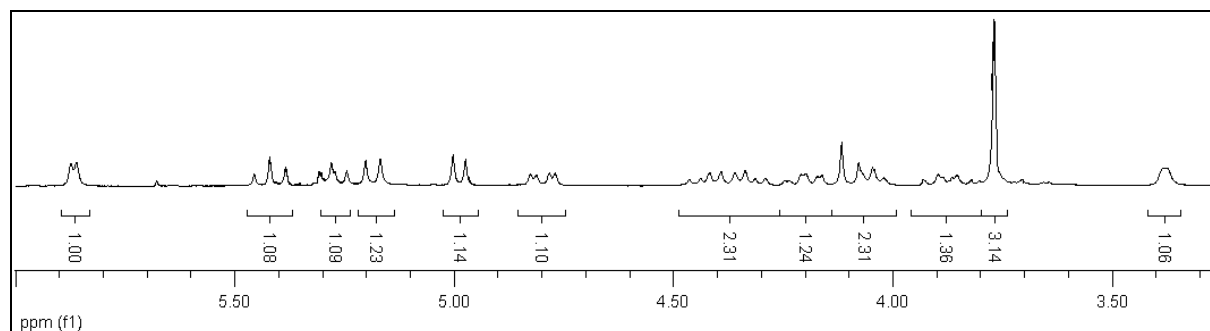


Figure IV. 11

Une infime quantité d'eau pourrait hydrolyser le trichloroacétimide et former l'hémiacétal **147**, accepteur en position anomérique avec lequel le trichloroacétimide peut alors rapidement réagir et former le produit d'homocouplage **148** (Schéma IV. 29).

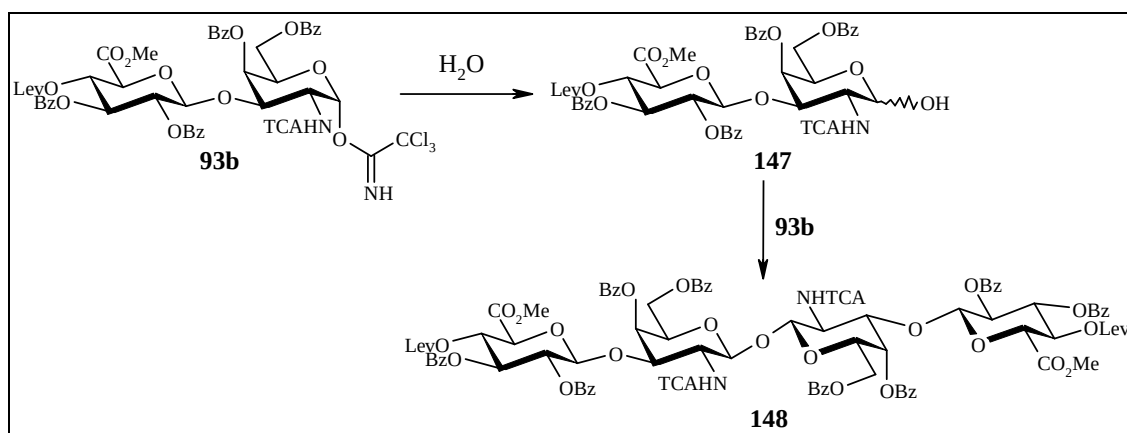


Schéma IV. 29

A ce stade, nous avons à notre disposition tous les oligomères de chondroïtines protégés de tailles désirées. La préparation des composés biotinylés est ensuite réalisée selon la même méthodologie que celle suivie pour le disaccharide final **122**.

IV-7 SYNTHÈSES DES OLIGOMÈRES BIOTINYLES

IV-7.1 Réduction des groupements *N*-trichloroacétyle

L'étape de réduction des oligosaccharides est réalisée en milieu radicalaire en présence de *n*-Bu₃SnH et d'AIBN (Schéma IV. 30).

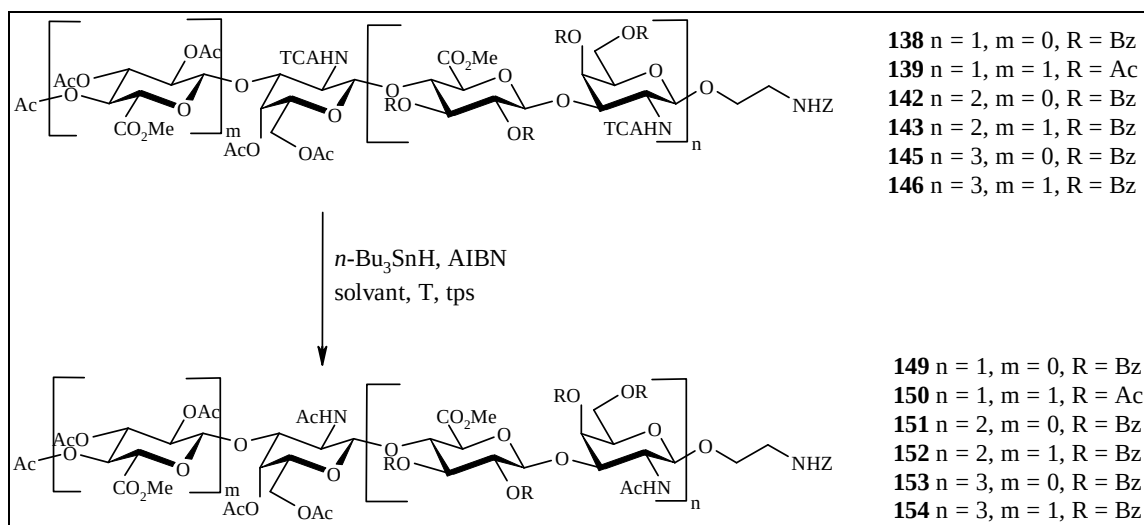


Schéma IV. 30

Pour commencer le tétrasaccharide **139** est soumis aux mêmes conditions de réduction que celles utilisées pour le disaccharide **127**. Le tétrasaccharide **139** est dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide avec deux équivalents par chlore de *n*-Bu₃SnH. Le milieu réactionnel est chauffé 2 heures à 80°C. La réduction étant incomplète, elle est relancée dans les mêmes conditions pour donner 30% de produit désiré **150** (entrée 1 du Tableau IV. 3). Ces conditions sont testées une deuxième fois, la manipulation engendre à nouveau une réduction incomplète. Le mélange de composés subit une nouvelle fois ces conditions et le tétrasaccharide réduit **150** est obtenu avec 53% de rendement (entrée 1 du Tableau IV. 3). Ces conditions de réduction ne sont donc pas reproductibles.

Ces conditions sont alors appliquées à l'hexasaccharide **143**, mais après 2 heures à 80°C, la réaction est incomplète. Elle est alors relancée 2h à 105°C pour mener à 22% de produit réduit **152** (entrée 2 du Tableau IV. 3).

Nous avons ensuite essayé d'augmenter un peu plus la température.

Ainsi l'hexasaccharide **143** est tout d'abord chauffé 1h30 à 80°C puis 1h30 à 100°C, mais les produits obtenus n'ont pas pu être déterminés (entrée 3 Tableau IV. 3). En chauffant 4 heures à 120°C, un mélange de composés est observé (entrée 4 du Tableau IV. 3). Le chauffage à 120°C engendrant une dégradation (β -élimination et déprotection), nous avons diminué la température pour la suite des essais.

Le pentasaccharide **142** est alors réduit toujours dans le même solvant avec les mêmes quantités de *n*-Bu₃SnH et AIBN pendant 2h30 à 100°C. Un mélange de composés en résulte dont un, possédant un atome de chlore (prouvé par spectrométrie de masse) (entrée 5 du Tableau IV. 3), la réduction n'est donc pas complète.

Après 8h à 100°C, la réduction n'est toujours pas complète (entrée 6 du Tableau IV. 3). Nous en concluons alors qu'augmenter la température et le temps de chauffage ne permet pas d'améliorer la réaction.

Toujours en prenant le pentasaccharide **142** en tant que substrat, nous avons alors tenté de faire des ajouts séquentiels d'AIBN et de *n*-Bu₃SnH afin qu'il y ait des radicaux en permanence dans le milieu. Ainsi les quantités de *n*-Bu₃SnH et d'AIBN restent inchangées mais elles sont ajoutées en trois fois (une quantité dès le début de la réaction, puis deux ajouts). Après 4h30, la réduction est toujours incomplète (entrée 7 du Tableau IV. 3).

Nous avons alors décidé d'ajouter du benzène au mélange réactionnel, connu pour être un très bon solvant pour les réactions radicalaires.

Le pentasaccharide **142** est alors dissous dans un mélange de *N,N*-diméthylacétamide et de benzène. Après les trois ajouts de *n*-Bu₃SnH (1eq/Cl) et d'AIBN pendant 4h30 à 80°C la réaction présente un mélange de composés dont 40% de pentasaccharide réduit **151** (entrée 8 du Tableau IV. 3).

Nous avons ensuite augmenté le nombre d'équivalents de *n*-Bu₃SnH à quatre par chlore. Le pentasaccharide **151** est alors obtenu avec un rendement de 59% (entrée 9 du Tableau IV. 3).

Pour terminer, l'hexasaccharide **143** est alors soumis aux mêmes conditions et le composé totalement réduit **152** est obtenu avec 78% de rendement (entrée 10 du Tableau IV. 3).

	Produit de départ	Solvant	Conditions de réaction	<i>n</i> -Bu ₃ SnH (nb équivalents)	Résultat	Rendement
1	139	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	2h à 80°C	2eq/Cl	Incomplet puis relance 1 fois	30% à 53%
2	143	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	2h à 80°C	2eq/Cl	Incomplet puis relance 2h à 105°C	22%
3	143	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	1h30 à 80°C puis 1h30 à 100°C	2eq/Cl	n.d.	
4	143	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	4h à 120°C	2eq/Cl	Incomplet + β-élimination + produit déprotégé	
5	142	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	2h30 à 100°C	2eq/Cl	Incomplet Reste 1Cl	
6	142	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	8h à 100°C	2eq/Cl	Incomplet	
7	142	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	4h30 à 80°C ajouts séquentiels d'AIBN et <i>n</i> -Bu ₃ SnH	2eq/Cl (3 fois 0.66eq/Cl)	Incomplet	
8	142	<i>N,N</i> -diméthylacétamide/ Benzène	4h30 à 80°C ajouts séquentiels d'AIBN et <i>n</i> -Bu ₃ SnH	3eq/Cl (3 fois 1eq/Cl)	Incomplet, mélange	40%
9	142	<i>N,N</i> -diméthylacétamide/ Benzène	4h30 à 80°C ajouts séquentiels d'AIBN et <i>n</i> -Bu ₃ SnH	4eq/Cl (2eq/Cl puis 2 fois 1eq/Cl)	Complet	59%
10	143	<i>N,N</i> -diméthylacétamide/ Benzène	4h30 à 80°C ajouts séquentiels d'AIBN et <i>n</i> -Bu ₃ SnH	4eq/Cl (2eq/Cl puis 2 fois 1eq/Cl)	Complet	78%

Tableau IV. 3

Comme nous avons pu le constater ces réactions de réduction par du *n*-Bu₃SnH et de l'AIBN sont assez aléatoires. Mais grâce aux ajouts séquentiels de *n*-Bu₃SnH et d'AIBN et la solubilisation dans le benzène et la *N,N*-diméthylacétamide, ces conditions opératoires semblent améliorées (Tableau IV. 4).

	Conditions initiales	Nouvelles conditions
Solvant	<i>N,N</i> -diméthylacétamide	<i>N,N</i> -diméthylacétamide/ Benzène
<i>n</i> -Bu ₃ SnH	2eq/Cl	4eq/Cl
Ajouts	Une fois au début de la réaction	Séquentiels en 3 fois (un dès le début, puis deux ajouts)
Temps de réaction	2h à 80°C	5h à 80°C

Tableau IV. 4

De plus, la mauvaise solubilité de ces composés a entraîné des difficultés de purification sur colonne de silice et influence donc le rendement de cette réduction.

Ainsi, les trisaccharide, heptasaccharide et octasaccharide sont soumis à ces nouvelles conditions de réduction et sont obtenus en une seule réaction. Les rendements de toutes ces réductions sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau IV. 5).

Oligosaccharide	Rendement
Trisaccharide 149	55%
Tétrasaccharide 150	53%
Pentasaccharide 151	59%
Hexasaccharide 152	78%
Heptasaccharide 153	77%
Octasaccharide 154	53%

Tableau IV. 5

IV-7.2 Déprotection des esters

La déprotection des esters est réalisée en deux étapes quel que soit l'oligosaccharide et selon les mêmes conditions que celles décrites pour le disaccharide **129** (Schéma IV. 14). La purification des composés est réalisée sur LH-20.

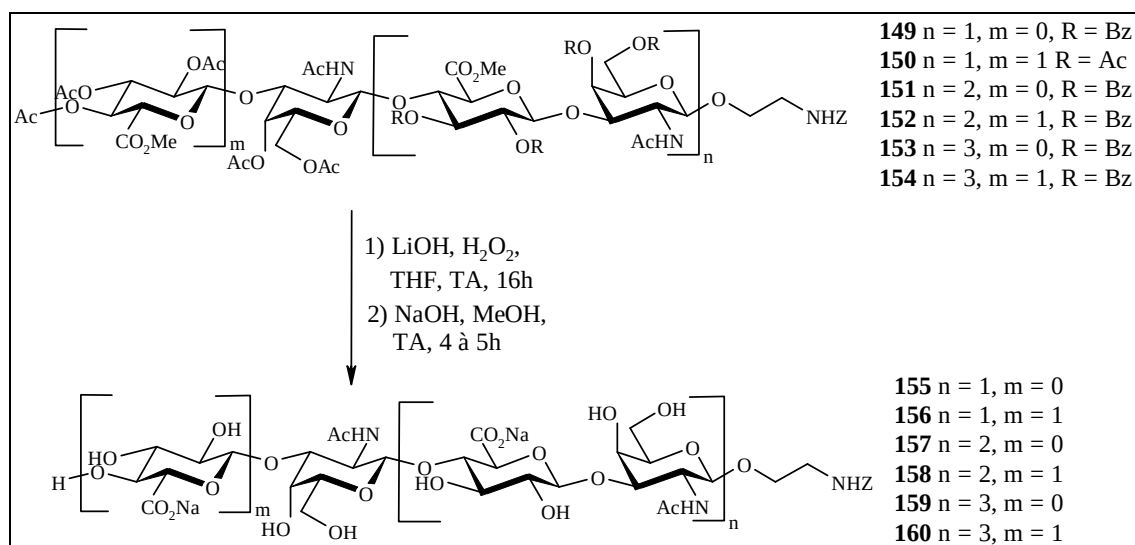


Schéma IV. 31

Les rendements de cette étape de déprotection sont donnés dans le tableau suivant (Tableau IV. 6).

Oligosaccharide	Temps de réaction	Rendement
Trisaccharide 155	4h	68%
Tétrasaccharide 156	4h	62%
Pentasaccharide 157	4h	58%
Hexasaccharide 158	4h	71%
Heptasaccharide 159	5h	95%
Octasaccharide 160	5h	84%

Tableau IV. 6

Les composés totalement déprotégés sont maintenant prêts à être engagés dans la dernière étape de synthèse : la biotinylation.

IV-7.3 Couplage avec la biotine

L'hydrogénolyse du groupement benzyloxycarbonyl est réalisée puis l'intermédiaire aminé est couplé avec le réactif biotinylé en milieu DMF/eau pour conduire à tous les oligosaccharides biotinylés désirés **167, 168, 169, 170, 171, 172** (Schéma IV. 32) avec de bons rendements (Tableau IV. 7).

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de l'octasaccharide biotinylé **172** sont présentés en Annexe 2.

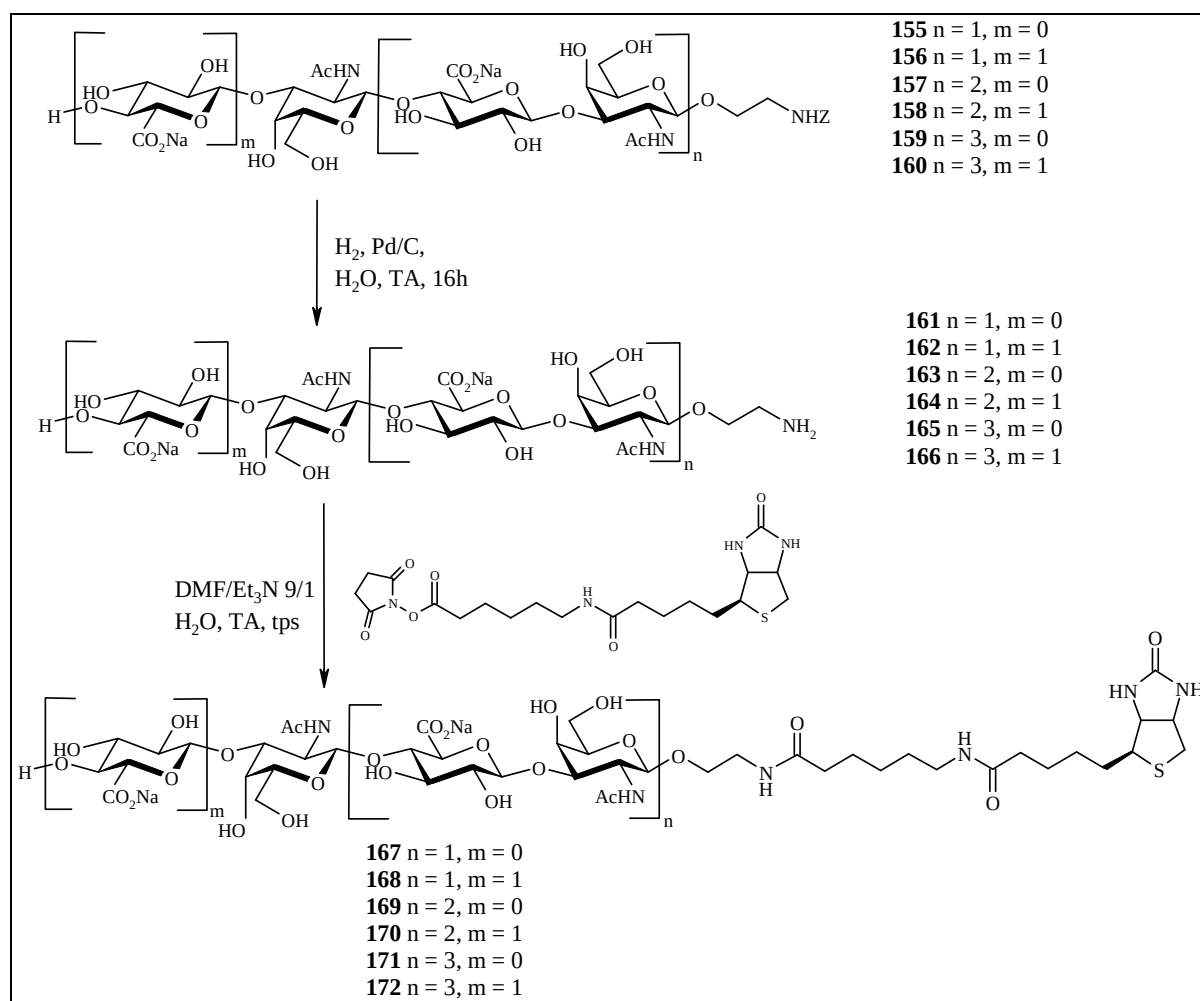


Schéma IV. 32

Oligosaccharide	N°	Rendement brut hydrogénolyse	N°	Temps de réaction	Rendement sur les 2 étapes
Trisaccharide	161	84%	167	1h30	60%
Tétrasaccharide	162	100%	168	1h	72%
Pentasaccharide	163	77%	169	4h	59%
Hexasaccharide	164	75%	170	1h	63%
Heptasaccharide	165	100%	171	1h30	85%
Octasaccharide	166	94%	172	2h30	77%

Tableau IV. 7

IV-8 CONCLUSION

Grâce à cette stratégie basée sur l'hydrolyse acide d'un polymère de sulfates de chondroïtines, les intermédiaires clés **88**, **93** et **121** ont pu être préparés relativement rapidement en 4, 12 et 14 étapes respectivement à partir du disaccharide clé **118**. Le disaccharide final est rapidement obtenu en 5 étapes à partir de l'intermédiaire **88**. La stratégie d'élongation permet l'obtention des composés trisaccharidique à octasaccharidique. Ainsi, les analogues biotinylés sont préparés en 19 à 23 étapes de synthèses à partir de l'intermédiaire **118** (Figure IV. 12).

La préparation de ces sept oligosaccharides de chondroïtines biotinylés a conduit à une publication⁷⁸.

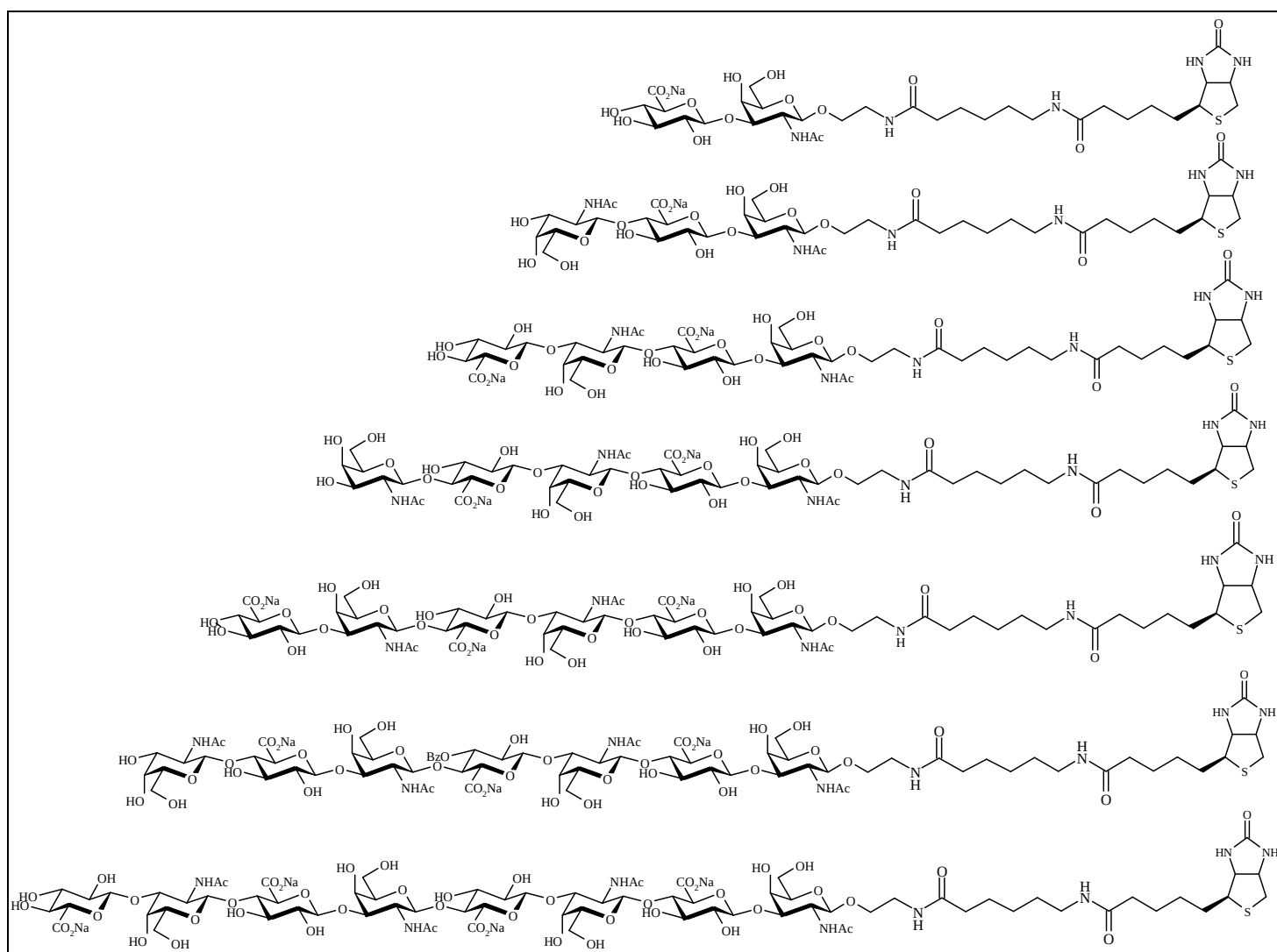


Figure IV. 12

⁷⁸ Vibert A.; Lopin-Bon C.; Jacquet J.-C. *Chem Eur. J.*, **2009**, *15*, 9561-9578



V- SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES DE SULFATATION HOMOGÈNE EN POSITION 4 OU 6



V- SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES DE SULFATATION HOMOGENE EN POSITION 4 OU 6

Le cartilage humain contient des CSA (4-sulfate) et des CSC (6-sulfate). Cherchant à déterminer le rôle des sulfotransférases et la reconnaissance enzyme-substrat de la chondroïtine synthase, nous nous sommes intéressés, dans un deuxième temps, à la synthèse d'oligosaccharides de chondroïtines sulfatés en position 4 ou en position 6.

La préparation d'oligosaccharides portant un groupement sulfate en position 4 ou en position 6 de la D-GalN nécessite l'introduction d'un groupement sélectif et orthogonal sur la future position sulfatée. Ainsi ces deux positions devront être isolées. La présence d'un acétal benzyldène permettra cet isolement. De plus il pourra être, par la suite, ouvert de manière régiosélective du côté 4 ou du côté 6 selon que les composés conduiront à la synthèse des produits 4-sulfatés ou 6-sulfatés.

V-1 PREMIERE STRATEGIE APPLIQUEE A LA SYNTHÈSE DE TETRASACCHARIDES

La première stratégie envisagée consiste en la préparation de tétrasaccharides portant un acétal benzyldène qui est ensuite ouvert régiosélectivement.

Le tétrasaccharide sulfaté biotinylé **IV** sera préparé à partir d'un tétrasaccharide **V** possédant un groupement sélectif sur la future position sulfatée, un ester chloroacétate. Quel que soit le type de sulfatation auquel il conduira, le composé **V** sera issu, grâce à une ouverture régiosélective, d'un précurseur commun **VI** possédant l'acétal benzyldène. Le produit **VI** sera synthétisé par glycosylation entre l'accepteur **VII** et le bloc donneur **173**. Ce dernier sera aussi le précurseur de l'intermédiaire **VII**. Cet intermédiaire **173** sera préparé à partir du composé **126** déjà synthétisé dans le chapitre IV à partir de l'unité de base **118** (Schéma V. 1).

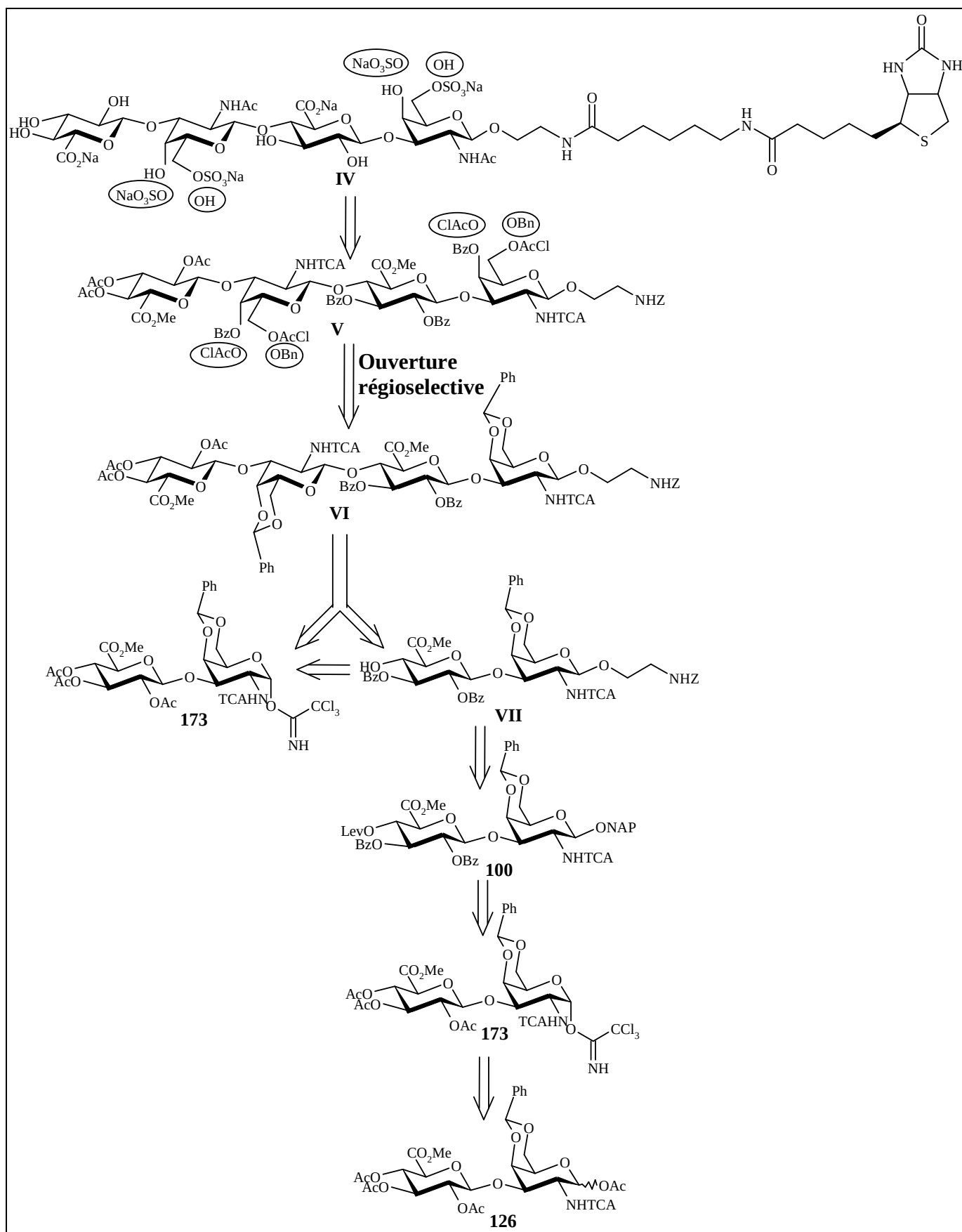


Schéma V. 1

V-1.1 Synthèse du trichloroacétimide benzyldène **173**

Par analogie avec la synthèse des composés non sulfatés, le premier intermédiaire clé à préparer était un bloc donneur (trichloroacétimide). Le composé **126** obtenu lors de la préparation des produits non sulfatés en est le précurseur (Schéma IV. 8).

Ainsi, dans un premier temps, la position anomérique est sélectivement déprotégée par l'acétate d'hydrazine⁶⁹. L'hémiacétal formé est alors imidoylé dans les mêmes conditions que celles décrites pour le trichloroacétimide **88**, pour donner le composé **173**, d'anomérie α exclusivement (RMN ^1H , $J_{1,2} = 3.5\text{Hz}$), avec un rendement de 54% sur les deux étapes (Schéma V. 2).

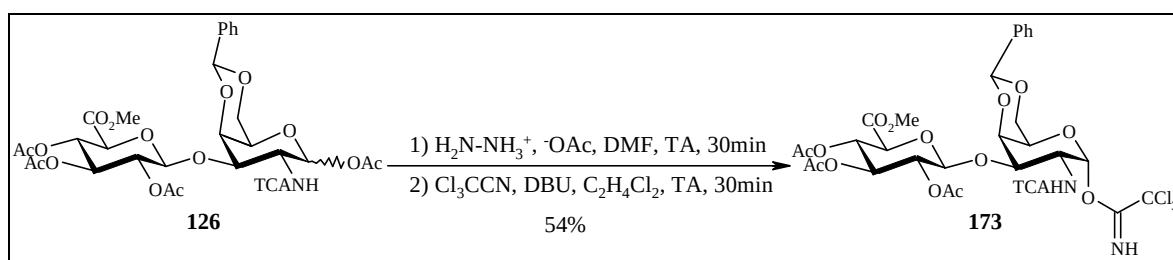


Schéma V. 2

V-1.2 Glycosylations « push-pull »

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre II, la présence d'un acétal benzyldène sur un résidu D-GalN **174**, sous une catalyse avec un acide de Lewis dur, conduit à des mélanges α/β inséparables³⁶. Dans cette publication, les auteurs ont démontré que malgré la présence du groupement participant en C-2 (NHTCA), la glycosylation avec un accepteur de type sucre, quelles que soient les conditions (catalyseur, température, temps de réaction) conduit à la formation de liaisons α et β **175** (Schéma V. 3). La participation du groupement trichloroacétyl en C-2 et l'activation du thiogalactoside n'ont pas été mises en cause, puisque l'oxazoline intermédiaire a pu être isolée. De plus, la glycosylation avec du MeOH donne exclusivement le β -méthylgalactoside **176** (Schéma V. 3).

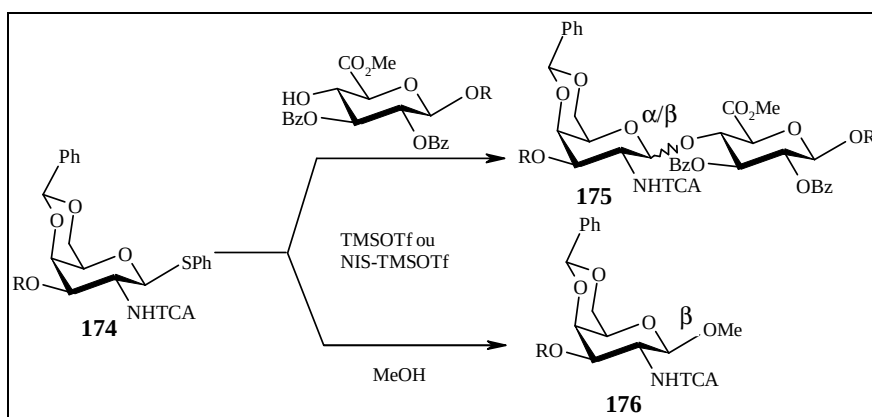


Schéma V. 3

Il a ainsi été mis en évidence que ce seraient les encombrements stérique (de l'aromatique) et électronique (des orbitales des atomes d'oxygène) dû à l'acétal benzylidène qui conduirait, lorsque que l'accepteur est un peu plus encombré stériquement (de type sucre), à une attaque par les deux faces et ainsi à la formation des liaisons α et β (Figure V. 1).

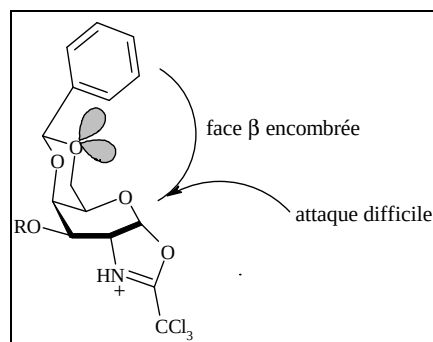


Figure V. 1

Pour contourner ce problème, nous avons envisagé un mécanisme de type « push-pull », utilisé lorsque le groupement en C-2 n'est pas participant et que la liaison formée doit être d'anométrie β (voir chapitre II)^{29,32}. Ce mécanisme s'apparente à une substitution nucléophile de type 2 dans lequel le catalyseur est un acide de Lewis mou (type $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) (Figure V. 2).

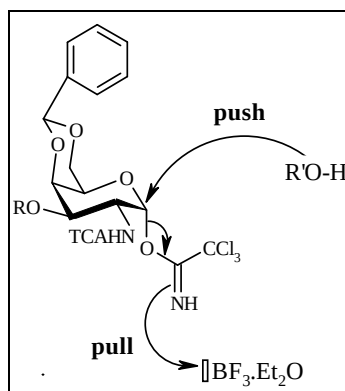


Figure V. 2

Ainsi, le trichloroacétimide **173** est glycosylé sous conditions parfaitement anhydres, en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (catalyseur). Les conditions de réaction avec le 2-naphtylméthanol ont été optimisées par Caryn Dupont lors de son stage de Master 2 et il apparaît que les meilleurs résultats de sélectivité sont obtenus à -60°C (rendement de 75% proportion α/β 2 : 23). A -40°C , par exemple, la proportion α/β était de 1 pour 4. Une diminution de la température favoriserait le mécanisme « push-pull » et expliquerait ces résultats.

Cette glycosylation fonctionne aussi bien avec le 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol (72%) (Schéma V. 4).

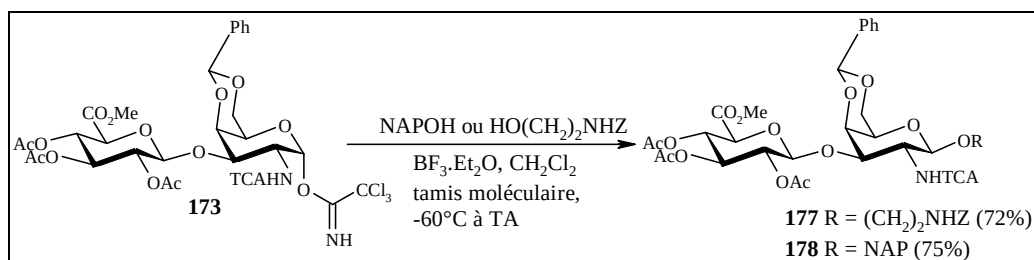


Schéma V. 4

L'intermédiaire **177**, tout comme son analogue peracétylé **87**, va subir quelques transformations afin de mener à un produit possédant le groupement lévulinoylé nécessaire à l'élongation des chaînes.

V-1.3 Synthèse du disaccharide précurseur 100

La stratégie envisagée est exactement la même que celle décrite pour les composés non sulfatés, avec pour objectif d'introduire le groupement lévulinoylé en C-4' du D-GlcA.

Les groupements acétates du composé **178** sont transestérifiés par méthanolyse. La présence de l'acétal benzylidène limite la réaction de β -élimination. Les positions 2' et 3' du D-GlcA sont ensuite protégées par un acétal isopropylidène pour donner **179** (57%).

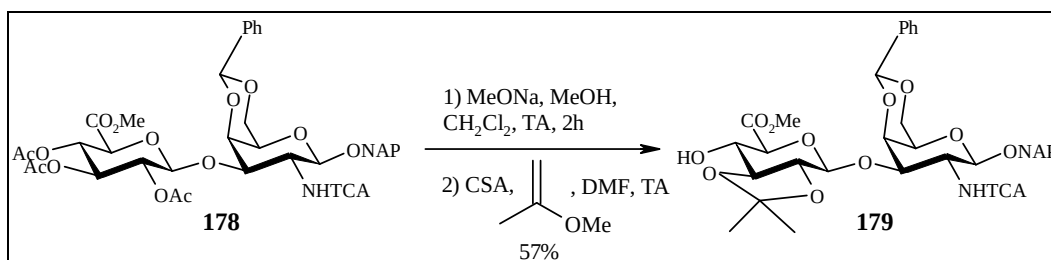


Schéma V. 5

Ce composé **179** avait déjà été synthétisé au laboratoire mais par une stratégie différente⁴⁵. En effet, l'étape de glycosylation « push-pull » n'était alors pas mise au point, augmentant ainsi le nombre d'étapes de synthèse. La glycosylation par la méthode « push-pul », permet donc de conserver cet acétal benzylidène et ainsi de nous affranchir de 3 étapes de synthèse (Schéma V. 6).

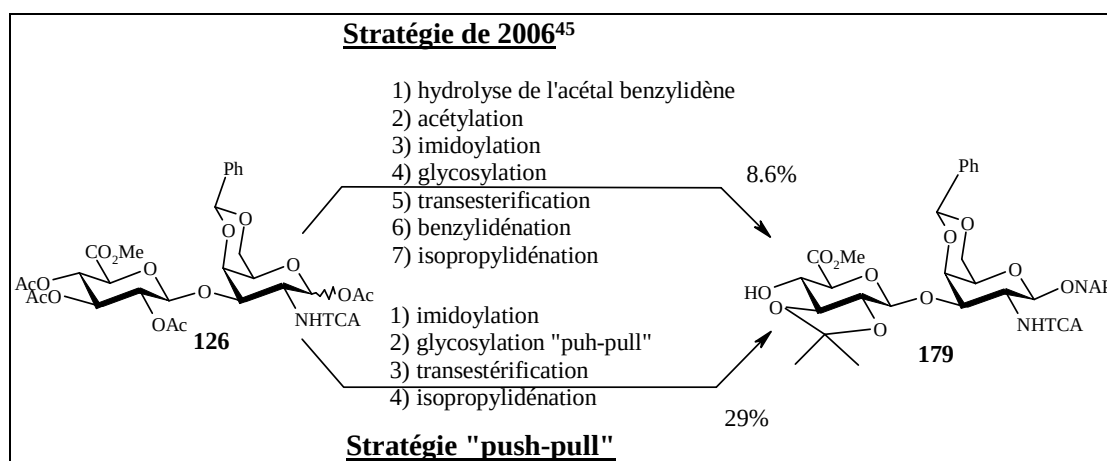


Schéma V. 6

Afin d'obtenir l'intermédiaire clé **100** désiré, l'hydroxyle libre en C-4' est ensuite lévulinoylé conduisant au composé **98** avec un bon rendement de 73%.

L'acétal isopropylidène est sélectivement hydrolysé en milieu acide acétique pendant 24 heures. Il en résulte le diol **181** avec 73% de rendement et une faible quantité de tétrol **180** provenant de l'hydrolyse des deux acétals. Ce dernier est facilement recyclé en réintroduisant l'acétal benzylidène, par du benzaldéhyde en présence de TFA pendant 3 heures à température ambiante. Le diol **181** a été utilisé comme précurseur commun à la synthèse d'oligosaccharides de CSA, CSC, CSD, CSE, CSK, CSL et CSM⁷⁹.

Les deux hydroxyles libres sont benzoylés par du chlorure de benzoyle dans la pyridine et le dichlorométhane. L'intermédiaire clé **100** est préparé avec un rendement de 72% (Schéma V. 7).

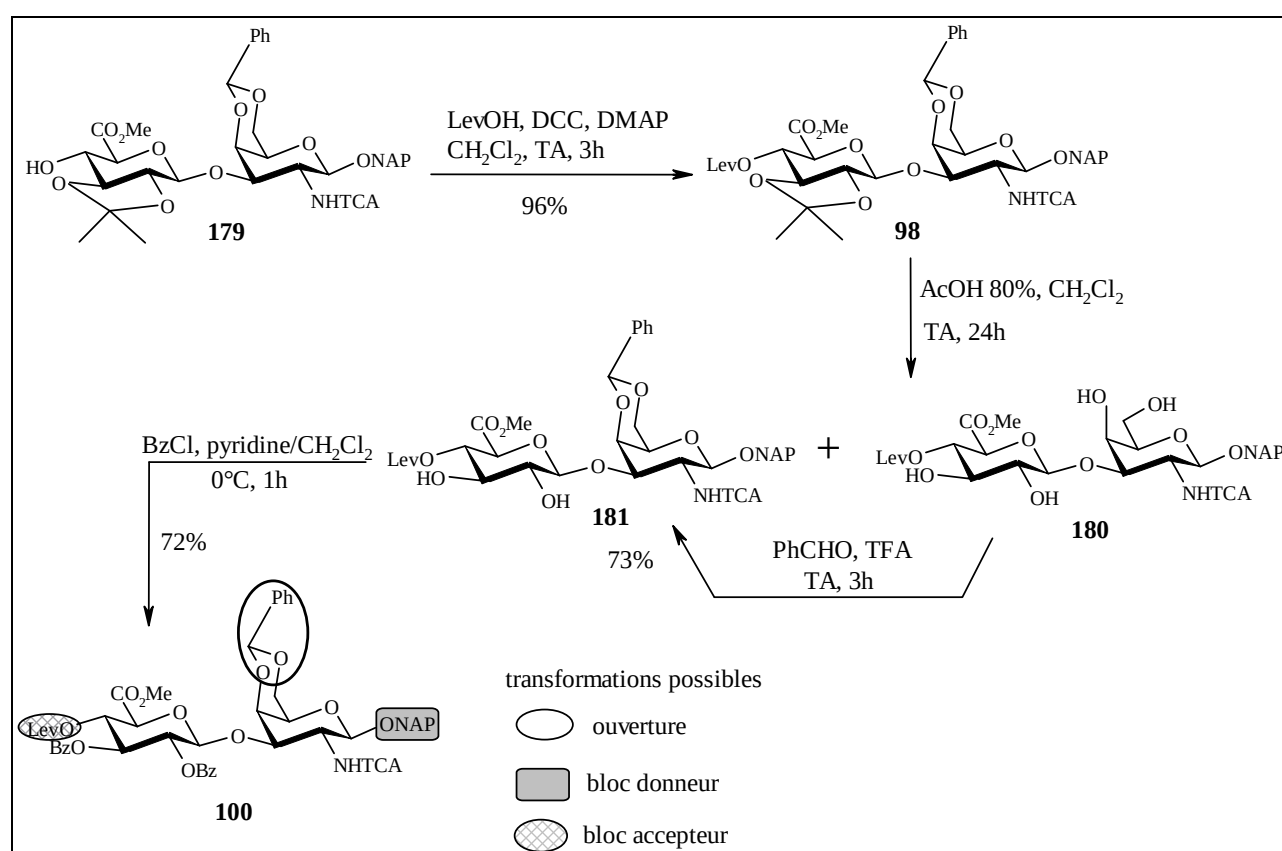


Schéma V. 7

Ce précurseur clé **100** présente trois groupements sélectifs pouvant donner lieu à :

- Un bloc donneur après déprotection du 2-naphtylméthyle
- Un bloc accepteur après délévulinoylation
- Une divergence vers la synthèse des composés 4-sulfatés ou 6-sulfatés grâce à l'acétal benzylidène

⁷⁹ Jacquinet J.-C.; Lopin-Bon C.; Vibert A. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 9579-9595

L'intermédiaire **100** permet d'accéder rapidement (une étape) à un accepteur possédant l'acétal benzylidène. Cet accepteur nous donne la possibilité de tester la glycosylation « push-pull » entre ce dernier et le trichloroacétimide **173** pour former un tétrasaccharide.

L'accepteur disaccharidique est préparé à partir du composé **100** par délévulinoxylation dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. L'accepteur attendu **183** est obtenu avec un rendement de 94% (Schéma V. 8).

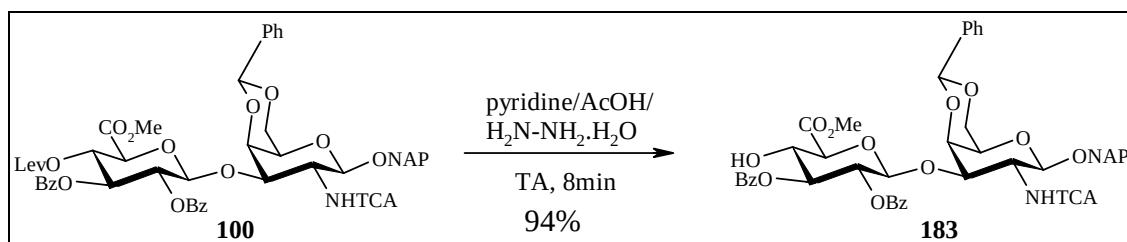


Schéma V. 8

V-1.4 Synthèse du tétrasaccharide : Glycosylation « push-pull »

Le premier essai de glycosylation a été réalisé dans les conditions « push-pull », à savoir avec le trichloroacétimide **173** dans le dichlorométhane, en présence de BF₃.Et₂O (Schéma V. 9). Aucun produit de couplage n'est formé (entrée 1 du Tableau V. 1) et de l'accepteur de départ **183** est observé. Cet accepteur **183** n'étant pas très soluble dans le dichlorométhane, nous avons essayé d'ajouter de l'acétonitrile (entrée 2 du Tableau V. 1). Dans le mélange de solvants dichlorométhane/acétonitrile, l'accepteur avait l'air soluble à l'œil nu, mais à nouveau, le tétrasaccharide désiré **185** n'est pas obtenu et de l'accepteur de départ est isolé.

Afin de savoir si les problèmes de couplage proviennent uniquement de l'accepteur benzylidène, nous avons testé sa réactivité en le glycosylant avec le trichloroacétimide **88** dans le mélange dichlorométhane/acétonitrile avec le TMSOTf comme catalyseur (entrée 3 du Tableau V. 1). Cet essai a conduit au tétrasaccharide **184** avec 11% de rendement (Schéma V. 9) et du produit de départ est à nouveau trouvé. La formation du tétrasaccharide est prouvée par RMN (présence notamment de deux singulets correspondants aux groupements méthyle des deux unités D-GlcA) et par spectrométrie de masse où une masse $m/z = 1659,2$ correspondante au $[M]^+$ a été détectée.

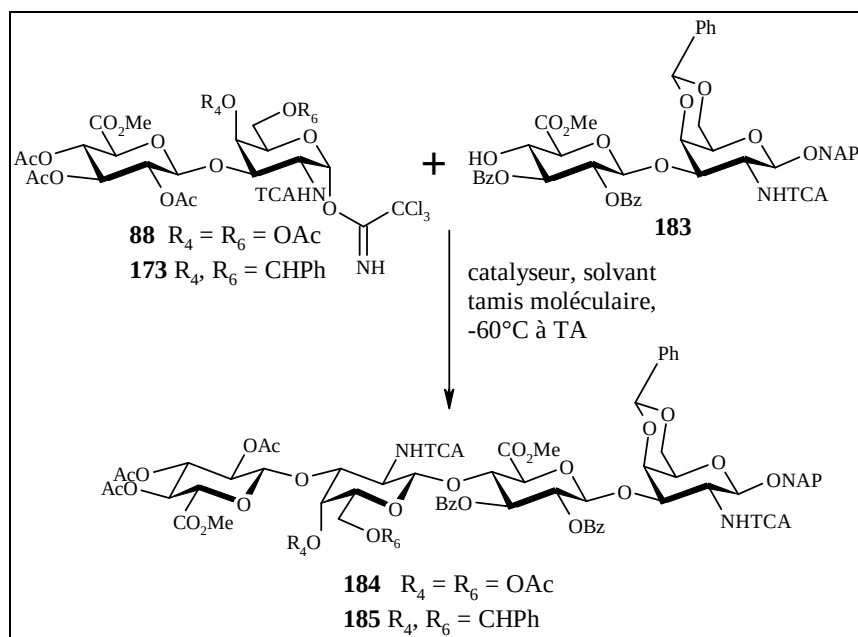


Schéma V. 9

	Trichloroacétimide	Solvant	Catalyseur	Rendement	Produit de départ
1	173	CH_2Cl_2	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	/	oui
2	173	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACN}$	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	/	oui
3	88	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACN}$	TMSOTf	11%	oui

Tableau V. 1

Suite à ces résultats décevants et connaissant la faible solubilité des composés en série aminoéthylbenzyloxycarbonyl, la préparation de l'accepteur correspondant **VII** (Schéma V. 1) n'a pas été réalisée.

Dans le but de synthétiser des oligosaccharides sulfatés, nous avons choisi une autre voie de synthèse, où les précurseurs de glycosylation (blocs donneurs et accepteurs) sont déjà sélectivement protégés avant les étapes de couplages, selon qu'ils conduisent aux composés 4- ou 6-sulfatés.

V-2 SECONDE STRATEGIE

Dans cette deuxième stratégie, les disaccharides clés possèdent déjà une protection orthogonale sur la future position sulfatée avant les étapes d'élongation.

Dans la rétrosynthèse envisagée, les oligosaccharides 4-sulfatés ou 6-sulfatés biotinylés **IV** seront obtenus à partir d'oligosaccharides de mêmes tailles totalement protégés **V**, qui posséderont sur la future position sulfatée une protection orthogonale : un ester chloroacétate. Ces composés seront obtenus après le couplage entre les blocs clés **188** et **186** ou **187**. Le précurseur de ces blocs clés sera le composé **100** préparé dans le chapitre V-1 à partir du bloc **173**.

Les dissaccharides sulfatés finaux **189a** et **189b** proviendront directement de ce bloc donneur **173** (Schéma V. 10).

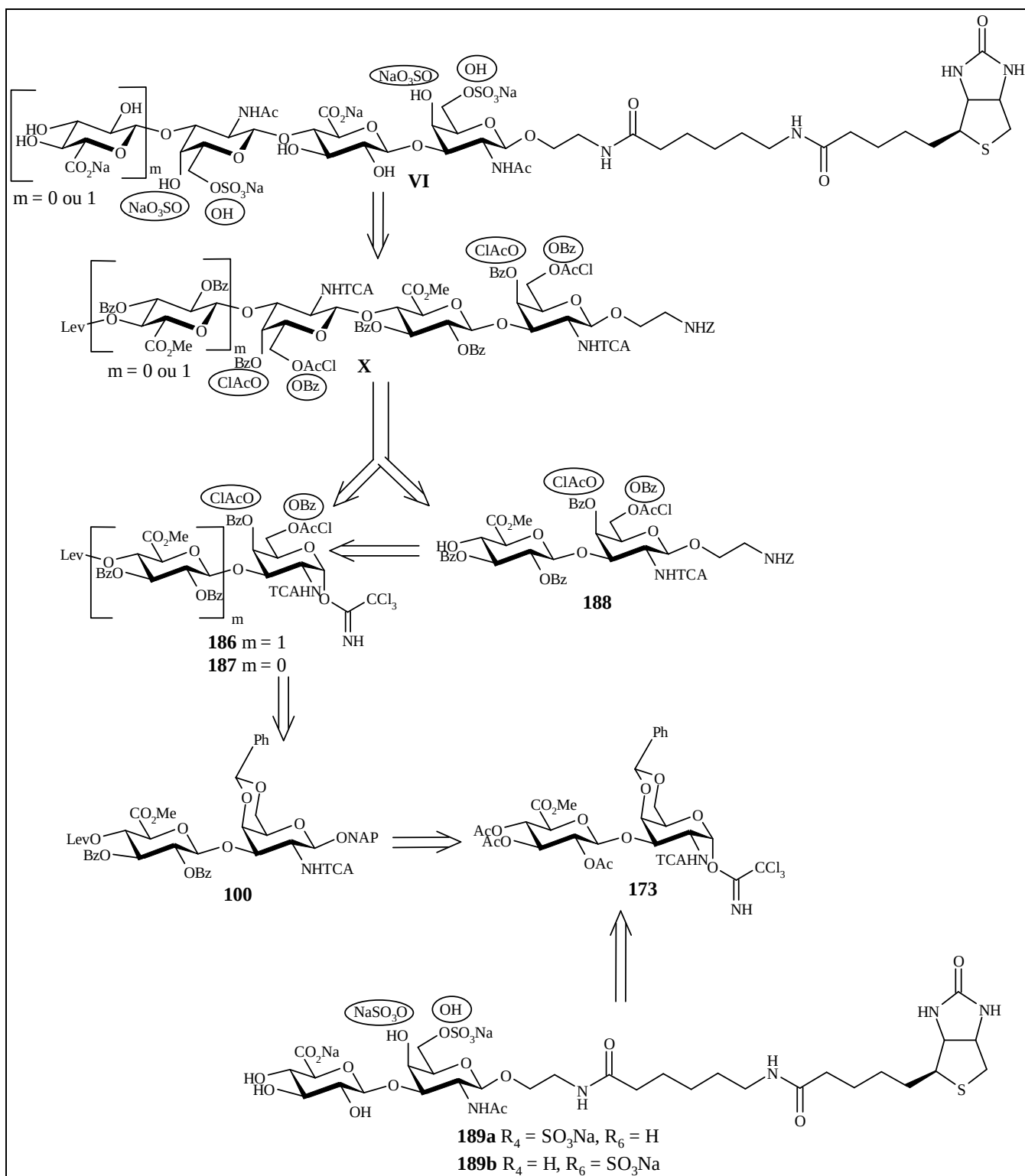


Schéma V. 10

V-2.1 Stratégie divergente utilisant l'acétal benzyldène

Afin d'introduire une protection sélective sur la future position sulfatée, différentes méthodologies ont été envisagées utilisant l'acétal benzyldène.

a. Ouverture de l'acétal benzyldène

De nombreux travaux décrits dans la littérature font office d'ouvertures régiosélectives réductrices d'acétals 4,6-O-benzyldène, permettant d'aboutir, selon les conditions, à un composé protégé sélectivement en C-6 par un éther benzylique et possédant un hydroxyle libre en C-4 ou inversement protégé en 4 et libre en 6 (Schéma V. 11).

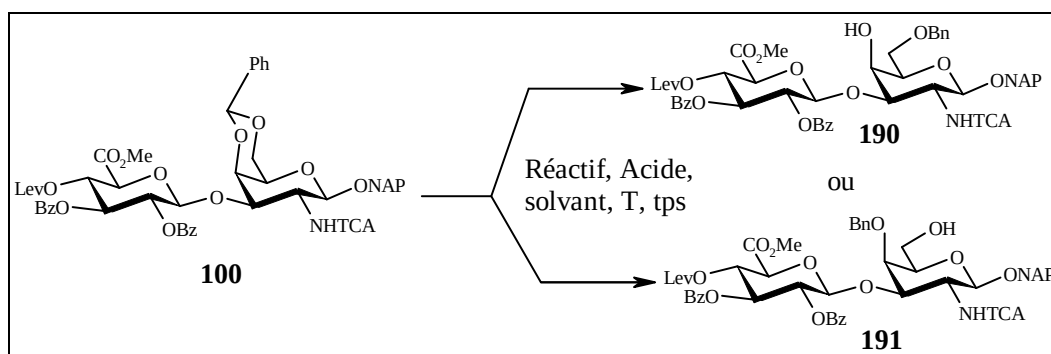


Schéma V. 11

Dans notre cas, désirant synthétiser les composés 4-sulfatés et les composés 6-sulfatés, nous nous sommes intéressés aux deux types d'ouvertures. Les essais ont été réalisés, dans un premier temps, sur le composé **100** précédemment synthétisé (Schéma V. 7).

➤ Ouverture en position 6 (composé **190**) :

L'ouverture en position 6 avait déjà été réalisée au laboratoire sur un résidu monomérique de D-Galactose, par du Et_3SiH en présence de TFA⁸⁰. Dans notre cas (entrées 1 et 2 du Tableau V. 2), nous avons obtenu beaucoup de produit d'hydrolyse (55% de diol 4,6) et seulement 10% de produit d'ouverture 6-O-benzyle **190**. Observant la quantité de diol formé, nous avons pensé que la protonation par du TFA pouvait avoir lieu, mais par un manque de réactivité de Et_3SiH , le produit d'hydrolyse apparaîtrait au moment du traitement aqueux. Nous avons alors testé un hydrure plus réactif : NaBH_3CN .

Dans la littérature, l'utilisation du NaBH_3CN avec du TFA sur un D-Gal a donné de bons rendements⁸¹. Sur notre composé (entrée 3 du Tableau V. 2), aucun produit d'ouverture ni de produit de départ n'ont été isolés. Par contre, d'autres composés ont été remarqués, tous possédant l'acétal benzyldène mais ayant perdu le groupement lévulinoylé. Par conséquent, l'hydroxyle en C-4' est déprotégé par NaBH_3CN .

NaBH_3CN associé avec HCl est la méthodologie la plus couramment utilisée⁸², mais elle n'est donc pas applicable à nos produits lévulinoylés. Nos tentatives d'ouverture ont été

⁸⁰ Barroca N.; Jacquinot J.-C. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 329, 667-679

⁸¹ Johansson R.; Samuelsson B. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1984**, 201-202

⁸² Garreg P. J.; Hultberg H.; Wallin S. *Carbohydr. Res.*, **1982**, 108, 97-101

restreintes par ce groupement lévulinoylé clivable par les hydrures. Les réactifs type LiAlH_4 , DIBAL, $\text{BH}_3\cdot\text{NMe}_3$ ont été proscrits eux-aussi.

Deux publications^{83,84} précisent que les conditions $\text{Et}_3\text{SiH}/\text{TFA}$ ne fonctionnent pas sur un résidu de D-Gal, mais par contre, ils montrent l'ouverture avec de l'acide triflique (TfOH) en remplacement du TFA⁸⁴. Dans notre cas, il a été impossible de déterminer les produits de la réaction (entrée 4 du Tableau V. 2).

Nous avons en dernier recours tenté de remplacer l'acide par un acide de Lewis, le $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$. En présence de Et_3SiH et sur un disaccharide composé d'une unité D-Gal possédant un acétal benzylidène, l'ouverture réductrice est décrite avec 73% de rendement⁸⁵. Dans le cas de notre substrat **180**, nous n'avons pas pu déterminer la structure exacte des produits, mais il n'apparaît de produit résultant de l'ouverture sur aucun d'entre eux (entrée 5 du Tableau V. 2).

	Réactif	Nb éq	Acide	Nb éq	Solvant	Conditions	Produit de départ	Résultats
1	Et_3SiH	5eq	TFA	5eq	CH_2Cl_2	1h à 0°C puis 24h à TA	Oui	diol 4,6
2	Et_3SiH	10eq	TFA	5eq	CH_2Cl_2	24h à TA	Oui 8%	diol 4,6 (55%) ouverture 6-OBn (10%)
3	NaBH_3CN	10eq	TFA	2eq	THF	5h30 à 0°C	nd	délévulinoylation
4	Et_3SiH	5eq	TfOH 0.16M	1eq	CH_2Cl_2	1h30 à 0°C	nd	nd
5	Et_3SiH	12eq	$\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$	2eq	CH_2Cl_2	24h à TA	nd	nd

Tableau V. 2

Nos essais ayant été restreints par le groupement lévulinoylé, nous avons tenté d'ouvrir l'acétal benzylidène du composé **169**, qui n'en possède pas. Après 6h30 à 0°C, en présence de NaBH_3CN et de TFA, aucune réaction n'a eu lieu, seul le produit de départ est retrouvé (Schéma IV. 10).

Ces conditions ne permettent donc pas d'ouvrir l'acétal benzylidène.

Un essai avec Et_3SiH et TFA conduit à 17% du produit d'ouverture **169'** et 66% de diol issu de l'hydrolyse. L'ouverture en conditions Et_3SiH et TFA, quel que soit le disaccharide, ne donne pas le résultat attendu.

⁸³ DeNinno M. P.; Etienne J. B.; Duplantier K. C. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 669-672

⁸⁴ Sakagami M.; Hamana H. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 5547-5551

⁸⁵ Debenham S. D.; Toone E. J. *Tetrahedron Asym.*, **2000**, 11, 385-387

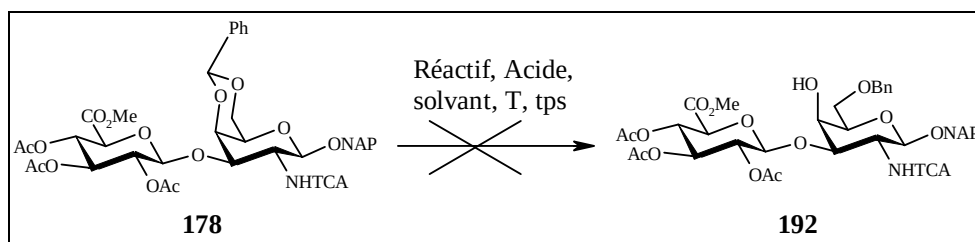


Schéma V. 12

➤ Ouverture en position 4 (Composé **191**):

En 2003⁸⁶, l'équipe de D. Bonnaffé montre l'ouverture régiosélective en 4 d'un acétal 4,6-*O*-paraméthoxybenzylidène sur un résidu D-Glc, ouverture utilisant Et₃SiH et PhBCl₂ développée en 2004⁸⁷. Nous avons alors essayé ces conditions sur le composé **100**, malheureusement le PhBCl₂ s'avère être un acide de Lewis trop fort qui permettrait une assistance pour le départ du groupement lévulinoylé, les composés obtenus étant tous délévulinoylés (entrée 1 du Tableau V. 3). Pour le confirmer nous avons testé la stabilité du groupement lévulinoylé dans ces mêmes conditions sur un monomère protégé par des esters benzoates et possédant un ester lévulinate. Ce dernier est effectivement clivé.

En essayant ces mêmes conditions sur le composé **178** (non lévulinoylé), les produits en résultant n'ont pas pu être identifiés.

Reprenant l'ouverture de l'acétal benzylidène du composé **100**, nous avons ensuite remplacé l'acide de Lewis par le TMSOTf^{88,89}. Quel que soit le nombre d'équivalents d'acide de Lewis, nous n'avons obtenu que de la dégradation et n'avons pu déterminer les produits obtenus (entrées 2, 3 et 4 du Tableau V. 3).

	Réactif	Nb éq	Acide	Nb éq	Solvant	Conditions	Produit de départ	Résultats
1	Et ₃ SiH	5eq	PhBCl ₂	3.4eq	CH ₂ Cl ₂	4h à -78°C	non	délévulinoylation
2	Et ₃ SiH	5eq	TMSOTf	3eq	CH ₂ Cl ₂	45min à 0°C puis 2h à TA	nd	nd
3	Et ₃ SiH	5eq	TMSOTf	1eq	CH ₂ Cl ₂	1h à 0°C puis 1h à TA	nd	nd
4	Et ₃ SiH	5eq	TMSOTf	0.25eq	CH ₂ Cl ₂	1h à 0°C puis 3h à TA	nd	nd

Tableau V. 3

⁸⁶ Gavard O.; Hersant Y.; Alais J.; Duverger V.; Dilhas A.; Bascou A.; Bonnaffé D. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 3603-3620

⁸⁷ Dilhas A.; Bonnaffé D. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 3643-3645

⁸⁸ Jiang L.; Chan T. H. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 355-358

⁸⁹ Jonke S.; Liu K.-G.; Schmidt R. R. *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 1274-1290

Toutes nos tentatives d'ouvertures réductrices régiosélectives de l'acétal benzyldène ont échoué. Une autre stratégie partant d'un précurseur commun et qui mène à la divergence recherchée : un composé 4-hydroxylé et un 6-hydroxylé a alors été mise en place.

b. Stratégie de l'orthoester

Notre but était de construire une synthèse pouvant diverger soit vers la voie des composés 4-sulfatés, soit vers celle des composés 6-sulfatés à partir d'un précurseur commun. La stratégie d'ouverture de l'acétal benzyldène ayant été vaine, nous nous sommes penchés sur une voie de synthèse nous permettant d'obtenir en une seule et même étape cette diversité.

Pour commencer, l'acétal benzyldène de l'intermédiaire **100** est hydrolysé par du TFA à 80%, pour conduire au diol 4,6 correspondant **193** avec un rendement de 84%.

Par la suite, ce diol est mis en présence du triméthylorthobenzoate et d'ACS. Le milieu réactionnel est neutralisé avec de la triéthylamine pour donner un unique orthoester intermédiaire **194**, ce qui a été prouvé sur un disaccharide similaire (avec un ester chloroacétate en C-3')⁷⁹. Cet orthoester est ensuite hydrolysé en milieu acide acétique à 80% pour conduire à un mélange (de ratio 1 : 1) des produits **195a** et **195b**, séparables par colonne chromatographique, avec un rendement de 72% (Schéma V. 13).

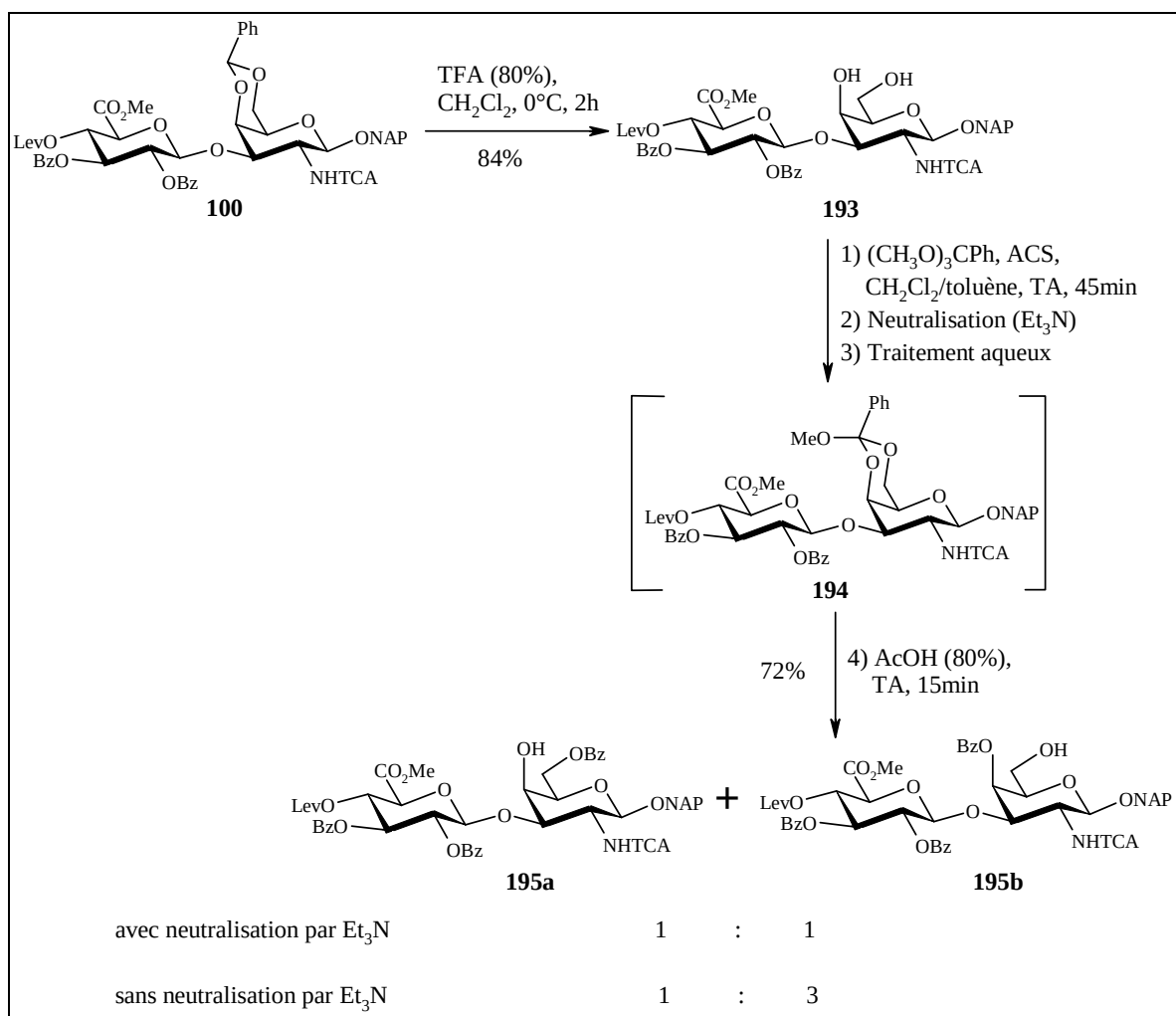


Schéma V. 13

Les produits **195a** et **195b**, sont caractérisés par RMN ^1H (voir Annexes 3 et 4 respectivement), et on peut ainsi remarquer l'influence des groupements benzoates sur les déplacements chimiques des protons.

	$\delta(\text{ppm})$ H-4	$\delta(\text{ppm})$ H-6
193	4.26	4.03 et 3.87
195a	4.32	4.63 (les 2)
195b	5.69	3.55 et 3.70

L'obtention de ces deux produits **195a** (4-hydroxylé) et **195b** (6-hydroxylé) à partir d'un même orthoester serait probablement due à la protonation respective de la position 4 et de la position 6.

Par ailleurs, nous avons pu remarquer que si le milieu était hydrolysé directement au cours du traitement aqueux, sans être préalablement neutralisé avec de la triéthylamine, ces deux mêmes composés étaient obtenus mais en proportions différentes (1 : 3). Nous avons donc supposé que l'encombrement stérique de l'acide utilisé, ou plus précisément son contre-ion, avait une influence. Ainsi, dans notre cas, si l'acide est de type acide acétique il protonnerait autant l'atome d'oxygène en position 4 que celui en position 6, alors que dans le cas d'un acide type ACS (avec un contre-ion plus encombré), il protonnerait majoritairement en position 6 d'où la formation majoritaire du composé **195b** (Schéma V. 13).

Cette stratégie divergente mise au point, les blocs clés **186**, **187** et **188** peuvent maintenant être préparés.

V-2.2 Synthèse des blocs clés accepteurs **188** et donneurs **186** et **187**

Comme évoqué lors de la stratégie rétrosynthétique (Schéma V. 10), la préparation préalable des intermédiaires **186**, **187** et **188** est nécessaire.

a. Synthèse des trichloroacétimides disaccharidiques lévulinoylés **186**

Par analogie avec la synthèse des composés non sulfatés, un trichloroacétimide élongateur de chaîne, c'est-à-dire possédant le groupement lévulinoyle en C-4' du D-GlcA, est préparé.

Les intermédiaires clés **195a** et **195b** ont été précédemment préparés grâce à l'orthoester (Schéma V. 19). Ils vont, à partir de maintenant, être engagés séparément dans les mêmes réactions chimiques, pour conduire aux mêmes types d'intermédiaires, mais protégés différemment selon qu'ils soient précurseurs de l'un ou l'autre type de sulfatation.

Les composés **195a** et **195b** présentent des hydroxyles libres non compatibles avec la suite des étapes de synthèse. Ces futures positions sulfatées sont par conséquent protégées par un groupement sélectif et orthogonal aux autres protections : un ester chloroacétate.

La chloroacétylation est réalisée par de l'anhydride chloroacétique, en présence de pyridine pour conduire aux composés **196a** et **196b** avec de très bons rendements.

La déprotection de la position anomérique par le DDQ suivie de l'imidoxylation donne les trichloroacétimidates **186a** et **186b** avec 66% et 73% de rendements respectifs (Schéma V. 14).

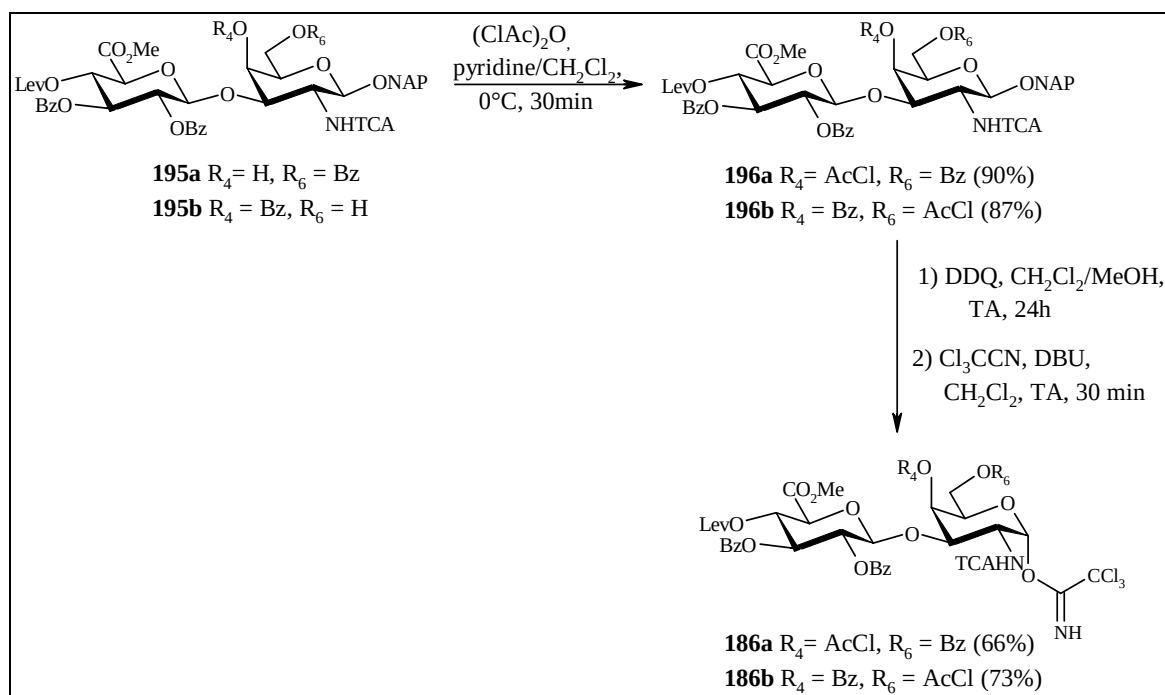


Schéma V. 14

b. Synthèse des disaccharides accepteurs 188

Les disaccharides accepteurs possédant, en position anomérique, l'amorce aminée protégée par le groupement benzyloxycarbonyle, sont ensuite préparés.

Les trichloroacétimidates **186a** et **186b** sont tout d'abord glycosylés avec le 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol pour conduire aux produits **197a** et **197b** avec 80% de rendements. Le groupement lévulinoyle est ensuite clivé pour permettre l'obtention des disaccharides accepteurs **188a** (78%) et **188b** (77%). La délévulinoylation en présence d'ester chloroacétates est réalisée en 3 minutes, évitant ainsi la perte de ces esters facilement labiles (Schéma V. 15).

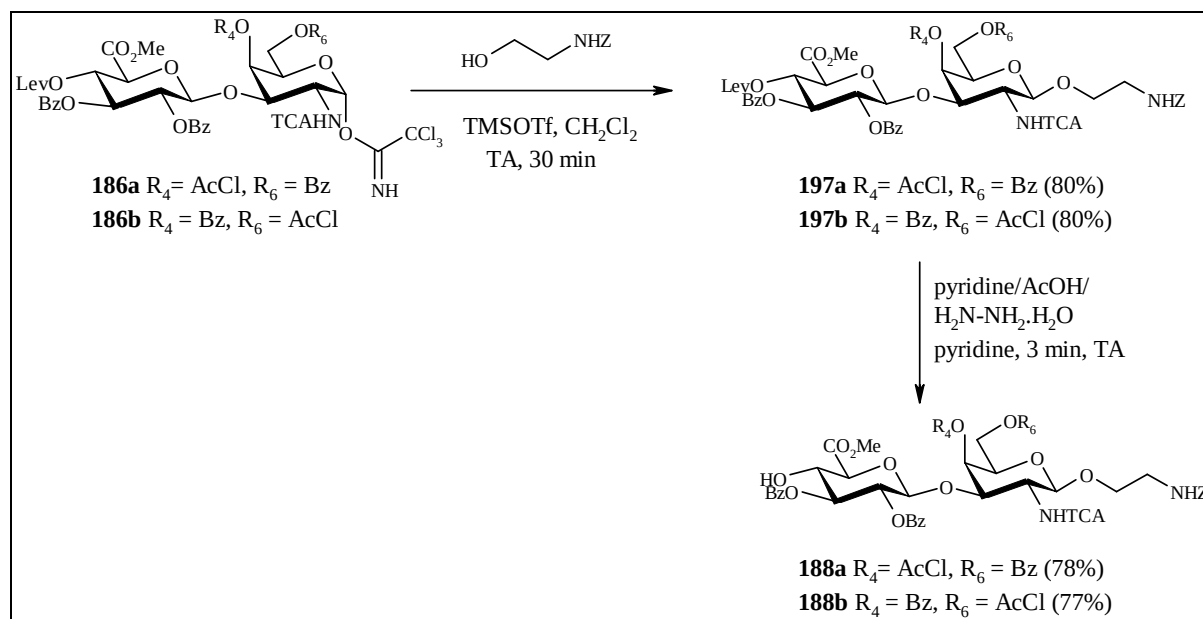


Schéma V. 15

La synthèse de motifs impairs requiert la préparation préalable de trichloroacétimides monomériques portant un ester chloroacétate soit en position 4 soit en position 6.

c. Synthèse des trichloroacétimides monomériques 187

Pour obtenir ces blocs donneurs monomériques, le monosaccharide **198** a été choisi comme produit de départ. Cette *N*-trichloroacétyl-D-galactosamine protégée sur la position anomérique par un groupement paraméthoxyphényle et sur les autres par des esters acétates avait déjà été préparée au laboratoire³⁶.

Les groupements acétates sont transestérifiés par du méthanolate de sodium en présence de méthanol, pour conduire au triol **199**³⁶. Les positions 4 et 6 sont ensuite protégées par un acétal isopropyliène.

La réaction, réalisée en présence d'ACS et de 2-méthoxypropène, mène au composé **200a** désiré (61%) mais aussi à l'autre isomère **200b** et à un mélange d'acétals mixtes. L'isomère 3,4-*O*-isopropylidène **200b** et les acétals mixtes sont hydrolysés par une résine acide, pour donner le triol **199**, qui peut à nouveau subir les mêmes conditions d'isopropylidénation et conduire à l'intermédiaire **200a** désiré. L'ensemble de ces manipulations permet l'obtention du produit 4,6-*O*-isopropylidène **200a** avec 85% de rendement (Schéma V. 16).

