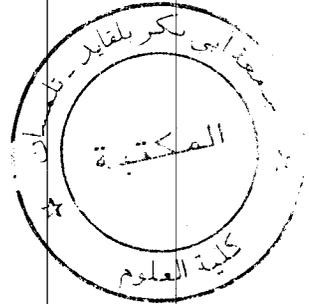


DOC/247-12/04

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID, TLEMCCEN  
FACULTE DES SCIENCES Département de Chimie  
Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses  
(COSNA)



**THESE**

Inscrit Sous le N°: .....  
Date le: 9 MARS 2015  
Code: 1028

Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR D'ETAT ES-SCIENCES

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Inscrit Sous le N°: .....  
Date le: 07 MARS 2011  
Code: 4665

**SYNTHESE DE TRI ET PENTASACCHARIDES  
DOUES D'UNE ACTIVITE BIOLOGIQUE.  
MODELISATION MOLECULAIRE.**

Présentée par

M<sup>lle</sup> GOURMALA Chafika

Le 05 Décembre 2005, devant le jury composé de :

<b>TALEB BENDIAB S.A.,</b>	<i>Professeur, Univ-Abou Bekr Belkaid-Tlemccen</i>
<b>ZHANG Y.,</b>	<i>Directeur de Recherche-CNRS, ENS-Paris-France</i>
<b>AINAD TABET D.,</b>	<i>Professeur, Univ-Djilali Liabes-Sidi Bel-Abbes</i>
<b>TABTI B.,</b>	<i>Professeur, Univ-Abou Bekr Belkaid-Tlemccen</i>
<b>FAN B.T.,</b>	<i>Professeur, ITODYS-Univ-Paris7-France</i>
<b>GHALEM S.,</b>	<i>Professeur, Univ-Abou Bekr Belkaid-Tlemccen</i>

<b>Président</b>
<b>Examineur</b>
<b>Examineur</b>
<b>Examineur</b>
<b>Co-Encadreur</b>
<b>Encadreur</b>



# TABLE DES MATIERES

Abréviations	7
Introduction générale	9
<b>CHAPITRE. 1. GLYCOBIOLOGIE ET SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDE</b>	
1. Introduction	12
2. Rôle biologique des trisaccharides Le <sup>x</sup> et Le <sup>a</sup>	13
2.1 Antigènes membranaires	13
2.2 Système Lewis	14
2.3 Structure chimique de quelques antigènes	14
3. Communication intercellulaire	16
3.1 Adhésion cellulaire	16
3.2 Importance des glucides dans les interactions	17
3.3 Méthodes physiques de quantification de l'interaction	19
4. Synthèse d'oligosaccharides	20
4.1 Introduction	20
4.2 Synthèse chimique d'oligosaccharides	21
4.3 Glycosylation orthogonale par la différence de groupements protecteurs	24
4.4 Les groupements protecteurs	25
5. Stratégie de synthèse des trisaccharides Le <sup>a</sup> et Le <sup>x</sup>	27
6. Quelques notions sur les glycolipides	34
<b>CHAPITRE. 2. PARTIE THEORIQUE</b>	37
1. Introduction	37
2. Préparation du Synthone Glucosamine	38
3. Préparation du Synthone Fucose	40
4. Préparation du Synthone Galactose	41
4.1 Désoxygénation de la position 3 du galactose	41
4.2 Désoxygénation de la position 4 du galactose	43
4.3 Désoxygénation de la position 6 du galactose	44
5. Préparation des Mimes Trisaccharide Lewis <sup>x</sup> Désoxygénés en Position 3, 4 et 6	46
5.1 Préparation des blocs disaccharidiques	46
5.2 Fucosylation des blocs disaccharidiques	48
5.3 Déprotection des différents trisaccharides	49

6. Préparation du Bloc Lactose	50
7. Préparation du Pentasaccharide Le <sup>x</sup> Désoxygéné en Position 3	52
7.1 Activation de la position anomérique.	52
7.2 Préparation du bloc lactosamine.	52
7.3 Synthèse du trisaccharide 3'-désoxy Le <sup>x</sup>	53
7.4 Synthèse du bloc 3'-désoxy Le <sup>x</sup> pentasaccharide	54
8. Préparation du Trisaccharide Lewis <sup>a</sup>	55
8.1 Activation de la position anomérique du penta-acétyl galactose	55
8.2 Préparation du synthon accepteur	56
8.3 Préparation du bloc lactosamine précurseur du trisaccharide Lewis <sup>a</sup>	56
8.4 Synthèse du bloc trisaccharide Lewis <sup>a</sup>	57
9. Préparation du Glycosphingolipide Lewis <sup>a</sup>	58
9.1 Stratégie de synthèse.	59
9.2 Préparation du bloc lactosamine	60
9.3 Fucosylation	60
9.4 Préparation du bloc pentasaccharide	61
9.5 Activation du carbone anomérique du pentasaccharide	62
9.6 Introduction de l'azidosphingosine	63
<b>CHAPITRE. 3. PARTIE EXPERIMENTALE</b>	65
1. Préparation du Synthon Glucosamine	67
2. Préparation du Synthon Fucose	73
3. Préparation du Synthon Galactose	75
3.1 Galactose désoxygéné en position 3	75
3.2 Galactose désoxygéné en position 4	83
3.3 Galactose désoxygéné en position 6	85
4. Préparation du Trisaccharide Le <sup>x</sup> Désoxygéné en Position 3	88
4.1 Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-3 mime Le <sup>x</sup>	88
4.2 Synthèse du désoxy-3 mime trisaccharide Le <sup>x</sup>	89
4.3 Déprotection du désoxy-3 mime trisaccharide Le <sup>x</sup>	90
5. Préparation du Mime Trisaccharide Le <sup>x</sup> Désoxygéné en Position 6	
5.1 Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-6 mime Le <sup>x</sup>	92
5.2 Synthèse du désoxy-6 mime Le <sup>x</sup>	93
5.3 Déprotection du désoxy-6 mime Le <sup>x</sup>	94
6. Préparation du Le <sup>x</sup> Désoxygéné en Position 4	96
6.1 Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-4 mime Le <sup>x</sup>	96
7. Préparation du Bloc Lactose	97
8. Préparation du Pentasaccharide Le <sup>x</sup> Désoxygéné en Position 3	

8.1 Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-3 mime Le <sup>x</sup>	104
8.2 Synthèse du bloc trisaccharide mime Le <sup>x</sup>	105
8.3 Préparation du désoxy-3 pentasaccharide Le <sup>x</sup>	107
8.4 Déprotection du désoxy-3 pentasaccharide Le <sup>x</sup>	108
9. Préparation du Trisaccharide Le <sup>a</sup>	110
9.1 Activation de la position anomérique du galactose	110
9.2 Préparation du synthon glucosamine	111
9.3 Préparation du bloc lactosamine précurseur du trisaccharide Le <sup>a</sup>	112
9.4 Synthèse du trisaccharide Le <sup>a</sup>	114
9.5 Déprotection du trisaccharide Le <sup>a</sup>	115
10. Préparation du Glycosphingolipide Le <sup>a</sup>	117
10.1 Préparation du bloc lactosamine précurseur du trisaccharide Le <sup>a</sup>	117

## CHAPITRE. 4. MODELISATION DE L'INTERACTION DU DIMERE Le<sup>x</sup>

1. Introduction	120
2. Outils de la modélisation moléculaire	121
2.1 Les méthodes quantiques	121
2.2 Mécanique moléculaire	122
2.3 Dynamique moléculaire	124
2.3.1 Principe de la dynamique moléculaire	124
2.3.2 Etapes d'une dynamique moléculaire	126
3. Champs de forces utilisés pour les hydrates de carbonés	127
4. Etude computationnelle des oligosaccharides	128
5. Théorie et méthode	129
6. Analyse et résultats	131
6.1. Analyse des énergies d'interaction et détermination de la constante de dissociation	131
6.2. Analyse des liaisons hydrogènes	132
6.3. Analyse des angles glycosidiques	135
6.4. Analyse des fluctuations RMSD pour le dimère Lewis <sup>x</sup> -Lewis <sup>x</sup>	139
6.5. Analyse des RMSD et corrélation avec l'angle oméga	144
6.6. Analyse des distances calcium-dimère	146
6.6.1 Analyse globale	146
6.6.2 Analyse locale	147
Conclusion et perspectives	149
Références Bibliographiques	153

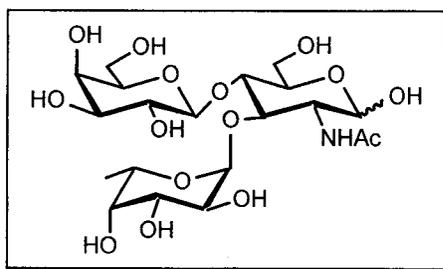
# Abréviations

$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire
$\delta$	Déplacement chimique (en ppm)
Ac	Acétyl
Ac <sub>2</sub> O	Anhydride acétique
APTS	Acide para-toluènesulfonique
Arom	Aromatique
Bn	Benzyl
BnBr	bromure de benzyle
Bz	Benzoyl
Cutoff	rayon de coupure
CSA	Acide 10-d, 1-camphorsulfonique
d	doublet
DBU	1, 8-diaza-bicyclo[5.4.0] undec-7-ène
DCM	Dichlorométhane
DFT	Density functional theory
DIPEA	N, N-diisopropyléthylamine
ddd	doublet de doublet de doublet
DM	Dynamique moléculaire
DMAP	4-N, N-diméthylaminopyridine
DME	Diméthoxyéthane
DMF	N, N-diméthylformamide
DMTST	Triflate de diméthyl (méthylthio) sulfonium
DTBMP	2, 6-di-tert-butyl-4-méthylpyridine
Et	Ethyl
éq	équivalent
Fuc	Fucose
Gal	D-galactose
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
Gem	Geminé
Glc	D-glucose
Lac	Lactose
m	multiplet
M	masse molaire (en mol/l)
Me	Methyl
MM	Mécanique moléculaire

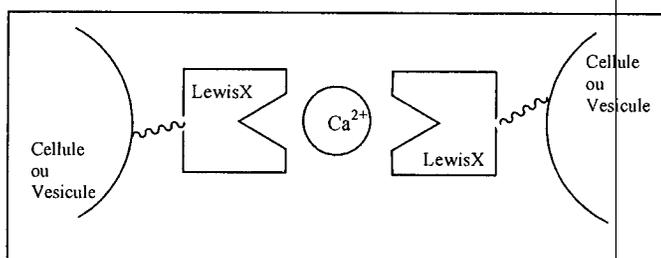
Mpm	4-méthoxy benzyl ether
MBn	4-méthoxy benzyl ether
NBS	N-bromosuccinimide
NeuAc	Acide N-acétylneuraminique(acide sialique)
NIS	N-iodosuccinimide
NHAc	Acétamido
NPh	Phthalimido
nOe	Nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
PF	Point de fusion
Ph	Phényl
ppm	partie par million
Py	Pyridine
q	quadruplet
QM	Mécanique quantique
quat	quaternaire
R <sub>f</sub>	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	root mean square deviation
s	Singulet
SLe <sup>x</sup>	Sialyl Lewis <sup>x</sup>
SM	Spectrométrie de masse
t	Triplet
TA	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TFA	Acide trifluoroacétique
TfO	Triflate (trifluorométhanesulfonate)
THF	Tétrahydrofuranne
TMS	Triméthylsilyl
TBS	Tertiobutyl diméthylsilyl
TBDS	Tertiobutyl diméthylsilyl
TMSOTf	Acide trifluorométhanesulfonique
Tol	Toluène
TsCl	Chlorure de tosyle
V/V	volume à volume
WSC	Water-soluble carbodiimide, Chlorhydrate de 1-éthyle-3 (3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

# INTRODUCTION GENERALE

Les sucres sont présents à la surface de toutes les cellules animales sous forme de glycolipides ou de glycoprotéines. La reconnaissance moléculaire entre des protéines et des structures sucrées donne aux sucres un rôle fondamental en biologie cellulaire. En plus de cette interaction très étudiée, certains biologistes et biochimistes pensent qu'une reconnaissance directe sucre/sucre peut également avoir lieu en présence de calcium. En effet, c'est le cas du déterminant Lewis<sup>x</sup>, dont le rôle de responsable de la différence cellulaire a été démontré sur les embryons de souris par Hakomori, un chercheur américain. Des détails de l'identification moléculaire entre les parties neutres d'hydrate de carbone sont mal caractérisés en raison de la complexité chimique de la membrane cellulaire. Si l'énergie d'adhésion est maintenant connue, plusieurs caractéristiques de cette interaction en l'occurrence les détails structuraux restent dans l'ombre et donc plusieurs questions restent encore posées sur la partie du trisaccharide Lewis<sup>x</sup> qui est responsable de la reconnaissance homotypique, la spécificité de l'adhésion et aussi sur le caractère préférentiel de l'interaction sucre-sucre.



Structure du trisaccharide  
Lewis<sup>x</sup>



Adhésion cellulaire

Le trisaccharide Lewis X ( $Le^x$ ) est la partie terminale de nombreux glycolipides et glycoprotéines. Il joue un rôle important dans le processus de reconnaissance entre cellules. Ce trisaccharide est fortement exprimé à la surface cellulaire au stade *morula* et cette interaction pourrait alors être capitale dans le phénomène de compaction. Il est présent à la surface des cellules sanguines, où il joue un rôle important dans le processus inflammatoire. Le trisaccharide  $Le^x$  est également présent en quantité importante à la surface de diverses cellules tumorales humaines. Une interaction  $Le^x$ - $Le^x$  conduirait alors à l'autoagrégation des cellules tumorales correspondantes, donnant lieu à des microembolies engendrant la métastase tumorale.