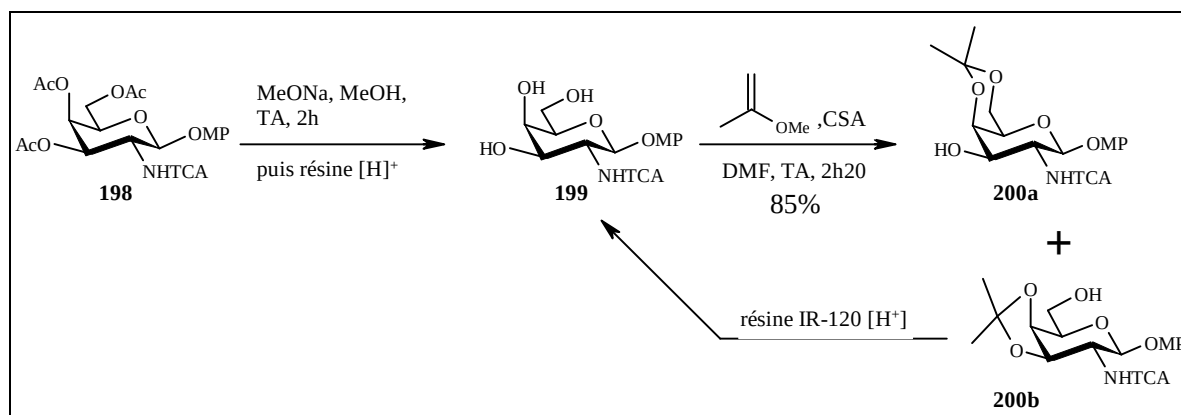


Schéma V. 16

L'hydroxyle libre en C-4 est ensuite benzoylé par du chlorure de benzoyle, le composé **201** résultant est préparé avec 99% de rendement. Une hydrolyse acide de l'acétal isopropylidène en milieu acétique donne le diol en positions 4 et 6 **202** avec un rendement de 85% (Schéma V. 16).

Nous avons ensuite essayé la stratégie de l'orthoester sur ce diol **202**. En suivant le protocole classique, c'est-à-dire avec neutralisation du milieu par de la triéthylamine, puis hydrolyse de l'orthoester intermédiaire, les composés **203a** et **203b** sont obtenus en proportion 3 : 1. Naturellement, nous désirions obtenir autant des deux composés afin de poursuivre la synthèse vers les trisaccharides. Ayant observé que la neutralisation par la triéthylamine avait une influence sur les proportions (Chapitre V-2. partie b), nous avons essayé le protocole sans neutralisation. Appliquée au diol monomérique **202**, cette méthodologie, a mené aux deux composés **203a** et **203b** en proportions 1 : 2. Quelle que soit la technique, le mélange de composés est obtenu avec de très bons rendements supérieurs à 90% (Schéma V. 17).

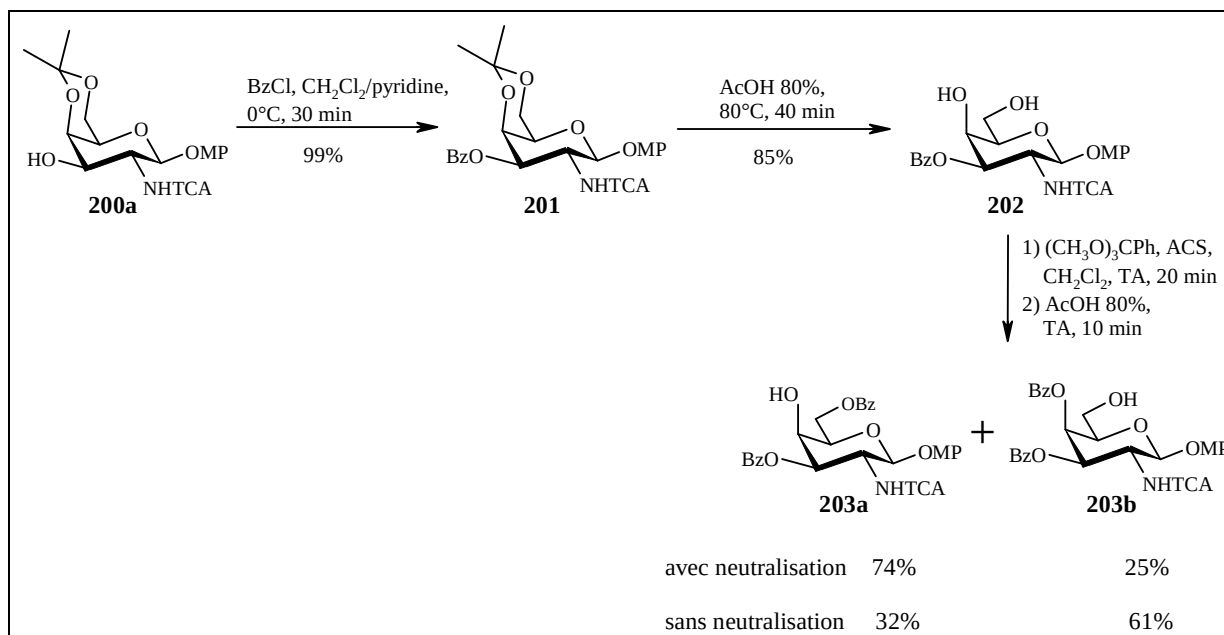


Schéma V. 17

Les hydroxyles libres sont ensuite chloroacétylés, par de l'anhydride chloroacétique donnant les composés **204a** et **204b** avec 88% et 80% de rendement respectivement.

Les groupements paraméthoxyphényle sont sélectivement déprotégés en présence de CAN en phase hétérogène toluène/acétonitrile/eau⁹⁰, le CAN n'étant pas soluble en phase organique. Les hémiacétals sont obtenus avec 72% et 73% de rendements. Les trichloroacétimidates sont préparés selon les mêmes conditions que celles décrites auparavant pour conduire aux molécules **187a** et **187b** avec de très bons rendements (Schéma V. 18).

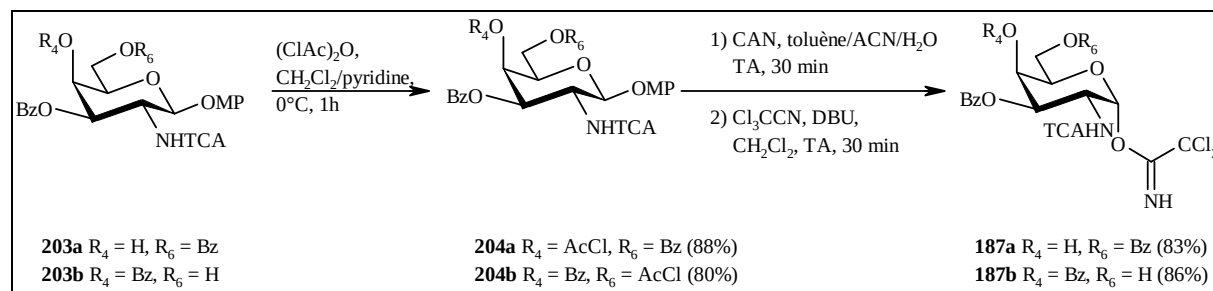


Schéma V. 18

Ces trichloroacétimidates monomériques **187a** et **187b** ont été obtenus après 8 étapes de synthèse à partir du précurseur acétylé **191**.

Les trois précurseurs clés **186**, **187** et **188** ayant été préparés, les oligosaccharides vont pouvoir être synthétisés.

V-2.3 Synthèses des oligosaccharides protégés

a. Synthèse des disaccharides protégés

Comme nous l'avons vu dans l'analyse rétrosynthétique, les disaccharides sulfatés biotinylés sont obtenus directement à partir du trichloroacétimidate **173** (Schéma V. 10). Nos essais de glycosylation « push-pull », ont conduit au disaccharide **177**, possédant en position anomérique l'amorce pour le couplage final avec la biotine (Schéma V. 4). Afin d'obtenir les disaccharides 4-hydroxylé et 6-hydroxylé désirés, nous avons tenté la stratégie divergente *via* l'orthoester intermédiaire.

Dans un premier temps, l'acétal benzylidène du composé **177**, est hydrolysé selon les mêmes conditions que celles décrites auparavant, pour mener au diol **205** avec un bon rendement de 79%.

Dans un deuxième temps, le diol est mis en réaction avec le triméthylorthobenzoate et l'ACS pour donner, après neutralisation avec de la triéthylamine, l'orthoester intermédiaire qui est ensuite hydrolysé par de l'acide acétique. Tout comme nous l'avons observé pour les produits précédents, les composés **206a** et **206b** sont préparés en quantité équimolaire, avec un très bon rendement de 85% (Schéma V. 19).

⁹⁰ Fukuyama T.; Laird A. A.; Hotchkiss L. M. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 6291-6292

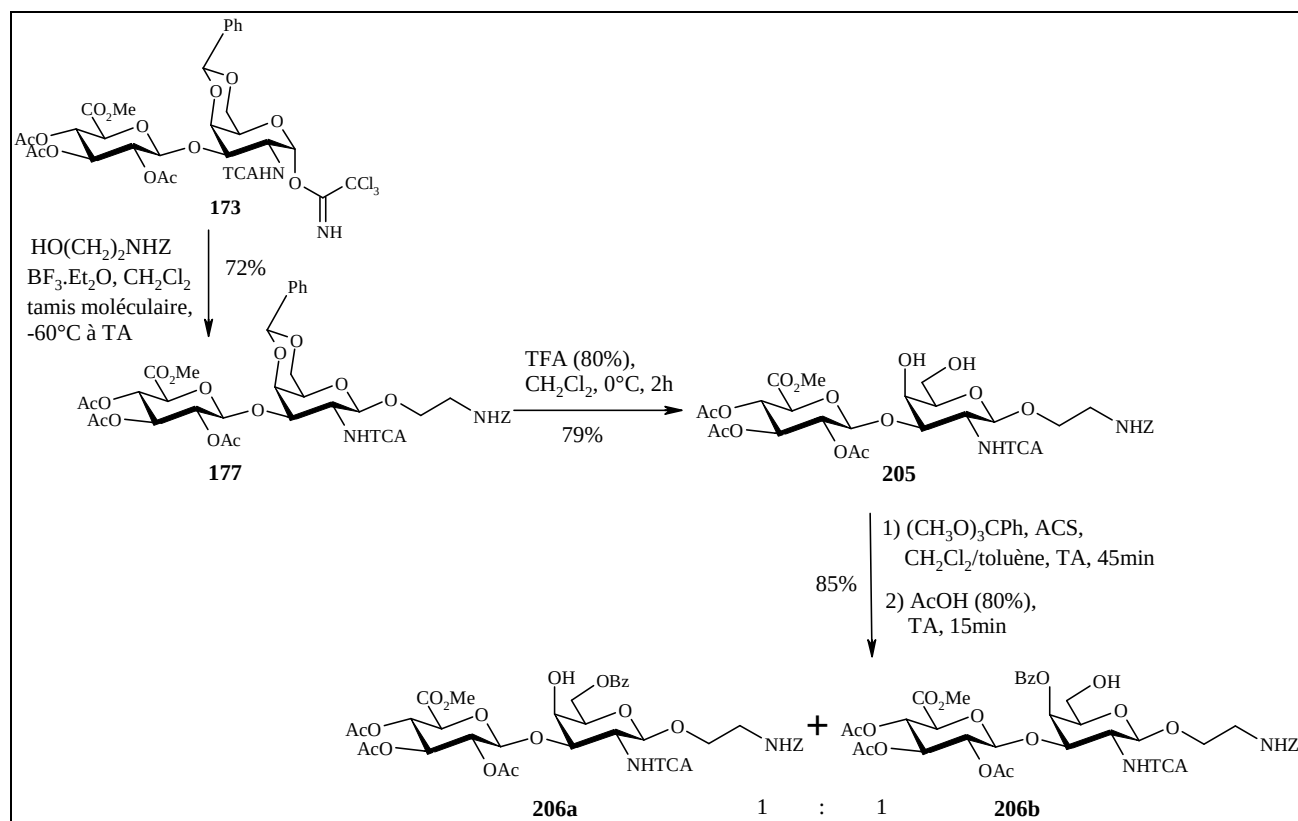
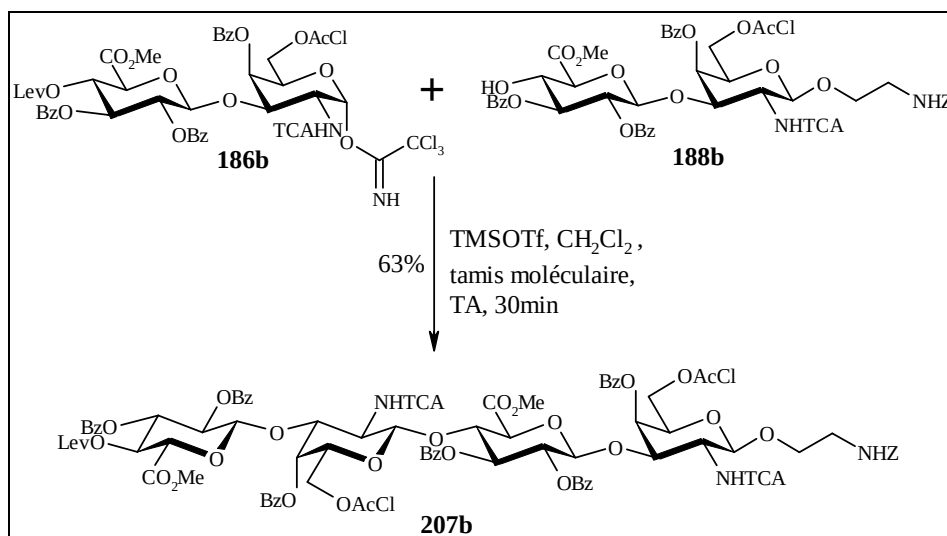


Schéma V. 19

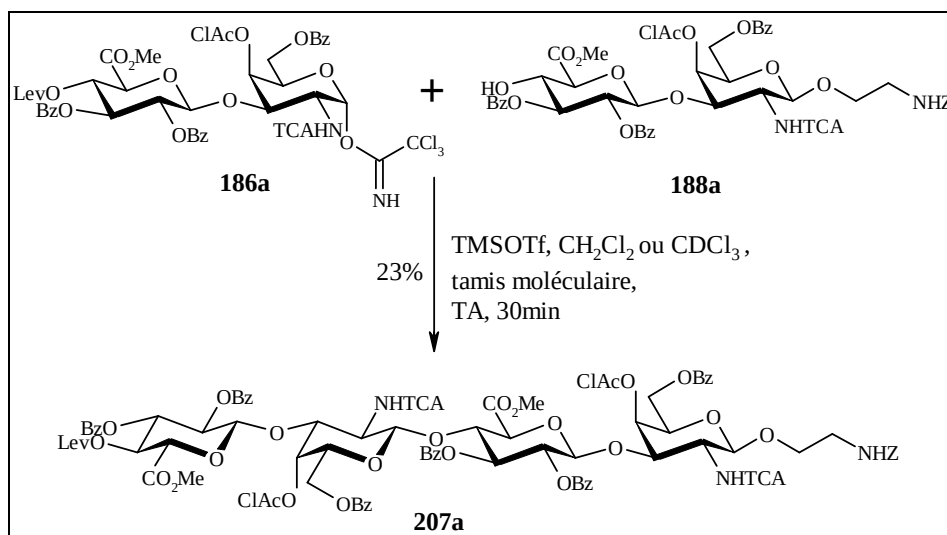
Nous avons ainsi démontré que cette technique utilisant l'orthoester fonctionne sur des disaccharides différents, en donnant les produits désirés en proportion équivalente et avec de bons rendements.

b. Synthèse des tétrasaccharides protégés

Afin de préparer le tétrasaccharide 6-chloroacétylé **207b**, le trichloroacétimide **186b** et le bloc accepteur **188b** sont couplés au moyen de TMSOTf (0,15eq) dans le dichlorométhane. Le tétrasaccharide 6-chloroacétylé **207b** désiré est synthétisé avec 67% de rendement (Schéma V. 20).



En ce qui concerne la synthèse de son analogue 4-chloroacétylé dans les mêmes conditions, le tétrasaccharide **207a** est obtenu avec un rendement de 23% (Schéma V. 21).



Le faible rendement de glycosylation obtenu avec l'accepteur **188a** est certainement dû à sa très mauvaise solubilité (entrée 1 du Tableau V. 4).

Nous avons alors essayé d'effectuer la réaction dans le chloroforme et le tétrasaccharide est préparé avec un rendement de 31% (entrée 2 du Tableau V. 4).

En augmentant la quantité de triflate de triméthylsilyle la réaction conduit au composé désiré avec 41% de rendement (entrée 3 du Tableau V. 4).

Pour chacun de ces essais 30 à 40% d'accepteur de départ sont retrouvés (Tableau V. 4).

	Produit de départ	TMSOTf (nb équivalents)	Solvant	Conversion	Rendement
1	188a	0,15 eq	CH ₂ Cl ₂	67%	23%
2	188a	0,15 eq	CDCl ₃	62%	31%
3	188a	0,20 eq	CDCl ₃	70%	41%

Tableau V. 4

Avant de pouvoir réduire les groupements trichloroacétyl en groupements acétyl, la déprotection des esters chloroacétate doit être préalablement réalisée. En effet, en milieu *n*-Bu₃SnH et AIBN, ces derniers risqueraient d'être réduits en esters acétates et par conséquent, seraient difficilement différenciables des autres esters (benzoate, lévulinate).

c. Déchloroacétylation

Les esters chloroacétates sont sélectivement déprotégés par la thiourée dans un mélange de pyridine et d'éthanol⁹¹. La réaction est réalisée à 80°C pendant 4h30 pour le 4-chloroacétate et 3 heures pour le 6-chloroacétate. Cette déprotection conduit aux tétrasaccharides **208a** et **208b** avec 84% et 77% de rendements respectivement.

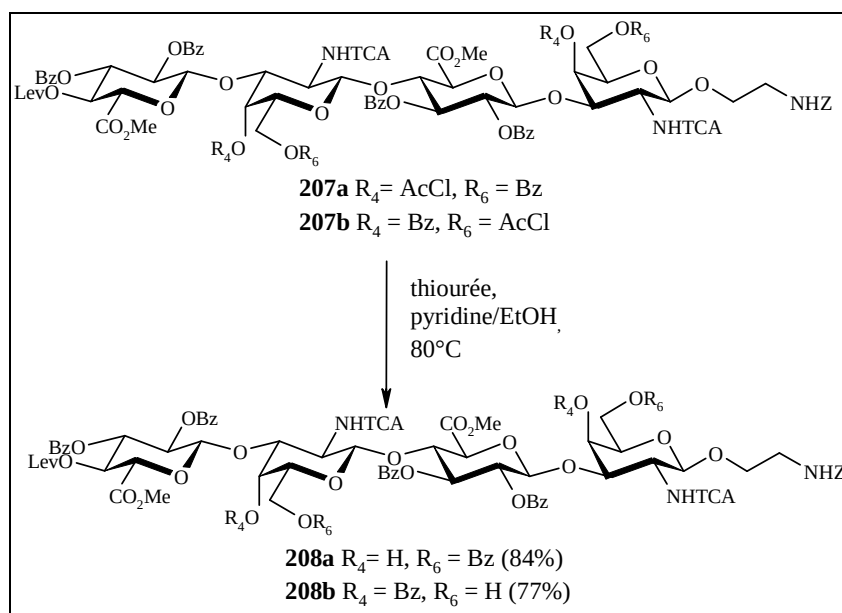


Schéma IV. 33

⁹¹ Naruto M.; Ohno K.; Naruse N.; Takeushi H. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 251-254

d. Synthèse des trisaccharides protégés

Pour préparer les trisaccharides, les disaccharides accepteurs **188a** et **188b** précédemment obtenus (Schéma V. 15) sont glycosylés avec les trichloroacétimidates **187a** et **187b** selon les conditions de glycosylation décrites précédemment (0.20eq de TMSOTf). Les trisaccharides **209a** et **209b** sont obtenus avec 66% et 53% de rendements. Pour des raisons de solubilité, la glycosylation avec l'accepteur **188a** est réalisée dans le chloroforme.

Ces derniers sont ensuite déchloroacétylés par la thiourée pour donner les composés **210a** (73%) et **210b** (85%) (Schéma V. 22).

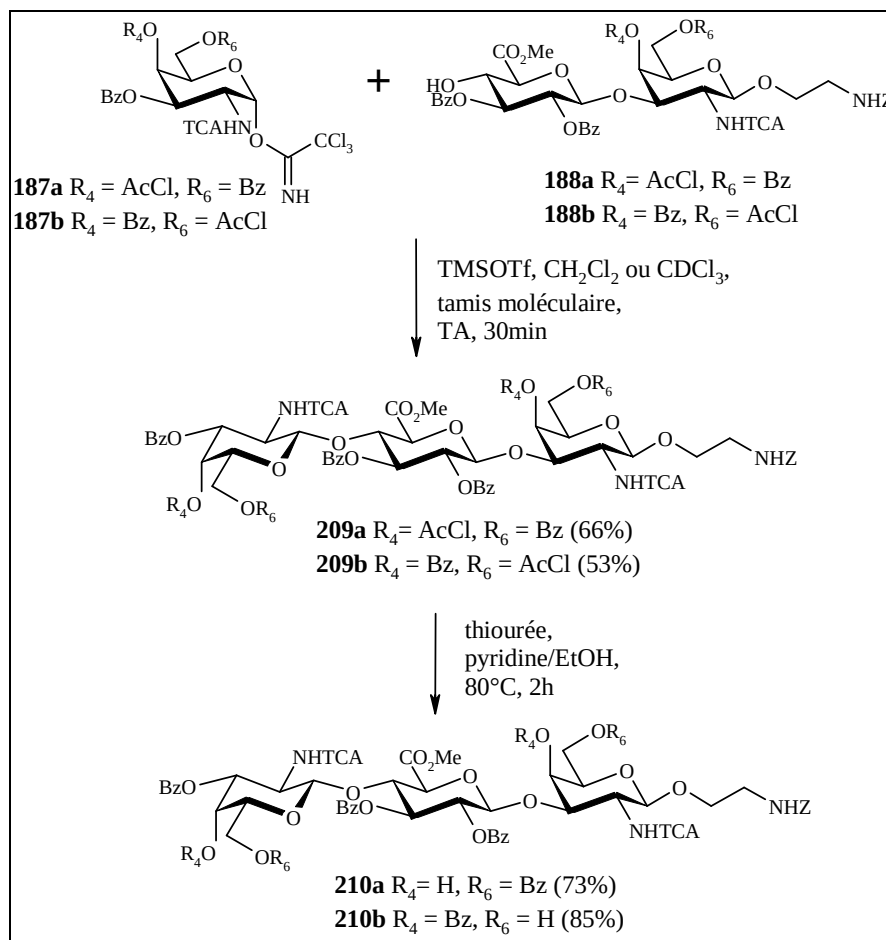


Schéma V. 22

V-2.5 Réduction des groupements N-trichloroacétyle

a. Disaccharides

Les groupements trichloroacétyle des deux disaccharides **206a** et **206b** sont réduits en groupements acétyle selon la méthode mise au point au chapitre IV-7.1. Les composés sont dissous dans un mélange de benzène et de *N,N*-diméthylacétamide et des ajouts séquentiels de *n*-Bu₃SnH et d'AIBN sont effectués. Les molécules *N*-acétylées **211a** et **211b** sont obtenues avec de bons rendements respectifs de 79% et 88% (Schéma V. 23).

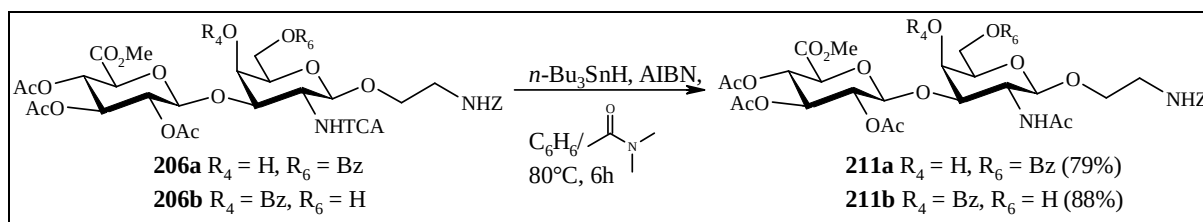


Schéma V. 23

b. Tétrasaccharides

Pour commencer, les trichloroacétamides des tétrasaccharides **207a** et **207b** sont réduits selon les conditions radicalaires décrites ci-dessus. Pour les deux produits ces conditions n'ont pas conduit aux composés totalement réduits. Nous avons essayé d'utiliser un pousse-seringue afin d'avoir en permanence des radicaux dans le milieu réactionnel, sans succès. En effet, par RMN ^1H , nous avons constaté la présence de CHCl_2 , CH_2Cl en accord avec la RMN ^{13}C qui montre des CH_2Cl (inversé en dept 135). Il n'est pas évident de l'assurer par la RMN, du fait du mélange de tous les produits. Par contre les analyses de spectrométrie de masse confirment la présence d'un mélange de produits sans atome de chlore ou possédant un, deux, trois ou quatre atomes de chlores. Il est impossible de déterminer où se situent ces chlores.

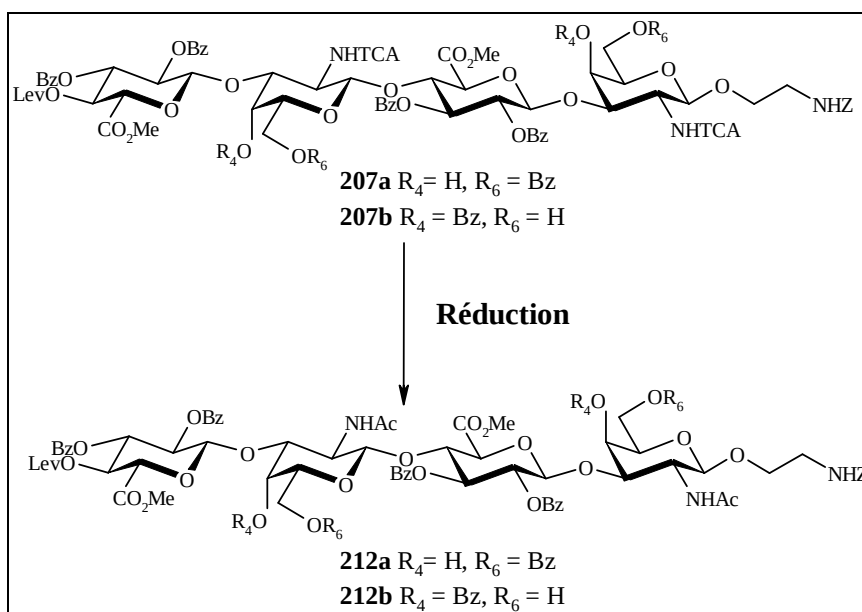


Schéma V. 24

Ces étapes de réduction sont très problématiques car extrêmement aléatoires. Il est impossible de prévoir si une structure sera réduite en une seule fois ou s'il sera nécessaire de la relancer dans les mêmes conditions et parfois même, remettre en solution n'aboutit pas aux composés totalement réduits. Nous avons cherché d'autres méthodologies de réduction applicables à nos molécules.

α. Déprotection en conditions basiques puis acétylation

Lors d'une synthèse d'acide hyaluronique parue en 2007, les auteurs utilisent la déprotection concomitante des esters (COOMe, OBz) et amides (NHTCA) suivie d'une acétylation pour obtenir les composés totalement déprotégés et *N*-acétylés⁹². La déprotection est réalisée par addition de l'hydroxyde de potassium 0,5M sur 48 heures puis agitation à température ambiante et l'acétylation par Ac₂O. Elle est appliquée à des oligosaccharides de différentes tailles en changeant le temps de réaction : 4 jours pour le trisaccharide, 7 jours pour le tétrasaccharide et 12 jours pour le pentasaccharide.

Nous avons alors décidé d'essayer nos conditions de saponification (NaOH 4M) à des composés *N*-trichloroacétylés puis d'y ajouter l'étape d'acétylation. Le suivi des réactions est effectué par CCM et révélation à la ninhydrine.

Le premier essai est effectué sur le dissaccharide **121b** (Figure V. 3) possédant la chaîne aminoéthylbenzyloxycarbonyle (entrée 1 du Tableau V. 5). Après 52 heures de saponification, 4 heures d'acétylation et une purification sur LH-20, seule une toute petite quantité de produits est récupérée, due à un problème de solubilité lors du passage sur résine. Nous n'avons alors pas pu déterminer les produits formés.

Le disaccharide **121b** est alors soumis, une nouvelle fois, aux conditions de saponification pendant 6 jours à température ambiante. Il est assez difficile de voir l'évolution de la saponification par suivi CCM. Après acétylation et analyse par RMN, on peut observer la présence de deux NHCOCH₃ et la disparition du groupement benzyloxycarbonyle (entrée 2 du Tableau V. 5). Lors de cet essai on constate que ce groupement n'est pas résistant dans ces conditions basiques. La molécule formée présente alors deux amines libres qui sont acétylées par la suite. L'avancement de cette saponification est trop difficile à suivre pour savoir à quel moment ce groupement benzyloxycarbonyle est clivé et par conséquent, non applicable sur nos molécules portant ce groupement.

Afin de vérifier la résistance du groupement benzyloxycarbonyle, un essai est effectuée sur le disaccharide totalement déprotégé **213** (Figure V. 3) possédant ce groupement benzyloxycarbonyle. Après 8 heures à 55°C, la perte du groupement est constatée (entrée 3 du Tableau V. 5). Les prochains essais se feront donc à nouveau à température ambiante.

Pour terminer, afin de déterminer si cette technique de saponification est tout de même applicable à un oligomère possédant plusieurs fonctions trichloroacétamides en dehors de la présence du groupement benzyloxycarbonyle, elle est réalisée sur un pentasaccharide **214** (Figure V. 3) possédant un groupement benzyle en position anomérique et trois trichloroacétamides. La saponification de ces trois groupements est encore une fois très difficile à contrôler par CCM. Après acétylation, purification et analyse, des mélanges de produits sont observés et il n'est pas aisé de distinguer s'il y a sur la molécule un, deux ou trois *N*-acétates.

⁹² Dinkelaar J.; Codée J. D. C.; Van den Bos L. J.; Overkleeft H. S.; Van der Marel G. A. *J Org. Chem.*, **2007**, 72, 5737-5742

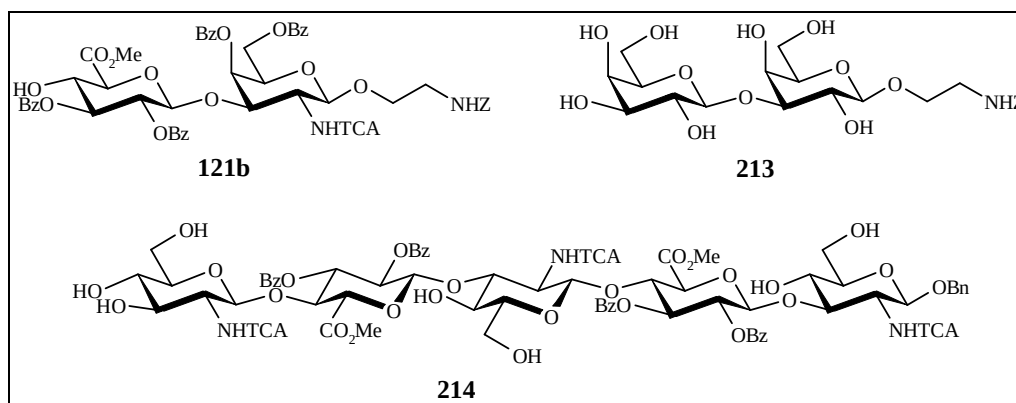


Figure V. 3

	Produit de départ	Conditions	Résultats
1	Disaccharide 121b	52h à TA	n.d.
2	Disaccharide 121b	6j à TA	2 NHAc
3	Disaccharide 213	8h à 55°C	Perte du NHZ
4	Pentasaccharide 214	12j à TA	n. d.

Tableau V. 5

En conclusion, cette technique n'est pas applicable à nos molécules, le groupement benzyloxycarbonyl étant clivé. De plus, nous avons pu constater qu'elle était difficilement envisageable avec plusieurs groupements *N*-trichloroacétyles.

β. Réduction en présence d'amalgame de Zn-Cu en milieu acide acétique

➤ Essais sur des disaccharides

Une synthèse publiée en 2007 montrait la réduction d'un trichloroacétamide sur un hexasaccharide portant un groupement benzyloxycarbonyl en position anomérique, par un amalgame de Zn-Cu en milieu acide acétique⁹³. Le protocole que nous avons suivi est le suivant⁹⁴ : les composés sont solubilisés dans l'acide acétique à 50°C sous flux d'argon et l'amalgame de Zn-Cu est ajouté par portions (cinq fois) toutes les heures, puis le milieu réactionnel est agité à 50°C. Une filtration sur célite permet de s'affranchir des résidus métalliques. Les composés sont analysés après une purification sur colonne chromatographique de silice.

Nous avons d'abord essayé ces conditions sur différents disaccharides.

Le disaccharide peracétylé **124** d'anométrie α est soumis à ces nouvelles conditions (entrée 1 du Tableau V. 6). Le disaccharide réduit est obtenu avec un rendement de 95%.

Le deuxième essai a été réalisé sur le disaccharide **131** possédant le 2-naphtylméthyle. Le composé réduit est obtenu avec un rendement de 77% (entrée 2 du Tableau V. 6).

⁹³ Hanashima S.; Castagner B.; Esposito D.; Nokami T.; Seeberger P. H. *Org. Lett.*, **2007**, 9, 1777-1779

⁹⁴ El-Abadla N. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 699-722

Encouragés par ces résultats, nous avons choisi de tester ces conditions sur le composé **121b** possédant la chaîne aminoéthylbenzyloxycarbonyle et un hydroxyle libre en C-4'. La réduction a très bien fonctionné avec 98% de rendement (entrée 3 du Tableau V. 6).

Par la suite, nous avons procédé à un essai sur très petite quantité du diol **193** possédant un groupement lévulinoyle (entrée 4 du Tableau V. 6). Le produit majoritairement formé était assez inattendu car il s'agit en fait du disaccharide *N*-acétylé mais sous forme furanique **216**! (Schéma V. 25)

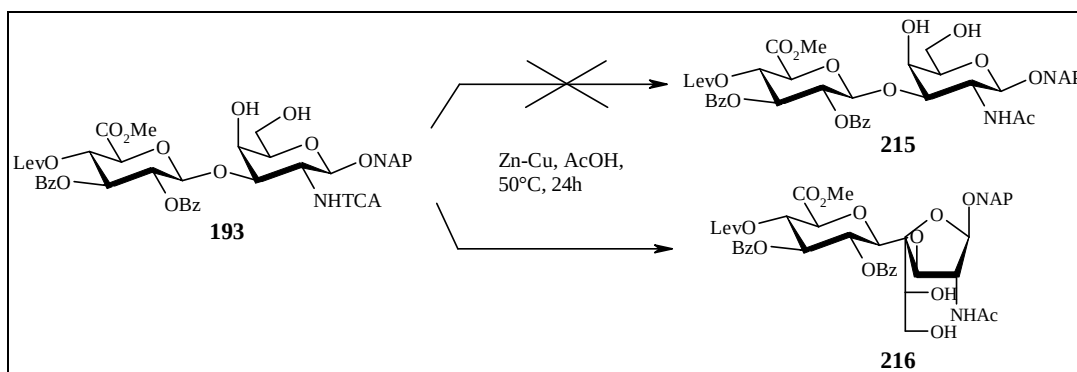


Schéma V. 25

La réduction du groupement *N*-trichloroacétyle a été prouvée par RMN (présence du NHCOCH_3) et par masse (m/z 880.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Ce genre de réarrangement avec un substrat glycoside (non réducteur) avait déjà été observé au laboratoire au cours de la thèse de Nathalie Karst^{41,95}. Il peut être expliqué par la présence d'un acide de Lewis (sels de zinc) qui favoriserait l'ouverture du cycle pyranique en formant un ion oxonium. Dans le cas d'une unité D-Gal avec un hydroxyle axial libre en position 4, la fermeture est favorisée par l'attaque de cet hydroxyle formant un cycle furanique **216** (Schéma V. 26).

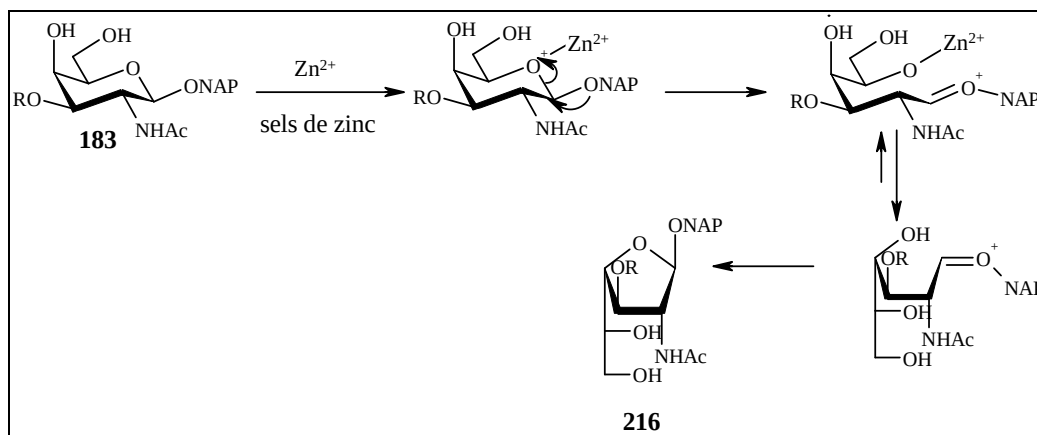


Schéma V. 26

Nous désirions ensuite comparer avec un diol possédant la chaîne aminoéthylbenzyloxycarbonyle sur sa position anomérique (entrée 5 du Tableau V. 6). Par manque de produit, nous avons pris une toute petite quantité de l'intermédiaire **205** et après 24 heures nous avons pu observer par CCM plusieurs tâches indiquant la présence de plusieurs produits et donc une manipulation difficile lorsqu'un diol est substrat.

⁹⁵ Thèse de Nathalie Karst, Université d'Orléans, 2001

Le composé monohydroxylé en position 4 **195a** est ensuite soumis aux mêmes conditions de réduction (entrée 6 du Tableau V. 6). On peut alors noter que le cycle furanique est formé mais en quantité moindre, très certainement due à la présence du groupement benzoate en position 6, assez encombré stériquement, pour limiter le réarrangement.

En suivant l'avancement de la réaction, nous avons réussi à obtenir le disaccharide *N*-acétylé désiré avec un rendement de 71% (entrée 7 du Tableau V. 6). Il s'avère donc, qu'en contrôlant le temps de réaction, il est possible de minimiser la formation du sous-produit furanique et d'obtenir le composé désiré avec un rendement tout à fait correct.

Pour terminer la réduction a été réalisée sur le composé monohydroxylé en position 6 **195b**, en suivant l'avancement de la réaction. La réduction est effectuée après 7h30 avec un rendement de 85% (entrée 8 du Tableau V. 6).

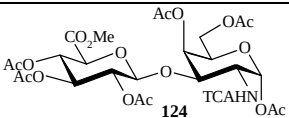
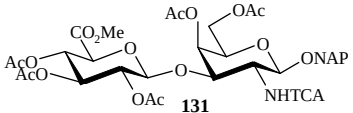
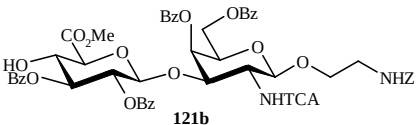
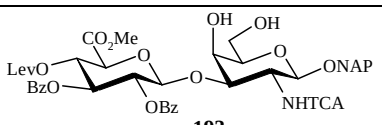
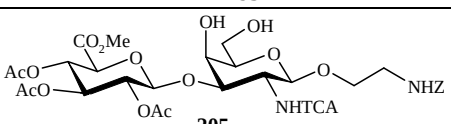
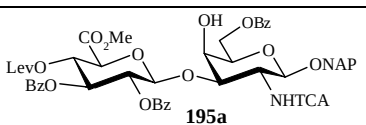
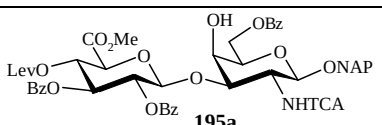
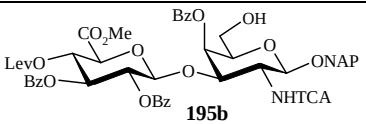
	Substrat de départ	Conditions de réaction	Rendement réduction
1	 124	24h à 50°C	95%
2	 131	24h à 50°C	77%
3	 121b	24h à 50°C	98%
4	 193	24h à 50°C	furane
5	 205	24h à 50°C	n.d
6	 195a	24h à 50°C	48%
7	 195a	5h à 50°C	71%
8	 195b	7h30 à 50°C	85%

Tableau V. 6

En conclusion les réductions par l'amalgame de Zn-Cu en milieu acide acétique conduisent systématiquement aux composés réduits désirés avec de bons rendements. Elles sont compatibles avec toutes les fonctions chimiques présentes sur nos molécules. La

difficulté rencontrée avec les composés possédant un hydroxyle libre en C-4 est finalement limitée lorsque la position 6 est protégée par un benzoate et que l'avancement de la réaction est contrôlé. L'autre avantage majeur de ces conditions est qu'elles nous affranchissent de l'utilisation d'étain, toxique et difficile à éliminer.

➤ Essais sur des tétrasaccharides

Nous avons ensuite essayé de réduire les deux groupements trichloroacétyle présents sur les tétrasaccharides **207a** et **207b** (Schéma V. 24). Pour les deux composés, après 24 heures, la réaction est toujours incomplète, présentant plusieurs tâches sur plaque CCM.

Ne voyant pas d'évolution après 24 heures, nous avons procédé à la séparation des composés par colonne chromatographique pour les deux manipulations.

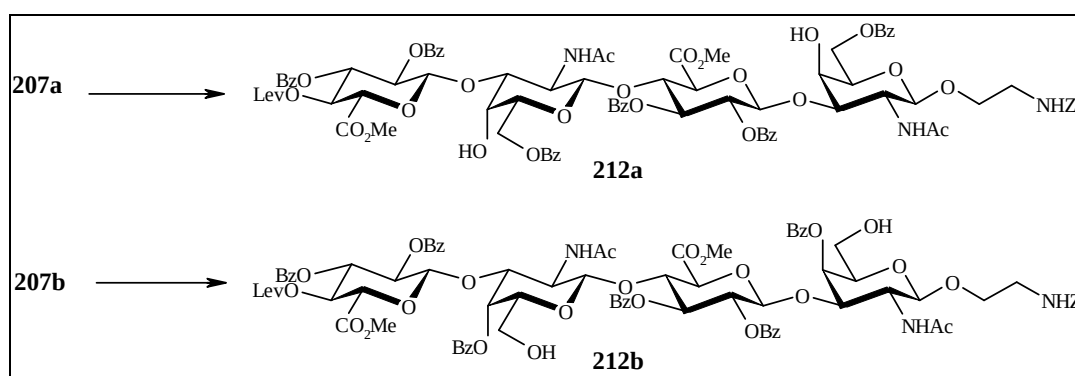


Figure V. 4

▪ La purification du tétrasaccharide 6-hydroxylé a conduit à l'isolement d'un composé majoritaire identifié par RMN ¹H, qui présente un seul groupement trichloroacétyle réduit (spectre 2 Figure V. 5). Uniquement 12% de tétrasaccharide réduit **212b** sont obtenus (spectre 3 Figure V. 5). La fraction majoritaire contenant la molécule incomplètement réduite est relancée avec l'amalgame de Zn-Cu en milieu AcOH pendant 20 heures, aucune évolution n'est observée.

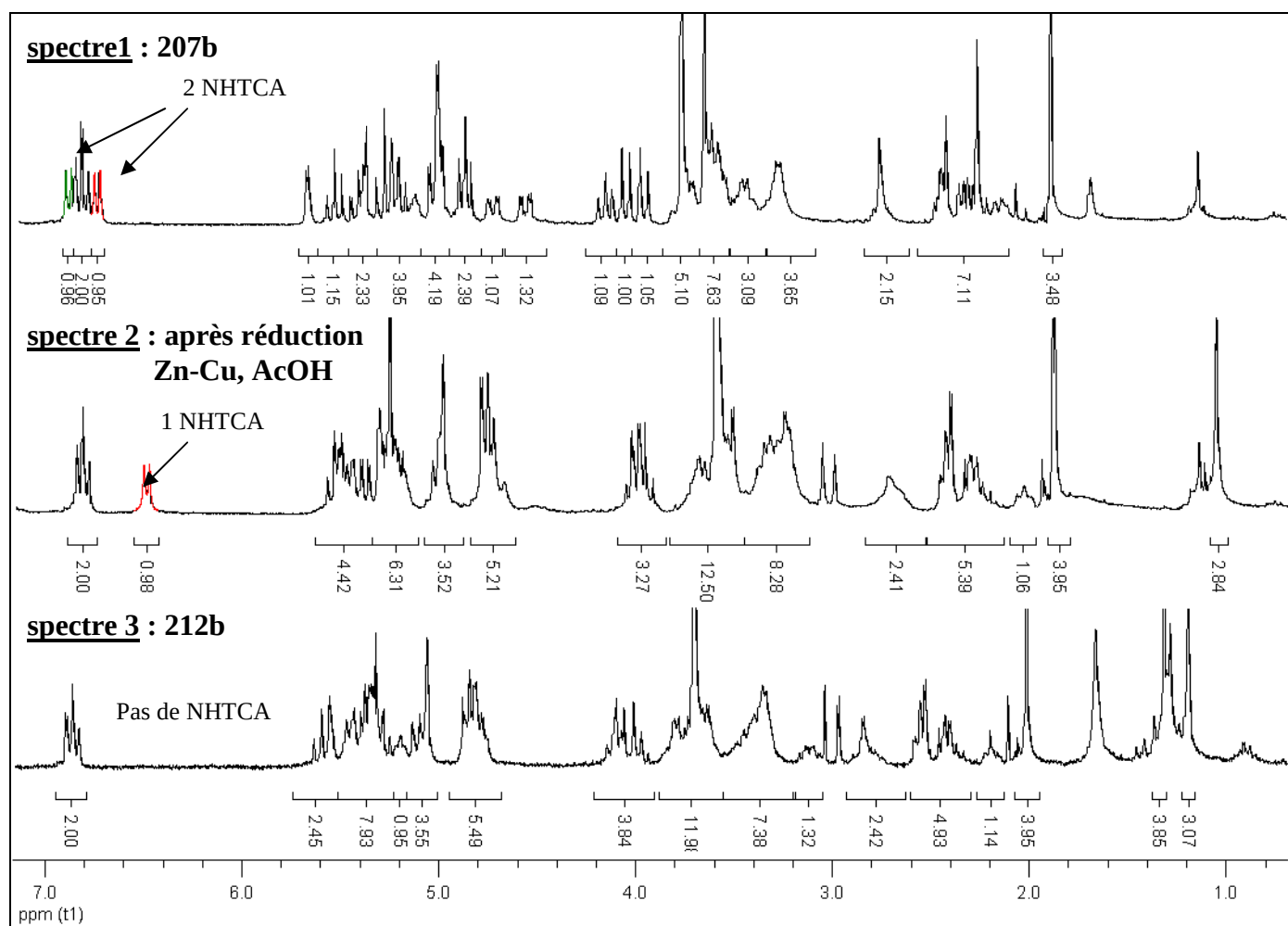


Figure V. 5

Nous décidons alors de tenter la réduction, sur le mélange, dans les conditions précédemment utilisées, *n*-Bu₃SnH et AIBN. Elles conduisent au tétrasaccharide *N*-acétylé **212b** avec un rendement de 34%.

- La purification du tétrasaccharide 4-hydroxylé conduit à un mélange de produits de réduction incomplète. Ce mélange est relancé dans les mêmes conditions et du composé furanique est alors isolé. Une autre fraction présente toujours un mélange de composés incomplètement réduits. Comme pour son analogue 6-hydroxylé, le tétrasaccharide est soumis aux conditions radicalaires $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$ et AIBN, mais la réduction est encore incomplète et seulement quelques milligrammes de produits ont été récupérés. Le tétrasaccharide **212a** n'a donc pas été synthétisé.

La réduction, par l'amalgame de Zn-Cu, de composés possédant plus d'un groupement trichloroacétamide s'avère beaucoup moins évidente que dans le cas des disaccharides. Elle semble s'arrêter à un stade de la réduction sans vouloir se compléter. Le recours à la réduction par *n*-Bu₃SnH et AIBN nous a permis d'obtenir le tétrasaccharide **212b** désiré, mais comme nous avons pu le constater auparavant, ces conditions sont très aléatoires et non reproductibles.

c. Trisaccharides

Les conditions de réduction utilisant l'amalgame de Zn-Cu en milieu AcOH sont appliquées au trisaccharide **210a**. Nous voulions ainsi voir si, sur une structure différente, il était tout de même possible de réduire deux groupements *N*-trichloroacétyl. Mais après 24 heures à 50°C, la réaction n'est toujours pas complète et il apparaît sept tâches sur plaque CCM dont une représentant du produit de départ. Sans que nous n'ayons d'explications, la réduction d'oligomères de tailles supérieures au disaccharide n'a donné aucun résultat positif. Nous n'avons donc pas essayé ces conditions sur le trisaccharide 6-hydroxylé.

La réaction en conditions radicalaires *n*-Bu₃SnH et AIBN est alors essayée. Les trisaccharides **210a** et **210b** sont dissous dans un mélange de benzène et de *N,N*-diméthylacétamide. Le *n*-Bu₃SnH et l'AIBN sont ajoutés séquentiellement, conditions mises au point dans le chapitre précédent. Les trisaccharides *N*-acétylés **217a** et **217b** attendus sont obtenus avec des rendements de 48% et 71% respectivement (Schéma V. 27).

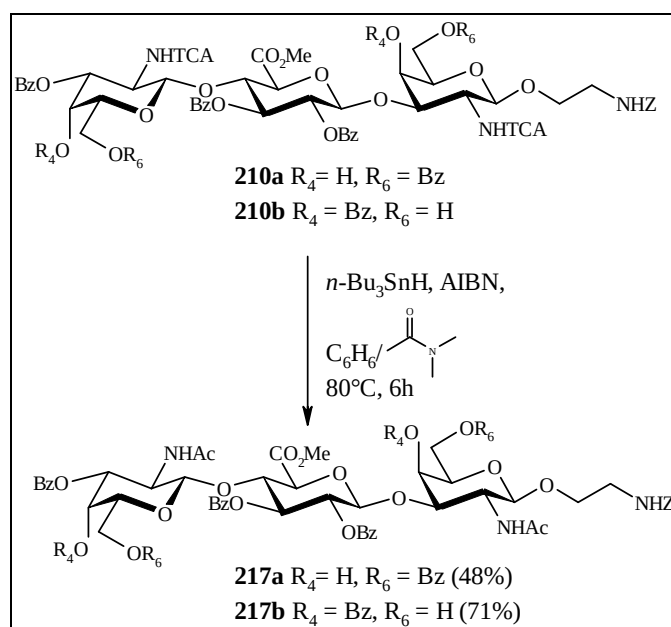


Schéma V. 27

V-2.6 Réaction de sulfatation

Les différents oligosaccharides sont ensuite sulfatés. Cette réaction a lieu par un complexe de trioxyde de soufre-triméthylamine dans le *N,N*-diméthylformamide en chauffant (Schéma V. 28). Les conditions opératoires diffèrent selon le substrat à sulfater. D'une manière générale, les sulfatations en position 4 sont plus lentes qu'en position 6 et nécessitent une quantité de réactif plus importante.

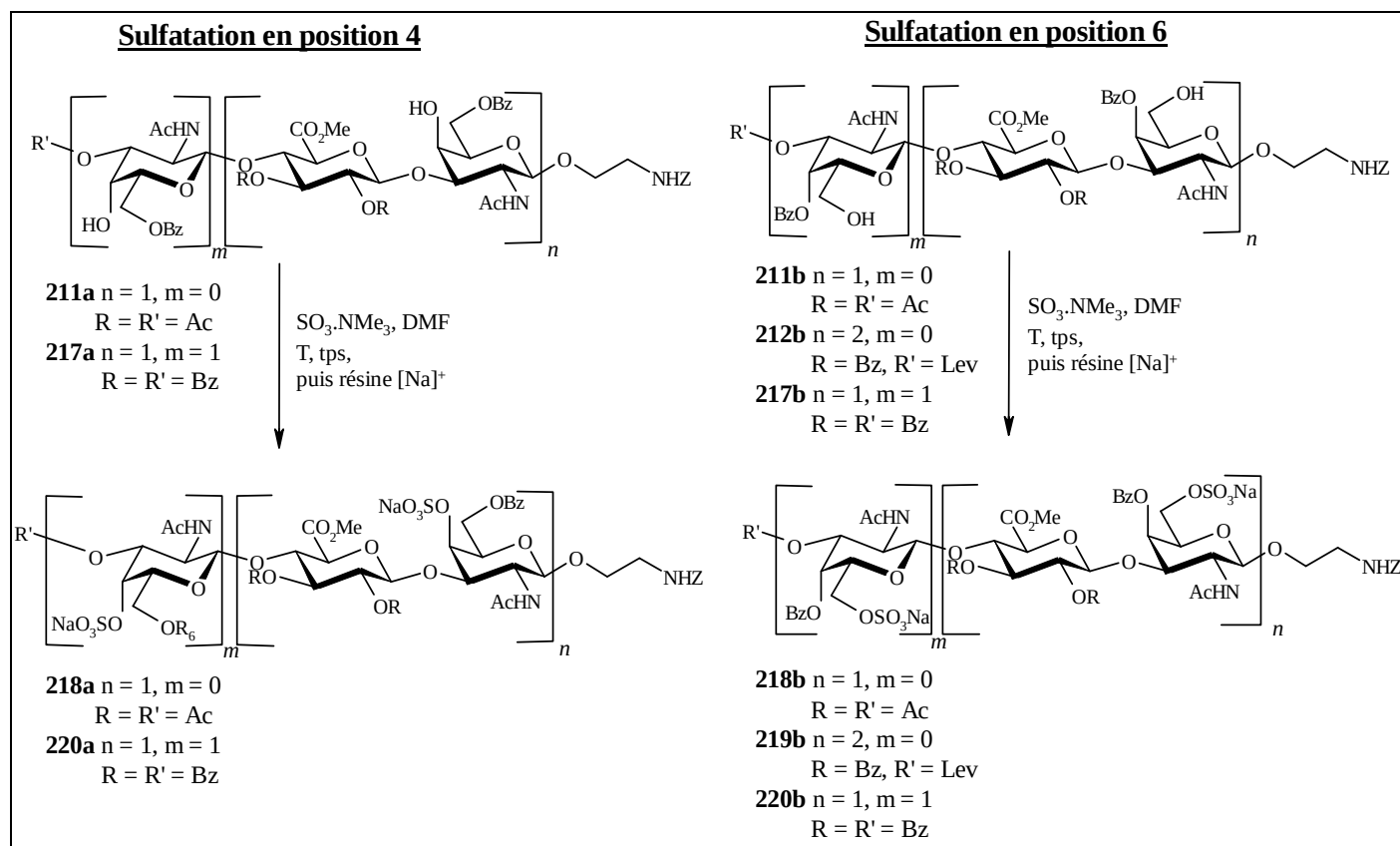


Schéma V. 28

▪ Sulfatation en position 6 :

Pour le disaccharide **211b**, la réaction est complète après 16 heures à 40°C. Afin d'éliminer l'excès de réactif, le produit est directement purifié par chromatographie sur gel de silice. Après échange sur résine cationique $[\text{Na}]^+$, le composé **218b** est obtenu avec un rendement de 82% (entrée 1 du Tableau V. 7).

La sulfatation du tétrasaccharide **212b** a nécessité 10 équivalents de réactif. Lorsque la quantité de réactif est aussi importante une purification par chromatographie sur gel silice n'est pas suffisante pour s'en affranchir. Le mélange réactionnel est, dans ces cas-là, préalablement purifié sur colonne LH-20 afin d'éliminer l'excès de réactif. Le tétrasaccharide 6-sulfaté **219b** est préparé après purification sur colonne de silice et échange sur résine $[\text{Na}]^+$ avec 67% de rendement (entrée 3 du Tableau V. 7).

La réaction ayant été un peu lente pour le tétrasaccharide, la température de sulfatation du trisaccharide est augmentée à 65°C. La réaction est ainsi complète après 30 heures. L'excès de réactif est à nouveau éliminer par LH-20 puis le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice et échangé sur résine $[\text{Na}]^+$ pour conduire au trisaccharide attendu **220b** avec 48% de rendement (entrée 3 du Tableau V. 7). Ce rendement peut être expliqué par la mauvaise solubilité des composés sulfatés. Lorsque cela ne sera pas nécessaire, c'est-à-dire lorsque le produit brut ne présentera qu'un unique produit, cette purification sur colonne de silice sera évitée.

	Produit de départ	SO ₃ .NMe ₃ (nb eq total)	Conditions de réaction	Purification	Produit sulfaté	Rendement
1	Disaccharide 211b	3.5eq	5h à 40°C	chromatographie sur silice	218b	82%
2	Tétrasaccharide 212b	10eq	48h à 40°C	LH-20 puis chromatographie sur silice	219b	67%
3	Trisaccharide 217b	9eq	30h à 65°C	LH-20 puis chromatographie sur silice	220b	48%

Tableau V. 7

La réaction de sulfatation est facilement prouvée par analyse RMN (voir Annexes 6 pour le disaccharide), l'introduction d'une fonction sulfate ayant une forte influence sur les protons et les carbones les portant, en les déblindant.

	Composé	H-6 (ppm)	C-6 (ppm)
Disaccharide	6-hydroxylé 211b	3.60 et 3.48	60.24
	6-sulfaté 218b	4.17 et 4.07	68.00
Trisaccharide	6-hydroxylé 217b	3.79-3.22 (les 2) 2.85 et 2.64	60.15 59.63
	6-sulfaté 220b	4.28 et 3.96-3.83 3.62 et 3.36	68.10 65.30
Tétrasaccharide	6-hydroxylé 212b	3.48-3.27 (les 2) 2.79 et 2.16	59.94 58.89
	6-sulfaté 219b	4.25 et 3.92 3.55 et 3.28	65.98 64.74

Tableau V. 8

▪ Sulfatation en position 4 :

La sulfatation du disaccharide **211a** a nécessité 5 équivalents de réactif et 16 heures de chauffage à 40°C (entrée 1 du Tableau V. 9). Dans ce cas, l'excès (modéré) de réactif est précipité dans le dichlorométhane, puis filtré. Une chromatographie sur gel de silice suivie du passage sur résine échangeuse d'ions [Na]⁺ donnent le composé **218a** avec 92% de rendement.

Pour le trisaccharide **217a** en chauffant à 65°C, la réaction a été lente (72 heures). Le large excès de réactif est éliminé par LH-20. Dans ce cas-là, la purification par chromatographie sur gel de silice n'étant pas nécessaire, l'échange d'ions est réalisé pour mener au trisaccharide **220a** avec un très bon rendement de 85% (entrée 2 du Tableau V. 9).

	Produit de départ	SO ₃ .NMe ₃ (nb eq total)	Conditions de réaction	Purification	Produit sulfaté	Rendement
1	Disaccharide 211a	5eq	16h à 40°C	chromatographie sur silice	218a	92%
2	Trisaccharide 217a	14eq	72h à 65°C	LH-20	220a	85%

Tableau V. 9

Les réactions de sulfatation ont été prouvées par RMN (Tableau V. 10 et voir Annexe 5 pour le disaccharide).

	Composé	H-4 (ppm)	C-4 (ppm)
Disaccharide	4-hydroxylé 211a	4.14	71.32
	4-sulfaté 218a	4.93	76.08
Trisaccharide	4-hydroxylé 217a	4.18 et 3.99	67.08 et 64.59
	4-sulfaté 220a	5.20 et 4.90	73.47 et 72.61

Tableau V. 10

Ces réactions de sulfatations fonctionnent avec de bons rendements. L'avantage, dans notre cas, est que seule la position à sulfater est libre. Nous pouvons ainsi, ajouter du réactif ou augmenter la température de la réaction sans risque. La partie délicate est finalement la purification de ces composés, du fait de leur manque de solubilité.

V-2.7 Saponification des esters

a. Disaccharides

Par analogie avec les composés non sulfatés, les disaccharides **218a** et **218b** sont saponifiés en deux étapes, dans les mêmes conditions que celles décrites auparavant. Après une purification sur LH-20, les composés totalement déprotégés **221a** et **221b** sont obtenus avec des rendements respectifs de 39% et 66% (Schéma V. 29).

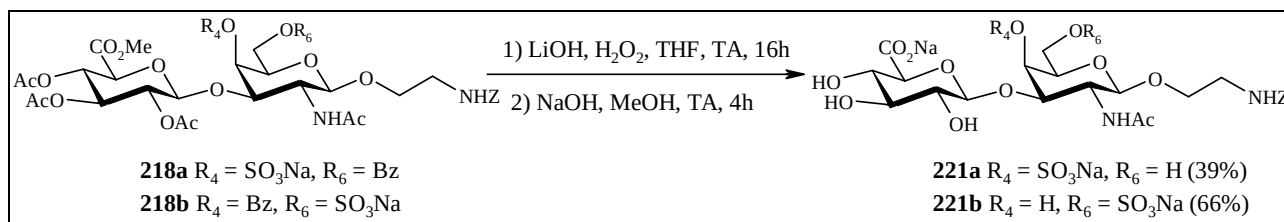


Schéma V. 29

Le faible rendement de la saponification sur le composé 4-sulfaté est expliqué par la formation de 32% d'un sous-produit tout à fait inattendu, un monomère de D-GalN sulfaté en position 4 **222** (Schéma V. 30). Ce composé a été identifié par analyse RMN ^1H et présente un H-3 plus blindé que le disaccharide correspondant **221a**.

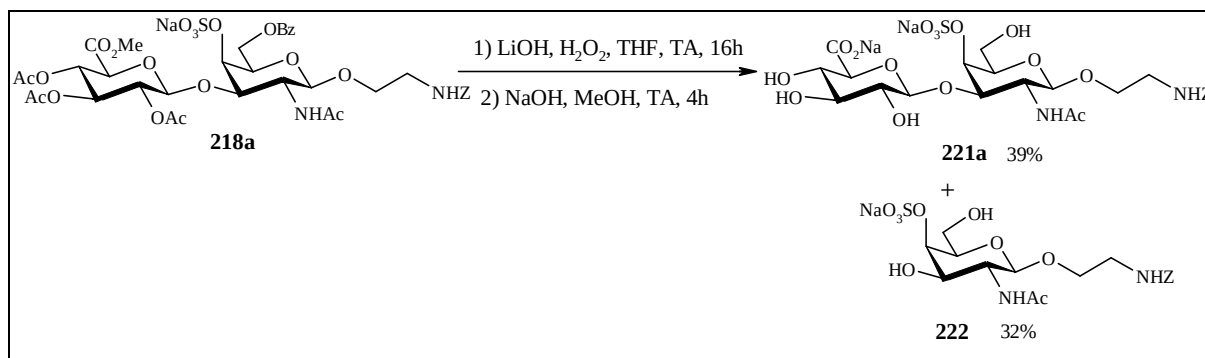


Schéma V. 30

b. Tétrasaccharide

La saponification des esters du tétrasaccharide **217b** est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Le tétrasaccharide **223b** totalement déprotégé est préparé avec 71% de rendement (Schéma V. 31).

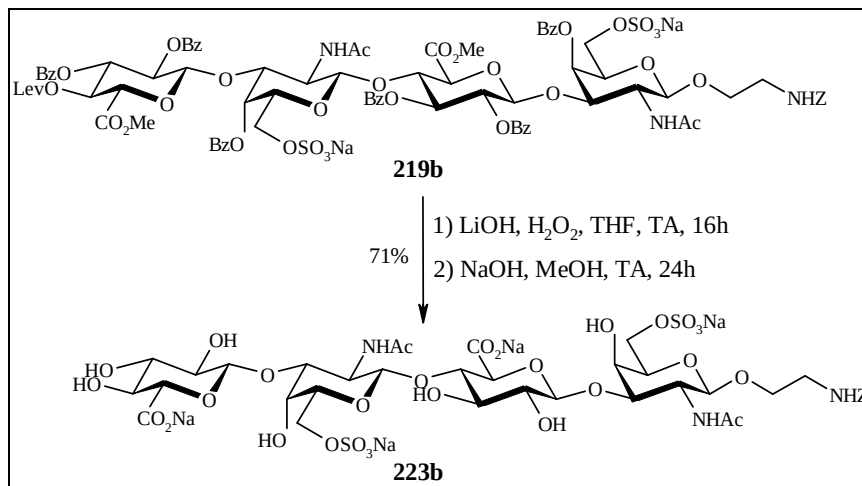


Schéma V. 31

c. Trisaccharides

Les trisaccharides **220a** et **220b** sont saponifiés selon les mêmes conditions que celles décrites pour les autres oligomères. Le temps de saponification est toujours de 24 heures. La saponification du produit 6-sulfaté conduit au trisaccharide désiré **224b** avec 77% de rendement (Schéma V. 32). Par contre celle du trisaccharide 4-sulfaté **220a** n'a pas produit l'oligomère désiré **224a** mais une large dégradation de la molécule. L'analyse des différentes fractions est effectuée par RMN ¹H. L'une d'entre elles ne présente plus de groupement benzyloxycarbonyl et est donc sous forme d'amine primaire, confirmé par la révélation à la ninhydrine. Une autre montre la présence de 33% du monomère **222** (Schéma V. 32). Nous soupçonnons donc une corrélation entre les composés 4-sulfatés, la présence de la chaîne aminoéthylbenzyloxycarbonyl et cette coupure des liaisons interglycosydiques 1→3. En effet, des étapes de saponifications dans ces mêmes conditions ont déjà largement été réalisées au laboratoire sur des composés 4-sulfatés possédant un glycoside différent sur la position anomérique et ce sous-produit n'a pas été observé⁷⁹. Il en est de même pour les composés possédant la chaîne aminoéthylbenzyloxycarbonyl et qui sont non sulfatés (section IV-7.2) ou 6-sulfatés comme nous venons de le constater.

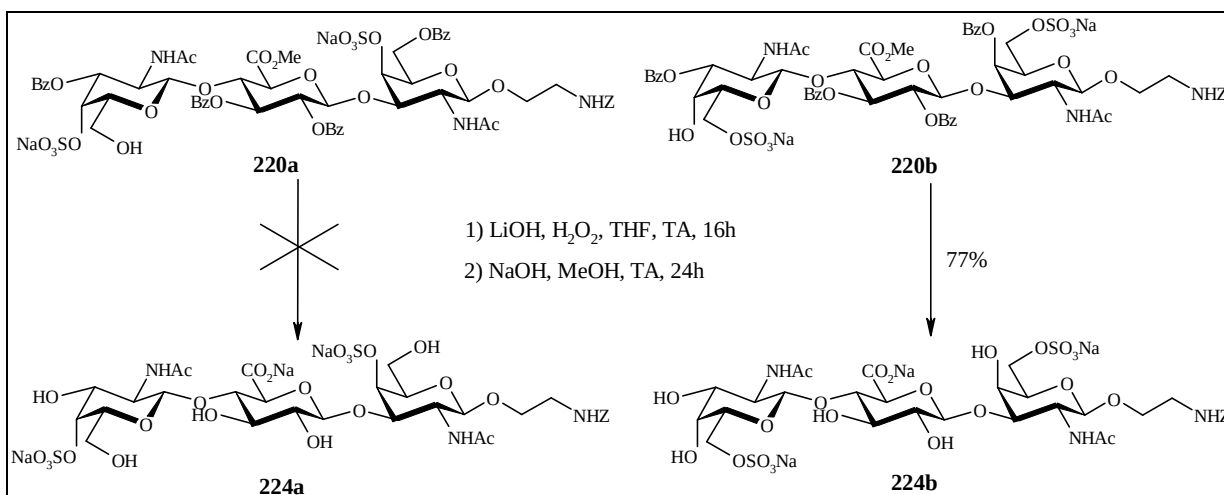


Schéma V. 32

V-2.8 Couplage avec la biotine

Afin de biotinyler les produits, une hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyl est effectuée en présence de Pd activé sur charbon. L'étape finale de biotinylation est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (Schéma V. 33) et conduit aux oligosaccharides désirés avec les rendements donnés dans le Tableau V. 11.

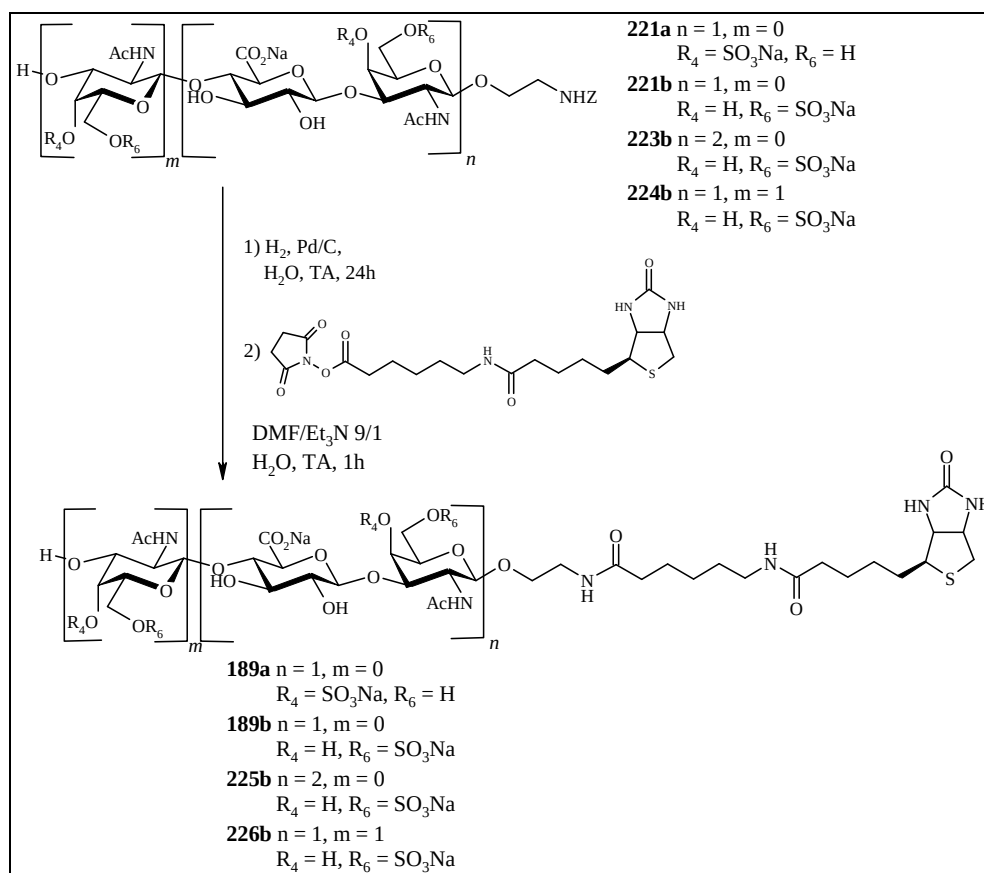


Schéma V. 33

	Rendement brut hydrogénolyse	Rendement sur les 2 étapes
Disaccharide 4-sulfaté 189a	100%	50%
Disaccharide 6-sulfaté 189b	100%	68%
Trisaccharide 6-sulfaté 225b	82%	70%
Tétrasaccharide 6-sulfaté 226b	94%	77%

Tableau V. 11

V-3 CONCLUSION

L'étape de glycosylation « push-pull » mise au point permet une diminution du nombre d'étapes et un accès rapide aux disaccharides biotinylés finaux en 11 étapes.

Grâce à cette étape de couplage et à la stratégie utilisant l'acétal benzyldène puis l'orthoester les trichloroacétimides **186a** et **186b** ont été préparés en 14 étapes à partir du disaccharide de base **118** et les blocs accepteurs **188a** et **188b** en 16 étapes.

Les trisaccharide et tétrasaccharide 6-sulfatés biotinylés ont été obtenus après 23 étapes de synthèse pour chacun (Figure V. 6).

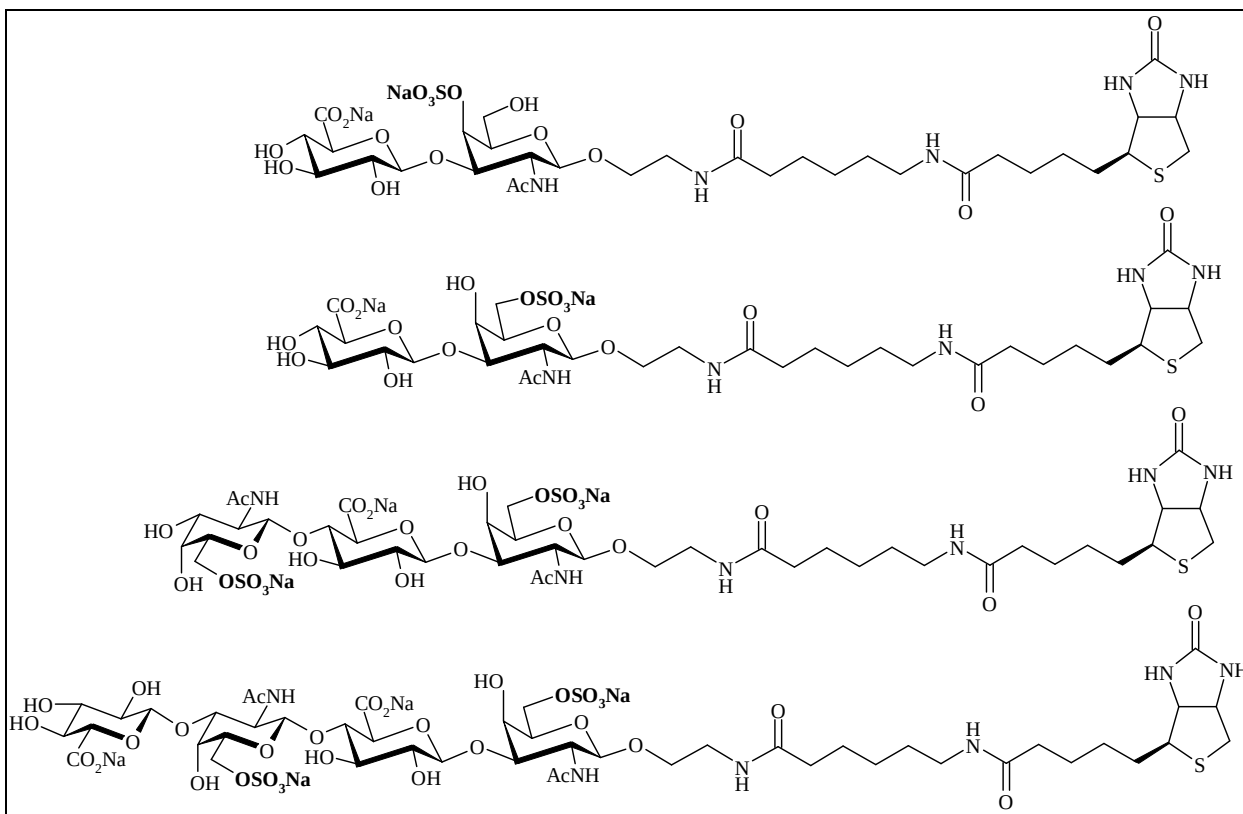


Figure V. 6

**VI- SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES
DE SULFATATION HÉTÉROGÈNE EN
POSITION 4**

VI- SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES DE SULFATATION HÉTÉROGÈNE EN POSITION 4

Pour l'étude des sulfotransférases et de la chondroïtine synthase de la biosynthèse, un trisaccharide et un tétrasaccharide de sulfatation hétérogène ont été synthétisés. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, dans la nature, les chaînes de chondroïtines sont hétérogènes en sulfatation.

Ces composés seront sulfatés sur la première unité de D-GalN et non sulfatés sur la deuxième. Aucun oligosaccharide de sulfates de chondroïtines présentant une sulfatation hétérogène n'a encore été décrit dans la littérature.

VI-1 SYNTHÈSE DES TRISACCHARIDE ET TETRASACCHARIDE PROTEGES

Afin de préparer le trisaccharide et le tétrasaccharide sulfaté en position 4 de la première unité D-GalN, l'accepteur **188a** 4-chloroacétylé, préparé dans le chapitre précédent, est utilisé.

L'accepteur disaccharidique **188a** (Schéma V. 15) est glycosylé soit avec le trichloroacétimide monomérique **61** pour donner le trisaccharide **227**, soit avec le trichloroacétimide disaccharidique **88** pour conduire au tétrasaccharide **228** (Schéma VI. 1). Ces réactions sont effectuées dans le chloroforme, pour des raisons de solubilité. Les rendements étant assez faibles dans les conditions classiques, c'est-à-dire avec 0,20 équivalent de catalyseur (entrées 1 et 2 du Tableau VI. 1), nous avons essayé avec 0,25 équivalent. Les rendements sont un peu meilleurs mais demeurent modérés (entrées 3 et 4 du Tableau VI. 1).

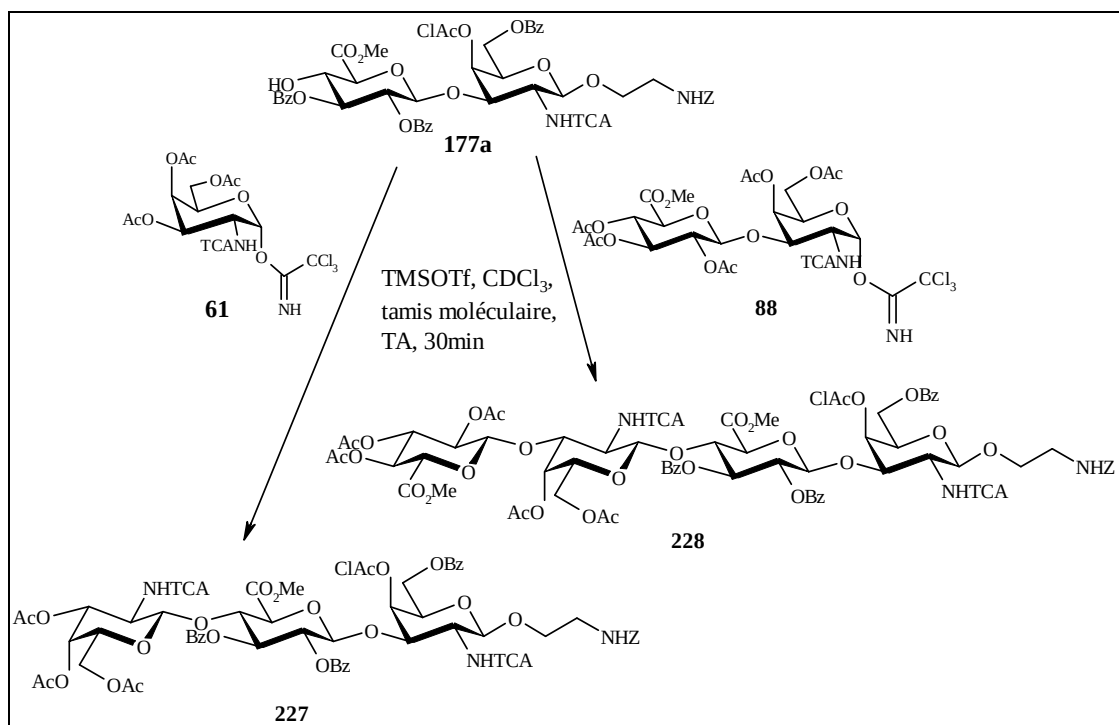


Schéma VI. 1

	Produit obtenu	TMSOTf (nb eq)	Rendement
1	227	0,20 eq	19%
2	228	0,20 eq	30%
3	227	0,25 eq	36%
4	228	0,25 eq	38%

Tableau VI. 1

VI-2 DECHLOROACETYLTATION

Les positions 4 des composés **227** et **228** sont ensuite déchloroacétylées par la thiourée pendant 3h30 pour conduire au trisaccharide **229** avec 67% de rendement et au tétrasaccharide **230** avec 82% de rendement (Schéma VI. 2).

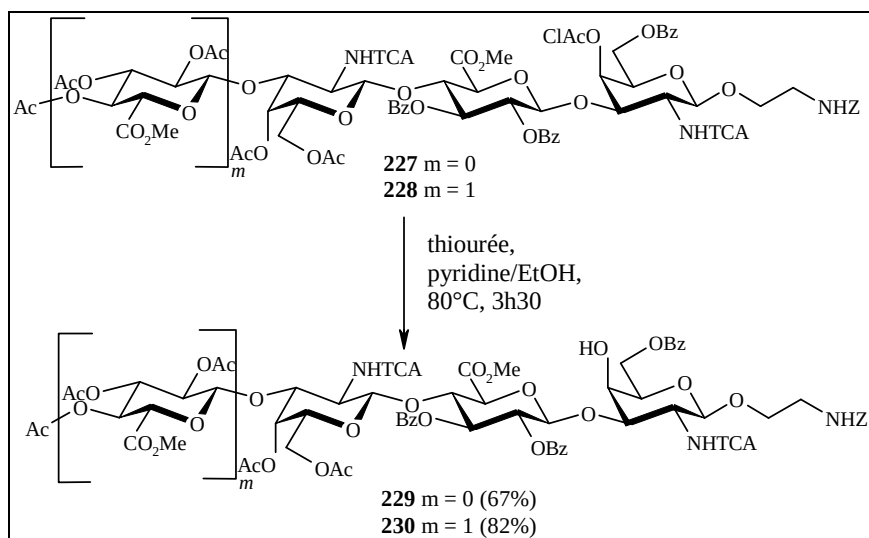


Schéma VI. 2

VI-3 REDUCTION DES GROUPEMENTS N-TRICHLOROACÉTYLES

Pour réduire les groupements *N*-trichloroacétyles des molécules 229 et 230, nous avons effectué les ajouts séquentiels de *n*-Bu₃SnH et AIBN. Les conditions utilisant l'amalgame de Zn-Cu dans l'AcOH n'ayant pas donné de résultats concluants sur des unités supérieures à deux sucres, nous ne les avons pas tentées sur ces substrats. Les composés *N*-acétylés désirés 231 et 232 sont préparés avec des rendements respectifs de 50% et 63% (Schéma VI. 3).

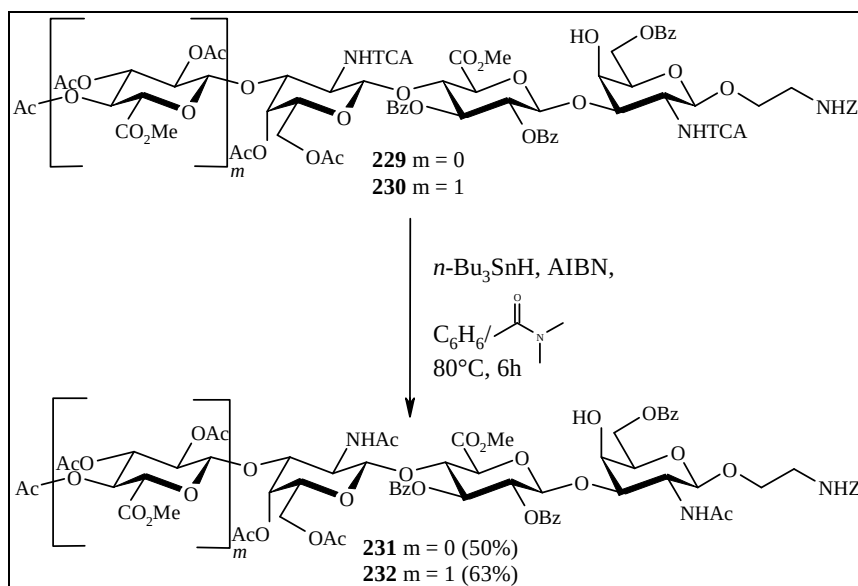


Schéma VI. 3

VI-4 REACTION DE SULFATATION

L'étape de sulfatation est réalisée à 65°C pour les deux oligomères **231** et **232** (Schéma VI. 4). Les sulfatations sur la position 4 n'étant pas aisées, plusieurs ajouts de réactifs ont été nécessaires ainsi que des temps de réaction relativement longs (Tableau VI. 2). La purification des composés a été réalisée sur LH-20 et il n'a pas été utile de les purifier par chromatographie sur silice. Ainsi, après l'échange sur résine $[\text{Na}]^+$, les produits **233** et **234** sont obtenus avec des bons rendements de 70% et 84% respectivement (Tableau VI. 2).

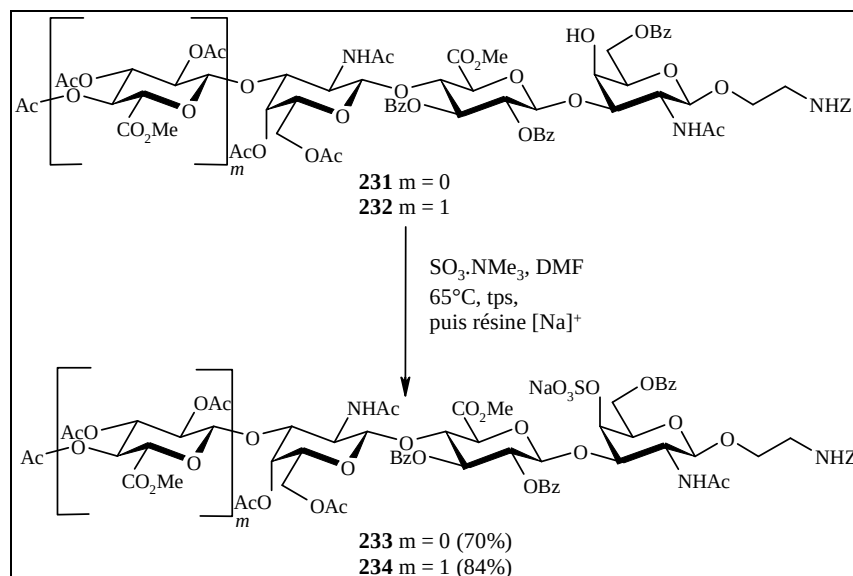


Schéma VI. 4

	Produit de départ	$\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$ (nb équivalent total)	Temps de réaction	Rendement
1	231	13 eq	106h	70%
2	232	15 eq	10 h	84%

Tableau VI. 2

La sulfatation des composés est, à nouveau, prouvée par analyse RMN (Tableau VI. 3).

	Composé	H-4 (ppm)	C-4 (ppm)
Trisaccharide	4-hydroxylé 231	4.18	67.75
	4-sulfaté 233	5.20	76.72
Tétrasaccharide	4-hydroxylé 232	4.14	67.90
	4-sulfaté 234	5.24	76.68

Tableau VI. 3

VI-5 SAPONIFICATION DES ESTERS

La déprotection des esters est réalisée selon le même protocole que celui décrit précédemment (Schéma VI. 5). Pensant que le monomère **222** pouvait se former plus facilement lorsque le temps de saponification dans la soude était trop long, nous avons comparé ces temps de réaction.

Le trisaccharide **233** est saponifié pendant 24 heures et le produit déprotégé correspondant **235** est obtenu avec 70% de rendement (Tableau VI. 4). On peut effectivement observer la présence du monomère **222**.

Le tétrasaccharide **234** est, quant à lui, saponifié pendant 8 heures et le composé désiré **236** est formé avec 50% de rendement (Tableau VI. 4). Le monomère **222** est à nouveau isolé.

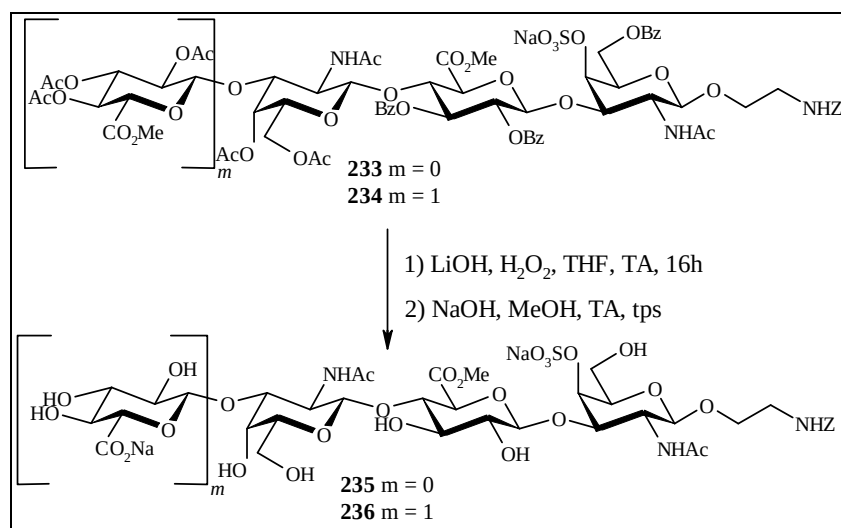


Schéma VI. 5

Produit de départ	Temps de réaction	Rendement
233	24h	70%
234	8h	50%

Tableau VI. 4

Comme nous avons pu le constater lors de la saponification du disaccharide et du trisaccharide 4-sulfaté dans le chapitre IV-3.9, il y a formation systématique de ce sous-produit monomérique issu de la rupture la liaison interglycosidique 1→3 et ce quel que soit le temps de réaction.

VI-6 COUPLAGE AVEC LA BIOTINE

Afin de préparer les composés biotinylés désirés, le groupement benzyloxycarbonyle est tout d'abord hydrogénolysé (Tableau VI. 5). L'étape finale de biotinylation est ensuite réalisée en milieu DMF/eau avec le dérivé de biotine succinimique selon la même méthodologie que celle appliquée dans les chapitres précédents. Les trisaccharide et tétrasaccharide biotinylés sont obtenus avec des rendements de 56% et 44% respectivement pour ces deux étapes.

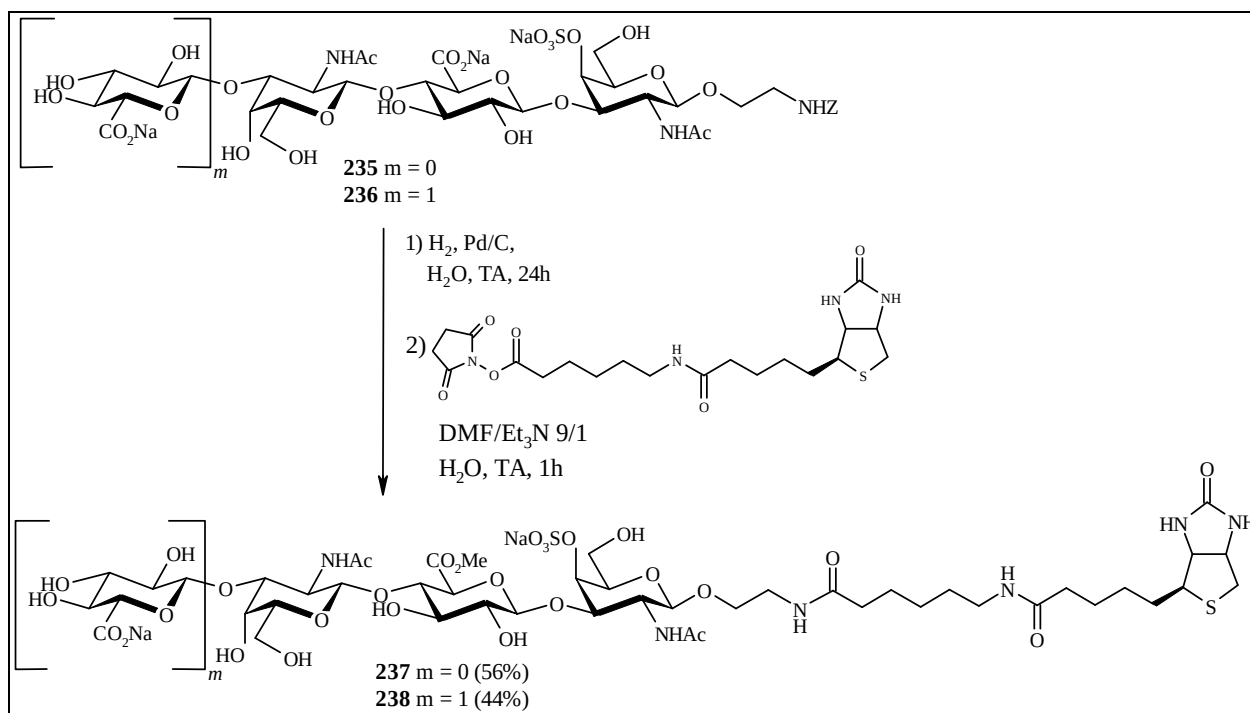


Schéma VI. 6

Produit de départ	Rendement brut hydrogénolyse	Rendement sur les 2 étapes
Trisaccharide 235	84%	56%
Tétrasaccharide 236	84%	44%

Tableau VI. 5

8. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du trisaccharide biotinylé **237** sont présentés en Annexe

VI-7 CONCLUSION

Pour la première fois, un trisaccharide et un tétrasaccharide de sulfates de chondroïtines présentant une sulfatation hétérogène ont été préparés. Ces derniers ont été obtenus à partir du bloc accepteur **188a** et des blocs donneurs **61** et **88** déjà synthétisés dans le chapitre V et le chapitre IV respectivement. Ainsi, 23 étapes de synthèse ont conduit aux trisaccharide et tétrasaccharide 4-sulfatés de sulfatation hétérogène (Figure VI. 1).

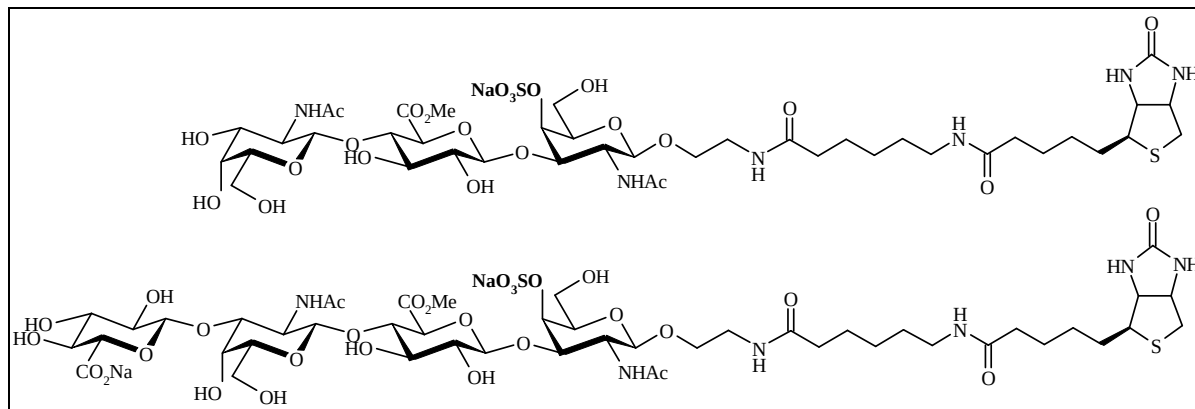


Figure VI. 1

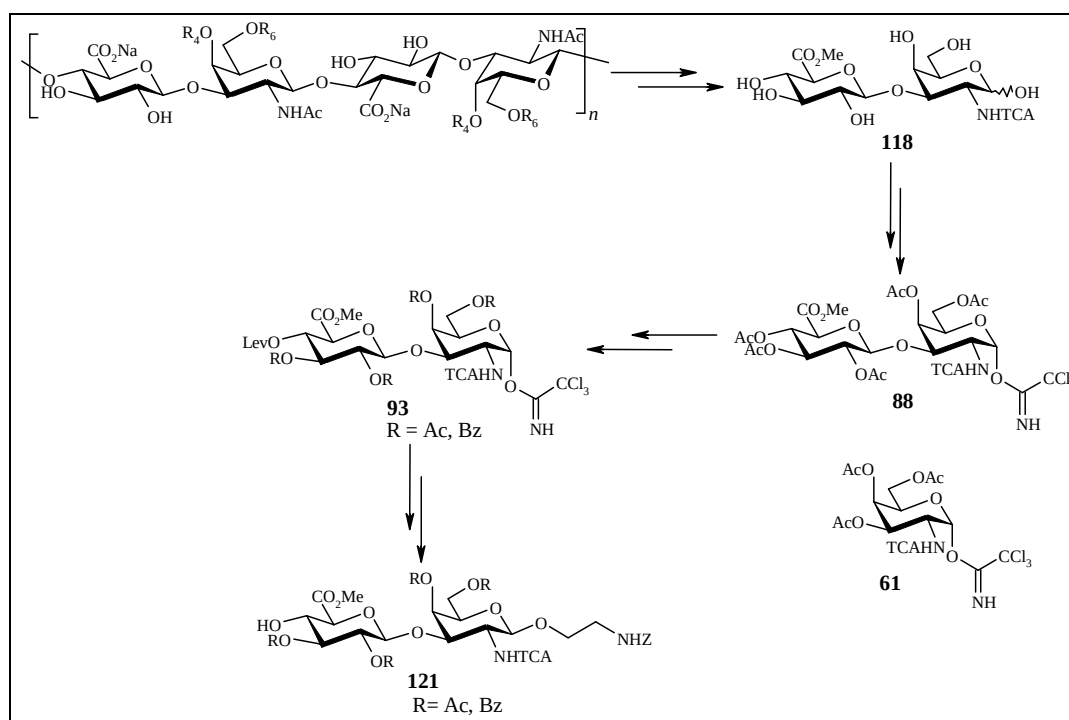
Les analogues 6-sulfatés présentant une sulfatation hétérogène sont actuellement en cours de préparation.

VII- CONCLUSION GENERALE

VII- CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail était la synthèse d'oligosaccharides de chondroïtines et de sulfates de chondroïtines pouvant être des substrats potentiels de la chondroïtine synthase et de sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage.

Une stratégie efficace, basée sur une hydrolyse d'un polymère de départ conduit rapidement au disaccharide de base **118**, et permet d'obtenir les intermédiaires clés **88**, **93** et **121** (Schéma VII. 1).



Grâce à une stratégie d'élargissement utilisant ces trois blocs clés **88**, **93** et **121** ainsi que le bloc monomérique donneur **61** (pour les motifs impairs), sept oligosaccharides de tailles désirées (du disaccharide **122** à l'octasaccharide **172**) ont été obtenus (Figure VII. 1).

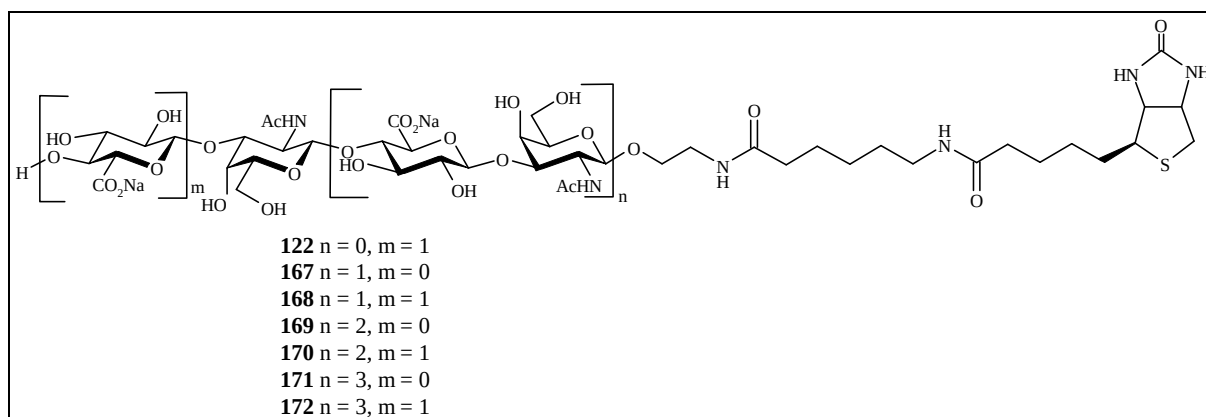


Figure VII. 1

Tous les oligosaccharides sulfatés sont, quant à eux, préparés à partir d'un bloc donneur clé **173**. L'intermédiaire **100** est ensuite préparé et va permettre d'obtenir la divergence recherchée sur les positions 4 et 6. En effet, une stratégie utilisant l'acétal 4,6-*O*-benzylidène et passant par un orthoester a été mise au point et a conduit à la préparation, en proportions équivalentes, des blocs donneurs clés **186a** et **186b** puis des blocs accepteurs clés **188a** et **188b** (Schéma VII. 2).

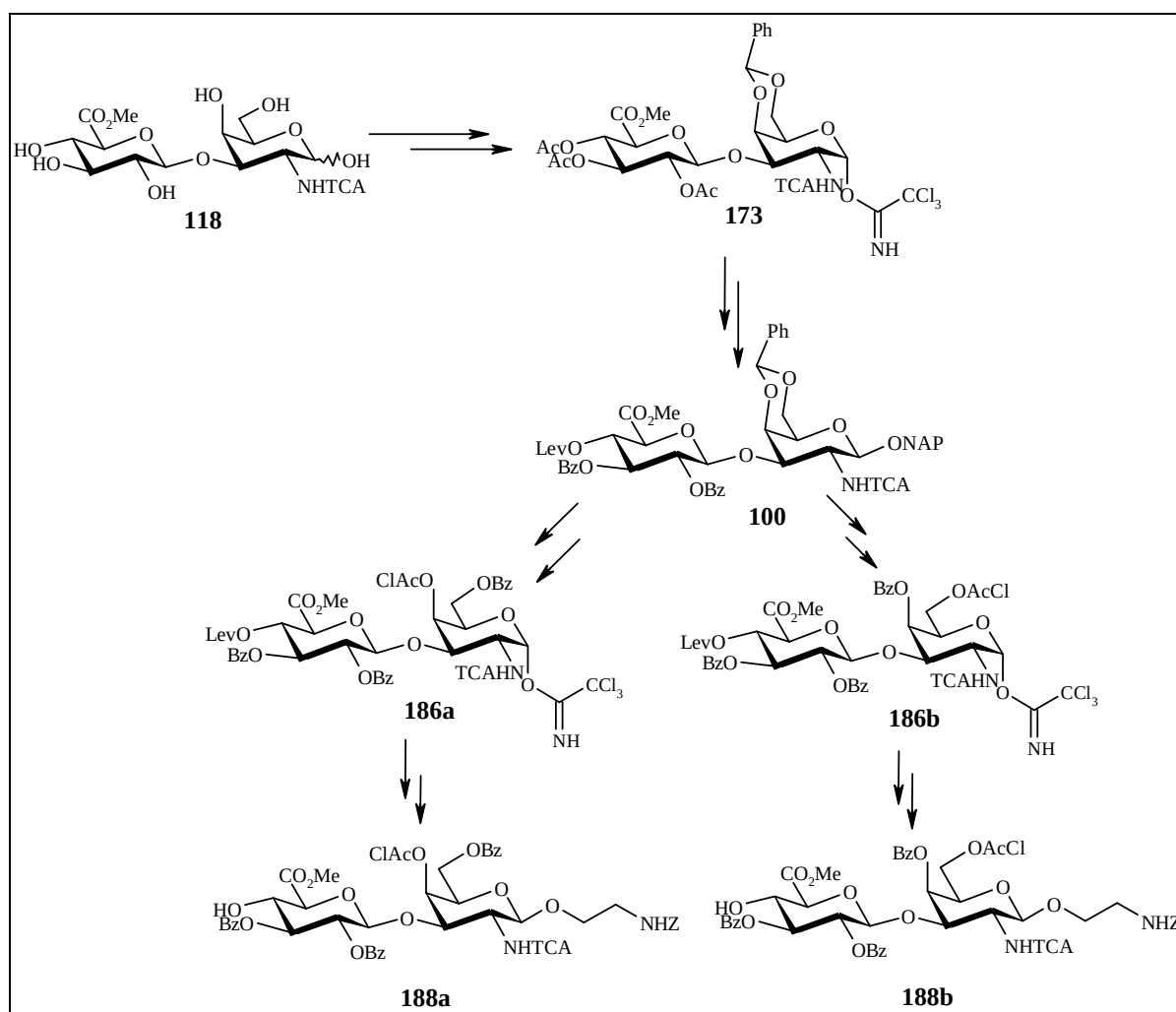


Schéma VII. 2

Les blocs donneurs monomériques **187a** et **187b** ont, pour leur part, été synthétisés à partir du composé **198** en utilisant la stratégie de l'orthosester (Schéma VII. 3).

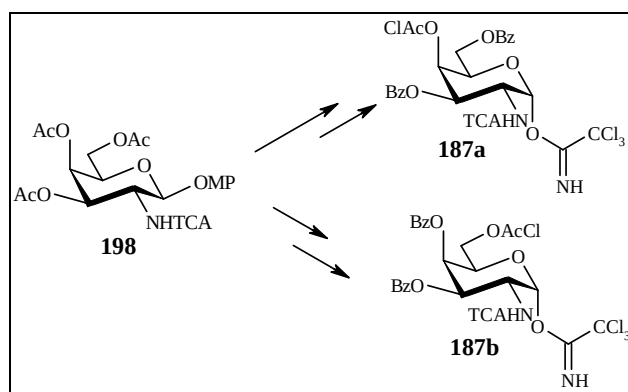


Schéma VII. 3

Les blocs accepteurs **188a** et **188b** ont servi à la préparation des oligosaccharides de sulfates de chondroïtines de sulfatations homogène et hétérogène selon qu'ils aient été glycosylés avec les blocs donneurs **186a**, **186b**, **187a**, **187b** ou **61** et **88** respectivement (Figure VII. 2).

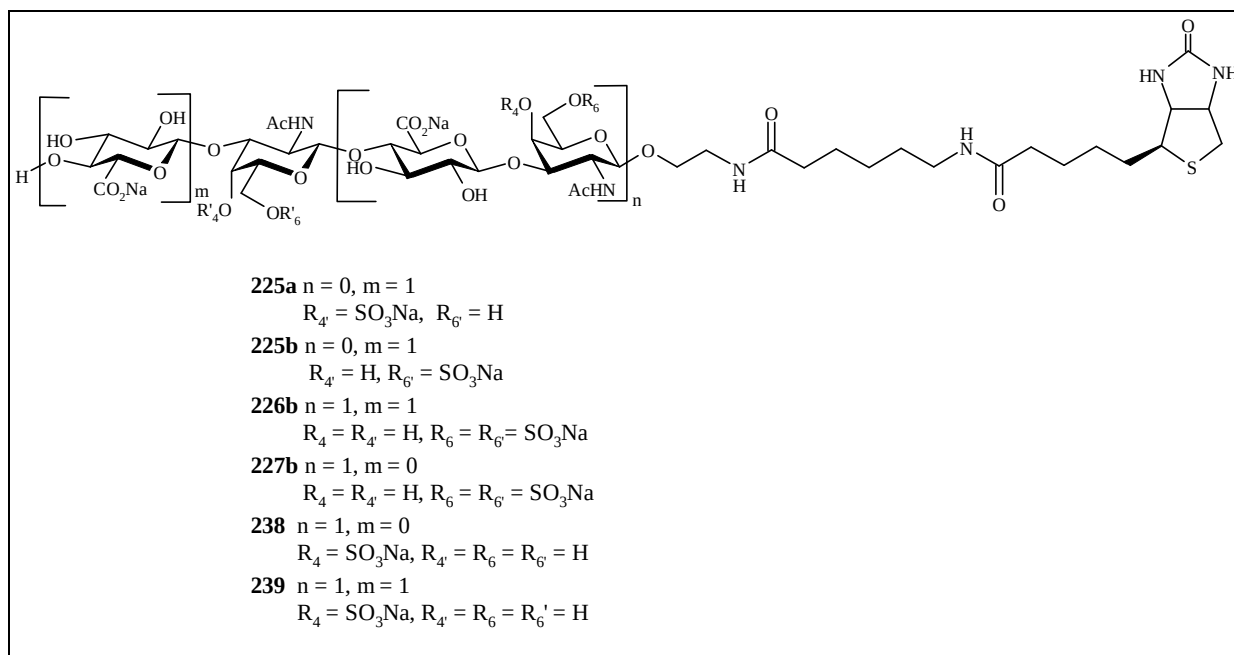


Figure VII. 2

Durant ces trois années de thèse, nous avons ainsi synthétisé sept oligosaccharides de chondroïtines, quatre oligosaccharides sulfatés de façon homogène soit en position 4, soit en position 6 et deux oligosaccharides sulfatés de façon hétérogène en position 4.

VIII- PARTIE EXPERIMENTALE

VIII- PARTIE EXPERIMENTALE

Chromatographie

Les CCM ont été réalisées sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice Merck 60F₂₅₄ (épaisseur 0.2 mm). Elles ont été révélées par pulvérisation d'un mélange éthanol-acide sulfurique (95 : 5) ou par une solution de ninhydrine (1% dans l'acétone), puis par chauffage au moyen d'un décapeur thermique.

Les chromatographies flash sont réalisées sur un gel de silice (E.Merck, 40-63 μ m).

Spectrométrie

Les spectres de masse ont été obtenus à partir d'un spectromètre Micromass Quattro Ultima triple quadripôle opérant en modes négatif et positif ou d'un spectromètre Perkin-Elmer SCIEX API 300 en mode positif, équipés d'une source d'ionisation par électrospray.

Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés au Centre Régional de mesure Physique (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France).

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à 25°C au moyen de spectromètres Bruker DPX-250 ou AV-400. Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en ppm, (s : singulet, d : doublet, dd ; doublet de doublet, t : triplet, m : massif, q : quadruplet) par rapport :

- au Me_4Si en tant que standard interne pour les spectres effectués dans le CDCl_3 .
- à l'acétone en tant que standard interne pour les spectres effectués dans le D_2O .
- au signal résiduel de l'acétone, du DMSO et du MeOH pour les spectres effectués dans ces solvants.

Autres analyses physiques

Les pouvoirs rotatoires optiques ont été mesurés à 20°C avec un polarimètre Perkin-Elmer 341.

Les points de fusion ont été déterminés dans des tubes capillaires au moyen d'un appareil Büchi.

Les analyses élémentaires sont réalisées par le Service Central de Microanalyse du CNRS (Vernaison, France).

Divers

Afin de simplifier la description des protocoles opératoires, les composés trichloroacétimidoylés seront dénommés « imidate ».

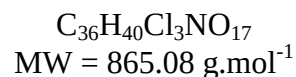
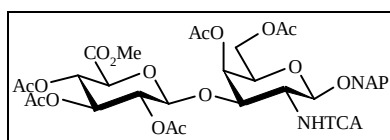
Les réactions finales de biotinylation sont réalisées avec le *N*-succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate qui sera appelé « réactif biotinylé » dans la description des protocoles opératoires qui suivront.

Organisation de la partie expérimentale

Dans la partie expérimentale chaque molécule apparaît par ordre numérique croissant.

Lors de la description des spectres de RMN ^1H , les constantes de couplage ne sont pas rappelées.

Les différents composés sont dénommés selon la nomenclature anglo-saxonne francisée.



2-Naphtylmethyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (87)

Un mélange d'imide **88** (10 g, 11.5 mmol), de 2-naphtalèneméthanol (3.28 g, 20.7 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dans du CH_2Cl_2 anhydre (130 mL) est agité pendant 1 heure à température ambiante sous argon. Le TMSOTf (312 μL , 1.72 mmol, 0.15eq/imide) est ajouté, puis la solution est agitée 30 minutes supplémentaires et est ensuite neutralisée avec Et_3N (721 μL , 5.17mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite, puis concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 1 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (7.80 g, 78 %) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -20 (c 1.06, CHCl_3).

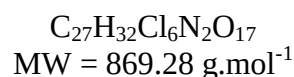
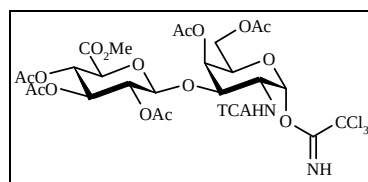
F 120-122°C (i-PrOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 7.85-7.39 (m, 7H, Ar), 6.83 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH GalN), 5.47 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.15-5.19 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 4.95-4.92 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.92 (ABq, 2H, CH_2 -Ar), 4.91 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.69 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.50 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.20-4.09 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 3.96 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5 GlcA), 3.91-3.82 (m, 2H, H-2 et H-5 GalN), 3.76 (s, 3H, COOCH_3), 2.12, 2.10, 2.02, 1.99, 1.98 (5s, 15H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 170.61, 170.12, 169.94, 169.42, 166.82, 162.14 (7C, C-6 GlcA et C=O), 133.90, 133.27, 128.52, 128.00, 127.83, 127.44, 126.42, 126.34, 126.12 (10C, Ar), 99.75, 97.90 (2C, C-1 GalN et C-1 GlcA), 92.43 (1C, CCl_3), 73.70, 72.53, 72.20, 71.49, 71.34, 71.01, 69.21, 68.44 (8C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA et CH_2 -Ar), 62.30 (1C, C-6 GalN), 55.54, 52.99 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 20.88, 20.76, 20.66, 20.57 (5C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 864 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 886 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{Cl}_3\text{NO}_{17}$: C, 49.98 ; H, 4.66 ; N, 1.62 ; trouvée C, 49.84 ; H, 4.82 ; N, 1.55



O-(Méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranose (88)

A une solution de disaccharide **124** (6.99 g, 9.30 mmol) dissous dans du DMF (55 mL), est ajouté de l'acétate d'hydrazine (1.26 g, 13.70 mmol, 1.5eq). Le mélange réactionnel est agité 1 heure à température ambiante sous flux d'argon. La solution est ensuite versée dans de l'eau glacée et de l'AcOEt (200 mL) est ajouté. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt et la phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée, puis séchée sur MgSO_4 et concentrée pour donner un solide blanc.

L'hémiacétal obtenu (6.48 g, 8.95 mmol) est dissous dans du CH_2Cl_2 (65 mL). Le trichloroacétonitrile (9 mL, 89.5 mmol, 10eq) et le DBU (33 mL, 0.22 mmol, 0.25eq) sont ajoutés successivement. Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à température ambiante sous flux d'argon puis est concentré. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 1 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (5.24 g, 65 % sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +59$ (c 1.05, CHCl_3).

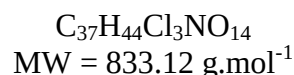
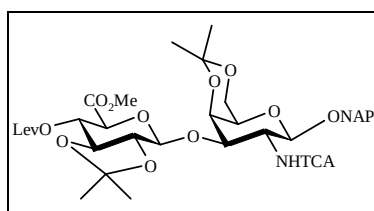
F 113-114°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.80 (s, 1H, C=NH), 6.88 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 8.5Hz, NH GalN), 6.53 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5Hz, H-1 GalN), 5.45 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 2.5Hz, H-4 GalN), 5.20-5.15 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 5.05 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 5Hz, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2 GlcA), 4.82 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.63 (ddd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 4.35-4.32 (m, 1H, H-5 GalN), 4.31 (dd, 1H, H-3 GalN), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.06 (d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.99 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b GalN), 3.74 (s, 3H, COOCH_3), 2.12, 2.08, 2.04, 2.01 (4s, 15H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 170.06, 170.04, 169.76, 169.35, 166.74, 162.14 (7C, C-6 GlcA et C=O), 160.39 (1C, C=NH), 99.03 (1C, C-1 GlcA), 94.67 (1C, C-1 GalN), 92.50, 90.77 (2C, CCl_3), 73.12, 72.18, 70.04, 69.89, 69.34, 68.15 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 62.55 (1C, C-6 GalN), 53.23, 50.66 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 20.98, 20.76, 20.68, 20.57 (5C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 885 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{O}_{17}$: C, 37.31 ; H, 3.71 ; N, 3.12 ; trouvée C, 37.19 ; H, 3.82 ; N, 3.01.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl 2,3-O-isopropylidène-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-4,6-O-isopropylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (91)

Un mélange de disaccharide **131** (4.05 g, 5.51 mmol) et d'acide lévulinique (0.77 g, 6.61 mmol, 1.2eq) est dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (40.5 mL) sous argon. La DMAP (202 mg, 1.65 mmol, 0.3eq) et la DCC (1.36 mg, 6.61 mmol, 1.2eq) sont ajoutées et le mélange réactionnel est agité 3 heures à température ambiante sous argon. La solution est ensuite filtrée sur büchner et le solide est rincé avec du CH_2Cl_2 . Le filtrat est lavé avec une solution de NaHCO_3 saturée puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 3 : 2 avec 0.2% de Et_3N) donne le produit désiré (4.18 mg, 91%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -33 (c 1.05, CHCl_3).

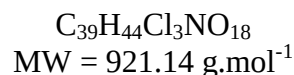
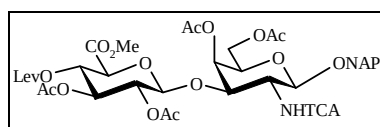
F 196°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 7.28-7.15 (m, 7H, Ar), 7.07 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 6.5Hz, NH GalN), 5.30-5.20 (m, 1H, H-4 GlcA), 5.17 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.96 (Abq, 2H, CH_2 -Ar), 4.83 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1 GlcA), 4.59 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3.5Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.40 (dd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, H-4 GalN), 4.15-4.01 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 3.91-3.79 (m, 2H, H-2 GalN et H-5 GlcA), 3.71 (s, 3H, COOCH_3), 3.61-3.54 (m, 2H, H-2 et H-3 GlcA), 3.42-3.32 (m, 1H, H-5 GalN), 2.75-2.60 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.17 (s, 3H, CH_3 Lev), 1.51, 1.50, 1.40, 1.36 (4s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 206.14 (1C, C=O Lev), 171.60, 167.66, 162.34, (3C, C-6 GlcA et C=O), 133.33, 129.16, 128.35, 128.04, 127.82, 127.24, 126.13, 125.42 (10C, Ar), 112.34 (1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 102.91, 99.25, 97.80 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, C-1 GalN et C-1 GlcA), 91.54 (1C, CCl_3), 75.81, 75.47, 74.39, 70.90, 68.74, 66.72 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 71.50 (1C, CH_2 -Ar), 62.88 (1C, C-6 GalN), 52.95, 52.02 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 37.73, 27.83 (2C, CH_2 Lev), 29.99, 29.36, 26.60, 21.58, 18.59 (5C, CH_3 Lev, $(\text{CH}_3)_2$ isopropylidène).

ES-SM : m/z 830 $[\text{M-H}]^-$, 747 $[\text{M-C}(\text{CH}_3)_2]^-$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{Cl}_3\text{NO}_{14}$: C, 53.34 ; H, 5.32 ; N, 1.68 ; trouvée C, 53.55 ; H, 5.45 ; N, 1.72.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl 2,3-di-O-acétyl-4-O-lévulinoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (92a)

A une solution chauffée à 100°C de disaccharide **91** (4.19 g, 5.02 mmol) dissous dans l'AcOH (42 mL) est ajoutée de l'eau distillée (26 mL). Le mélange réactionnel est agité à 100°C pendant 45 minutes, puis est concentré et coévaporé à l'eau puis au toluène. Le solide obtenu et l'Ac₂O (3.8 mL, 40.19 mmol, 8eq) dissous dans la pyridine (40 mL) sont agités toute la nuit à température ambiante. La solution est concentrée puis coévaporée au toluène. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 3 : 2) donne le produit désiré (2.69 g, 58%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -18 (c 1.00, CHCl₃).

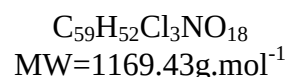
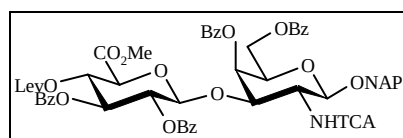
F 158°C (*i*-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 7.84-7.38 (m, 7H, Ar), 6.68 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH GalN), 5.43 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.20-5.10 (m, 3H, H-2, H-3 et H-4 GlcA), 4.91 (Abq, 2H, CH₂-Ar), 4.88 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.69 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.51 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.20-4.10 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 3.96 (d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.90-3.81 (m, 2H, H-2 et H-5 GalN), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 2.73-2.61 (m, 2H, CH₂ Lev), 2.48-2.40 (m, 2H, CH₂ Lev), 2.13, 2.12, 2.09, 2.01 (4s, 15H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ (ppm) 205.95 (1C, C=O Lev), 171.13, 170.67, 170.35, 169.98, 166.83, 162.15 (7C, C-6 GlcA et C=O), 133.91, 133.28, 128.53, 128.02, 127.44, 126.42, 126.35, 126.12 (10C, Ar), 99.77, 97.94 (2C, C-1 GalN et C-1 GlcA), 92.44 (1C, CCl₃), 73.71, 72.56, 71.94, 71.49, 70.42, 69.24, 68.43 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 71.00 (1C, CH₂-Ar), 62.29 (1C, C-6 GalN), 55.54, 53.05 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 37.68, 27.75 (2C, CH₂ Lev), 29.76 (1C, CH₃ Lev), 20.89, 20.79, 20.69 (4C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 937 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₉H₄₄Cl₃NO₁₈ : C, 50.85 ; H, 4.81 ; N, 1.52 ; trouvée C, 50.82 ; H, 4.92 ; N, 1.43.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (92b)

Le disaccharide **91** (4.76 g, 5.07 mmol) est dissous à 100°C dans de l'AcOH (56 mL). L'eau distillée (37 mL) est ajoutée et le mélange réactionnel est agité à 100°C pendant 45 minutes, puis est concentré et coévaporé à l'eau puis au toluène. Le solide obtenu et du BzCl (5 mL, 0.05 mol, 8eq) dissous dans la pyridine (50 mL) sont agités 2 heures à 0°C. Du MeOH (4.8 mL) est ensuite ajouté, le mélange réactionnel est agité 15 à 20 minutes puis est dilué avec du CH₂Cl₂, lavé avec de l'eau puis avec une solution de NaHCO₃ saturée et enfin avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, concentrée puis coévaporée au toluène. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 1 : 1) donne le produit désiré **23** (5.25g, 74%) sous la forme d'une poudre blanche.

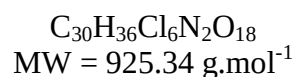
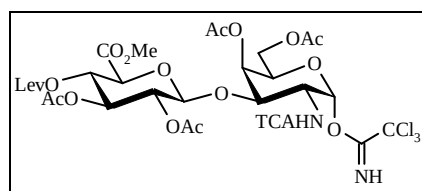
$[\alpha]_D^{20} +24.5$ (c 1.01, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 8.17-7.71 (m, 27H, Ar), 6.76 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 6Hz, NH GalN), 5.86 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.55 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.41 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 5.91 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 GlcA), 5.13 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.88 (Abq, 2H, CH₂-Ar), 4.89 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.87 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 10Hz, H-3 GalN), 4.56-4.50 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 4.16 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.12-4.08 (m, 1H, H-5 GalN), 3.87-3.81 (m, 1H, H-2 GalN), 3.71 (s, 3H, COOCH₃), 2.62-2.31 (m, 4H, CH₂ vv), 2.02 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ (ppm) 205.76 (1C, C=O Lev), 171.12, 168.85, 166.25, 165.64, 164.72, 162.27 (7C, C-6 GlcA et C=O), 133.82, 133.48, 133.41, 133.33, 133.26, 130.23, 129.96, 129.78, 129.01, 128.76, 128.61, 128.45, 128.00, 127.80, 127.52, 126.33, 126.33, 126.12 (34C, Ar), 100.53, 97.43 (2C, C-1 GlcA et C-1 GalN), 92.13 (1C, CCl₃), 73.40, 72.79, 72.31, 72.01, 71.64, 69.92, 69.39 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 71.38 (1C, CH₂-Ar), 63.03 (1C, C-6 GalN), 56.59, 53.07 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 37.78, 27.80 (2C, CH₂ Lev), 29.65 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1190 [M+Na]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₅₉H₅₂Cl₃NO₁₈: C, 60.60 ; H, 4.48 ; N, 1.20 ; trouvée C, 60.35 ; H, 4.56 ; N, 1.27.



O-(Méthyl 2,3-di-O-acétyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranose (93a)

A une solution de disaccharide **92a** (943 mg, 0.79 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 (9 mL) et du MeOH (1 mL), est ajouté du DDQ (693 mg, 3.05 mmol, 3eq). Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température ambiante. La solution est ensuite diluée dans du CH_2Cl_2 et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (3 fois), séchée sur MgSO_4 , puis concentrée pour donner un solide marron. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 9 : 1) donne le produit désiré (620 mg, 78%) sous la forme d'une poudre jaune pâle.

A une solution d'hémiacétal précédemment obtenu (620 mg, 0.79 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (7 mL) sont ajoutés successivement du trichloroacétonitrile (796 μL , 7.94 mmol, 10eq) et du DBU (30 μL , 0.20 mmol, 0.25eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes sous argon à température ambiante. La solution est concentrée pour donner une huile noire. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 2 : 1 avec 0.1% Et_3N) donne le produit désiré (464 mg, 63%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +55$ (c 0.97, CHCl_3).

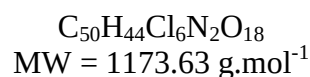
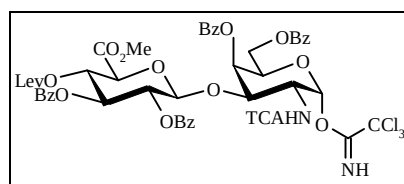
F 100°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 8.78 (s, 1H, C=NH), 6.88 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 8Hz, NH GalN), 6.49 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3Hz, H-1 GalN), 5.42 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.21-5.13 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 5.10-5.01 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.81 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.62 (ddd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 4.32-4.27 (m, 2H, H-3 et H-5 GalN), 4.21-3.99 (m, 3H, H-5 GlcA, H-6a et H-6b GalN), 3.74 (s, 3H, COOCH_3), 2.73-2.68 (m, 2H, CH_2 Lev), 2.50-2.46 (m, 2H, CH_2 Lev), 2.15, 2.08, 2.05, 2.03 (4s, 15H, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 205.84 (1C, C=O Lev), 171.12, 170.48, 170.20, 169.70, 166.66, 162.12, 160.35 (8C, C-6 GlcA, C=O et C=NH), 98.92 (1C, C-1 GlcA), 94.57 (1C, C-1 GalN), 92.27, 90.76 (2C, CCl_3), 73.08, 71.92, 70.55, 69.99, 69.73, 68.10 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 61.55 (1C, C-6 GalN), 53.25, 50.66 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 37.65, 27.69 (2C, CH_2 Lev), 29.74 (1C, CH_3 Lev), 20.95, 20.72, 20.66 (4C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 762 $[\text{M-OC(NH)CCl}_3]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{O}_{18}$: C, 38.94 ; H, 3.92 ; N, 3.03 ; trouvée C, 38.56 ; H, 3.73 ; N, 2.88.



O-(Méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévilinoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl- α -D-galactopyranose (93b)

A une solution de disaccharide **92b** (2.9 g, 2.48 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 (27 mL) et du MeOH (3 mL), est ajouté du DDQ (1.69 g, 7.44 mmol, 3eq). Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température ambiante. La solution est ensuite diluée dans du CH_2Cl_2 et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (3 fois), séchée sur MgSO_4 , puis concentrée pour donner un solide marron. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 18 : 1) donne le produit désiré (1.80 g, 73%) sous la forme d'une poudre jaune pâle.

A une solution d'hémiacétal précédemment obtenu (1.80 mg, 1.75 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (18 mL) sont ajoutés successivement du trichloroacétonitrile (1.76 mL, 17.52 mmol, 10eq) et du DBU (65.5 μL , 0.44 mmol, 0.25eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes sous argon à température ambiante. La solution est concentrée pour donner une huile noire. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt /EP 2 : 3 avec 0.1% Et_3N) donne le produit désiré (1.58 g, 77%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +89$ (c 1.05, CHCl_3).

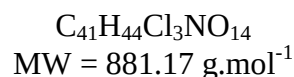
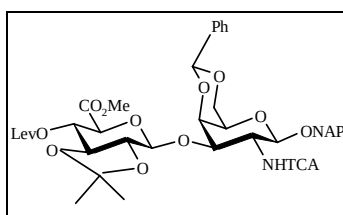
F 115°C (CH_2Cl_2 /EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 8.70 (s, 1H, C=NH), 8.18-7.72 (m, 8H, Ar), 7.60-7.23 (m, 12H, Ar), 6.95 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH GalN), 6.69 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3Hz, H-1 GalN), 5.95 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.64 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.45 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2 GlcA), 5.41 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 5.16 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.82-4.78 (m, 1H, H-2 GalN), 4.62-4.58 (m, 2H, H-3 et H-6a GalN), 4.43-4.38 (m, 2H, H-5 et H-6b GalN), 4.23 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5 GlcA), 3.69 (s, 3H, COOCH_3), 2.62-2.34 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.04 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 205.84 (1C, C=O Lev), 171.12, 170.48, 170.20, 169.70, 166.66, 162.12, 160.35 (8C, C-6 GlcA, C=O et C=NH), 98.92 (1C, C-1 GlcA), 94.57 (1C, C-1 GalN), 92.27, 90.76 (2C, CCl_3), 73.08, 71.92, 70.55, 69.99, 69.73, 68.10 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 61.55 (1C, C-6 GalN), 53.25, 50.66 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 37.65, 27.69 (2C, CH_2 Lev), 29.74 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 1026 $[\text{M}-\text{C}(\text{NH})\text{CCl}_3]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{50}\text{H}_{44}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{O}_{18}$: C, 51.17 ; H, 3.78 ; N, 2.39 ; trouvée C, 51.06 ; H, 4.04 ; N, 2.39.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl 2,3-O-isopropylidène-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-4,6-O-benzylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (98)

Un mélange de disaccharide **179** (4.64 g, 5.94 mmol) et d'acide lévulinique (833 mg, 7.13 mmol, 1.2eq) est dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (46 mL) sous argon. La DMAP (220 mg, 1.78 mmol, 0.3eq) et la DCC (1.48 mg, 7.13 mmol, 1.2eq) sont ajoutées et le mélange réactionnel est agité 2 heures à température ambiante sous argon. La solution est ensuite filtrée sur büchner et le solide est rincé avec du CH₂Cl₂. Le filtrat est lavé successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO₃ saturée et avec de l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 avec 0.2% de Et₃N) donne le produit désiré (5 g, 96%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -9 (c 1.04, CHCl₃).

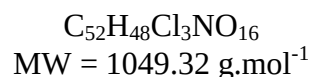
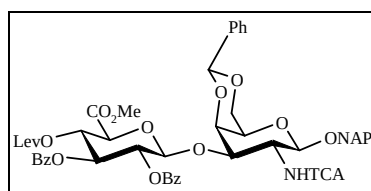
F 213°C (AcOEt).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 7.81-7.33 (m, 12H, Ar), 7.17 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 6.5Hz, NH GalN), 5.61 (s, 1H, CH-Ph), 5.29 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 5.26 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5}$ 9Hz, H-4 GlcA), 4.94 (ABq, 2H, CH₂-Ar), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.71 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.43 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1$ Hz, H-4 GalN), 4.38 (d, 1H, $J_{6a,6b}$ 12.5Hz, H-6a GalN), 4.13 (d, 1H, H-6b GalN), 3.92 (d, 1H, H-5 GlcA), 3.91-3.85 (m, 1H, H-2 GalN), 3.69 (s, 3H, COOCH₃), 3.63-3.55 (m, 3H, H-5 GalN, H-2 et H-3 GlcA), 2.83-2.64 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.19 (s, 3H, CH₃ Lev), 1.38, 1.35 (2s, 6H, C(CH₃)₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.97 (1C, C=O Lev), 171.53, 167.66, 162.29 (3C, C-6 GlcA et C=O), 137.73, 134.33, 133.18, 133.10, 128.89, 127.90, 127.67, 127.10, 126.39, 126.09, 126.04, 125.99 (16C, Ph), 112.42 (1C, C(CH₃)₂), 102.44 (1C, C-1 GlcA), 100.83 (1C, CH-Ph), 97.60 (1C, C-1 GalN), 92.24 (1C, CCl₃), 77.23 (1C, C-3 GlcA), 75.90, 75.80 (2C, C-4 GalN et C-2 GlcA), 74.46, 74.39 (2C, C-3 GalN et C-5 GlcA), 71.30 (1C, CH₂-Ar), 70.92 (1C, C-4 GlcA), 69.08 (1C, C-6 GalN), 66.70 (1C, C-5 GalN), 55.53 (1C, C-2 GalN), 52.92 (1C, COOCH₃), 37.58, 27.65 (2C, CH₂ Lev), 29.84 (1C, CH₃ Lev), 26.62, 26.48 (2C, C(CH₃)₂).

ES-SM : m/z 897 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse calculée pour C₄₁H₄₄Cl₃NO₁₄ : C, 55.89 ; H, 5.03 ; N, 1.59 ; trouvée C, 55.63 ; H, 5.07 ; N, 1.52.



2-Naphtylmethyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-4,6-O-benzylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (100)

Une solution de disaccharide **181** (3.5 g, 4.16 mmol) et de BzCl (1.9 mL, 16.64 mmol, 4eq) dissous dans un mélange de pyridine (11 mL) et de CH₂Cl₂ anhydre (23 mL), est agitée 1 heure à 0°C sous argon. Du MeOH (1.5 mL) est ensuite ajouté, le mélange réactionnel est agité 15 à 20 minutes puis est dilué avec du CH₂Cl₂, lavé avec de l'eau puis avec une solution de NaHCO₃ saturée et enfin avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, concentrée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une recrystallisation dans le MeOH à reflux puis une purification des eaux mères par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 19 : 1) donne le produit désiré (3.15g, 72%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +28$ (c 1.02, CHCl₃).

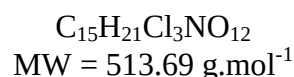
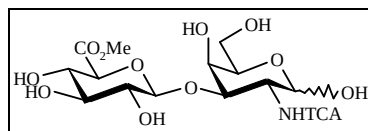
F 234°C (MeOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 7.89-7.33 (m, 22H, Ar), 6.98 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH GalN), 5.61 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3 GlcA), 5.58 (s, 1H, CH-Ph), 5.52-5.45 (m, 2H, H-2 et H-4 GlcA), 5.22 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 5.18 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.91 (ABq, 2H, CH₂-Ar), 4.76 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11.5Hz, H-3 GalN), 4.50 (dd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, H-4 GalN), 4.40 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ <1Hz, $J_{6a,6b}$ 12.5Hz, H-6a GalN), 4.19 (d, 1H, $J_{4,5}$ 11.5Hz, H-5 GlcA), 4.11 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ <1Hz, H-6b GalN), 3.89-3.81 (m, 1H, H-2 GalN), 3.78 (s, 3H, COOCH₃), 3.55 (m, 1H, H-5 GalN), 2.66-2.34 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.05 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.68 (1C, C=O Lev), 171.23, 167.29, 165.50, 164.94, 162.26 (5C, C-6 GlcA et C=O), 137.63, 134.32, 133.40, 133.14, 133.02, 129.85, 129.79, 128.82, 128.62, 128.38, 128.15, 128.07, 127.87, 127.62, 126.16, 126.05, 125.94 (28C, Ar), 100.65 (1C, CH-Ph), 100.13 (1C, C-1 GlcA), 97.73 (1C, C-1 GalN), 92.13 (1C, CCl₃), 75.69 (1C, C-4 GalN), 73.38 (1C, C-3 GalN), 72.44 (1C, C-3 GlcA), 72.14 (C-5 GlcA), 71.39 (1C, CH₂-Ar), 71.19, 69.01 (2C, C-2 et C-4 GlcA), 69.43 (1C, C-6 GalN), 66.64 (1C, C-5 GalN), 55.15 (1C, C-2 GalN), 53.06 (1C, COOCH₃), 37.54, 27.61 (2C, CH₂ Lev), 29.55 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1070 [M+Na]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₅₂H₄₈Cl₃NO₁₆ : C, 59.58 ; H, 4.52 ; N, 1.34 ; trouvée C, 59.50 ; H, 4.55 ; N, 1.27.



O-(Méthyl β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-2-trichloroacétamido-D-galactopyranose (118)

A une solution de disaccharide **89** (31.89 g, 008 mol) dans la pyridine (320 mL) est ajouté lentement à 0°C du TCACl (99 mL, 0.89 mol, 11.2eq) sous argon. Le mélange réactionnel est ensuite agité 1 heure à 0°C, puis de l'eau est ajoutée goutte à goutte. La solution est diluée et extraite 2 fois avec du CH₂Cl₂ (800 mL puis 300 mL), la phase organique est lavée avec de l'eau (500 mL) puis avec une solution de NaCl saturée (500 mL), puis elle est séchée rapidement sur MgSO₄ et concentrée. Le résidu obtenu est agité 4 heures à température ambiante dans un mélange de CH₂Cl₂-MeOH-pyridine (1 : 1 : 1, 280 mL), puis la solution est concentrée et enfin évaporée avec un mélange EtOH/Toluène. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 5 : 1 puis 4 : 1) donne le produit désiré (20 g, 50%) sous la forme d'une poudre blanche.

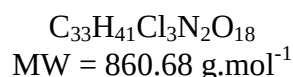
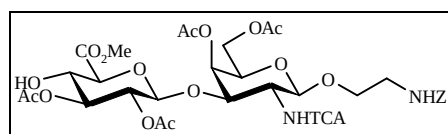
$[\alpha]_D^{20} +35$ (c 1.00, MeOH).

RMN ¹H (D₂O, 250 MHz): δ(ppm) 5.22 (d, $J_{1,2}$ 3.5Hz, H-1α GalN), 4.72 (d, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1β GalN), 4.60, 4.52 (2d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.15 (dd, 1H, $J_{4,3}<1\text{Hz}$, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 3.96, 3.94 (2d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.76, 3.74 (2s, 3H, COOCH₃), 3.39, 3.37 (2dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3 GlcA), 3.28, 3.27 (2dd, 1H, H-2 GlcA).

RMN ¹³C (D₂O, 62.5 MHz): δ(ppm) 171.20, 165.00 (2C, C-6 GlcA et C=O), 104.07, 103.81 (1C, C-1 GlcA), 101.98 (1C, C-1β GalN), 94.71 (1C, C-1α GalN), 91.85, 90.75 (1C, CCl₃), 82.93, 79.30 (1C, C-3 GalN), 74.62, 74.20, 72.67, 72.60, 71.51, 71.36, 70.37 (6C, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 61.29, 61.06 (1C, C-6 GalN), 54.79, 53.88 (1C, COOCH₃), 51.49, 49.07 (1C, C-2 GalN).

ES-MS : m/z 535 [M+Na]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₁₅H₂₁Cl₃NO₁₂ : C, 35.07 ; H, 4.12 ; N, 2.73 ; trouvée C, 34.80 ; H, 4.31 ; N, 2.54.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-acétyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (121a)

A une solution de disaccharide **137a** (365.5 mg, 0.38 mmol) dans la pyridine (3.5 mL) est ajouté un mélange de pyridine-acide acétique-hydrazine monohydrate (12 : 8 : 1, 8 mL). Le mélange réactionnel est agité 8 minutes à température ambiante puis est dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (3 fois) puis à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , concentrée et enfin coévaporée au toluène (2 fois) pour donner un solide blanc. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/toluène 2 : 1) donne le produit désiré (263.5 mg, 80%) sous la forme d'une poudre blanche.

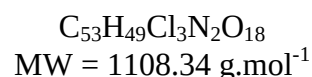
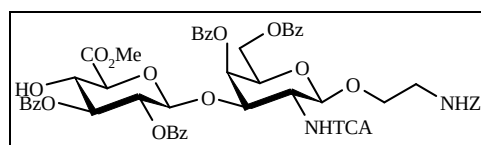
$[\alpha]_D^{20} +1$ (c 0.95, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 7.39-7.32 (m, 5H, Ph), 6.72 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH GalN), 5.49 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.21-5.17 (m, 1H, NHC(O)O), 5.18 (s, 2H, CH_2 -Ph), 5.02-4.98 (m, 1H, H-3 GlcA), 4.91-4.83 (m, 2H, H-1 GalN et H -2 GlcA), 4.69 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.39 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.20-3.99 (m, 3H, H-6a, H-6b GalN et H-5 GlcA), 3.92-3.82 (m, 3H, H-5 GalN, H-4 GlcA et O- CH_2), 3.79 (s, 3H, COOCH_3), 3.78-3.67 (m, 2H, H-2 GalN et O- CH_2), 3.45-3.35 (m, 2H, CH_2 -N), 3.13 (d, 1H, $J_{\text{OH},4}$ 3Hz, OH), 2.11, 2.05, 2.04, 2.02 (4s, 12H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 176.96, 170.82, 170.67, 169.98, 168.96, 162.34 (6C, C-6 GlcA et C=O), 156.52 (1C, NHC(O)O), 136.51, 128.67, 128.33 (6C, Ph), 100.28, 99.44 (2C, C-1 GalN et C-1 GlcA), 92.36 (1C, CCl_3), 74.27, 73.83, 71.61, 71.11, 69.89, 68.59 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 69.66 (1C, O- CH_2), 66.94 (1C, CH_2 -Ph), 62.42 (1C, C-6 GalN), 55.54, 53.14 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 41.08 (1C, CH_2 -N), 20.95, 20.87, 20.82, 20.79 (4C, OC(O)CH_3).

ES-MS : m/z 857 $[\text{M-H}]^-$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{18} + \text{H}_2\text{O}$: C, 45.14 ; H, 4.83 ; N, 3.19 ; trouvée C, 45.44 ; H, 4.83 ; N, 3.12.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (121b)

A une solution de disaccharide **137b** (882 mg, 0.73 mmol) dans la pyridine (0.9 mL) est ajouté un mélange de pyridine-acide acétique-hydrazine monohydrate (12 : 8 : 1, 18 mL). Le mélange réactionnel est agité 8 minutes à température ambiante puis est dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois), la phase organique est ensuite lavée à l'eau, avec une solution de NaHCO_3 saturée (3 fois) et à l'eau, puis est séchée sur MgSO_4 , concentrée et enfin coévaporée au toluène (2 fois) pour donner un solide blanc. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 1 : 1) donne le produit désiré (621 mg, 75%) sous la forme d'une poudre blanche.

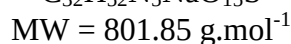
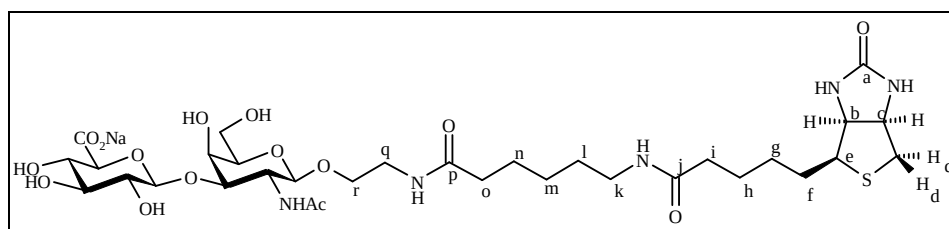
$[\alpha]_D^{20} +39$ (c 1.07, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.09-7.71 (m, 25H, Ar), 6.88 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH GalN), 5.89 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.43 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.30-5.22 (m, 1H, H-2 GlcA), 5.12-5.09 (m, 1H, NHC(O)O), 5.09 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 5.01 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.96 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1 GlcA), 4.84 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.49-4.38 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 4.57-4.51 (m, 2H, H-5 GalN et H-4 GlcA), 4.08 (d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.91-3.80 (m, 1H, O- CH_2), 3.77 (s, 3H, COOCH_3), 3.72-3.61 (m, 2H, H-2 GalN et O- CH_2), 3.42-3.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.33 (d, 1H, $J_{\text{OH},4}$ 3Hz, OH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 169.04, 166.40, 166.26, 165.73, 164.99, 162.47, (6C, C-6 GlcA et C=O), 156.44 (1C, NHC(O)O), 136.50, 133.45, 133.35, 130.16, 129.97, 129.93, 129.83, 129.70, 129.04, 128.87, 128.59, 128.57, 128.47, 128.43, 128.21 (30C, Ar), 100.83 (1C, C-1 GlcA), 99.02 (1C, C-1 GalN), 92.02 (1C, CCl_3), 74.74 (1C, C-3 GlcA), 74.52 (1C, C-5 GlcA), 73.80 (1C, C-3 GalN), 72.04 (1C, C-5 GalN), 71.63 (1C, C-2 GlcA), 70.03 (1C, C-4 GlcA), 69.92 (1C, C-4 GalN), 69.47 (1C, O- CH_2), 66.81 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 60.01 (1C, C-6 GalN), 56.30 (1C, C-2 GalN), 53.04 (1C, COOCH_3), 40.94 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$).

ES-MS : m/z 1129 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{53}\text{H}_{49}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{18}$: C, 57.44 ; H, 4.46 ; N, 2.53 ; trouvée : C, 57.79 ; H, 4.62 ; N, 2.45.



2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (122)

Le disaccharide **129** (19 mg, 32 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

Un mélange de l'amine précédemment obtenue (15 mg, 32 μmol) et de réactif biotinylé (58 mg, 0.13 mmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (17 mg, 67%) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 3 : 2 : 1).

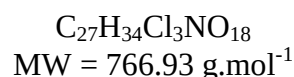
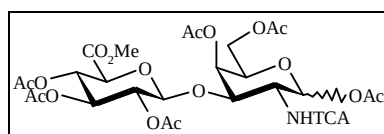
$[\alpha]_D^{20}$ -0.5 (c 0.99, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.62 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.52 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1 GalN), 4.51 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.43 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.19 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 4.03 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 3.96-3.90 (m, 1H, CH₂-r), 3.84 (dd, 1H, H-3 GalN), 3.82-3.67 (m, 6H, H-5, H-6a, H-6b GalN, H-5 GlcA et CH₂-r), 3.53-3.46 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 3.40-3.32 (m, 4H, H-2 GlcA, H-e et CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.29-2.23 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.03 (s, 3H, NHC(O)CH₃), 1.80-1.30 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.61, 177.27, 176.57, 175.34 (4C, C-6 GlcA et C=O), 165.99 (1C, C-a), 104.74 (1C, C-1 GlcA), 102.01 (1C, C-1 GalN), 80.80 (1C, C-3 GalN), 76.80, 75.99 (2C, C-5 GalN et C-5 GlcA), 75.56, 72.44 (2C, C-3 et C-4 GlcA), 73.37 (1C, C-2 GlcA), 68.77 (1C, C-r), 68.35 (1C, C-4 GalN), 62.76 (1C, C-b), 61.71 (1C, C-6 GalN), 60.91 (1C, C-c), 56.06 (1C, C-e), 51.83 (1C, C-2 GalN), 40.36 (1C, C-d), 39.93, 39.74 (2C, C-k et C-q), 36.30, 36.18 (2C, C-i et C-o), 28.69, 28.51, 28.34, 26.25, 25.89, 25.66 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 22.95 (1C, NHC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 778 [M-Na]⁺.

HR-MS(ES): m/z: calculée pour C₃₂H₅₃Na N₅O₁₅S ([M+H]⁺): 802.3157 ; trouvée : 802.3149.



O-(Méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-1,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-D-galactopyranose (124)

A une solution refroidie à 0°C de disaccharide **126** (14.42 g, 18.32 mmol) dans du CH₂Cl₂ (275 mL), un mélange de TFA et d'eau (3 : 1, 18 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 3 heures (suivi CCM : CH₂Cl₂/MeOH 13 : 1 avec 0.1% de Et₃N), puis une solution aqueuse de l'AcONa.3H₂O (49.50 g, 0.36 mol) est ajoutée. La phase aqueuse est ensuite extraite avec du CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchée sur MgSO₄ et concentrée.

Le disaccharide obtenu et l'Ac₂O (10 mL, 0.11 mol, 5eq) dissous dans la pyridine (130 mL) sont agités une nuit à température ambiante. La pyridine est évaporée puis coévaporée au toluène. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 3 : 2) donne le produit désiré (8.57 g, 60 % ; 91/9 α/β) sous la forme d'une poudre blanche.

Composé α :

$[\alpha]_D^{20} +41$ (c 0.98, CHCl₃).

F 175°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 6.97 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH GalN), 6.37 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3Hz, H-1 GalN), 5.35 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.27-5.19 (m, 3H, H-2, H-3 et H-4 GlcA), 4.84 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.51 (ddd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 4.41 (dd, 1H, H-3 GalN), 4.52-4.31 (m, 1H, H-5 GalN), 4.13-4.05 (m, 3H, H-5 GlcA, H-6a et H-6b GalN), 3.76 (s, 3H, COOCH₃), 2.15, 2.12, 2.02 (3s, 18H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 171.76, 171.31, 170.93, 170.69, 170.49, 169.84, 168.18, 163.10 (8C, C-6 GlcA et C=O), 99.22 (1C, C-1 GlcA), 93.49 (1C, CCl₃), 91.70 (1C, C-1 GalN), 73.89, 73.06, 70.63, 70.25, 70.10, 69.29 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 62.32 (1C, C-6 GalN), 54.33, 51.27 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 21.99, 21.94, 21.81, 21.79, 21.66, 21.57 (6C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 788 [M+Na]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₂₇H₃₄Cl₃NO₁₈ : C, 42.28 ; H, 4.47 ; N, 1.83 ; trouvée C, 42.12 ; H, 4.60 ; N, 1.71.

Composé β :

$[\alpha]_D^{20} +12$ (c 1.05, CHCl_3).

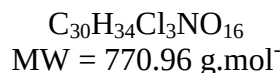
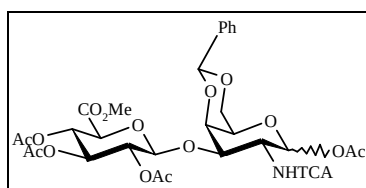
F 213-214°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 6.71 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9Hz, NH GalN), 5.90 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 5.45 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.22-5.12 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 4.97 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, $J_{2,3}$ 9Hz, H-2 GlcA), 4.74 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.35 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.16 (ddd, 1H, H-2 GalN), 4.11-3.95 (m, 4H, H-5 GlcA, H-5, H-6a et H-6b GalN), 3.75 (s, 3H, COOCH_3), 2.11, 2.10, 2.05, 2.03, 2.01, 2.00 (6s, 18H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 171.34, 170.77, 170.47, 170.26, 170.05, 169.89, 167.58, 162.85 (8C, C-6 GlcA et C=O), 100.26, 91.70 (2C, C-1 GalN et C-1 GlcA), 94.53 (1C, CCl_3), 74.45, 73.36, 73.23, 72.74, 71.27, 69.88, 68.61 (7C, C-3 C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 62.55 (1C, C-6 GalN), 54.23, 53.82 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 21.52, 21.37, 21.32, 21.24 (6C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 788 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{Cl}_3\text{NO}_{18}$: C, 42.28 ; H, 4.47 ; N, 1.83 ; trouvée C, 42.30 ; H, 4.56 ; N, 1.77.



O-(Méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-1-O-acétyl-4,6-O-benzylidène-2-désoxy-2-trichloroacétamido-D-galactopyranose (126)

A un mélange de disaccharide **118** (18.83 g, 0.04 mol) et de benzaldéhyde (150 mL) agité à température ambiante, sous flux d'argon, est ajouté du TFA (7.5 mL, 0.10 mol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 24 heures. De l'AcONa (16.56 g, 0.20 mol) est additionné et l'agitation est laissée 30 minutes puis la pyridine (150 mL) et de l'Ac₂O (417 mL, 0.44 mol, 12eq) sont ajoutés. La solution est agitée à température ambiante toute la nuit. Le mélange réactionnel est ensuite versé dans 600 mL d'eau glacée et est agité 1 heure. La phase aqueuse est extraite 2 fois avec du CH₂Cl₂, puis la phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchée sur MgSO₄, concentrée puis coévaporée plusieurs fois au toluène. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/EP 5 : 1, puis CH₂Cl₂ 100% puis CH₂Cl₂/acétone 15 : 1) donne le produit α sous la forme d'une poudre blanche, puis l'élution avec CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 donne le produit β sous la forme d'une poudre blanche (23.16 g, 81% ; 80/20 α/β).

Composé α :

$[\alpha]_D^{20} +45$ (c 1.00, CHCl₃).

F 124-125°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 7.51-7.48 (m, 2H, Ph), 7.38-7.30 (m, 3H, Ph), 6.80 (d, 1H, *J*_{NH,2} 7.5Hz, NH GalN), 6.48 (d, 1H, *J*_{1,2} 3.5Hz, H-1 GalN), 5.50 (s, 1H, CH-Ph), 5.27-5.21 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 5.11-5.03 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.95 (d, 1H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.60 (ddd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-2 GalN), 4.51 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3.5Hz, H-4 GalN), 4.47 (dd, 1H, H-3 GalN), 4.28 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 1.5Hz, *J*_{6a,6b} 13Hz, H-6a GalN), 4.13-4.02 (m, 2H, H-5 GlcA et H-6b GalN), 3.79-3.76 (m, 1H, H-5 GalN), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 2.01, 2.00, 1.99 (3s, 12H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 171.24, 171.08, 170.88, 170.74, 168.48, 163.08 (6C, C-6 GlcA et C=O), 138.83, 130.47, 129.87, 129.66, 127.60, 127.31 (6C, Ph), 102.28, 99.81 (2C, C-1 GlcA et CH-Ph), 93.83 (1C, CCl₃), 92.67 (1C, C-1 GalN), 75.85, 73.80, 73.22, 71.89, 71.39, 70.41, 70.36 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 66.37 (1C, C-6 GalN), 54.57, 51.05 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 22.46, 22.21, 22.03, 21.91 (4C, OC(O)CH₃).

ES-MS : *m/z* 762 [M+Na]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₀H₃₄Cl₃NO₁₆ : C, 48.63 ; H, 4.63 ; N, 1.89 ; trouvée C, 48.50 ; H, 4.73 ; N, 1.78.

Composé β :

$[\alpha]_D^{20} +25$ (c 1.05, CHCl_3).

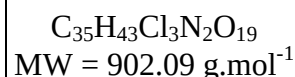
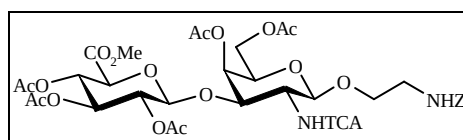
F 245-246°C (EtOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 7.56-7.49 (m, 2H, Ph), 7.41-7.32 (m, 3H, Ph), 7.06 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 8Hz, NH GalN), 6.00 (d, 1H, $J_{1,2}$ 9Hz, H-1 GalN), 5.50 (s, 1H, CH-Ph), 5.28-5.12 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 5.08-5.00 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.47 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3.5Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.42 (dd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, H-4 GalN), 4.29 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 1Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a GalN), 4.23-3.93 (m, 3H, H-5 GlcA, H-2 et H-6b GalN), 3.61 (s, 3H, COOCH_3), 3.59-3.55 (m, 1H, H-5 GalN), 2.03, 2.00, 1.99 (3s, 12H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 168.32, 167.81, 167.75, 167.68, 165.46, 160.41 (6C, C-6 GlcA et C=O), 135.85, 127.24, 126.47, 124.46, 124.19 (6C, Ph), 98.94, 98.22, 89.43 (3C, C-1 GlcA, C-1 GalN et CHPh), 90.66 (1C, CCl_3), 73.27, 72.62, 70.54, 70.40, 69.39, 67.38, 65.72 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 67.07 (1C, C-6 GalN), 51.33, 51.29 (2C, C-2 GalN et COOCH_3), 19.13, 19.06, 18.87, 18.79 (4C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 762 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{Cl}_3\text{NO}_{16}$: C, 48.63 ; H, 4.63 ; N, 1.89 ; trouvée C, 48.70 ; H, 4.51 ; N, 1.81.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (127)

Un mélange d'imide **88** (100 mg, 0.57 mmol), de 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol (40 mg, 0.21 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (1 mL) sous argon, est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 23 µl, 23 µmol, 0.20eq/imide) est ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (10 µL, 69 µmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/*i*-PrOH 19 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (94 mg, 90%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +6$ (c 1.03, CHCl₃).

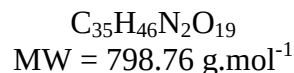
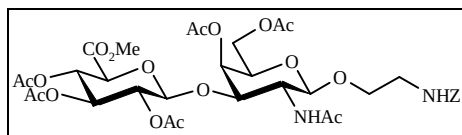
F 192-193°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 7.35 (s, 5H, Ph), 6.85 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH GalN), 5.44 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.21-5.15 (m, 3H, H-3, H-4 GlcA et NHC(O)O), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.99-4.91 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.84 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.72 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.50 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.16 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a GalN), 4.09-3.97 (m, 2H, H-6b GalN et H-5 GlcA), 3.91-3.82 (m, 2H, O-CH₂ et H-5 GalN), 3.76 (s, 3H, COOCH₃), 3.74-3.65 (m, 2H, H-2 GalN et O-CH₂), 3.45-3.35 (m, 2H, CH₂-N), 2.12, 2.05, 2.03, 2.01, 1.99 (5s, 15H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 169.07, 168.85, 168.41, 168.34, 165.8, 161.29 (7C, C-6 GlcA et C=O), 155.44 (1C, NHC(O)O), 135.47, 127.61, 127.25 (6C, Ph), 98.57 (1C, C-1 GlcA), 98.49 (1C, C-1 GalN), 91.33 (1C, CCl₃), 72.71, 71.54, 71.16, 70.51, 69.94, 68.13, 67.14 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 68.65 (1C, O-CH₂), 65.87 (1C, CH₂-Ph), 61.18 (1C, C-6 GalN), 54.35, 52.02 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 40.01 (1C, CH₂-N), 19.87, 19.74, 19.71, 19.62, 19.53 (5C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 899 [M-H]⁻ pour ³⁵Cl

Analyse élémentaire calculée pour C₃₅H₄₃Cl₃N₂O₁₉ : C, 46.60 ; H, 4.80 ; N, 3.11 ; trouvée C, 46.44 ; H, 4.92 ; N, 3.15.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (128)

A une solution de disaccharide **127** (186 mg, 0.21 mmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (2 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN (90 mg) et du *n*-Bu₃SnH (356 µL, 1.32 mmol, 6eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, puis chauffée 2 heures à 80°C et enfin est concentrée. Le produit est précipité dans l'éther de pétrole (5 mL) à 0°C pendant 1 heure, avant d'être filtré. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (88 mg, 53%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +5$ (*c* 1.31, CHCl₃)

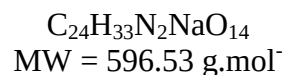
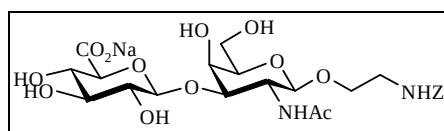
F 124°C (EtOH/Et₂O).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 7.35 (s, 5H, Ph), 6.07 (d, 1H, *J*_{NH,2} 7Hz, NH GalN), 5.37-5.34 (m, 1H, NHC(O)O), 5.33 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4 GalN), 5.22-5.12 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 5.09 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.97 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.85 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1 GalN), 4.73 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GlcA), 4.47 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3 GalN), 4.12 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 6Hz, *J*_{6a,6b} 11.5Hz, H-6a GalN), 4.03-3.99 (m, 2H, H-6b GalN et H-5 GlcA), 3.40-3.30 (m, 2H, H-5 GalN et O-CH₂), 3.74 (s, 3H, COOCH₃), 3.69-3.61 (m, 2H, H-2 GalN et O-CH₂), 3.38-3.32 (m, 2H, CH₂-N), 2.07, 2.04, 2.02, 2.01, 1.99 (5s, 18H, OC(O)CH₃ et NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 170.56, 170.06, 170.01, 169.54, 169.44, 167.09 (7C, C-6 GlcA et C=O), 156.54 (1C, NHC(O)O), 136.59, 128.55, 128.17 (6C, Ph), 100.39, 99.11 (2C, C-1 GalN et C-1 GlcA), 74.29, 72.28, 72.21, 71.22, 70.69, 69.27, 67.84 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 69.06 (1C, O-CH₂), 66.70 (1C, CH₂-Ph), 62.24 (1C, C-6 GalN), 53.77, 52.95 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 40.94 (1C, CH₂-N), 23.44 (1C, NHC(O)CH₃), 20.74, 20.70, 20.58, 20.49 (5C, OC(O)CH₃).

ES-SM : *m/z* 821 [M+Na]⁺.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₅H₄₆N₂O₁₉ + H₂O : C, 51.47 ; H, 6.04 ; N, 3.36 ; trouvée C, 51.49 ; H, 5.85 ; N, 3.72.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-galactopyranoside (129)

Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 559 μL , 0.56 mmol, 5eq) et de H_2O_2 (30%, 280 μL) est ajoutée goutte à goutte à une solution de disaccharide **128** (88 mg, 0.11 mmol) dissous dans du THF (2 mL) refroidie à -10°C. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, du MeOH (1.5 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.7 mL, 25eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, puis dilué dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 2.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (4 fois). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (45 mg, 67 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

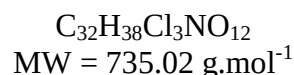
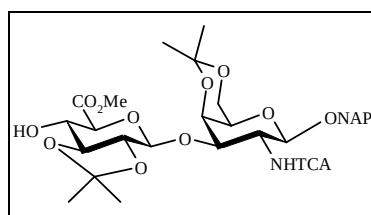
$[\alpha]_D^{20}$ -29 (c 1.04, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) 7.45 (s, 5H, Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.50 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.47 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.17 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 4.01 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 4.04-3.98 (m, 1H, O-CH₂), 3.91 (dd, 1H, H-3 GalN), 3.79-3.68 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 3.73-3.70 (m, 1H, H-5 GalN), 3.70 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5 GlcA), 3.68-3.63 (m, 1H, O-CH₂), 3.53-3.46 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 3.38-3.31 (m, 3H, H-2 GlcA et CH₂-N), 1.96 (s, 3H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 62.5 MHz): δ (ppm) 176.34, 175.18 (2C, C-6 GlcA et C=O), 158.71 (1C, NHC(O)O), 136.87, 129.29, 128.90, 128.33, 126.39 (6C, Ph), 104.59 (1C, C-1 GlcA), 101.98 (1C, C-1 GalN), 80.58 (1C, C-3 GalN), 76.54, 75.83, 75.88, 73.24, 72.31 (5C, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 68.18 (1C, C-4 GalN), 69.04 (1C, O-CH₂), 67.35 (1C, CH₂-Ph), 61.49 (1C, C-6 GalN), 51.67 (1C, C-2 GalN), 40.31 (1C, CH₂-N), 22.69 (1C, NHC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 574 [M+H-Na]⁺.