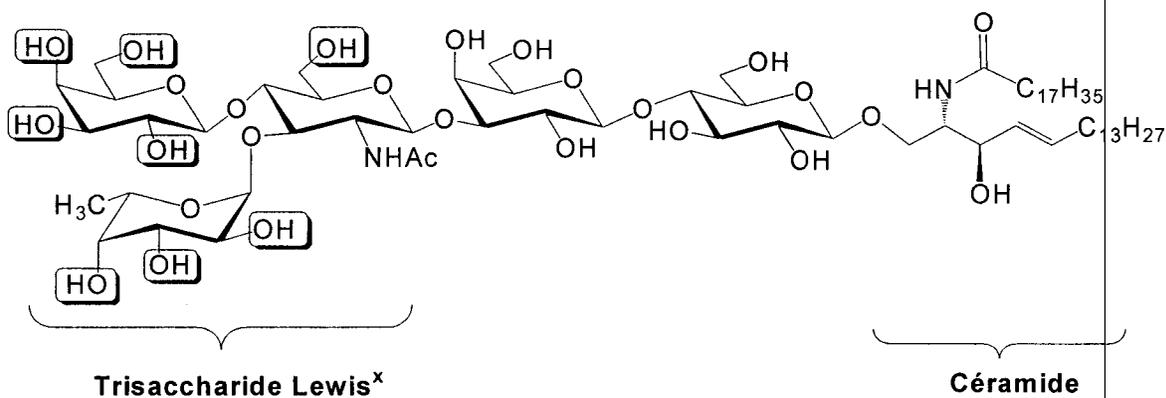
Cette association entre les deux trisaccharides Lewis X négociée par calcium a été étudiée par diverses méthodes. On peut citer les études menées sur des liposomes et des microbilles de

plastique qui ont affirmées cette hypothèse (Boubelik, 1998), étude faite par microscopie à force atomique (Tromas, 2001). D'autres études en solution de dimères ont été mises en évidence par spectrométrie de masse (Siuzdak, 1993 ; Geyer, 1999). Des études conformationnelles par RMN (Henry, 1999), et par RMN des milieux orientés (Azurmendi, 2002).

La démonstration qualitative de l'importance des interactions  $Le^x-Le^x$  (interaction spécifique sucre-sucre) dans le développement (qu'il soit cancéreux ou naturel) est d'une grande portée. Le but de la synthèse de glycosphingolipides est de faire des études d'interaction de glycolipides à tête Lewis<sup>x</sup> par différentes méthodes:

- Adhésion de liposomes géants fonctionnalisés
- Etude par RMN des milieux orientés
- Calculs théoriques par dynamique moléculaire

Notre ambition, d'une part est de déterminer avec précision les groupements hydroxyyles impliqués dans la reconnaissance  $Le^x-Le^x$ , sous la médiation du calcium. Pour cela, une série de huit glycolipides contenant le trisaccharide  $Le^x$  sera alors préparée, dans lesquels une des huit fonctions hydroxyyles aura été remplacée par un hydrogène. Et d'autre part, affirmer que cette interaction est bien spécifique, c'est à dire ne se réalisant qu'entre deux sucres Lewis X ; tandis qu'avec un autre sucre l'interaction ne se produisait pas. Cette hypothèse a été prouvée récemment (Gourier, 2005) par mesure physique de l'énergie d'adhésion entre un glycosphingolipide portant une tête Lewis X et un glycosphingolipide portant une tête Lewis<sup>a</sup> qui n'est qu'un isomère du trisaccharide Lewis<sup>x</sup>.



Lors de cette étude, nous présenterons tout d'abord quelques notions sur la chimie des oligosaccharides et leur intervention dans les phénomènes d'interaction et adhésion cellulaire. Le deuxième chapitre décrira les schémas réactionnels réalisés au cours de la synthèse

d'oligosaccharides. La partie expérimentale indiquant les modes opératoires des composés synthétisés sera décrite dans le chapitre 3. Ce dernier sera suivi d'un calcul par dynamique moléculaire dans l'eau et d'une analyse des résultats expliquant l'interaction entre deux trisaccharides Lewis<sup>x</sup> en absence et en présence de l'ion calcium.

# CHAPITRE 1

## GLYCOBIOLOGIE ET SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES

---

### 1. INTRODUCTION

La glycobiologie (Varki, 1993 ; Dwek, 1995) est une science en émergence qui a pour objectif l'étude du rôle biologique joué par les glucides et leurs assemblages complexes. Ces assemblages regroupés sous le terme de glycoconjugués peuvent se faire, par voie chimique ou enzymatique (Hendrix, 1996 ; McGarvey, 1997) sur des lipides ou des protéines.

La compréhension du rôle biologique des sucres dans les mécanismes cellulaires permet d'envisager ces molécules comme de cibles thérapeutiques potentielles (Axford, 1997) aussi bien pour le traitement du cancer (Hakomori, 1991), des maladies cardiovasculaires que des maladies infectieuses ou liées à l'inflammation.

Les glucides, encore appelés sucres ou hydrates de carbone, représentent, avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques, l'une des quatre grandes classes de constituants de la matière vivante. La complexité de leurs structures rebute plus d'un biologiste. Alors que les acides aminés des protéines s'enchaînent linéairement, les sous-unités monosaccharidiques peuvent se lier en plusieurs points.

Le plus grand intérêt d'étude des hydrates de carbone est concentré sur les substances complexes telles les glycoprotéines et les glycolipides (qui sont des hydrates de carbones complexes) dans lesquels les sucres sont liés respectivement aux protéines et aux lipides. Les monosaccharides les plus importants qui interviennent dans la structure de ces glycoconjugués sont le D-glucose, le D-galactose, le D-mannose, le L-fucose, la N-acétylglucosamine, l'acide N-acétyl-neuraminique, leurs structures sont représentées sur la Figure1.



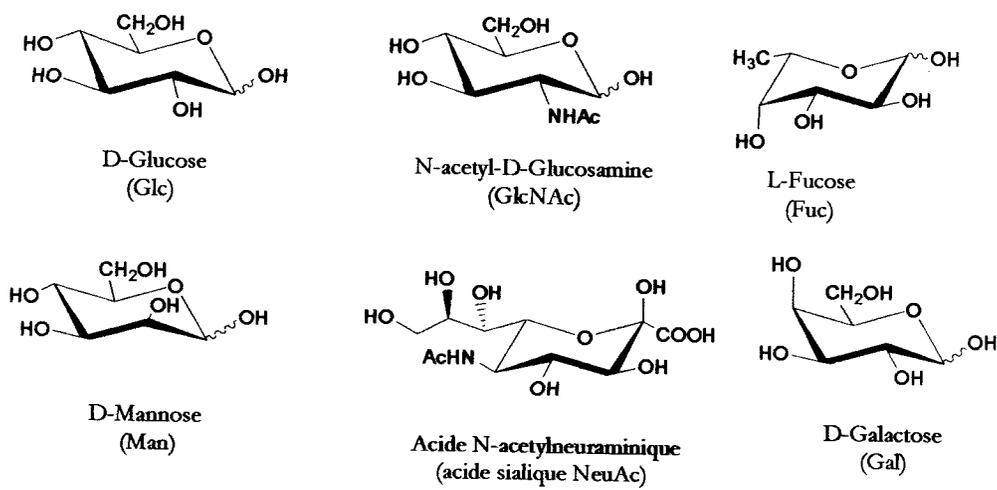


Figure 1. Quelques sucres simples rencontrés dans les cellules

## 2. ROLE BIOLOGIQUE DES TRISACCHARIDES Le<sup>x</sup> ET Le<sup>a</sup>

### 2.1. Antigènes membranaires

On trouve à la surface des globules rouges (ou érythrocytes) des molécules capables d'être reconnues par le système immunitaire et de déclencher une réponse immunitaire. Ce sont les antigènes membranaires érythrocytaires. Leur nature chimique est variable, protéine, glycoprotéine ou glycolipide (figure 2). Il s'agit de transporteurs et canaux membranaires (protéines assurant les transports de molécules à travers la membrane), d'enzymes, de protéines structurales de la membrane (charpente du globule), de molécules d'adhésions ou de récepteurs membranaires (protéines capables de lier une molécule signal ou informative).

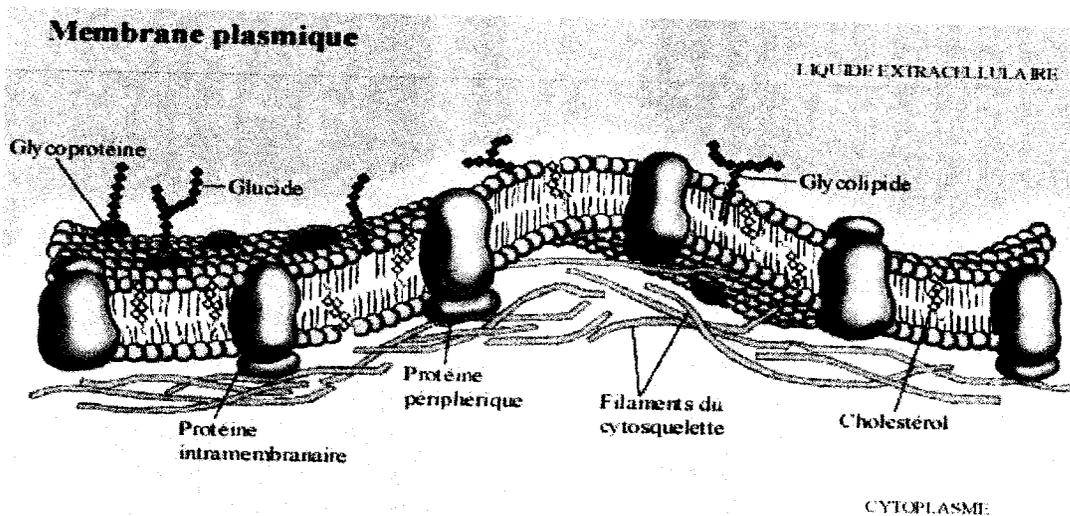


Figure 2. Modèle de la membrane plasmique (Singer et Nicolson)

L'ensemble des variants antigéniques d'un composé membranaire constitue un système. Plus de 23 systèmes de groupes sanguins ont été identifiés depuis la découverte du système ABO par Landsteiner en 1900. Certains sont de nature glucidique, comme les systèmes ABO, H ou Lewis, dont les antigènes sont portés par les extrémités terminales de glycoprotéines ou de glycolipides membranaires. D'autres sont de nature peptidique, expression directe des gènes, et ancrés dans la membrane des hématies. Au contraire des antigènes de nature peptidique, dont l'expression est souvent restreinte aux cellules sanguines et souvent limitée à l'homme, les antigènes glucidiques sont des antigènes tissulaires, présents dans de nombreux organes, et exprimés dans de nombreuses autres espèces, y compris les bactéries.

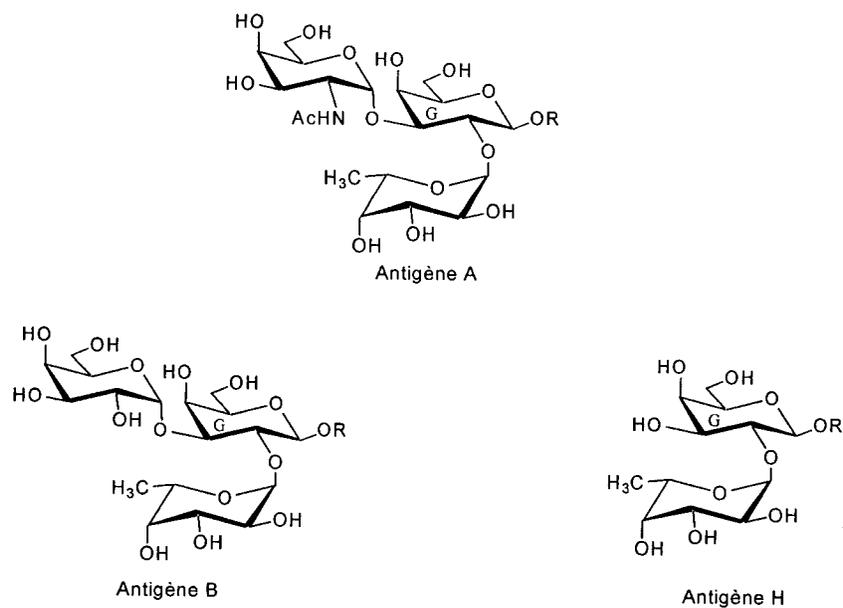
## 2.2. Système Lewis

L'antigène Lewis a été identifié la première fois par un anticorps dans un échantillon de sérum provenant de Mme H. G. D. Lewis. Les antigènes du système Lewis sont d'un grand intérêt dans l'immunohématologie du fait qu'ils sont les seuls antigènes qui ne sont pas produits par les globules rouges (RBC) eux même. Ce sont des glycoprotéines synthétisés par les glandes salivaires (Mandel, 1991) et les cellules du tube digestif (Cordon-cardo, 1986 ; Sakamoto, 1986). Ces glycoprotéines sont des substances hydrosolubles présentes éventuellement dans les sécrétions et le plasma et qui se fixent secondairement sur les chaînes glucidiques qui portent les antigènes A, B et H en leur ajoutant de nouvelles spécificités Le (a) et Le (b).

## 2.3. Structure chimique de quelques antigènes

Les antigènes A, B et H sont des oligosaccharides portés par des glycolipides membranaires des hématies, des cellules épithéliales et endothéliales. L'antigène A et l'antigène B sont des trisaccharides, et l'antigène H est un disaccharide, qui est l'épine dorsale des trisaccharides A et B.

Au galactose de l'antigène H, une molécule de galactose est liée par une liaison alpha 1→3 pour former le trisaccharide B. Si la N-acétylgalactosamine est transférée de la même façon au galactose de l'antigène H, on forme le trisaccharide du groupe sanguin A (figure 3).



**Figure 3.** Les structures des déterminants antigéniques A, B et H

On observe 4 types de jonction, entre le galactose présent dans les antigènes A, B, H et la chaîne porteuse du glycoconjugué, la répartition de ces types de jonction disaccharidique est différente suivant la famille du glycoconjugué porteur.

- Type 1 : Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc- $\beta$ -(1-R)
- Type 2 : Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc- $\beta$ -(1-R)
- Type 3 : Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc- $\alpha$ -(1-R)
- Type 4 : Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc- $\beta$ -(1-R)

Les types de chaînes 1 et 2 sont rencontrés à la fois sur les glycoprotéines et glycolipides, la chaîne de type 3 sur les protéines glycosidiques et la chaîne de type 4 seulement sur les glycolipides.

La fucosylation enzymatique de la chaîne de type 1 donne les antigènes du groupe Lewis. L'antigène Lewis<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>) présente un résidu fucosyle sur la position 4 de la GlcNAc. Une seconde fucosylation donne l'antigène Lewis<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>), qui est donc un produit difucosylé. On observe d'autres produits de fucosylation, isomères des antigènes Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup> et qui sont respectivement les antigènes Le<sup>x</sup> et Le<sup>y</sup> (figure 4). Il a été démontré que les antigènes Lewis agissaient comme récepteurs de pylore de la bactérie H (*Helicobacter Pylori*) (Wang, 2000 ; Appelmelk, 2000) qui cause des ulcères d'estomac. Les personnes portant ce type d'antigène ont plus de risque d'avoir un ulcère que les personnes qui n'en portent pas. Le trisaccharide Le<sup>a</sup> est exprimé sur des cellules épithéliales du côlon et peut être utile pour la détection des tumeurs gastro-intestinales, du cancer pancréatique, et des tumeurs colo-rectales.

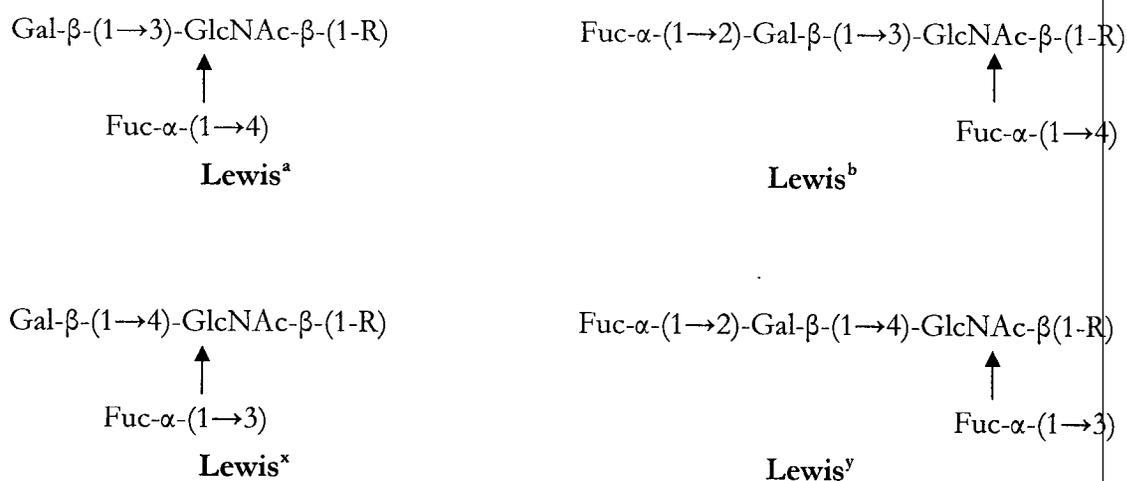


Figure 4. Structures des déterminants antigéniques Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>

### 3. COMMUNICATION INTERCELLULAIRE

#### 3.1. Adhésion Cellulaire

Les cellules adhèrent entre elles pour former des tissus. Ce phénomène prend forme dès le stade du développement embryonnaire. Ces cellules portent sur leur surface des molécules d'adhésion qui assurent la cohésion de l'ensemble. Une perturbation dans les phénomènes d'adhésion peut conduire à des situations pathologiques. C'est le cas dans la formation des métastases du cancer.

La reconnaissance et l'adhésion cellulaire sont des processus essentiels dans de nombreuses situations biologiques, en particulier dans le cas de la réponse immunitaire. L'action de cellules spécialisées (globules blancs ou leucocytes) implique une reconnaissance spécifique ligand-récepteur entre cellules, ou bien entre la cellule et son environnement extra-cellulaire, permettant au système de diriger son action vers l'infection ou la lésion. Les oligosaccharides, qui sont les structures les plus exposés à la surface de la cellule, sont maintenant reconnus pour avoir un grand rôle en tant que molécules de reconnaissance dans les processus liés à l'adhésion cellulaire (Fukuda, 1995) tels que le "rolling" des leucocytes. Lors d'une infection, les leucocytes, initialement dans le flux sanguin, doivent franchir la paroi endothéliale pour parvenir à la zone infectée et défendre l'organisme. Dans un premier temps la paroi endothéliale participe au recrutement des leucocytes en exprimant une molécule d'adhésion appelée ELAM 1 (endothelial leucocyte adhesion molecule-1). L'ELAM 1 appartient à la classe des sélectines, famille de molécules d'adhésion contenant une lectine capable de reconnaître un ligand hydrate de carbone se trouvant sur les leucocytes appelé sialyl-Lewis X (SLe<sup>x</sup>) qui est en fait un résidu terminal d'une

glycoprotéine de surface cellulaire ou d'un glycolipide des leucocytes. L'interaction sélectine/ligand est responsable du "rolling" des globules blancs ; le premier stade de la réponse inflammatoire (Mc Ever, 1995). En effet, cette reconnaissance spécifique permet d'accrocher faiblement les globules blancs à la paroi endothéliale, pour les ralentir, puis les intégrer, de plus forte interaction permet de les arrêter. Ensuite, les protéines de transfert permettent de traverser la paroi endothéliale (figure 5). Les ligands SLe<sup>x</sup> se trouvent également à la surface de certaines cellules tumorales (Zeisig, 2004). Ces phénomènes d'adhésion sont souvent complexes faisant appel à différents systèmes distincts.

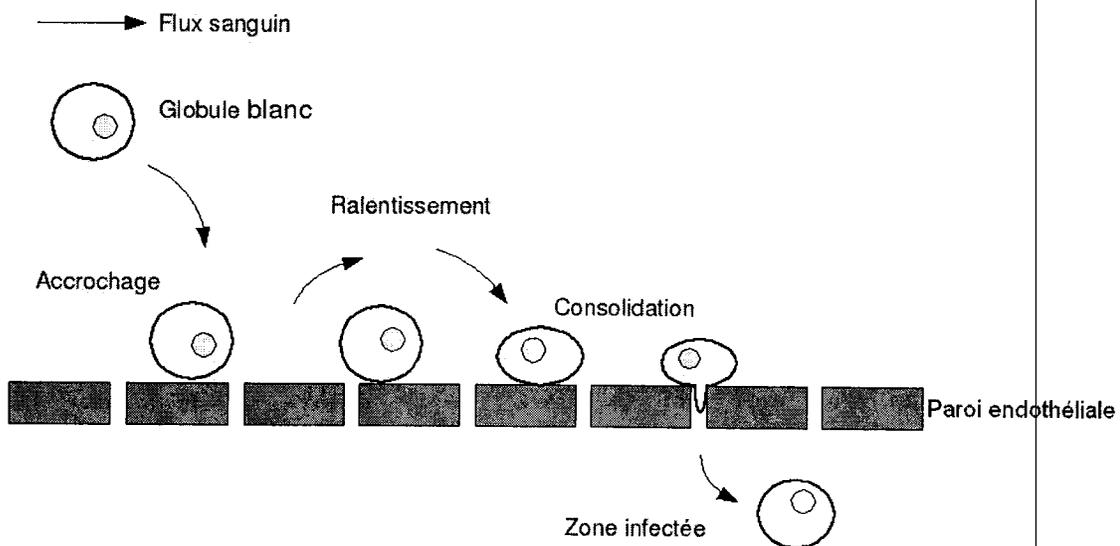
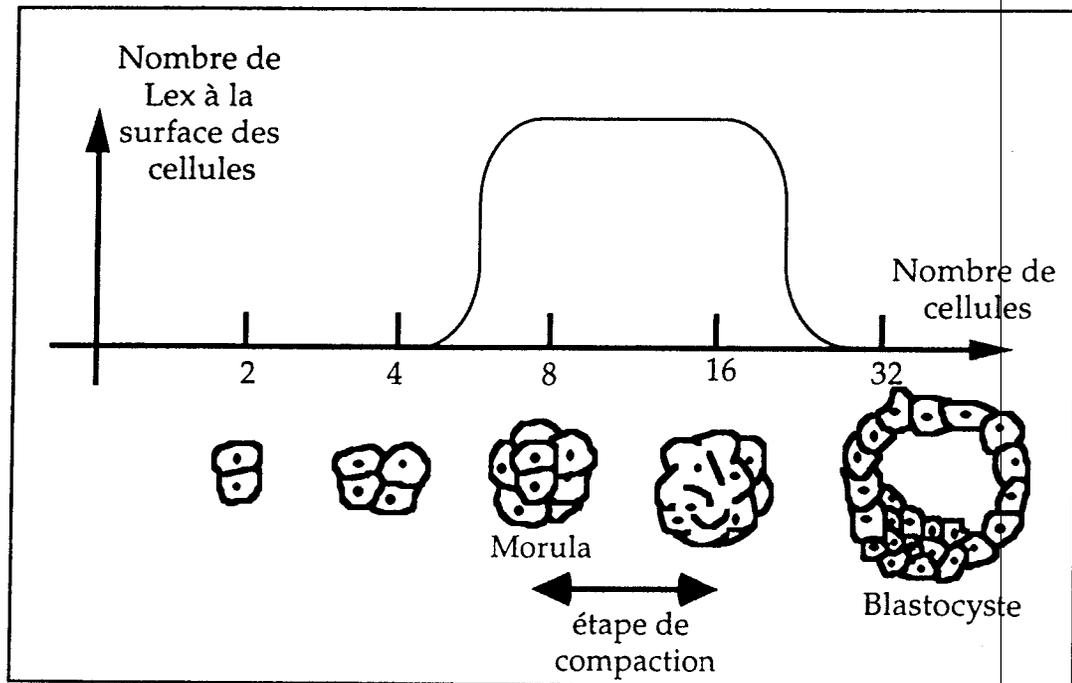


Figure 5. Processus d'adhésion lors de la réponse inflammatoire

### 3.2. Importance des glucides dans les interactions

Récemment, certains glucides complexes, en particulier, ceux qui entrent dans la constitution des membranes cellulaires et porteurs de messages, ont été introduits dans le domaine de la biologie moléculaire. Les glycolipides extérieurs de cellules sont responsables des négociations de divers événements intercellulaires d'adhérence. La composition des glycolipides sur la surface de cellules (Hakomori, 2003) est fortement corrélée avec les étapes de développement de cellules embryonnaires, et sert également de marqueur moléculaire de la carcinogenèse et de la métastase. Les interactions de ces glycolipides avec des récepteurs d'autres surfaces de cellules permettent une signalisation et un rôle de normalisation dans le développement et l'adhérence de cellules (Hakomori, 1997). Plusieurs de ces interactions impliquent l'identification d'hydrate de carbone-hydrate de carbone, et dépendent des cations bivalents tels que le calcium et le magnésium. Par exemple, l'agrégation des cellules au stade *Morula* du cancer se produit en raison de l'identification entre les glycosphingolipides contenant la structure du trisaccharide Lewis X. Cette hypothèse a

été proposée par Hakomori et ses collaborateurs dans le cas du développement de l'embryon de souris. En effet dès la première division de l'œuf, l'embryon prend la forme d'une petite mûre d'où le nom de stade *Morula*, entre 8 et 16 cellules, le premier signe de différenciation cellulaire commence à apparaître, c'est l'étape de compaction (figure 6).

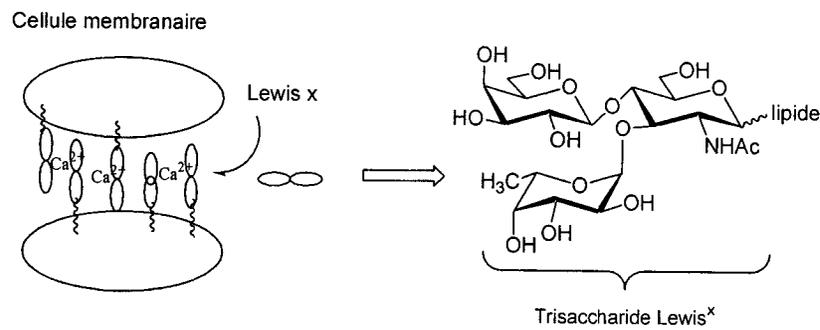


**Figure 6.** Expression du déterminant Lewis X au stade *Morula*

Les divisions cellulaires se poursuivent, l'œuf est transformé, et parvient au stade blastocyste contenant un bouton embryonnaire à partir duquel se développera l'embryon. Il a été remarqué que le déterminant Lewis X ( $Le^x$ ) ou SSEA-1 (Stage Specific Embryonic Antigen 1), n'est pas présent avant l'étape "8 cellules", mais montre un pic d'expression juste pendant l'étape de compaction (16-32 cellules). Ce trisaccharide est fortement exprimé à la surface cellulaire au stade *Morula* et cette interaction pourrait alors être capitale dans le phénomène de compaction. De plus, cette étape de compaction, essentielle pour la poursuite du développement de l'embryon, est inhibée par la présence du  $Le^x$  en solution dans le milieu (Fenderson, 1984).

De nombreux résultats sur l'embryogenèse ont été établis en travaillant sur des cellules de tératocarcinome embryonnaire de souris (Kannagi, 1983). Ce sont des cellules cancéreuses qui miment le comportement des cellules embryonnaires précoces de la souris avant l'implantation dans l'utérus. L'étude de ce système a permis de montrer le rôle crucial des sucres dans l'embryogenèse (Muramatsu, 1988). Hakomori recherchait de façon plus précise une protéine qui reconnaissait le  $Le^x$  et qui était responsable de cette adhésion dépendante du calcium. Des résultats préliminaires ont semblés montrer que cette protéine portait, elle aussi un motif  $Le^x$ .