Analyse élémentaire calculée pour C₂₄H₃₃N₂NaO₁₂ : C, 48.32 ; H, 5.58 ; N, 4.70 ; trouvée C, 48.13 ; H, 5.59 ; N, 4.28.



2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3-O-isopropylidène-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-4,6-O-isopropylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (131)

Une solution de MeONa (quantité catalytique) est ajoutée à une solution de disaccharide **87** (1.86 g, 2.19 mmol) dans du MeOH anhydre (16 mL) et du CH₂Cl₂ anhydre (4 mL) placée sous argon. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures puis est neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺], filtré sur coton, concentré et séché sous vide.

A une solution de disaccharide précédemment obtenu (1.8 g, 2.75 mmol) et de (±)ACS (180 mg) dans le DMF (18 mL), est ajouté 6 fois toutes les 20 minutes, du 2-méthoxypropène (342 µL, 3.57 mmol, 1.3eq). De la Et₃N (960 µL) est ensuite additionnée et la solution est concentrée. Le mélange est dilué avec de l'AcOEt, la phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée puis plusieurs fois avec une solution de NaCl saturée, séchée sur MgSO₄ et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/toluène 3 : 2 avec 0.2% de Et₃N) donne le produit désiré (0.96 g, 60 %) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -29 (c 1.05, CHCl₃).

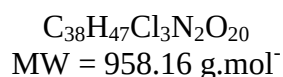
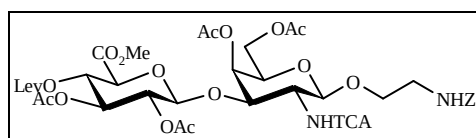
F 214°C (*i*-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 7.81-7.41 (m, 7H, Ar), 7.09 (d, 1H, *J*_{NH,2} 6.5Hz, NH GalN), 5.22 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GalN), 4.96 (Abq, 2H, CH₂-Ar), 4.83 (d, 1H, *J*_{1,2} 7Hz, H-1 GlcA), 4.59 (dd, 1H, *J*_{3,4} 3Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3 GalN), 4.47 (dd, 1H, *J*_{4,5} <1Hz, H-4 GalN), 4.15-4.03 (m, 3H, H-4 GlcA, H-6a et H-6b GalN), 3.81 (s, 3H, COOCH₃), 3.84-3.78 (m, 2H, H-2 GalN et H-5 GlcA), 3.55-3.39 (m, 2H, H-2 et H-3 GlcA), 3.47-3.45 (m, 1H, H-5 GalN), 3.28 (d, 1H, *J*_{OH,4} 2Hz, OH), 1.49, 1.46, 1.40, 1.36 (4s, 12H, C(CH₃)₂ isopropylidène).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 168.93, 161.89 (2C, C-6 GlcA et C=O), 133.32, 133.24, 128.39, 128.03, 127.82, 126.24 (10C, Ar), 112.25, 103.42 (2C, C(CH₃)₂), 99.17, 97.80 (2C, C-1 GalN et C-1 GlcA), 92.46 (1C, CCl₃), 79.45, 75.91, 75.81, 75.71, 70.96, 68.73, 66.70 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 71.51 (1C, CH₂-Ar), 62.94 (1C, C-6 GalN), 55.24, 52.92 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 26.80, 26.62 (4C, C(CH₃)₂ isopropylidène).

ES-SM : *m/z* 732 [M-H]⁻, 718 [M-CH₃]⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₂H₃₈Cl₃NO₁₂ : C, 52.29 ; H, 5.21 ; N, 1.91 ; trouvée C, 52.47 ; H, 5.32 ; N, 1.78.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-acétyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (137a)

Un mélange d'imidate **93a** (262 mg, 0.28 mmol), de 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol (100 mg, 0.51 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (2.6 mL) sous argon, est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 42.5 µL, 42 µmol, 0.15eq/imidate) est ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec Et₃N (18 µL, 0.13 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré et l'alcool résiduel en excès. Afin de pouvoir séparer ces deux produits, le mélange est dissous dans la pyridine (2 mL), sous argon, et du TBDMSCl (145 mg, 0.96 mmol, 1.5eq) est ajouté à la solution. Le mélange réactionnel est agité une nuit sous argon à température ambiante, puis est dilué avec du CH₂Cl₂. La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂, la phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée, séchée sur MgSO₄, et enfin concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (147 mg, 54%) sous la forme d'une poudre blanche.

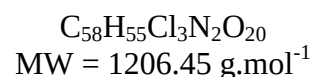
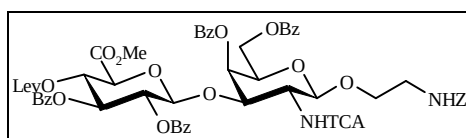
$[\alpha]_D^{20} +8$ (c 0.97, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 7.33-7.21 (m, 5H, Ph), 7.09 (d, 1H, *J*_{NH,2} 7.5Hz, NH GalN), 5.33 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4 GalN), 5.10-4.97 (m, 5H, H-3, H-4 GlcA, CH₂-Ph et NHC(O)O), 4.89-4.81 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.71 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GalN), 4.64 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GlcA), 4.39 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3 GalN), 4.08 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 6Hz, *J*_{6a,6b} 11.5Hz, H-6a GalN), 3.99-3.95 (m, 2H, H-6b GalN et H-5 GlcA), 3.81-3.71 (m, 2H, H-5 GalN et O-CH₂), 3.63 (s, 3H, COOCH₃), 3.62-3.57 (m, 2H, H-2 GalN et O-CH₂), 3.31-3.21 (m, 2H, CH₂-N), 2.63-2.59 (m, 2H, CH₂ Lev), 2.42-2.33 (m, 2H, CH₂ Lev), 2.07, 2.03, 1.96, 1.95 (4s, 15H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 209.97 (1C, C=O Lev), 171.15, 170.64, 170.33, 169.96, 169.49, 166.91, 162.34 (7C, C-6 GlcA et C=O), 156.52 (1C, NHC(O)O), 136.51, 128.64, 128.28 (6C, Ph), 99.68, 98.49 (2C, C-1 GalN et C-1 GlcA), 92.44 (1C, CCl₃), 73.77, 72.59, 71.94, 71.52, 70.90, 69.24, 68.22 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 70.90 (1C, O-CH₂), 66.99 (1C, CH₂-Ph), 62.25 (1C, C-6 GalN), 55.23, 53.11 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 41.04 (1C, CH₂-N), 37.67, 27.74 (2C, CH₂ Lev), 29.75 (1C, CH₃ Lev), 20.89, 20.78, 20.75, 20.08 (4C, OC(O)CH₃).

ES-SM : *m/z* 955 [M-H]⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₈H₄₇Cl₃N₂O₂₀ : C, 47.64 ; H, 4.94 ; N, 2.92; trouvée C, 47.56 ; H, 5.02 ; N, 2.85.



2-Benzylloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (137b)

Un mélange d'imide **93b** (1 g, 0.85 mmol), de 2-benzylloxycarbonylaminoéthanol (300 mg, 1.53 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) sous argon, est agité 30 minutes à température ambiante. Puis une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 128 µl, 0.13 mmol, 0.15eq/imide) est ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec Et₃N (54 µL, 0.38 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/toluène 1 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (918 mg, 89%) sous la forme d'une poudre blanche.

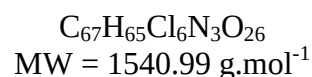
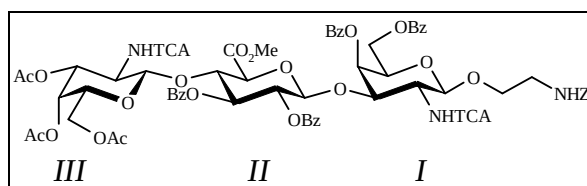
$[\alpha]_D^{20} +44$ (c 1.0, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 8.09-7.31 (m, 25H, Ar), 6.88 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 6.5Hz, NH GalN), 5.88 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.58 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 9.5Hz, $J_{2,3}$ 10Hz, H-3 GlcA), 5.42 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 5.21 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5 Hz, H-2 GlcA), 5.18-5.10 (m, 1H, NHC(O)O), 5.08 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 5.04 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.98 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.82 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.45-4.40 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 4.21 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.13-4.08 (m, 1H, H-5 GalN), 3.89-3.71 (m, 2H, H-2 GalN et O-CH₂), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 3.71-3.62 (m, 1H, O-CH₂), 3.41-3.29 (m, 2H, CH₂-N), 2.62-2.37 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.02 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 204.78 (1C, C=O Lev), 170.13, 165.88, 165.23, 164.64, 164.58, 163.82, 161.46 (7C, C-6 GlcA et C=O), 155.45 (1C, NHC(O)O), 136.99, 135.53, 132.46, 132.32, 129.19, 129.01, 128.93, 128.88, 128.72, 128.69, 128.16, 127.97, 127.74, 127.60, 127.57, 127.50, 127.46, 127.35, 127.21, 124.42 (30C, Ar), 99.48 (1C, C-1 GlcA), 98.15 (1C, C-1 GalN), 91.07 (1C, CCl₃), 72.73, 71.83, 71.35, 71.05, 70.69, 68.69, 68.34 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 68.52 (1C, O-CH₂), 65.81 (1C, CH₂-Ph), 61.88 (1C, C-6 GalN), 55.23, 52.12 (2C, C-2 GalN et COOCH₃), 39.97 (1C, CH₂-N), 36.77, 26.80 (2C, CH₂ Lev), 20.58 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1229 [M+Na]⁺ pour ³⁵Cl

Analyse élémentaire calculée pour C₅₈H₅₅Cl₃N₂O₂₀ + 2 H₂O : C, 56.07 ; H, 4.79 ; N, 2.25 ; trouvée C, 56.20 ; H, 4.26 ; N, 2.47.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (138)

Un mélange d'accepteur **121b** (200 mg, 0.18 mmol), d'imidate **61** (193 mg, 0.33 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (2 mL) sous argon, est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 66 µL, 66 µmol, 0.2eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (25 µL, 0.19 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée pour donner un solide rose pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 3 : 2 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (64.5 mg, 55%) sous la forme d'une poudre blanche.

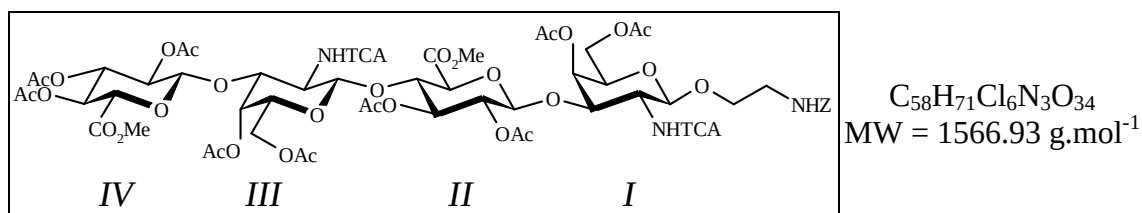
$[\alpha]_D^{20} +10$ (c 1.01, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.12-7.25 (m, 25H, Ar), 6.98 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH^I), 6.83 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH^{III}), 5.88 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.54 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 5.54 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-2^{II}), 5.20-5.13 (m, 1H, NHZ), 5.12 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.07 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 5.07 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.02 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.97 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1^{II}), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 4.82 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.48 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a^I), 4.40 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.29 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II}), 4.16-4.09 (m, 2H, H-5^I et H-5^{II}), 4.05-3.96 (m, 1H, H-2^{III}), 3.91-3.84 (m, 1H, O-CH₂), 3.79-3.62 (m, 3H, H-2^I, H-5^{III} et O-CH₂), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 3.44-3.31 (m, 2H, CH₂-N), 3.27 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 8Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a^{III}), 3.21 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, H-6b^{III}), 1.95, 1.94, 1.93 (3s, 9H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 170.14, 169.85, 169.82, 168.63, 166.02, 165.60, 165.01, 164.80, 162.30, 161.68 (10C, C-6^{II} et C=O), 156.23 (1C, NHC(O)O), 136.34, 133.30, 133.25, 133.22, 133.13, 129.94, 129.81, 129.61, 129.56, 129.51, 129.49, 129.46, 128.79, 128.44, 128.39, 128.32, 128.13, 128.00 (30C, Ar), 100.87 (1C, C-1^{II}), 100.05 (1C, C-1^{III}), 98.76 (1C, C-1^I), 92.40, 91.78 (2C, CCl₃), 75.80 (1C, C-4^{II}), 74.12 (1C, C-3^I), 73.50 (1C, C-5^{II ou III}), 72.05 (1C, C-3^{II}), 71.88 (1C, C-5^{II ou III}), 71.61 (1C, C-2^{II}), 70.74 (1C, C-3^{III}), 70.09 (1C, C-5^I), 69.80 (1C, C-4^I), 69.31 (1C, O-CH₂), 66.62 (1C, CH₂-Ph), 66.08 (1C, C-4^{III}), 62.87 (1C, C-6^I), 60.16 (1C, C-6^{III}), 56.08 (1C, C-2^I), 53.08 (1C, COOCH₃), 52.65 (1C, C-2^{III}), 40.78 (1C, CH₂-N), 20.53, 20.36, 20.34 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 1536 [M-H]⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₆₇H₆₅Cl₆N₃O₂₆ + H₂O: C, 51.92 ; H, 4.21 ; N 2.70 ; trouvée : C, 51.95 ; H, 4.38 ; N, 2.63.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (139)

Un mélange d'accepteur **121a** (150 mg, 0.17 mmol), d'imidate **88** (212 mg, 0.24 mmol, 1.4eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (1.5 mL) sous argon, est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 36 µl, 36 µmol, 0.15eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec Et₃N (15 µL, 0.11 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/toluène 3 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (181.5 mg, 67%) sous la forme d'une poudre blanche.

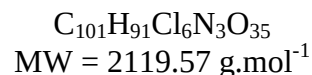
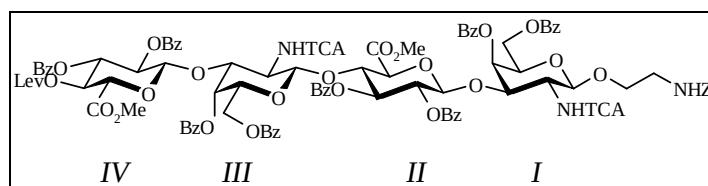
$[\alpha]_D^{20} +6$ (c 1.01, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 7.33-7.29 (m, 5H, Ph), 6.87, 6.78 (2d, 2H, $J_{NH,2}$ 8Hz, NH^I et NH^{III}), 5.46, 5.41 (2dd, 2H, $J_{4,5} < 1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I et H-4^{III}), 5.25-5.21 (m, 1H, NHC(O)O), 5.19-5.01 (m, 5H, H-3^{II}, H-3^{IV}, H-4^{IV} et CH₂Ph), 4.92 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 4.90-4.82 (m, 3H, H-1^I, H-2^{II} et H-2^{IV}), 4.69-4.61 (m, 2H, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.49, 4.28 (2dd, 2H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I et H-3^{III}), 4.20-3.70 (m, 7H, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-6a^{III}, H-6b^{III} et H-5^{IV}), 3.82-3.79 (m, 4H, H-2^{I ou III}, H-5^I, H-5^{III} et O-CH₂), 3.82, 3.78 (2s, 6H, COOCH₃), 3.77-3.65 (m, 2H, H-2^{I ou III} et O-CH₂), 3.47-3.36 (m, 2H, CH₂-N), 2.11, 2.04, 2.01, 2.00, 1.99, 1.98 (6s, 27H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 169.21, 168.50, 168.31, 166.89, 162.37, 162.11, 161.70 (13C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.49 (1C, NHC(O)O), 136.51, 136.43, 128.61, 128.26, 128.21 (6C, Ph), 100.51, 99.87, 99.44, 98.92 (4C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III} et C-1^{IV}), 92.63, 92.32 (2C, CCl₃), 75.18, 74.32, 73.74, 73.65, 72.47, 72.15, 71.98, 71.60, 71.39, 70.98, 70.78, 69.28, 68.76, 68.36 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.52 (1C, O-CH₂), 66.86 (1C, CH₂-Ph), 62.52, 61.81 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 55.24, 54.87, 53.30, 52.99 (4C, COOCH₃, C-2^{II} et C-2^{IV}), 40.96 (1C, CH₂-N), 20.87, 20.80, 20.75, 20.61, 20.52 (9C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 1562 [M-H]⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₅₈H₇₁Cl₆N₃O₃₄ : C, 44.46 ; H, 4.57 ; N, 2.68 ; trouvée C, 44.22 ; H, 4.47 ; N, 2.48.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (140)

Un mélange d'accepteur **121b** (650 mg, 0.59 mmol), d'imidate **93b** (895 mg, 0.76 mmol, 1.3eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (6.5 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 152 µL, 0.15 mmol, 0.2eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (64 µL, 0.45 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (1.07 g, 87%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +18.5$ (c 1.01, CHCl₃).

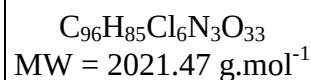
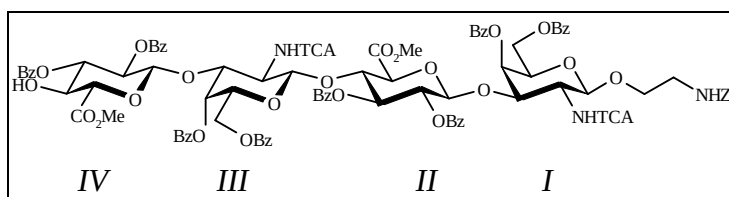
Plage de fusion 131-151°C.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 8.12-7.10 (m, 45H, Ar), 6.80, 6.78 (2d, 2H, $J_{\text{NH},2}$ 8Hz, NH^I et NH^{III}), 5.83 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.67 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.53-5.42 (m, 2H, H-3^{II} et H-3^{IV}), 5.32 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{IV}), 5.38-5.24 (m, 2H, H-2^{II} et H-2^{IV}), 5.23-5.16 (m, 1H, NHC(O)O), 5.14 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 5.02 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.92, 4.87 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.80 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.69 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.47 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a^I), 4.43 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.32 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 9.5Hz, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II}), 4.16-4.09 (m, 2H, H-5^I et H-5^{IV}), 4.05 (d, 1H, H-5^{II}), 3.91-3.82 (m, 2H, H-6a^{III} et O-CH₂), 3.73, 3.66 (2s, 6H, COOCH₃), 3.69-3.52 (m, 4H, H-2^I, H-2^{III}, H-6b^{III} et O-CH₂), 3.42-3.29 (m, 3H, H-5^{III} et CH₂-N), 3.42-3.29 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.00 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 205.73 (1C, C=O Lev), 171.05, 167.71, 166.72, 166.18, 165.86, 165.60, 165.15, 164.87, 164.57, 162.42, 161.75 (13C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.37 (1C, NHC(O)O), 136.49, 133.34, 133.12, 130.10, 129.98, 129.88, 129.83, 129.69, 129.55, 129.13, 129.01, 128.93, 128.73, 128.56, 128.36, 128.18, 128.05 (54C, Ar), 101.23, 100.37, 98.82, 97.90 (4C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III} et C-1^{IV}), 92.32, 91.92 (2C, CCl₃), 74.97, 74.27, 74.12, 73.16, 72.64, 72.26, 72.02, 71.47, 69.78, 69.41 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.52 (1C, O-CH₂), 66.78 (1C, CH₂-Ph), 62.95, 61.89 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 56.33, 56.09, 53.36, 52.94 (4C, C-2^I, C-2^{III} et COOCH₃), 40.93 (1C, CH₂-N), 37.75, 27.77 (2C, CH₂ Lev), 29.61 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 2114 [M-H]⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₁₀₁H₉₁Cl₆N₃O₃₅ : C, 57.23 ; H, 4.33 ; N 1.98 ; trouvée : C, 57.23 ; H, 4.13 ; N, 1.82.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (141)

A une solution de tétrasaccharide **140** (1.06 g, 0.50 mmol) dans la pyridine (10 mL) est ajouté un mélange de pyridine-acide acétique-hydrasine monohydrate (12 : 8 : 1, 10.5 mL). Le mélange réactionnel est agité 8 minutes à température ambiante puis est dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois), la phase organique est ensuite lavée à l'eau, puis avec une solution de NaHCO_3 saturée (3 fois) et enfin à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , concentrée et enfin coévaporée au toluène (2 fois) pour donner un solide blanc. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 12 : 1) donne le produit désiré (759 mg, 75%) sous la forme d'une poudre blanche.

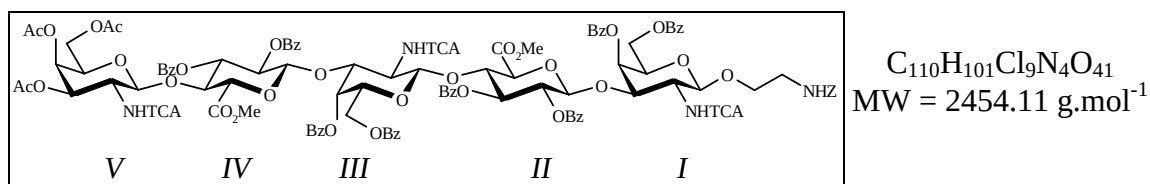
$[\alpha]_D^{20} +9.5$ (c 1.01, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 8.12-7.09 (m, 43H, Ar), 6.88-6.71 (m, 4H, NH^I , NH^{III} et 2H Ar), 5.69 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 3\text{Hz}$, H-4 ^{I}), 5.59 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 3\text{Hz}$, H-4 ^{III}), 5.46 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} 9.5\text{Hz}$, H-3 ^{II}), 5.34 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} 9.5\text{Hz}$, H-3 ^{IV}), 5.27-5.09 (m, 4H, H-1 ^{III} , H-2 ^{II} , H-2 ^{IV} et $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 5.03 (d, 1H, $J_{1,2} 8\text{Hz}$, H-1 ^{I}), 4.98 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.89, 4.82 (2d, 2H, $J_{1,2} 7\text{Hz}$, H-1 ^{II} et H-1 ^{IV}), 4.76, 4.67 (2dd, 2H, $J_{2,3} 11\text{Hz}$, H-3 ^{I} et H-3 ^{III}), 4.47-4.31 (m, 2H, H-6a ^{I} et H-6b ^{I}), 4.26 (dd, 1H, $J_{4,5} 9.5\text{Hz}$, H-4 ^{II}), 4.09-3.93 (m, 2H, H-5 ^{I} et H-4 ^{IV}), 4.02, 3.97 (2d, 2H, H-5 ^{II} et H-5 ^{IV}), 3.89-3.78 (m, 2H, O- CH_2 et H-6a ^{III}), 3.68, 3.61 (2s, 6H, COOCH_3), 3.60-3.50 (m, 4H, H-2 ^{I} , H-2 ^{III} , H-6b ^{III} et O- CH_2), 3.34-3.23 (m, 4H, H-5 ^{III} , $\text{CH}_2\text{-N}$ et OH).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 169.16, 167.77, 166.39, 166.23, 165.91, 165.69, 165.61, 165.36, 164.92, 164.80, 162.46, 161.84 (12C, C-6 ^{II} , C-6 ^{IV} et C=O), 156.43 (1C, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 136.51, 133.38, 133.22, 130.14, 129.99, 129.93, 129.82, 129.71, 129.61, 129.10, 128.99, 128.96, 128.65, 128.60, 128.41, 128.22, 128.06 (54C, Ar), 101.27, 100.66, 98.83, 97.91 (4C, C-1 ^{I} , C-1 ^{II} , C-1 ^{III} et C-1 ^{IV}), 92.32, 91.93 (2C, CCl_3), 75.00, 74.66, 74.26, 74.13, 73.20, 72.40, 72.06, 71.59, 71.45, 70.11, 69.81, 69.70 (14C, C-3 ^{I} , C-4 ^{I} , C-5 ^{I} , C-2 ^{II} , C-3 ^{II} , C-4 ^{II} , C-5 ^{II} , C-3 ^{III} , C-4 ^{III} , C-5 ^{III} , C-2 ^{IV} , C-3 ^{IV} , C-4 ^{IV} et C-5 ^{IV}), 69.55 (1C, O- CH_2), 66.83 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.99, 61.75 (2C, C-6 ^{I} et C-6 ^{III}), 56.40, 56.17, 53.56, 53.38 (4C, C-2 ^{I} , C-2 ^{III} et COOCH_3), 40.96 ($\text{CH}_2\text{-N}$).

ES-SM : m/z 2018 $[\text{M}+\text{H}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{96}\text{H}_{85}\text{Cl}_6\text{N}_3\text{O}_{33} + 2 \text{H}_2\text{O}$: C, 56.04 ; H, 4.36 ; N 2.06 ; trouvée : C, 56.02 ; H, 4.23 ; N, 2.03.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (142)

Un mélange d'accepteur **141** (200 mg, 0.10 mmol), d'imidate **61** (106 mg, 0.18 mmol, 1.6eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (2 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 36 µL, 36 µmol, 0.2eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (15 µL, 0.11 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une première purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 10 : 1 avec 0.1% de Et₃N) puis une deuxième (AcOEt/toluène 2 : 3 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (210 mg, 85%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -3 (c 1.03, CHCl₃).

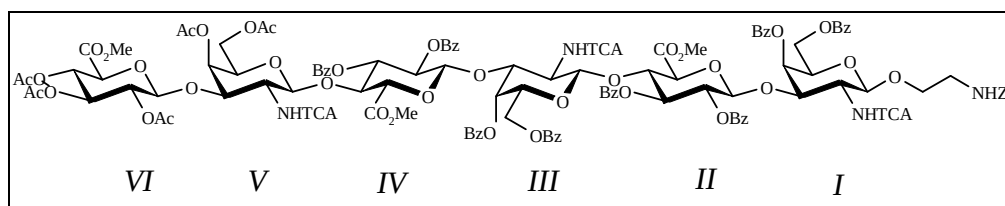
F 144-145°C (iPrOH/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.09-7.11 (m, 43H, Ar), 6.88-6.82 (m, 3H, NH^I et 2H Ar), 6.78 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^V), 6.71 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^{III}), 5.81 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.62 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.51, 5.49 (2dd, 2H, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II} et H-3^{IV}), 5.27-5.02 (m, 3H, H-2^{II}, H-2^{IV} et NHC(O)O), 5.18 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^I), 5.11 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^V), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{III}), 5.11 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^V), 5.01 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{II}), 4.86 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{IV}), 4.85 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1^V), 4.80 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.67 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.47 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a^I), 4.39 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.32, 4.23 (2dd, 2H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II} et H-4^{IV}), 4.12-4.07 (m, 1H, H-5^I), 4.05 (d, 2H, H-5^{II} et H-5^{IV}), 4.15-3.94 (m, 1H, H-2^V), 3.92-3.81 (m, 2H, H-5^{III} et O-CH₂), 3.73, 3.61 (2s, 6H, COOCH₃), 3.75-3.54 (m, 5H, H-2^I, H-2^{III}, H-6a^{III}, H-5^V et O-CH₂), 3.44-3.20 (m, 4H, CH₂-N, H-6b^{III} et H-6a^V), 3.09 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6b^V), 1.95, 1.94, 1.92 (3s, 9H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 170.19, 169.88, 168.72, 167.58, 166.03, 165.72, 165.44, 165.42, 165.30, 165.04, 164.72, 164.68, 162.27, 161.67 (16C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.22 (1C, NHC(O)O), 136.33, 133.27, 133.23, 133.20, 133.18, 133.12, 129.96, 129.76, 129.63, 129.60, 129.55, 129.52, 129.46, 129.43, 129.03, 128.85, 128.78, 128.50, 128.42, 128.38, 128.30, 128.28, 128.04, 127.87 (54C, Ar), 101.11, 100.69, 100.05, 98.63, 97.67 (5C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV} et C-1^V), 92.39, 92.06, 91.76 (3C, CCl₃), 77.21, 75.95, 74.85, 74.15, 73.95, 73.56, 73.30, 72.24, 72.12, 71.88, 71.42, 71.23, 70.25, 69.64, 69.49, 66.08 (17C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V et C-5^V), 69.38 (1C, O-CH₂), 66.64 (1C, CH₂-Ph), 62.81, 61.62, 60.13 (3C, C-6^I, C-6^{III} et C-6^V), 56.22, 55.86, 53.21, 53.00, 52.56 (5C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et COOCH₃), 40.78 (1C, CH₂-N), 21.59, 20.41, 20.38 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 2447 [M-H]⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₁₁₀H₁₀₁Cl₉N₄O₄₁ + 3 H₂O : C, 52.68 ; H, 4.30 ; N 2.23 ; trouvée : C, 52.45 ; H, 4.25 ; N, 2.14.



$C_{121}H_{115}Cl_9N_4O_{49}$
MW = 2728.34 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (143)

Un mélange d'accepteur **141** (209 mg, 0.10 mmol), d'imide **88** (162 mg, 0.19 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (2 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 37 µL, 37 µmol, 0.15eq/imide) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec Et₃N (16 µL, 0.11 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/toluène 2 : 3 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (154 mg, 55%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +2.5$ (c 1.02, CHCl₃).

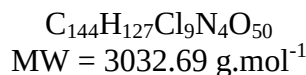
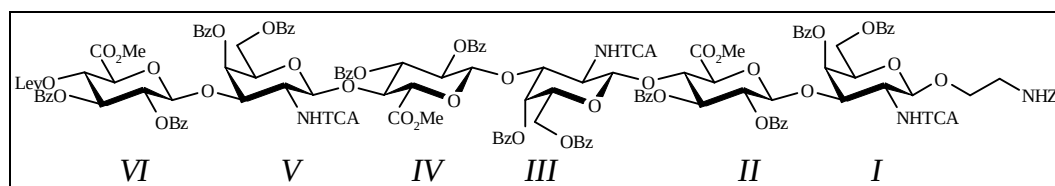
F 177-179°C (iPrOH/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 8.09-6.62 (m, 45H, Ar), 6.85 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^I), 6.85 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^V), 6.85 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^{III}), 5.82 (dd, 1H, $J_{4,5}<1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.59 (dd, 1H, $J_{4,5}<1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.49, 5.47 (2dd, 2H, $J_{2,3}$ 9Hz, $J_{3,4}$ 10Hz, H-3^{III} et H-3^{IV}), 5.28-5.01 (m, 10H, H-1^I, H-2^{II}, H-1^{III}, H-2^{IV}, H-4^V, H-3^{VI}, H-4^{VI}, CH₂-Ph et NHC(O)O), 4.94-4.78 (m, 3H, H-1^{II}, H-1^{IV} et H-2^{VI}), 4.81 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^V), 4.68 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.58 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{VI}), 4.47-4.31 (m, 2H, H-6a^I et H-6b^I), 4.30-4.16 (m, 3H, H-4^{II}, H-3^V et H-4^{IV}), 4.14-4.07 (m, 1H, H-5^I), 4.02, 3.97 (2d, 2H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5^{II} et H-5^{IV}), 3.96-3.78 (m, 3H, H-5^{III}, H-5^{VI} et O-CH₂), 3.74, 3.71, 3.64 (3s, 9H, COOCH₃), 3.79-3.51 (m, 6H, H-2^I, H-2^{III}, H-6a^{III}, H-2^V, H-5^V et O-CH₂), 3.41-3.22 (m, 4H, H-6b^{III}, H-6a^V et CH₂-N), 3.09 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ 12Hz, $J_{6b,5}$ 6Hz, H-6b^V), 2.02, 1.99, 1.97, 1.96, 1.82 (5s, 15H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 169.16, 167.77, 166.39, 166.23, 165.91, 165.69, 165.61, 165.36, 164.92, 164.80, 162.46, 161.84 (19C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 156.43 (1C, NHC(O)O), 136.51, 133.37, 133.13, 130.14, 129.99, 129.93, 129.80, 129.69, 129.59, 129.15, 129.04, 128.94, 128.67, 128.59, 128.49, 128.22, 128.04 (54C, Ar), 101.28, 101.03, 99.91, 98.80, 98.51, 97.73 (6C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV}, C-1^V et C-1^{VI}), 92.70, 92.24, 91.92 (3C, CCl₃), 75.08, 75.04, 74.96, 74.29, 74.13, 73.95, 73.80, 73.74, 72.46, 72.41, 72.20, 72.10, 72.06, 71.58, 71.39, 71.26, 70.92, 69.82, 69.65, 69.30, 68.11 (21C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI} et C-5^{VI}), 69.54 (1C, O-CH₂), 66.82 (1C, CH₂-Ph), 63.01, 61.81, 61.24 (3C, C-6^I, C-6^{III} et C-6^V), 53.38, 56.42, 56.09, 55.03, 53.19, 52.93 (6C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et COOCH₃), 40.96 (1C, CH₂-N), 21.57, 20.87, 20.66, 20.57, 20.41 (5C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 2721 [M-H]⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour $C_{121}H_{115}Cl_9N_4O_{49} + 2 H_2O$: C, 52.57 ; H, 4.34 ; N 2.03 ; trouvée : C, 52.39 ; H, 4.35 ; N, 1.89.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (144)

Un mélange d'accepteur **141** (759 mg, 0.34 mmol), d'imidate **93b** (705 mg, 0.60 mmol, 1.6eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (7.6 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 120 µl, 0.12 mmol, 0.2eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (51 µL, 0.36 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (754 mg, 66%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +5.5$ (c 1.01, CHCl₃).

F 150-155°C (i-PrOH/EP).

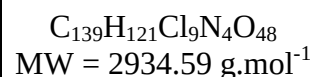
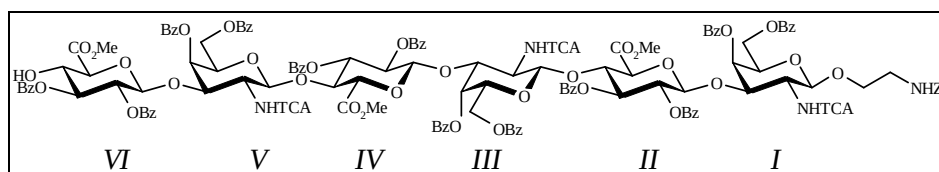
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.08-7.12 (m, 61H, Ar), 6.86-6.80 (m, 5H, 4H Ar et NH^I), 6.74 (2d, 2H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{III} et NH^V), 5.81 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.59, 5.55 (2dd, 2H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III} et H-4^V), 5.51, 5.48, 5.42 (3dd, 3H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{II}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 5.37 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{VI}), 5.18, 5.10 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III} et H-1^V), 5.24-5.09 (m, 4H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI} et NHC(O)O), 5.07 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.01 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.91 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{VI}), 4.87, 4.81 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.79 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.68, 4.65 (2dd, 2H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III} et H-3^V), 4.47 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.39 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.31, 4.25 (2dd, 2H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4^{II} et H-4^{IV}), 4.10 (d, 1H, H-5^{VI}), 4.12-4.07 (m, 1H, H-5^I), 4.03, 3.96 (2d, 2H, H-5^{II} et H-5^{IV}), 3.89-3.82 (m, 3H, H-5^{III}, H-5^V et O-CH₂), 3.73, 3.64, 3.63 (3s, 9H, COOCH₃), 3.74-3.50 (m, 6H, H-2^I, H-2^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-2^V et O-CH₂), 3.42-3.24 (m, 4H, H-6a^V, H-6b^V et CH₂-N), 2.60-2.31 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.01 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 205.58 (1C, C=O Lev), 170.87, 167.56, 167.51, 166.57, 166.00, 165.67, 165.65, 165.42, 165.04, 164.96, 164.69, 164.53, 164.37, 162.24, 161.60, 161.54 (19C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 156.19 (1C, NHC(O)O), 136.29, 133.22, 133.13, 133.14, 132.93, 129.91, 129.78, 129.72, 129.69, 129.60, 129.50, 129.46, 129.36, 128.95, 128.81, 128.72, 128.53, 128.43, 128.38, 128.25, 128.18, 128.00, 127.82 (78C, Ar), 101.05, 100.82, 100.15, 98.66, 97.73, 97.58 (6C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV}, C-1^V et C-1^{VI}), 92.14, 92.04, 91.75 (3C, CCl₃), 74.88, 74.77, 74.13, 73.92, 73.77, 73.48, 73.05, 72.45, 72.20, 72.16, 72.08, 71.82, 71.35, 71.20, 71.08, 69.60, 69.31, 69.24 (21C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI} et C-5^{VI}), 66.60 (1C, O-CH₂), 62.79 (1C, CH₂-Ph), 61.53, 61.43 (3C, C-6^I, C-6^{III} et C-

6^V), 56.11, 55.93, 55.86, 53.16, 53.02, 52.76 (6C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et COOCH₃), 40.74 (1C, CH₂-N), 37.56, 27.59 (2C, CH₂ Lev), 29.43 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1512 [M-2H]²⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₁₄₄H₁₂₇Cl₉N₄O₅₀ + 2 H₂O : C, 56.36 ; H, 4.30 ; N 1.83 ; trouvée : C, 56.28 ; H, 4.33 ; N, 1.71.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)- (méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (144')

A une solution d'hexasaccharide **144** (754 mg, 0.25 mmol) dans la pyridine (7.5 mL) est ajouté un mélange de pyridine-acide acétique-hydrazine monohydrate (12 : 8 : 1, 5.2 mL). Le mélange réactionnel est agité 8 minutes à température ambiante puis est dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois), la phase organique est ensuite lavée à l'eau, puis avec une solution de NaHCO_3 saturée (2 fois) et à l'eau, puis est séchée sur MgSO_4 , concentrée et enfin coévaporée au toluène (3 fois) pour donner un solide blanc. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 12 : 1) donne le produit désiré (604.5 mg, 83%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +1$ (c 0.99, CHCl_3).

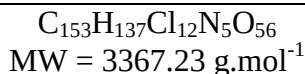
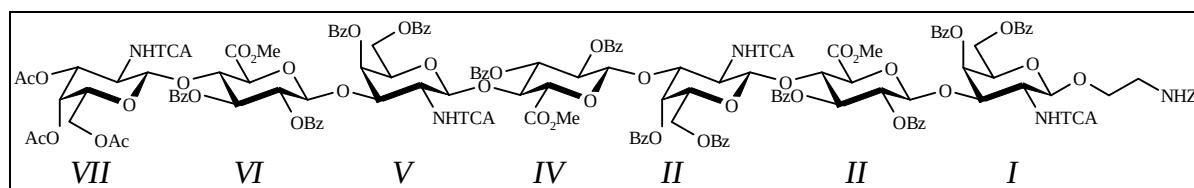
F 162°C (*i*-PrOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.08-7.12 (m, 62H, Ar), 6.91 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 6.87-6.76 (m, 5H, NH^{III} , NH^V et 3H Ar), 5.81 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, $\text{H}-4^I$), 5.61, 5.56 (2dd, 2H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, $\text{H}-4^{III}$ et $\text{H}-4^V$), 5.49, 5.42, 5.38 (3dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, $\text{H}-3^{II}$, $\text{H}-3^{IV}$ et $\text{H}-3^{VI}$), 5.25-5.09 (m, 6H, $\text{H}-2^{II}$, $\text{H}-1^{III}$, $\text{H}-2^{IV}$, $\text{H}-1^V$, $\text{H}-2^{VI}$ et $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, $\text{H}-1^I$), 5.00 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.92, 4.84, 4.81 (3d, 3H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, $\text{H}-1^{II}$, $\text{H}-1^{IV}$ et $\text{H}-1^{VI}$), 4.79 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, $\text{H}-3^I$), 4.68, 4.63 (2dd, 2H, $J_{2,3}$ 11Hz, $\text{H}-3^{III}$ et $\text{H}-3^V$), 4.45 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, $\text{H}-6a^I$), 4.38 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, $\text{H}-6b^I$), 4.30, 4.26 (2dd, 2H, $J_{3,4}$ 8Hz, $J_{4,5}$ 9.5Hz, $\text{H}-4^{II}$ et $\text{H}-4^{IV}$), 4.12-3.95 (m, 5H, $\text{H}-5^I$, $\text{H}-5^{II}$, $\text{H}-5^{IV}$, $\text{H}-4^{VI}$ et $\text{H}-5^{VI}$), 3.89-3.81 (m, 3H, $\text{O}-\text{CH}_2$, $\text{H}-5^{III}$ et $\text{H}-5^V$), 3.72, 3.67, 3.63 (3s, 9H, COOCH_3), 3.72-3.52 (m, 6H, $\text{H}-2^I$, $\text{H}-2^{III}$, $\text{H}-6a^{III}$, $\text{H}-6b^{III}$, $\text{H}-2^V$ et $\text{O}-\text{CH}_2$), 3.40 (d, 1H, $J_{\text{OH},4}$ 3Hz, OH), 3.42-3.22 (m, 4H, $\text{H}-6a^V$, $\text{H}-6b^V$ et $\text{CH}_2\text{-N}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 169.02, 167.61, 167.54, 166.23, 166.06, 165.73, 165.52, 165.44, 165.19, 165.09, 164.75, 164.61, 164.59, 162.29, 161.66, 161.64 (18C, $\text{C}-6^{II}$, $\text{C}-6^{IV}$, $\text{C}-6^{VI}$ et $\text{C}=\text{O}$), 156.25 (1C, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 136.35, 133.30, 133.21, 133.18, 133.05, 132.97, 129.98, 129.82, 129.77, 129.64, 129.56, 129.53, 129.42, 129.04, 128.99, 128.94, 128.88, 128.84, 128.79, 128.48, 128.43, 128.30, 128.24, 128.06, 127.87 (78C, Ar), 101.11, 100.87, 100.45, 98.63, 97.71, 97.59 (6C, $\text{C}-1^I$, $\text{C}-1^{II}$, $\text{C}-1^{III}$, $\text{C}-1^{IV}$, $\text{C}-1^V$ et $\text{C}-1^{VI}$), 92.17, 92.10, 91.76 (3C, CCl_3), 77.20, 74.94, 74.78, 74.50, 74.15, 74.07, 73.95, 73.82, 73.49, 73.02, 72.24, 71.80, 71.42, 71.26, 71.09, 69.95, 69.38 (21C, $\text{C}-3^I$, $\text{C}-4^I$, $\text{C}-5^I$, $\text{C}-2^{II}$, $\text{C}-3^{II}$, $\text{C}-4^{II}$, $\text{C}-5^{II}$, $\text{C}-3^{III}$, $\text{C}-4^{III}$, $\text{C}-5^{III}$, $\text{C}-2^{IV}$, $\text{C}-3^{IV}$, $\text{C}-4^{IV}$, $\text{C}-5^{IV}$, $\text{C}-3^V$, $\text{C}-4^V$, $\text{C}-5^V$, $\text{C}-2^{VI}$, $\text{C}-3^{VI}$, $\text{C}-4^{VI}$ et $\text{C}-5^{VI}$), 69.53 (1C, $\text{O}-\text{CH}_2$), 66.66 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.85, 61.59 (3C, $\text{C}-6^I$, $\text{C}-6^{III}$ et $\text{C}-6^V$), 56.25, 55.99, 53.21, 53.09, 52.78 (6C, $\text{C}-2^I$, $\text{C}-2^{III}$, $\text{C}-2^V$ et COOCH_3), 40.79 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$).

ES-SM : m/z 2927 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 1463 $[\text{M}-\text{H}]^{2-}$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{139}\text{H}_{121}\text{Cl}_9\text{N}_4\text{O}_{48} + \text{H}_2\text{O}$: C, 56.54 ; H, 4.20 ; N 1.90 ; trouvée : C, 56.30 ; H, 4.33 ; N, 1.81.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (145)

Un mélange d'accepteur **144'** (250 mg, 0.085 mmol), d'imidate **61** (91 mg, 0.15 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (2.5 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 30 µL, 0.03 mmol, 0.2eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec Et₃N (10 µL, 0.09 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (183 mg, 67%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -6 (c 0.99, CHCl₃).

F 160-162°C (*i*-PrOH).

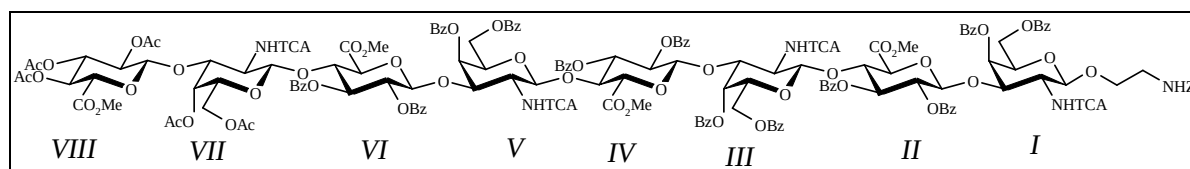
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.09-7.55 (m, 63H, Ar), 7.19 (d, 1H, *J*_{NH,2} 6.5Hz, NH^I), 6.98-6.95 (m, 5H, 2H Ar, NH^{III}, NH^V et NH^{VII}), 5.82 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^I), 5.59, 5.56 (2dd, 2H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{III} et H-4^V), 5.51, 5.49, 5.45 (3dd, 3H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9Hz, H-3^{II}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 5.26-5.19 (m, 2H, H-2^{II, IV ou VI} et H-2^{II, IV ou VI}), 5.18, 5.13 (2d, 2H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^{III} et H-1^V), 5.15-4.97 (m, 6H, H-1^I, H-2^{II, IV ou VI}, H-1^{VII}, CH₂-Ph et NHC(O)O), 5.10 (d, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{VII}), 4.95, 4.89, 4.86 (3d, 3H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-1^{II}, H-1^{IV} et H-1^{VI}), 4.87-4.82 (m, 1H, H-3^{VII}), 4.78 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^I), 4.59 (2dd, 2H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III} et H-3^V), 4.46 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 5Hz, *J*_{6a,6b} 12Hz, H-6a^I), 4.39 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 7Hz, H-6b^I), 4.31, 4.27, 4.24 (3dd, 3H, *J*_{4,5} 10Hz, H-4^{II}, H-4^{IV} et H-4^{VI}), 4.11-4.03 (m, 2H, H-5^I et H-5^{II, IV ou VI}), 4.04, 4.01 (2d, 2H, H-5^{II, IV ou VI} et H-5^{II, IV ou VI}), 4.02-3.95 (m, 1H, H-2^{VII}), 3.90-3.78 (m, 4H, H-2^I, H-5^{III}, H-5^V et O-CH₂), 3.72, 3.61 (2s, 9H, COOCH₃), 3.74-3.52 (m, 6H, H-2^{III}, H-6a^{III}, H-2^V, H-6a^V, H-5^{VII} et O-CH₂), 3.48-3.19 (m, 4H, H-6b^{III}, H-6b^V et CH₂-N), 3.17 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} 11Hz, *J*_{6,5} 6Hz, H-6a^{VII}), 3.13 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 5Hz, H-6a^{VII}), 1.95, 1.93, 1.92 (3s, 9H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 170.24, 169.94, 169.91, 168.68, 167.84, 166.08, 165.73, 165.70, 165.52, 165.48, 165.46, 165.36, 165.16, 164.84, 164.76, 164.68, 163.72, 162.30, 161.87, 161.73 (22C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 156.28 (1C, NHC(O)O), 136.25, 133.20, 132.94, 129.93, 129.82, 129.76, 129.71, 129.60, 129.56, 129.45, 129.38, 128.98, 128.94, 128.78, 128.69, 128.48, 128.40, 128.31, 128.23, 128.19, 127.13, 128.02, 127.99, 127.84 (78C, Ar), 100.94, 100.80, 100.62, 100.01, 99.00, 98.07, 98.01 (7C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV}, C-1^V, C-1^{VI} et C-1^{VII}), 92.32, 92.05, 91.92 (4C, CCl₃), 77.20, 75.84, 75.00, 74.94, 74.24, 73.91, 73.74, 73.29, 72.24, 71.78, 71.39, 71.36, 71.32, 71.22, 71.11, 70.62,

70.15, 69.62, 69.42, 69.30, 66.02 (24C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI}, C-5^{VI}, C-3^{VII}, C-4^{VII} et C-5^{VII}), 69.23 (1C, O-CH₂), 66.63 (1C, CH₂-Ph), 62.85, 61.56, 60.08 (4C, C-6^I, C-6^{III}, C-6^V et C-6^{VII}), 55.74, 55.55, 55.40, 53.19, 53.05, 530.1, 52.54 (7C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V, C-2^{VII} et COOCH₃), 40.72 (1C, CH₂-N), 20.56, 20.39, 20.37 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 1679 [M-H]²⁻ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₁₅₃H₁₃₇Cl₁₂N₅O₅₆ + H₂O : C, 54.58 ; H, 4.10 ; N 2.08 ; trouvée : C, 54.45 ; H, 4.18 ; N, 1.99.



$C_{164}H_{151}Cl_{12}N_5O_{64}$
 MW = 3641.46 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (146)

Un mélange d'accepteur **144'** (321 mg, 0.11 mmol), d'imide **88** (256 mg, 0.22 mmol, 2eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (3 mL) sous argon, est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 44 µl, 44 µmol, 0.2eq/imide) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 45 minutes puis est neutralisée avec Et₃N (20 µL, 0.13 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/toluène 2 : 3 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (260 mg, 65%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -4.5 (c 1.05, CHCl₃).

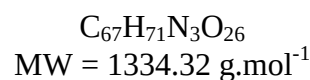
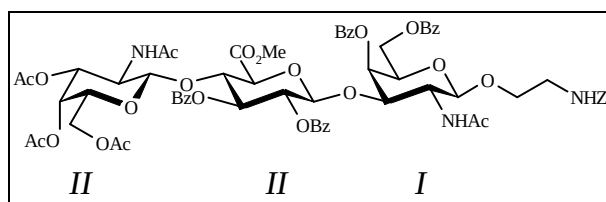
F 165°C (Et₂O).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.06-7.12 (m, 43H, Ar), 6.86 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 6.5Hz, NH^I), 6.86-6.77 (m, 2H, Ar), 6.78 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^{VII}), 6.74, 6.71 (2d, 2H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^{III} et NH^V), 5.81 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.57, 5.54 (2dd, 2H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III} et H-4^V), 5.47, 5.46, 5.43 (3dd, 3H, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{II}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 5.18 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{VII}), 5.07 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.25-5.05 (m, 8H, H-2^{II}, H-1^{III}, H-2^{IV}, H-1^V, H-2^{VI}, H-3^{VIII}, H-4^{VIII} et NHC(O)O), 5.02 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.91 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{II, IV ou VI}), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{VII}), 4.87-4.77 (m, 4H, H-3^I, H-1^{II, IV ou VI}, H-1^{II, IV ou VI} et H-2^{VIII}), 4.65 (2dd, 2H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III} et H-3^V), 4.57 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{VIII}), 4.47 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.38 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.30, 4.26, 4.22 (3dd, 3H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4^{II}, H-4^{IV} et H-4^{VI}), 4.21 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{VII}), 4.12-4.07 (m, 1H, H-5^I), 4.03, 3.99, 3.92 (3d, 3H, H-5^{II}, H-5^{IV} et H-5^{VI}), 3.96 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5^{VIII}), 3.89-3.82 (m, 3H, O-CH₂, H-5^{III} et H-5^V), 3.73, 3.71, 3.64, 3.62 (4s, 12H, COOCH₃), 3.74-3.53 (m, 8H, H-2^I, H-2^{III}, H-6a^{III}, H-2^V, H-6a^V, H-2^{VII}, H-5^{VII} et O-CH₂), 3.36 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a^{VII}), 3.29, 3.21 (2dd, 2H, $J_{5,6b}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6b^{III} et H-6b^V), 3.40-3.26 (m, 2H, CH₂-N), 3.09 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6b^{VII}), 2.02, 1.99, 1.98, 1.96, 1.82 (5s, 15H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 170.24, 170.00, 169.50, 169.27, 169.20, 168.30, 167.58, 166.73, 166.06, 165.75, 165.51, 165.49, 165.45, 165.29, 165.10, 164.76, 164.69, 164.59, 164.59, 162.31, 161.67 (25C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI}, C-6^{VIII} et C=O), 156.26 (1C, NHC(O)O), 136.34, 133.31, 133.21, 129.97, 129.82, 129.78, 129.65, 129.61, 129.55, 129.52, 129.42, 129.03, 128.99, 128.88, 128.77, 128.51, 128.43, 128.40, 128.32, 128.29, 128.27,

128.24, 128.06, 127.87, 127.85 (78C, Ar), 101.10, 100.85, 100.82 (3C, C-1^{II}, C-1^{IV} et C-1^{VI}), 99.75 (1C, C-1^{VIII}), 98.64 (1C, C-1^I), 98.36 (1C, C-1^{VII}), 97.61 (2C, C-1^{III} et C-1^V), 92.53, 92.09, 91.76 (4C, CCl₃), 74.90, 74.87, 74.78, 74.11, 73.96, 73.82, 73.73, 73.64, 73.76, 73.48, 72.29, 72.25, 72.06, 71.93, 71.89, 71.41, 71.24, 71.07, 70.71, 69.65, 39.47, 69.15, 67.97 (28C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI}, C-5^{VI}, C-3^{VII}, C-4^{VII}, C-5^{VII}, C-2^{VIII}, C-3^{VIII}, C-4^{VIII} et C-5^{VIII}), 69.40 (1C, O-CH₂), 66.67 (1C, CH₂-Ph), 62.85 (1C, C-6^I), 61.69, 61.58, 61.08 (3C, C-6^{III}, C-6^V et C-6^{VII}), 56.23, 56.21, 55.95, 55.87, 53.22, 53.08, 53.04, 52.79 (8C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V, C-2^{VII} et COOCH₃), 40.78 (1C, CH₂-N), 20.70, 20.50, 20.41, 20.24 (5C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 1815 [M-2H]²⁻ pour ³⁵Cl.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (149)

A une solution de trisaccharide **138** (135 mg, 87 μmol) dissous dans la *N,N*-diméthyl acétamide (1 mL) et le benzène (3mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN (150 mg) et du *n*-Bu₃SnH (212 μL, 0.79 mmol, 9eq). La solution est dégazée 30 minutes à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (141 μL, 0.52 mmol, 6eq) sont ajoutés (2 fois) puis la solution est concentrée. Le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2mL) en agitant 1 heure, avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 2 : 1) donne le produit désiré (64.5 mg, 55%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +24$ (c 1.01, CHCl₃).

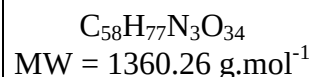
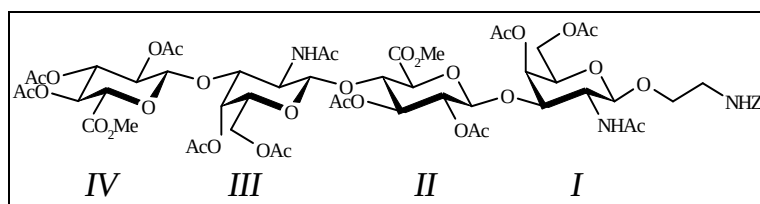
F 131°C (Et₂O/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.12-7.17 (m, 25H, Ar), 6.03 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{4,3} 3Hz, H-4^I), 6.98 (d, 1H, *J*_{NH,2} 9Hz, NH^{III}), 5.63 (d, 1H, *J*_{NH,2} 7Hz, NH^I), 5.52 (dd, 1H, *J*_{4,3} 9Hz, *J*_{2,3} 7Hz, H-3^{II}), 5.29-5.21 (m, 1H, NHC(O)O), 5.23 (dd, 1H, *J*_{1,2} 6Hz, H-2^{II}), 5.18 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^I), 5.07 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{III}), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.99 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 4.97 (d, 1H, H-1^{II}), 4.86 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^I), 4.60 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^{III}), 4.51 (dd, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-4^{II}), 4.46 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 5Hz, *J*_{6a,6b} 12Hz, H-6a^I), 4.35 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 5Hz, H-6b^I), 4.24 (d, 1H, H-5^{II}), 4.13 (dd, 1H, H-5^I), 3.98-3.91 (m, 1H, H-2^{III}), 3.87-3.79 (m, 1H, O-CH₂), 3.78-3.66 (m, 2H, H-5^{III} et O-CH₂), 3.77 (s, 3H, COOCH₃), 3.48-3.31 (m, 4H, H-2^I, H-6a^{III} et CH₂-N), 3.21 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 6Hz, *J*_{6a,6b} 12Hz, H-6b^{III}), 1.97, 1.95 (2s, 9H, OC(O)CH₃), 1.90, 1.89, (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.44, 170.45, 170.42, 170.03, 169.83, 168.56, 166.08, 166.04, 164.92, 164.82 (10C, C-6^{II} et C=O), 156.31 (1C, NHC(O)O), 136.48, 133.59, 133.52, 133.25, 133.15, 130.01, 129.77, 129.68, 129.54, 129.39, 129.19, 128.88, 128.71, 128.56, 128.44, 128.35, 128.32, 128.05 (30C, Ar), 101.15 (1C, C-1^{III}), 100.18 (1C, C-1^{II}), 99.42 (1C, C-1^I), 75.94 (1C, C-4^{II}), 74.44 (1C, C-3^I), 73.64 (1C, C-3^{II}), 73.25 (1C, C-5^{II}), 72.26 (1C, C-2^{II}), 71.87 (1C, C-5^I), 70.58, 70.55 (2C, C-3^{III} et C-5^{III}), 70.30 (1C, C-4^I), 69.24 (1C, O-CH₂), 66.61 (1C, CH₂-Ph), 66.03 (1C, C-4^{III}), 63.03 (1C, C-6^I), 60.26 (1C, C-6^{III}), 55.49 (1C, C-2^I), 52.88 (1C, COOCH₃), 50.97 (1C, C-2^{III}), 40.85 (1C, CH₂-N), 23.31, 22.95 (3C, OC(O)CH₃), 20.57, 20.51 (2C, NHC(O)CH₃)

ES-SM : *m/z* 1334 [M+H]⁺.

Analyse élémentaire calculée pour C₆₇H₇₁N₃O₂₆ + 2 H₂O : C, 58.73 ; H, 5.52 ; N 3.07 ; trouvée : C, 58.58 ; H, 5.55 ; N, 3.06.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acétamido-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-acétyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acétamido-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy- β -D-galactopyranoside (150)

A une solution de tétrasaccharide **139** (313 mg, 0.20 mmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (5 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN (150 mg) et du *n*-Bu₃SnH (645 μ L, 2.40 mmol, 12eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée 2 heures à 80°C, puis est concentrée. Le produit est précipité dans l'éther de pétrole (2 mL) à 0°C pendant 1 heure, avant d'être filtré. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 15 : 1) donne le produit désiré (145 mg, 53%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +8.5$ (c 1.01, CHCl₃).

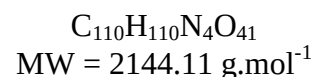
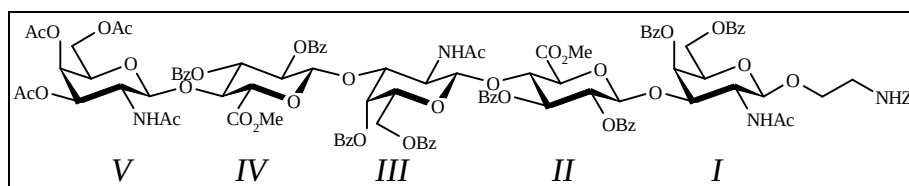
F 159-160°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 7.35 (s, 5H, Ph), 5.91, 5.81 (2d, 2H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I et NH^{III}), 5.39-5.26 (m, 3H, H-4^I, H-4^{III} et NHC(O)O), 5.25-5.11 (m, 4H, H-3^{IV}, H-4^{IV} et CH₂-Ph), 5.03 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 4.93-4.80 (m, 3H, H-1^{I ou III}, H-2^{II} et H-2^{IV}), 4.75 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{I ou III}), 4.68-4.62 (m, 2H, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.57-4.42 (m, 2H, H-3^I et H-3^{III}), 4.09-3.64 (m, 11H, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-5^{IV} et O-CH₂), 3.73, 3.66 (2s, 6H, COOCH₃), 3.54-3.41 (m, 4H, H-2^I, H-2^{III} et CH₂-N), 2.11, 2.04, 2.01, 2.00, 1.99, 1.98 (6s, 33H, OC(O)CH₃ et NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ (ppm) 170.23, 170.15, 169.99, 169.82, 169.40, 167.86, 167.08, (13C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.56 (1C, NHC(O)O), 136.62 128.64, 128.27 (6C, Ph), 100.07, 99.89, 99.52, 98.12 (4C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III} et C-1^{IV}), 75.39, 74.77, 74.28, 73.97, 72.62, 72.34, 72.24, 71.46, 71.35, 71.06, 70.97, 69.11, 68.44, 67.91 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.34 (1C, O-CH₂), 66.82 (1C, CH₂-Ph), 62.67, 61.87 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 54.55, 54.36, 53.24, 52.95 (4C, C-2^I, C-2^{III} et COOCH₃), 41.05 (1C, CH₂-N), 23.64, 23.58, 22.72, 20.82, 20.70, 20.66, 20.57 (11C, OC(O)CH₃ et NHC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 1359 [M+2H]⁺.

Analyse élémentaire calculée pour C₅₈H₇₇N₃O₃₄ + 2 H₂O : C, 49.89 ; H, 5.85 ; N, 3.01; trouvée C, 50.13 ; H, 5.88 ; N, 2.91.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (151)

A une solution de pentasaccharide **142** (103 mg, 42 μmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (0.75 mL) et le benzène (3mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN (150 mg) et du *n*-Bu₃SnH (152 μL, 0.57 mmol, 13.5eq). La solution est dégazée 30 minutes à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (102 μL, 0.38 mmol, 9eq) sont ajoutés (2 fois). La solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL) en agitant 1 heure, avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 2 : 1) donne le produit désiré (53 mg, 59%) sous la forme d'une poudre blanche.

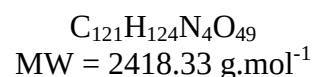
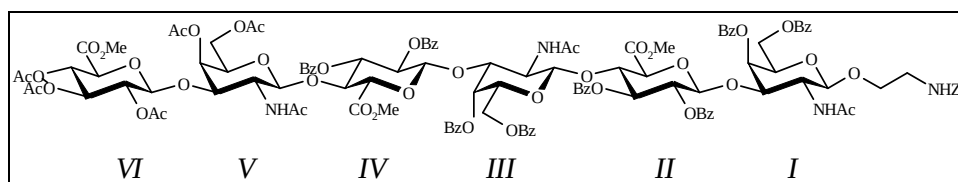
$[\alpha]_D^{20} +5$ (c 0.91, CHCl₃).

F 159-160°C (Et₂O/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.07-6.81 (m, 45H, Ar), 5.88 (d, 1H, *J*_{NH,2} 9Hz, NH^V), 5.82 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^I), 5.73 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{III}), 5.52 (d, 1H, *J*_{NH,2} 9Hz, NH^I), 5.51 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9Hz, H-3^{II}), 5.49-5.44 (m, 2H, NH^{III} et H-3^{IV}), 5.29 (dd, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-2^{II}), 5.20-5.15 (m, 1H, NHC(O)O), 5.14-5.10 (m, 2H, H-2^{IV} et H-1^{III}), 5.04 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^V), 5.01 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.98 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^I), 4.92 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^V), 4.91-4.86 (m, 2H, H-3^I et H-1^{II}), 4.86 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{IV}), 4.79 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 4.51 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^V), 4.50-4.44 (m, 2H, H-6a^I et H-4^{II ou IV}), 4.31 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 5Hz, *J*_{6a,6b} 11Hz, H-6b^I), 4.23 (dd, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-4^{II ou IV}), 4.16 (dd, 1H, H-5^{II ou IV}), 4.09-4.05 (m, 2H, H-5^I et H-5^{II ou IV}), 3.99-3.89 (m, 1H, H-2^V), 3.85-3.75 (m, 2H, H-5^{III} et O-CH₂), 3.72, 3.67 (2s, 6H, COOCH₃), 3.75-3.68 (m, 2H, H-5^V et O-CH₂), 3.55-3.50 (m, 1H, H-6a^{III}), 3.46-3.40 (m, 1H, H-6b^{III}), 3.44-3.20 (m, 6H, H-2^I, H-2^{III}, H-2^V, H-6a^V, H-6b^V et CH₂-N), 1.96, 1.93, 1.87 (3s, 9H, OC(O)CH₃), 1.76, 1.63, 1.25 (3s, 9H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.53, 171.18, 170.15, 170.43, 170.06, 169.82, 168.65, 166.87, 166.06, 165.66, 165.59, 165.53, 165.45, 164.87, 164.69, 164.66 (16C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.27 (1C, NHC(O)O), 136.48, 133.54, 133.48, 133.20, 133.14, 133.08, 133.03, 130.03, 129.96, 129.79, 129.73, 129.70, 129.66, 129.46, 129.43, 129.34, 129.16, 129.04, 128.93, 128.92, 128.71, 128.55, 128.43, 128.40, 128.35, 128.31, 128.05, 127.94 (54C, Ar), 101.58, 101.24, 99.88, 99.18, 98.23 (5C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV} et C-1^V), 77.32, 75.98, 75.94, 75.81, 74.77, 73.80, 73.54, 72.89, 72.30, 72.25, 71.83, 71.30, 71.28, 70.71, 70.61, 69.91, 69.43, 66.04 (17C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V et C-5^V), 69.27 (1C, O-CH₂), 66.59 (1C, CH₂-Ph), 63.11, 61.62, 60.26 (3C, C-6^I, C-6^{III} et C-6^V), 55.51, 55.86, 53.13, 52.70, 50.80 (5C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et COOCH₃), 40.83 (1C, CH₂-N), 23.21, 23.10, 22.73 (3C, NHC(O)CH₃), 20.57, 20.54, 20.51 (3C, OC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : *m/z* : calculée pour C₁₁₀H₁₁₀N₄O₄₁ ([M]²⁺) : 1072.3401 trouvée : 1072.3434.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acétamido-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-galactopyranoside (152)

A une solution d'hexasaccharide **143** (154 mg, 56 μmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (2 mL) et le benzène (1.5 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (273 μL , 1.02 mmol, 18eq). La solution est dégazée 45 minutes à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (136 μL , 0.50 mmol, 9eq) sont ajoutés (2 fois). Après 2 heures, la solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL) en agitant 1 heure, avant d'être filtré pour donner une poudre blanche. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (106 mg, 78%) sous la forme d'une poudre blanche.

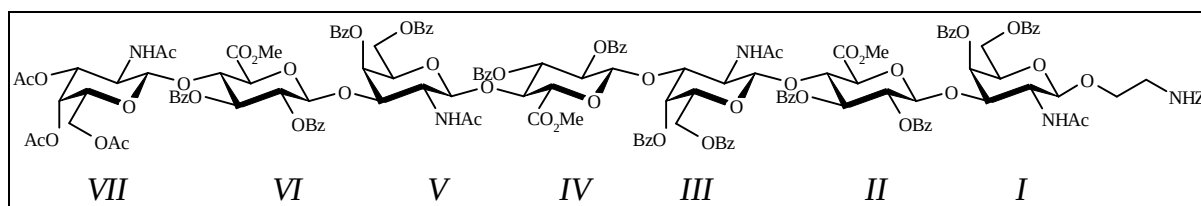
$[\alpha]_D^{20} +4$ (c 1.00, CHCl₃).

F 161-162°C (CH₂Cl₂/EP/Et₂O).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 8.09-6.77 (m, 45H, Ar), 5.72 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.67 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^V), 5.54 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.49-5.43 (m, 3H, H-3^{II}, H-3^{IV} et NH^I), 5.38 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{III}), 5.28 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, $J_{2,3}$ 9Hz, H-2^{II ou IV}), 5.22-5.08 (m, 6H, H-1^I, H-2^{II ou IV}, H-4^V, H-3^{VI}, H-4^{VI} et NHC(O)O), 5.01 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.94 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 4.89-4.81 (m, 3H, H-1^{II ou IV}, H-3^{III} et H-2^{VI}), 4.77 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.76 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1^{II ou IV}), 4.71 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^V), 4.60 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{VI}), 4.51-4.45 (m, 2H, H-6a^I et H-3^V), 4.33 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6b^I), 4.22, 4.18 (2dd, 2H, $J_{3,4}$ 9.5Hz, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II} et H-4^{IV}), 4.09-3.99 (m, 3H, H-5^I, H-5^{II} et H-5^{IV}), 3.93 (m, 1H, H-5^{VI}), 3.82-3.59 (m, 3H, H-5^{III}, H-5^V et O-CH₂), 3.68, 3.61 (2s, 9H, COOCH₃), 3.53 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a^{III}), 3.48-3.23 (m, 5H, H-6b^{III}, H-6a^V, CH₂-N et O-CH₂), 3.21-3.08 (m, 4H, H-2^I, H-2^{III}, H-2^V et H-6b^V), 2.01, 1.98, 1.97, 1.96, 1.89 (5s, 15H, OC(O)CH₃), 1.78, 1.40, 1.30 (3s, 9H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm) 171.29, 171.21, 170.91, 170.14, 170.01, 169.53, 169.25, 169.18, 167.38, 166.82, 166.72, 166.07, 165.67, 165.51, 165.03, 164.65, 164.59 (19C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 156.42 (NHC(O)O), 136.49, 133.52, 133.20, 133.08, 129.98, 129.85, 129.79, 129.74, 129.69, 129.67, 129.52, 129.43, 129.16, 128.56, 128.43, 128.36, 128.18, 128.06, 127.88 (54C, Ar), 101.64, 101.37, 99.48, 99.16, 98.55, 97.89 (6C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV}, C-1^V et C-1^{VI}), 75.98, 75.66, 75.26, 74.82, 74.68, 74.16, 74.01, 72.51, 72.23, 72.12, 71.84, 71.20, 71.02, 70.80, 69.24, 79.02, 67.48, 65.83 (21C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI} et C-5^{VI}), 69.54 (1C, O-CH₂), 66.83 (1C, CH₂-Ph), 63.15, 61.21 (3C, C-6^I et C-6^{III} et C-6^V), 55.55, 55.54, 53.08, 52.94, 52.71 (6C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et COOCH₃), 40.96 (1C, CH₂-N), 23.52, 22.60, 22.32 (3C, NHC(O)CH₃), 20.68, 20.54, 20.45, 20.32, 19.15 (5C, OC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : *m/z* : calculée pour C₁₂₁H₁₂₄N₄O₄₉ ([M]²⁺) : 1209.3745 ; trouvée : 1209.3773.



$C_{153}H_{149}N_5O_{56}$
 MW = 3367.23 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (153)

A une solution d'heptasaccharide **145** (193 mg, 57 μmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (3 mL) et le benzène (2 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (368 μL, 1.37 mmol, 24eq). La solution est dégazée 45 minutes à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (184 μL, 0.68 mmol, 12eq) sont ajoutés (2 fois). Après 2 heures, la solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL) en agitant 1 heure, avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (130 mg, 77%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -6 (c 0.98, CHCl₃).

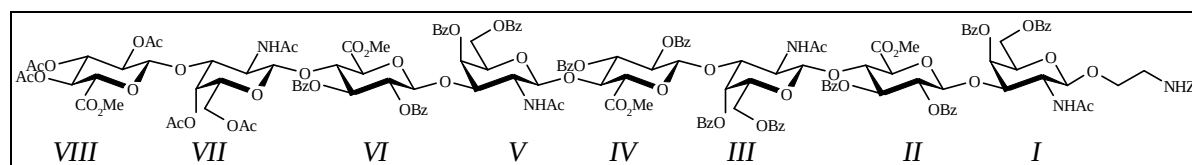
F 168-170°C (Et₂O/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.02-7.73 (m, 65H, Ar), 5.88 (d, 1H, *J*_{NH,2} 9Hz, NH^{VII}), 5.81 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^I), 5.69 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{III ou V}), 5.52-5.41 (m, 6H, NH^I, H-3^{II}, NH^{III ou V}, H-4^{III ou V}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 5.37 (d, 1H, *J*_{NH,2} 9Hz, NH^{III ou V}), 5.28-5.13 (m, 3H, H-2^{II, IV ou VI}, H-2^{II, IV ou VI} et NHC(O)O), 5.10 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^{III ou V}), 5.12-5.08 (m, 1H, H-2^{II, IV ou VI}), 5.02 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{VII}), 4.98 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.93 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^I), 4.91 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{III ou V}), 4.77 (dd, 1H, *J*_{3,4} 3Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III ou V}), 4.92-4.80 (m, 5H, H-3^I, H-1^{II}, H-1^{IV}, H-3^{III ou V} et H-3^{VII}), 4.74 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{VI}), 4.51 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^{VII}), 4.49-4.45 (m, 2H, H-6a^I et H-4^{II ou IV}), 4.31 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 7Hz, *J*_{6a,6b} 11Hz, H-6b^I), 4.21-4.13 (m, 2H, H-4^{II, IV ou VI} et H-4^{II, IV ou VI}), 4.16 (dd, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-5^{II, IV ou VI}), 4.06-3.90 (m, 2H, H-5^I et H-2^{VII}), 4.02 (d, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-5^{II, IV ou VI}), 3.99 (d, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-5^{II, IV ou VI}), 3.81-3.58 (m, 5H, H-5^{III}, H-5^V, H-5^{VII} et O-CH₂), 3.68, 3.65, 3.63 (3s, 9H, COOCH₃), 3.55-3.39 (m, 4H, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-6a^V et H-6b^V), 3.44-3.20 (m, 7H, H-2^I, H-2^{III}, H-2^V, H-6a^{VII}, H-6b^{VII} et CH₂-N), 1.96, 1.93, 1.87 (3s, 9H, OC(O)CH₃), 1.34, 1.30, 1.25 (3s, 12H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.25, 170.48, 170.08, 169.84, 168.68, 166.91, 166.72, 166.07, 165.68, 165.59, 165.52, 164.89, 164.51 (22C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 156.28 (1C, NHC(O)O), 136.47, 133.54, 133.09, 133.04, 132.99, 130.03, 129.96, 129.79, 129.71, 129.66, 129.42, 129.35, 128.72, 128.55, 128.44, 128.39, 128.36, 128.31, 128.06, 127.92, 127.87 (78C, Ar), 101.63, 101.28, 99.85, 99.17, 98.21, 97.82 (7C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV}, C-1^V, C-1^{VI} et C-1^{VII}), 77.21, 75.99, 75.78, 75.61, 75.04, 74.82, 74.56, 73.82, 73.58, 72.86, 72.25, 72.17, 71.84, 71.28, 71.20, 71.15, 70.75, 70.61, 69.92, 69.40, 69.04,

66.03 (24C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI}, C-5^{VI}, C-3^{VII}, C-4^{VII} et C-5^{VII}), 69.26 (1C, O-CH₂), 66.60 (1C, CH₂-Ph), 63.18, 61.63, 60.27 (4C, C-6^I, C-6^{III}, C-6^V et C-6^{VII}), 55.51, 55.47, 55.45, 53.07, 53.00, 52.71 (7C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V, C-2^{VII} et COOCH₃), 40.83 (1C, CH₂-N), 23.20, 23.07, 22.81, 22.71 (4C, NHC(O)CH₃), 20.58, 20.55, 20.53 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 2953 [M+2H]⁺.



$C_{164}H_{163}N_5O_{64}$
MW = 3641.46 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-4,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (154)

A une solution d'octasaccharide **146** (214 mg, 59 μmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (3 mL) et le benzène (2 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (380 μL, 1.41 mmol, 24eq). La solution est dégazée 45 minutes à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (190 μL, 0.68 mmol, 12eq) sont ajoutés (2 fois). Au bout de 2 heures, la solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL) en agitant 1 heure, avant d'être filtré pour donner une poudre blanche. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (100 mg, 53%) sous la forme d'une poudre blanche.

Rq : Si le produit n'est pas totalement réduit, le protocole précédent est répété jusqu'à réduction complète.

$[\alpha]_D^{20}$ -7 (c 1.01, CHCl₃).

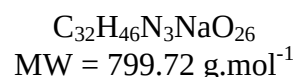
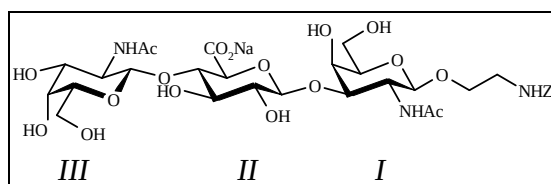
F 182°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.02-6.74 (m, 65H, Ar), 5.71 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3.5Hz, H-4^I), 5.69 (d, 1H, *J*_{NH,2} 6.5Hz, NH^I), 5.51, 5.45 (2dd, 2H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{III} et H-4^V), 5.49-5.41 (m, 4H, H-3^{II}, H-3^{IV}, H-3^{VI} et NH^{VII}), 5.40-5.35 (m, 2H, NH^{III} et NH^V), 5.30-5.11 (m, 6H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI}, H-3^{VIII}, H-4^{VIII} et NHC(O)O), 5.11 (d, 1H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-1^I), 5.09 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{VII}), 5.00 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.91, 4.89 (2d, 2H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{III} et H-1^V), 4.82, 4.76 (2d, 2H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-1^{II, IV ou VI} et H-1^{II, IV ou VI}), 4.92-4.74 (m, 4H, H-3^I, H-3^{III}, H-3^V et H-2^{VIII}), 4.72 (d, 1H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-1^{II, IV ou VI}), 4.70 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^{VII}), 4.58 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{VIII}), 4.49-4.43 (m, 2H, H-3^{VII} et H-6a^I), 4.31 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 7Hz, *J*_{6a,6b} 12Hz, H-6b^I), 4.23, 4.16, 4.13 (3dd, 3H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} 9.5Hz, H-4^{II}, H-4^{IV} et H-4^{VI}), 4.07-3.99 (m, 1H, H-5^I), 4.02, 4.01, 3.93 (3d, 3H, H-5^{II}, H-5^{IV} et H-5^{VI}), 3.92 (d, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-5^{VIII}), 3.81-3.58 (m, 5H, H-5^{III}, H-5^V, H-5^{VII} et O-CH₂), 3.69, 3.67, 3.66, 3.61 (4s, 12H, COOCH₃), 3.57-3.06 (m, 12H, H-2^I, H-2^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-2^V, H-6a^V, H-6b^V, H-2^{VII}, H-6a^{VII}, H-6b^{VII} et CH₂-N), 2.01, 1.98, 1.97, 1.96, 1.89, 1.78, 1.38, 1.33, 1.29 (9s, 27H, OC(O)CH₃ et NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.19, 170.91, 170.11, 169.96, 169.51, 169.23, 169.17, 167.38, 166.81, 166.71, 166.67, 166.03, 165.63, 165.47, 165.43, 165.17, 165.00, 164.82, 164.61, 164.54, 164.44 (25C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI}, C-6^{VIII} et C=O), 156.26 (1C, NHC(O)O), 136.44, 133.46, 133.41, 133.03, 129.91, 129.82, 129.77, 129.74, 129.67, 129.64, 129.61, 129.46, 129.43, 129.36, 129.03, 128.97, 128.95, 128.85, 128.50, 128.39, 128.31,

128.23, 128.14, 128.00, 127.81 (78C, Ar), 101.63, 101.59, 101.26 (3C, C-1^{II}, C-1^{IV} et C-1^{VI}), 99.43 (1C, C-1^{VIII}), 98.16 (1C, C-1^I), 98.61 (1C, C-1^{VII}), 97.83, 97.77 (2C, C-1^{III} et C-1^V), 77.20, 75.95, 75.57, 75.25, 75.03, 74.77, 74.56, 74.07, 73.98, 72.47, 72.21, 72.17, 72.13, 72.07, 71.78, 71.35, 71.12, 71.01, 70.98, 70.94, 70.74, 69.35, 69.19, 67.47 (28C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V, C-4^V, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI}, C-5^{VI}, C-3^{VII}, C-4^{VII}, C-5^{VII}, C-2^{VIII}, C-3^{VIII}, C-4^{VIII} et C-5^{VIII}), 68.98 (1C, O-CH₂), 66.55 (1C, CH₂-Ph), 63.12 (1C, C-6^I), 61.65, 61.62, 61.15 (3C, C-6^{III}, C-6^V et C-6^{VII}), 55.46, 55.42, 54.24, 53.01, 52.89, 52.68 (8C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V, C-2^{VII} et COOCH₃), 40.78 (1C, CH₂-N), 23.45, 22.80, 22.75, 22.66 (4C, NHC(O)CH₃), 20.64, 20.49, 20.41, 20.28 (5C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 1613 [M+H]²⁺.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (155)

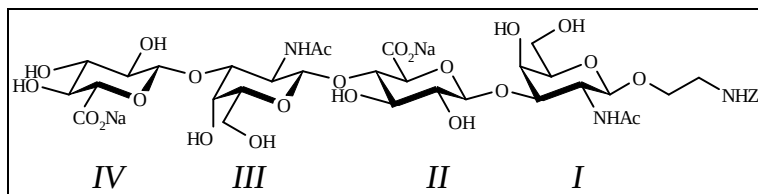
Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 206 µL, 0.21 mmol, 5eq) et de H₂O₂ (30%, 103 µL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de trisaccharide **149** (55 mg, 41 µmol) dissous dans du THF (1 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis du MeOH (0.75 mL) et une solution de NaOH (4M, 361 µL, 1.44 mmol, 35eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 4 heures à température ambiante puis concentré. Le produit est ensuite dissous dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (3 fois). Le solide est ensuite lavé 3 fois à l'acétone (4 mL). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (23 mg, 68%) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -7 (c 1.00, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.42 (s, 5H, Ph), 5.12 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.51-4.43 (m, 2H, H-1^I et H-1^{III}), 4.50 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{II}), 4.11 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^I), 4.01 (dd, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, *J*_{2,3} 9.5Hz, H-2^I), 3.95-3.61 (m, 15H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-2^{III}, H-3^{III}, H-4^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, NHC(O)O et O-CH₂), 3.59 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9.5Hz, H-3^{II}), 3.38 (dd, 1H, H-2^{II}), 3.35-3.29 (m, 2H, CH₂-N), 2.06, 1.96 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 175.69, 175.46, 175.26 (3C, C-6^{II} et C=O), 158.96 (NHC(O)O), 137.06, 129.44, 129.06, 128.46 (6C, Ph), 104.91 (1C, C-1^{II}), 102.12, 101.67 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 80.76, 80.28 (2C, C-3^I et C-4^{II}), 77.05, 75.87, 75.50, 74.34, 73.11, (8C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-3^{III} et C-5^{III}), 69.22 (1C, O-CH₂), 68.41 (2C, C-4^I et C-4^{III}), 67.58 (1C, CH₂-Ph), 61.69, 61.64 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 52.97, 51.76 (3C, C-2^I et C-2^{III}), 41.04 (1C, CH₂-N), 23.13, 22.81 (2C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : *m/z* : calculée pour C₃₂H₄₇N₃NaO₁₉ ([M+H]⁺) : 800.2701 ; trouvée : 800.2691.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (156)

Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 1.3 mL, 1.27 mmol, 10eq) et de H₂O₂ (30%, 650 µL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de tétrasaccharide **150** (173 mg, 0.13 mmol) dissous dans du THF (4 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis une nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, du MeOH (3 mL) et une solution de NaOH (4M, 1.1 mL) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, puis dilué dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 2.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (4 fois). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (78.5 mg, 62 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

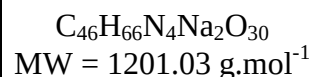
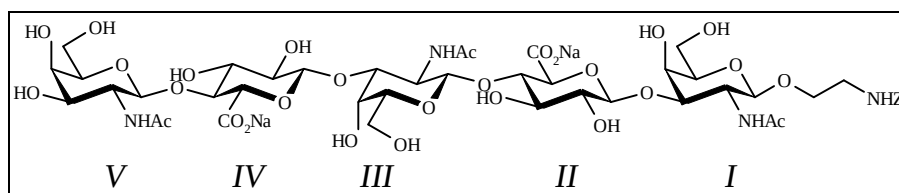
[α]_D²⁰ +17 (c 1.05, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.44 (s, 5H, Ph), 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.53 (d, 1H, J_{1,2} 8.5Hz, H-1^I), 4.51 (2d, 2H, J_{1,2} 8Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.49 (d, 1H, J_{1,2} 8.5Hz, H-1^{III}), 4.17 (dd, 1H, J_{4,5}<1Hz, J_{4,3} 3Hz, H-4^I), 4.11 (dd, 1H, J_{4,5}<1Hz, J_{4,3} 3Hz, H-4^{III}), 4.02, 3.99 (2dd, 2H, J_{2,3} 11Hz, H-2^I et H-2^{III}), 3.94-3.89 (m, 1H, O-CH₂), 3.84-3.68 (m, 11H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III} et H-5^{IV}), 3.66-3.62 (m, 1H, O-CH₂), 3.60 (dd, 1H, J_{2,3} 8.5Hz, J_{4,3} 9Hz, H-3^{II}), 3.53-3.46 (m, 2H, H-3^{IV} et H-4^{IV}), 3.38 (2dd, 2H, H-2^{II} et H-2^{IV}), 3.36-3.30 (m, 2H, CH₂-N), 2.04, 1.96 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 175.98, 175.60, 175.43, 174.72 (4C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 158.92 (1C, NHCOO), 137.03, 129.43, 129.05, 128.46 (6C, Ph), 104.49, 104.77 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 102.09, 101.57 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 80.88, 80.77, 80.40 (3C, C-3^I, C-4^{II} et C-3^{III}), 76.45, 75.90, 75.61, 75.47, 74.33, 73.31, 73.01, 72.34 (9C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 68.40, 68.31 (2C, C-4^I et C-4^{III}), 69.21 (1C, O-CH₂), 67.55 (1C, CH₂-Ph), 61.69, 61.61 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 51.74, 51.67 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 41.03 (1C, CH₂-N), 23.14, 22.80 (2C, NHC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 976 [M+2H-Na]⁺, 952 [M+H-2Na]⁻.