Hakomori et ses collaborateurs proposent (Eggens, 1989 ; Kojima, 1994) alors d'expliquer ces résultats par l'existence d'une interaction homotypique spécifique, en présence d'ion calcium, entre deux molécules identiques du trisaccharide  $Le^x$  (figure 7).



**Figure 7.** Adhésion cellulaire en présence de calcium

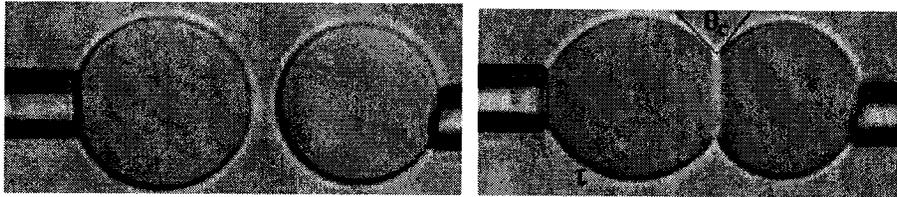
Le trisaccharide  $Le^x$  est également présent en quantité importante à la surface de diverses cellules tumorales humaines. Une interaction  $Le^x$ - $Le^x$  conduirait alors à l'autoagrégation des cellules tumorales correspondantes, donnant lieu à des microembolies engendrant la métastase tumorale. Cependant, les détails structuraux de ces interactions sucre-sucre demeurent mal caractérisés.

Une interaction relativement forte a été aussi mise en évidence par Hakomori (Kojima, 1989 ; Yu, 2002) entre deux autres oligosaccharides : le GM3 (sialosylactosylceramide,  $NeuAc\alpha 2 \rightarrow 3Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1Cer$ ) et le Gg3 (gangliotriosylceramide,  $GalNAc\beta 1 \rightarrow 4Gal\beta 1 \rightarrow 4Glc\beta 1 \rightarrow 1Cer$ ). A cause de leur association dynamique (Kojima, 1992), les interactions entre sucres constitueraient une phase initiale précédant l'adhésion cellulaire. La compréhension détaillée de cette dernière est d'un plus grand intérêt thérapeutique. En effet, le blocage de l'étape initiale rendrait impossible toutes les autres interactions et diminuerait ainsi l'invasion.

### 3.3. Méthodes physiques de quantification de l'interaction

Différentes méthodes ont été développées pour tenter de quantifier et de comprendre les mécanismes physiques d'interaction sucre-sucre en particulier entre les deux trisaccharides Lewis X. Parmi ces méthodes, on peut citer des études par RMN (Henry, 1999 ; Geyer, 2002), par spectrométrie de masse (Siuzdak, 1993 ; Koshy, 1999), et par AFM (atomic force microscopy) (Tromas, 2001). La mise en œuvre d'une technique très précise qui est la micromanipulation de vésicules ou de cellules a permis de quantifier cette interaction. Cette technique a été développée par l'équipe des « surfaces moléculaires organisées » du laboratoire de physique statistique de l'ENS (Dr E.Perez). Cette méthode a permis d'obtenir des caractéristiques macroscopiques, c'est à dire faisant intervenir un grand nombre de molécules. Les informations obtenues sont l'énergie d'adhésion pour les vésicules et la force d'adhérence de deux cellules. Le capteur de forces à

globule rouge ou capteur de forces à bille, souvent appelé BFP (Bead Force Probe) permet quant à lui de travailler à l'échelle de la molécule sur une liaison unique. Suivant l'utilisation qu'on en fait, cette technique donne accès à la force de rupture de la liaison ou à une force d'étirement (Pincet F, 2001). En effet, pour mesurer directement l'adhésion, deux vésicules de la taille d'une cellule ont été aspirées par des micropipettes et mises en contact. La pression dans chaque pipette contrôle la pression hydrostatique et donc la tension de la membrane. Quand une vésicule est très tendue et l'autre laissée molle, la géométrie de cette dernière permet d'évaluer l'énergie spécifique de l'adhésion. L'énergie d'adhésion  $W_{adh}$  est obtenue en mesurant l'angle de contact  $\theta_c$  des deux vésicules et la tension de leur membrane  $\tau_m$  :  $W_{adh} = \tau_m (1 - \cos\theta_c)$  (figure 8).



**Figure 8.** Adhésion de liposomes géants fonctionnalisés

L'énergie mise en jeu dans cette interaction a été mesurée de façon directe et quantitative, en quantifiant la déformation de ces vésicules une fois mis en contact. L'interaction mesurée bien que faible mais suffisante pour expliquer l'adhésion des deux cellules portant le trisaccharide Lewis<sup>x</sup> (Pincet, 2001).

## 4. SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES

### 4.1. Introduction

La synthèse d'oligosaccharides est caractérisée par un plus grand nombre de possibilités de couplage que les autres bio polymères naturels, comme les peptides ou les protéines. En effet, l'association de deux acides aminés identiques ne donne qu'un seul dipeptide alors que deux monosaccharides identiques peuvent former 11 disaccharides différents.

Le couplage osidique est l'opération fondamentale dans la synthèse d'oligosaccharides et demande de nombreuses étapes de protections et de déprotections dans le but d'éviter les produits de polycondensations. Dans une synthèse de disaccharide, le principe de base est de bâtir un pont oxygène avec le carbone hémiacétalique d'un sucre et la fonction alcool d'un autre sucre (Paulsen, 1982 ; Schmidt, 1986 ; Toshima, 1993 ; Davis, 2000). Ces deux sucres

polyfonctionnels doivent être liés de façon diastéréosélective avec respect de la configuration de la nouvelle liaison formée.

Les sucres protégés et activés appelés donneurs vont réagir sur les hydroxyles appelés accepteurs. La régiosélectivité est généralement réalisée quand le donneur glycosylant possède des groupes hydroxyles sélectivement protégés et un groupe activé sur le carbone anomérique. Cette glycosylation n'est possible que s'il y a présence d'acide de Lewis ou des sels ayant un caractère d'acide de Lewis, ce sont les « promoteurs ».

Il n'existe pas une seule et unique voie de synthèse pour atteindre un oligosaccharide cible. Néanmoins, chaque voie nécessite des stratégies protectrices compliquées, combinées à des procédures d'activation du carbone anomérique appropriées (Boons, 1996).

## 4.2. Synthèse chimique d'oligosaccharides

La plupart des approches dans le couplage osidique procèdent selon les mécanismes détaillés dans les figures 9 et 10. Le mécanisme proposé dans la figure 9 montre que le donneur portant un groupe partant sur son carbone anomérique est converti en ion oxocarbénium par action du promoteur. L'attaque de l'intermédiaire par l'accepteur glycosidique conduit au mélange de  $\alpha$ ,  $\beta$  glycosides (Koenigs, 1901).

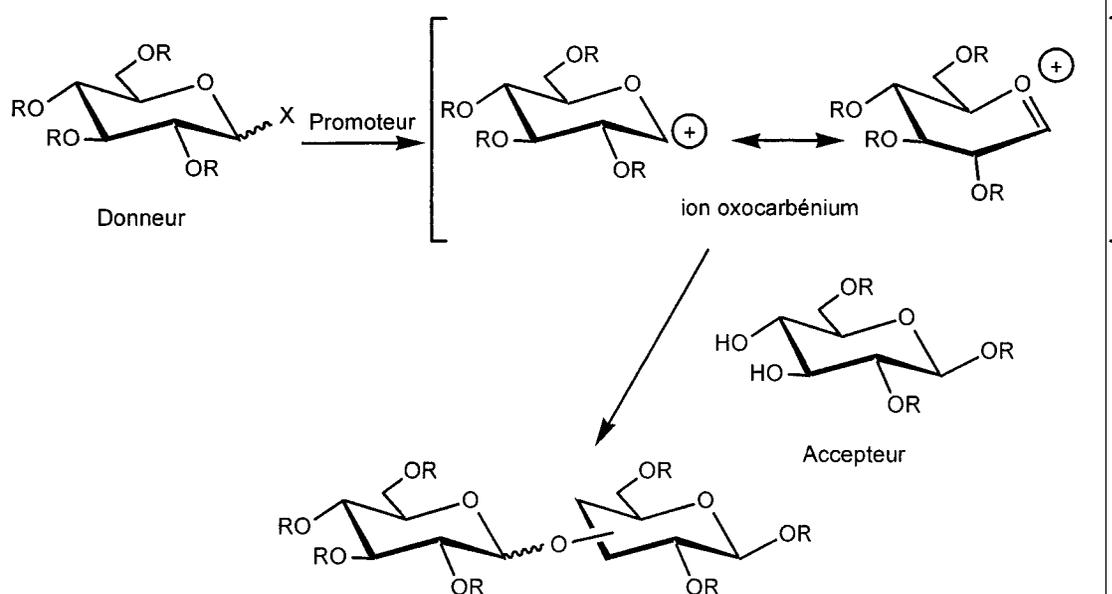
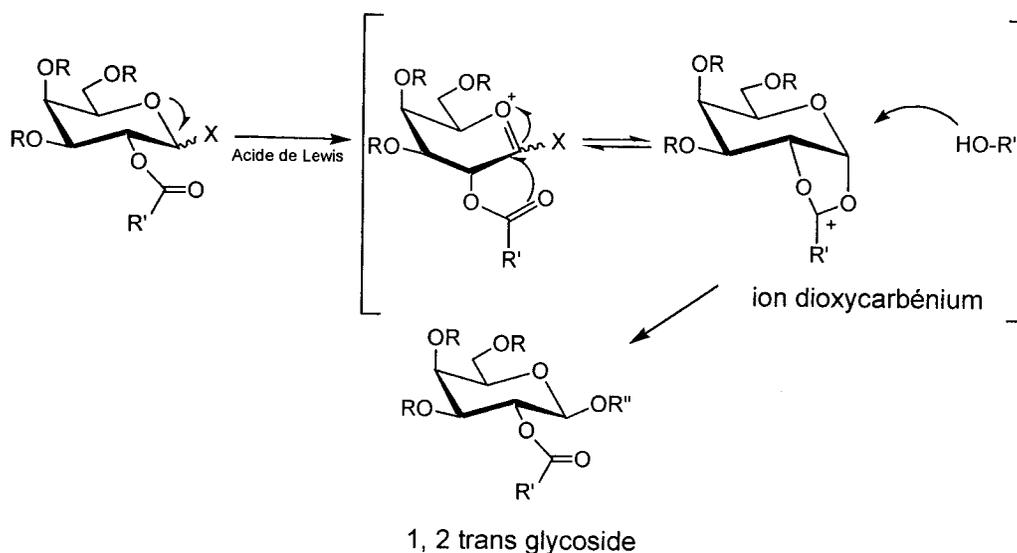


Figure 9. Approche générale d'une synthèse glycosidique

Pour faciliter la préparation du 1, 2 trans-glycoside (glucoside ou galactoside), le donneur nécessite un groupement participant, comme un ester sur la position 2 (figure 10). Au cours de la glycosylation l'ion oxocarbenium initialement formé interagit avec le groupement protecteur acétyle en position 2 pour former un ion dioxocarbenium plus stable. L'attaque nucléophile du centre anomérique permet l'ouverture de l'ion dioxocarbenium pour conduire au 1, 2 -trans glycoside.



**Figure 10.** Formation de la liaison 1, 2 trans avec la participation du groupement voisin

Différentes méthodes ont été proposées pour la synthèse chimique d'oligosaccharides. Parmi ces méthodes chimiques, il y en a trois connues pour avoir d'excellents résultats. La première est basée sur la réaction classique de Koenigs-Knorr (Flowers, 1971 ; Dejter-Juszynski, 1971, 1973) qui utilise les halogénures de glycosyles. Cette méthode est utilisée pour certains types de réactions (Schmidt, 1980, 1986), bien qu'elle a également une large application pour les glycosyles fluorés (Mukaiyama, 1981). La seconde méthode est celle des trichloroacétimidates (Fügedi, 1987 ; Schmidt, 1989, 1991) qui est très flexible, nécessite de basses températures et a besoin de temps de réactions étonnément courts. Les donneurs glycosyliques de trichloroacétimide sont facilement disponibles à partir des sucres réducteurs O-substitués correspondants, et ils peuvent être aisément activés par des acides de Lewis, tels que l'éthérate de trifluorure de bore, pour produire des intermédiaires d'ion oxocarbenium dans des conditions modérées. D'autre part, la relative labilité du groupe partant peut être un inconvénient dans certaines circonstances (conservation, chromatographie, etc.). La troisième importante méthode est celle des thioglycosides (Ogawa, 1984 ; Mootoo, 1988 ; Veeneman, 1990 ; Sliedregt, 1993). Contrairement aux bromures et trichloroacétimidates, les thioglycosides sont stables dans les conditions de

protection et de déprotection. Ils sont donc extrêmement utiles non seulement en tant que groupe protecteur de carbone anomérique mais également en tant que groupe partant. Ils doivent être activés par des acides de Lewis afin de les transformer en bon groupements partants. En réalité, il est difficile de prévoir laquelle de ces trois méthodes sera la mieux adaptée pour une certaine difficulté.

La synthèse des disaccharides implique la formation de liaison glycosidique entre deux monosaccharides polyfonctionnels, et le succès de la réaction de couplage dépend :

- de la réactivité du donneur et de l'accepteur
- du choix du catalyseur
- du type de protecteurs présents sur les deux unités saccharidiques
- et naturellement, de la sélectivité préférée de la réaction autrement dit, un produit de forme anomérique  $\alpha$  ou  $\beta$ .

L'expérience et les préférences de la personne entreprenant la réaction jouent également un rôle. Dans des cas difficiles, il faut examiner chacune des trois méthodes et changer les modèles de substitution des unités de disaccharide, afin de trouver les meilleurs résultats. C'est particulièrement le cas durant les synthèses de grands oligosaccharides comme ceux présentés par (Ogawa, 1984 ; Kanie, 1994) et (Hasegawa, 1991 ; Hotta, 1994).