SM-HR(ES) : m/z: calculée pour C₃₈H₅₅NaN₃O₂₅ ([M+2H-Na]⁺) : 976.3022 ; trouvée : 976.3004.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(sodium- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acétamido-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(sodium- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acétamido-2-désoxy- β -D-galactopyranoside (157)

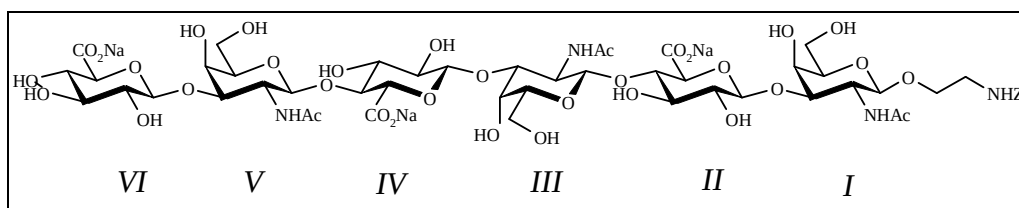
Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 172 μ L, 0.17 mmol, 10eq) et de H₂O₂ (30%, 86 μ L) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de pentasaccharide **151** (37 mg, 17 μ mol) dissous dans du THF (1 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis du MeOH (0.75 mL) et une solution de NaOH (4M, 236 μ L, 0.95 mmol, 55eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, puis dilué dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (3 fois). Le solide est ensuite lavé 3 fois à l'acétone (4 mL). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à un pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (12 mg, 58%) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 2 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -9 (c 1.01, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) 7.41 (s, 5H, Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.54-4.47 (m, 5H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV} et H-1^V), 4.13, 4.11 (2dd, 2H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I et H-4^{III}), 4.04-3.98 (m, 2H, H-2^I et H-2^{III}), 3.93 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^V), 3.92-3.56 (m, 21H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-3^{II}, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-3^{IV}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-2^V, H-3^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V et O-CH₂), 3.42-3.31 (m, 4H, H-2^{II}, H-2^{IV} et CH₂-N), 2.06, 2.04, 1.96 (3s, 9H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ (ppm) 175.69, 175.63, 175.46, 175.30, 175.19 (5C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 158.96 (1C, NHC(O)O), 129.44, 129.06, 128.46 (6C, Ph), 104.91, 102.13, 101.62, 101.49, 100.66 (5C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV} et C-1^V), 80.97, 80.74, 80.39, 80.23 (4C, C-3^I, C-4^{II}, C-3^{III} et C-4^{IV}), 77.06, 77.01, 75.88, 75.60, 75.52, 74.37, 74.32, 73.14, 73.09, 71.75 (13C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V et C-5^V), 69.23 (1C, O-CH₂), 68.45, 68.41, 68.39 (3C, C-4^I, C-4^{III} et C-4^V), 67.58 (1C, CH₂-Ph), 61.70, 61.65 (3C, C-6^I, C-6^{III} et C-6^V), 52.98, 51.77, 51.65 (3C, C-2^I, C-2^{III} et C-2^V), 41.05 (1C, CH₂-N), 23.16, 23.13, 22.81 (3C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour C₄₆H₆₈N₄O₃₀Na ([M+2H-Na]⁺) : 1179.3816 ; trouvée : 1179.3839 ; calculée pour C₄₆H₆₈N₄O₃₀ ([M+2H-2Na]²⁺) : 577.1181 ; trouvée : 577.1880.



$C_{52}H_{73}N_4Na_3O_{36}$
MW = 1399.14 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (158)

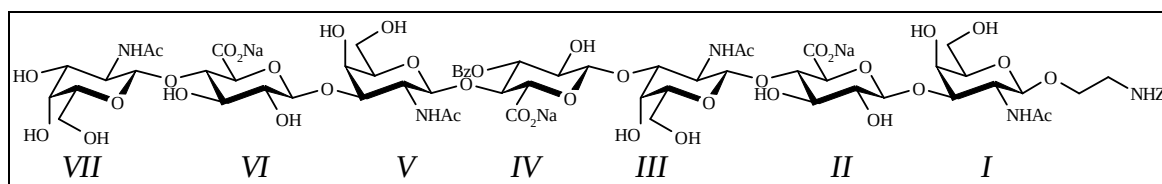
Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 254 µL, 0.25 mmol, 15eq) et de H₂O₂ (30%, 127 µL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C d'hexasaccharide **152** (41 mg, 17 µmol) dissous dans du THF (1.5 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis du MeOH (0.8 mL) et une solution de NaOH (4M, 275 µL, 1.1 mmol, 65eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, puis dilué dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (3 fois). Le solide est ensuite lavé 3 fois à l'EtOH (3x 4 mL). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (17 mg, 71 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 2 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -21.5 (c 1.00, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.81-7.30 (m, 5H, Ph), 5.15 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.52-4.42 (m, 6H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV}, H-1^V et H-1^{VI}), 4.16 (dd, 1H, J_{4,5}<1Hz, J_{3,4} 3Hz, H-4^I), 4.11, 4.10 (2dd, 2H, J_{4,5}<1Hz, J_{3,4} 3Hz, H-4^{III} et H-4^V), 4.04-3.95 (m, 3H, H-2^I, H-2^{III} et H-2^V), 3.94-3.54 (m, 21H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-3^{II}, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-3^{IV}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-3^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V, H-5^{VI} et O-CH₂), 3.50-3.46 (m, 2H, H-3^{VI} et H-4^{VI}), 3.39-3.25 (m, 5H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI} et CH₂-N), 2.03, 2.02, 1.95 (3s, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 175.63, 175.62, 175.47, 174.92 (6C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 158.97 (1C, NHC(O)O), 129.45, 129.07, 128.47 (6C, Ph), 104.96, 104.93, 104.80 (3C, C-1^{II}, C-1^{IV} et C-1^{VI}), 102.14, 101.16, 101.54 (3C, C-1^I, C-1^{III} et C-1^V), 80.94, 80.74, 80.42, 80.37 (5C, C-3^I, C-4^{II}, C-3^{III}, C-4^{IV} et C-3^V), 76.76, 76.75, 75.94, 75.61, 75.52, 74.35, 73.36, 73.08, 73.05, 72.41 (13C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-5^{IV}, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI} et C-5^{VI}), 69.24 (1C, O-CH₂), 68.42, 68.34 (3C, C-4^I, C-4^{III} et C-4^V), 67.58 (1C, CH₂-Ph), 63.72, 61.65 (3C, C-6^I, C-6^{III} et C-6^V), 51.76, 51.69, 51.65 (3C, C-2^I, C-2^{III} et C-2^V), 41.06 (1C, CH₂-N), 23.14, 22.80 (3C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour C₅₂H₇₆N₄O₃₆ ([M+3H-3Na]²⁺) : 665.2041 ; trouvée : 665.2032.



$C_{60}H_{86}N_5Na_3O_{41}$
MW = 1602.33 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (159)

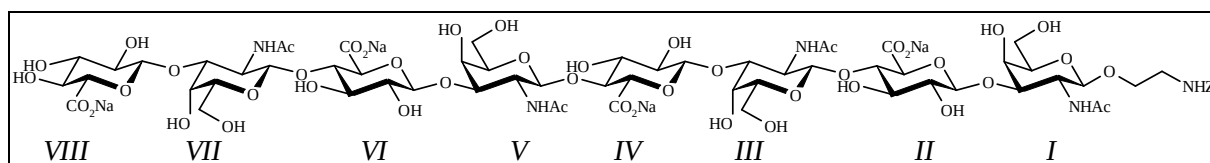
Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 711 μL, 0.71 mmol, 15eq) et de H₂O₂ (30%, 355 μL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C d'heptasaccharide **153** (140 mg, 47 μmol) dissous dans du THF (3 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis du MeOH (1.5 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.88 mL, 3.12 mmol, 35eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 5 heures à température ambiante puis concentré. Le produit est ensuite dissous dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (3 fois). Le solide est ensuite lavé 7 fois à l'acétone (2 mL). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (71 mg, 95%) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -4 (c 0.95, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.45 (s, 5H, Ph), 5.13 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.51-4.49 (m, 7H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV}, H-1^V, H-1^{VI} et H-1^{VII}), 4.12, 4.11 (2dd, 3H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^I, H-4^{III} et H-4^V), 4.00, 3.99 (2dd, 3H, *J*_{1,2} 8Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-2^I, H-2^{III} et H-2^V), 3.88 (dd, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-2^{VII}), 3.94-3.67 (m, 23H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-3^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V, H-4^{VI}, H-5^{VI}, H-3^{VII}, H-4^{VII}, H-5^{VII}, H-6a^{VII}, H-6b^{VII} et O-CH₂), 3.65-3.61 (m, 1H, O-CH₂), 3.58 (dd, 3H, *J*_{3,4} 3Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{II}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 3.41-3.30 (m, 5H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI} et CH₂-N), 2.06, 2.03, 1.96 (3s, 12H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 175.70, 175.64, 175.47, 175.21, 175.12 (7C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 158.96 (1C, NHC(O)O), 137.06, 129.47, 129.08, 128.48 (6C, Ph), 104.96, 104.92 (3C, C-1^{II}, C-1^{IV} et C-1^{VI}), 102.14, 101.67, 101.52, 101.50 (4C, C-1^I, C-1^{III}, C-1^V et C-1^{VII}), 80.98, 80.76, 80.41, 80.37, 80.26 (6C, C-3^I, C-4^{II}, C-3^{III}, C-4^{IV}, C-3^V et C-4^{VI}), 77.01, 76.99, 76.96, 76.93, 75.90, 75.62, 75.52, 74.35, 73.14, 73.09, 71.75 (14C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-5^{IV}, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-5^{VI}, C-3^{VII} et C-5^{VII}), 69.27 (1C, O-CH₂), 69.25, 68.42 (4C, C-4^I, C-4^{III}, C-4^V et C-4^{VII}), 67.59 (1C, CH₂-Ph), 61.74, 61.67 (4C, C-6^I, C-6^{III}, C-6^V et C-6^{VII}), 52.99, 51.78, 51.66 (4C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et C-2^{VII}), 41.09 (1C, CH₂-N), 23.17, 22.84 (4C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : *m/z* : calculée pour C₆₀H₈₉N₅O₄₁Na ([M+3H-2Na]⁺) : 1558.4931 ; trouvée : 1558.4933, calculée pour C₆₀H₈₉N₅O₄₁ ([M+3H-3Na]²⁺) : 766.7438 ; trouvée : 766.7424.



$C_{66}H_{93}N_5Na_4O_{47}$
MW = 1800.44 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (160)

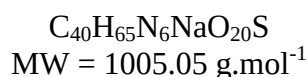
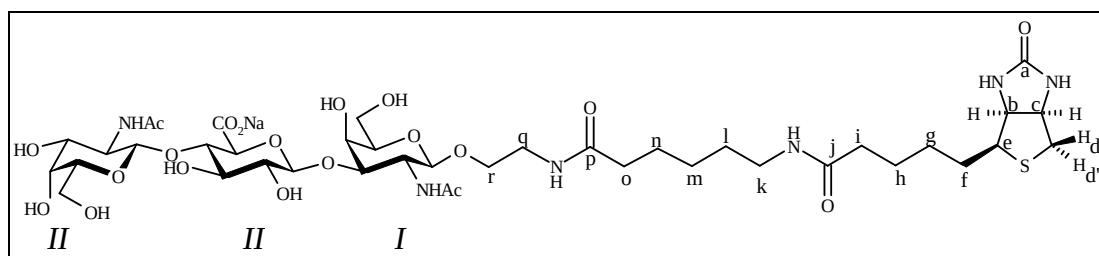
Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 496 µL, 0.49 mmol, 20eq) et de H₂O₂ (30%, 247 µL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C d'octasaccharide **154** (80 mg, 25 µmol) dissous dans du THF (1 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis du MeOH (0.75 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.53 mL, 2.11 mmol, 85eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 5 heures à température ambiante puis concentré. Le produit est ensuite dissous dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (3 fois). Le solide est ensuite lavé 7 fois à l'acétone (2 mL). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (37 mg, 84%) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 2 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -24.5 (c 0.99, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) : δ(ppm) 7.45 (s, 5H, Ph), 5.13 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.52-4.45 (m, 8H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV}, H-1^V, H-1^{VI}, H-1^{VII} et H-1^{VIII}), 4.18 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 4.12, 4.11 (2dd, 3H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}, H-4^V et H-4^{VII}), 4.04-3.97 (m, 4H, H-2^I, H-2^{III}, H-2^V et H-2^{VII}), 3.95-3.89 (m, 1H, O-CH₂), 3.83-3.55 (m, 24H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-3^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V, H-4^{VI}, H-5^{VI}, H-3^{VII}, H-5^{VII}, H-6a^{VII}, H-6b^{VII}, H-5^{VIII} et O-CH₂), 3.48 (dd, 3H, $J_{2,3}$ 9Hz, $J_{3,4}$ 10Hz, H-3^{II}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 3.51-3.45 (m, 2H, H-3^{VIII} et H-4^{VIII}), 3.41-3.30 (m, 6H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI}, H-2^{VIII} et CH₂-N), 2.04, 2.03, 1.96 (3s, 12H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) : δ(ppm) 176.59, 175.62, 175.44, 175.24, 175.22, 175.17 (8C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI}, C-6^{VIII} et C=O), 158.95 (1C, NHC(O)O), 137.05, 129.43, 129.05, 128.45 (6C, Ph), 104.96, 104.89, 104.76 (4C, C-1^{II}, C-1^{IV}, C-1^{VI} et C-1^{VIII}), 102.11, 101.45 (4C, C-1^I, C-1^{III}, C-1^V et C-1^{VII}), 80.95, 80.72, 80.34, 80.33 (7C, C-3^I, C-4^{II}, C-3^{III}, C-4^{IV}, C-3^V, C-4^{VI} et C-3^{VII}), 77.05, 77.00, 76.76, 75.94, 75.60, 75.50, 74.33, 73.36, 73.10, 73.08, 72.44, (17C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-5^{IV}, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-5^{VI}, C-5^{VII}, C-2^{VIII}, C-3^{VIII}, C-4^{VIII} et C-5^{VIII}), 69.22 (1C, O-CH₂), 68.37, 68.33 (4C, C-4^I, C-4^{III}, C-4^V et C-4^{VII}), 67.56 (1C, CH₂-Ph), 61.72, 61.63 (4C, C-6^I, C-6^{III}, C-6^V et C-6^{VII}), 51.75, 51.66, 51.62 (4C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et C-2^{VII}), 41.04 (1C, CH₂-N), 23.14, 22.80 (4C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour C₆₆H₉₇N₅O₄₇ ([M+4H-4Na]²⁺) : 854.7599 ; trouvée : 854.7588.



2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (167)

Le trisaccharide **155** (20 mg, 25 μmol) est dissous dans l'eau distillée (1.5 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) 1 nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut **161** (14 mg, 84%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

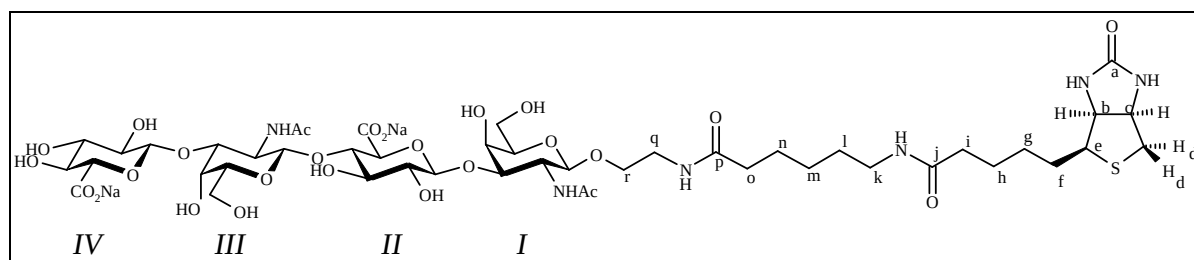
Un mélange de l'amine obtenue précédemment et de réactif biotinylé (38 mg, 0.08 mmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h30, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (15 mg, 60% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

$[\alpha]_D^{20} +10$ (c 1.00, H₂O).

RMN 1H (D₂O, 400MHz) : δ(ppm) 4.63 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.51 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{II}), 4.50 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 4.44 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.13 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 4.02 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2^I), 3.96-3.68 (m, 14H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-2^{III}, H-3^{III}, H-4^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III} et CH₂-r), 3.59 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 3.41-3.32 (m, 4H, H-2^{II}, H-e, CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.29-2.23 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.06, 2.02 (2s, 6H, NHC(O)CH₃), 1.80-1.28 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN 13C (D₂O, 100MHz) : δ(ppm) 177.59, 177.26, 175.68, 175.35, 175.17 (5C, C-6^{II} et C=O), 165.98 (1C, C-a), 104.93 (1C, C-1^{II}), 101.99, 101.71 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 80.87 (1C, C-3^I), 80.29 (1C, C-4^{II}), 76.99, 76.96, 75.88, 75.53 (4C, C-5^I, C-5^{II}, C-4^{III}, C-5^{III}), 74.37 (1C, C-3^{III}), 73.10 (1C, C-2^{II}), 71.71 (1C, C-3^{III}), 68.77 (1C, C-r), 68.42 (1C, C-4^I), 62.75 (1C, C-b), 61.69 (1C, C-6^I), 60.90 (1C, C-c), 56.05 (1C, C-e), 52.97 (1C, C-2^{III}), 51.77 (1C, C-2^I), 40.36 (1C, C-d), 39.92, 39.73 (2C, C-k et C-q), 36.30, 36.18 (2C, C-i et C-o), 28.68, 28.51, 28.34, 26.25, 25.88, 25.66 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.12, 22.94 (2C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z: calculée pour C₄₀H₆₆NaN₆O₂₀S ([M+H]⁺) : 1005.3950 ; trouvée : 1005.3953.



$C_{46}H_{72}N_6Na_2O_{26}S$
 MW = 1203.15 g.mol⁻¹

2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (168)

Le tétrasaccharide **156** (20 mg, 20 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut **162** (17.5 mg, 100%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

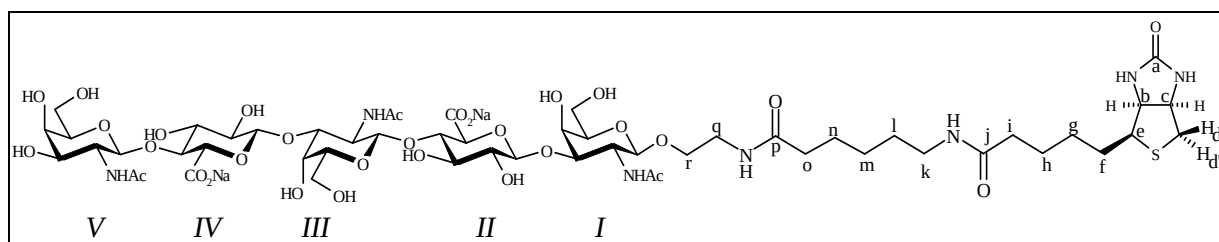
Un mélange de l'amine obtenue précédemment et de réactif biotinylé (36.6 mg, 0.08 mmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (17 mg, 72% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -2.5 (c 0.97, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.63 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1$ Hz, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.58-4.48 (m, 4H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III} et H-1^{IV}), 4.44 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.19 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 4.16 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 4.02 (2dd, 2H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2^I et H-2^{III}), 3.96-3.90 (m, 1H, CH₂-r), 3.85-3.67 (m, 12H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-5^{IV} et CH₂-r), 3.59 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{2,3}$ 9Hz, H-3^{II}), 3.52-3.47 (m, 2H, H-3^{IV} et H-4^{IV}), 3.41-3.31 (m, 5H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-e et CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.29- 2.23 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.04, 2.02 (2s, 6H, NHC(O)CH₃), 1.81-1.32 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.60, 177.27, 176.57, 175.61, 175.35, 175.19 (6C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 165.97 (1C, C-a), 104.94, 104.79 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 101.99, 101.52 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 80.94, 80.84, 80.42 (3C, C-3^I, C-4^{II} et C-3^{III}), 77.06, 76.78, 75.96, 75.65, 75.55, 74.39, 73.38, 73.08, 72.46 (9C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 68.76 (1C, C-r), 68.41, 68.33 (2C, C-4^I et C-4^{III}), 62.75 (1C, C-b), 61.75, 61.71 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 60.91 (1C, C-c), 56.05 (1C, C-e), 51.79, 51.69 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 40.36 (1C, C-d), 39.93, 39.74 (2C, C-k et C-q), 36.30, 36.18 (2C, C-i et C-o), 28.68, 28.50, 28.34, 26.25, 25.88, 25.66 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.17, 22.94 (2C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z: calculée pour C₄₆H₇₄NaN₆O₂₆S ([M+2H-Na]⁺) : 1181.4271 ; trouvée : 1181.4279 ; calculée pour C₄₆H₇₄N₆O₂₆S (M+2H-2Na)²⁺ : 578.2108 ; trouvée : 578.2097.



$C_{54}H_{85}N_7O_{31}S$
MW = 1406.35 g.mol⁻¹

2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (169)

Le pentasaccharide **157** (15 mg, 12 μmol) est dissous dans l'eau distillée (1.2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) 4 jours à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut **163** (10 mg, 77%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

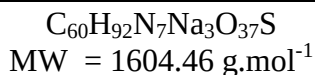
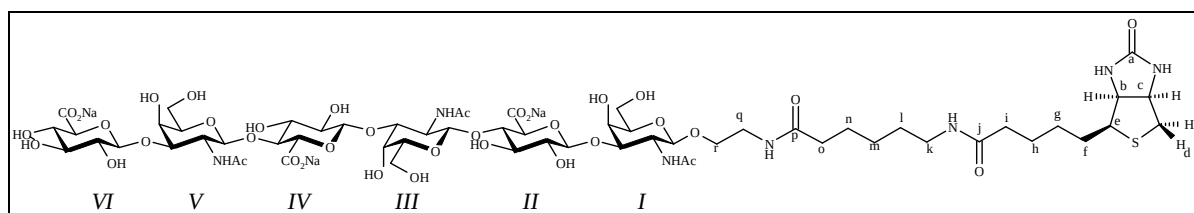
Un mélange de l'amine obtenue précédemment et de réactif biotinylé (21 mg, 0.05 mmol, 5eq) est dissous dans un mélange de DMF (450 μL), de Et₃N (50 μL) et d'eau distillée (500 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 heures, puis est concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (10 mg, 59% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -2.5 (c 1.05, H₂O).

RMN 1H (D₂O, 400MHz) : δ(ppm) 4.62 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.53-4.51 (m, 5H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV} et H-1^V), 4.43 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.13, 4.11 (2dd, 2H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I et H-4^{III}), 4.04-3.97 (m, 2H, H-2^I et H-2^{III}), 3.95-3.68 (m, 20H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-2^V, H-3^V, H-4^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V et CH₂-r), 3.59, 3.58 (2dd, 2H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{II} et H-3^{IV}), 3.41-3.32 (m, 5H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-e et CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.28-2.21 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.02, 2.02, 2.01 (3s, 9H, NHC(O)CH₃), 1.78-1.22 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN 13C (D₂O, 100MHz) : δ(ppm) 177.54, 177.21, 175.64, 175.57, 175.29 (7C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 165.92 (1C, C-a), 104.95 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 102.00, 101.62, 101.51 (3C, C-1^I, C-1^{III} et C-1^V), 80.97, 80.83, 80.39, 80.21 (4C, C-3^I, C-4^{II}, C-3^{III} et C-4^{IV}), 77.06, 77.01, 75.88, 75.60, 75.54, 74.84, 74.32, 73.14, 73.08, 71.75 (10C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-5^{IV}, C-3^V et C-5^V), 68.76 (1C, C-r), 68.76, 68.41, 68.39 (3C, C-4^I, C-4^{III} et C-4^V), 62.75 (1C, C-b), 61.70 (3C, C-6^I, C-6^{III} et C-6^V), 60.90 (1C, C-c), 56.05 (1C, C-e), 52.98, 51.77, 51.63 (3C, C-2^I, C-2^{III} et C-2^V), 40.36 (1C, C-d), 39.92, 39.73 (2C, C-k et C-q), 36.29, 36.18 (2C, C-i et C-o), 28.67, 28.49, 28.34, 26.24, 25.87, 25.65 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.15, 23.13, 22.93 (3C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour $C_{54}H_{87}N_7O_{31}NaS$ ($[M+2H-Na]^+$) : 1384.5065 ; trouvée : 1384.5046 ; calculée pour $C_{54}H_{87}N_7O_{31}S$ ($[M+2H-2Na]^2+$) : 679.7505 ; trouvée : 679.7482.



2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (170)

L'hexasaccharide **158** (28 mg, 20 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut **164** (19 mg, 75%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

Un mélange de l'amine obtenue précédemment et de réactif biotinyé (27mg, 0.06 mmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et de l'eau distillée (75 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis est concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (17 mg, 63% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

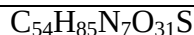
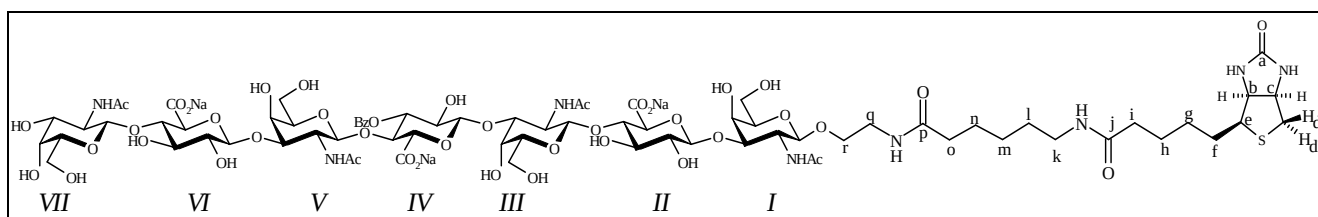
$[\alpha]_D^{20}$ -8.5 (c 0.92, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400MHz) : δ(ppm) 4.60 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.53-4.48 (m, 6H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV}, H-1^V et H-1^{VI}), 4.43 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.16 (dd, 1H, $J_{4,5} < 11\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 4.12, 4.11 (2dd, 2H, $J_{4,5} < 11\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III} et H-4^V), 4.04-3.96 (m, 3H, H-2^I, H-2^{III} et H-2^V), 3.95-3.67 (17H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-3^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V et H-5^{VI}), 3.59 (dd, 2H, $J_{3,4}$ 9Hz, $J_{3,2}$ 8Hz, H-3^{II} et H-3^{IV}), 3.53-3.45 (m, 2H, H-3^{VI} et H-4^{VI}), 3.39-3.26 (6H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI}, H-e et CH₂-q), 3.18 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.00 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.79 (dd, 1H, H-d), 2.21-2.28 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.02, 2.02, 2.01 (3s, 9H, NHC(O)CH₃), 1.78-1.22 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100MHz) : δ(ppm) 177.60, 177.27, 175.36 (8C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 165.92 (1C, C-a), 104.94, 104.79, 101.98, 101.58 (6C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III}, C-1^{IV}, C-1^V et C-1^{VI}), 80.91, 80.87, 80.42, 80.38 (5C, C-3^I, C-4^{II}, C-3^{III}, C-4^{IV} et C-3^V), 76.68, 76.66, 76.62, 76.60, 75.92, 75.63, 75.61, 75.53, 74.39, 74.35, 73.33, 73.04, 73.02, 72.38 (13C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-5^{IV}, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-4^{VI} et C-5^{VI}), 68.42, 68.37, 68.33 (3C, C-4^I, C-4^{III} et C-4^V), 68.76 (1C, C-r), 62.75 (1C, C-b), 61.70 (3C, C-6^I et C-6^{III} et C-6^V), 60.90 (1C, C-c), 56.04 (1C, C-e), 51.77, 51.69, 51.65 (3C, C-2^I, C-2^{III} et C-2^V), 40.35 (1C, C-d), 39.91, 39.72 (2C, C-k et C-q), 36.29, 36.18 (2C, C-i et C-o), 28.67, 28.49, 28.33, 26.24, 25.87, 25.65 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.13, 22.93 (3C, NHC(O)CH₃).

ES-MS : m/z: 1536 [M+3H-3Na]⁺.

SM-HR(ES) : m/z: calculée pour C₆₀H₉₄N₇O₃₇S ([M+2H-3Na]⁺) : 1536.5410 ; trouvée : 1536.5398.



MW = 1406.35 g.mol⁻¹

2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (171)

L'heptasaccharide **159** (30 mg, 19 μmol) est dissous dans l'eau distillée (1.5 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) une nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut **165** (27 mg, 100%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

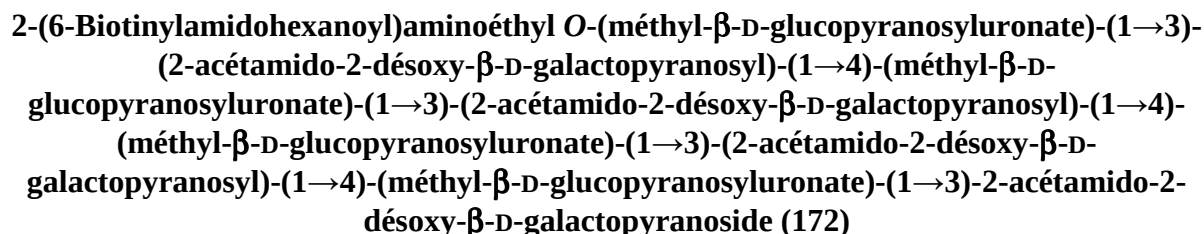
Un mélange de l'amine obtenue précédemment et de réactif biotinylé (27.5 mg, 0.02 mmol, 5eq) est dissous dans un mélange de DMF (1.35 mL), de Et₃N (150 μL) et d'eau distillée (1.5 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h30, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (29 mg, 85% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

[α]_D²⁰ -13 (c 1.02, H₂O).

RMN 1H (D₂O, 400MHz) : δ(ppm) 4.62 (ddd, 1H, *J*_{c,d}<1Hz, *J*_{c,d'} 5Hz, *J*_{b,c} 8Hz, H-c), 4.54-4.45 (m, 7H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV}, H-1^V, H-1^{VI} et H-1^{VII}), 4.43 (dd, 1H, *J*_{b,e} 5Hz, H-b), 4.12, 4.11 (2dd, 3H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^I, H-4^{III} et H-4^V), 4.04-3.97 (m, 3H, H-2^I, H-2^{III} et H-2^V), 3.95-3.88 (m, 2H, H-2^{VII} et CH₂-r), 3.95-3.63 (m, 24H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-3^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V, H-4^{VI}, H-5^{VI}, H-3^{VII}, H-4^{VII}, H-5^{VII}, H-6a^{VII}, H-6b^{VII} et CH₂-r), 3.59, 3.58 (2dd, 3H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9.5Hz, H-3^{II}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 3.41-3.31 (m, 6H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI}, H-e et CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, *J*_{k,k'} = *J*_{k,l} 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, *J*_{d,d'} 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.28-2.21 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.06, 2.03, 2.02 (3s, 12H, NHC(O)CH₃), 1.78-1.28 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN 13C (D₂O, 100MHz) : δ(ppm) 177.57, 177.24, 175.66, 175.59, 175.31, 175.28, 175.14 (9C, C-6^{II}, C-6^{IV}, C-6^{VI} et C=O), 165.95 (1C, C-a), 104.97 (3C, C-1^{II}, C-1^{IV} et C-1^{VI}), 102.01, 101.62, 101.52, 101.46 (4C, C-1^I, C-1^{III}, C-1^V et C-1^{VII}), 81.02, 80.99, 80.35, 80.21 (6C, C-3^I, C-4^{II}, C-3^{III}, C-4^{IV}, C-3^V et C-4^{VI}), 77.07, 77.02, 75.89, 75.61, 75.56, 74.40, 74.35, 73.32, 73.15, 73.13, 73.08, 71.77 (14C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-5^{IV}, C-5^V, C-2^{VI}, C-3^{VI}, C-5^{VI}, C-3^{VII} et C-5^{VII}), 68.77 (1C, C-r), 68.45, 68.41, 68.38 (4C, C-4^I, C-4^{III}, C-4^V et C-4^{VII}), 62.76 (1C, C-b), 61.73, 61.71 (4C, C-6^I, C-6^{III}, C-6^V et C-6^{VII}), 60.91 (1C, C-c), 56.05 (1C, C-e), 52.99, 51.78, 51.64 (4C, C-2^I, C-2^{III}, C-2^V et C-2^{VII}), 40.36 (1C, C-d), 39.93, 39.74 (2C, C-k et C-q), 36.30, 36.18 (2C, C-i et C-o), 28.68, 28.50, 28.36, 26.25, 25.88, 25.66 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.15, 23.13, 22.94 (4C, NHC(O)CH₃).

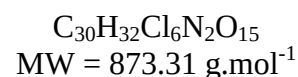
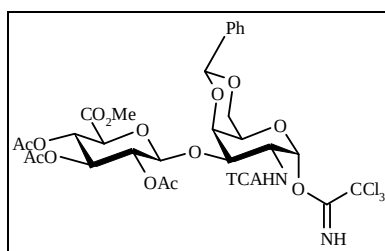
SM-HR(ES) : *m/z* : calculée pour C₆₈H₁₀₈N₈O₄₂S ([M+3H-3Na]²⁺) : 869.3063 ; trouvée: 869.3078.



Un mélange de l'amine obtenue précédemment et de réactif biotinylé (42 mg, 0.1 mmol, 5eq) est dissous dans un mélange de DMF (1.35 mL), de Et₃N (150 µL) et d'eau distillée (1.5 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2h30, puis concentré. Le solide est lavé dix fois avec de l'EtOH (2 mL). Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (33 mg, 77% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

RMN 1H (D₂O, 400MHz) : δ (ppm) 4.62 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.54-4.45 (m, 8H, H-1^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-1^{IV}, H-1^V, H-1^{VI}, H-1^{VII} et H-1^{VIII}), 4.43 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.17 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 4.12, 4.11 (2dd, 3H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}, H-4^V et H-4^{VII}), 4.03-3.94 (m, 4H, H-2^I, H-2^{III}, H-2^V et H-2^{VII}), 3.94-3.88 (m, 1H, CH₂-r), 3.85-3.62 (m, 24H, H-3^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-4^{IV}, H-5^{IV}, H-3^V, H-5^V, H-6a^V, H-6b^V, H-4^{VI}, H-5^{VI}, H-3^{VII}, H-5^{VII}, H-6a^{VII}, H-6b^{VII}, H-5^{VIII} et CH₂-r), 3.61-3.55 (m, 3H, H-3^{II}, H-3^{IV} et H-3^{VI}), 3.52-3.46 (m, 2H, H-3^{VIII} et H-4^{VIII}), 3.40-3.29 (m, 7H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-2^{VI}, H-2^{VIII}, H-e et CH₂-q), 3.18 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 2.99 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.79 (dd, 1H, H-d), 2.28-2.21 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.02, 2.01, 2.00 (3s, 12H, NHC(O)CH₃), 1.78-1.28 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

SM-HR(ES): m/z : calculée pour $C_{74}H_{116}N_8O_{48}S$ ($[M+4H-4Na]^{2-}$) : 957.3223 ;
trouvée : 957.3259.



O-(Méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-O-benzylidène-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranose (173)

A une solution de disaccharide **126** (5 g, 6.5 mmol) dissous dans du DMF (50 mL), est ajouté de l'acétate d'hydrazine (1.07 g, 11.7 mmol, 1.8eq). Le mélange réactionnel est agité 1 heure à température ambiante sous flux d'argon. La solution est ensuite versée dans de l'eau glacée (100 mL), et de l'AcOEt (200 mL) est ajouté. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt et la phase organique est lavée avec une solution de NaCl saturée (4 à 5 fois), puis séchée sur MgSO_4 et concentrée pour donner un solide blanc.

L'hémiacétal obtenu (4.38 g, 6.02 mmol) est dissous dans du dichloroéthane (50 mL). Le trichloroacétonitrile (6 mL, 60.2 mmol, 10eq) et le DBU (135 μL , 0.90 mmol, 0.15eq) sont ajoutés successivement. Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à température ambiante sous flux d'argon puis est concentré. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (AcOEt/EP 1 : 1 avec 0.1% de Et_3N) suivie d'une recristallisation dans l' Et_2O donne le produit désiré (5.23 g, 54 % sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +67$ (c 1.00, CHCl_3).

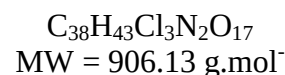
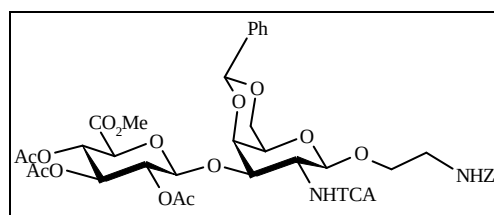
F 131-132°C (Et_2O).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 8.76 (s, 1H, C=NH), 7.55-7.30 (m, 5H, Ph), 6.79 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 8Hz, NH GalN), 6.65 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5Hz, H-1 GalN), 5.57 (s, 1H, CH-Ph), 5.29-5.16 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 5.02 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, $J_{2,3}$ 8.5Hz, H-2 GlcA), 4.82 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.76 (ddd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 4.56 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 4.39 (dd, 1H, H-3 GalN), 4.33 (dd, 1H, $J_{5,6a}<1\text{Hz}$, $J_{6a,6b}$ 12.5 Hz, H-6a GalN), 4.12 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5 GlcA), 4.08 (dd, 1H, $J_{5,6b}<1\text{Hz}$, H-6b GalN), 3.93-3.91 (m, 1H, H-5 GalN), 3.72 (s, 3H, COOCH_3), 2.02 (s, 9H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62.5 MHz): δ (ppm) 169.85, 169.54, 169.25, 166.77, 161.66, 160.08 (6C, C-6 GlcA, C=O et C=NH), 137.33, 129.00, 128.19, 126.14 (6C, Ar), 100.79 (1C, CH-Ph), 98.85 (1C, C-1 GlcA), 94.40 (1C, C-1 GalN), 92.23, 90.82 (2C, CCl_3), 74.29 (1C, C-4 GalN), 72.57 (1C, C-5 GlcA), 72.03, 69.06 (2C, C-3 et C-4 GlcA), 71.05 (1C, C-3 GalN), 70.66 (1C, C-2 GlcA), 68.79 (C-6 GalN), 65.26 (1C, C-5 GalN), 52.99 (1C, COOMe), 49.98 (1C, C-2 GalN), 20.60, 20.50, 20.39 (3C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 893 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{Cl}_6\text{N}_2\text{O}_{15}$: C, 41.26 ; H, 3.69 ; N, 3.28 ; trouvée C, 41.11 ; H, 3.58 ; N, 3.09.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-O-benzylidène-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (177)

Un mélange d'imidate **173** (419 mg, 0.48 mmol), de 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol (150 mg, 0.77 mmol, 1.6eq) et de tamis moléculaire (4Å) dans du CH_2Cl_2 anhydre (4 mL) est agité pendant 1 heure à température ambiante sous argon. A -60°C , le $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1M, 48 μL , 0.05 mmol, 0.10eq/imidate) est ajouté, puis la solution est agitée jusqu'à ce que la température remonte à -20°C . La solution est ensuite neutralisée avec de la Et_3N (420 μL , 0.14 mmol, 3eq/ $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$), filtrée sur célite, puis concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{-PrOH}$ 19 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (312 mg, 72 %) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +13.5$ (c 1.00, CHCl_3).

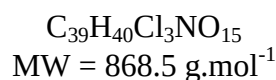
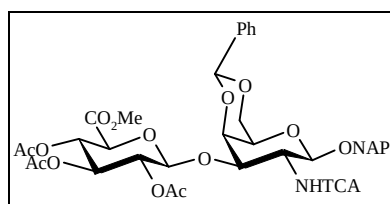
F 190-192°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 7.54-7.22 (m, 10H, Ar), 7.06 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 6.5Hz, NH GalN), 5.58 (s, 1H, CH-Ph), 5.29-5.24 (m, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 5.25 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 GlcA), 5.17 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 8.5Hz, H-3 GlcA), 5.11-5.01 (m, 3H, H-2 GlcA et CH_2 -Ph), 5.03 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.94 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.58 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3.5Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.44 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, H-4 GalN), 4.31 (dd, 1H, $J_{5,6a} < 1\text{Hz}$, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a GalN), 4.07 (dd, 1H, $J_{5,6b} < 1\text{Hz}$, H-6b GalN), 4.02 (d, 1H, H-5 GlcA), 3.96-3.89 (m, 1H, O- CH_2), 3.85-3.78 (m, 1H, H-2 GalN), 3.71 (s, 3H, COOCH_3), 3.72-3.65 (m, 1H, O- CH_2), 3.50-3.48 (m, 1H, H-5 GalN), 3.45-3.33 (m, 2H, CH_2 -N), 2.01, 2.00, 1.99 (3s, 9H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 169.96, 169.36, 169.16, 167.06, 162.26 (5C, C-6 GlcA et C=O), 156.35 (1C, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 137.58, 136.48, 128.84, 128.10, 127.99, 126.07 (12C, Ph), 100.56 (1C, CH-Ph), 99.96 (1C, C-1 GlcA), 98.93 (1C, C-1 GalN), 92.20 (1C, CCl_3), 75.54 (1C, C-4 GalN), 74.01 (1C, C-3 GalN), 72.30 (1C, C-4 GlcA), 71.93 (1C, C-5 GlcA), 71.18 (1C, C-2 GlcA), 69.09 (1C, O- CH_2), 68.95 (1C, C-3 GlcA), 68.92 (1C, C-6 GalN), 66.68 (1C, C-5 GalN), 66.59 (1C, CH_2 -Ph), 54.86, (1C, C-2 GalN), 52.90 (1C, COOCH_3), 40.87 (1C, CH_2 -N), 20.76, 20.52, 20.44 (3C, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$).

ES-SM : m/z 922 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{17}$: C, 50.37 ; H, 4.78 ; N, 3.09 ; trouvée C, 50.45 ; H, 4.96 ; N, 2.95.



2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-O-benzylidène-2-désoxy-2-trichloroacétamido-D-galactopyranoside (178)

Un mélange d'imide **173** (10 g, 11.4 mmol), de 2-naphtalèneméthanol (2.85 g, 18.3 mmol, 1.6eq) et de tamis moléculaire (4Å) dans du CH_2Cl_2 anhydre (100 mL) est agité pendant 45 minutes à température ambiante sous argon. A -60°C , du $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (1M, 1.14 mL, 1.14 mmol, 0.10eq/imide) est ajouté, puis la solution est agitée jusqu'à ce que la température remonte à -20°C . La solution est ensuite neutralisée avec de la Et_3N (477 μL , 3.42 mmol, 3eq/ $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$), filtrée sur célite, puis concentrée. Une dissolution dans l'AcOEt à chaud suivie d'une précipitation avec de l'éther de pétrole et une purification des eaux mères par chromatographie flash sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 1 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (8.55 g, 86 %) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -11 (c 1.00, CHCl_3).

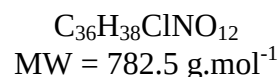
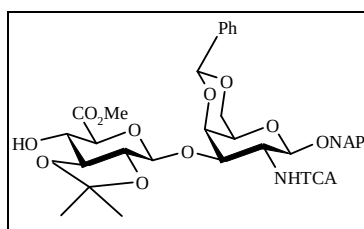
F 250-251 $^\circ\text{C}$ (AcOEt).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 7.78-7.44 (m, 12H, Ar), 7.05 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7Hz, NH GalN), 5.61 (s, 1H, CH-Ph), 5.15-5.11 (m, 3H, H-1 GalN, H-2 et H-4 GlcA), 5.03 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3 GlcA), 4.98 (ABq, 2H, CH_2 -Ar), 4.90 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.67 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3.5Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.45 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, H-4 GalN), 4.40 (d, 1H, $J_{6a,6b}$ 12.5Hz, H-6a GalN), 4.12 (dd, 1H, $J_{5,6b} < 1\text{Hz}$, H-6b GalN), 4.00 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5 GlcA), 3.91-3.85 (m, 1H, H-2 GalN), 3.70 (s, 3H, COOCH_3), 3.54-3.52 (m, 1H, H-5 GalN), 1.99 (s, 9H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 170.01, 169.37, 169.12, 162.11 (5C, C-6 GlcA et C=O), 137.69, 134.30, 133.18, 133.09, 128.85, 128.11, 127.89, 127.67, 127.56, 127.11, 126.15, 126.09 (16C, Ph), 100.67 (1C, CH-Ph), 100.07 (1C, C-1 GlcA), 97.73 (1C, C-1 GalN), 92.28 (1C, CCl_3), 75.72 (1C, C-4 GalN), 73.88 (1C, C-3 GalN), 72.38, 69.04 (2C, C-3 et C-4 GlcA), 71.96 (1C, C-5 GlcA), 71.22 (1C, C-2 GlcA), 71.18 (1C, CH_2 -Ar), 69.06 (1C, C-6 GalN), 66.71 (1C, C-5 GalN), 55.24 (1C, C-2 GalN), 52.88 (1C, COOCH_3), 20.79, 20.55, 20.47 (3C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 891 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{Cl}_3\text{NO}_{15}$: C, 53.90 ; H, 4.64 ; N, 1.61 ; trouvée C, 53.79 ; H, 4.62 ; N, 1.49.



2-Naphtylmethyl O-(méthyl 2,3-O-isopropylidène-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-4,6-O-benzylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (179)

Une solution de MeONa dans le MeOH (quantité catalytique) est ajoutée à une solution de disaccharide **178** (5.56 g, 6.4 mmol) dans du MeOH anhydre (45 mL) et du CH₂Cl₂ anhydre (25 mL) placée sous argon. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures puis est neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺], filtré sur coton, concentré et séché sous vide.

A une solution de disaccharide précédemment obtenu (4.48 g, 6.94 mmol) et de (±)ACS (480 mg) dans le DMF (48 mL), est ajouté 6 fois toutes les 20 minutes, du 2-méthoxypropène (369 µL, 3.99 mmol, 0.6eq). De la Et₃N (864 µL) est ensuite additionnée et la solution est concentrée. Le mélange est dilué avec de l'AcOEt, la phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée puis plusieurs fois avec une solution de NaCl saturée, séchée sur MgSO₄ et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 9 : 1 avec 0.2% de Et₃N) donne le produit désiré (2.84 g, 57 %) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -5 (c 1.01, CHCl₃).

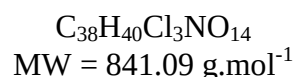
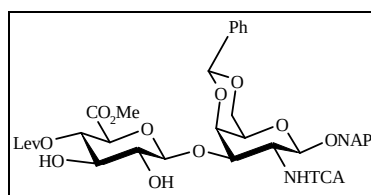
F 218°C (AcOEt).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ(ppm) 7.77-7.32 (m, 12H, Ar), 7.18 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 8Hz, NH GalN), 5.59 (s, 1H, CH-Ph), 5.32 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.96 (ABq, 2H, CH₂-Ar), 4.91 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.73 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.46 (dd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, H-4 GalN), 4.40 (d, 1H, $J_{6a,6b}$ 12.5Hz, H-6a GalN), 4.14-4.03 (m, 2H, H-6 GalN et H-4 GlcA), 3.94-3.81 (m, 5H, H-2 GalN, H-5 GlcA et COOCH₃), 3.57-3.55 (s, 1H, H-5 GalN), 3.53-3.37 (m, 2H, H-2 et H-3 GlcA), 3.26 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}}$ 2Hz, OH), 1.40, 1.37 (2s, 6H, C(CH₃)₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62.5 MHz): δ(ppm) 169.83, 162.40 (2C, C-6 GlcA et C=O), 137.84, 134.48, 133.33, 133.25, 129.06, 128.41, 128.20, 128.04, 127.83, 127.23, 126.42, 126.26, 126.17 (16C, Ph), 112.43 (1C, C(CH₃)₂), 102.77 (1C, C-1 GlcA), 100.93 (1C, CH-Ph), 97.65 (1C, C-1 GalN), 92.42 (1C, CCl₃), 79.50 (1C, C-3 GlcA), 76.21 (1C, C-4 GalN), 75.85 (1C, C-2 GlcA), 75.73 (1C, C-5 GlcA), 74.76 (1C, C-3 GalN), 71.46 (1C, CH₂-Ar), 70.93 (1C, C-4 GlcA), 69.34 (1C, C-6 GalN), 66.83 (1C, C-5 GalN), 55.66 (1C, C-2 GalN), 53.08 (1C, COOCH₃), 26.80, 26.61 (2C, C(CH₃)₂).

ES-SM : m/z 799 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₆H₃₈Cl₃NO₁₂ : C, 55.22 ; H, 4.89 ; N, 1.79 ; trouvée C, 54.97 ; H, 4.96 ; N, 1.70.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl 4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-4,6-O-benzylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (181)

Une solution de disaccharide **98** (5 g, 5.67 mmol) est agité 24 heures à température ambiante dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5 : 4 : 1, 100mL), puis évaporé et coévaporé à l'eau. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice donne le produit désiré (3.5 g, 73%), sous la forme d'un solide blanc.

$[\alpha]_D^{20}$ -26 (c 0.98, CHCl_3).

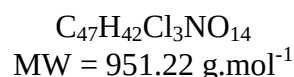
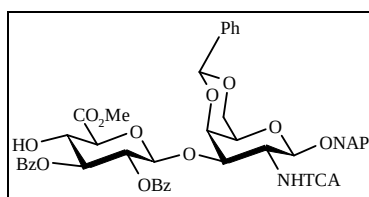
F 198°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 7.86-7.35 (m, 12H, Ar), 7.09 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 6.5Hz, NH GalN), 5.59 (s, 1H, CH-Ph), 5.14 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 5.02 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 GlcA), 4.94 (ABq, 2H, CH_2 -Ar), 4.57 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.41-4.37 (m, 2H, H-4 et H-6a GalN), 4.11 (dd, 1H, $J_{5,6b} < 1\text{Hz}$, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6b GalN), 4.00-3.95 (m, 1H, H-2 GalN), 3.92 (d, 1H, H-5 GlcA), 3.71 (s, 3H, COOCH_3), 3.65 (ddd, 1H, $J_{3,\text{OH}}$ 3Hz, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 3.56-3.52 (m, 2H, H-5 GalN et H-2 GlcA), 3.09 (d, 1H, OH-3 GlcA), 2.77-2.74 (m, 3H, OH-2 GlcA et CH_2 Lev), 2.58-2.54 (m, 2H, CH_2 Lev), 2.16 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1, 100 MHz): δ (ppm) 208.89 (1C, C=O Lev), 173.38, 169.87, 164.16 (3C, C-6 GlcA et C=O), 141.84, 135.65, 134.75, 134.21, 129.86, 129.42, 128.91, 128.72, 128.45, 127.69, 126.90, 126.70 (16C, Ar), 104.99 (1C, C-1 GlcA), 102.28 (1C, CH-Ph), 100.26 (1C, C-1 GalN), 92.12 (1C, CCl_3), 76.80 (2C, C-3 et C-4 GalN), 74.45 (1C, C-3 GlcA), 74.06 (1C, C-2 GlcA), 73.27 (1C, C-4 GlcA), 73.16 (1C, C-5 GlcA), 71.77 (1C, CH_2 -Ar), 67.82 (1C, C-5 GalN), 55.23 (1C, C-2 GalN), 53.42 (1C, COOCH_3), 34.63, 25.88 (2C, CH_2 Lev), 28.59 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 862 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{Cl}_3\text{NO}_{14}$: C, 54.26 ; H, 4.79 ; N, 1.66; trouvée C, 54.19 ; H, 4.86 ; N, 1.52.



2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-4,6-O-benzylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (183)

A une solution de disaccharide **100** (200 mg, 0.19 mmol) dans la pyridine (2 mL) est ajouté un mélange de pyridine-acide acétique-hydrazine monohydrate (12 : 8 : 1, 4.02 mL). Le mélange réactionnel est agité 8 minutes à température ambiante puis est dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (4 fois) puis avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , concentrée et enfin coévaporée au toluène (3 fois) pour donner un solide blanc. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1) donne le produit désiré (124 mg, 68%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +17$ (c 1.00, CHCl_3).

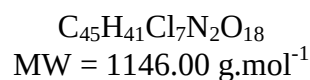
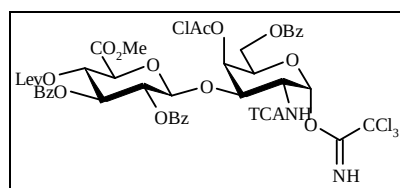
F 251°C (CH_2Cl_2 /EP).

RMN ^1H (CDCl_3 / CD_3OD , 400 MHz): δ (ppm) 7.95-7.28 (m, 22H, Ar), 6.82 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 6.5Hz, NH GalN), 5.56 (s, 1H, CH-Ph), 5.48 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, $J_{2,3}$ 9Hz, H-2 GlcA), 5.44 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 9Hz, H-3 GlcA), 5.27 (d, 1H, H-1 GlcA), 5.22 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1 GalN), 4.88 (ABq, 2H, CH_2 -Ar), 4.73 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3.5Hz, $J_{2,3}$ 11.5Hz, H-3 GalN), 4.45 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, H-4 GalN), 4.40 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 1Hz, $J_{6a,6b}$ 12.5Hz, H-6a GalN), 4.21 (dd, 1H, $J_{4,\text{OH}}$ 3Hz, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 4.36 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 1Hz, H-6b GalN), 4.08 (d, 1H, H-5 GlcA), 3.84 (s, 3H, COOCH_3), 3.84-3.79 (m, 1H, H-2 GalN), 3.55-3.53 (m, 1H, H-5 GalN), 3.34 (d, 1H, OH-4).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ (ppm) 169.19, 165.99, 165.34, 162.33 (6C, C-6 GlcA et C=O), 137.30, 134.11, 133.07, 132.99, 132.87, 132.73, 129.50, 128.79, 128.59, 128.45, 128.00, 127.98, 124.74, 127.64, 127.50, 127.25, 126.53, 125.83, 125.72, 125.61 (28C, Ph), 100.53 (1C, CH-Ph), 99.95 (1C, C-1 GlcA), 98.13 (1C, C-1 GalN), 92.05 (1C, CCl_3), 75.08 (1C, C-4 GalN), 75.022, 71.20 (2C, C-2 GlcA et C-3 GlcA), 74.86, 69.69 (2C, C-5 et C-4 GlcA), 73.34 (1C, C-3 GalN), 70.51 (1C, CH_2 -Ar), 68.77 (1C, C-6 GalN), 66.32 (1C, C-5 GalN), 53.69 (1C, C-2 GalN), 52.33 (1C, COOCH_3).

ES-SM : m/z 972 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{47}\text{H}_{42}\text{Cl}_3\text{NO}_{14}$: C, 59.35 ; H, 4.45 ; N, 1.47 ; trouvée C, 59.16 ; H, 4.47 ; N, 1.39.



O-(Méthyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranose (186a)

A une solution de disaccharide **196a** (201 mg, 0.18 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (1.8 mL) et du MeOH anhydre (0.2 mL), est ajouté du DDQ (119 g, 0.53 mmol, 3eq). Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température ambiante. La solution est ensuite diluée dans du CH_2Cl_2 et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (3 fois), séchée sur MgSO_4 , puis concentrée pour donner un solide marron. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 18 : 1 puis 9 : 1) donne le produit désiré (146 g, 83%) sous la forme d'une poudre jaune pâle.

A une solution d'hémiacétal précédemment obtenu (146 mg, 0.15 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (1.5 mL) sont ajoutés successivement du trichloroacétonitrile (115 μL , 1.46 mmol, 10eq) et du DBU (20 μL , 0.02 mmol, 0.15eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes sous argon à température ambiante. La solution est concentrée pour donner une huile noire. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1 avec 0.1% Et_3N) donne le produit désiré (110 mg, 66%) sous la forme d'une poudre blanche.

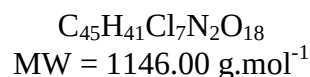
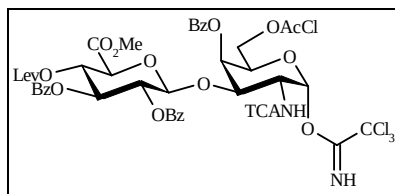
$[\alpha]_D^{20} +78$ (c 0.95, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.79 (s, 1H, C=NH), 7.92-7.31 (m, 15H, Ar), 6.79 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 8Hz, NH GalN), 6.56 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5Hz, H-1 GalN), 5.82 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.68 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.44 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 GlcA), 5.42 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 GlcA), 5.12 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.66 (ddd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 4.56-4.51 (m, 1H, H-5 GalN), 4.43 (dd, 1H, H-3 GalN), 4.35-4.37 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 4.25 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.26 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 3.76 (s, 3H, COOCH_3), 2.68-2.33 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.03 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 205.48 (1C, C=O Lev), 170.98, 166.55, 165.82, 165.38, 164.96, 161.17, 159.78 (8C, C-6 GlcA, C=O et C=NH), 133.41, 133.37, 133.17, 129.82, 129.71, 129.67, 129.31, 128.59, 128.42 (18C, Ph), 99.10 (1C, C-1 GlcA), 93.98 (1C, C-1 GalN), 91.73, 90.41 (2C, CCl_3), 72.85 (1C, C-5 GlcA), 72.17 (1C, C-3 GalN), 71.88 (1C, C-3 GlcA), 71.40 (1C, C-2 GlcA), 69.63 (1C, C-5 GalN), 69.38 (1C, C-4 GalN), 69.21 (1C, C-4 GlcA), 62.11 (1C, C-6 GalN), 53.09 (1C, COOCH_3), 50.50 (1C, C-2 GalN), 40.51 (1C, CH_2 AcCl), 37.46, 27.51, (2C, CH_2 Lev), 29.42 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 1021 $[\text{M} - \text{Cl}_3\text{CC}(\text{NH}) + \text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{Cl}_7\text{N}_2\text{O}_{18}$: C, 47.16 ; H, 3.61 ; N, 2.44 ; trouvée C, 47.30 ; H, 3.74 ; N, 2.32.



O-(Méthyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévilinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-6-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl-α-D-galactopyranose (186b)

A une solution de disaccharide **196b** (179 mg, 0.16 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (1.62 mL) et du MeOH anhydre (0.18 mL), est ajouté du DDQ (107 mg, 0.47 mmol, 3eq). Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température ambiante. La solution est ensuite diluée dans du CH_2Cl_2 et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (3 fois), séchée sur MgSO_4 , puis concentrée pour donner un solide marron. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 18 : 1 puis 9 : 1) donne le produit désiré (134 mg, 85%) sous la forme d'une poudre jaune pâle.

A une solution d'hémiacétal précédemment obtenu (134 mg, 0.13 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (1.3 mL) sont ajoutés successivement du trichloroacétonitrile (134 μL , 1.34 mmol, 10eq) et du DBU (20 μL , 0.02 mmol, 0.15eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes sous argon à température ambiante. La solution est concentrée pour donner une huile noire. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1 avec 0.1% Et_3N) donne le produit désiré (111 mg, 73%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +111$ (c 1.03, CHCl_3).

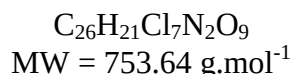
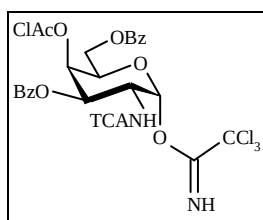
F 135-137°C (Et_2O).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.75 (s, 1H, C=NH), 8.02-7.34 (m, 15H, Ar), 6.95 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7.5Hz, NH GalN), 6.69 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5Hz, H-1 GalN), 5.86 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.63 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.44 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2 GlcA), 5.38 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 GlcA), 5.15 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.77 (ddd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 4.53 (dd, 1H, H-3 GalN), 4.52-4.49 (m, 1H, H-5 GalN), 4.35 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.24 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.16 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, H-6b GalN), 4.02 (s, 2H, CH_2 AcCl), 3.68 (s, 3H, COOCH_3), 2.69-2.31 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.03 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 205.45 (1C, C=O Lev), 171.01, 166.74, 166.44, 165.41, 165.18, 165.13, 162.11, 160.11 (8C, C-6 GlcA, C=O et C=NH), 133.46, 133.34, 129.91, 129.87, 129.79, 128.79, 128.72, 128.45, 128.36, 128.24 (15C, Ph), 98.51 (1C, C-1 GlcA), 93.99 (1C, C-1 GalN), 91.84, 90.55 (2C, CCl_3), 72.17 (1C, C-5 GlcA), 72.23 (1C, C-3 GlcA), 71.16 (1C, C-3 GalN), 70.95 (1C, C-2 GlcA), 69.81 (1C, C-5 GalN), 69.27 (1C, C-4 GlcA), 67.92 (1C, C-4 GalN), 63.43 (1C, C-6 GalN), 53.07 (1C, COOCH_3), 51.02 (1C, C-2 GalN), 40.50 (1C, CH_2 AcCl), 37.53, 27.57, (2C, CH_2 Lev), 29.49 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 1021 $[\text{M} - \text{Cl}_3\text{CC}(\text{NH}) + \text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{Cl}_7\text{N}_2\text{O}_{18}$: C, 47.16 ; H, 3.61 ; N, 2.44 ; trouvée C, 47.30 ; H, 3.68 ; N, 2.36.



3-O-Benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl- α -D-galactopyranose (187a)

A une solution de monosaccharide **204a** (580 mg, 0.81 mmol) dissous dans un mélange de toluène (9 mL), d'acétonitrile (13.6 mL) et d'eau (9 mL), est ajouté du CAN (2.22 g, 4.05 mmol, 5eq). Le mélange réactionnel est agité vigoureusement 30 minutes à température ambiante. La solution est ensuite diluée dans de l'AcOEt, lavée successivement avec de l'eau, avec une solution de NaCl saturée et avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 , puis concentrée pour donner un solide marron. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1) donne le produit désiré (358 mg, 72%) sous la forme d'une mousse orangée.

A une solution d'hémiacétal précédemment obtenu (358 mg, 0.59 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (3.6 mL) sont ajoutés successivement du trichloroacétonitrile (589 μL , 5.88 mmol, 10eq) et du DBU (1M dans le toluène, 88 μL , 0.09 mmol, 0.15eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes sous argon à température ambiante. La solution est concentrée pour donner une huile noire. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 29 : 1 avec 0.1% Et_3N) donne le produit désiré (367 mg, 83%) sous la forme d'une poudre blanche.

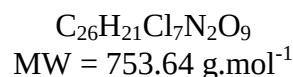
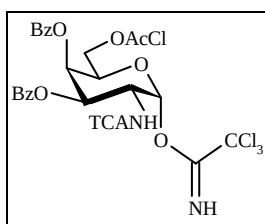
$[\alpha]_D^{20} +41$ (c 0.99, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.87 (s, 1H, C=NH), 7.99-7.13 (m, 10H, Ar), 7.14 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9Hz, NH), 6.64 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5Hz, H-1), 5.89 (dd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4), 5.76 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3), 4.90 (ddd, 1H, H-2), 4.69-4.63 (m, 1H, H-5), 4.54 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a), 4.42 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b), 4.24 (ABq, 2H, CH_2 AcCl).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 166.68, 166.63, 165.82, 162.29, 160.03 (5C, C=O et C=NH), 134.08, 133.49, 129.97, 129.76, 129.14, 128.70, 128.52, 128.17 (10C, Ar), 94.36 (1C, C-1), 91.75, 90.57 (2C, CCl_3), 69.45 (1C, C-5), 68.87 (1C, C-4), 68.45 (1C, C-3), 61.35 (1C, C-6), 50.27 (1C, C-2), 40.46 (1C, CH_2 AcCl).

ES-SM : m/z 629 $[\text{M}-\text{Cl}_3\text{CC}(\text{NH})+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{Cl}_7\text{N}_2\text{O}_9$: C, 41.44 ; H, 2.81 ; N, 3.72 ; trouvée C, 41.36 ; H, 2.72 ; N, 3.80.



3-O-Benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-1-O-trichloroacétimidoyl- α -D-galactopyranose (187b)

A une solution de monosaccharide **204b** (518 mg, 0.81 mmol) dissous dans un mélange de toluène (7.9 mL), d'acétonitrile (12 mL) et d'eau (7.9 mL), est ajouté du CAN (1.98 g, 3.62 mmol, 5eq). Le mélange réactionnel est agité vigoureusement 30 minutes à température ambiante. La solution est ensuite diluée dans de l'AcOEt, lavée successivement avec de l'eau, avec une solution de NaCl saturée et avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 , puis concentrée pour donner un solide marron. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 20 : 1) donne le produit désiré (320 mg, 73%) sous la forme d'une mousse orangée.

A une solution d'hémiacétal précédemment obtenu (320 mg, 0.53 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (3.2 mL) sont ajoutés successivement du trichloroacétonitrile (527 μL , 5.25 mmol, 10eq) et du DBU (1M dans le toluène, 79 μL , 0.08 mmol, 0.15eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes sous argon à température ambiante. La solution est concentrée pour donner une huile noire. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 29 : 1 avec 0.1% Et_3N) donne le produit désiré (339 mg, 86%) sous la forme d'une poudre blanche.

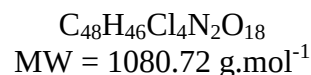
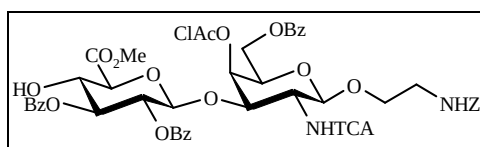
$[\alpha]_D^{20} +123$ (c 0.98, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.91 (s, 1H, C=NH), 8.13-7.32 (m, 10H, Ar), 7.14 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9Hz, NH), 6.71 (d, 1H, $J_{1,2}$ 3.5Hz, H-1), 5.98 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4), 5.80 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3), 4.98 (ddd, 1H, H-2), 4.68-4.62 (m, 1H, H-5), 4.39-4.35 (m, 2H, H-6a et H-6b), 4.00 (s, 2H, CH_2 AcCl).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 166.72, 166.64, 165.49, 162.30, 160.09 (5C, C=O et C=NH), 133.99, 133.87, 129.94, 129.90, 128.84, 128.56, 128.53, 128.19 (10C, Ar), 94.34 (1C, C-1), 91.69, 90.55 (2C, CCl_3), 69.64 (1C, C-5), 68.57 (1C, C-3), 67.46 (1C, C-4), 63.19 (1C, C-6), 50.46 (1C, C-2), 40.41 (1C, CH_2 AcCl).

ES-SM : m/z 624 $[\text{M}-\text{Cl}_3\text{CC}(\text{NH})+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{Cl}_7\text{N}_2\text{O}_9$: C, 41.44 ; H, 2.81 ; N, 3.72 ; trouvée C, 41.81 ; H, 2.85 ; N, 3.67.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (188a)

A une solution de disaccharide **197a** (150 mg, 0.13 mmol) dans la pyridine (1.5 mL) est ajouté un mélange de pyridine-acide acétique-hydrazine monohydrate (12 : 8 : 1, 2.63 mL). Le mélange réactionnel est agité 2 minutes à température ambiante puis est dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (2 fois) puis avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , concentrée et enfin coévaporée au toluène (3 fois) pour donner un solide blanc. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 6 : 1) donne le produit désiré (107 mg, 78%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +46$ (c 1.00, CHCl_3).

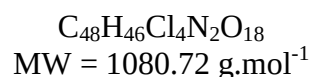
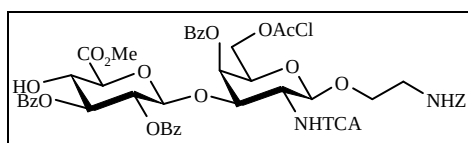
F 124°C ($\text{Et}_2\text{O}/\text{EP}$).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.05-7.23 (m, 20H, Ar), 6.82 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7Hz, NH GalN), 5.71 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.49 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.29 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 GlcA), 5.12-5.07 (m, 1H, NHC(O)O), 5.02 (s, 2H, CH_2 -Ph), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.88 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.75 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.45 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.36 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, H-6b GalN), 4.28, 4.21 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 5.48 (dd, 1H, $J_{4,\text{OH}}$ 3Hz, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 4.09-4.04 (m, 1H, H-5 GalN), 4.04 (d, 1H, H-5 GlcA), 3.90-3.80 (m, 1H, O- CH_2), 3.71 (s, 3H, COOCH_3), 3.64-3.57 (m, 1H, O- CH_2), 3.57-3.43 (m, 1H, H-2 GalN), 3.39 (d, 1H, OH-4), 3.39-3.23 (m, 2H, CH_2 -N).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 168.80, 166.63, 166.24, 166.03, 165.05, 162.33 (6C, C-6 GlcA et C=O), 156.23 (1C, NHC(O)O), 136.32, 133.48, 133.41, 133.37, 129.85, 129.82, 129.72, 129.42, 128.84, 128.81, 128.51, 128.48, 128.36, 128.12 (15C, Ph), 100.84 (1C, C-1 GlcA), 98.58 (1C, C-1 GalN), 91.77 (1C, CCl_3), 74.32 (1C, C-5 GlcA), 74.17 (1C, C-3 GlcA), 72.83 (1C, C-3 GalN), 71.46 (1C, C-2 GlcA), 71.10 (1C, C-4 GalN), 71.02 (1C, C-5 GalN), 70.08 (1C, C-4 GlcA), 69.38 (1C, O- CH_2), 66.72 (1C, CH_2 -Ph), 62.10 (1C, C-6 GalN), 55.95 (1C, C-2 GalN), 52.92 (1C, COOCH_3), 40.72 (2C, CH_2 -N et CH_2 AcCl).

ES-SM : m/z 1096 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{48}\text{H}_{46}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_{18}$: C, 53.35 ; H, 4.29 ; N, 2.59 ; trouvée C, 53.30 ; H, 4.25 ; N, 2.61.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-benzoyl-6-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (188b)

A une solution de disaccharide **197b** (199 mg, 0.17 mmol) dans la pyridine (1.5 mL) est ajouté un mélange de pyridine-acide acétique-hydrazine monohydrate (12 : 8 : 1, 3.52 mL). Le mélange réactionnel est agité 2 minutes à température ambiante puis est dilué avec du CH_2Cl_2 . La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois). La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (2 fois) puis à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , concentrée et enfin coévaporée au toluène (3 fois) pour donner un solide blanc. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 8 : 1) donne le produit désiré (140 mg, 77%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +46$ (c 0.99, CHCl_3).

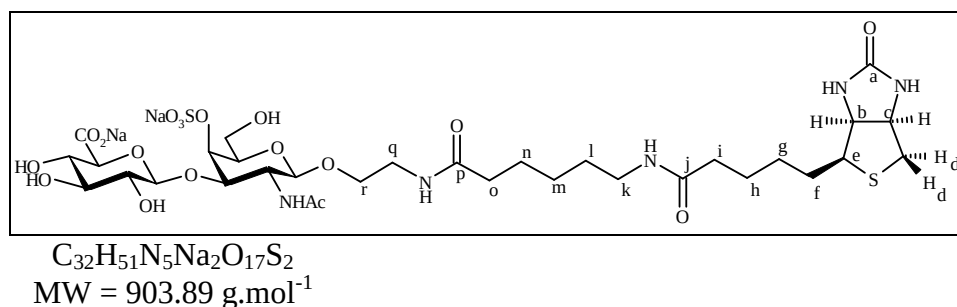
F 158-159°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.04-7.24 (m, 20H, Ar), 6.93, (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7Hz, NH GalN), 5.75 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.44 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3 GlcA), 5.35 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 5.26 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 GlcA), 5.19-5.14 (m, 1H, NHC(O)O), 5.05 (s, 2H, CH_2 -Ph), 4.96 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.95 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.78 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.39 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, H-6b GalN), 4.11 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.02 (s, 2H, CH_2 AcCl), 4.03-4.00 (m, 1H, H-5 GalN), 3.87-3.80 (m, 1H, O- CH_2), 3.85 (s, 3H, COOCH_3), 3.77-3.69 (m, 1H, H-2 GalN), 3.70-3.62 (m, 1H, O- CH_2), 3.45-3.27 (m, 3H, CH_2 -N et OH-4).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 168.74, 166.93, 166.26, 165.65, 164.83, 162.33 (6C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.30 (1C, NHC(O)O), 136.32, 133.33, 129.97, 129.81, 129.76, 129.37, 128.85, 128.77, 128.47, 128.42, 128.34, 128.28, 128.11 (24C, Ph), 100.70 (1C, C-1 GlcA), 98.92 (1C, C-1 GalN), 91.84 (1C, CCl_3), 74.64 (1C, C-3 GlcA), 74.43 (1C, C-5 GlcA), 73.57 (1C, C-3 GalN), 71.57 (1C, C-5 GalN), 71.34 (1C, C-2 GlcA), 69.91 (1C, C-4 GlcA), 69.66 (1C, C-4 GalN), 69.53 (1C, O- CH_2), 66.73 (1C, CH_2 -Ph), 64.13 (1C, C-6 GalN), 56.03 (1C, C-2 GalN), 53.00 (1C, COOCH_3), 40.90 (1C, CH_2 -N), 40.54 (1C, CH_2 AcCl).

ES-SM : m/z 1096 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{48}\text{H}_{46}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_{18} + \text{H}_2\text{O}$: C, 52.47 ; H, 4.40 ; N, 2.55 ; trouvée C, 52.38 ; H, 4.28 ; N, 2.61.



2-(6-Biotinylamido)hexanoyl aminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (189a)

Le disaccharide **221a** (23 mg, 33 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut (18 mg, 100%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

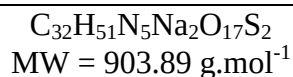
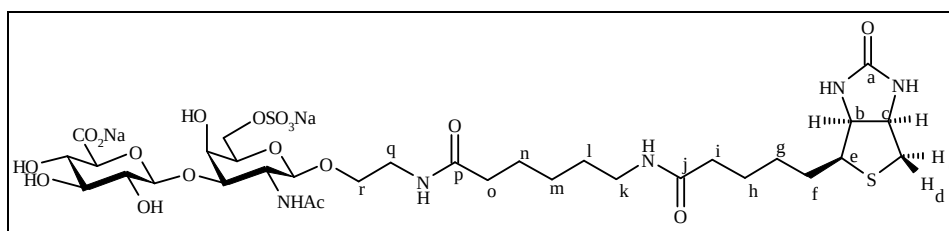
Un mélange de l'amine précédemment obtenue (18 mg, 32 μmol) et de réactif biotinylé (58 mg, 0.13 mmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (15 mg, 50% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20} +4$ (c 1.3, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.81 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 3\text{Hz}$, H-4 GalN), 4.63 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'} 5\text{Hz}$, $J_{b,c} 8\text{Hz}$, H-c), 4.55 (d, 1H, $J_{1,2} 8\text{Hz}$, H-1 GalN), 4.50 (d, 1H, $J_{1,2} 8\text{Hz}$, H-1 GlcA), 4.44 (dd, 1H, $J_{b,e} 5\text{Hz}$, H-b), 4.09-4.06 (m, 2H, H-2 et H-3 GalN), 3.98-3.91 (m, 1H, CH₂-r), 3.85-3.78 (m, 3H, H-5, H-6a et H-6b GalN), 3.78-3.71 (m, 1H, CH₂-r), 3.69 (d, 1H, $J_{4,5} 9.5\text{Hz}$, H-5 GlcA), 3.55 (dd, 1H, $J_{3,4} 9\text{Hz}$, H-4 GlcA), 3.48 (d, 1H, $J_{2,3} 9\text{Hz}$, H-3 GlcA), 3.42-3.33 (m, 4H, H-2 GlcA, H-e et CH₂-q), 3.20 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l} 7\text{Hz}$, CH₂-k), 3.02 (dd, 1H, $J_{d,d'} 13\text{Hz}$, H-d'), 2.81 (dd, 1H, H-d), 2.29-2.23 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.04 (s, 3H, NHC(O)CH₃), 1.80-1.30 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.59, 177.25, 176.57, 175.26 (4C, C-6 GlcA et C=O), 165.99 (1C, C-a), 103.83 (1C, C-1 GlcA), 101.79 (1C, C-1 GalN), 77.03 (1C, C-4 GalN), 76.99 (1C, C-5 GlcA), 75.74 (1C, C-3 GlcA), 75.31 (1C, C-3 GalN), 75.10 (1C, C-5 GalN), 73.12 (1C, C-2 GlcA), 72.42 (1C, C-4 GlcA), 68.87 (1C, C-r), 62.71 (1C, C-b), 61.66 (1C, C-6 GalN), 60.87 (1C, C-c), 56.01 (1C, C-e), 52.40 (1C, C-2 GalN), 40.32 (1C, C-d), 39.97, 39.70 (2C, C-k et C-q), 36.26, 36.14 (2C, C-i et C-o), 28.62, 28.45, 28.30, 26.18, 25.83, 25.61 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 22.92 (1C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour C₃₂H₅₂N₅O₁₇S ([M+H-Na]⁺) : 858.2749 ; trouvée : 858.2752.



2-(6-Biotinylamido)hexanoyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (189b)

Le disaccharide **221b** (22 mg, 32 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut (18 mg, 100%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

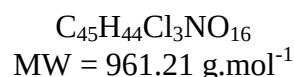
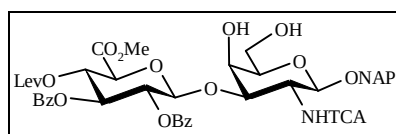
Un mélange de l'amine précédemment obtenue (18 mg, 32 μmol) et de réactif biotinylé (58 mg, 0.13 mmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH (20x2 mL). Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (20 mg, 68% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20} +10$ (c 1.04, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.63 (ddd, 1H, $J_{C,d} < 1\text{Hz}$, $J_{C,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.55 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.53 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.44 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.22 (d, 1H, $J_{5,6a}$ 4.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a GalN), 4.23-4.26 (m, 1H, H-4 GalN), 4.26 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7.5Hz, H-6b GalN), 4.04 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2 GalN), 3.96-3.89 (m, 2H, H-5 GalN et CH₂-r), 3.87 (dd, 1H, H-3 GalN), 3.81-3.74 (m, 1H, CH₂-r), 3.71 (d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.53-3.47 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 3.40-3.31 (m, 4H, H-2 GlcA, H-e et CH₂-q), 3.20 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.30-2.22 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.03 (s, 3H, NHC(O)CH₃), 1.80-1.30 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.61, 177.27, 176.56, 175.35 (4C, C-6 GlcA et C=O), 165.99 (1C, C-a), 104.70 (1C, C-1 GlcA), 101.94 (1C, C-1 GalN), 80.56 (1C, C-3 GalN), 76.78 (1C, C-5 GlcA), 75.99, 72.44 (2C, C-3 et C-4 GlcA), 73.35, 73.32 (2C, C-5 GalN et C-2 GlcA), 69.03 (1C, C-r), 68.40 (1C, C-6 GalN), 68.19 (1C, C-4 GalN), 62.74 (1C, C-b), 60.91 (1C, C-c), 56.03 (1C, C-e), 51.73 (1C, C-2 GalN), 40.36 (1C, C-d), 39.98, 39.74 (2C, C-k et C-q), 36.29, 36.20 (2C, C-i et C-o), 28.65, 28.50, 28.34, 26.21, 25.89, 25.64 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 22.94 (1C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour C₃₂H₅₂N₅O₁₇S₂ ([M+H-2Na]⁺) : 858.2749 ; trouvée : 858.2737.



2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (193)

A une solution de disaccharide **100** (1.67 g, 1.59 mmol) dans le CH_2Cl_2 (17 mL), est ajouté à 0°C, un mélange de TFA (4 mL) et d'eau (1.3 mL). Le mélange réactionnel est agité 2 heures à 0°C, puis est dilué dans le CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée successivement avec de l'eau, une solution de AcONa (1M) et avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 et concentrée. Une recristallisation dans l'EtOH à chaud donne le produit désiré (1.29 g, 84%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +18$ (c 1.00, CHCl_3).

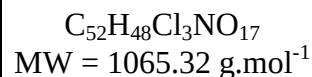
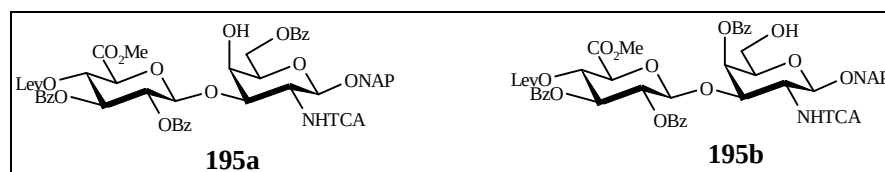
F 198°C (EtOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 7.89-7.34 (m, 17H, Ar), 6.81 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH GalN), 5.64 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3 GlcA), 5.49-5.42 (m, 2H, H-2 et H-4 GlcA), 5.09 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 5.00 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1 GlcA), 4.88 (ABq, 2H, CH_2 -Ar), 4.61 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11.5Hz, H-3 GalN), 4.27-4.25 (m, 1H, H-4 GalN), 4.28 (d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 4.03 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 3.87 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 4.5Hz, H-6b GalN), 3.77 (s, 3H, COOCH_3), 3.75-3.63 (m, 2H, H-2, H-5 GalN et OH-6), 3.23-3.20 (m, 1H, OH-4), 2.62-2.37 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.05 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 206.22 (1C, C=O Lev), 171.33, 167.73, 165.56, 165.52, 164.42 (5C, C-6 GlcA et C=O), 134.21, 133.52, 133.00, 132.86, 129.90, 128.37, 128.31, 128.28, 127.96, 127.71, 127.45, 126.80, 125.95, 125.84, 125.79 (22C, Ar), 100.74 (1C, C-1 GlcA), 98.02 (1C, C-1 GalN), 92.03 (1C, CCl_3), 77.00 (1C, C-3 GalN), 74.24 (1C, C-5 GalN), 71.92, 71.83, 71.00, 69.33 (4C, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 71.51 (1C, CH_2 -Ar), 68.16 (1C, C-4 GalN), 61.31 (1C, C-6 GalN), 54.61 (1C, C-2 GalN), 53.11 (1C, COOCH_3), 37.35, 27.46 (2C, CH_2 Lev), 29.33 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 982 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{52}\text{H}_{48}\text{Cl}_3\text{NO}_{17} + \text{H}_2\text{O}$: C, 55.20 ; H, 4.74 ; N, 1.47 ; trouvée C, 55.18 ; H, 4.54 ; N, 1.30.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (195a)

2-Naphtylméthyl O-(méthyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (195b)

A une solution de disaccharide **193** (863 mg, 0.90 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (8 mL) et le toluène anhydre (4 mL), sont successivement ajoutés de l'($\pm$)ACS (151 mg) et du triméthylorthobenzoate (1 mL, 5.64 mmol, 6eq). Le mélange réactionnel est agité 1 heure à température ambiante sous argon, puis est neutralisé avec de la Et_3N (457 μL , 3.25 mmol). La solution est diluée dans du CH_2Cl_2 , lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO_3 saturée et enfin avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 puis concentrée. L'orthoester ainsi obtenu est alors hydrolysé avec de l' AcOH à 80% (16 mL) pendant 15 minutes à température ambiante. De l'eau est ensuite ajoutée au mélange, puis la solution est évaporée et coévaporée à l'eau (3 fois), à l' EtOH (1 fois) et enfin au toluène (1 fois). Une purification par chromatographie sur colonne de silice (AcOEt/EP 1 : 1 puis 3 : 2) donne les composés **195a** (333 mg, 35%) et **195b** (AcOEt/EP 3 : 1 ; 357mg, 37%).

Composé 195a:

$[\alpha]_D^{20} +15$ (c 1.02, CHCl_3).

F 183°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.11-7.22 (m, 22H, Ar), 6.80 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7Hz, NH GalN), 5.69 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3 GlcA), 5.52-5.45 (m, 2H, H-2 et H-4 GlcA), 5.03 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 5.02 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 GlcA), 4.86 (Abq, 2H, CH_2 -Ar), 4.67-4.60 (m, 2H, H-6a et H-6b GalN), 4.62 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.32 (ddd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{4,\text{OH}}$ 2Hz, H-4 GalN), 4.28 (d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.95-3.90 (m, 1H, H-5 GalN), 3.72 (s, 3H, COOCH_3), 3.70-3.59 (m, 1H, H-2 GalN), 3.23 (d, 1H, OH), 2.65-2.32 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.01 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 205.61 (1C, C=O Lev), 171.21, 167.27, 166.31, 165.45, 165.01, 162.15 (6C, C-6 GlcA et C=O), 133.97, 133.56, 133.50, 133.17, 133.10, 133.05, 129.96, 129.93, 129.81, 129.73, 128.62, 128.55, 128.46, 128.42, 128.21, 127.84, 127.62, 126.07, 126.03, 126.01 (28C, Ph), 100.87 (1C, C-1 GlcA), 97.06 (1C, C-1 GalN), 91.92 (1C, CCl_3), 72.21 (1C, C-3 GalN), 72.07, 71.78 (2C, C-5 GalN et C-5 GlcA), 71.49 (1C, C-3 GlcA), 70.95 (1C, C-2 GlcA), 69.16 (1C, CH_2 -Ar), 67.97 (1C, C-4 GlcA), 63.55 (1C, C-4 GalN), 58.45 (1C, C-6 GalN), 55.47 (1C, C-2 GalN), 53.17 (1C, COOCH_3), 37.35, 27.63, (2C, CH_2 Lev), 29.55 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 1086 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{52}\text{H}_{48}\text{Cl}_3\text{NO}_{17} + \text{H}_2\text{O}$: C, 57.65 ; H, 4.54 ; N, 1.31 ; trouvée C, 57.75 ; H, 4.44 ; N, 1.33.

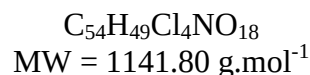
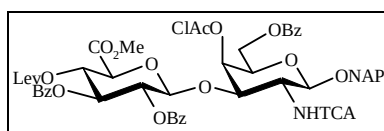
Composé 195b : $[\alpha]_D^{20} +29$ (*c* 1.04, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.09-7.22 (m, 22H, Ar), 6.89 (d, 1H, *J*_{2,NH} 7Hz, NH GalN), 5.69 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4 GalN), 5.58 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.36 (d, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-4 GlcA), 5.32 (dd, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-2 GlcA), 4.14 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GalN), 4.96 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.85 (Abq, 2H, CH₂-Ar), 4.85 (dd, 1H, *J*_{3,4} 3.5Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3 GalN), 4.17 (d, 1H, H-5 GlcA), 3.88-3.69 (m, 3H, H-2, H-5 et H-6a GalN), 3.74 (s, 3H, COOCH₃), 3.55 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 8.5Hz, *J*_{6a,6b} 11.5Hz, H-6b GalN), 3.45-3.27 (m, 1H, OH), 2.61-2.12 (m, 4H, CH₂ Lev), 1.99 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.54 (1C, C=O Lev), 170.96, 167.90, 166.45, 165.47, 164.67, 162.18 (6C, C-6 GlcA et C=O), 133.86, 133.58, 133.36, 133.31, 133.11, 133.08, 130.26, 129.90, 129.74, 129.23, 128.58, 128.44, 128.36, 128.30, 128.29, 127.86, 127.64, 127.18, 126.20, 126.13, 125.90 (28C, Ar), 100.87 (1C, C-1 GlcA), 97.78 (1C, C-1 GalN), 91.86 (1C, CCl₃), 74.36 (1C, C-3 GalN), 73.54 (1C, C-5 GalN), 72.58 (1C, C-5 GlcA), 72.13 (1C, C-3 GlcA), 71.98 (1C, CH₂-Ar), 71.35, 69.20 (2C, C-2 et C-4 GlcA), 70.56 (1C, C-4 GalN), 59.97 (1C, C-6 GalN), 56.45 (1C, C-2 GalN), 52.95 (1C, COOCH₃), 37.64, 27.67 (2C, CH₂ Lev), 29.46 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : *m/z* 1086 [M+Na]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₅₂H₄₈Cl₃NO₁₇ + H₂O : C, 57.65 ; H, 4.65 ; N, 1.31 ; trouvée C, 57.76 ; H, 4.58 ; N, 1.24.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (196a)

A une solution de disaccharide **195a** (467 mg, 0.44 mmol) dans un mélange de pyridine (1.25 mL) et de CH_2Cl_2 anhydre (5 mL), est ajouté à 0°C de l'anhydride de chlorure d'acétyl (150 mg 0.88 mmol, 2eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à 0°C sous argon, puis hydrolysé avec des grains de glace avant d'être dilué dans du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO_3 saturée, puis avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1) donne le produit désiré (448 mg, 90%).

$[\alpha]_D^{20} +12$ (c 1.01, CHCl_3).

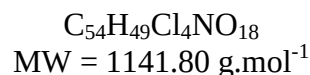
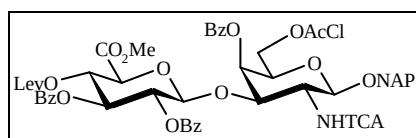
F 186°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.12-7.34 (m, 22H, Ar), 6.73 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7Hz, NH GalN), 5.71 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3.5Hz, H-4 GalN), 5.59 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.46 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 GlcA), 5.33 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 GlcA), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.85 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.84 (Abq, 2H, CH_2 -Ar), 4.82 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.57 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.38 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6.5Hz, H-6b GalN), 4.26 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 4.13 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.13-4.05 (m, 1H, H-5 GalN), 3.69 (s, 3H, COOCH_3), 3.61-3.54 (m, 1H, H-2 GalN), 2.60-2.35 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.02 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 205.56 (1C, C=O Lev), 170.99, 166.56, 166.03, 165.52, 164.80, 162.13 (7C, C-6 GlcA et C=O), 133.49, 133.47, 133.43, 133.33, 133.13, 133.09, 129.97, 129.94, 129.86, 129.84, 129.60, 128.79, 128.63, 128.55, 128.45, 128.40, 128.39, 127.84, 127.66, 127.41, 126.22, 126.19, 125.92 (28C, Ph), 100.50 (1C, C-1 GlcA), 96.99 (1C, C-1 GalN), 91.87 (1C, CCl_3), 72.63 (1C, C-3 GalN), 72.50 (1C, C-5 GlcA), 71.89 (1C, C-3 GlcA), 71.55 (1C, C-2 GlcA), 71.32 (1C, CH_2 -Ar), 71.12 (1C, C-5 GalN), 70.99 (1C, C-4 GalN), 69.31 (1C, C-4 GlcA), 62.15 (1C, C-6 GalN), 56.23 (1C, C-2 GalN), 52.94 (1C, COOCH_3), 40.71 (1C, CH_2 AcCl), 37.65, 27.67, (2C, CH_2 Lev), 29.52 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 1162 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{54}\text{H}_{49}\text{Cl}_4\text{NO}_{18} + \text{H}_2\text{O}$: C, 55.92 ; H, 4.43 ; N, 1.21 ; trouvée C, 55.98 ; H, 4.31 ; N, 1.27.



2-Naphtylméthyl O-(méthyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-benzoyl-6-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (196b)

A une solution de disaccharide **195b** (200 mg, 0.19 mmol) dans un mélange de pyridine (0.5 mL) et de CH_2Cl_2 anhydre (2 mL), est ajouté à 0°C, de l'anhydride de chlorure d'acétyle (64 mg 0.38 mmol, 2eq). Le mélange réactionnel est agité 30 minutes à 0°C sous argon, puis hydrolysé avec des grains de glace avant d'être dilué dans du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO_3 saturée, puis avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1 puis 17 : 1) donne le produit désiré (187 mg, 87%).

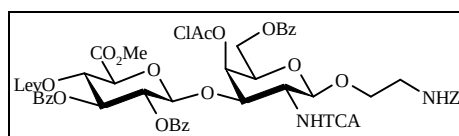
$[\alpha]_D^{20} +39$ (c 1.07, CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.06-7.22 (m, 22H, Ar), 6.97 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7Hz, NH GalN), 5.76 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.57 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.41 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 GlcA), 5.32 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 GlcA), 5.11 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.96 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.84 (Abq, 2H, CH_2 -Ar), 4.74 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.39 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.38 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b GalN), 4.17 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.06 (s, 2H, CH_2 AcCl), 4.05-4.00 (m, 1H, H-5 GalN), 3.86 (ddd, 1H, H-2 GalN), 3.74 (s, 3H, COOCH_3), 2.60-2.31 (m, 4H, CH_2 Lev), 1.97 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 205.54 (1C, C=O Lev), 170.86, 166.80, 166.58, 165.45, 165.35, 164.46, 162.02 (7C, C-6 GlcA et C=O), 133.71, 133.24, 133.16, 133.10, 133.00, 132.97, 129.89, 129.68, 129.62, 129.34, 128.88, 128.71, 128.45, 128.24, 128.21, 128.19, 128.08, 127.75, 127.55, 127.11, 126.13, 126.06, 125.84, 125.15 (28C, Ph), 100.19 (1C, C-1 GlcA), 97.58 (1C, C-1 GalN), 91.90 (1C, CCl_3), 73.18 (1C, C-3 GalN), 72.50 (1C, C-5 GlcA), 72.05 (1C, C-3 GlcA), 71.29 (3C, C-5 GalN, C-2 GlcA et CH_2 -Ar), 69.48 (1C, C-4 GalN), 69.16 (1C, C-4 GlcA), 63.91 (1C, C-6 GalN), 56.01 (1C, C-2 GalN), 52.87 (1C, COOCH_3), 40.53 (1C, CH_2 AcCl), 37.44, 27.52 (2C, CH_2 Lev), 29.34 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 1162 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{54}\text{H}_{49}\text{Cl}_4\text{NO}_{18}$: C, 56.81 ; H, 4.33 ; N, 1.23; trouvée C, 56.72 ; H, 4.43 ; N, 1.25.



$C_{53}H_{52}Cl_4N_2O_{20}$
MW = 1178.82 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (197a)

Un mélange d'imidate **186a** (160 mg, 0.14 mmol), de 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol (49 mg, 0.25 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (1.6 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 41 µL, 0.02 mmol, 0.15eq/imidate) est ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (9 µL, 0.06 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 puis 10 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (133 mg, 80%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +37$ (c 1.05, CHCl₃).

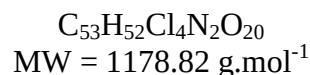
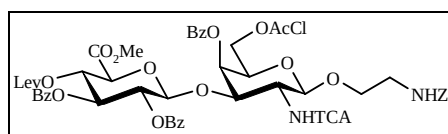
F 122°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.05-7.28 (m, 20H, Ar), 6.82, (d, 1H, $J_{2,NH}$ 7Hz, NH GalN), 5.70 (dd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.62 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.48 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 5.34 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2 GlcA), 5.13-5.08 (m, 1H, NHC(O)O), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.98 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.90 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.78 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.46 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.34 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, H-6b GalN), 4.24 (ABq, 2H, CH₂ AcCl), 4.16 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.08-4.02 (m, 1H, H-5 GalN), 3.84-3.81 (m, 1H, O-CH₂), 3.71 (s, 3H, COOCH₃), 3.68-3.60 (m, 1H, H-2 GalN), 3.59-3.41 (m, 1H, O-CH₂), 3.41-3.25 (m, 2H, CH₂-N), 2.65-2.62 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.04 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.58 (1C, C=O Lev), 170.98, 166.58, 166.47, 165.99, 165.50, 164.80, 162.29 (7C, C-6 GlcA et C=O), 156.23 (1C, NHC(O)O), 136.34, 133.48, 133.43, 133.29, 129.87, 129.80, 129.74, 129.42, 128.73, 128.58, 128.49, 128.46, 128.42, 128.37, 128.10 (24C, Ph), 100.48 (1C, C-1 GlcA), 98.63 (1C, C-1 GalN), 91.79 (1C, CCl₃), 72.91 (1C, C-3 GalN), 72.64 (1C, C-5 GlcA), 71.92 (1C, C-3 GlcA), 71.58 (1C, C-2 GlcA), 71.16 (1C, C-5 GalN), 70.76 (1C, C-4 GalN), 69.39 (1C, O-CH₂), 69.25 (1C, C-4 GlcA), 66.69 (1C, CH₂-Ph), 66.02 (1C, C-6 GalN), 55.87 (1C, C-2 GalN), 52.99 (1C, COOCH₃), 40.75 (1C, CH₂-N), 40.66 (1C, CH₂ AcCl), 37.62, 27.64 (2C, CH₂ Lev), 29.50 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1194 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₅₃H₅₂Cl₄N₂O₂₀ : C, 54.00 ; H, 4.45 ; N, 2.38 ; trouvée C, 83.94 ; H, 4.45 ; N, 2.38.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-6-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (197b)

Un mélange d'imidate **186b** (112 mg, 0.10 mmol), de 2-benzyloxycarbonylaminoéthanol (34 mg, 0.18 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (1.1 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 20 µL, 0.02 mmol, 0.20eq/imidate) est ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (8 µL, 0.06 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 8 : 1 puis 7 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (133 mg, 80%) sous la forme d'une poudre blanche.

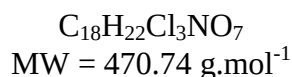
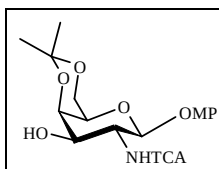
$[\alpha]_D^{20} +54.5$ (c 1.03, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 7.98-7.18 (m, 20H, Ar), 6.91, (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ 7Hz, NH GalN), 5.68 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.54 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.35 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 5.25 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 GlcA), 5.16-5.11 (m, 1H, NHC(O)O), 4.98 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.96 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 GalN), 4.94 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.74 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.32 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a GalN), 4.17 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.13 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, H-6b GalN), 3.98 (s, 2H, CH₂ AcCl), 4.00-3.93 (m, 1H, H-5 GalN), 3.83-3.78 (m, 1H, O-CH₂), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 3.76-3.68 (m, 1H, H-2 GalN), 3.67-3.59 (m, 1H, O-CH₂), 3.37-3.25 (m, 2H, CH₂-N), 2.60-2.23 (m, 4H, CH₂ Lev), 1.96 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.56 (1C, C=O Lev), 170.94, 166.87, 166.66, 165.46, 165.42, 164.61, 162.26 (7C, C-6 GlcA et C=O), 156.25 (1C, NHC(O)O), 136.32, 133.32, 133.29, 133.23, 129.96, 129.80, 129.71, 129.33, 128.75, 128.51, 128.43, 128.35, 128.27, 128.07 (24C, Ph), 100.27 (1C, C-1 GlcA), 99.06 (1C, C-1 GalN), 91.87 (1C, CCl₃), 73.49 (1C, C-3 GalN), 72.62 (1C, C-5 GlcA), 72.13 (1C, C-3 GlcA), 71.46, 71.40 (2C, C-5 GalN et C-2 GlcA), 69.48 (1C, O-CH₂), 69.35, 69.16 (2C, C-4 GalN et C-4 GlcA), 66.67 (1C, CH₂-Ph), 63.89 (1C, C-6 GalN), 55.84 (1C, C-2 GalN), 53.00 (1C, COOCH₃), 40.88 (1C, CH₂-N), 40.54 (1C, CH₂ AcCl), 37.55, 27.60 (2C, CH₂ Lev), 29.46 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1194 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₅₃H₅₂Cl₄N₂O₂₀ : C, 53.19 ; H, 4.55 ; N, 2.34 ; trouvée C, 53.45 ; H, 4.53 ; N, 2.48.



Méthoxyphényl-2-désoxy-4,6-O-isopropylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (200a)

A une solution de monosaccharide **198** (5 g, 8.98 mol) dans du MeOH anhydre (50 mL) placée sous argon est ajouté du sodium solide. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures puis est neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺], filtré sur coton, concentré et séché sous vide.

A une solution de triol précédemment obtenu **199** (3.80 g, 8.82 mmol) et d'ACS (60 mg) dans le DMF (40 mL), est ajouté 6 fois toutes les 20 minutes, du 2-méthoxypropène (422 μL, 4.41 mmol, 0.5eq). De la Et₃N (109 μL) est ensuite additionnée et la solution est concentrée. Le mélange est dilué avec du CH₂Cl₂, la phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée puis plusieurs fois avec une solution de NaCl saturée, séchée sur MgSO₄ et concentrée. Le solide obtenu est ensuite dissous dans un mélange de CH₂Cl₂ (32 mL) et de MeOH (16 mL) et de la résine amberlite est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité 2 minutes à température ambiante avant d'être filtré puis évaporé. Une recristallisation dans l'AcOEt à reflux donne le produit désiré (3.44 g, 83 %) sous la forme d'une poudre blanche.

[α]_D²⁰ -20 (c 1.02, CHCl₃).

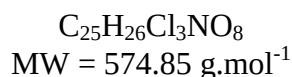
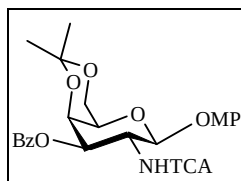
F 188°C (AcOEt).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 7.01, 6.78 (2d, 4H, *J*_{H,H} 7Hz, Ar), 6.89 (d, 1H, *J*_{NH,2} 7.5Hz, NH), 5.16 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1), 4.23 (dd, 1H, *J*_{4,5} <1Hz, *J*_{3,4} 4Hz, H-4), 4.18 (ddd, 1H, *J*_{3,OH} 10.5Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3), 4.11 (dd, 1H, *J*_{6a,5} 3Hz, *J*_{6a,6b} 13Hz, H-6a), 4.04-3.98 (m, 2H, H-2 et H-6b), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.51-3.50 (m, 1H, H-5), 3.62 (d, 1H, OH), 1.50 (s, 6H, C(CH₃)₂ isopropylidène).

RMN ¹³C (DMSO, 100 MHz): δ(ppm) 161.58 (1C, C=O), 154.51, 151.33, 117.88, 114.35 (6C, Ar), 99.94 (C-1), 97.93 (2C, C(CH₃)₂), 93.09 (1C, CCl₃), 68.41 (1C, C-3), 67.75 (1C, C-4), 65.91 (1C, C-5), 62.01 (1C, C-6), 55.24 (1C, OCH₃), 53.71 (1C, C-2), 29.29, 18.73 (2C, C(CH₃)₂ isopropylidène).

ES-SM : *m/z* 487 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₁₈H₂₂Cl₃NO₇ : C, 45.93 ; H, 4.71 ; N, 2.98 ; trouvée C, 46.05 ; H, 4.62 ; N, 3.02.



Méthoxyphényl-3-O-benzoyl-2-désoxy-4,6-O-isopropylidène-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (201)

Le monosaccharide **200a** (3.49 g, 7.71 mmol) et le BzCl (1.7 mL, 0.015 mmol) dissous dans le CH₂Cl₂ (46 mL) et la pyridine (9 mL) sont agités 30 minutes à 0°C sous argon. Du MeOH (2.3 mL) est ensuite ajouté, et la solution est agitée 15 minutes puis est dilué avec du CH₂Cl₂, lavé avec de l'eau puis avec une solution de NaHCO₃ saturée et enfin avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, concentrée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une recristallisation (AcOEt/EP) donne le produit désiré (4.21g, 99%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +53$ (c 1.09, CHCl₃).

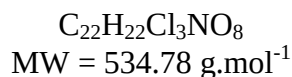
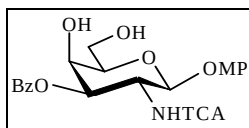
F 204°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.04 (d, 2H, *J*_{H,H} 8Hz, Ar Bz), 7.59 (dd, 1H, *J*_{H,H} 8Hz, Ar Bz), 7.45 (dd, 2H, Ar Bz), 7.03, 6.78 (2d, 4H, *J*_{H,H} 9Hz, Ar MP), 6.83 (d, 1H, *J*_{NH,2} 8Hz, NH), 5.52 (dd, 1H, *J*_{3,4} 3.5Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3), 5.22 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1), 4.60 (ddd, 1H, H-2), 4.50 (dd, 1H, *J*_{4,5} <1Hz, H-4), 4.14 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 2Hz, *J*_{6a,6b} 12.5Hz, H-6a), 4.05 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 1.5Hz, H-6b), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.62-3.60 (m, 1H, H-5), 1.51, 1.43 (2s, 6H, C(CH₃)₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 166.37, 162.06, (2C, C=O), 155.59, 151.29, 133.57, 129.95, 129.07, 128.46, 119.06, 114.45 (12C, Ar), 100.17 (1C, C(CH₃)₂), 99.09 (1C, C-1), 92.31 (1C, CCl₃), 70.70 (1C, C-3), 66.51 (1C, C-5), 66.19 (1C, C-4), 62.58 (1C, C-6), 55.57 (1C, OCH₃), 52.67 (1C, C-2), 29.07, 18.73 (2C, C(CH₃)₂ isopropylidène).

ES-SM : *m/z* 591 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₂₅H₂₆Cl₃NO₈ : C, 52.24 ; H, 4.56 ; N, 2.44 ; trouvée C, 52.54 ; H, 4.66 ; N, 2.41.



Méthoxyphényl-3-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (202)

Une solution de monosaccharide **201** (4.21 g, 7.32 mmol) dans l'AcOH 80% (90 mL) est agitée 40 minutes à 80°C. De l'eau est ensuite ajoutée, puis le mélange réactionnel est évaporé puis coévaporé à l'eau (5 fois) et par un mélange EtOH/toluène (1 fois). Une recristallisation (*i*-PrOH à reflux) donne le produit désiré (3.34g, 85%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +73$ (*c* 0.99, MeOH).

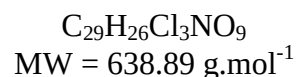
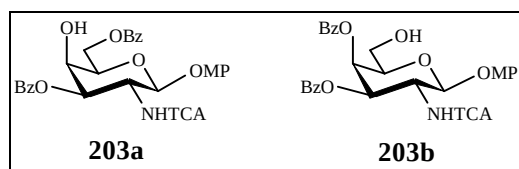
F 194°C (*i*-PrOH).

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ (ppm) 8.05 (d, 2H, $J_{\text{H,H}}$ 8Hz, Ar Bz), 7.59 (dd, 1H, $J_{\text{H,H}}$ 8Hz, Ar Bz), 7.45 (dd, 2H, Ar Bz), 7.04, 6.83 (2d, 4H, $J_{\text{H,H}}$ 9Hz, Ar MP), 5.33 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3), 5.20 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1), 4.70 (dd, 1H, H-2), 4.28 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, H-4), 3.87-3.80 (m, 3H, H-5, H-6a et H-6b), 3.74 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ (ppm) 167.43, 164.64 (2C, C=O), 157.00, 153.16, 134.52, 130.97, 129.52, 119.64, 115.55 (12C, Ar), 102.12 (1C, C-1), 93.98 (1C, CCl_3), 76.99, 75.30 (2C, C-3 et C-5), 67.22 (1C, C-4), 62.22 (1C, C-6), 56.08 (1C, OCH_3), 53.65 (1C, C-2).

ES-SM : m/z 551 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{NO}_8$: C, 49.41 ; H, 4.15 ; N, 2.62 ; trouvée C, 49.48 ; H, 4.07 ; N, 2.61.



Méthoxyphényl-3,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (203a)

Méthoxyphényl-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (203b)

Protocole avec neutralisation :

A une solution de monosaccharide **202** (500 mg, 0.94 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (10 mL) sont successivement ajoutés de l'($\pm$)ACS (57 mg) et du triméthylorthobenzoate (993 μL , 5.61 mmol, 6eq). Le mélange réactionnel est agité 20 minutes à température ambiante sous argon, puis est neutralisé avec de la Et_3N (103 μL , 0.74 mmol). La solution est diluée dans du CH_2Cl_2 , lavée successivement avec une solution de NaHCO_3 saturée puis avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 puis concentrée. L'orthoester ainsi obtenu est alors hydrolysé avec de l'AcOH à 80% (16 mL) pendant 10 minutes à température ambiante. De l'eau est ensuite ajoutée au mélange, puis la solution est évaporée et coévaporée à l'eau (3 fois), à l'EtOH (1 fois) et enfin au toluène (1 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1) donne les composés **203a** (440 mg, 74%) et **203b** (CH_2Cl_2 /acétone 12 : 1 ; 158 mg, 25%).

Protocole sans neutralisation :

A une solution de monosaccharide **202** (500 mg, 0.94 mmol) dans le CH_2Cl_2 anhydre (10 mL) sont successivement ajoutés de l'($\pm$)ACS (57 mg) et du triméthylorthobenzoate (993 μL , 5.61 mmol, 6eq). Le mélange réactionnel est agité 20 minutes à température ambiante sous argon. La solution est diluée dans du CH_2Cl_2 , lavée successivement avec une solution de NaHCO_3 saturée puis avec de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 puis concentrée. L'orthoester ainsi obtenu est alors hydrolysé avec de l'AcOH à 80% (16 mL) pendant 10 minutes à température ambiante. De l'eau est ensuite ajoutée au mélange, puis la solution est évaporée et coévaporée à l'eau (3 fois), à l'EtOH (1 fois) et enfin au toluène (1 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1) donne les composés **203a** (193 mg, 32%) et **203b** (CH_2Cl_2 /acétone 12 : 1 ; 366 mg, 61%).

Composé 203a :

$[\alpha]_D^{20} +34$ (c 0.97, MeOH/ CHCl_3 7 : 3).

F 244°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (Acétone, 400 MHz): δ (ppm) 8.42 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9.5Hz, NH), 8.10-6.73 (m, 14H, Ar), 5.49 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3), 5.41 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1), 5.03 (d, 1H, $J_{\text{OH},4}$ 5.5Hz, OH), 4.86 (ddd, 1H, H-2), 4.70 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 8Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a), 4.61 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 4.5Hz, H-6b), 4.51 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, H-4), 4.34-4.30 (m, 1H, H-5), 3.71 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (Acétone, 100 MHz): δ (ppm) 167.49, 167.38, 164.03 (3C, C=O), 157.41, 153.56, 135.16, 135.08, 132.10, 131.79, 131.60, 131.33, 130.47, 130.30, 120.42, 116.66 (18C, Ar), 102.35 (1C, C-1), 93.98 (1C, CCl_3), 75.88 (1C, C-3), 74.79 (1C, C-5), 67.92 (1C, C-4), 65.53 (1C, C-6), 56.78 (1C, OCH_3), 54.07 (1C, C-2).

ES-SM : m/z 655 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $C_{29}H_{26}Cl_3NO_9$: C, 54.52 ; H, 4.10 ; N, 2.19 ; trouvée C, 54.23 ; H, 4.02 ; N, 2.21.

Composé 203b :

$[\alpha]_D^{20} +114$ (c 1.01, $CHCl_3$).

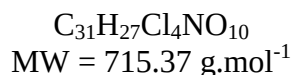
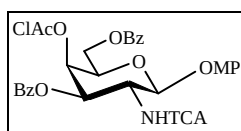
F 196-197°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ (ppm) 8.14-6.80 (m, 14H, Ar), 7.25 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 9.5Hz, NH), 5.83 (dd, 1H, $J_{4,5}<1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4), 5.77 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3), 5.31 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1), 4.81 (ddd, 1H, H-2), 4.13-4.09 (m, 1H, H-5), 3.88-3.84 (m, 1H, H-6a), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.74-3.70 (m, 1H, H-6b), 2.92-2.90 (m, 1H, OH).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ (ppm) 166.69, 166.20, 162.45 (3C, C=O), 155.70, 151.10, 133.89, 133.67, 130.06, 129.82, 128.69, 128.62, 128.44, 128.38, 118.59, 114.65 (18C, Ar), 100.79 (1C, C-1), 92.23 (1C, CCl_3), 74.18 (1C, C-5), 70.64 (1C, C-3), 68.18 (1C, C-4), 60.48 (1C, C-6), 55.60 (1C, OCH_3), 53.76 (1C, C-2).

ES-SM : m/z 655 $[M+NH_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $C_{29}H_{26}Cl_3NO_9$: C, 54.52 ; H, 4.10 ; N, 2.19 ; trouvée C, 54.40 ; H, 9.94 ; N, 2.17.



Méthoxyphényl-4-O-chloroacétyl-3-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (204a)

A une solution de monosaccharide **203a** (430 mg, 0.67 mmol) dans un mélange de pyridine (3 mL) et de CH_2Cl_2 anhydre (1 mL), est ajouté à 0°C de l'anhydride de chlorure d'acétyle (230 mg, 1.35 mmol, 2eq). Le mélange réactionnel est agité 1 heure à 0°C sous argon, puis hydrolysé avec des grains de glace avant d'être dilué dans du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO_3 saturée, puis avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1) donne le produit désiré (422 mg, 88%).

$[\alpha]_D^{20}$ -1.6 (c 1.02, CHCl_3).

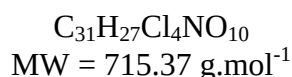
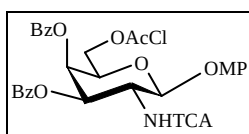
F 139-140°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.05-6.67 (m, 14H, Ar), 7.04 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 8.5Hz, NH), 5.79 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3), 5.79 (dd, 1H, $J_{4,5}$ <1Hz, H-4), 5.37 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1), 4.63-4.54 (m, 2H, H-2 et H-6a), 4.46 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6b), 4.39-4.32 (m, 1H, H-5), 4.22 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 3.72 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 166.74, 165.98, 165.90, 162.39 (4C, C=O), 155.86, 150.97, 133.88, 133.46, 129.85, 129.76, 129.21, 128.61, 128.52, 128.30, 118.89, 114.54 (18C, Ar), 100.52 (1C, C-1), 92.10 (1C, CCl_3), 71.15 (1C, C-5), 69.78 (1C, C-3), 68.92 (1C, C-4), 61.66 (1C, C-6), 55.57 (1C, OCH_3), 53.41 (1C, C-2), 40.45 (1C, CH_2 AcCl).

ES-SM : m/z 731 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{Cl}_4\text{NO}_{10}$: C, 52.05 ; H, 3.80 ; N, 1.96 ; trouvée C, 51.75 ; H, 3.92 ; N, 1.82.



Méthoxyphényl-3-O-benzoyl-6-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (204b)

A une solution de monosaccharide **203b** (500 mg, 0.78 mmol) dans un mélange de pyridine (2 mL) et de CH_2Cl_2 anhydre (3 mL), est ajouté à 0°C de l'anhydride de chlorure d'acétyle (268 mg, 1.56 mmol, 2eq). Le mélange réactionnel est agité 1 heure à 0°C sous argon, puis hydrolysé avec des grains de glace avant d'être dilué dans du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO_3 saturée et avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1) donne le produit désiré (450 mg, 80%).

$[\alpha]_D^{20} +72$ (c 0.97, CHCl_3).

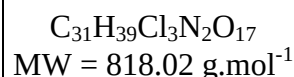
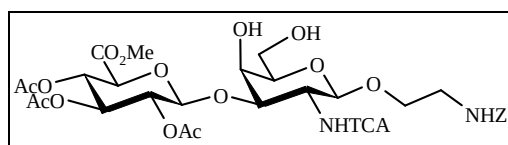
F 140°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.13-6.81 (m, 14H, Ar), 7.07 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9.5Hz, NH), 5.88 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3.5Hz, H-4), 5.85 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3), 5.34 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1), 4.66 (ddd, 1H, H-2), 4.46 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 8.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a), 4.46 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, H-6b), 4.40-4.36 (m, 1H, H-5), 4.04 (s, 2H, CH_2 AcCl), 3.77 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 166.81, 166.03, 165.62, 162.39 (4C, C=O), 155.90, 151.01, 133.87, 133.71, 130.00, 129.81, 128.73, 128.68, 128.47, 128.37, 118.88, 114.63 (18C, Ar), 100.50 (1C, C-1), 92.11 (1C, CCl_3), 71.37 (1C, C-5), 70.00 (1C, C-3), 67.56 (1C, C-4), 63.56 (1C, C-6), 55.64 (1C, OCH_3), 53.54 (1C, C-2), 40.49 (1C, CH_2 AcCl).

ES-SM : m/z 731 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{Cl}_4\text{NO}_{10}$: C, 52.05 ; H, 3.80 ; N, 1.96 ; trouvée C, 52.18 ; H, 3.60 ; N, 1.94.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (205)

A une solution de disaccharide **177** (516 mg, 0.57 mmol) dissous dans le CH_2Cl_2 (5 mL), un mélange de TFA/ H_2O (3 : 1, 1.8 mL) est ajouté à 0°C. Le mélange réactionnel est agité 1 heure à 0°C, puis est dilué avec du CH_2Cl_2 , lavé avec une solution de NaHCO_3 saturée puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19 : 1) donne le produit désiré (404 mg, 87 %) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20}$ -5 (c 1.06, CHCl_3).

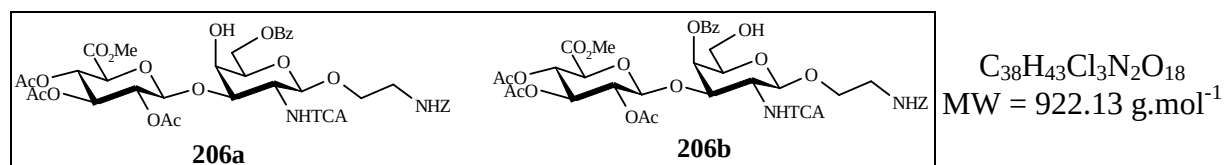
F 115-121°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 400 MHz): δ (ppm) 7.65 (m, 5H, Ar), 5.51 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 GlcA), 5.51 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.37 (s, 2H, CH_2 -Ph), 5.31 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2 GlcA), 4.94 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.85 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.47 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.38-4.29 (m, 3H, H-2, H-3 et H-4 GalN), 4.20-4.03 (m, 3H, H-6a, H-6b GalN et O- CH_2), 4.07 (s, 3H, COOCH_3), 3.96-3.91 (m, 1H, O- CH_2), 3.86-3.82 (m, 1H, H-5 GalN), 3.66-3.60 (m, 2H, CH_2 -N), 2.37, 2.35, 2.33 (3s, 9H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$, 100 MHz): δ (ppm) 170.03, 169.84, 169.46, 167.32, 162.76 (5C, C-6 GlcA et C=O), 156.76 (1C, NHC(O)O), 136.01, 127.90, 127.50, 127.36 (6C, Ph), 100.42 (1C, C-1 GlcA), 100.22 (1C, C-1 GalN), 92.34 (1C, CCl_3), 77.69, 74.36, 71.52, 71.45, 70.40, 69.05, 67.47 (7C, C-3, C-4, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4 et C-5 GlcA), 68.28 (1C, O- CH_2), 66.12 (1C, CH_2 -Ph), 60.75 (1C, C-6 GalN), 53.25, (1C, C-2 GalN), 52.29 (1C, COOCH_3), 40.33 (1C, CH_2 -N), 19.94, 19.71, 19.62 (3C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 834 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{17} + \text{H}_2\text{O}$: C, 44.54 ; H, 4.94 ; N, 3.42 ; trouvée C, 44.66 ; H, 4.83 ; N, 3.34.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (206a)

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (206b)

A une solution de disaccharide **205** (270 mg, 0.33 mmol) dans le CH₂Cl₂ anhydre (2.7 mL) et le toluène anhydre (1.35 mL), sont successivement ajoutés de l'(±)ACS (70 mg) et du triméthylorthobenzoate (350 μL, 1.98 mmol, 6eq). Le mélange réactionnel est agité 40 minutes à température ambiante sous argon, puis est neutralisé avec de la Et₃N (212 μL, 1.51 mmol). La solution est diluée dans du CH₂Cl₂, lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO₃ saturée et enfin avec de l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄ puis concentrée. L'orthoester ainsi obtenu est alors hydrolysé avec de l'AcOH à 80% (5.4 mL) pendant 15 minutes à température ambiante. De l'eau est ensuite ajoutée au mélange, puis la solution est évaporée et coévaporée à l'eau (3 fois), à l'EtOH (1 fois) et enfin au toluène (1 fois). Une purification par chromatographie sur colonne de silice (AcOEt/EP 1 : 1 puis 3 : 2) donne le composé **206a** sous la forme d'une poudre blanche (144mg, 45%) puis l'élution avec AcOEt/EP 3 : 1 donne **206b** sous la forme d'une poudre blanche (144mg, 45%).

Composé 206a :

[α]_D²⁰ -5 (c 1.06, CHCl₃).

F 115-121°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.03-7.08 (m, 11H, NH GalN et 10H Ar), 5.36-5.31 (m, 1H, NHC(O)O), 5.25-5.16 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 5.07 (dd, 1H, J_{1,2} 8Hz, J_{2,3} 9Hz, H-2 GlcA), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.93 (d, 1H, J_{1,2} 8Hz, H-1 GalN), 4.80 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.61 (dd, 1H, J_{5,6a} 5Hz, J_{6a,6b} 11.5Hz, H-6a GalN), 4.57 (dd, 1H, J_{5,6b} 7Hz, H-6b GalN), 4.46 (dd, 1H, J_{3,4} 2Hz, J_{2,3} 11Hz, H-3 GalN), 4.23 (ddd, 1H, J_{4,5} <1Hz, J_{4,OH} 2Hz, H-4 GalN), 4.08 (d, 1H, J_{4,5} 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.96-3.80 (m, 2H, H-5 GalN et O-CH₂), 3.81-3.76 (m, 1H, H-2 GalN), 3.71 (s, 3H, COOCH₃), 3.72-3.65 (m, 1H, O-CH₂), 3.31 (d, 1H, OH), 3.45-3.33 (m, 2H, CH₂-N), 2.01, 2.00, 1.99 (3s, 9H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 169.96, 169.41, 169.39, 167.11, 162.29 (6C, C-6 GlcA et C=O), 156.37 (1C, NHC(O)O), 136.45, 133.18, 129.73, 129.62, 128.43, 128.04, 128.01 (12C, Ph), 100.60 (1C, C-1 GlcA), 98.83 (1C, C-1 GalN), 92.23 (1C, CCl₃), 77.66 (1C, C-3 GalN), 72.16, 71.94, 68.88 (2C, C-5 GalN, C-3 et C-4 GlcA), 71.81 (1C, C-5 GlcA), 71.03 (1C, C-2 GlcA), 69.19 (1C, O-CH₂), 67.73 (1C, C-4 GalN), 66.60 (1C, CH₂-Ph), 63.53 (1C, C-6 GalN), 54.88 (1C, C-2 GalN), 53.01 (1C, COOCH₃), 40.87 (1C, CH₂-N), 20.79, 20.49, 20.43 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 938 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₈H₄₃Cl₃N₂O₁₈ + H₂O : C, 48.55 ; H, 4.82 ; N, 2.98 ; trouvée C, 48.96 ; H, 4.69 ; N, 2.96.

Composé 206b :

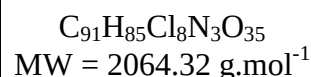
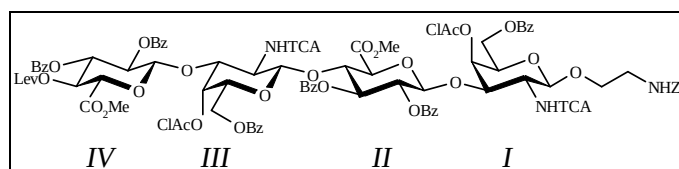
$[\alpha]_D^{20} +28.5$ (c 0.98, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 8.04-7.16 (m, 11H, NH GalN et 10H Ar), 5.62 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 3\text{Hz}$, H-4 GalN), 5.38-5.31 (m, 1H, NHC(O)O), 5.13-5.00 (m, 4H, H-3, H-4 GlcA et CH₂-Ph), 5.07 (dd, 1H, $J_{1,2} 8\text{Hz}$, $J_{2,3} 9\text{Hz}$, H-2 GlcA), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2} 8\text{Hz}$, H-1 GalN), 4.80 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.59 (dd, 1H, $J_{2,3} 11\text{Hz}$, H-3 GalN), 4.05 (d, 1H, $J_{4,5} 9.5\text{Hz}$, H-5 GlcA), 4.07-3.99 (m, 1H, H-2 GalN), 3.90-3.81 (m, 1H, O-CH₂), 4.72-3.62 (m, 2H, H-6a GalN et O-CH₂), 3.82-3.75 (m, 1H, H-5 GalN), 3.74 (s, 3H, COOCH₃), 3.56-3.41 (m, 2H, H-6b GalN et OH), 3.39-3.31 (m, 2H, CH₂-N), 1.99, 1.97, 1.93 (3s, 9H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm) 169.88, 169.18, 169.16, 167.37, 166.71, 162.23 (6C, C-6 GlcA et C=O), 156.40 (1C, NHC(O)O), 136.20, 133.56, 130.02, 129.00, 128.41, 128.04, 127.93 (12C, Ph), 99.97 (1C, C-1 GlcA), 99.66 (1C, C-1 GalN), 92.31 (1C, CCl₃), 74.83 (1C, C-3 GalN), 73.75 (1C, C-5 GalN), 72.30 (1C, C-5 GlcA), 71.96, 68.98 (2C, C-3 et C-4 GlcA), 70.71 (1C, C-2 GlcA), 69.77 (1C, C-4 GalN), 69.10 (1C, O-CH₂), 66.65 (1C, CH₂-Ph), 60.06 (1C, C-6 GalN), 55.20 (1C, C-2 GalN), 52.83 (1C, COOCH₃), 40.79 (1C, CH₂-N), 20.63, 20.36, 20.32 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : m/z 938 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₈H₄₃Cl₃N₂O₁₈ + H₂O : C, 48.55 ; H, 4.82 ; N, 2.98 ; trouvée C, 48.63 ; H, 4.83 ; N, 2.91.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(6-O-benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (207a)

Un mélange d'accepteur **188a** (174 mg, 0.16 mmol), d'imidate **186a** (240 mg, 0.21 mmol, 1.3eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CDCl_3 (1.5 mL) sous argon, est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 42 µL, 0.04 mmol, 0.2eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et_3N (18 µL, 0.13 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (135 g, 41%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +24$ (c 1.00, CHCl_3).

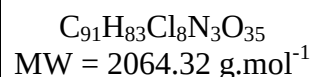
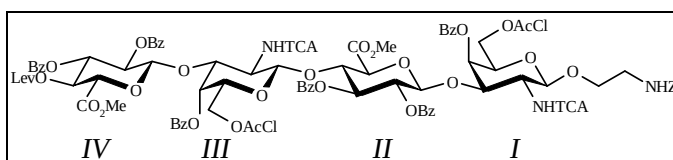
F 131-132°C (*i*-PrOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.11-7.22 (m, 35H, Ar), 6.80 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 6.78 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{III}), 5.62 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.57 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{IV}), 5.49 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.49 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 10Hz, H-3^{II}), 5.42 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{IV}), 5.28-5.22 (m, 2H, H-2^{II} et H-2^{IV}), 5.10-5.05 (m, 1H, NHC(O)O), 5.08 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 5.03 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.01 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 4.84, 4.78 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.73 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.63 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.43 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 4Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.36 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II}), 4.33 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7.5Hz, H-6b^I), 4.21 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 4.11 (d, 1H, H-5^{IV}), 4.03-3.99 (m, 1H, H-5^I), 3.98 (d, 1H, H-5^{II}), 3.91 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 3.92-3.87 (m, 1H, H-5^{III}), 3.75-3.70 (m, 2H, H-6a^{III} et O-CH_2), 3.67, 3.62 (2s, 6H, COOCH_3), 3.53 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6b^{III}), 3.50-3.35 (m, 4H, H-2^I , H-2^{III} et $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.71-2.39 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.00 (s, 3H, CH_3 Lev).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 205.60 (1C, C=O Lev), 170.96, 167.54, 166.50, 166.17, 165.98, 165.72, 165.51, 165.38, 164.97, 164.76, 162.32, 161.69 (13C, C-6^{II} , C-6^{IV} et C=O), 156.37 (1C, NHC(O)O), 136.32, 133.52, 133.37, 129.98, 129.94, 129.84, 129.79, 129.77, 129.69, 129.38, 128.81, 128.72, 128.58, 128.52, 128.47, 128.35, 128.31, 128.12 (42C, Ar), 101.04, 100.31 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 98.45 (1C, C-1^{III}), 97.52 (1C, C-1^I), 92.10, 91.69 (2C, CCl_3), 74.48, 73.94, 73.22, 72.51, 72.44, 71.89, 71.83, 71.46, 71.39, 71.09, 70.84, 70.78, 70.62, 69.31 (14C, C-3^I , C-4^I , C-5^I , C-2^{II} , C-3^{II} , C-4^{II} , C-5^{II} , C-3^{III} , C-4^{III} , C-5^{III} , C-2^{IV} , C-3^{IV} , C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.42 (1C, O-CH_2), 66.72 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.05, 60.92 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 56.00, 55.52 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 53.23, 52.85 (2C, COOCH_3), 40.73 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 40.64, 40.39 (2C, CH_2 AcCl), 37.62, 27.64 (2C, CH_2 Lev), 29.50 (1C, CH_3 Lev).

ES-SM : m/z 2077 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{91}\text{H}_{85}\text{Cl}_8\text{N}_3\text{O}_{35} + \text{H}_2\text{O}$: C, 52.49 ; H, 4.21 ; N, 2.02 ; trouvée C, 52.37 ; H, 4.17 ; N, 2.02.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévilinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4-O-benzoyl-6-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-6-O-chloroacetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (207b)

Un mélange d'accepteur **188b** (150 mg, 0.14 mmol), d'imide **187b** (207 mg, 0.18 mmol, 1.3eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (1.5 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 28 µl, 0.03 mmol, 0.2eq/imide) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (12 µL, 0.09 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (181 mg, 63%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +33$ (c 1.01, CHCl₃).

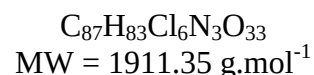
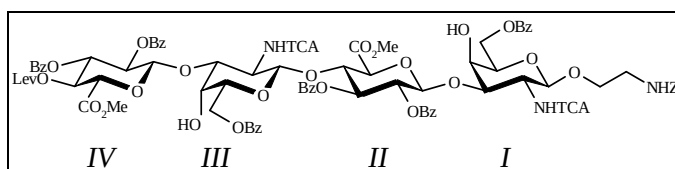
F 131-132°C (i-PrOH/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.07-7.22 (m, 33H, Ar), 7.04 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 6.91 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{III}), 6.90-6.85 (m, 2H, Ar), 5.71 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.53 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{IV}), 5.49 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.46 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 9.5Hz, $J_{3,4}$ 10Hz, H-3^{II}), 5.34 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{IV}), 5.26-5.18 (m, 3H, H-2^{II}, H-2^{IV} et NHC(O)O), 5.09 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 5.05 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.02 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 4.94, 4.88 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.75 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.67 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.39 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 4Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.29 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II}), 4.14 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7.5Hz, H-6b^I), 4.12 (d, 1H, H-5^{IV}), 4.07 (s, 2H, CH₂ AcCl), 4.06 (d, 1H, H-5^{II}), 4.00 (s, 2H, CH₂ AcCl), 4.02-3.97 (m, 1H, H-5^I), 3.84, 3.74 (2s, 6H, COOCH₃), 3.86-3.77 (m, 2H, H-5^{III} et O-CH₂), 3.72-3.59 (m, 3H, H-2^I, H-2^{III} et O-CH₂), 3.49 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^{III}), 3.45-3.30 (m, 2H, CH₂-N), 3.13 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^{III}), 2.62-2.31 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.00 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.62 (1C, C=O Lev), 170.91, 167.56, 166.87, 166.66, 166.55, 165.58, 165.40, 165.32, 165.09, 164.79, 164.45, 162.28, 161.68 (13C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.24 (1C, NHC(O)O), 136.26, 133.28, 133.18, 133.08, 129.94, 129.89, 129.78, 129.72, 129.67, 129.30, 129.26, 128.83, 128.76, 128.67, 128.47, 128.41, 128.27, 128.22, 128.18, 128.18, 128.06, 127.90 (42C, Ar), 101.93, 100.09 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 98.75 (1C, C-1^I), 97.78 (1C, C-1^{III}), 92.09, 91.73 (2C, CCl₃), 74.72, 74.08, 73.97, 72.80, 72.44, 72.14, 72.05, 71.52, 71.21, 70.96, 69.51, 69.08 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.44 (1C, O-CH₂), 66.66 (1C, CH₂-Ph), 64.17, 62.61 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 55.88, 55.68 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 53.27, 52.92 (2C, COOCH₃), 40.82 (1C, CH₂-N), 40.65, 40.46 (2C, CH₂ AcCl), 37.51, 27.56 (2C, CH₂ Lev), 29.43 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1927 [M-2 ClCH₂C(O)+Na]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₉₁H₈₃Cl₈N₃O₃₅ + H₂O : C, 52.49; H, 4.21; N 2.02; trouvée : C, 52.32; H, 4.01; N, 2.00.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévilinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (208a)

Un mélange de tétrasaccharide **207a** (109 mg, 53 μmol) et de thiourée (16 mg, 0.21 mmol, 4eq) dissous dans la pyridine (0.8 mL) et l'EtOH (0.8 mL) est agité 4h30 à 80°C. Après refroidissement, la solution est concentrée, puis diluée dans le CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution de NaCl saturée et enfin à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (85 mg, 84%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +38$ (c 1.03, CHCl₃).

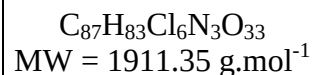
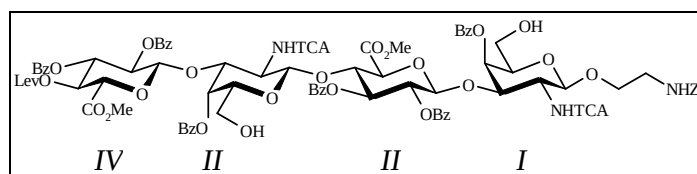
F 135°C (i-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.07-7.13 (m, 35H, Ar), 6.82 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 6.78 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{III}), 5.62 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{IV}), 5.58 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 8Hz, $J_{2,3}$ 9Hz, H-3^{II}), 5.44 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4^{IV}), 5.42 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-2^{IV}), 5.35 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-2^{II}), 5.22-5.17 (m, 1H, NHC(O)O), 5.11 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.01 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.98, 4.95 (2d, 2H, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.92 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 4.62 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.55 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.48 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3.5Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.43 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.41 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II}), 4.21 (d, 1H, H-5^{IV}), 4.17 (d, 1H, H-5^{II}), 4.22-4.18 (m, 1H, H-4^I), 4.13-4.09 (m, 1H, H-4^{III}), 4.09 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^{III}), 3.68, 3.60 (2s, 6H, COOCH₃), 3.89-3.53 (m, 7H, H-2^I, H-5^I, H-2^{III}, H-5^{III}, H-6b^{III} et O-CH₂), 3.42-3.27 (m, 3H, OH^I et CH₂-N), 2.76-2.73 (m, 1H, OH^{III}), 2.68-2.38 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.04 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.57 (1C, C=O Lev), 171.14, 168.12, 167.13, 166.23, 165.42, 165.15, 164.89, 162.26, 161.76 (11C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.29 (1C, NHC(O)O), 136.42, 133.44, 133.23, 133.18, 133.07, 129.94, 129.82, 129.75, 129.70, 129.65, 129.60, 129.56, 129.16, 128.96, 128.68, 128.63, 128.49, 128.40, 128.36, 128.23, 127.94 (42C, Ar), 100.82, 100.70 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 98.97, 98.08 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 92.05, 91.83 (2C, CCl₃), 78.25, 77.05, 74.45, 73.94, 72.07, 71.89, 71.64, 71.45, 71.08, 69.11, 67.53, 67.46 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.09 (1C, O-CH₂), 66.51 (1C, CH₂-Ph), 63.40, 62.58 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 54.79, 54.62 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 53.13, 53.03 (2C, COOCH₃), 40.77 (1C, CH₂-N), 37.48, 27.57 (2C, CH₂ Lev), 29.49 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1925 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₈₇H₈₃Cl₆N₃O₃₃ + H₂O : C, 54.16; H, 4.44; N 2.18; trouvée : C, 53.94; H, 4.34; N, 2.14.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (208b)

Un mélange de tétrasaccharide **207b** (115 mg, 56 μmol) et de thiourée (17 mg, 0.22 mmol, 4eq) dissous dans la pyridine (0.8 mL) et l'EtOH (0.8 mL) est agité 3 heures à 80°C. Après refroidissement, la solution est concentrée, puis diluée dans le CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution de NaCl saturée et enfin à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (82 mg, 77%) sous la forme d'une poudre blanche.

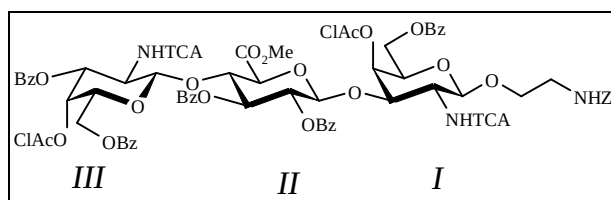
$[\alpha]_D^{20} +26$ (c 1.01, CHCl₃).

F 140-148°C (i-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.07-7.13 (m, 33H, Ar), 6.83 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 6.82-6.77 (m, 2H, Ar), 6.72 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{III}), 5.68 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3.5Hz, H-4^I), 5.52 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{IV}), 5.42 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{II}), 5.38 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.29 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{IV}), 5.27-5.20 (m, 2H, H-2^{II} et H-2^{IV}), 5.13-5.08 (m, 1H, NHC(O)O), 5.05 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 5.05-5.01 (m, 3H, H-1^I et CH₂-Ph), 4.91, 4.86 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.76 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.58 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.20 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II}), 4.09 (d, 1H, H-5^{IV}), 4.00 (d, 1H, H-5^{II}), 3.82, 3.71 (2s, 6H, COOCH₃), 3.83-3.42 (m, 8H, H-2^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-2^{III}, H-5^{III} et O-CH₂), 3.38-3.31 (m, 3H, OH et CH₂-N), 2.89-2.79 (m, 2H, H-6a^{III} et OH), 2.56-2.31 (m, 4H, CH₂ Lev), 2.27-2.20 (m, 1H, H-6b^{III}), 2.00 (s, 3H, CH₃ Lev).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 205.57 (1C, C=O Lev), 170.91, 167.35, 167.16, 166.40, 165.42, 165.25, 164.84, 165.56, 162.24, 161.60 (11C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.23 (1C, NHC(O)O), 136.27, 133.62, 133.53, 133.33, 133.26, 132.77, 130.19, 130.13, 129.90, 129.79, 129.67, 129.23, 129.11, 129.08, 128.95, 128.80, 128.70, 128.52, 128.49, 128.40, 128.35, 128.25, 128.23, 128.15, 128.04, 128.00, 127.84, 125.22 (42C, Ar), 101.44, 100.60 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 98.82, 97.71 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 92.08, 91.69 (2C, CCl₃), 75.24, 74.56, 74.13, 73.73, 73.56, 73.28, 72.49, 72.42, 72.08, 71.27, 70.93, 69.97, 69.16 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.40 (1C, O-CH₂), 66.65 (1C, CH₂-Ph), 59.88, 58.90 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 56.05, 55.81 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 53.17, 52.85 (2C, COOCH₃), 40.81 (1C, CH₂-N), 37.59, 27.62 (2C, CH₂ Lev), 29.41 (1C, CH₃ Lev).

ES-SM : m/z 1925 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.



$C_{72}H_{65}Cl_8N_3O_{26}$
MW = 1671.95 g.mol⁻¹

2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,6-di-O-benzoyl-4-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (209a)

Un mélange d'accepteur **188a** (226 mg, 0.21 mmol), d'imidate **187a** (283 mg, 0.38 mmol, 1.8eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CDCl₃ (3 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 75 µL, 0.07 mmol, 0.2eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et₃N (31 µL, 0.23 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée pour donner un solide rose pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétone 29 : 1 avec 0.1% de Et₃N) donne le produit désiré (232 mg, 66%) sous la forme d'une poudre blanche.

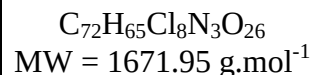
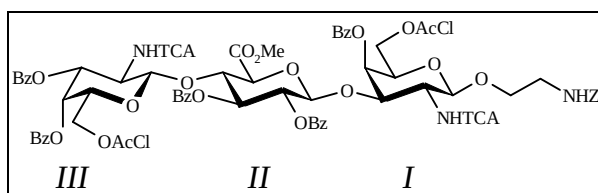
$[\alpha]_D^{20}$ -10 (c 0.98, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.08-7.27 (m, 30H, Ar), 6.96 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 9Hz, NH^{III}), 6.81 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^I), 5.70 (dd, 1H, $J_{4,5}<1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.65 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 5.48 (dd, 1H, $J_{4,5}<1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.36 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 5.31 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2^{II}), 5.12-5.08 (m, 1H, NHC(O)O), 5.06 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{III}), 5.02 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^I), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.89 (d, 1H, H-1^{II}), 4.37 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.45 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.39-4.34 (m, 1H, H-6b^I), 4.35 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4^{II}), 4.27 (ABq, 2H, CH₂ AcCl), 4.25-4.21 (m, 1H, H-2^{III}), 4.14 (d, 1H, H-5^{II}), 4.09-4.04 (m, 1H, H-5^I), 4.09-3.92 (m, 1H, H-5^{III}), 3.96 (ABq, 2H, CH₂ AcCl), 3.88-3.81 (m, 1H, O-CH₂), 3.74 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a^{III}), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 3.67-3.61 (m, 1H, O-CH₂), 3.54-3.48 (m, 1H, H-2^I), 3.45 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 8Hz, H-6b^{III}), 3.38-3.26 (m, 2H, CH₂-N).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 168.65, 166.66, 166.35, 165.98, 165.74, 165.43, 165.08, 165.00, 162.38, 161.83 (10C, C-6^{II} et C=O), 156.21 (1C, NHC(O)O), 136.30, 133.60, 133.50, 133.46, 133.40, 133.36, 129.86, 129.82, 129.66, 129.63, 129.44, 129.36, 129.11, 128.70, 128.54, 128.51, 128.46, 128.44, 128.39, 128.34, 128.11 (36C, Ar), 100.97 (1C, C-1^{II}), 100.37 (1C, C-1^{III}), 98.48 (1C, C-1^I), 92.23, 91.67 (2C, CCl₃), 76.28 (1C, C-4^{II}), 73.44 (1C, C-5^{II}), 73.23 (1C, C-3^I), 71.85 (1C, C-3^{II}), 71.52 (2C, C-2^{II} et C-3^{III}), 71.06 (1C, C-4^I), 70.93 (1C, C-5^I), 70.80 (1C, C-5^{III}), 69.41 (1C, O-CH₂), 68.29 (1C, C-4^{III}), 66.72 (1C, CH₂-Ph), 62.07 (1C, C-6^I), 60.11 (1C, C-6^{III}), 55.91 (1C, C-2^I), 53.15 (1C, COOCH₃), 52.64 (1C, C-2^{III}), 40.73 (2C, CH₂-N et CH₂ AcCl), 40.22 (1C, CH₂ AcCl).

ES-SM : m/z 1685 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₇₂H₆₅Cl₈N₃O₂₆ : C, 51.72 ; H, 3.92 ; N 2.51 ; trouvée : C, 51.49 ; H, 3.93 ; N, 2.47.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,4-di-O-benzoyl-6-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-6-O-chloroacétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (209b)

Un mélange d'accepteur **188b** (240 mg, 0.22 mmol), d'imide **187b** (251 mg, 0.33 mmol, 1.5eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CH_2Cl_2 (2.5 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 67 µL, 0.07 mmol, 0.2eq/imide) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et_3N (28 µL, 0.20 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentrée pour donner un solide rose pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 19 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (192 mg, 52%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +27$ (c 1.00, CHCl_3).

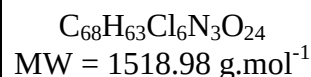
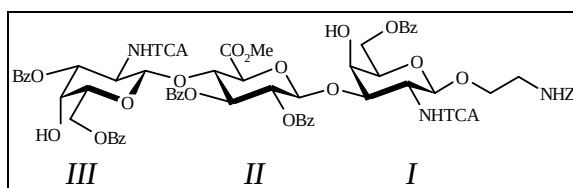
F 128°C (*i*-PrOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.11-7.16 (m, 30H, Ar), 6.99 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9Hz, NH^{III}), 6.95 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{I}), 5.78 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.63 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{III}), 5.56 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.39 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 5.27 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-2^{II}), 5.19-5.13 (m, 1H, NHC(O)O), 5.07 (d, 2H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^I et H-1^{III}), 5.06 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.98 (d, 1H, H-1^{II}), 4.82 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.43 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 4Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.37 (ddd, 1H, H-2^{III}), 4.32 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9Hz, H-4^{II}), 4.21-4.15 (m, 1H, H-6b^I), 4.18 (d, 1H, H-5^{II}), 4.06-3.99 (m, 1H, H-5^I), 4.00 (s, 2H, CH_2 AcCl), 4.09-3.96 (s, 2H, CH_2 AcCl), 3.90 (s, 3H, COOCH_3), 3.89-3.84 (m, 1H, H-5^{III} et O- CH_2), 3.72-3.65 (m, 2H, H-2^I et O- CH_2), 3.43-3.35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.36 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a^{III}), 3.28 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, H-6b^{III}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 168.66, 166.94, 166.31, 165.81, 165.77, 165.19, 165.13, 164.88, 162.39, 161.85 (10C, C-6^{II} et C=O), 156.28 (1C, NHC(O)O), 136.31, 133.62, 133.46, 133.43, 133.32, 129.98, 129.89, 129.84, 129.81, 129.77, 129.37, 129.22, 128.72, 128.68, 128.57, 128.55, 128.47, 128.40, 128.32, 128.18, 128.12 (36C, Ar), 101.08 (1C, C-1^{II}), 100.34, 98.69 (1C, C-1^I et C-1^{III}), 92.25, 91.71 (2C, CCl_3), 76.24 (1C, C-4^{II}), 74.17 (1C, C-3^I), 73.50 (1C, C-5^{II}), 72.27 (1C, C-3^{II}), 71.70 (1C, C-5^I), 71.40 (1C, C-2^{II}), 71.05, 70.93 (2C, C-3^{III} et C-5^{III}), 69.80 (1C, C-4^I), 69.59 (1C, O- CH_2), 66.88 (1C, C-4^{III}), 66.75 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 64.39 (1C, C-6^I), 62.00 (1C, C-6^{III}), 56.08 (1C, C-2^I), 53.34 (1C, COOCH_3), 52.89 (1C, C-2^{III}), 40.91, 40.50 (3C, $\text{CH}_2\text{-N}$ et CH_2 AcCl).

ES-SM : m/z 1685 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{72}\text{H}_{65}\text{Cl}_8\text{N}_3\text{O}_{26}$: C, 51.72 ; H, 3.92 ; N 2.51 ; trouvée : C, 51.43 ; H, 4.09 ; N, 2.50.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (210a)

Un mélange de trisaccharide **209a** (178 mg, 0.11 mmol) et de thiourée (32 mg, 0.43 mmol, 4eq) dissous dans la pyridine (1.2 mL) et l'EtOH (1.2 mL) est agité 2 heures à 80°C. Après refroidissement, la solution est concentrée, puis diluée dans le CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution de NaCl saturée et enfin à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 8 : 1) donne le produit désiré (117 mg, 73%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +19$ (c 1.02, CHCl₃).

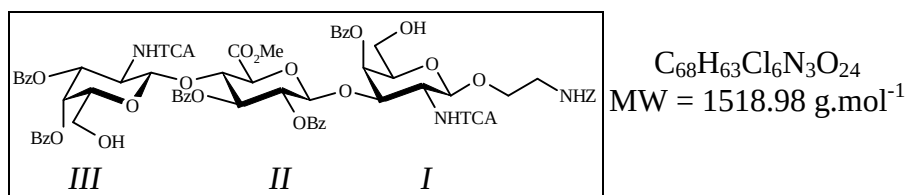
F 177°C (*i*-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.03-7.12 (m, 31H, Ar et NH^{III}), 7.02 (d, 1H, *J*_{NH,2} 7Hz, NH^I), 5.53 (dd, 1H, *J*_{2,3} 8.5Hz, *J*_{3,4} 9Hz, H-3^{II}), 5.43 (dd, 1H, *J*_{1,2} 7Hz, H-2^{II}), 5.26 (dd, 1H, *J*_{3,4} 3Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 5.28-5.22 (m, 1H, NHC(O)O), 5.07 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{III}), 5.03 (d, 1H, H-1^{II}), 4.99 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.94 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^I), 4.65 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 5Hz, *J*_{6a,6b} 11.5Hz, H-6a^I), 4.55 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 5Hz, H-6b^I), 4.52-4.42 (m, 2H, H-3^I et H-2^{III}), 4.35 (dd, 1H, *J*_{4,5} 9Hz, H-4^{II}), 5.31 (ddd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, *J*_{OH,4} 6Hz, H-4^I), 4.23 (d, 1H, H-5^{II}), 4.13 (ddd, 1H, *J*_{OH,4} = *J*_{4,5} < 1Hz, H-4^{III}), 3.96-3.89 (m, 2H, H-5^I et H-5^{III}), 3.89-3.52 (m, 5H, H-2^I, H-6a^{III}, H-6b^{III} et O-CH₂), 3.67 (s, 3H, COOCH₃), 3.42-3.22 (m, 2H, CH₂-N), 3.20 (d, 1H, OH^{III}), 3.09 (d, 1H, *J*_{OH,4} 6Hz, OH^I).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 168.71, 166.31, 166.14, 165.99, 165.54, 165.09, 162.30, 162.02 (8C, C-6^{II} et C=O), 156.31 (1C, NHC(O)O), 136.40, 133.48, 133.29, 130.07, 129.96, 129.69, 129.64, 129.60, 129.56, 129.41, 129.22, 129.05, 128.98, 128.62, 128.57, 128.48, 128.46, 128.42, 128.39, 128.26, 128.18, 127.96 (36C, Ar), 100.87 (1C, C-1^{II}), 100.73 (1C, C-1^{III}), 98.93 (1C, C-1^I), 92.34, 91.84 (2C, CCl₃), 78.30 (1C, C-3^I), 76.57 (1C, C-4^{II}), 73.45 (1C, C-5^{II}), 73.34 (1C, C-3^{III}), 72.74 (1C, C-5^{III}), 72.41 (1C, C-3^{II}), 72.15 (1C, C-5^I), 71.12 (1C, C-2^{II}), 69.11 (1C, O-CH₂), 67.59 (1C, C-4^I), 66.55 (1C, CH₂-Ph), 66.33 (1C, C-4^{III}), 63.61 (1C, C-6^I), 61.91 (1C, C-6^{III}), 54.63 (1C, C-2^I), 53.29 (1C, COOCH₃), 52.46 (1C, C-2^{III}), 40.79 (1C, CH₂-N).

ES-SM : *m/z* 1533 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₆₈H₆₃Cl₆N₃O₂₄ + 2 H₂O: C, 52.52 ; H, 4.34 ; N 2.70 ; trouvée : C, 52.69 ; H, 3.94 ; N, 2.73.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (210b)

Un mélange de trisaccharide **209b** (99 mg, 59 μmol) et de thiourée (18 mg, 0.24 mmol, 4eq) dissous dans la pyridine (0.7 mL) et l'EtOH (0.7 mL) est agité 2 heures à 80°C. Après refroidissement, la solution est concentrée, puis diluée dans le CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution de NaCl saturée et enfin à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1 puis 18 : 1 puis 17 : 1) donne le produit désiré (76 mg, 85%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +31$ (c 0.99, CHCl₃).

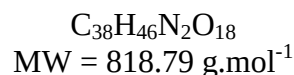
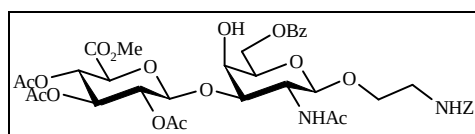
F 142-149°C (i-PrOH/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.10-6.95 (m, 30H, Ar), 6.96 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^{III}), 6.92 (d, 1H, $J_{NH,2}$ 7Hz, NH^I), 5.77 (dd, 1H, $J_{4,5}<1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 5.59 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 8.5Hz, H-3^{III}), 5.46 (dd, 1H, $J_{4,5}<1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.35 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 5.31 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2^{II}), 5.17-5.12 (m, 1H, NHC(O)O), 5.05 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.00 (d, 1H, H-1^{II}), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{III}), 4.80 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.47 (ddd, 1H, H-2^{III}), 4.22 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4^{II}), 4.16 (d, 1H, H-5^{II}), 3.88 (s, 3H, COOCH₃), 3.89-3.62 (m, 6H, H-2^I, H-5^I, H-6a^I, OH^{III} et O-CH₂), 3.53-3.48 (m, 1H, H-6b^I), 3.42-3.31 (m, 2H, CH₂-N), 3.35 (d, 1H, $J_{OH,6}$ 4.5Hz, OH^I), 2.75 (ddd, 1H, $J_{OH,6a}$ 5Hz, $J_{5,6a}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a^{III}), 2.51 (m, 1H, $J_{OH,6b}$ 5Hz, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^{III}), 2.15-2.13 (m, 1H, H-5^{III}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 168.49, 166.40, 165.89, 165.10, 164.98, 162.34, 161.95 (8C, C-6^{II} et C=O), 156.28 (1C, NHC(O)O), 136.29, 133.84, 133.73, 133.48, 133.44, 133.01, 130.20, 130.05, 129.87, 129.42, 129.30, 129.18, 128.72, 128.66, 128.60, 128.50, 128.44, 128.35, 128.11, 128.08, 128.04 (36C, Ar), 101.51, 100.41 (2C, C-1^I et C-1^{II}), 98.92 (1C, C-1^{III}), 92.30, 91.74 (2C, CCl₃), 76.15 (1C, C-4^{II}), 75.36 (1C, C-3^I), 74.04 (1C, C-5^{III}), 73.60 (1C, C-5^I), 73.37 (1C, C-5^{II}), 72.60 (1C, C-3^{II}), 72.38 (1C, C-3^{III}), 71.14 (1C, C-2^{II}), 70.61 (1C, C-4^I), 69.48 (1C, O-CH₂), 67.93 (1C, C-4^{III}), 66.70 (1C, CH₂-Ph), 59.48 (1C, C-6^I), 58.38 (1C, C-6^{III}), 54.40 (1C, C-2^I), 53.23 (1C, COOCH₃), 53.06 (1C, C-2^{III}), 40.84 (1C, CH₂-N).

ES-SM : m/z 1533 [M+NH₄]⁺ pour ³⁵Cl.

Analyse élémentaire calculée pour C₆₈H₆₃Cl₆N₃O₂₄ + 2 H₂O : C, 52.52 ; H, 4.34 ; N 2.70 ; trouvée : C, 52.78 ; H, 4.01 ; N, 2.71.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-6-O-benzoyl-β-D-galactopyranoside (211a)

A une solution de disaccharide **206a** (186 mg, 0.20 mmol) dissous sous argon dans la *N,N*-diméthylacétamide (3 mL) et le benzène (2mL), sont ajoutés successivement de l'AIBN (300 mg) et du *n*-Bu₃SnH (273 μL, 1.02 mmol, 4.5eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (280 μL, 0.68 mmol, 3eq) sont ajoutés (2 fois) puis la solution est concentrée. Le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2mL) en agitant 1 heure, avant d'être filtré pour donner une poudre blanche. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (130 mg, 79%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +1$ (c 1.01, CHCl₃).

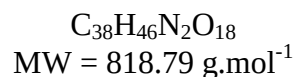
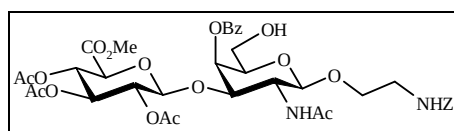
F 237-239°C (AcOEt).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.02-7.11 (m, 10H, Ar), 6.19 (d, 1H, *J*_{2,NH} 6.5Hz, NH GalN), 5.49-5.44 (m, 1H, NHC(O)O), 5.26 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9Hz, H-3 GlcA), 5.19 (dd, 1H, *J*_{4,5} 9Hz, H-4 GlcA), 5.08-5.01 (m, 3H, H-2 GlcA et CH₂-Ph), 4.97 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GlcA), 4.77 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GalN), 4.59 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 5Hz, *J*_{6a,6b} 11.5Hz, H-6a GalN), 4.07 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 7Hz, H-6b GalN), 4.55-4.49 (m, 1H, H-3 GalN), 4.14 (ddd, 1H, *J*_{4,5} <1Hz, *J*_{4,OH} <1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4 GalN), 4.08 (d, 1H, *J*_{4,5} 9.5Hz, H-5 GlcA), 4.92-3.85 (m, 1H, H-5 GalN), 3.84-3.79 (m, 1H, O-CH₂), 4.71-3.65 (m, 1H, O-CH₂), 3.66 (s, 3H, COOCH₃), 3.49-3.26 (m, 2H, H-2 GalN et CH₂-N), 3.13 (d, 1H, OH), 2.02, 2.01 (2s, 9H, OC(O)CH₃), 1.93 (s, 3H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.71, 169.94, 169.53, 167.43, 166.23 (6C, C-6 GlcA et C=O), 156.72 (1C, NHC(O)O), 136.14, 132.86, 129.35, 129.20, 128.06, 128.02, 129.62, 127.48 (12C, Ph), 100.84 (1C, C-1 GalN), 100.06 (1C, C-1 GlcA), 78.62 (1C, C-3 GalN), 71.73 (1C, C-5 GalN), 71.56 (1C, C-3 GlcA), 71.32 (1C, C-4 GalN), 70.77 (1C, C-2 GlcA), 69.00 (1C, C-4 GlcA), 68.22 (1C, O-CH₂), 67.45 (1C, C-5 GlcA), 66.19 (1C, CH₂-Ph), 63.27 (1C, C-6 GalN), 52.54 (1C, COOCH₃), 52.04 (1C, C-2 GalN), 40.38 (1C, CH₂-N), 22.50 (1C, NHC(O)CH₃), 19.97, 19.92, 19.88 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : *m/z* 819 [M+H]⁺, 836 [M+NH₄]⁺.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₈H₄₃Cl₃N₂O₁₈ + H₂O : C, 48.55 ; H, 4.70 ; N, 3.04 ; trouvée C, 48.96 ; H, 4.69 ; N, 2.96.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-2-désoxy-4-O-benzoyl-β-D-galactopyranoside (211b)

A une solution de disaccharide **206b** (193 mg, 0.21 mmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (3 mL) et le benzène (2mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN (300 mg) et du *n*-Bu₃SnH (280 µL, 1.05 mmol, 4.5eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (190 µL, 0.71 mmol, 3eq) sont ajoutés (2 fois) puis la solution est concentrée. Le solide est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2mL) en agitant 1 heure, avant d'être filtré pour donner une poudre blanche. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (150 mg, 88%) sous la forme d'une poudre blanche.