D'autres groupements protecteurs du carbone anomérique ont été développés comme ceux cités dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Quelques donneurs lors de glycosylations et leurs promoteurs respectifs

	X	Promoteur
Halogène	Cl, Br, F	AgOTf SnCl <sub>2</sub> /AgClO <sub>4</sub>
Thioalkyle	SR	NIS/TfOH
Phosphate		DMTST
Pentényle		TMSOTf
Sulfoxyde	SOPh	NIS/Et <sub>3</sub> SiOTf
xanthate		Tf <sub>2</sub> O Cu(OTf) <sub>2</sub> DMTST
Phosphite		TMSOTf
Trichloroacétimide		TMSOTf

### 4.3 Glycosylation orthogonale par la différence des groupements protecteurs

Le défi principal d'une synthèse convergente par blocs est d'aboutir à un rendement élevé et un couplage stéréocontrôlé. Ogawa et Coll (Kanie, 1994) ont proposé une stratégie de glycosylation par blocs dans laquelle des manipulations ont encore été réduites jusqu'à l'étape d'oligosaccharide (Kanie, 1996). Dans cette approche (figure 11), on emploie deux groupements anomériques (X et Y). Le groupement (X) peut être activé sans affecter le groupement (Y) et *vice-versa*. En effet, le groupement protecteur anomérique d'accepteur glycosidique (Y), après glycosylation est converti

en groupement partant pour le prochain couplage dans des conditions qui laissent les autres groupements protecteurs inchangés. Ainsi cette méthode de glycosylation est dite orthogonale lorsqu'elle relie d'une façon orthogonale les propriétés de deux groupements anomériques différents.

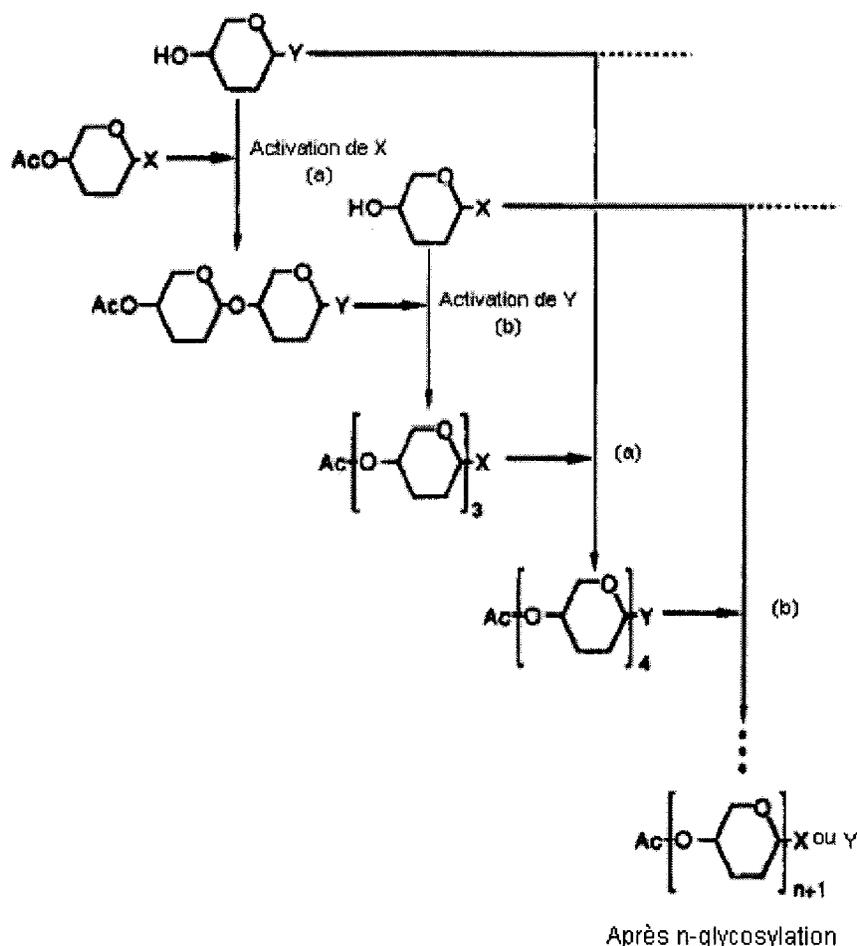


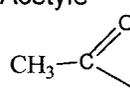
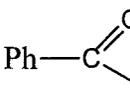
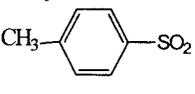
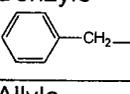
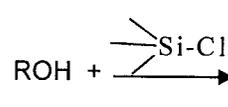
Figure 11. Stratégie de glycosylation orthogonale

#### 4.4 Les groupements protecteurs

Les glucides possèdent de nombreuses fonctions hydroxyles. Il est donc nécessaire pour réaliser des réactions régiospécifiques, de protéger temporairement, et différemment de la position anomérique, les positions qui ne sont pas impliquées dans le couplage désiré. Cette caractéristique est très présente dans la chimie des glucides. Une variété de groupements protecteurs (Tableau 2) est exigée pour effectuer la synthèse d'oligosaccharide de la façon la plus concise. Ces groupes jouent un rôle signifiant dans le contrôle de la stéréochimie du glycoside. Les principales conditions exigées de ces groupements lors d'une synthèse glycosidique sont :

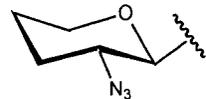
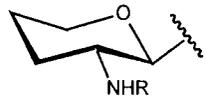
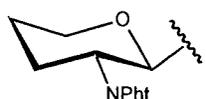
- Clivage facile avec de bons rendements
- Stabilité lors des réactions suivantes
- Réaction aisée et sélective avec de bons rendements.

**Tableau 2.** Quelques groupes protecteurs usuels et leurs conditions de clivage

Groupe bloquant	Méthodes	Clivage
Acétyle 	(Ac) $\text{ROH} + \text{Ac}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Pyr}} \text{R-OAc} + \text{AcOH}$	$\text{NH}_3$ ou $\text{CN}^-$ $\text{Et}_3\text{N}$ , $\text{NaOCH}_3$
Benzoate 	(Bz) $\text{ROH} + \text{PhCOCl} \xrightarrow{\text{Pyr}} \text{R-OBz}$	$\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$
Tosylate 	(Ts) $\text{ROH} + \text{TsCl} \xrightarrow{\text{Pyr}} \text{R-OTs}$	$\text{PhCONa} \longrightarrow \text{OH}$ $\text{AlLiH}_4 \longrightarrow \text{CH}_2$
Méthyle 	(Me) $\text{ROH} + \text{Me}_2\text{SO}_4 \xrightarrow{\text{OH}^-} \text{R-OMe}$	Base ou $\text{BF}_3$
Benzyle 	(Bn) $\text{ROH} + \text{BnCl} \xrightarrow[\text{DMF}]{\text{NaH}} \text{R-OBn}$	Hydrogénolyse $\text{H}_2/\text{Pd/C}$
Allyle $\text{CH}_3\text{-CH=CH-}$	(AlI) $\text{ROH} + \text{ClAlI} \xrightarrow[\text{DMF}]{\text{NaH}} \text{R-OAlI}$	$\text{TBuOK/DMSO}$ ; $(\text{PPh}_3)_3\text{RhCl}$
Tertibutyldiméthylsilyl $(\text{CH}_3)_2\text{tBuSi}$ (TBDS)	 $\text{ROH} + \text{Si-Cl} \longrightarrow \text{R-O-Si}$	$\text{Bu}_4\text{N}^+$ , $\text{F}^-$

Beaucoup d'oligosaccharides portent des groupements amine ou acétamide, les groupes protecteurs les plus utilisés sont cités avec leurs conditions de clivage dans la tableau 3.

**Tableau 3.** Quelques groupements protecteurs des fonctions amines

		<b>Clivage</b>
		H <sub>2</sub> /Pd
	Si R = CH <sub>3</sub> CO- Si R = CCl <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OC(O)-: Troc Si R = ArSO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	MsOH, MeOH Zn-CH <sub>3</sub> COOH Na/NH <sub>3</sub> ou Ac <sub>2</sub> O/DMAP)
		NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>

## 5. STRATEGIE DE SYNTHÈSE DES TRISACCHARIDES LE<sup>a</sup> ET LE<sup>x</sup>

Les antigènes Lewis sont des oligosaccharides biologiquement importants. La complexité de leurs structures a attiré l'attention de beaucoup de chercheurs de chimie des glucides. Diverses recherches ont été effectuées précédemment afin de préparer les trisaccharides Lewis A et Lewis X (Jaquinet, 1979 ; Hindsgaul, 1982 ; Rana, 1983 ; Lönn, 1985 ; Sato, 1987 ; Classon, 1989 ; Nilsson, 1989 ; Nicolaou, 1990 ; März, 1992 ; Von dem Bruch, 1994 ; Toepler, 1994 ; Windmüller, 1994). Les conditions de glycosylation ont été atteintes après une expérimentation étendue optimisant différents paramètres tels que promoteurs, température, temps et solvant.

L'analyse rétrosynthétique du trisaccharide Lewis X proposée dans la figure 12 révèle qu'il est possible d'avoir deux disconnections différentes a et b. La voie A indique que la première glycosylation dans la synthèse du trisaccharide Le<sup>x</sup> est la galactosylation du diol glucosamine (Tableau 4). Cette dernière est suivie par une fucosylation de la lactosamine (Tableau 5). Par contre dans la voie B, la première étape est la fucosylation du diol glucosamine, suivie par la condensation du synthon galactose.

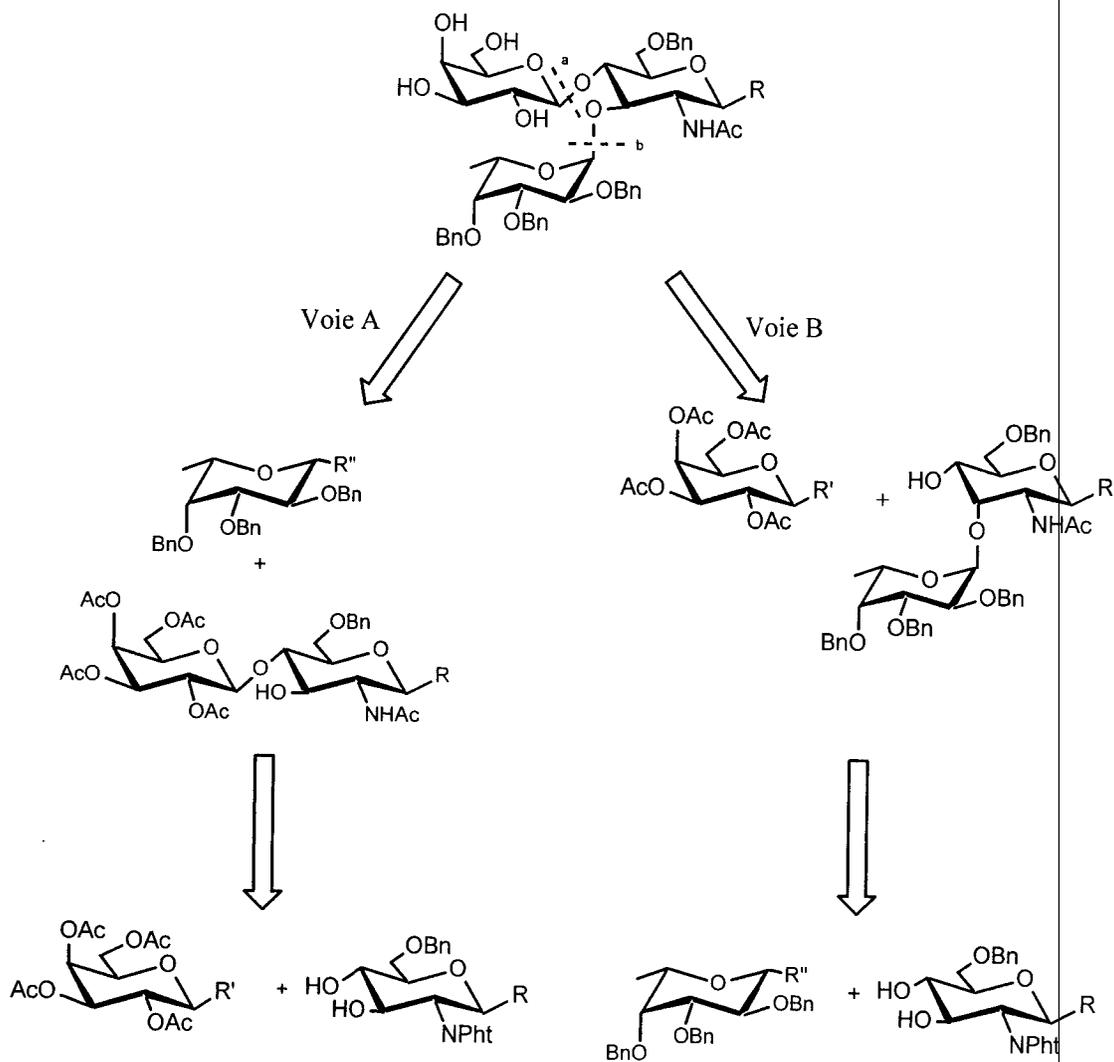


Figure 12. Analyse rétrosynthétique du trisaccharide Lewis X

Plusieurs galactosylations du diol glucosamine sont apparues dans différentes séries de synthèses de Lewis A et Lewis X (Tableau 4). Les accepteurs pourront être partagés en trois différents types dépendants du groupement protecteur de la fonction amine. Le groupement protecteur de la fonction amine des trois premières glucosamines du tableau 4 est un groupement phtalimide, et nous avons constaté que les produits formés majoritairement sont de type  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), probablement à cause de la gêne stérique causé par le groupement phtalimide (Nicolaou, 1990 ; Jain 1994 ; Numomura, 1994 ; Zhang, 1995 ; Jain, 1996). Cependant, la galactosylation des accepteurs qui portent un groupement azide (moins volumineux que le phtalimide) forment des produits de liaison glycosidique  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) en excès, ceci indique qu'en absence de gêne stérique la position HO-3 est plus réactive que la position HO-4 (Nikrad, 1993 ; Numomura, 1994). Finalement, la galactosylation du 3<sup>ème</sup> type portant un groupe acétamide, présente un mélange de deux produits 1 : 1  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (Lemieux, 1975 ; Von dem bruch, 1994).

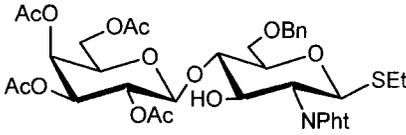
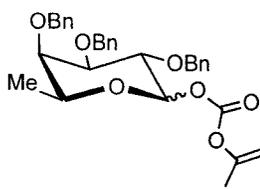
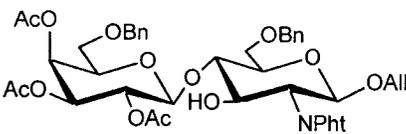
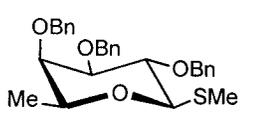
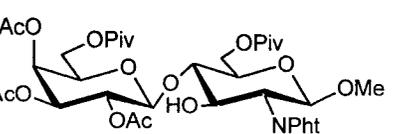
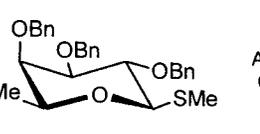
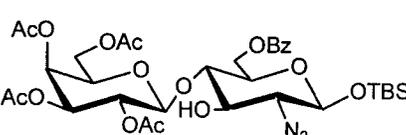
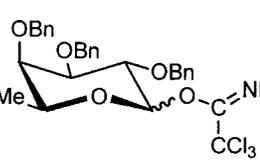
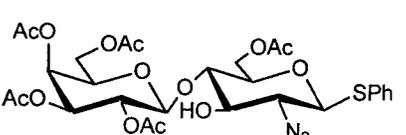
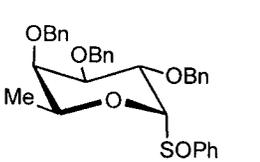
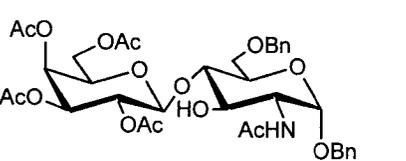
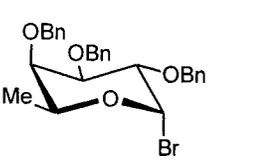
**Tableau 4.** Galactosylations regioselective reportés dans la littérature

Accepteur	Donneur	Conditions expérimentales	Rendement, 1-4:1-3 (%)
		AgOTf (1.2éq), SnCl <sub>2</sub> (1.2éq), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Toluène (5:1), -15a 20 °C, 4h	R=OBn 50:17(2.94:1) R=OMe 48:21
		AgOTf (1.2éq), SnCl <sub>2</sub> (1.2éq), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Toluène (5:1), -15a 20 °C, 2h	45:25(1.80:1)
		MeOTf (1.2éq), -15 °C	61:17(3.59:1)
		TMSOTf (2.8éq), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 22 °C, 1.5h	24:42(0.57:1)
		BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O (0.04éq), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Hexane (1:1), -25°C, 1h	22:65(0.34:1)
		AgOTf (2.0éq), MSB (2.1éq), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -15°C, 4.5h	36:45(0.80:1)

Ces galactosylations sont suivies par des fucosylations selon la voie A (Tableau 5). Le couplage désiré de stéréochimie alpha est donc les donneurs doivent posséder des groupements non participants en position 2 comme les groupements benzyles. Les réactions citées dans le tableau 5 avec leurs conditions expérimentales montrent la grande diversité des groupements protecteurs des positions anomériques des synthons donneurs et accepteurs. Ces synthèses ont été réalisées (Jacquinet, 1979 ; Numomura, 1994 ; Toepfer, 1994 ; Zhang, 1995 ; Jain, 1996) avec d'excellents rendements.

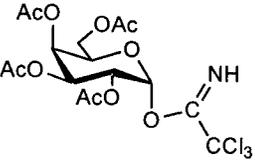
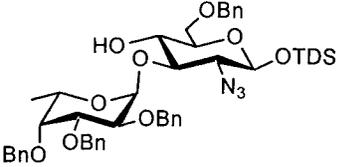
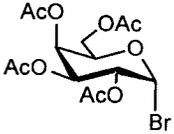
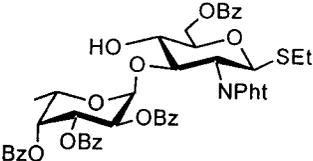
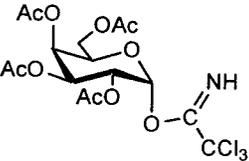
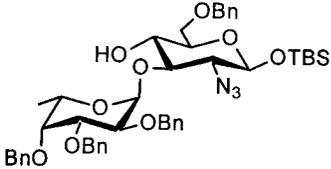
Cela reste toujours difficile de faire son choix entre ces différents groupements et donc dépendra essentiellement de la personne qui entreprend la réaction et de la molécule cible qu'elle veut atteindre.

Tableau 5. Fucosylations reportés dans la littérature

Accepteur	Donneur	Conditions expérimentales	Rendement
 <p><b>Zhang, 1995</b></p>		TMSOTf (1.2éq), Et <sub>2</sub> O 0 °C, 1h	85%
 <p><b>Numomura, 1994</b></p>			77%
 <p><b>Jain, 1996</b></p>		AgOTf (2éq), DTBMP, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Toluène (2:3), -35 °C, 3h	79%
 <p><b>Toepfer, 1994</b></p>		TMSOTf (0.01éq), Et <sub>2</sub> O	78%
 <p><b>Yan, 1996</b></p>		Tf <sub>2</sub> O, DTBMP, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -78 °C à 0 °C, 1.5h	83%
 <p><b>Jacquinet, 1979</b></p>		BrNBu <sub>4</sub> , 1, 2-dichloroéthane, DMF (1:1), T.A, 5j	85%

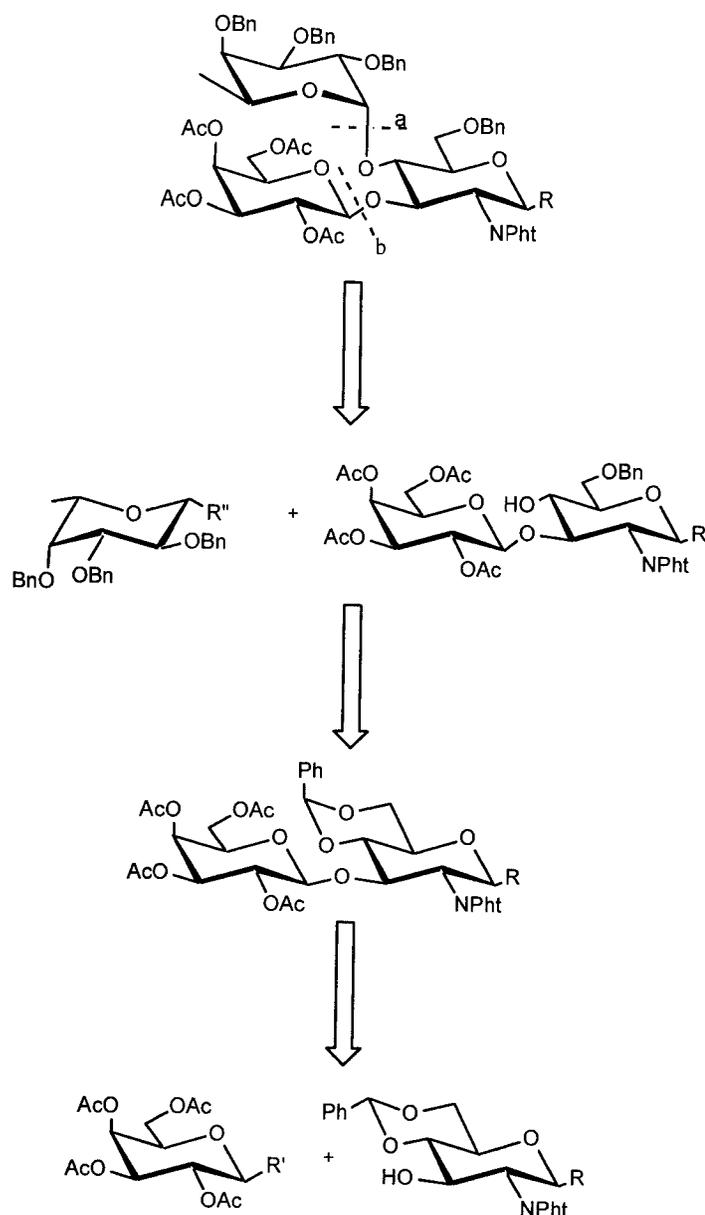
D'autres publications indiquent un mode de préparation du trisaccharide Lewis X en suivant la voie B (figure 12), c'est à dire en partant du disaccharide formé par le couplage entre le synthon glucosamine et le synthon fucose ; le synthon galactose n'est introduit qu'en dernier lieu. Le tableau 6 reporte respectivement les conditions et les différents rendements des réactions décrites dans divers articles.

**Tableau 6.** Synthèses du trisaccharide Lewis X reportés dans la littérature

Donneur	Accepteur	Conditions expérimentales	Rendement
 <b>Hummel, 1997</b>		TMSOTf, Et <sub>2</sub> O	85%
 <b>Lönn, 1985</b>		AgOTf, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Toluène (3:2) 2, 4, 6-triméthylpyridine, -20 °C	53%
 <b>Toepfer, 1994</b>		TMSOTf (0.04 eq), Et <sub>2</sub> O	71%

Dans cette voie on assiste à une étape supplémentaire par rapport à la voie A qui est l'ouverture du groupement benzylidène protecteur des positions 4 et 6 de l'accepteur avant la galactosylation. En examinant la synthèse décrite par Hummel et Toepfer dans le tableau 6, on remarque bien l'influence du groupement protecteur du carbone anomérique de l'accepteur sur le rendement de la réaction. L'intérêt du choix de la voie A, lors de notre étude, est dans le fait que cette méthode possède une étape en moins par rapport à la voie B, tout en obtenant la molécule cible avec un rendement relativement bon.

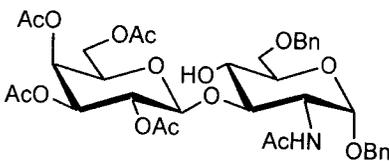
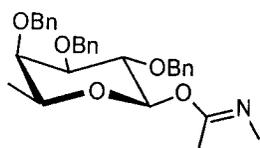
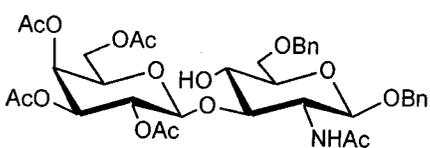
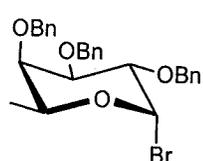
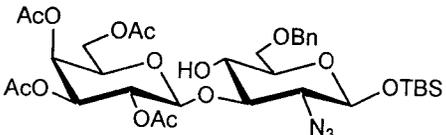
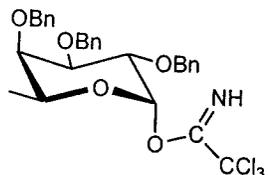
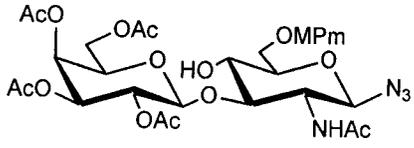
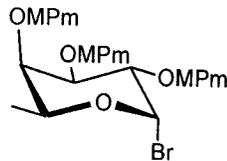
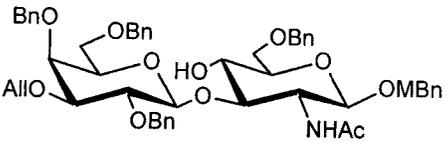
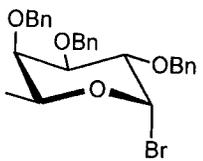
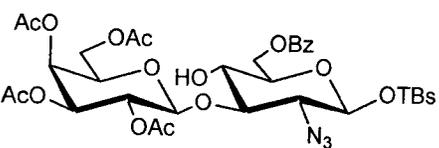
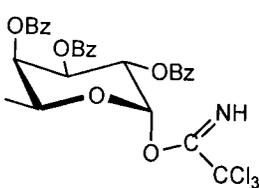
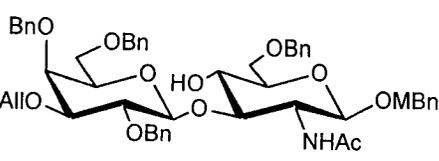
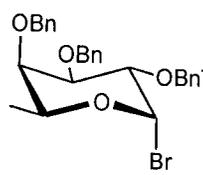
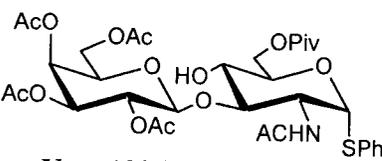
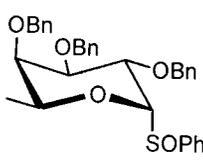
L'analyse rétrosynthétique du trisaccharide Lewis A qui est un isomère du trisaccharide Lewis X représentée sur la figure 13 est décrite dans la majorité de publications. Cette synthèse débute par la galactosylation du bloc glucosamine où les positions 4 et 6 sont protégées par un groupement benzylidène pour conduire au bloc lactosamine, qui va subir une déprotection de la position 4 afin de pouvoir être fucosylé.