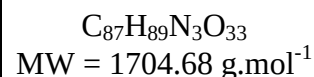
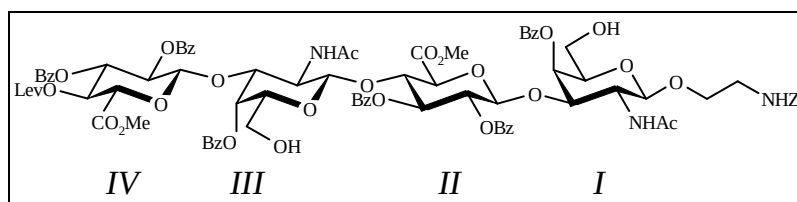
$[\alpha]_D^{20} +25$ (c 1.01, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.02-7.11 (m, 10H, Ar), 6.10 (d, 1H, *J*_{2,NH} 7Hz, NH GalN), 5.54 (dd, 1H, *J*_{4,5}<1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4 GalN), 5.42-5.37 (m, 1H, NHC(O)O), 5.16 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9Hz, H-3 GlcA), 5.09 (dd, 1H, *J*_{4,5} 9Hz, H-4 GlcA), 5.07 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.95 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1 GalN), 4.92 (dd, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-2 GlcA), 4.78 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.63 (dd, 1H, *J*_{2,3} 10Hz, H-3 GalN), 4.02 (d, 1H, H-5 GlcA), 3.89-3.82 (m, 1H, O-CH₂), 3.80-3.74 (m, 1H, H-5 GalN), 3.72-3.58 (m, 3H, H-2, H-6a GalN et O-CH₂), 3.62 (s, 3H, COOCH₃), 3.53-3.43 (m, 1H, H-6b GalN), 3.42-3.31 (m, 2H, CH₂-N), 3.24-3.19 (m, 1H, OH), 2.02, 1.98, 1.94 (3s, 12H, OC(O)CH₃, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.06, 169.88, 169.20, 167.44, 167.42, 166.67 (6C, C-6 GlcA et C=O), 156.46 (1C, NHC(O)O), 136.47, 133.47, 130.06, 129.27, 128.45, 128.41, 128.07, 128.00 (12C, Ph), 100.23 (1C, C-1 GalN), 99.86 (1C, C-1 GlcA), 75.43 (1C, C-3 GalN), 73.73 (1C, C-5 GalN), 72.37 (1C, C-5 GlcA), 72.11 (1C, C-3 GlcA), 70.98 (1C, C-2 GlcA), 69.56 (1C, C-4 GalN), 69.15 (1C, O-CH₂), 68.99 (1C, C-4 GlcA), 66.66 (1C, CH₂-Ph), 60.24 (1C, C-6 GalN), 54.47 (1C, C-2 GalN), 52.72 (1C, COOCH₃), 40.92 (1C, CH₂-N), 23.43 (1C, NHC(O)CH₃), 20.59, 20.41, 20.37 (3C, OC(O)CH₃).

ES-SM : *m/z* 819 [M+H]⁺, 836 [M+NH₄]⁺.

Analyse élémentaire calculée pour C₃₈H₄₆N₂O₁₈ + H₂O : C, 54.54 ; H, 5.78 ; N, 3.35 ; trouvée C, 54.54 ; H, 5.88 ; N, 3.30.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acétamido-4-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acétamido-4-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (212b)

A une solution de tétrasaccharide **208b** (133mg, 69.9 μmol) dissous dans l'AcOH (1.7 mL) à 50°C sous argon, est ajouté un amalgame de Zn-Cu (50 mg) par 5 portions toutes les heures. Le mélange réactionnel est agité à 50°C sous argon pendant 24 heures. La réaction n'étant pas terminée, un nouvel ajout d'amalgame de Zn-Cu (15 mg) est effectué et la solution est agitée 8h à 50°C sous argon. Le mélange est ensuite filtré sur célite puis concentré. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19 : 1) donne le produit désiré (15 mg, 13%) et le produit majoritaire ne possédant qu'un groupement trichloroacétamide (80 mg).

Ce composé majoritaire est alors redissous à 50°C sous argon dans l'AcOH (1 mL) et l'amalgame de Zn-Cu (15 mg) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité 24 heures à 50°C sous argon, filtré et évaporé. Aucun avancement n'est observé.

A une solution de mélange précédemment obtenu (103 mg, 0.04 mmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (0.5 mL) et le benzène (1.5 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (89 μL , 0.33 mmol, 7.5eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (35 μL , 0.12 mmol, 3eq) sont ajoutés (2 fois). La solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL), avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19 : 1) donne le produit désiré (40 mg, 34%) sous la forme d'une poudre blanche.

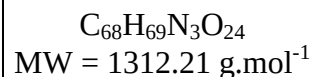
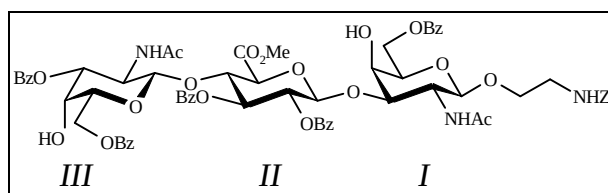
$[\alpha]_D^{20} +15$ (c 1.03, CHCl_3).

F 144°C (AcOEt/EP).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.02-6.88 (m, 35H, Ar), 5.56 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 10Hz, H-3^{II}), 5.51 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3.5Hz, H-4^I), 5.40 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{IV}), 5.43-5.40 (m, 1H, NH^I), 5.33-5.23 (m, 5H, H-2^{II}, H-4^{II}, NH^{III}, H-4^{III} et H-2^{IV}), 5.17-5.12 (m, 1H, NHC(O)O), 5.08 (d, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.03 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.85-4.72 (m, 5H, H-3^I, H-1^{II}, H-1^{III}, H-3^{III} et H-1^{IV}), 4.06 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{IV}), 4.03 (d, 1H, H-5^{IV}), 3.96 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5^{II}), 3.38 (s, 6H, COOCH_3), 3.82-3.57 (m, 4H, H-5^I, OH^I et O- CH_2), 3.48-3.27 (m, 6H, H-2^I, H-6a^I, H-6b^I, H-5^{III} et $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.12-3.08 (m, 1H, H-2^{III}), 2.86-2.72 (m, 2H, H-6a^{III} et OH^{III}), 2.56-2.31 (m, 4H, CH_2 Lev), 2.20-2.12 (m, 1H, H-6b^{III}), 1.99 (s, 3H, CH_3 Lev), 1.29, 1.17 (2s, 6H, NHC(O) CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 205.51 (1C, C=O Lev), 171.24, 171.06, 170.89, 167.16, 166.52, 166.31, 165.45, 165.24, 164.68, 164.45 (11C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.23 (1C, NHC(O)O), 136.39, 133.54, 133.51, 133.49, 133.29, 132.81, 130.14, 130.08, 129.74, 129.71, 129.33, 129.28, 129.16, 128.91, 128.76, 128.65, 128.56, 128.47, 128.42, 128.28, 128.06, 128.01, 127.91 (42C, Ar), 101.74, 101.60 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 99.33, 97.75 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 76.57, 75.78 (2C, C-3^I et C-3^{III}), 75.33, 74.65, 73.39, 72.87, 72.41, 72.34, 72.06, 71.21, 70.87, 69.79, 69.70, 69.12 (12C, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-4^{III}, C-

5^{III} , C- 2^{IV} , C- 3^{IV} , C- 4^{IV} et C- 5^{IV}), 69.21 (1C, O-CH₂), 66.61 (1C, CH₂-Ph), 59.94, 58.89 (2C, C- 6^I et C- 6^{III}), 55.50, 55.27 (2C, C- 2^I et C- 2^{III}), 52.97, 52.75 (2C, COOCH₃), 40.85 (1C, CH₂-N), 37.64, 27.66 (2C, CH₂ Lev), 29.42 (1C, CH₃ Lev), 22.72, 22.47 (2C, NHC(O)CH₃).



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-3,6-di-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acétamido-6-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-galactopyranoside (217a)

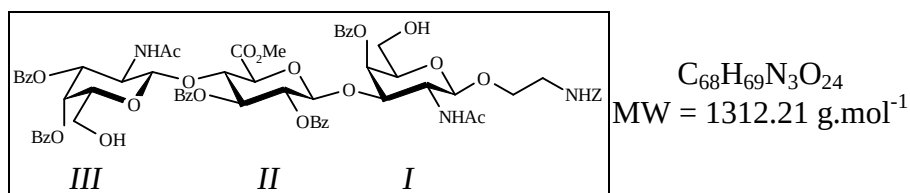
A une solution de trisaccharide **210a** (140 mg, 0.09 mmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (1.6 mL) et le benzène (5 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (297 μ L, 1.11 mmol, 12eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 90 minutes de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (148 μ L, 0.56 mmol, 6eq) sont ajoutés (2 fois). La solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL), avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (58 mg, 48%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +16$ (c 1.02, CHCl₃).

F 195-215°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 8.13-7.12 (m, 30H, Ar), 5.83 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9Hz, NH^{III}), 5.71 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 5.51 (dd, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 5.45 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2^{II}), 5.32-5.27 (m, 1H, NHC(O)O), 5.19 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 5.01 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 5.00 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.97 (d, 1H, H-1^{II}), 4.85 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 4.61 (dd, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.58-4.49 (m, 2H, H-3^I et H-6b^I), 4.39 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{II}), 4.29 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5^{II}), 4.29-4.21 (m, 1H, H-2^{III}), 4.18 (ddd, 1H, $J_{\text{OH},4} = J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^I), 3.99 (ddd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{\text{OH},4}$ 6Hz, H-4^{III}), 3.98-3.91 (m, 2H, H-5^I et H-5^{III}), 3.83-3.63 (m, 4H, H-6a^{III}, H-6b^{III} et O-CH₂), 3.74 (s, 3H, COOCH₃), 3.38-3.27 (m, 3H, H-2^I et CH₂-N), 2.79 (d, 1H, OH^I), 2.43 (d, 1H, OH^{III}), 1.85, 1.26 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) 171.58, 171.50, 167.86, 165.89, 165.64, 165.46, 165.00, 164.64 (8C, C-6^{II} et C=O), 156.59 (1C, NHC(O)O), 135.94, 132.74, 132.72, 132.61, 132.51, 129.14, 129.10, 129.03, 128.94, 128.87, 128.84, 128.76, 128.73, 128.54, 128.37, 127.73, 127.68, 127.56, 127.14, 127.00 (36C, Ar), 101.25 (1C, C-1^{II}), 101.05 (1C, C-1^I), 100.64 (1C, C-1^{III}), 79.92 (1C, C-3^{III}), 76.26 (1C, C-4^{II}), 73.40 (1C, C-5^{II}), 73.27 (1C, C-3^I), 72.74 (1C, C-3^{II}), 71.81 (1C, C-5^{III}), 71.39 (1C, C-2^{II}), 71.26 (1C, C-5^I), 67.73 (1C, O-CH₂), 67.08 (1C, C-4^I), 65.68 (1C, CH₂-Ph), 64.59 (1C, C-4^{III}), 62.90 (1C, C-6^I), 61.62 (1C, C-6^{III}), 51.94 (1C, COOCH₃), 50.60 (1C, C-2^I), 49.62 (1C, C-2^{III}), 39.96 (1C, CH₂-N), 21.58, 20.92 (2C, NHC(O)CH₃).



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-4-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (217b)

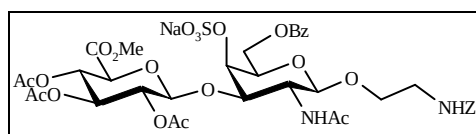
A une solution de trisaccharide **210b** (150 mg, 0.10 mmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (1.6 mL) et le benzène (5 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (319 μL, 1.18 mmol, 12eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 2 heures, de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (159 μL, 0.59 mmol, 6eq) sont ajoutés (2 fois). La solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL), avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (92 mg, 71%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +38$ (c 1.02, CHCl₃).

F 144-150°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.06-7.12 (m, 30H, Ar), 6.01-5.93 (m, 1H, NH^{III}), 5.83-5.75 (m, 1H, NH^I), 5.71 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 2Hz, H-4^I), 5.61 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 8.5Hz, H-3^{II}), 5.45 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 2Hz, H-4^{III}), 5.36 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 5.31 (dd, 1H, *J*_{1,2} 7Hz, H-2^{II}), 5.09-4.95 (m, 1H, NHC(O)O), 5.03 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.02 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^I), 4.98 (d, 1H, H-1^{II}), 4.97 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{III}), 4.75-4.68 (m, 1H, H-3^I), 4.32-4.26 (m, 2H, H-4^{II} et H-2^{III}), 4.22 (d, 1H, *J*_{4,5} 10Hz, H-5^{II}), 3.80 (s, 3H, COOCH₃), 3.79-3.22 (m, 10H, H-2^I, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, OH^I, H-5^{III}, O-CH₂ et CH₂-N), 2.85 (ddd, 1H, *J*_{OH,6a} 5Hz, *J*_{5,6a} 7Hz, *J*_{6a,6b} 12Hz, H-6a^{III}), 2.64 (ddd, 1H, *J*_{OH,6b} 5Hz, *J*_{5,6b} 7Hz, H-6b^{III}), 2.39 (d, 1H, OH^{III}), 1.83, 1.32 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.19, 170.46, 168.03, 167.80, 166.46, 165.88, 165.22, 164.79 (8C, C-6^{II} et C=O), 156.35 (1C, NHC(O)O), 136.37, 133.66, 133.62, 133.55, 133.29, 130.10, 130.03, 129.73, 129.36, 129.28, 129.24, 128.85, 128.73, 128.54, 128.41, 128.33, 128.18, 128.04, 127.97 (36C, Ar), 101.25 (1C, C-1^I), 100.86 (1C, C-1^{II}), 99.75 (1C, C-1^{III}), 76.18 (2C, C-3^I et C-4^{II}), 73.75, 73.70, 73.52 (3C, C-5^I, C-5^{II} et C-5^{III}), 72.87 (1C, C-3^{II}), 71.56 (1C, C-2^{II}), 71.21 (1C, C-3^{III}), 70.28 (1C, C-4^I), 69.09 (1C, O-CH₂), 67.88 (1C, C-4^{III}), 66.58 (1C, CH₂-Ph), 60.15 (1C, C-6^I), 59.63 (1C, C-6^{III}), 54.83 (1C, C-2^I), 53.00 (1C, COOCH₃), 51.53 (1C, C-2^{III}), 40.82 (1C, CH₂-N), 23.19, 22.58 (2C, NHC(O)CH₃).



$C_{38}H_{46}N_2O_{18}$
MW = 920.84 g.mol⁻¹

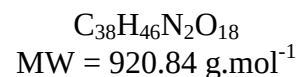
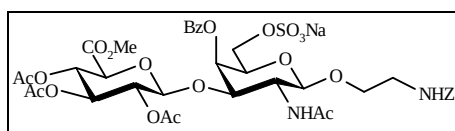
2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-benzoyl-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (218a)

A une solution de disaccharide **211a** (106 mg, 0.12 mmol) dans le DMF anhydre (1 mL) est ajouté du SO₃.NMe₃ (80 mg, 0.57 mmol, 5eq). Le mélange réactionnel est agité une nuit à 60°C sous argon. L'excès de réactif est hydrolysé à température ambiante par du MeOH (0.5 mL) puis les solvants sont évaporés à sec. L'excès de réactif est ensuite précipité dans du CH₂Cl₂, puis filtré. Une purification par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 10 : 1), suivie d'un échange d'ions sur résine Sephadex SP C25 [Na⁺] (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9 : 5 : 1) donne le produit désiré (110 mg, 92%) sous la forme d'un solide blanchâtre.

$[\alpha]_D^{20}$ -2 (c 0.99, MeOH/CHCl₃ 9 : 1).

RMN ¹H (CD₃OD/CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.02-7.11 (m, 10H, Ar), 5.32 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.22 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4 GlcA), 5.11 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2 GlcA), 5.05 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.93 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1$ Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 4.86 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.70 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 4Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a GalN), 4.63 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b GalN), 4.57 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.21 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.12 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.98-4.92 (m, 1H, H-5 GalN), 3.92-3.86 (m, 1H, H-2 GalN), 3.83-3.77 (m, 1H, O-CH₂), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 3.67-3.59 (m, 1H, O-CH₂), 3.35-3.25 (m, 2H, CH₂-N), 2.07, 2.04, 2.01 (3s, 9H, OC(O)CH₃), 1.96 (s, 3H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CD₃OD/CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 173.80, 171.85, 171.77, 171.43, 169.50, 167.92 (6C, C-6 GlcA et C=O), 158.53 (1C, NHC(O)O), 137.79, 134.19, 130.95, 130.58, 129.42, 129.35, 128.90, 128.72 (12C, Ph), 102.29 (1C, C-1 GalN), 101.89 (1C, C-1 GlcA), 77.50 (1C, C-3 GalN), 76.08 (1C, C-4 GalN), 73.62 (1C, C-3 GlcA), 73.44 (1C, C-5 GalN), 72.84 (1C, C-5 GlcA), 72.55 (1C, C-2 GlcA), 70.56 (1C, C-4 GlcA), 69.56 (1C, O-CH₂), 67.44 (1C, CH₂-Ph), 65.38 (1C, C-6 GalN), 53.62 (1C, COOCH₃), 52.91 (1C, C-2 GalN), 41.66 (1C, CH₂-N), 23.34 (1C, NHC(O)CH₃), 21.02, 20.73, 20.66 (3C, OC(O)CH₃).



2-Benzylloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-benzoyl-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (218b)

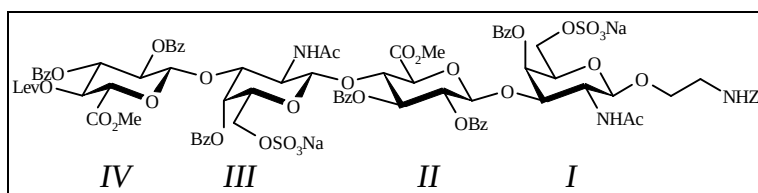
A une solution de disaccharide **211b** (117 mg, 0.14 mmol) dans le DMF anhydre (1 mL) est ajouté du $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ (44 mg, 0.32 mmol, 2.5eq). Le mélange réactionnel est agité 4 heures à 40°C sous argon. La réaction étant incomplète du $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ (18 mg, 0.13, 1eq) est ajouté et la solution est agitée 1 heure supplémentaire à 40°C sous argon. L'excès de réactif est hydrolysé à température ambiante par du MeOH (0.5 mL) puis les solvants sont évaporés à sec. Une purification par chromatographie flash sur gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8 :1), suivie d'un échange d'ions sur résine Sephadex SP C25 [Na^+] ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 9 : 5 : 1) donne le produit désiré (107 mg, 82%) sous la forme d'un solide blanchâtre.

$[\alpha]_D^{20} +17.5$ (c 1.03, MeOH).

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ (ppm) 8.02-7.08 (m, 10H, Ar), 5.67 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 5.23 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3 GlcA), 5.08 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.04 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9Hz, H-4 GlcA), 4.92 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.78 (dd, 1H, H-2 GlcA), 4.52 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GalN), 4.21 (d, 1H, H-5 GlcA), 4.25-4.19 (m, 1H, H-2 GalN), 4.17 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 4Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a GalN), 4.11 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 GalN), 4.07 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 8Hz, H-6b GalN), 3.96-3.87 (m, 2H, H-5 GalN et O- CH_2), 3.69 (s, 3H, COOCH_3), 3.66-3.61 (m, 1H, O- CH_2), 3.35-3.28 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.02, 1.98, 1.94 (3s, 12H, OC(O)CH_3 et NHC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ (ppm) 173.77, 171.46, 171.20, 170.96, 169.28, 167.46 (6C, C-6 GlcA et C=O), 158.81 (1C, NHC(O)O), 138.33, 134.38, 131.15, 131.11, 129.52, 128.99, 128.90 (12C, Ph), 102.87 (1C, C-1 GalN), 101.76 (1C, C-1 GlcA), 78.55 (1C, C-3 GalN), 73.71, 73.52, 70.96 (3C, C-5 GalN, C-3 et C-4 GlcA), 73.31 (1C, C-5 GlcA), 72.40 (1C, C-2 GlcA), 71.17 (1C, C-4 GalN), 69.53 (1C, O- CH_2), 68.00 (1C, C-6 GalN), 67.51 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 53.49 (1C, COOCH_3), 53.10 (1C, C-2 GalN), 41.84 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 23.34 (1C, NHC(O)CH_3), 20.73, 20.48, 20.45 (3C, OC(O)CH_3).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_{21}$ ($[\text{M}-\text{Na}]^+$) : 897.2236 ; trouvée : 897.228.



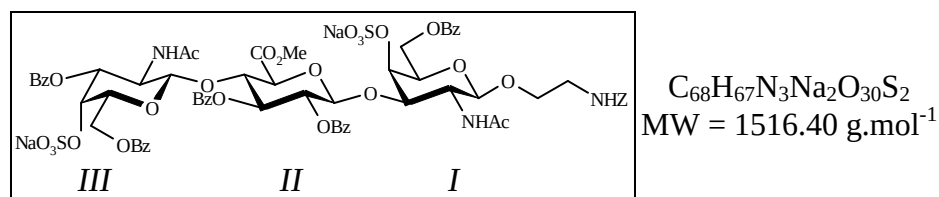
2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-lévulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(sodium 2-acétamido-4-O-benzoyl-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-4-O-benzoyl-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (219b)

A une solution de tétrasaccharide **212b** (60 mg, 350 μmol) dans le DMF anhydre (1 mL) est ajouté du SO₃.NMe₃ (19 mg, 140 μmol, 4 eq). Le mélange réactionnel est agité à 40°C sous argon. Après 8 heures, 24 heures et 32 heures, la réaction étant incomplète du SO₃.NMe₃ (19 mg, 140 μmol, 2eq) est ajouté et l'agitation est laissée à 40°C pendant 16h. L'excès de réactif est hydrolysé à température ambiante par du MeOH (1 mL) puis les solvants sont évaporés à sec. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1 : 1), suivie d'une purification par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 5 : 1), et d'un échange d'ions sur résine Sephadex SP C25 [Na⁺] (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9 : 5 : 1) donne le produit désiré (40 mg, 67%) sous la forme d'un solide blanchâtre.

[α]_D²⁰ +11 (c 1.06, MeOH /CHCl₃ 1 :1).

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, 400 MHz): δ(ppm) 8.07-6.97 (m, 35H, Ar), 5.69 (dd, 1H, J_{4,5}<1Hz, J_{3,4} 3.5Hz, H-4^I), 5.68 (dd, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} 9.5Hz, H-3^{IV}), 5.62-5.55 (m, 1H, H-3^{II}), 5.54 (dd, 1H, J_{4,5}<1Hz, J_{3,4} 3Hz, H-4^{III}), 5.28 (dd, 1H, J_{4,5} 10Hz, H-4^{IV}), 5.20 (dd, 2H, J_{1,2} 7.5Hz, H-2^{II} et H-2^{IV}), 5.08, 5.07 (2d, 2H, H-1^{II} et H-1^{IV}), 5.02 (ABq, 2H, CH₂-Ph), 4.53 (d, 1H, J_{1,2} 8Hz, H-1^I), 4.47 (d, 1H, J_{1,2} 8Hz, H-1^{III}), 4.34 (d, 1H, J_{4,5} 10Hz, H-5^{IV}), 4.29-4.22 (m, 3H, H-6a^I, H-4^{II} et H-5^{II}), 4.22 (dd, 1H, J_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 4.15-4.10 (m, 2H, H-2^I et H-3^I), 4.09-4.05 (m, 1H, H-5^I), 3.92 (dd, 1H, J_{6b,5} 8Hz, J_{6a,6b} 11Hz, H-6b^I), 3.88-3.73 (m, 2H, H-5^{III} et O-CH₂), 3.83, 3.73 (2s, 6H, COOCH₃), 3.73-3.70 (m, 1H, H-2^{III}), 3.62-3.48 (m, 2H, H-6a^{III} et O-CH₂), 3.32-3.25 (m, 3H, H-6b^{III} et CH₂-N), 2.62-2.31 (m, 4H, CH₂ Lev), 1.99 (s, 3H, CH₃ Lev), 1.28, 1.22 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD 100 MHz): δ(ppm) 206.29 (1C, C=O Lev), 171.52, 171.17, 170.74, 167.31, 167.04, 165.18, 165.03, 164.88, 164.81, 164.10 (11C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.52 (1C, NHC(O)O), 135.92, 132.52, 132.46, 132.19, 132.07, 129.01, 128.97, 128.81, 128.63, 128.61, 128.25, 128.14, 128.10, 127.91, 127.43, 127.33, 127.24, 127.07, 126.87, 126.75 (42C, Ar), 100.73, 100.08 (4C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III} et C-1^{IV}), 77.63 (1C, C-3^I), 76.30 (1C, C-3^{III}), 74.48 (1C, C-4^{IV}), 73.32 (1C, C-5^{IV}), 71.79 (2C, C-3^{II} et C-3^{IV}), 71.56 (1C, C-5^I), 71.28 (1C, C-5^{II}), 71.05 (1C, C-5^{III}), 70.77, 70.75 (2C, C-2^{II} et C-2^{IV}), 68.89 (1C, C-4^I), 68.76 (1C, C-4^{II}), 67.51 (1C, O-CH₂), 65.98, 64.74 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 65.41 (1C, CH₂-Ph), 52.61, 50.85 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 51.78, 51.69 (2C, COOCH₃), 39.63 (1C, CH₂-N), 36.31, 27.54 (2C, CH₂ Lev), 27.54 (1C, CH₃ Lev), 20.86, 20.58 (2C, NHC(O)CH₃).



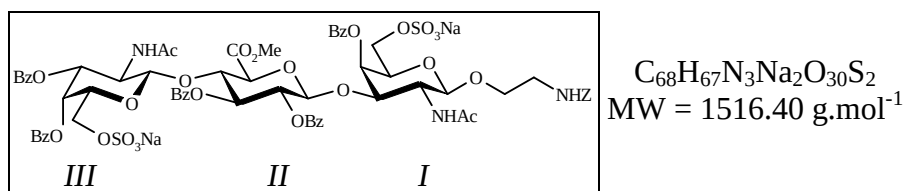
2-Benzylloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium 2-acétamido-3,6-di-O-benzoyl-2-désoxy-4-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-6-O-benzoyl-2-désoxy-4-sulfonato-β-D-galactopyranoside (220a)

A une solution de trisaccharide **217a** (79 mg, 60 μmol) dans le DMF (1 mL) est ajouté du SO₃.NMe₃ (42 mg, 0.30 mmol, 5 eq). Le mélange réactionnel est agité à 65°C sous argon. Après 8h, 31h et 53h la réaction étant incomplète du SO₃.NMe₃ (25 mg, 0.18 mmol, 3eq) est ajouté et l'agitation est laissée à 65°C pendant 19h après le dernier ajout. L'excès de réactif est hydrolysé à température ambiante par du MeOH (1 mL). Une purification sur colonne Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1 : 1) et un échange d'ions sur résine Sephadex SP C25 [Na⁺] (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9 : 5 : 1) donne le produit désiré (77 mg, 85%) sous la forme d'un solide blanchâtre.

[α]_D²⁰ +12 (c 1.00, MeOH).

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ(ppm) 8.15-7.19 (m, 30H, Ar), 5.79 (dd, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} 8Hz, H-3^{II}), 5.49 (dd, 1H, J_{1,2} 7Hz, H-2^{II}), 5.22-5.11 (m, 3H, H-1^{II}, H-3^{III} et H-4^{III}), 5.00 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.00-4.98 (m, 1H, H-1^{III}), 4.92-4.89 (m, 1H, H-4^I), 4.85-4.79 (m, 1H, H-4^{II}), 4.69-4.61 (m, 2H, H-6a^I et H-6b^I), 4.53-4.49 (m, 1H, H-1^I), 4.43 (d, 1H, J_{4,5} 9.5Hz, H-5^{II}), 4.39-4.31 (m, 2H, H-2^{III} et H-6a^{III}), 4.12-3.98 (m, 3H, H-2^I, H-3^I et H-5^I), 3.75 (s, 3H, COOCH₃), 3.70-3.52 (m, 4H, H-5^{III}, H-6b^{III} et O-CH₂), 3.22-3.15 (m, 2H, CH₂-N), 1.89, 1.45 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz): δ(ppm) 174.08, 173.79, 170.42, 167.96, 167.80, 167.40, 167.31, 167.20 (8C, C-6^{II} et C=O), 158.68 (1C, NHC(O)O), 138.24, 134.70, 134.43, 134.21, 133.96, 131.57, 131.36, 131.14, 130.95, 130.76, 130.51, 129.59, 129.56, 129.47, 129.38, 128.98, 128.84 (36C, Ar), 103.06, 102.77, 102.75 (3C, C-1^I, C-1^{II} et C-1^{III}), 79.13 (1C, C-3^I), 78.04 (1C, C-4^{II}), 76.96 (1C, C-3^{III}), 75.39 (1C, C-3^{II}), 74.13 (1C, C-5^{II}), 75.08 (1C, C-2^{II}), 73.77 (1C, C-5^I), 73.50 (1C, C-5^{III}), 73.47 (1C, C-4^{III}), 72.61 (1C, C-4^I), 69.56 (1C, O-CH₂), 67.44 (1C, CH₂-Ph), 65.63 (1C, C-6^I), 64.08 (1C, C-6^{III}), 53.72 (1C, COOCH₃), 52.70 (1C, C-2^{III}), 51.95 (1C, C-2^I), 41.80 (1C, CH₂-N), 23.40, 22.76 (2C, NHC(O)CH₃).



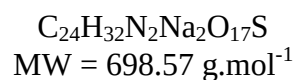
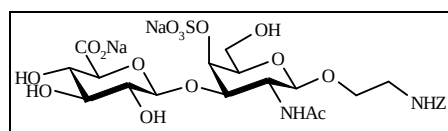
2-Benzylloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium 2-acétamido-3,4-di-O-benzoyl-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-4-O-benzoyl-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (220b)

A une solution de trisaccharide **217b** (85 mg, 64 μmol) dans le DMF (1 mL) est ajouté du SO₃.NMe₃ (45 mg, 0.32 mmol, 4eq). Le mélange réactionnel est agité à 65°C sous argon. Après 7h et 24h la réaction étant incomplète du SO₃.NMe₃ (20 mg, 0.16 mmol, 2.5eq) est ajouté et l'agitation est laissée à 65°C pendant 16 heures après le dernier ajout. L'excès de réactif est hydrolysé à température ambiante par du MeOH (1 mL). Une purification sur colonne Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂/MeOH 1 : 1), suivie d'une purification par chromatographie flash sur gel de silice (CH₂Cl₂/ MeOH 5 : 1), et d'un échange d'ions sur résine Sephadex SP C25 [Na⁺] (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 9 : 5 : 1) donne le produit désiré (47 mg, 48%) sous la forme d'un solide blanchâtre.

[α]_D²⁰ -15 (c 1.11, MeOH).

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz): δ(ppm) 8.13-7.17 (m, 30H, Ar), 5.75-5.73 (m, 1H, H-4^I), 5.73-5.68 (m, 1H, H-3^{II}), 5.63 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{III}), 5.37 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 5.24 (dd, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, *J*_{2,3} 9Hz, H-2^{II}), 5.18 (d, 1H, H-1^{II}), 5.02 (ABq, 2H, CH₂-Ph), 4.76 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{III}), 4.51 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^I), 4.36-4.31 (m, 2H, H-3^I et H-4^{II}), 4.28 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 3Hz, *J*_{6a,6b} 11Hz, H-6a^I), 4.20-4.14 (m, 2H, H-5^{II} et H-2^{III}), 4.13-4.08 (m, 2H, H-2^I et H-5^I), 4.02-3.98 (m, 1H, H-5^{III}), 3.94 (s, 3H, COOCH₃), 3.96-3.83 (m, 2H, H-6b^I et O-CH₂), 3.62 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 6Hz, *J*_{6a,6b} 11Hz, H-6a^{III}), 3.60-3.55 (m, 1H, O-CH₂), 3.39-3.33 (m, 1H, H-6b^{III}), 3.30-3.25 (m, 2H, CH₂-N), 1.85, 1.26 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz): δ(ppm) 173.71, 173.64, 169.37, 167.31, 166.99, 166.82, 166.29 (8C, C-6^{II} et C=O), 158.75 (1C, NHC(O)O), 138.22, 134.62, 134.51, 134.33, 131.29, 131.12, 131.04, 130.88, 130.80, 130.64, 130.59, 130.49, 129.59, 129.51, 129.46, 128.99, 128.87 (36C, Ar), 102.67 (1C, C-1^{II}), 102.58 (1C, C-1^{III}), 101.74 (1C, C-1^I), 79.76 (1C, C-5^{II}), 77.00 (1C, C-3^I), 75.16 (1C, C-4^{II}), 73.85 (1C, C-3^{II}), 73.61 (1C, C-5^I), 72.84 (1C, C-2^{II}), 72.30 (1C, C-3^{III}), 72.12 (1C, C-5^{III}), 70.88 (1C, C-4^I), 69.31 (1C, O-CH₂), 68.10 (1C, C-6^I), 68.06 (1C, C-4^{III}), 67.19 (1C, CH₂-Ph), 65.30 (1C, C-6^{III}), 53.59 (1C, COOCH₃), 52.67 (1C, C-2^I), 52.03 (1C, C-2^{III}), 41.48 (1C, CH₂-N), 22.78, 22.29 (2C, NHC(O)CH₃).



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-sodium acétamido-2-désoxy-4-O-sulfonato- β -D-galactopyranoside (221a)

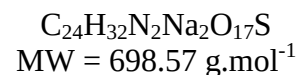
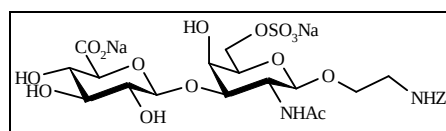
Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 530 μL , 0.53 mmol, 5eq) et de H_2O_2 (30%, 265 μL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de disaccharide **218a** (98 mg, 0.11 mmol) dissous dans du THF (2 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis du MeOH (1.5 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.53 mL, 2.12 mmol, 20eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, concentré, puis dilué dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 2.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (4 fois). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (29 mg, 39%) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

[α]_D²⁰ -22 (c 1.01, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) 7.45 (s, 5H, Ph), 5.13 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.79 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 GalN), 4.52 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-1 GalN), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1 GlcA), 4.10-4.01 (m, 2H, H-2 et H-3 GalN), 3.96-3.89 (m, 1H, O-CH₂), 3.85-3.75 (m, 3H, H-5, H-6a et H-6b GalN), 3.68 (d, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.75-3.68 (m, 1H, O-CH₂), 3.55 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 9Hz, H-4 GlcA), 3.51 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 9Hz, H-3 GlcA), 3.37 (dd, 1H, H-2 GlcA), 3.35-3.31 (m, 2H, CH₂-N), 1.98 (s, 3H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ (ppm) 176.49, 175.37 (2C, C-6 GlcA et C=O), 158.93 (1C, NHC(O)O), 137.03, 129.42, 129.02, 128.42 (6C, Ph), 103.89 (1C, C-1 GlcA), 101.92 (1C, C-1 GalN), 77.01 (1C, C-4 GalN), 75.73, 75.34, 75.07, 73.15, 72.44 (6C, C-3, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 69.37 (1C, O-CH₂), 67.54 (1C, CH₂-Ph), 61.59 (1C, C-6 GalN), 52.40 (1C, C-2 GalN), 40.99 (1C, CH₂-N), 22.81 (1C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : m/z : calculée pour C₂₄H₃₃N₂O₁₇S ([M+H-2Na]⁻) : 653.1500 ; trouvée : 653.1486.



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (221b)

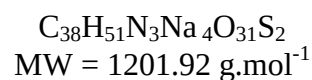
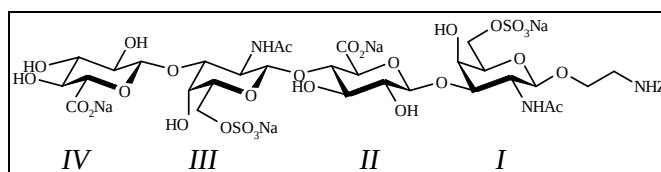
Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 540 µL, 0.54 mmol, 5eq) et de H₂O₂ (30%, 0.27 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de disaccharide **218b** (100 mg, 0.11 mmol) dissous dans du THF (2 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis toute la nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis du MeOH (1.5 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.54 mL, 2.16 mmol, 20eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 4 heures à température ambiante, concentré, puis dilué dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 2.6 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton, concentrée puis coévaporée à l'eau distillée (4 fois). Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à pH 10, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentré. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (50 mg, 66 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -13.5 (c 1.02, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.46 (s, 5H, Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.51 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1 GlcA), 4.48 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1 GalN), 4.26-4.17 (m, 3H, H-4, H-6a et H-6b GalN), 4.02 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-2 GalN), 3.96-3.90 (m, 1H, O-CH₂), 3.89-3.84 (m, 1H, H-5 GalN), 3.83 (dd, 1H, H-3 GalN), 3.72 (d, 1H, *J*_{4,5} 9.5Hz, H-5 GlcA), 3.77-3.69 (m, 1H, O-CH₂), 3.53-3.46 (m, 2H, H-3 et H-4 GlcA), 3.38-3.31 (m, 3H, H-2 GlcA et CH₂-N), 1.97 (s, 3H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 62.5 MHz): δ(ppm) 176.56, 175.42 (2C, C-6 GlcA et C=O), 158.91 (1C, NHC(O)O), 137.08, 129.43, 129.03, 128.46 (6C, Ph), 104.68 (1C, C-1 GlcA), 101.99 (1C, C-1 GalN), 80.46 (1C, C-3 GalN), 76.79, 75.96, 73.35, 73.23, 72.43 (5C, C-5 GalN, C-2, C-3, C-4, C-5 GlcA), 69.28 (1C, O-CH₂), 68.23 (1C, C-6 GalN), 68.14 (1C, C-4 GalN), 67.53 (1C, CH₂-Ph), 51.71 (1C, C-2 GalN), 41.06 (1C, CH₂-N), 22.82 (1C, NHC(O)CH₃).

SM-HR(ES) : *m/z*: calculée pour C₂₄H₃₃N₂O₁₇S ([M+H-2Na]⁺): 653.1500; trouvée: 653.1501.



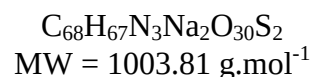
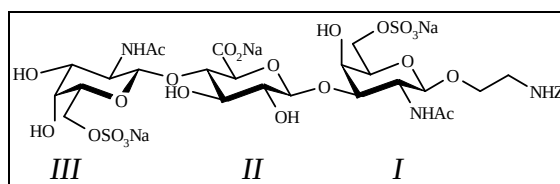
2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(sodium- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato- β -D-galactopyranoside (223b)

Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 199 μ L, 199 μ mol, 10eq) et de H₂O₂ (30%, 100 μ L) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de tétrasaccharide **219b** (38 mg, 20 μ mol) dissous dans du THF (1 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis une nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, du MeOH (3 mL) et une solution de NaOH (4M, 1.1 mL) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température, concentré, puis dilué dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton et concentrée. Le solide est alors lavé plusieurs fois avec un mélange EtOH/CHCl₃ puis dissous dans l'eau. Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à un pH 8.5, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentrée. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (17 mg, 71 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 3 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -7.5 (c 1.00, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) 7.45 (s, 5H, Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.56 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^I), 4.52, 4.51 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{III}), 4.23 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{4,3}$ 3Hz, H-4^I), 4.26-4.15 (m, 4H, H-6a^I, H-6b^I, H-6a^{III} et H-6b^{III}), 4.17 (dd, 1H, $J_{4,5}$ < 1Hz, $J_{4,3}$ 3Hz, H-4^{III}), 4.16-3.95 (m, 3H, H-2^I, H-2^{III} et H-5^{I ou III}), 3.94-3.89 (m, 1H, O-CH₂), 3.88-3.69 (m, 7H, H-3^I, H-5^{I ou III}, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{IV} et O-CH₂), 3.61 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 8.5Hz, $J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 3.51-3.47 (m, 2H, H-3^{IV} et H-4^{IV}), 3.42-3.31 (m, 4H, H-2^{II}, H-2^{IV} et CH₂-N), 2.04, 1.96 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ (ppm) 176.61, 175.63, 175.46, 174.94 (4C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 158.95 (1C, NHC(O)O), 129.45, 129.05, 129.49 (6C, Ph), 104.84, 104.77 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 102.02, 102.00 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 81.93 (1C, C-4^{II}), 80.64 (1C, C-3^I), 80.37 (1C, C-3^{III}), 77.08, 76.75 (2C, C-5^{II} et C-5^{IV}), 75.96, 72.46 (2C, C-3^{IV} et C-4^{IV}), 74.51 (1C, C-3^{II}), 73.38 (2C, C-5^I et C-5^{III}), 73.26, 72.98 (2C, C-2^{II} et C-2^{IV}), 69.32 (1C, O-CH₂), 68.31, 68.16 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 68.26, 68.05 (2C, C-4^I et C-4^{III}), 67.56 (1C, CH₂-Ph), 51.69, 51.53 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 41.08 (1C, CH₂-N), 23.21, 22.81 (2C, NHC(O)CH₃).



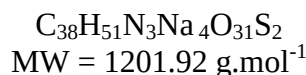
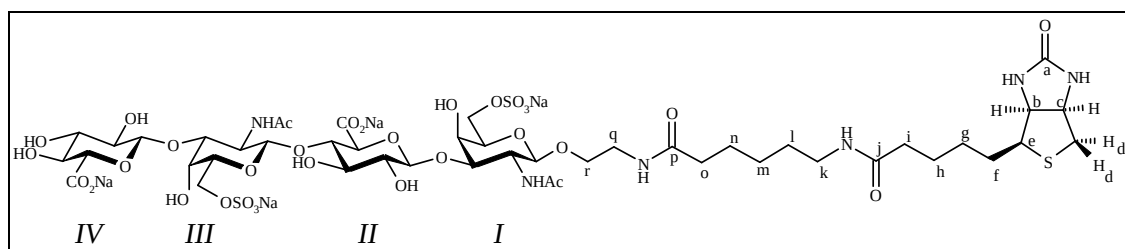
2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (224b)

Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 148 µL, 148 µmol, 5eq) et de H₂O₂ (30%, 74 µL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de trisaccharide **220b** (45 mg, 30 µmol) dissous dans du THF (1 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis une nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, du MeOH (0.75 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.19 mL, 25eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température ambiante puis évaporé. Le résidu obtenu est ensuite dissous dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton et concentrée. Le solide est alors lavé plusieurs fois avec de l'EtOH puis dissous dans l'eau. Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à un pH 8.5, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentrée. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (23 mg, 77 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -2.5 (*c* 1.00, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.46 (s, 5H, Ar), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.52 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^I), 4.51 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{II}), 4.48 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^{III}), 4.25-4.18 (m, 4H, H-6a^I, H-6b^I, H-6a^{III} et H-6b^{III}), 4.16 (dd, 1H, *J*_{4,5} < 1Hz, *J*_{3,4} 3Hz, H-4^{III}), 4.12-3.89 (m, 5H, H-2^I, H-4^I, H-5^I, H-2^{III} et O-CH₂), 3.87-3.82 (m, 1H, H-5^{III}), 3.82 (dd, 1H, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 3.77-3.70 (m, 4H, H-3^I, H-4^{II}, H-5^{II} et O-CH₂), 3.59 (d, 1H, *J*_{2,3} 8.5Hz, *J*_{3,4} 9Hz, H-3^{II}), 3.39 (dd, 1H, H-2^{II}), 3.36-3.30 (m, 2H, CH₂-N), 2.07, 1.97 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 62.5 MHz): δ(ppm) 175.68, 175.46, 175.01 (3C, C-6^{II} et C=O), 158.95 (1C, NHC(O)O), 129.45, 129.05, 128.49 (6C, Ar), 104.87 (1C, C-1^{II}), 102.14, 102.33 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 81.56, 80.38 (2C, C-3^I et C-4^{II}), 77.10, 74.44, 73.28, 73.26, 73.01, 71.47, 68.29, 68.04 (8C, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III} et C-5^{III}), 69.30 (1C, O-CH₂), 68.31 (1C, C-6^I), 67.62 (1C, CH₂-Ph), 67.57 (1C, C-6^{III}), 52.79, 51.68 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 41.08 (1C, CH₂-N), 22.17, 22.81 (2C, NHC(O)CH₃).



2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (225b)

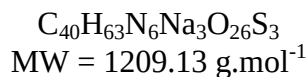
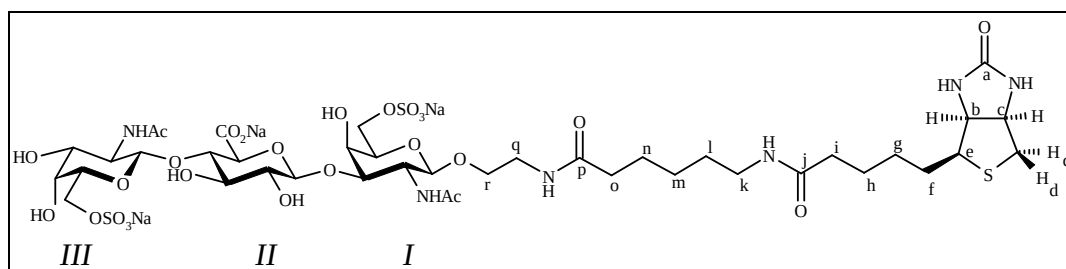
Le tétrasaccharide **223b** (15 mg, 12 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut (12 mg, 94%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

Un mélange de l'amine obtenue précédemment (12 mg, 11 mmol) et de réactif biotinylé (20 mg, 44 μmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (13 mg, 77% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -3.5 (c 1.00, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.62 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.56 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^I), 4.52, 4.50 (2d, 2H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{II} et H-1^{IV}), 4.51 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{III}), 4.45 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.28-4.17 (m, 6H, H-4^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{III}, H-6a^{III} et H-6b^{III}), 4.03, 4.02 (2dd, 2H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2^I et H-2^{III}), 3.96-3.66 (m, 9H, H-3^I, H-5^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-5^{IV} et CH₂-r), 3.60 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 3.50-3.47 (m, 2H, H-3^{IV} et H-4^{IV}), 3.42-3.31 (m, 5H, H-2^{II}, H-2^{IV}, H-e et CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.29- 2.23 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.03, 2.02 (2s, 6H, NHC(O)CH₃), 1.81-1.32 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.62, 177.30 (6C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 165.97 (1C, C-a), 104.86, 104.75 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 101.86, 100.60 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 81.75, 80.53, 80.47 (3C, C-3^I, C-4^{II} et C-3^{III}), 76.98, 76.67, 75.89, 74.45, 73.30, 73.21, 73.19, 72.95, 72.91 (9C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 68.96 (C-r), 68.33, 68.09 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 68.19, 67.98 (2C, C-4^I et C-4^{III}), 62.67 (1C, C-b), 60.84 (1C, C-c), 55.96 (1C, C-e), 51.60, 51.48 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 40.28 (1C, C-d), 39.90, 39.66 (2C, C-k et C-q), 36.21, 36.12 (2C, C-i et C-o), 28.57, 28.42, 28.26, 26.14, 25.81, 25.56 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.13, 22.85 (2C, NHC(O)CH₃).



2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (225b)

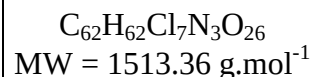
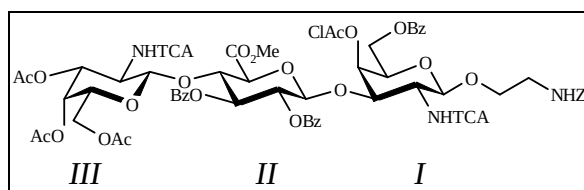
Le trisaccharide **224b** (17 mg, 17 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut (13 mg, 82%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

Un mélange de l'amine obtenue précédemment et de réactif biotinylé (25 mg, 55 μmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (14 mg, 70% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20} +15$ (c 1.00, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.62 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.54-4.50 (m, 3H, H-1^I, H-1^{II} et H-1^{III}), 4.45 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.28-4.20 (m, 4H, H-6a^I, H-6b^I, H-6a^{III} et H-6b^{III}), 4.19 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 2.5Hz, H-4^I), 4.03 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-2^I), 4.01 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 3.99-3.89 (m, 4H, H-5^I, H-2^{III}, H-5^{III} et CH₂-r), 3.86 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 3.80-3.69 (m, 4H, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III} et CH₂-r), 3.60 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 9Hz, $J_{2,3}$ 8Hz, H-3^{II}), 3.40-3.30 (m, 4H, H-2^{II}, H-e et CH₂-q), 3.18 (dd, 2H, $J_{k,k'}$ = $J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.79 (dd, 1H, H-d), 2.30- 2.24 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.06, 2.02 (2s, 6H, NHC(O)CH₃), 1.79-1.30 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.56, 177.23, 175.65, 175.34, 174.98 (5C, C-6^{II} et C=O), 165.95 (1C, C-a), 104.88 (1C, C-1^{II}), 102.13, 101.95 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 81.57, 80.51 (2C, C-3^I et C-4^{II}), 77.08, 74.47, 73.31, 73.30, 73.02, 71.51 (6C, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-3^{III} et C-5^{III}), 68.02 (1C, C-r), 68.41, 67.59 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 68.28, 68.05 (2C, C-4^I et C-4^{III}), 62.74 (1C, C-b), 60.90 (1C, C-c), 56.04 (1C, C-e), 52.81, 51.69 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 40.37 (1C, C-d), 39.98, 39.74 (2C, C-k et C-q), 36.29, 36.20 (2C, C-i et C-o), 28.66, 28.52, 28.35, 26.23, 25.91, 25.65 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.16, 22.93 (2C, NHC(O)CH₃).



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-chloroacétyl-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido- β -D-galactopyranoside (227)

Un mélange d'accepteur **188a** (300 mg, 0.28 mmol), d'imidate **61** (248 mg, 0.42 mmol, 1.5eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CDCl_3 (3 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 104 μL , 0.10 mmol, 0.25eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et_3N (44 μL , 0.31 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentré. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (153 mg, 36%) sous la forme d'une poudre jaune.

$[\alpha]_D^{20} +4$ (c 1.03, CHCl_3).

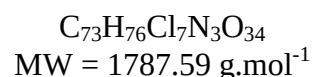
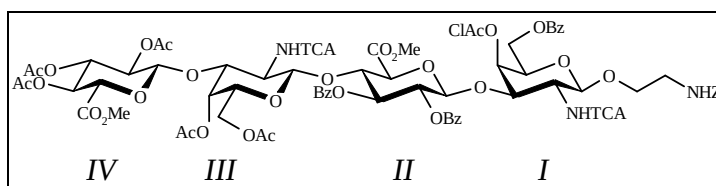
F 130-135°C (*i*-PrOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.06-7.22 (m, 20H, Ar), 6.84 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9Hz, NH^{III}), 6.81 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^{I}), 5.59 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 $^{\text{I}}$), 5.58 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3 $^{\text{II}}$), 5.29 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-2 $^{\text{II}}$), 5.13 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4 $^{\text{III}}$), 5.12-5.07 (m, 1H, NHC(O)O), 5.07 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 $^{\text{III}}$), 5.02 (s, 2H, CH_2 -Ph), 5.01 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1 $^{\text{I}}$), 4.88 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1 $^{\text{III}}$), 4.92 (d, 1H, H-1 $^{\text{II}}$), 4.73 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3 $^{\text{I}}$), 4.44 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a $^{\text{I}}$), 4.34 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 5.5Hz, H-6b $^{\text{I}}$), 4.25 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 4.23 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, H-4 $^{\text{II}}$), 4.08 (d, 1H, H-5 $^{\text{II}}$), 4.09-4.02 (m, 1H, H-5 $^{\text{I}}$), 4.03-3.97 (m, 1H, H-2 $^{\text{III}}$), 3.87-3.80 (m, 1H, O- CH_2), 3.71-3.65 (m, 1H, H-5 $^{\text{III}}$), 3.65 (s, 3H, COOCH_3), 3.65-3.59 (m, 1H, O- CH_2), 3.55-3.45 (m, 1H, H-2 $^{\text{I}}$), 3.39-3.23 (m, 4H, H-6a $^{\text{III}}$, H-6b $^{\text{III}}$ et CH_2 -N), 1.97, 1.95, 1.93 (3s, 9H, OC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 170.20, 169.96, 169.88, 168.43, 166.68, 165.98, 165.09, 165.00, 162.36, 161.70 (10C, C-6 $^{\text{II}}$ et C=O), 156.22 (1C, NHC(O)O), 136.29, 133.47, 133.44, 133.28, 129.85, 129.66, 129.54, 129.50, 129.36, 128.71, 128.53, 128.45, 128.23, 128.10 (36C, Ar), 100.92 (1C, C-1 $^{\text{II}}$), 100.03 (1C, C-1 $^{\text{III}}$), 98.53 (1C, C-1 $^{\text{I}}$), 92.38, 91.69 (2C, CCl_3), 75.85 (1C, C-4 $^{\text{II}}$), 73.50 (1C, C-5 $^{\text{II}}$), 73.22 (1C, C-3 $^{\text{I}}$), 71.89 (1C, C-3 $^{\text{III}}$), 71.43 (1C, C-2 $^{\text{II}}$), 71.08 (1C, C-5 $^{\text{I}}$), 71.02 (1C, C-5 $^{\text{III}}$), 70.84 (1C, C-4 $^{\text{I}}$), 70.05 (1C, C-3 $^{\text{II}}$), 69.37 (1C, O- CH_2), 66.70 (1C, CH_2 -Ph), 66.12 (1C, C-4 $^{\text{III}}$), 62.03 (1C, C-6 $^{\text{I}}$), 60.21 (1C, C-6 $^{\text{III}}$), 55.80 (1C, C-2 $^{\text{I}}$), 53.09 (1C, COOCH_3), 52.67 (1C, C-2 $^{\text{III}}$), 40.72 (2C, CH_2 -N et CH_2 AcCl), 20.63, 20.41, 20.38 (3C, OC(O)CH_3).

ES-SM : m/z 1527 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{62}\text{H}_{62}\text{Cl}_7\text{N}_3\text{O}_{26} + \text{H}_2\text{O}$: C, 48.63 ; H, 4.21 ; N 2.74 ; trouvée : C, 48.85 ; H, 4.06 ; N, 2.78.



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-chloroacétyl-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (228)

Un mélange d'accepteur **188a** (200 mg, 0.18 mmol), d'imidate **88** (241 mg, 0.27 mmol, 1.5eq) et de tamis moléculaire (4Å) dissous dans du CDCl_3 (2 mL) sous argon est agité 30 minutes à température ambiante. Une solution de TMSOTf dans le toluène (1M, 69 µL, 0.07 mmol, 0.25eq/imidate) est ensuite ajoutée et la solution est agitée à nouveau pendant 30 minutes puis est neutralisée avec de la Et_3N (29 µL, 0.21 mmol, 3eq/TMSOTf), filtrée sur célite et concentré. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH_2Cl_2 /acétone 12 : 1 avec 0.1% de Et_3N) donne le produit désiré (125 mg, 38%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +12$ (c 1.04, CHCl_3).

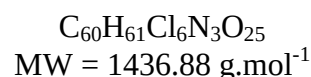
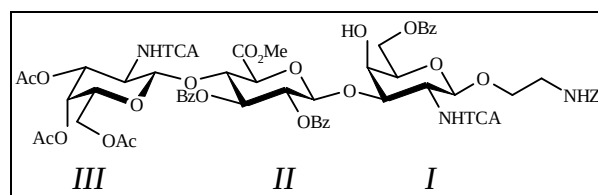
F 130-140°C (*i*-PrOH).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 8.12-7.31 (m, 20H, Ar), 6.82 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH^I), 6.81 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 9Hz, NH^{III}), 5.67 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3.5Hz, $\text{H}-4^I$), 5.54 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 9Hz, $J_{3,4}$ 9.5Hz, $\text{H}-3^{II}$), 5.29 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, $\text{H}-2^{II}$), 5.22 (dd, 1H, $J_{4,5}<1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, $\text{H}-4^{III}$), 5.18 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 9Hz, $J_{4,5}$ 9.5Hz, $\text{H}-4^{IV}$), 5.10 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 9Hz, $\text{H}-3^{IV}$), 5.10-5.07 (m, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 5.03 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.01 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, $\text{H}-1^I$), 4.95 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, $\text{H}-1^{III}$), 4.86 (d, 1H, $\text{H}-1^{II}$), 4.85 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, $\text{H}-2^{IV}$), 4.74 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, $\text{H}-3^I$), 4.60 (d, 1H, $\text{H}-1^{IV}$), 4.44 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 7Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, $\text{H}-6a^I$), 4.36 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, $\text{H}-6b^I$), 4.34 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9.5Hz, $\text{H}-4^{II}$), 4.26 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, $\text{H}-3^{III}$), 4.25 (ABq, 2H, CH_2 AcCl), 4.06 (d, 1H, $\text{H}-5^{II}$), 4.07-4.04 (m, 1H, $\text{H}-5^I$), 3.93 (d, 1H, $\text{H}-5^{IV}$), 3.86-3.80 (m, 1H, $\text{O}-\text{CH}_2$), 3.73, 3.68 (2s, 6H, COOCH_3), 3.70-3.59 (m, 3H, $\text{H}-2^{III}$, $\text{H}-5^{III}$ et $\text{O}-\text{CH}_2$), 3.51-3.44 (m, 1H, $\text{H}-2^I$), 3.43 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz $\text{H}-6a^{III}$), 3.39-3.26 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.23 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 6Hz, $\text{H}-6b^{III}$), 2.06, 2.03, 1.98, 1.97, 1.83, 1.74 (5s, 15H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 170.26, 169.97, 169.43, 169.23, 169.18, 168.00, 166.67, 166.62, 165.97, 165.29, 164.98, 162.33, 161.49 (13C, $\text{C}-6^{II}$, $\text{C}-6^{IV}$ et $\text{C}=\text{O}$), 156.21 (1C, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$), 136.27, 133.46, 133.38, 133.32, 129.82, 129.77, 129.66, 129.56, 129.35, 129.33, 128.71, 128.51, 128.44, 128.18, 128.09, 128.07 (24C, Ar), 101.01 (1C, $\text{C}-1^{III}$), 99.69 (1C, $\text{C}-1^{IV}$), 98.53 (1C, $\text{C}-1^I$), 98.30 (1C, $\text{C}-1^{II}$), 92.50, 91.69 (2C, CCl_3), 74.78, 73.78, 73.66, 72.27, 71.92, 71.85, 71.32, 71.15, 71.03, 70.99, 70.75, 69.10, 67.94 (14C, $\text{C}-3^I$, $\text{C}-4^I$, $\text{C}-5^I$, $\text{C}-2^{II}$, $\text{C}-3^{II}$, $\text{C}-4^{II}$, $\text{C}-5^{II}$, $\text{C}-3^{III}$, $\text{C}-4^{III}$, $\text{C}-5^{III}$, $\text{C}-2^{IV}$, $\text{C}-3^{IV}$, $\text{C}-4^{IV}$ et $\text{C}-5^{IV}$), 69.35 (1C, $\text{O}-\text{CH}_2$), 66.69 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.06, 61.08 (2C, $\text{C}-6^I$ et $\text{C}-6^{III}$), 55.78, 54.89 (2C, $\text{C}-2^I$ et $\text{C}-2^{III}$), 53.11, 52.77 (2C, COOCH_3), 40.69 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}$ et CH_2 AcCl), 20.72, 20.70, 20.48, 20.40, 20.22 (5C, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$).

ES-SM : m/z 1801 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ pour ^{35}Cl .

Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{73}\text{H}_{76}\text{Cl}_7\text{N}_3\text{O}_{34} + \text{H}_2\text{O}$: C, 48.56 ; H, 4.35 ; N 2.33 ; trouvée : C, 48.35 ; H, 4.23 ; N, 2.33.



2-Benzylloxycarbonylaminoéthyl O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (229)

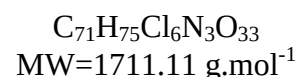
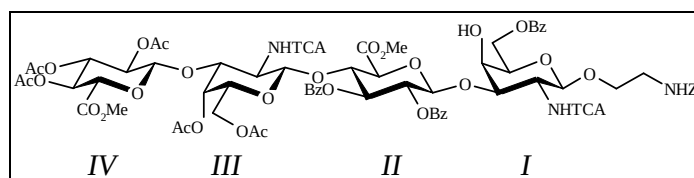
Un mélange de trisaccharide **227** (196 mg, 0.13 mmol) et de thiourée (20 mg, 0.26 mmol, 2eq) dissous dans la pyridine (1.3 mL) et l'EtOH (1.3 mL) est agité 3h30 à 80°C. Après refroidissement, la solution est concentrée, puis diluée dans le CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution de NaCl saturée et enfin à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (124 mg, 67%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +12$ (c 1.02, CHCl₃).

F 135-140°C (i-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.05-7.23 (m, 20H, Ar), 7.03 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 6.93 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 8.5Hz, NH^{III}), 5.63 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 8Hz, $J_{2,3}$ 9Hz, H-3^{II}), 5.43 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-2^{II}), 5.27-5.19 (m, 1H, NHC(O)O), 5.16-5.08 (m, 2H, H-3^{III} et H-4^{III}), 5.02 (d, 1H, H-1^{II}), 4.99 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.95 (d, 2H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^I et H-1^{III}), 4.64 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5Hz, $J_{6a,6b}$ 11.5Hz, H-6a^I), 4.55 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.52 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 3Hz, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.38 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9Hz, H-4^{II}), 5.59 (ddd, 1H, $J_{\text{OH},4} = J_{4,5} < 1\text{Hz}$, H-4^I), 4.21 (d, 1H, H-5^{II}), 4.01 (ddd, 1H, H-2^{III}), 3.93-3.89 (m, 1H, H-5^I), 3.88-3.80 (m, 1H, O-CH₂), 3.70 (s, 3H, COOCH₃), 3.72-3.54 (m, 4H, H-2^I, H-5^{III} et O-CH₂), 3.37-3.23 (m, 4H, H-6a^{III}, H-6b^{III} et CH₂-N), 3.22 (d, 1H, OH), 1.96, 1.94, 1.93 (3s, 9H, OC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 170.21, 170.04, 169.89, 168.66, 166.29, 165.16, 165.07, 162.34, 161.78 (9C, C-6^{II} et C=O), 156.31 (1C, NHC(O)O), 136.39, 133.54, 133.35, 133.31, 129.95, 129.63, 129.56, 129.38, 128.58, 128.48, 128.44, 128.39, 128.29, 127.97 (24C, Ar), 101.12 (1C, C-1^{II}), 100.12, 98.74 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 92.39, 91.79 (2C, CCl₃), 74.04 (1C, C-3^I), 75.82 (1C, C-4^{II}), 73.43 (1C, C-5^{II}), 72.31 (1C, C-3^{II}), 72.11 (1C, C-5^I), 71.24 (1C, C-2^{II}), 70.69 (1C, C-5^{III}), 69.88 (1C, C-3^{III}), 69.15 (1C, O-CH₂), 67.63 (1C, C-4^I), 66.57 (1C, CH₂-Ph), 66.03 (1C, C-4^{III}), 63.48 (1C, C-6^I), 60.16 (1C, C-6^{III}), 54.76 (1C, C-2^I), 53.31 (1C, COOCH₃), 52.72 (1C, C-2^{III}), 40.78 (1C, CH₂-N), 20.55, 20.42, 20.39 (3C, OC(O)CH₃).



2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-2-désoxy-2-trichloroacétamido-β-D-galactopyranoside (230)

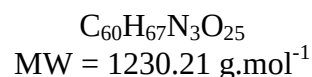
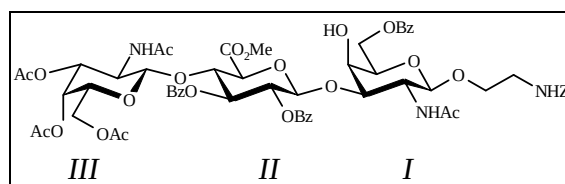
Un mélange de tétrasaccharide **228** (210 mg, 0.12 mmol) et de thiourée (18 mg, 0.24 mmol, 2eq) dissous dans la pyridine (1.4 mL) et l'EtOH (1.4 mL) est agité 3h30 à 80°C. Après refroidissement, la solution est concentrée, puis diluée dans le CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution de NaCl saturée et enfin à l'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, évaporée puis coévaporée au toluène (3 fois). Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 :1) donne le produit désiré (164 mg, 82%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +16$ (c 1.10, CHCl₃).

F 143-146°C (i-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.16-7.21 (m, 20H, Ar), 7.13 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7Hz, NH^I), 7.07 (d, 1H, $J_{\text{NH},2}$ 7.5Hz, NH^{III}), 5.61 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 5.42 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-2^{II}), 5.30-5.28 (m, 1H, NHC(O)O), 5.22 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.15 (dd, 1H, $J_{3,4}$ 7.5Hz, $J_{4,5}$ 9Hz, H-4^{IV}), 5.11 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 9Hz, H-3^{IV}), 5.03 (d, 1H, H-1^{II}), 5.00 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.99 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{III}), 4.92 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 4.87 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-2^{IV}), 4.64 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 5.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a^I), 4.63 (d, 1H, H-1^{IV}), 4.53 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^I), 4.50 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.38 (dd, 1H, $J_{4,5}$ 9Hz, H-4^{II}), 4.35 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.26 (ddd, 1H, $J_{\text{OH},4} = J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3.5Hz, H-4^I), 4.20 (d, 1H, H-5^{II}), 3.95 (d, 1H, H-5^{IV}), 3.95-3.87 (m, 1H, H-5^I), 3.86-3.80 (m, 1H, O-CH₂), 3.71, 3.69 (2s, 6H, COOCH₃), 3.72-3.60 (m, 3H, H-2^I, H-2^{III}, H-5^{III} et O-CH₂), 3.44 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 6.5Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6a^{III}), 3.39-3.31 (m, 2H, CH₂-N), 3.44 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 7Hz, H-6b^{III}), 3.21 (d, 1H, OH), 2.02, 2.01, 1.98, 1.97, 1.83 (5s, 15H, OCOCH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 170.29, 169.97, 169.47, 169.25, 169.20, 168.36, 166.73, 166.34, 165.26, 165.14, 162.41, 161.62 (12C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.32 (1C, NHC(O)O), 136.36, 133.52, 133.38, 133.29, 129.92, 129.57, 129.22, 128.58, 128.47, 128.42, 128.38, 128.23, 127.95 (24C, Ar), 101.13, 99.64, 98.85, 98.40 (4C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III} et C-1^{IV}), 77.95, 74.68, 73.73, 73.43, 72.25, 72.05, 71.92, 71.27, 71.08, 70.75, 69.11, 67.87, 67.63 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.05 (1C, O-CH₂), 66.55 (1C, CH₂-Ph), 63.41, 61.10 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 54.93, 54.61 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 53.27, 52.78 (2C, COOCH₃), 40.68 (1C, CH₂-N), 20.69, 20.62, 20.47, 20.38, 20.22 (5C, OC(O)CH₃).



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-6-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (231)

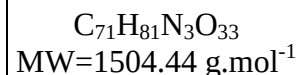
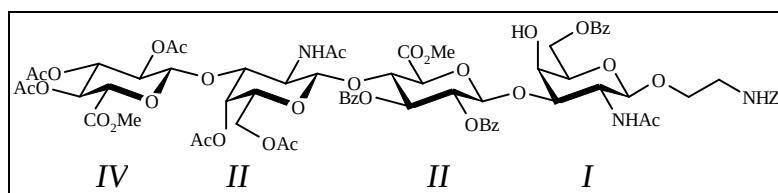
A une solution de trisaccharide **229** (112 mg, 780 μmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (1.2 mL) et le benzène (4 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (252 μL, 936 μmol, 10.5eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 2 heures, de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (126 μL, 470 μmol, 6eq) sont ajoutés (2 fois). La solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL), avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (48 mg, 50%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +17$ (c 0.99, CHCl₃).

F 146-149°C (AcOEt/EP).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.05-7.23 (m, 20H, Ar), 5.74 (d, 1H, *J*_{NH,2} 8.5Hz, NH^{III}), 5.66 (d, 1H, *J*_{NH,2} 8.5Hz, NH^I), 5.64 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9Hz, H-3^{II}), 5.42 (dd, 1H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-2^{II}), 5.38-5.31 (m, 1H, NHC(O)O), 5.09 (dd, 1H, *J*_{3,4} 3Hz, *J*_{2,3} 11Hz, H-3^{III}), 5.11-5.09 (m, 1H, H-4^{III}), 5.01 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.00 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^I), 4.94 (d, 1H, H-1^{II}), 4.76 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{III}), 4.62 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 5Hz, *J*_{6a,6b} 11.5Hz, H-6a^I), 4.52 (dd, 1H, *J*_{5,6b} 7Hz, H-6b^I), 4.55-4.50 (m, 1H, H-3^I), 4.38 (dd, 1H, *J*_{4,5} 9Hz, H-4^{II}), 4.23 (d, 1H, H-5^{II}), 4.19-4.17 (m, 1H, H-4^I), 3.93-3.75 (m, 3H, H-5^I, H-2^{III} et O-CH₂), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 3.69-3.59 (m, 1H, O-CH₂), 3.58-3.54 (m, 1H, H-5^{III}), 3.42-3.25 (m, 5H, H-2^I, H-6a^{III}, H-6b^{III}, OH et CH₂-N), 1.95, 1.93, 1.92, 1.89 (4s, 12H, OC(O)CH₃ et NHC(O)CH₃), 1.28 (s, 3H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.24, 170.38, 170.30, 170.03, 169.96, 168.37, 166.28, 165.02, 164.96 (9C, C-6^{II} et C=O), 156.37 (1C, NHC(O)O), 136.53, 133.68, 133.40, 133.19, 129.77, 129.68, 129.62, 129.59, 129.30, 128.73, 128.62, 128.44, 128.41, 127.97 (24C, Ar), 101.63 (1C, C-1^{II}), 100.74 (1C, C-1^{III}), 99.22 (1C, C-1^I), 79.01 (1C, C-3^I), 76.18 (1C, C-4^{II}), 73.76 (1C, C-5^{II}), 72.57 (1C, C-3^{II}), 71.96 (1C, C-5^I), 71.40 (1C, C-2^{II}), 70.49 (1C, C-5^{III}), 70.10 (1C, C-3^{III}), 68.98 (1C, O-CH₂), 67.75 (1C, C-4^I), 66.51 (1C, CH₂-Ph), 66.03 (1C, C-4^{III}), 63.64 (1C, C-6^I), 60.25 (1C, C-6^{III}), 54.06 (1C, C-2^I), 53.21 (1C, COOCH₃), 51.31 (1C, C-2^{III}), 40.83 (1C, CH₂-N), 23.32, 22.67 (2C, NHC(O)CH₃), 20.55, 20.49 (3C, OC(O)CH₃).



2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acétamido-6-O-benzoyl-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (232)

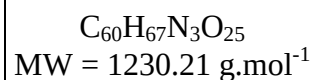
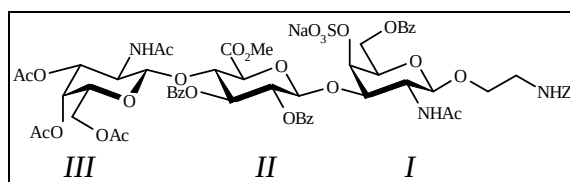
A une solution de trisaccharide **230** (150 mg, 0.09 mmol) dissous dans la *N,N*-diméthylacétamide (1.5 mL) et le benzène (5 mL) sous argon, sont ajoutés successivement de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (254 µL, 0.94 mmol, 10.5eq). La solution est dégazée 1 heure à température ambiante, est ensuite chauffée à 80°C, et toutes les 2 heures, de l'AIBN et du *n*-Bu₃SnH (145 µL, 0.54 mmol, 6eq) sont ajoutés (2 fois). La solution est concentrée puis le produit est précipité à 0°C dans un mélange d'éther de pétrole (2 mL) et d'Et₂O (2 mL), avant d'être filtré pour donner une poudre jaune pâle. Une purification par chromatographie flash sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 19 : 1) donne le produit désiré (83 mg, 63%) sous la forme d'une poudre blanche.

$[\alpha]_D^{20} +22$ (c 1.03, CHCl₃).

F 158-161°C (i-PrOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ(ppm) 8.09-7.21 (m, 20H, Ar), 5.90 (d, 1H, *J*_{NH,2} 7Hz, NH^{III}), 5.63 (d, 1H, *J*_{NH,2} 6.5Hz, NH^I), 5.58 (dd, 1H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} 9Hz, H-3^{II}), 5.41 (dd, 1H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-2^{II}), 5.32-5.28 (m, 1H, NHC(O)O), 5.16-5.09 (m, 3H, H-4^{III}, H-3^{IV} et H-4^{IV}), 4.99 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.96 (d, 1H, *J*_{1,2} 8.5Hz, H-1^I), 4.92 (d, 1H, H-1^{II}), 4.87 (d, 1H, *J*_{1,2} 8Hz, H-1^{III}), 4.89-4.85 (m, 1H, H-2^{IV}), 4.60 (d, 1H, *J*_{1,2} 7.5Hz, H-1^{IV}), 4.60-4.55 (m, 1H, H-3^I et H-6a^I), 4.54-4.48 (m, 2H, H-6b^I et H-3^{III}), 4.35 (dd, 1H, *J*_{4,5} 9Hz, H-4^{II}), 4.18 (d, 1H, H-5^{II}), 4.16-4.12 (m, 1H, H-4^I), 3.94 (d, 1H, *J*_{4,5} 9.5Hz, H-5^{IV}), 3.89-3.85 (m, 1H, H-5^I), 3.78-3.72 (m, 1H, O-CH₂), 3.73, 3.71 (2s, 6H, COOCH₃), 3.63-3.55 (m, 2H, H-5^{III} et O-CH₂), 3.48 (dd, 1H, *J*_{5,6a} 7Hz, *J*_{6a,6b} 11.5Hz H-6a^{III}), 3.32-3.15 (m, 5H, H-2^I, H-2^{III}, H-6b^{III} et CH₂-N), 3.91 (d, 1H, *J*_{OH,4} < 1Hz, OH), 2.01, 2.00, 1.98, 1.97, 1.92 (5s, 15H, OC(O)CH₃), 1.77, 1.27 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ(ppm) 171.31, 171.01, 170.24, 169.98, 169.60, 169.30, 169.27, 127.80, 166.90, 166.29, 165.22, 164.87 (12C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 156.36 (1C, NHC(O)O), 136.51, 133.64, 133.40, 133.16, 129.77, 129.65, 129.60, 129.27, 128.80, 128.61, 128.41, 128.31, 127.96 (24C, Ar), 101.83, 99.35, 99.15, 98.60 (4C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III} et C-1^{IV}), 78.66, 75.23, 74.28, 73.92, 72.26, 72.16, 72.10, 71.91, 71.87, 71.31, 70.93, 68.98, 67.90, 67.45 (14C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.01 (1C, O-CH₂), 66.53 (1C, CH₂-Ph), 63.58, 61.28 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 54.38, 54.20 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 53.25, 52.75 (2C, COOCH₃), 40.85 (1C, CH₂-N), 23.48, 22.70 (2C, NHC(O)CH₃), 20.68, 20.52, 20.43, 20.32 (5C, OC(O)CH₃).



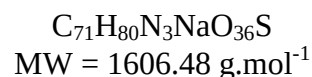
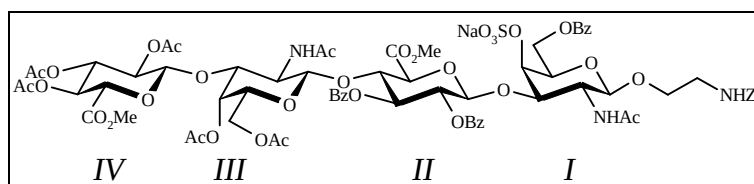
2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-6-O-benzoyl-2-désoxy-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (233)

A une solution de trisaccharide **231** (50 mg, 41 μmol) dans le DMF (0.5 mL) est ajouté du $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ (14 mg, 0.10 mmol, 2.5 eq). Le mélange réactionnel est agité à 65°C sous argon. Après 60h et 84h la réaction étant incomplète du $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ (27 mg, 0.20 mmol, 5eq) est ajouté et l'agitation est laissée à 65°C pendant 24h après le dernier ajout. L'excès de réactif est hydrolysé à température ambiante par du MeOH (1 mL). Une purification sur colonne Sephadex LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 : 1), et un échange d'ions sur résine Sephadex SP C25 [Na^+] ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 9 : 5 : 1) donne le produit désiré (38 mg, 70%) sous la forme d'un solide blanchâtre.

$[\alpha]_D^{20} +13$ (c 1.06, MeOH).

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ (ppm) 8.12-7.21 (m, 20H, Ar), 5.63 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 7Hz, H-3^{II}), 5.41 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 6.5Hz, H-2^{II}), 5.20-5.21 (m, 1H, H-4^I), 5.18 (d, 1H, H-1^{II}), 5.10 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 5.00 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.95 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^{III}), 4.95-4.89 (m, 1H, H-4^{II}), 4.86 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{III}), 4.72 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ 4.5Hz, $J_{6a,6b}$ 12Hz, H-6a^I), 4.63 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ 8Hz, H-6b^I), 4.52 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 4.31 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5^{II}), 4.12-3.98 (m, 3H, H-2^I, H-3^I et H-5^I), 3.93 (dd, 1H, H-2^{III}), 3.80 (s, 3H, COOCH_3), 3.80-3.72 (m, 1H, O- CH_2), 3.62-3.53 (m, 3H, H-5^{III}, H-6a^{III} et O- CH_2), 3.36-3.33 (m, 1H, H-6b^{III}), 3.26-3.21 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 1.95, 1.94, 1.89, 1.88 (4s, 12H, OC(O)CH_3 et NHC(O)CH_3), 1.52 (s, 3H, NHC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 173.95, 173.89, 171.95, 171.69, 170.30, 167.82, 166.96, 166.90 (9C, C-6^{II} et C=O), 158.71 (1C, NHC(O)O), 138.25, 134.75, 134.66, 134.27, 131.46, 131.05, 131.00, 130.86, 130.77, 130.51, 129.71, 129.64, 129.60, 129.54, 129.48, 128.99, 128.86 (24C, Ar), 102.72 (1C, C-1^I), 102.44 (1C, C-1^{III}), 102.25 (1C, C-1^{II}), 78.52 (1C, C-3^I), 77.06 (1C, C-3^{III}), 76.72 (1C, C-4^I), 75.49 (1C, C-3^{II}), 74.77 (1C, C-5^{II}), 74.24 (1C, C-2^{II}), 73.86 (1C, C-5^I), 72.24 (1C, C-4^{II}), 71.49 (1C, C-5^{III}), 69.56 (1C, O- CH_2), 67.47 (2C, C-4^{III} et $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 65.62 (1C, C-6^I), 61.69 (1C, C-6^{III}), 53.62 (1C, COOCH_3), 52.89 (1C, C-2^I), 51.74 (1C, C-2^{III}), 41.82 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 23.32, 22.81 (2C, NHC(O)CH_3), 20.56, 20.49 (3C, OC(O)CH_3).



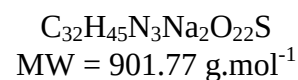
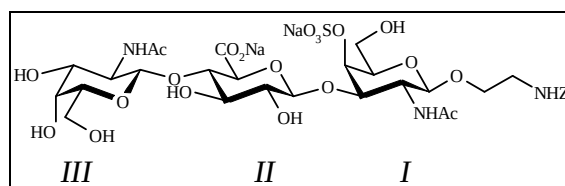
Sodium 2-Benzoyloxycarbonylaminoéthyl O-(méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acétamido-4,6-di-O-acétyl-2-désoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(méthyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-sulfonato- β -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-sodium 2-acétamido-6-O-benzoyl-2-désoxy- β -D-galactopyranoside (234)

A une solution de tétrasaccharide **232** (75 mg, 50 μmol) dans le DMF (1 mL) est ajouté du $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ (35 mg, 0.25 mmol, 5 eq). Le mélange réactionnel est agité à 65°C sous argon. Après 60h et 84h la réaction étant incomplète du $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ (35 mg, 0.25 mmol, 5eq) est ajouté et l'agitation est laissée à 65°C pendant 24h après le dernier ajout. L'excès de réactif est hydrolysé à température ambiante par du MeOH (1 mL). Une purification sur colonne Sephadex LH-20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 : 1), et un échange d'ions sur résine Sephadex SP C25 [Na^+] ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 9 : 5 : 1) donne le produit désiré (67 mg, 84%) sous la forme d'un solide blanchâtre.