**Figure 13.** Analyse rétrosynthétique du trisaccharide Lewis<sup>a</sup>

Le tableau 7 reporte les différents travaux réalisés dans le but de synthétiser le trisaccharide Lewis A où les fucosylations sont réalisés avec d'excellents rendements. Dans notre cas, la préparation du bloc lactosamine était beaucoup plus complexe que celle du trisaccharide en raison de la gêne stérique provoquée non seulement, par le groupement benzylidène en position 4 et 6 de la glucosamine, mais aussi par le groupement phtalimido en position 2 et le groupement phénylthio sur la position anomérique.

Tableau 7. Synthèses du trisaccharide Lewis A reportés dans la littérature

Accepteur	Donneur	Conditions expérimentales	Rendement
		TMSOTf (1.2éq), nitométhane 0 °C, 1h	85 %
<b>Jacquinet, 1979</b>			
		NEt <sub>4</sub> Br, DMF, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> diisopropyléthylamine	83 %
<b>Rana, 1983</b>			
		TMSOTf (0.01éq), Et <sub>2</sub> O	78 %
<b>Schmidt, 1991</b>			
		NEt <sub>4</sub> Br, DMF, 2,6-di-tert-butyl-pyridine	95 %
<b>März, 1992</b>			
		NEt <sub>4</sub> Br, DMF, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> diisopropyléthylamine	80 %
<b>Lubineau, 1993</b>			
		TMSOTf, Et <sub>2</sub> O	78 %
<b>Toepfer, 1993</b>			
		DIPEA (2.7éq), DMF, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> BrNBu <sub>4</sub> (1.5 éq), TA, 72h	89 %
<b>Lubineau, 1994</b>			
		Tf <sub>2</sub> O (1éq), DTBMP, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -78°C- 0°C, 1.5h	95 %
<b>Yan, 1996</b>			

## 6. QUELQUES NOTIONS SUR LES GLYCOSPHINGOLIPIDES

Les glycolipides sont issues d'une association entre un ou plusieurs glucides et un lipide. Ces molécules se trouvent essentiellement au niveau de la monocouche externe des membranes plasmiques et y jouent des rôles majeurs. On sait aujourd'hui que leur structure change lorsqu'une cellule devient cancéreuse et on pense qu'elles sont impliquées dans les communications intercellulaires. Dans le type sphingolipide, l'oligosaccharide est lié de façon glycosidique à la fonction primaire d'un aminoalcool à longue chaîne. Le plus communément observé est la sphingosine (Schmidt, 1982 ; Murakami, 1996) représentée sur la figure 13.

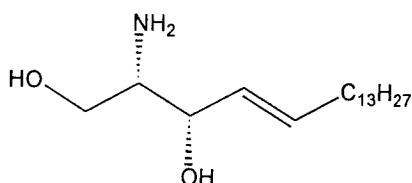


Figure 13. Sphingosine

Dans les glycosphingolipides (Nicolaou, 1990 ; Zhang, 2001), la fonction amine est engagée dans une liaison amide avec un résidu acyle dérivé d'un acide gras à longue chaîne. Il y a une grande variété de dérivés de ce type, auxquels on donne le nom de céramide (cer) (figure 14).

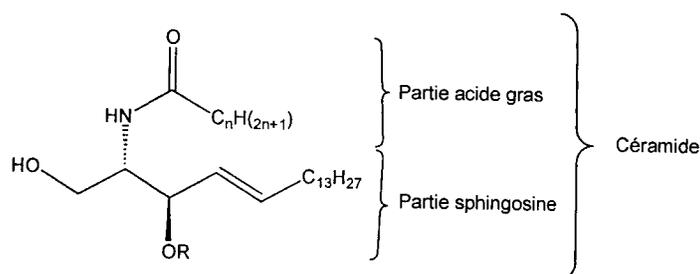


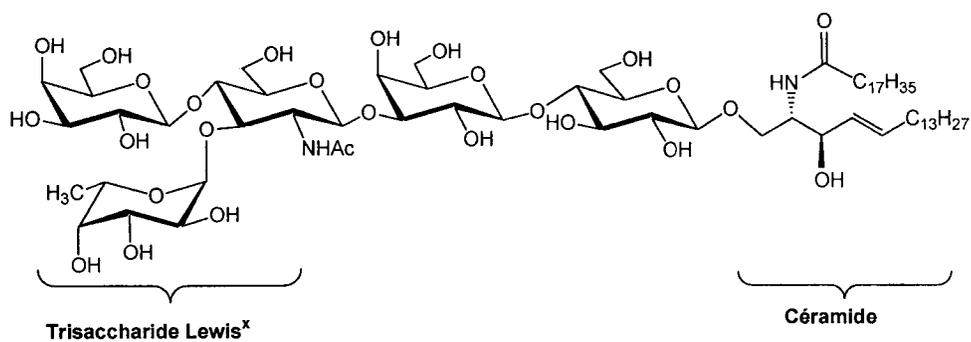
Figure 14. Description d'une céramide

Les glycolipides des tissus animaux (sans acide sialique) sont presque exclusivement des glycosphingolipides. Le classement en familles repose sur l'enchaînement des résidus monosaccharidiques attachés à la céramide (Tableau 5).

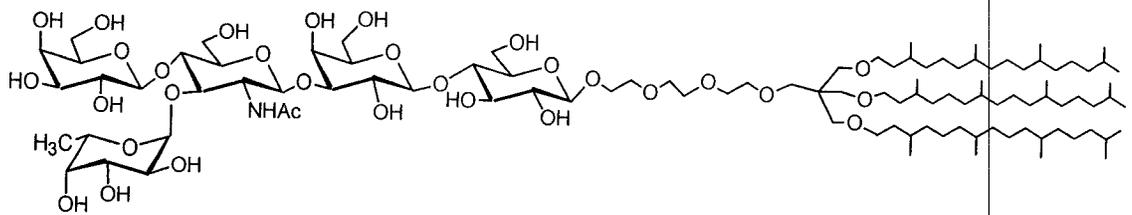
**Tableau 5.** Familles de glycosphingolipides neutres

Globo	GalNAc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc- $\beta$ -(1-Cer)
Isoglobo	GalNAc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc- $\beta$ -(1-Cer)
Lacto	Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc- $\beta$ -(1-Cer)
Néolacto	Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ Cer)
Ganglio	Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ Cer)
Muco	Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ Cer)
Gala	Gal- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ Cer)

Différents sphingolipides ont été préparés au sein de notre laboratoire dans le but de quantifier l'interaction de glycolipides à tête Lewis X. Il a été démontré que le glycolipide (produit naturel, isolé et purifié par l'équipe d'Hakomori, Seattle, WA, USA) n'était pas bien adapté aux études physiques, il est en effet très soluble dans l'eau, donnant des monocouches perdant peu à peu (15 % en 2h) le glycolipide (figure 15), alors que les phospholipides usuels (stéaryl oléyl phosphatidyl choline, SOPC) se montrent très peu solubles.

**Figure 15.** Glycolipide naturel

Afin de résoudre ce problème, des néoglycolipides moins hydrophiles ont été préparés (figure 16), et dont la partie lipidique a été modifiée par rapport au glycolipide naturel pour optimiser son comportement dans les monocouches (Bréant, 2000 ; Esnault, 2001). En effet, trois chaînes lipidiques remplacent les deux chaînes de la céramide ; ceci diminue la solubilité dans l'eau et assure l'équilibre entre les tailles des parties hydrophile et hydrophobe. La partie lipidique saturée et branchée (phytyle) remplace les chaînes linéaires et insaturées de la céramide tout en garantissant sa fluidité. Un espaceur long (triéthylène glycol) présente mieux l'oligosaccharide. Le répartiteur est le pentaerythrytol.



**Figure 16.** Néolipide pentasaccharidique

Des résultats encourageants ont poussés les chercheurs à développer des stratégies de synthèse dans le but de produire des glycolipides polyLewis X (Toepfer, 1992 ; Bregant, 2000).

# CHAPITRE 2

## PARTIE THEORIQUE

---

### 1. INTRODUCTION

Une étude préliminaire en collaboration avec l'équipe du Dr Perez du laboratoire de physique statistique de l'ENS, a montré qu'il existait une interaction entre deux néoglycolipides dont la tête polaire porte un trisaccharide Lewis X. Dans le but de déterminer les éléments structuraux responsables de cette interaction sélective et spécifique, nous avons tenté de désoxygéner les différents synthons formant le trisaccharide Lewis X. Grâce à l'emploi des techniques de micromanipulation de vésicules, nous pouvons ainsi évaluer avec précision les groupements hydroxyles impliqués dans la reconnaissance  $Le^x$ - $Le^x$  sous la médiation du calcium. Nous avons commencé cette étude par la désoxygénation du synthon galactose qui semble avoir une activité biologique (Hecht, 1999) lors des interactions lectine-sucre et aussi pour son faible coût par rapport au L-fucose. Divers auteurs ont essayé de désoxygéner le galactose dans le but de faire des études d'interaction protéine-sucre. On peut citer les travaux de Lemieux (1991), Paulsen (1992), Spohr (1992) et Janczuck (2002). La désoxygénation du L-fucose a été tentée par Hasegawa (1994) sur les positions 2, 3 et 4 dans le but d'une reconnaissance sélective-sialyl Lewis<sup>x</sup>.

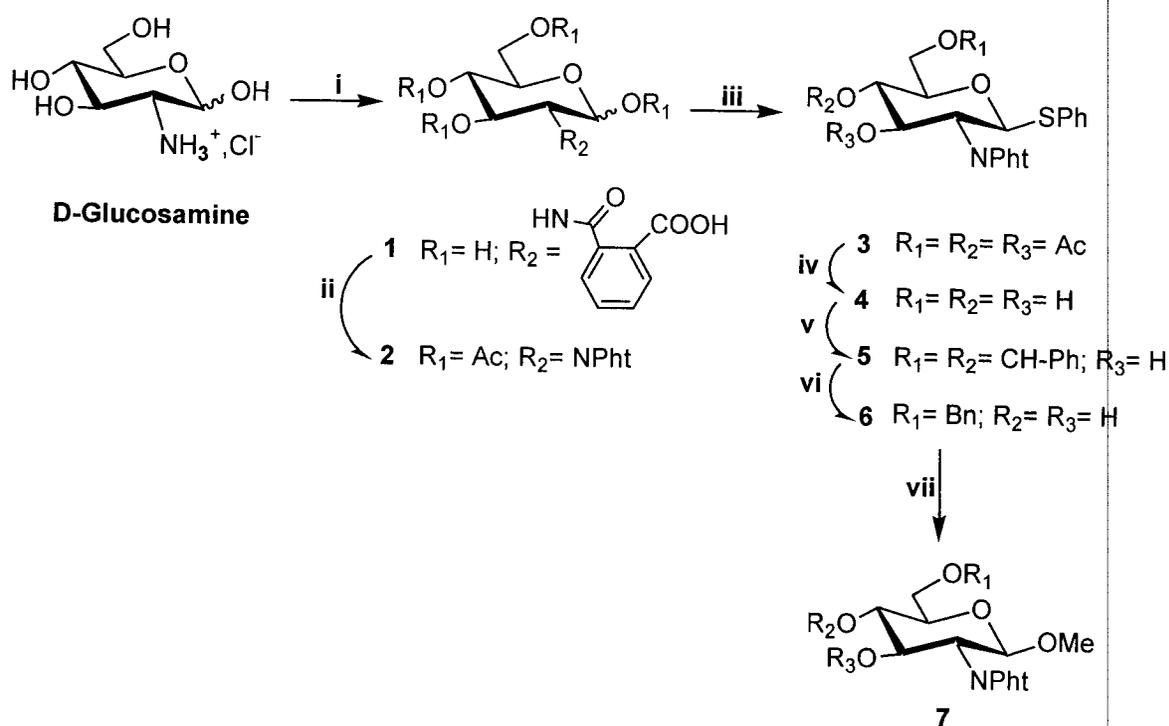
Pour pouvoir tester cette spécificité de l'interaction nous avons préparé un glycolipide naturel dont la tête polaire porte un trisaccharide Lewis A, et nous avons essayé de mesurer l'interaction sucre-sucre par l'adhésion des vésicules avec un glycolipide portant un trisaccharide Lewis X. Cette mesure a été effectuée et a fait l'objet d'un article (Gourier, 2005) qui nous a permis de bien confirmer la spécificité de cette interaction.

La synthèse chimique d'un oligosaccharide n'est possible que si des blocs de plusieurs résidus sont préalablement préparés de manières indépendantes puis couplés de façon convergente. Ainsi, nous avons été amenés à préparer différents blocs tels que le bloc fucose, le bloc galactose et le bloc glucosamine à partir de produits commerciaux.



## 2. PREPARATION DU SYNTHON GLUCOSAMINE

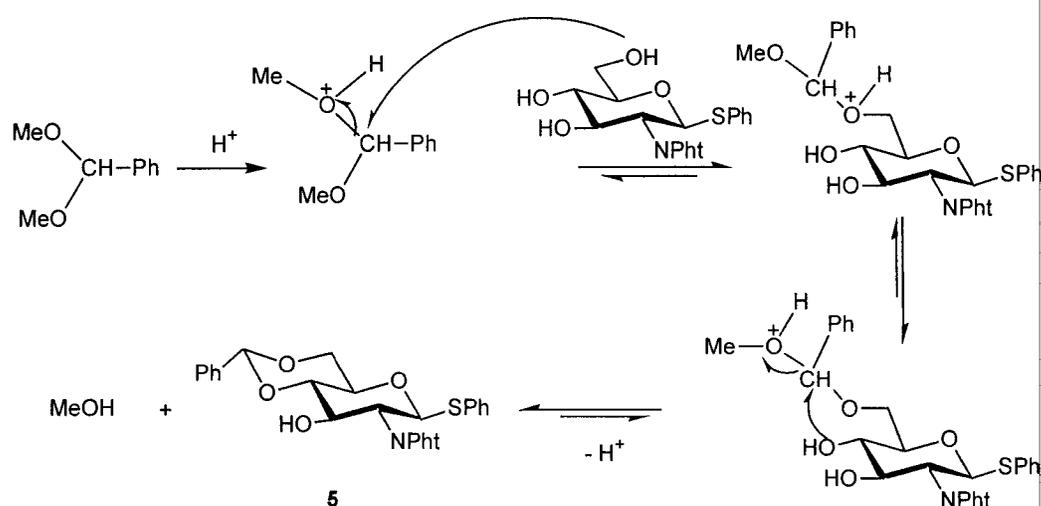
Les synthons **6** et **7**, préparés selon le schéma 1, seront utilisés comme sucre accepteur lors de la glycosylation avec le synthon galactose.