$[\alpha]_D^{20} +23$ (c 1.00, MeOH).

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ (ppm) 8.09-7.21 (m, 20H, Ar), 5.61 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 7Hz, $J_{3,4}$ 9Hz, H-3^{II}), 5.58 (dd, 1H, $J_{1,2}$ 7Hz, H-2^{II}), 5.33 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4}$ 8Hz, H-3^{IV}), 5.24 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 1.5Hz, H-4^I), 5.18 (d, 1H, H-1^{II}), 5.16-5.18 (m, 1H, H-4^{III}), 5.03 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-4^{IV}), 5.01 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.03-4.95 (m, 1H, H-4^{II}), 4.86-4.75 (m, 4H, H-6a^I, H-1^{III}, H-1^{IV} et H-2^{IV}), 4.65 (dd, 1H $J_{5,6b}$ 8Hz, $J_{6a,6b}$ 11Hz, H-6b^I), 4.55 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 4.32 (d, 1H, $J_{4,5}$ 10Hz, H-5^{II}), 4.23 (d, 1H, H-5^{IV}), 4.15 (dd, 1H, $J_{2,3}$ 11Hz, H-3^I), 4.08-4.02 (m, 2H, H-2^I et H-5^I), 3.93-3.90 (m, 2H, H-2^{III} et H-3^{III}), 3.81, 3.66 (2s, 6H, COOCH_3), 3.81-3.63 (m, 1H, O- CH_2), 3.61-3.57 (m, 2H, H-6a^{III} et O- CH_2), 3.44-3.40 (m, 1H, H-5^{III}), 3.27-3.11 (m, 3H, H-6b^{III} et $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.04, 1.97, 1.96, 1.95, 1.92 (5s, 18H, OC(O)CH_3) et NHC(O)CH_3), 1.52 (s, 3H, NHC(O)CH_3).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ (ppm) 173.95, 173.60, 171.96, 171.90, 171.43, 171.16, 171.10, 170.67, 169.04, 167.82, 166.92, 166.76 (12C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 158.70 (1C, NHC(O)O), 138.27, 134.73, 134.61, 134.27, 131.47, 131.05, 130.98, 130.85, 130.77, 130.67, 130.53, 129.71, 129.64, 129.61, 129.54, 129.49, 129.21, 129.00, 128.86 (24C, Ar), 102.68, 102.51, 102.15, 101.42 (4C, C-1^I, C-1^{II}, C-1^{III} et C-1^{IV}), 76.68 (1C, C-4^I), 78.44, 77.82, 77.04, 75.75, 74.78, 74.27, 73.90, 73.44, 73.10, 72.37, 72.01, 71.00, 69.65 (14C, C-3^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-4^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.55 (1C, O- CH_2), 67.46 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 65.73, 62.49 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 53.78, 53.27 (2C, COOCH_3), 53.01 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 41.85 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 23.78, 22.81 (2C, NHC(O)CH_3), 20.91, 20.73, 20.53, 20.45, 20.22 (5C, OC(O)CH_3).



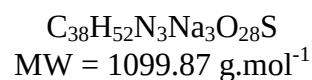
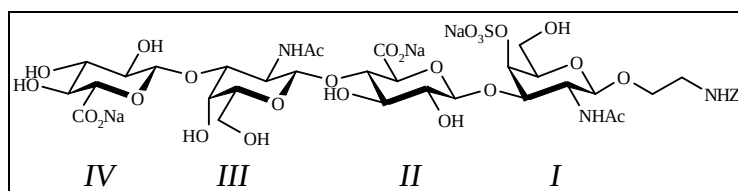
2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (235)

Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 139 µL, 139 µmol, 5eq) et de H₂O₂ (30%, 69 µL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de trisaccharide **233** (37 mg, 28 µmol) dissous dans du THF (1 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis une nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, du MeOH (0.75 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.21 mL, 30eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 24 heures à température ambiante puis évaporé. Le résidu obtenu est ensuite dissous dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton et concentrée. Le solide est alors lavé plusieurs fois avec de l'EtOH puis dissous dans l'eau. Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à un pH 8.5, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentrée. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (17.5 mg, 70 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 5 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20} -11$ (c 0.95, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.44 (s, 5H, Ar), 5.12 (s, 2H, CH₂-Ph), 4.72 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} < 1\text{Hz}$, H-4^I), 4.50 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^I), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{III}), 4.44 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^{II}), 4.05-3.99 (m, 2H, H-2^I et H-3^I), 3.92 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4}$ 3Hz, H-4^{III}), 3.92-3.65 (m, 12H, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-2^{III}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III} et H-6b^{III} et O-CH₂), 3.56 (d, 1H, $J_{2,3}$ 9Hz, $J_{3,4}$ 9.5Hz, H-3^{II}), 3.40 (dd, 1H, H-2^{II}), 3.34-3.29 (m, 2H, CH₂-N), 2.05, 1.95 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 62.5 MHz): δ(ppm) 176.46, 176.20, 175.94 (3C, C-6^{II} et C=O), 159.75 (1C, NHC(O)O), 137.84, 130.22, 129.83, 129.23 (6C, Ar), 104.98 (1C, C-1^{II}), 102.70, 102.63 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 81.41, 81.39 (2C, C-3^I et C-4^{II}), 77.81, 76.61, 76.48, 75.86, 74.94, 73.71, 72.50, 69.18 (8C, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III} et C-5^{III}), 70.17 (1C, O-CH₂), 68.35 (1C, CH₂-Ph), 62.39 (2C, C-6^I C-6^{III}), 52.89, 52.31 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 41.79 (1C, CH₂-N), 23.91, 23.58 (2C, NHC(O)CH₃).



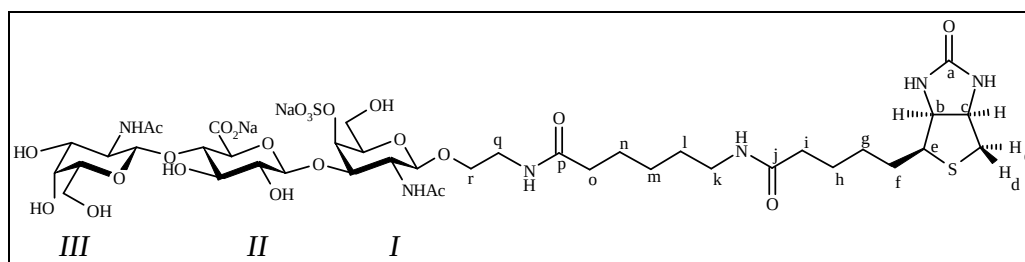
Sodium 2-Benzyloxycarbonylaminoéthyl O-(sodium β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium 4-O-sulfonato-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranoside (236)

Une solution de LiOOH préparée à 0°C à partir de LiOH (1M, 406 μL, 406 μmol, 10eq) et de H₂O₂ (30%, 203 μL) est ajoutée goutte à goutte à une solution refroidie à -10°C de tétrasaccharide **234** (65 mg, 40 μmol) dissous dans du THF (2 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure à -10°C puis une nuit à température ambiante. La solution est ensuite refroidie à 0°C, du MeOH (1.5 mL) et une solution de NaOH (4M, 0.40 mL, 40eq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité 8 heures à température ambiante puis évaporé. Le résidu obtenu est ensuite dissous dans l'eau distillée (10 mL) et neutralisé avec de la résine amberlite IR-120[H⁺] jusqu'à pH 3.5 (contrôle pHmétrique). La solution est ensuite filtrée sur coton et concentrée. Le solide est alors lavé plusieurs fois avec de l'EtOH puis dissous dans l'eau. Une solution de NaOH à 0.1M est ajoutée jusqu'à un pH 8.5, puis le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante et enfin est concentrée. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau conduit au produit désiré (22 mg, 50 %) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -15.5 (c 1.00, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 7.42 (s, 5H, Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.74 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 1.5\text{Hz}$, H-4^I), 4.53, 4.50 (2d, 2H, $J_{1,2} 8.5\text{Hz}$, H-1^I et H-1^{III}), 4.50 (d, 1H, $J_{1,2} 8\text{Hz}$, H-1^{IV}), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2} 7.5\text{Hz}$, H-1^{II}), 4.18 (m, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 3\text{Hz}$, H-4^{III}), 4.05 (m, 3H, H-2^I, H-3^I et H-2^{III}), 3.96-3.89 (m, 1H, O-CH₂), 3.84-3.66 (m, 11H, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III}, H-5^{IV} et O-CH₂), 3.58 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} 9\text{Hz}$, H-3^{II}), 3.51-3.47 (m, 2H, H-3^{IV} et H-4^{IV}), 3.40 (dd, 1H, $J_{1,2} 7\text{Hz}$, H-2^{II}), 3.35-3.30 (m, 3H, H-2^{IV} et CH₂-N), 2.04, 1.97 (2s, 6H, NHC(O)CH₃).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 176.58, 175.61, 175.42, 175.10 (4C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 158.95 (1C, NHC(O)O), 137.07, 129.45, 129.06, 128.46 (6C, Ar), 104.78, 104.18 (2C, C-1^{III} et C-1^{IV}), 101.94, 101.67 (4C, C-1^I et C-1^{III}), 81.01, 80.74 (3C, C-3^I, C-4^{II} et C-3^{III}), 77.35, 77.01, 76.74, 75.96, 75.61, 75.09, 74.20, 73.39, 72.86, 72.50, 68.39 (11C, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-4^{III}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 69.38 (1C, O-CH₂), 67.55 (1C, CH₂-Ph), 61.73, 61.68 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 52.33, 51.67 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 41.03 (1C, CH₂-N), 23.19, 22.82 (2C, NHC(O)CH₃).



$C_{40}H_{64}N_6Na_2O_{23}S_2$
MW = 1107.09 g.mol⁻¹

2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(2-acétamido-2-désoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (237)

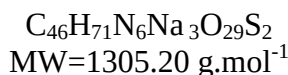
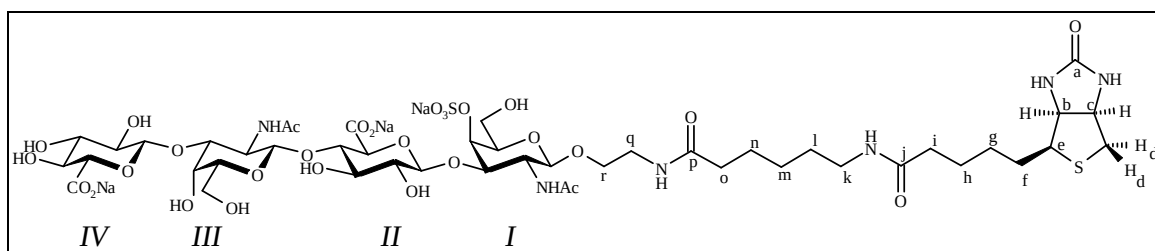
Le trisaccharide **235** (10 mg, 15 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut (10 mg, 84%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

Un mélange de l'amine brute obtenue précédemment et de réactif biotinyllé (25 mg, 55 μmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (14 mg, 56% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 4 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -11 (c 0.95, H₂O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.75 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 1.5\text{Hz}$, H-4^I), 4.63 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'}$ 5Hz, $J_{b,c}$ 8Hz, H-c), 4.55 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8Hz, H-1^{II}), 4.49 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8.5Hz, H-1^{III}), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7.5Hz, H-1^I), 4.44 (dd, 1H, $J_{b,e}$ 5Hz, H-b), 4.05-4.03 (m, 2H, H-2^I et H-3^I), 3.96-3.66 (m, 13H, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-4^{III}, H-2^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III} et CH₂-r), 3.58 (dd, 1H, $J_{3,4} = J_{2,3}$ 9Hz, H-3^{II}), 3.44-3.33 (m, 4H, H-2^{II}, H-e et CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l}$ 7Hz, CH₂-k), 3.02 (dd, 1H, $J_{d,d'}$ 13Hz, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.30- 2.24 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.06, 2.03 (2s, 6H, NHC(O)CH₃), 1.76-1.30 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.63, 177.28, 175.68, 175.33, 175.15 (5C, C-6^{II} et C=O), 166.02 (1C, C-a), 104.22 (1C, C-1^I), 101.87, 101.79 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 80.64, (1C, C-4^{II}), 77.34, 77.07, 75.84, 75.80, 75.12, 74.19, 72.88, 71.74, 68.42 (8C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-3^{III}, C-4^{III} et C-5^{III}), 68.90 (1C, C-r), 62.76 (1C, C-b), 61.67, 61.63 (2C, C-6^I et C-6^{III}), 60.92 (1C, C-c), 56.06 (1C, C-e), 52.94, 52.34 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 40.37 (1C, C-d), 39.91, 39.74 (2C, C-k et C-q), 36.30, 36.18 (2C, C-i et C-o), 28.67, 28.50, 28.34, 26.22, 25.88, 25.66 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.15, 22.94 (2C, NHC(O)CH₃).



2-(6-Biotinylamidohexanoyl)aminoéthyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium 2-acétamido-2-désoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside (238)

Le tétrasaccharide **236** (19 mg, 17 μmol) est dissous dans l'eau distillée (2 mL) et une quantité catalytique de Pd/C (10%) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ (ballon) toute la nuit à température ambiante, puis est filtré sur célite et concentré pour donner le composé aminé brut (14 mg, 84%) (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 1 : 1 : 1).

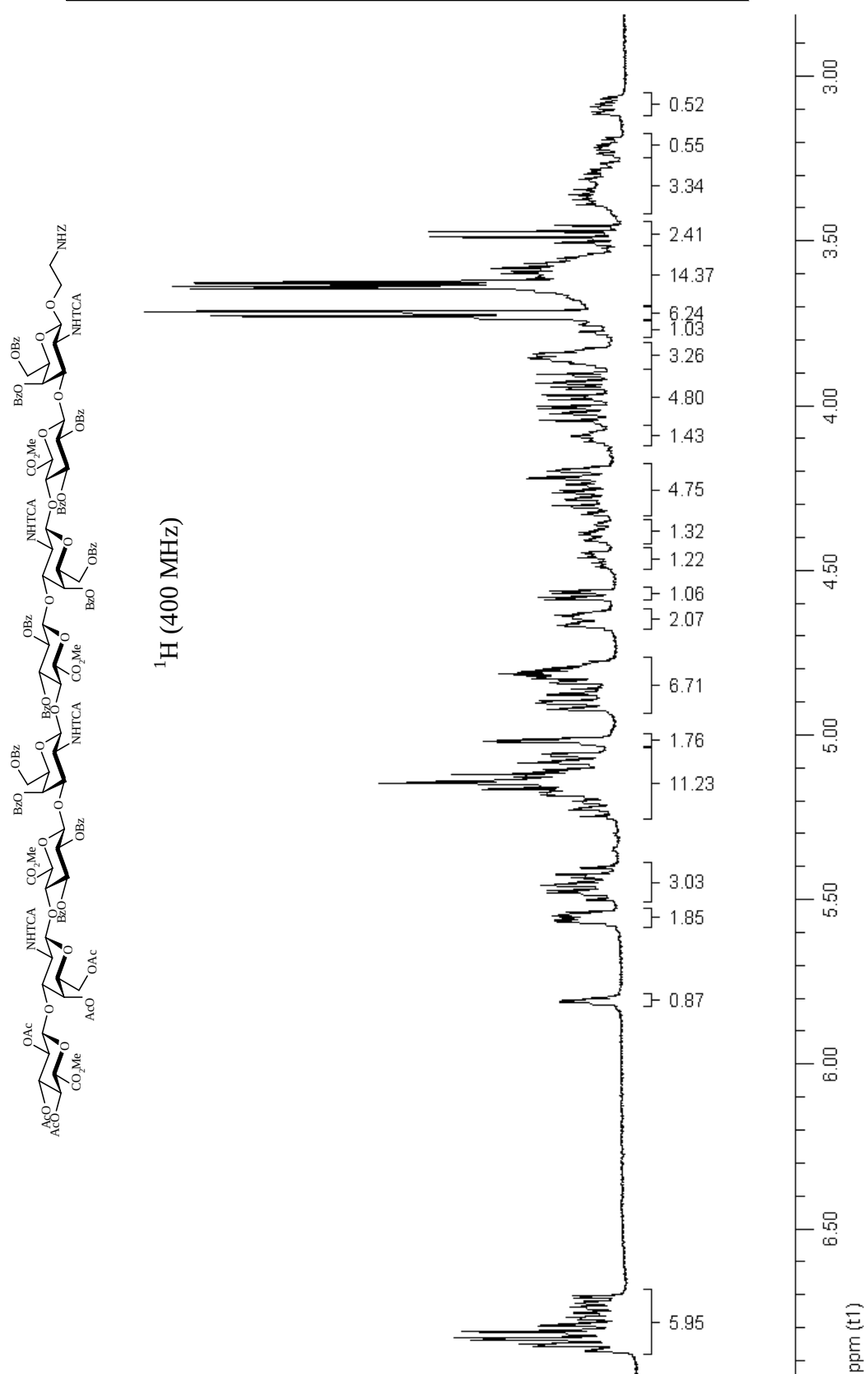
Un mélange de l'amine brute obtenue précédemment et de réactif biotinyllé (20 mg, 44 μmol, 4eq) est dissous dans un mélange de DMF (675 μL), de Et₃N (75 μL) et d'eau distillée (750 μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 heure, puis concentré. Le solide est lavé plusieurs fois avec de l'EtOH. Une purification sur colonne Sephadex LH-20 dans l'eau donne le produit désiré (10 mg, 44% sur les 2 étapes) sous la forme d'une poudre blanche (éluant CCM : AcOEt/MeOH/H₂O 3 : 2 : 1).

$[\alpha]_D^{20}$ -8.5 (c 0.70, H₂O).

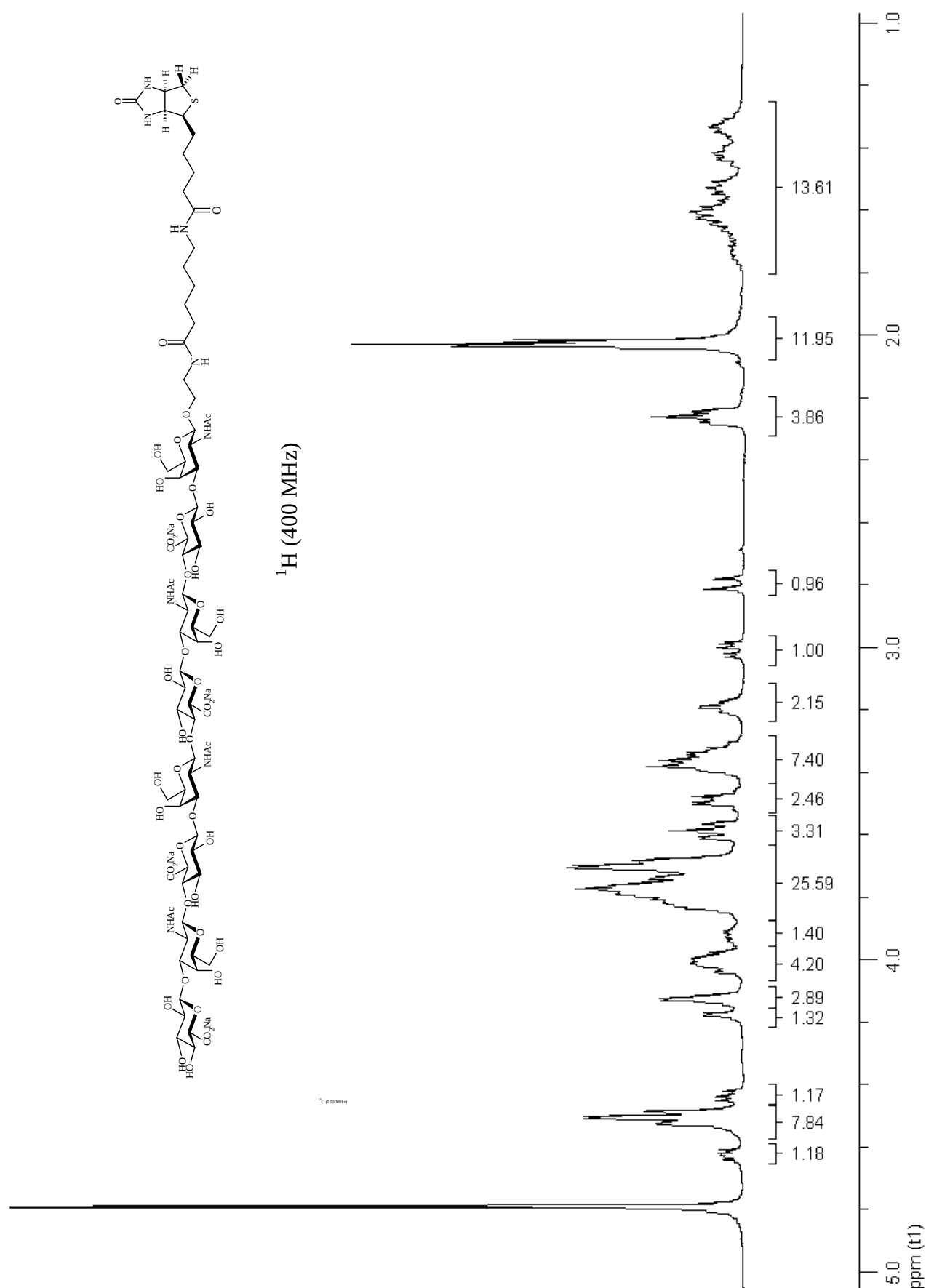
RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ(ppm) 4.78 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 1.5\text{Hz}$, H-4^I), 4.63 (ddd, 1H, $J_{c,d} < 1\text{Hz}$, $J_{c,d'} 5\text{Hz}$, $J_{b,c} 8\text{Hz}$, H-c), 4.53, 4.51 (2d, 2H, $J_{1,2} 8.5\text{Hz}$, H-1^I et H-1^{III}), 4.50 (d, 1H, $J_{1,2} 8\text{Hz}$, H-1^{IV}), 4.49 (d, 1H, $J_{1,2} 7.5\text{Hz}$, H-1^{II}), 4.44 (dd, 1H, $J_{b,e} 5\text{Hz}$, H-b), 4.18 (dd, 1H, $J_{4,5} < 1\text{Hz}$, $J_{3,4} 3\text{Hz}$, H-4^{III}), 4.06-3.99 (m, 3H, H-2^I, H-3^I et H-2^{III}), 3.97-3.90 (m, 1H, CH₂-r), 3.85-3.65 (m, 10H, H-5^I, H-6a^I, H-6b^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-3^{III}, H-5^{III}, H-6a^{III}, H-6b^{III} et CH₂-r), 3.68 (d, 1H, $J_{4,5} 9.5\text{Hz}$, H-5^{IV}), 3.60 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} 9\text{Hz}$, H-3^{II}), 3.51-3.46 (m, 2H, H-3^{IV} et H-4^{IV}), 3.41 (d, 1H, $J_{2,3} 9.5\text{Hz}$, H-2^{II}), 3.41-3.30 (m, 4H, H-2^{IV}, H-e et CH₂-q), 3.19 (dd, 2H, $J_{k,k'} = J_{k,l} 7\text{Hz}$, CH₂-k), 3.01 (dd, 1H, $J_{d,d'} 13\text{Hz}$, H-d'), 2.80 (dd, 1H, H-d), 2.29- 2.23 (m, 4H, CH₂-i et CH₂-o), 2.04, 2.03 (2s, 6H, NHC(O)CH₃), 1.81-1.32 (m, 12H, CH₂-f, CH₂-g, CH₂-h, CH₂-l, CH₂-m et CH₂-n).

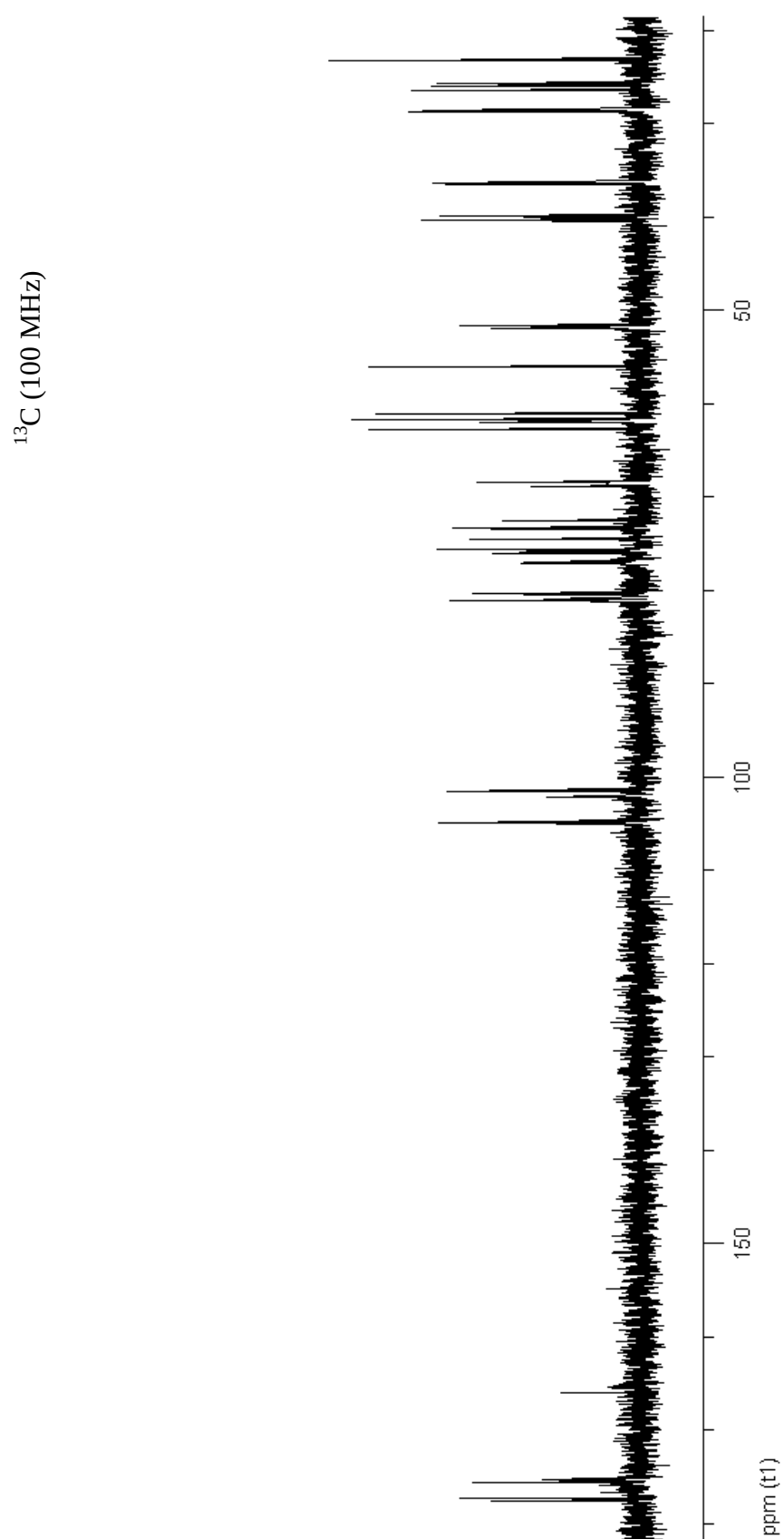
RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz): δ(ppm) 177.62, 177.30 (6C, C-6^{II}, C-6^{IV} et C=O), 165.97 (1C, C-a), 104.80, 104.18 (2C, C-1^{II} et C-1^{IV}), 101.80, 101.70 (2C, C-1^I et C-1^{III}), 81.05, 80.81 (2C, C-4^{II} et C-3^{III}), 77.37, 77.05, 76.77, 75.96, 75.73, 75.61, 75.13, 74.23, 73.39, 72.87, 72.47 (11C, C-3^I, C-4^I, C-5^I, C-2^{II}, C-3^{II}, C-5^{II}, C-5^{III}, C-2^{IV}, C-3^{IV}, C-4^{IV} et C-5^{IV}), 68.92 (C-r), 68.30 (1C, C-4^{III}), 62.76 (1C, C-b), 61.69 (1C, C-6^I et C-6^{III}), 60.92 (1C, C-c), 56.05 (1C, C-e), 52.34, 51.67 (2C, C-2^I et C-2^{III}), 40.37 (1C, C-d), 39.91, 39.74 (2C, C-k et C-q), 36.30, 36.19 (2C, C-i et C-o), 28.67, 28.49, 28.34, 26.22, 25.87, 25.66 (6C, C-f, C-g, C-h, C-l, C-m et C-n), 23.19, 22.95 (2C, NHC(O)CH₃).

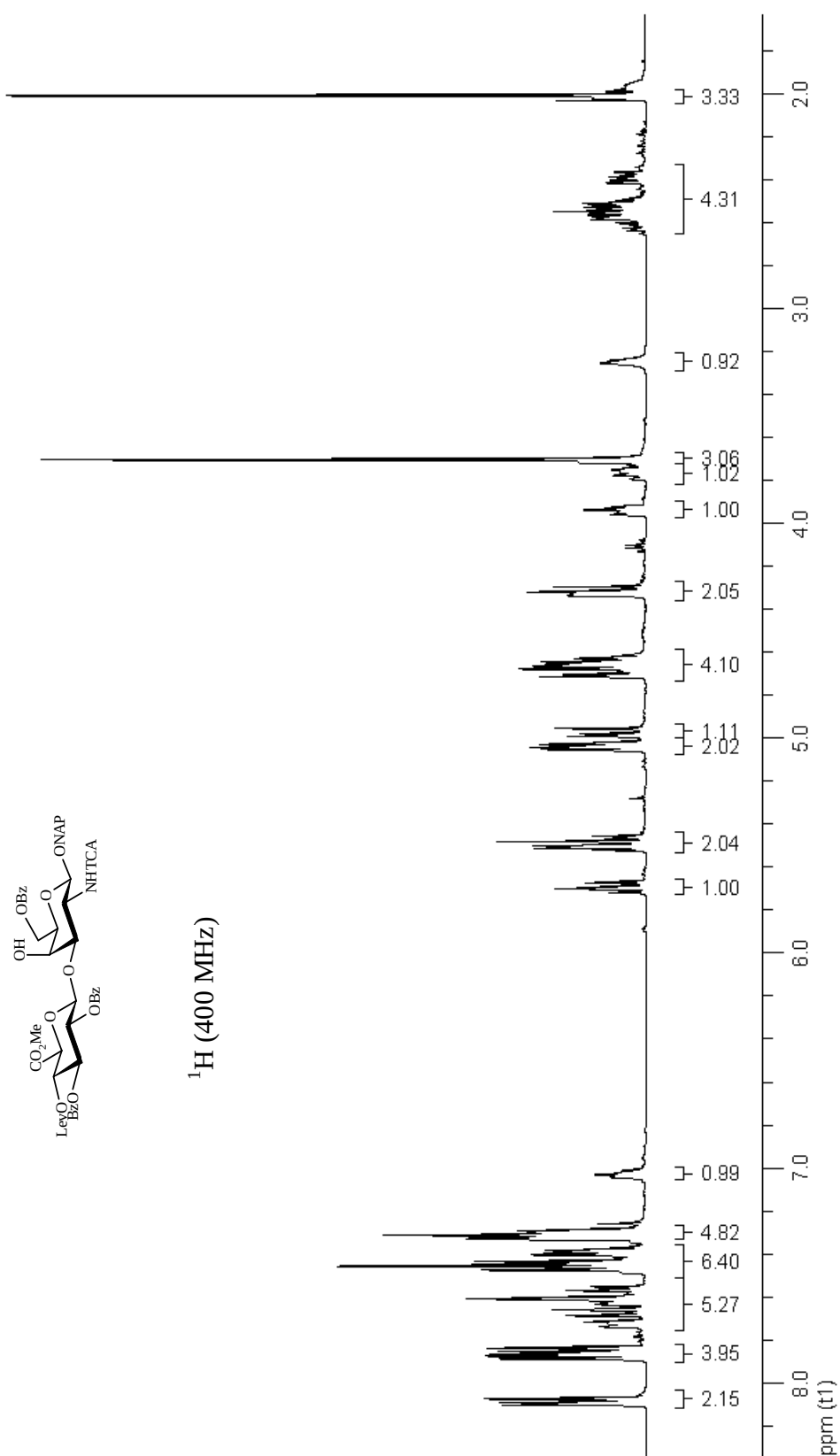
IX- ANNEXES



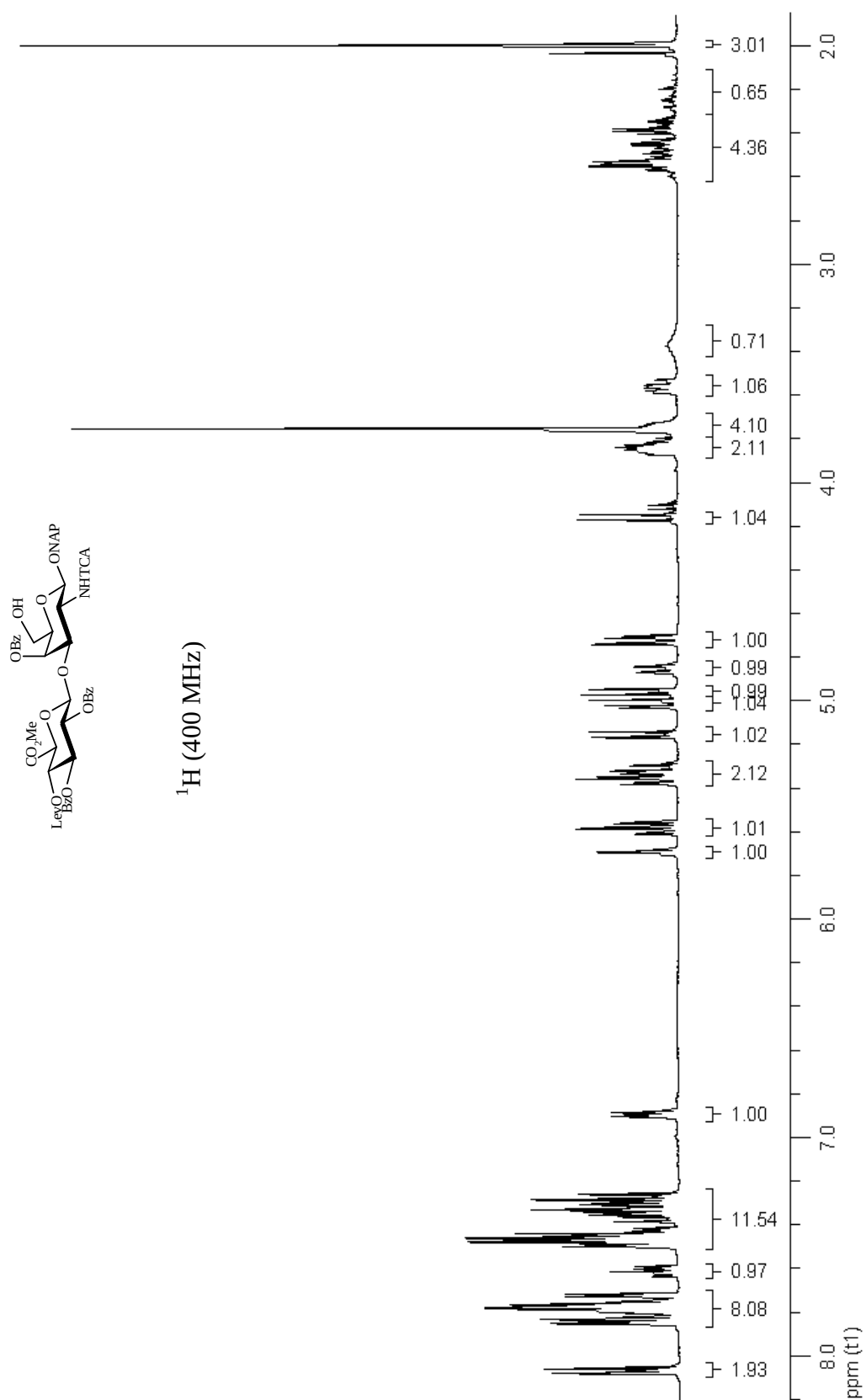
Annexe 2 : RMN ^1H et ^{13}C de l'octasaccharide biotinylé 172



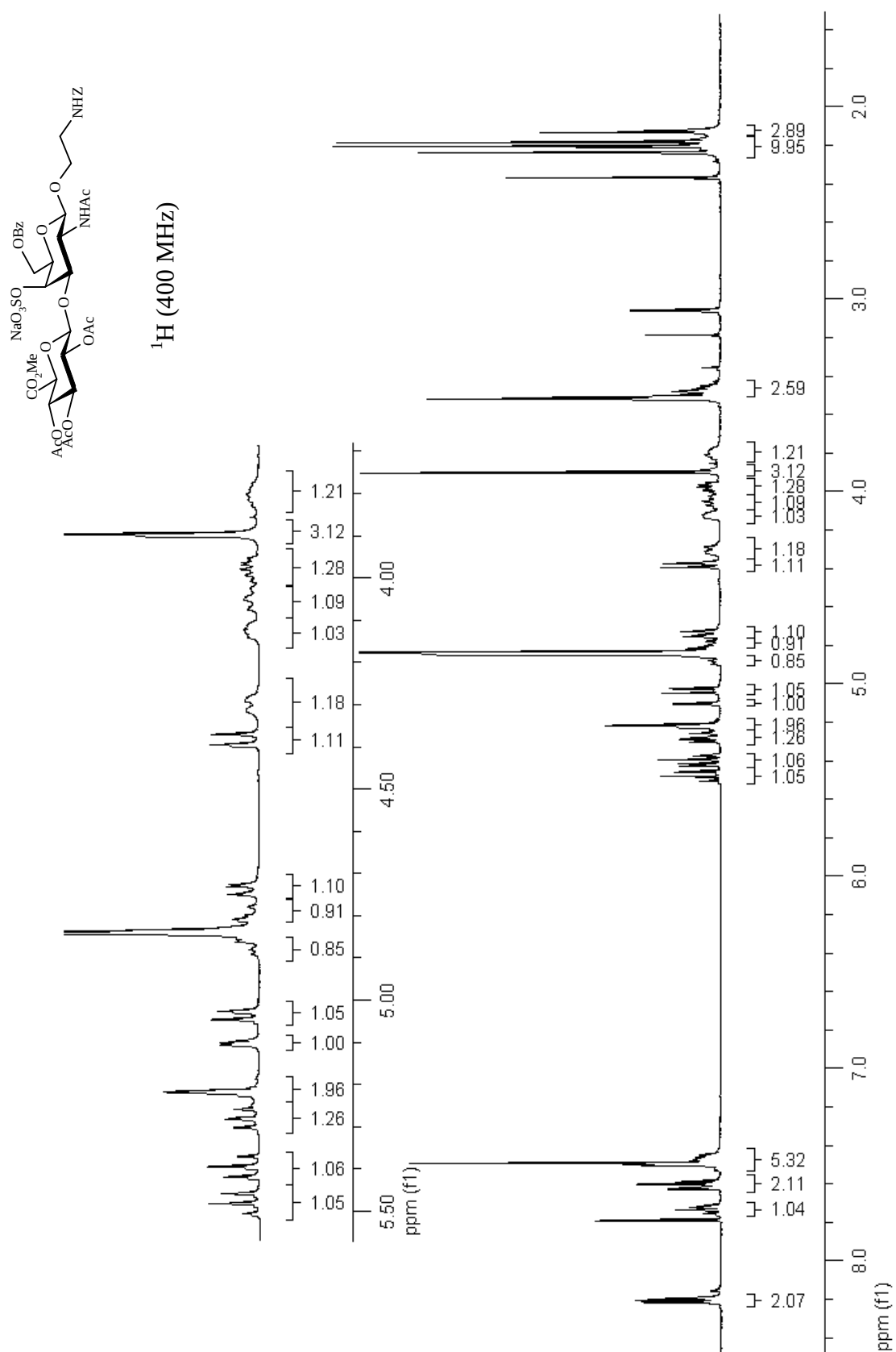


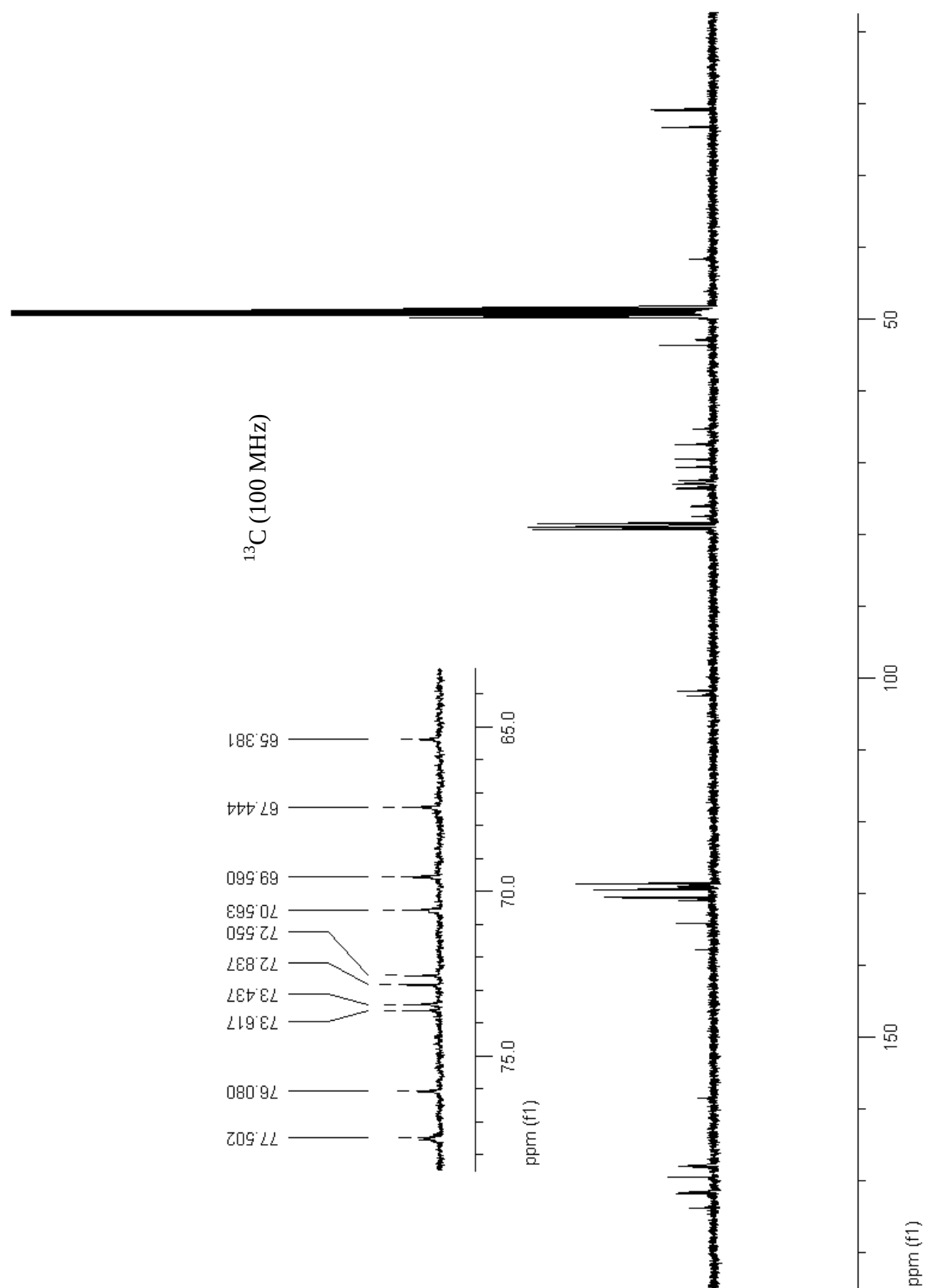
Annexe 3 : RMN ^1H du disaccharide 4-hydroxylé 195a

Annexe 4 : RMN ^1H du disaccharide 6-hydroxylé 195b

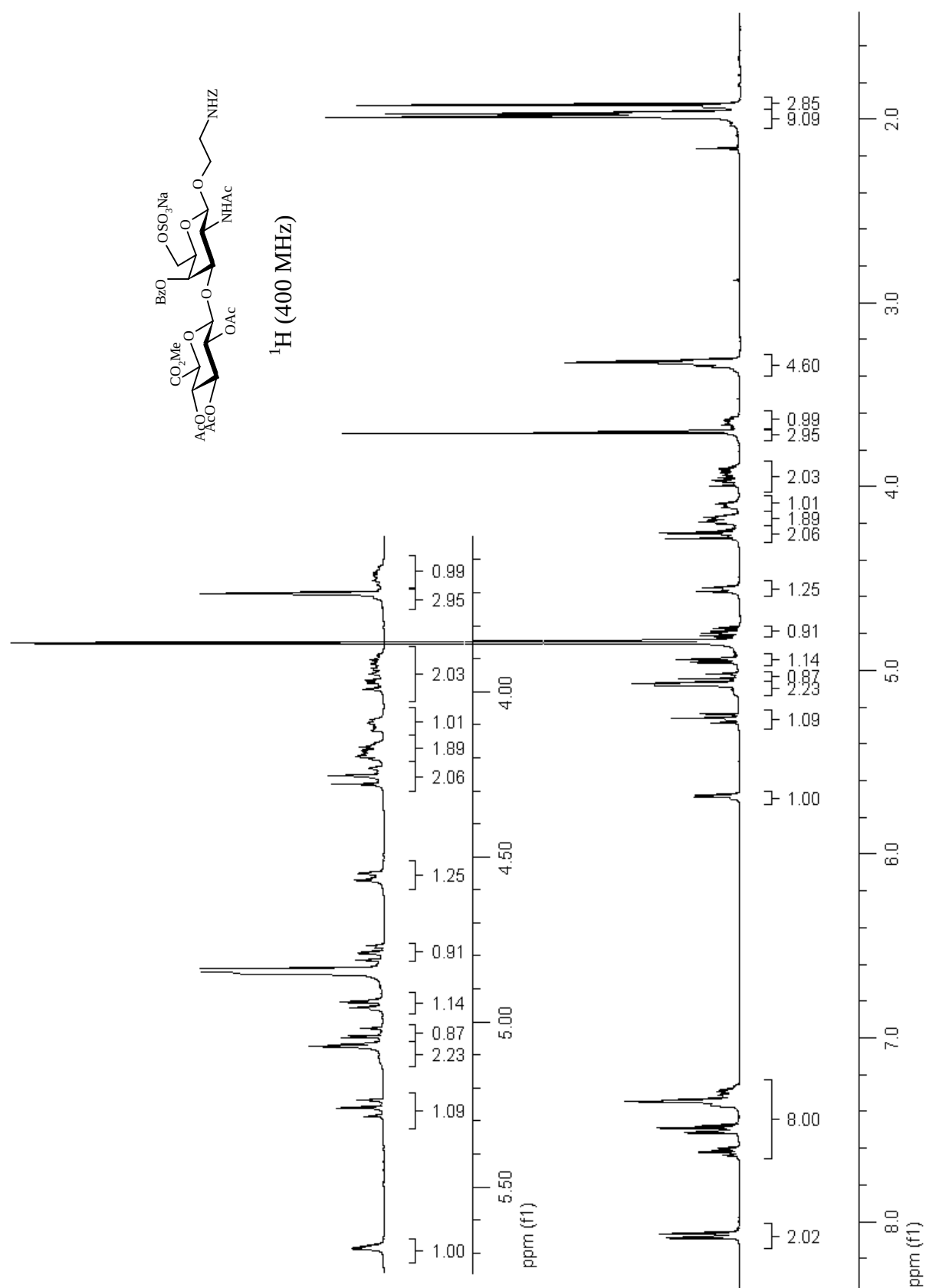


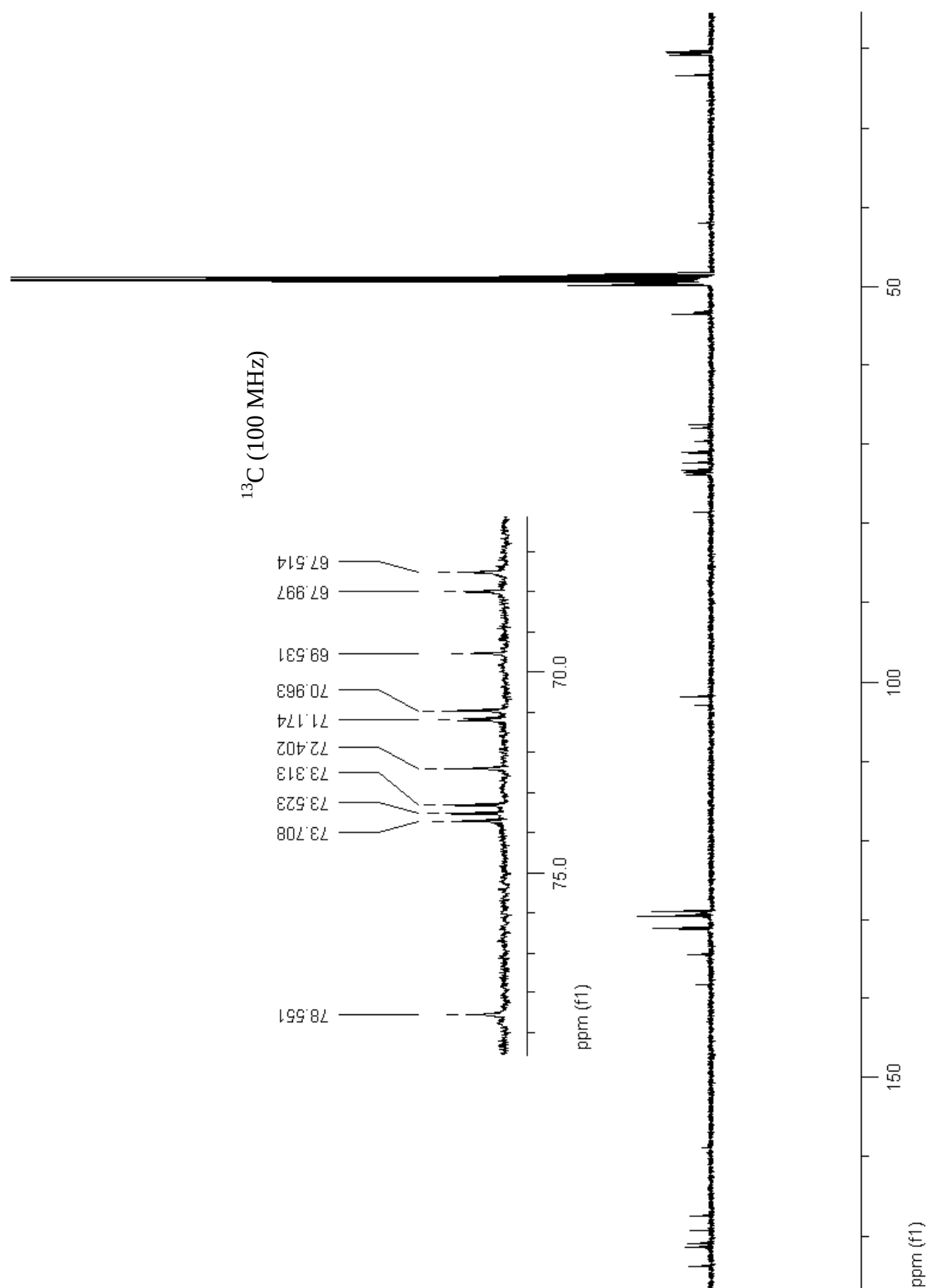
Annexe 5 : RMN ^1H et ^{13}C du disaccharide 4-sulfaté biotinylé 218a



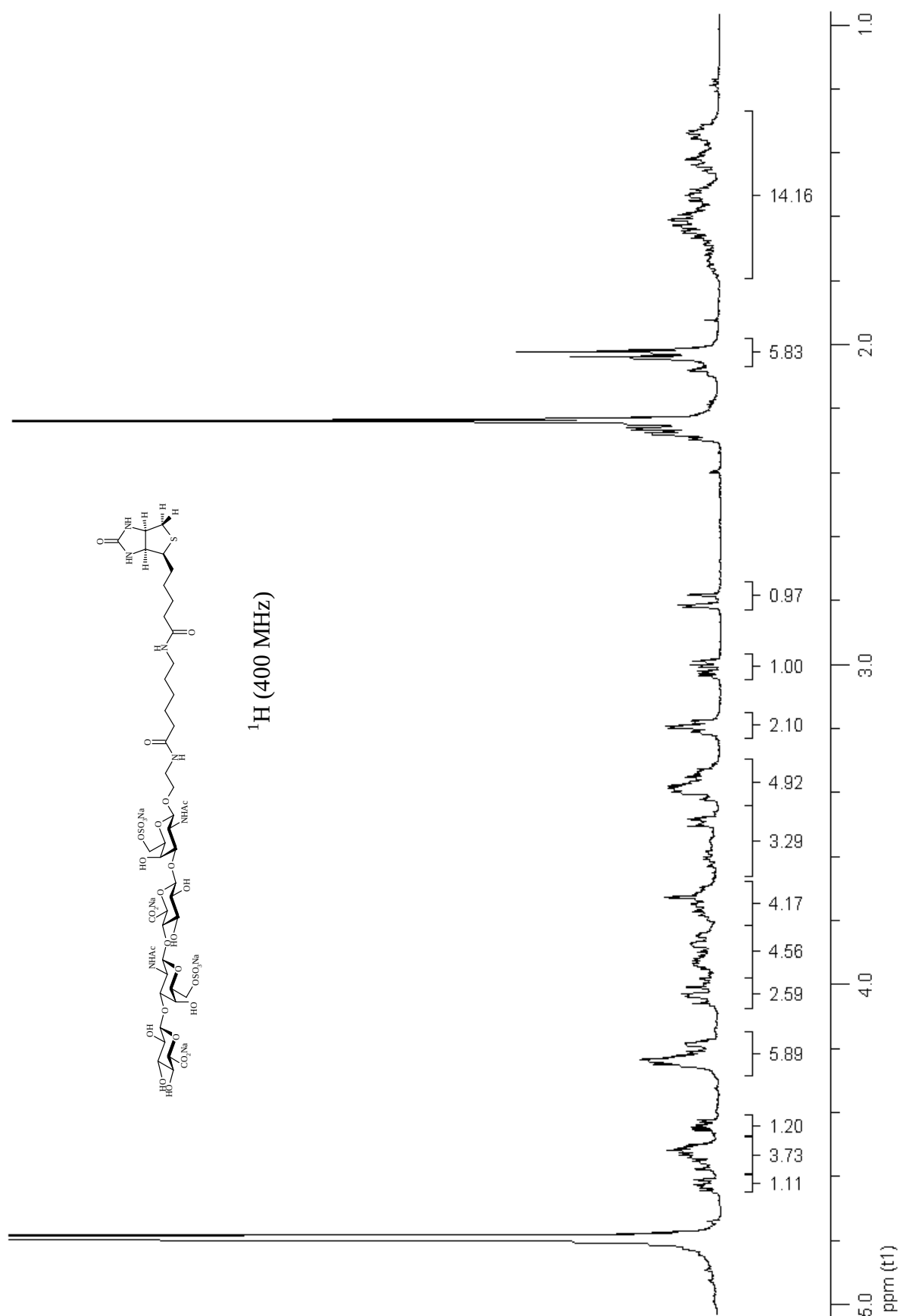


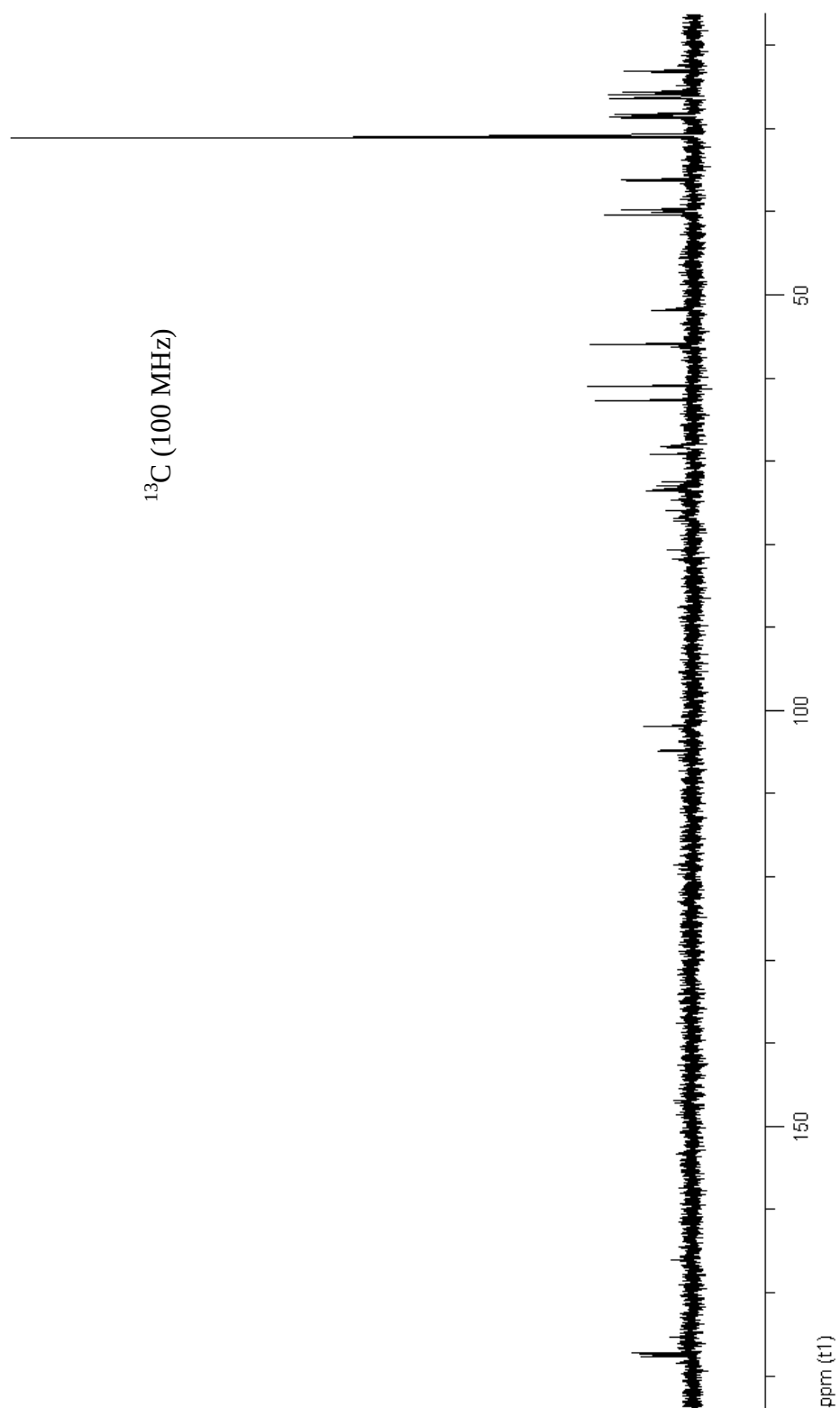
Annexe 6 : RMN ^1H et ^{13}C du disaccharide 6-sulfaté biotinylé 218b



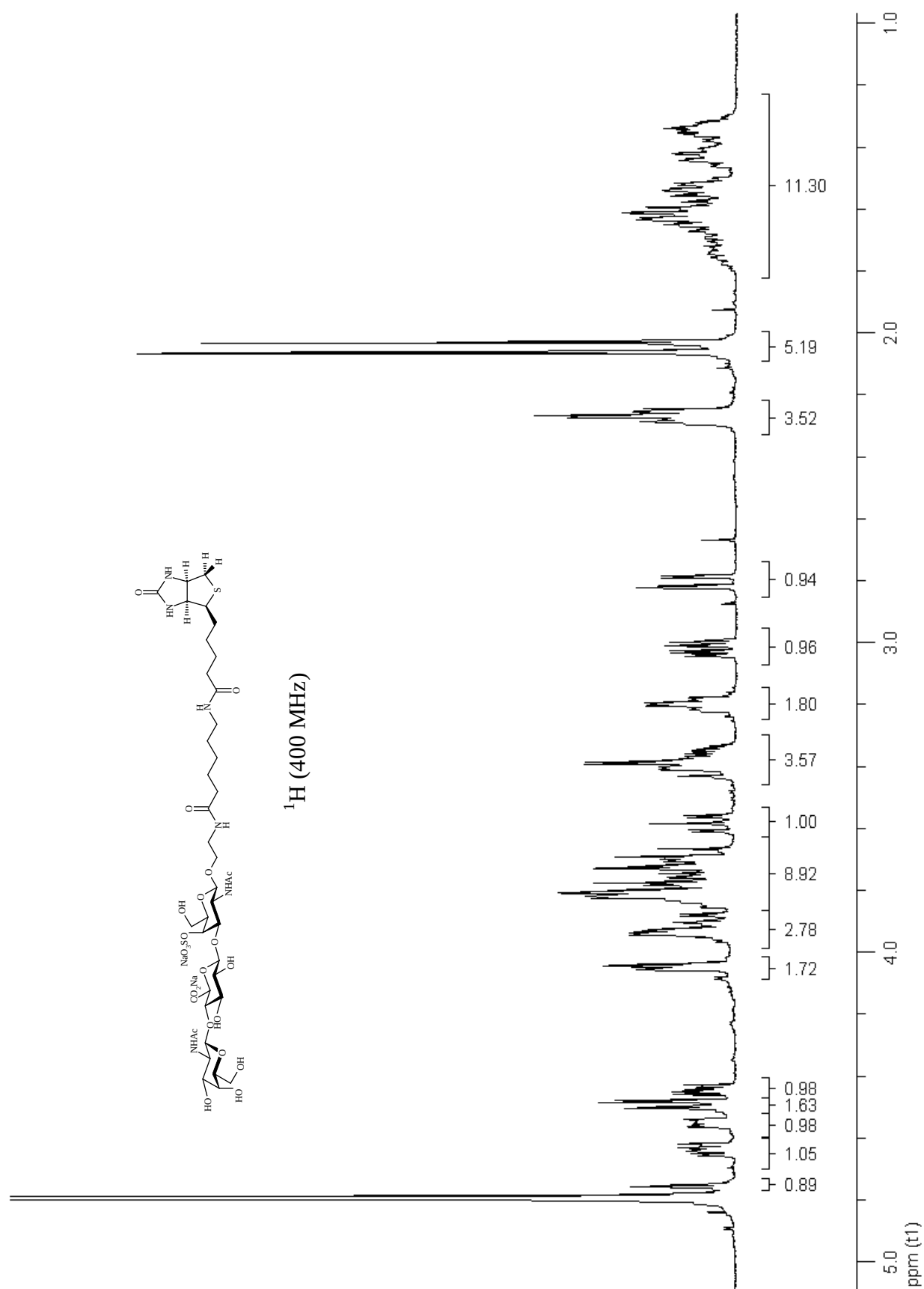


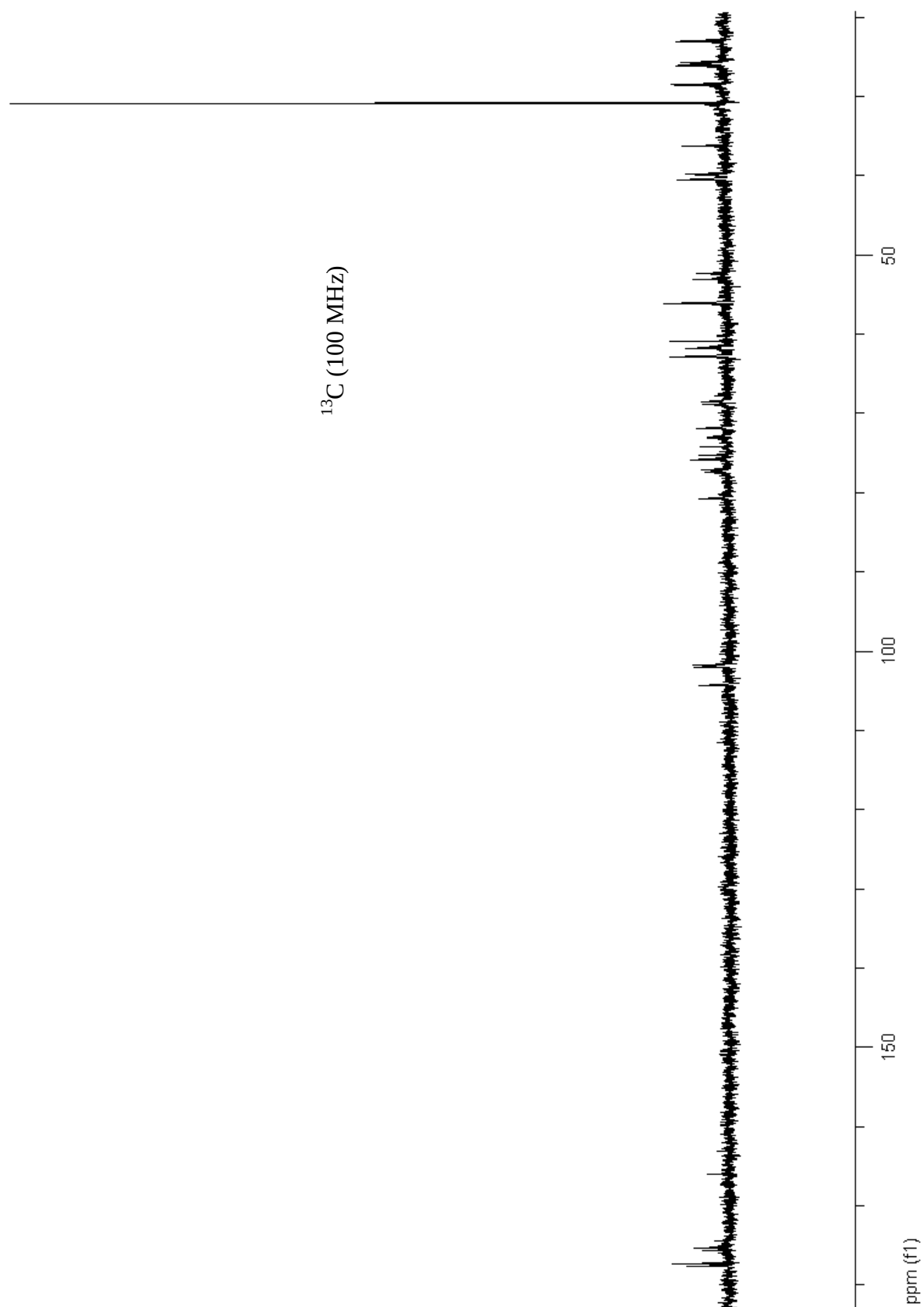
Annexe 7 : RMN ^1H et ^{13}C du tétrasaccharide 6-sulfaté 225b





Annexe 8 : RMN ^1H et ^{13}C du trisaccharide 4-sulfaté biotinylé 237





X- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

X- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] *Le Monde*, 24/02/09
- [2] www.doctissimo.fr
- [3] Creamer P.; Hochberg M. C. *The Lancet*, **1997**, 350, 503-509
- [4] Little C. B.; Flannery C. R.; Hugues C. E.; Mort J. S.; Roughley P. J.; Dent C.; Caterson B. *Biochem. J.*, **1999**, 344, 61-68
- [5] Thèse de Sandrine Gulberti, Université Henri Poincaré, Nancy I, **2003**
- [6] Sugahara K.; Yamashina I. *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 10168-10174
- [7] De Waard P.; Vliegthart J. F. G. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 6036-6043
- [8] Sugahara K.; Ohi Y.; Harada T. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 6027-6035
- [9] Yamada S.; Oyama M.; Yuki Y.; Kato K.; Sugahara K. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 233, 687-693
- [10] Kitagawa H.; Oyama M.; Masayama K.; Yamaguchi Y.; Sugahara K. *Glycobiology*, **1997**, 7, 1175-1180
- [11] Oegama T. R. Jr.; Kraft E. L.; Jourdan G. W.; Van Valen T. R. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 1720-1726
- [12] Fransson L.-A.; Silverberg I.; Carlstedt I. *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 14722-14726
- [13] Fransson L.-A., *The Polysaccharides*, G.O. Aspinall. Ed., Academic Press, **1985**, 3, 337-415
- [14] Kjellen L.; Lindhal U. *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, 60, 443-475
- [15] Gama C. I., Tully S. E., Sotogaku N., Clark P. M.; Rawat M.; Vaidehi N.; Goddard III W. A.; Nishi A.; Hsieh-Wilson L. C. *Nature Chem. Biol.*, **2006**, 2, 467-473
- [16] Sugahara K.; Yamada S. *Trends Glycosci. Glyc.*, **2000**, 12, 321-349
- [17] Yamada S.; Sugahara K. *Curr. Drug. Discov. Dev.*, **2008**, 5, 289-301
- [18] Alkhalil A.; Achur R. N.; Valiyaveetil M.; Ockenhouse C. F.; Gowda D. C. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 40357-40364
- [19] Uebelhart D.; Malaises M.; Marcolongo R.; De Vathaire F.; Piperno M.; Mailleux E.; Fioravanti A.; Matoso L.; Vignon E. *Osteoarthritis Cartilage*, **2004**, 12, 269-276
- [20] Michel B. A.; Stucki G.; Frey D.; De Vathaire F.; Vignon E.; Bruehlmann P.; Uebelhart D. *Arthritis Rheum.*, **2005**, 52, 779-786
- [21] Sugahara K.; Kitagawa H. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2000**, 10, 518-527
- [22] Gulberti S.; Lattard V.; Fondeur M.; Jacquinet J.-C.; Mulliert G.; Netter P.; Magdalou J.; Ouzzine M.; Fournel-Gigleux S. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 280, 1417-1425
- [23] Tchukida K.; Lind T.; Kitagawa H.; Lindahl U.; Sugahara K.; Lidholt K. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, 264, 461-467
- [24] Kitagawa H.; Uyama T.; Sugahara K. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 38721-38726
- [25] Kitagawa H.; Izumikawa T.; Uyama T.; Sugahara K. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 23666-23671
- [26] Yada T.; Masanori G.; Sato T.; Shionyu M.; Go M.; Kaseyama H.; Iwasaki H.; Kikuchi N.; Kwon Y.-D.; Togayachi A.; Kudo T.; Watanabe H.; Narimatsu H.; Kimata K. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 30235-30247
- [27] Marra A.; Dong X.; Petitou M.; Sinaÿ P. *Carbohydr. Res.* **1989**, 195, 39-50
- [28] Paulsen H.; Paal M. *Carbohydr. Res.* **1984**, 135, 53-69
- [29] Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **1990**, 199, 153-181
- [30] Coutant. C.; Jacquinet J.-C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1573-1581
- [31] Blatter G.; Beau J.-M.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **1994**, 260, 189-202
- [32] Tamura J. I.; Neumann K. W.; Kurov S.; Ogawa T. *Carbohydr. Res.* **1998**, 305, 43-63
- [33] Tamura J. I.; Neumann K. W.; Ogawa T. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 1351-1354
- [34] Jacquinet J.-C.; Rochepeau-Jobron L.; Combail J.-P. *Carbohydr. Res.* **1998**, 305, 43-63
- [35] Bélot F.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **2000**, 326, 88-97
- [36] Bélot F.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.* **2000**, 325, 93-106
- [37] Karst N.; Jacquinet J.-C. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 815-825
- [38] Sugahara K.; Tanaka S.; Yamada S. *Glycoconjugate J.* **1996**, 13, 609
- [39] Sugahara K.; Nadanaka S.; Takeda K.; Kojima T. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 871
- [40] Nadanaka S.; Sugahara K. *Glycobiology* **1997**, 7, 253
- [41] Karst N.; Jacquinet J.-C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2709-2717
- [42] Tully S. E.; Mabon R.; Gama C. J.; Tsai S. M.; Liu X.; Hsieh-Wilson L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7736-7737
- [43] Tamura J.I.; Tokuyoshi M. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **2004**, 68, 2436-2443
- [44] Tamura J.I.; Nakada Y.; Tanigushi K.; Yamane M. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 39-47

- [45] Lopin C.; Jacquinet J.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2574-2578
- [46] Levene P. A. *J. Biol. Chem.* **1941**, 140, 267-277
- [47] Davidson E. A.; Meyer K. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 5686-5689
- [48] Keiichi T.; Keinosuke I. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2000**, 67, 295-306
- [49] Kobayashi S.; Fujikawa S. I.; Ohmae M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14357-14369
- [50] Fujikawa S. I.; Ohmae M.; Kobayashi S. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2935-2942
- [51] Sugiura N.; Shimokata S.; Minamisawa T.; Hirabayashi J.; Kimata K.; Watanabe H. *Glycoconj. J.*, **2008**,
- [52] Lubineau A.; Bonnaffé D. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2523-2532
- [53] ANR-05-BLAN-0198-02 « GT-GAG »
- [54] Nagasawa K.; Inoue Y.; Kamata T. *Carbohydr. Res.*, **1977**, 58, 47-55
- [55] Inoue Y.; Nagasawa K. *Carbohydr. Res.*, **1980**, 85, 107-119
- [56] Inoue Y.; Nagasawa K. *Carbohydr. Res.*, **1981**, 97, 263-278
- [57] Toida T.; Sato K.; Sakamoto N.; Sakai S.; Hosoyama S.; Linhardt R. J. *Carbohydr. Res.*, **2009**, 344, 888-893
- [58] Inoue Y.; Nagasawa K. *Carbohydr. Res.*, **1986**, 146, 263-278
- [59] Faltynek C. R.; Silbert J. E. *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253, 7646-7649
- [60] Cowman M. K.; Balazs E. A.; Bergmann C. W.; Meyer K. *Biochemistry*, **1981**, 20, 1379-1385
- [61] Jansen E. F.; Jang R. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68, 1475-1477
- [62] Zurabyan S. E.; Antonenko T. S.; Khorlin A. Ya. *Carbohydr. Res.*, **1970**, 15, 21-27
- [63] Lemieux R. U.; Takeda M. T.; Chung B. Y. *ACS Symp. Ser.*, **1976**, 39, 90-115
- [64] Castro-Palomino J. C.; Schmidt R. R. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 5343-5346
- [65] Deckany G.; Bornaghi L.; Papageorgiou J.; Taylor S. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 3129-3132
- [66] Dagsupta F.; Anderson L. *Carbohydr. Res.*, **1990**, 202, 239-255
- [67] Shapiro D.; Acher A. J.; Rachaman E. S. *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 3767-3771
- [68] Meyer zu Reckendorf W.; Wassiliadou-Micheli N. *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 1792-1796
- [69] Dupeyre D.; Excoffier G.; Utile J.-P. *Carbohydr. Res.*, **1984**, 135, C1-C4
- [70] Schmidt R. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212-235
- [71] Zhu X.; Schmidt R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 1900-1934
- [72] Bélot F.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.*, **1996**, 290, 79-86
- [73] Excoffier G.; Gagnaire D.; Utile J.-P. *Carbohydr. Res.*, **1975**, 39, 3668-3672
- [74] Evans D. A.; Britton T. C.; Ellman J. A. *Tetrahedron Letters*, **1987**, 28, 6141-6144
- [75] Lucas H.; Basten J. E. M.; van Dinther T. G.; Meuleman D. G.; van Aelst S. F.; van Boeckel C. A. A. *Tetrahedron* **1990**, 46, 8207-8228
- [76] Gaunt M. J.; Yu J.; Spencer J. B. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 4172-4173
- [77] Xia J.; Abbas S. A.; Locke R. D.; Piskorz C. F.; Alderfer J. L.; Matta K. L. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 169-173
- [78] Vibert A.; Lopin-Bon C.; Jacquinet J.-C. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 9561-9578
- [79] Jacquinet J.-C.; Lopin-Bon C.; Vibert A. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 9579-9595
- [80] Barroca N.; Jacquinet J.-C. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 329, 667-679
- [81] Johansson R.; Samuelsson B. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1984**, 201-202
- [82] Garreg P. J.; Hultberg H.; Wallin S. *Carbohydr. Res.*, **1982**, 108, 97-101
- [83] DeNinno M. P.; Etienne J. B.; Duplantier K. C. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 669-672
- [84] Sakagami M.; Hamana H. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 5547-5551
- [85] Debenham S. D.; Toone E. J. *Tetrahedron Asym.*, **2000**, 11, 385-387
- [86] Gavard O.; Hersant Y.; Alais J.; Duverger V.; Dilhas A.; Bascou A.; Bonnaffé D. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 3603-3620
- [87] Dilhas A.; Bonnaffé D. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 3643-3645
- [88] Jiang L.; Chan T. H. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 355-358
- [89] Jonke S.; Liu K.-G.; Schmidt R. R. *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 1274-1290
- [90] Fukuyama T.; Laird A. A.; Hotchkiss L. M. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 6291-6292
- [91] Naruto M.; Ohno K.; Naruse N.; Takeushi H. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 251-254
- [92] Dinkelaar J.; Codée J. D. C.; Van den Bos L. J.; Overkleeft H. S.; Van der Marel G. A. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 5737-5742
- [93] Hanashima S.; Castagner B.; Esposito D.; Nokami T.; Seeberger P. H. *Org. Lett.*, **2007**, 9, 1777-1779
- [94] El-Abadla N. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 699-722
- [95] Thèse de Nathalie Karst, Université d'Orléans, **2001**

Aude VIBERT

SYNTHESE D'OLIGOSACCHARIDES DE CHONDROITINES ET DE SULFATES DE CHONDROITINES BIOTINYLES POUR L'ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEOGLYCANES DU CARTILAGE

Résumé :

L'arthrose est la plus fréquente des maladies articulaires pour laquelle aucun traitement efficace n'est aujourd'hui disponible. Elle est caractérisée par une destruction du cartilage et de ses composants, dont font partie les protéoglycanes. Les principaux protéoglycanes cartilagineux sont les sulfates de chondroïtines, qui sont de longs polysaccharides linéaires hétérogènes composés d'unités disaccharidiques répétitives constituées d'un acide-D-glucuronique et d'une *N*-acétyl-D-galactosamine. Dans le but d'étudier la biosynthèse de ces composés et ainsi de mieux comprendre le mécanisme d'action des enzymes qui y sont impliquées, la synthèse chimique d'oligosaccharides de chondroïtines et de sulfates de chondroïtines biotinylés a été réalisée.

Grâce à une méthodologie efficace et innovante basée sur une hydrolyse acide d'un polymère de sulfates de chondroïtines, des intermédiaires clés ont rapidement été obtenus. Une stratégie d'élongation les utilisant a ensuite été appliquée pour conduire à une première famille de sept oligosaccharides non sulfatés (du disaccharide à l'octasaccharide). Deux nouvelles familles d'oligosaccharides de sulfates de chondroïtines A et C, sulfatés de façon homogène ont été préparées, à partir d'un précurseur commun par stratégie divergente. Pour la première fois, deux oligosaccharides de sulfate de chondroïtine A, présentant une sulfatation hétérogène, ont également été synthétisés.

Ces travaux ont mené à la préparation de treize oligosaccharides biotinylés finaux.

Mots clés : oligosaccharides biotinylés, sulfates de chondroïtines, arthrose, synthèse chimique

SYNTHESIS OF BIOTINYLATED CHONDROITIN AND CHONDROITIN SULFATE OLIGOSACCHARIDES FOR BIOSYNTHESIS STUDY OF CARTILAGE'S PROTEOGLYCANES

Summary:

Osteoarthritis is the most frequent articular disease but until now no treatment exists. It is characterized by a destruction of cartilage and its components as proteoglycans. Major cartilage's proteoglycans are chondroitin sulfate, which are linear and heterogeneous polysaccharides composed of disaccharidic repeating units constituted of a D-glucuronic acid and an *N*-acetyl-D-galactosamine.

In order to study biosynthesis of those compounds and so to better understand working mechanism of the implicated enzymes, chemical syntheses of biotinylated chondroitin and chondroitin sulfate oligomers have been achieved.

Thanks to an efficient hydrolysis of a starting chondroitin sulfate polymer, key building blocks were quickly obtained. An elongation strategy using them has been then applied to give a first family of seven non sulfated oligosaccharides (from disaccharide to octasaccharide). Two new families of chondroitin sulfate A and C oligosaccharides, with homogeneous sulfation have been prepared from a common precursor by divergent strategy. For the first time, two chondroitin sulfate A oligosaccharides with an heterogeneous sulfation have been synthesized.

This work has led to thirteen final biotinylated oligosaccharides.

Key words: biotinylated oligosaccharides, chondroitin sulfate, osteoarthritis, chemical synthesis



**Institut de Chimie Organique et Analytique
Université d'Orléans, UFR Sciences,
Rue de Chartres, BP 6759**