**Schéma 1.** (i) Anhydride phtalique,  $NaHCO_3$ ,  $H_2O$ , TA, 1 nuit, 92% ; (ii)  $Ac_2O$ , Py, MeOH, TA, 1 nuit, 80% ; (iii) PhSH,  $BF_3 \cdot Et_2O$ , DCM, TA, 2 jours, 79% ; (iv) HCl (6M),  $H_2O$ / Acétone, 60 °C, 1 nuit ; (v)  $\alpha, \alpha$ -diméthoxytoluène, CSA, DMF, Ar, 45 °C, 1 h, 93% ; (vi) TFA/ TSE, DCM, 0 °C, 69% ; (vii) NBS, TfOH, MeOH, Tamis moléculaire 4 Å, DCM, -10 °C, 1h, 81.5%.

La première protection concerne l'amine qui est très réactive, et on choisit comme groupement protecteur le phtalimido, qui est encombrant et contribue à la formation stéréosélective du glycoside. A 40 °C, le chlorhydrate de D-glucosamine est dissous dans un mélange d'eau, d'hydrogénocarbonate de sodium et d'anhydride phtalique (Banoub, 1992). Après acidification (pH 5) et concentration du mélange, le produit **1** (Hirano, 1971) est séché sous  $P_2O_5$ , puis directement engagé dans l'étape suivante qui permet la formation du groupement phtalimide (NPht) en position 2 (Lemieux, 1976 ; Sasaki, 1978 ; Lemieux, 1982 ; Debendham, 1997 ; Bowers, 1998), et aussi la peracétylation de **1**. La raison pour laquelle, des groupements acétyles ont été choisis comme groupements protecteurs des fonctions alcools est qu'ils sont facilement enlevés en milieu acide sans affecter le groupement phtalimide. Pour ce faire, l'intermédiaire **1** est dissous dans un minimum de méthanol, puis la pyridine et l'anhydride acétique sont rajoutées. Après différents traitements et purification, le composé **2** est obtenu avec un rendement de 80%.

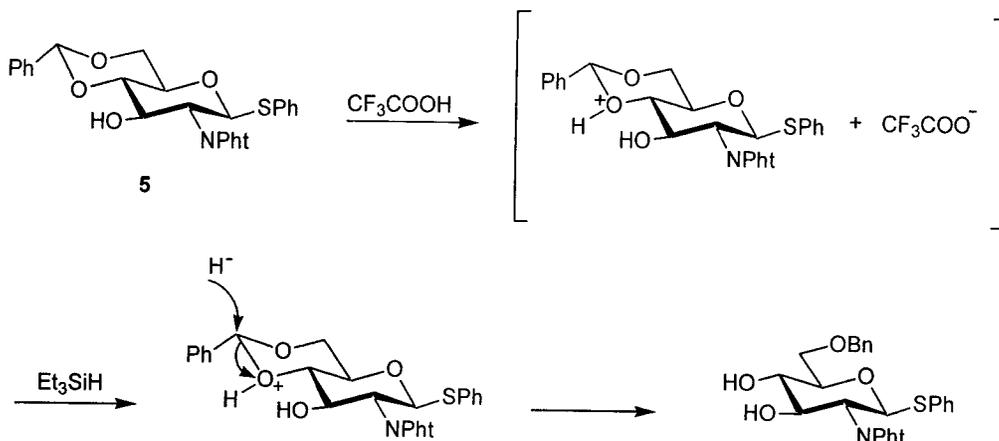
Cet intermédiaire **2** (Baker, 1954) est dissous dans le dichlorométhane anhydre, en présence de thiophénol et un acide de Lewis : le trifluorure de bore dans le diéthyléther ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) (Zhang, 1996 ; Chowdhury, 1996). Après traitement et purification le composé **3** (Ogawa, 1981 ; Jain, 1992) est récupéré avec un rendement de 80%. Ce dernier est obtenu uniquement sous forme d'isomère  $\beta$  et ceci grâce à la participation du groupe voisin, le phtalimide. En effet, l'analyse  $^1\text{H}$  RMN montre que la constante de couplage H-1/H-2 est de  $J_{1,2} = 10.5$  Hz. Cette constante de couplage est caractéristique des configurations trans di-axiale en série glucopyrannoside. La désacétylation qui suit, ne peut alors se faire dans les conditions classiques de transestérification en milieu basique (MeOH, NaOMe) qui détruirait le groupe phtalimide. La déprotection s'est donc effectuée en milieu acide pendant une nuit. Après concentration, le produit brut **4** est directement engagé dans l'étape suivante qui consiste en une protection du diol **4, 6** par un groupe benzylidène (figure 1). En présence d'une quantité catalytique d'acide 10-d, 1-camphorsulfonique, le composé **4** est dissous dans la N, N-diméthylformamide et sa réaction à 40 °C avec le benzaldéhyde diméthylacétal libère le méthanol qui doit être éliminé lors de sa formation afin d'obtenir une irréversibilité du système, déplaçant alors l'équilibre de la réaction vers la formation totale du produit **5** (Jain, 1992).



**Figure 1.** Mécanisme de benzylidénation de la D-glucosamine

Cette protection simultanée des HO-4 et HO-6 était nécessaire pour protéger ensuite sélectivement l'hydroxyle en 6 par un groupement benzyle. En effet, l'ouverture sélective du 4, 6-O-benzylidène permet l'obtention du dérivé 6-O-benzyl-4-hydroxy, et ceci dans un mélange de triéthylsilane et d'acide trifluoroacétique (DeNinno, 1995). L'acide protone l'oxygène le plus basique de l'acétal, ensuite l'hydrure permet l'ouverture réductrice afin d'obtenir le dérivé 6-O-benzylé (figure 2) avec un rendement de 70% après purification. Cette étape pouvait se faire dans les conditions d'ouverture classique  $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{HCl}/\text{THF}$  (Garegg, 1981) ou

$\text{Me}_3\text{NBH}_3/\text{AlCl}_3/\text{THF}$  (Garegg, 1984). Le rendement global de cette synthèse en 6 étapes est de 31%.

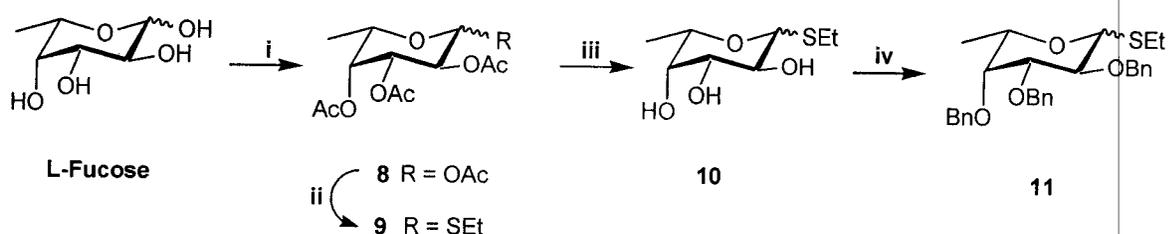


**Figure 2.** Mécanisme de l'ouverture réductrice régiosélective du 4,6-benzylidène dans les conditions TFA/TSE

Le produit **7** a été préparé dans le but de synthétiser les différents trisaccharides désoxygénés en position 3, 4 et 6 du synthon galactose. La réaction de glycosylation entre le méthanol et le composé **6** en présence de la N-bromosuccinimide permet d'obtenir le composé **7** après purification avec un rendement de 82%.

### 3. PREPARATION DU SYNTHON FUCOSE

Le groupe anomère donneur employé est un thioéthyle. Il a été choisi pour sa stabilité dans les réactions de protection et de déprotection envisagées et pour sa réactivité dans les réactions de glycosylations. Ce synthon devra participer à une réaction de couplage avec le disaccharide lactosamine. Le groupement protecteur en position 2 choisi est un groupement benzyle, afin d'avoir un couplage en  $\alpha$ -fucopyranosyle. Le rendement global de cette synthèse en 4 étapes est de 65%.



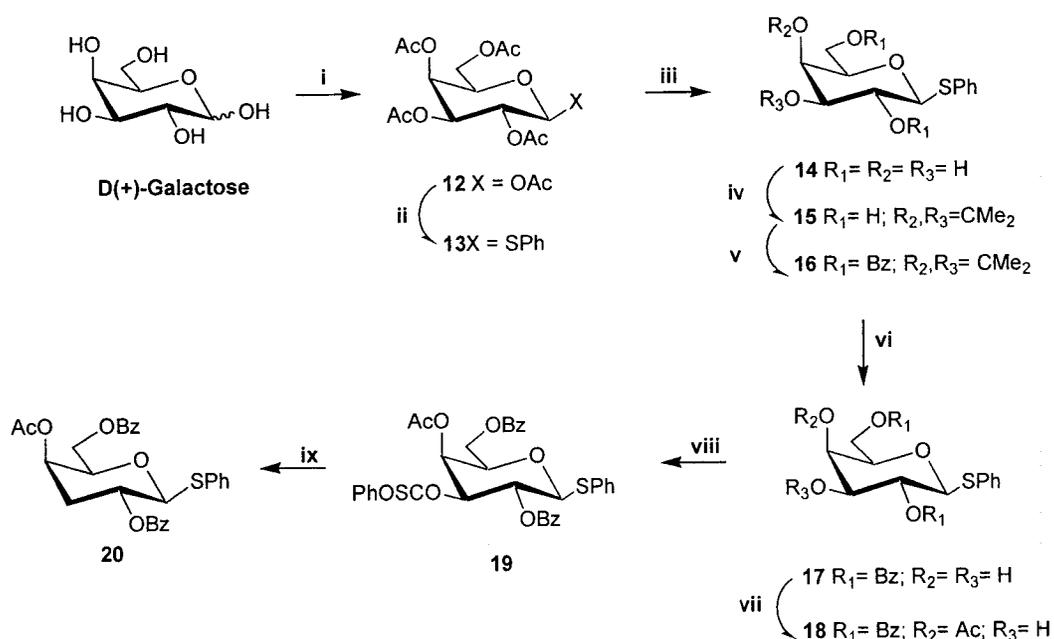
**Schéma 2.** (i)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Py (2 / 1), 100 °C, 1h ; (ii) EtSH,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , DCM, Tamis moléculaire 4 Å, 1.5h, 95% (2 étapes) ; (iii) NaOMe, MeOH, TA, 2h, 95% ; (iv) BnBr, DMF, NaH (60%), TA, 1 nuit, 77%.

Le synthon fucose **11** est préparé en quatre étapes (Schéma 2) à partir du L-fucose commercial (Lönn, 1985 ; Kristen, 1988). Après avoir procédé à une peracétylation par l'anhydride acétique dans la pyridine, le composé **9** est préparé dans les conditions de thioéthylation (Ferrier, 1976 ; 1980), dans le dichlorométhane anhydre (EtSH/BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O). Il est obtenu avec un rendement de 95% sur deux étapes sous forme d'un mélange de deux isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ . Le produit brut est engagé dans la réaction de désacétylation dans les conditions basiques (NaOMe/MeOH) (Zemplén, 1929) pour former le produit **10**. Cette déprotection est suivie d'une benzoylation par le bromure de benzyle dans la N, N-diméthylformamide contenant de l'hydruide de sodium en suspension (Brimacombe, 1972 ; Garegg, 1979). Le produit **11** est obtenu sous forme de deux épimères dont les configurations ont été établies grâce aux constantes de couplage  $J_{1,2}$  observées en R.M.N du proton. Elle est égale à 5 Hz pour le composé  $\alpha$  et 9.5 Hz pour le composé  $\beta$ . Le synthon fucose ainsi préparé sera couplé à la lactosamine pour synthétiser les différents trisaccharides.

#### 4. PREPARATION DU SYNTHON GALACTOSE

Les différents synthons galactose sont synthétisés pour servir de blocs donneurs dans les réactions de glycosylation avec le synthon glucosamine **7**.

##### 4.1. Désoxygénation de la position 3 du galactose



**Schéma 3.** (i) NaOAc, Ac<sub>2</sub>O, 140 °C, 1h, 56% ; (ii) PhSH, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, DCM, Ar, 1 nuit, 90% ; (iii) MeOH, NaOMe, TA, 1 nuit ; (iv) 2,2-diméthoxypropane, CSA, TA, 1 nuit, 89% (2 étapes) ; (v) BzCl, Py, TA, 1 nuit, 96% ; (vi) AcOH, H<sub>2</sub>O, 80 °C, 1.5h, 93% ; (vii) (EtO)<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>, CSA, puis AcOH 80% aq, 1 nuit, 93% ; (viii) PhOSCl, Py, DCM, 14h, 98% ; (ix) Bu<sub>3</sub>SnH, AIBN, 80 °C, 1h, 85%.

L'acétylation du D-galactose commercial selon un procédé classique (NaOAc/Ac<sub>2</sub>O) conduit au β-penta-acétate galactopyranoside (Hudson, 1915) avec un rendement de 56% (Schéma 3). La position anomérique est activée par un groupement thiophényle en présence d'éthérate de trifluorure de bore dans le dichlorométhane anhydre, le dérivé **13** (Das, 2003) est donc obtenu avec un rendement de 90% uniquement sous l'anomérie β. Ce résultat peut s'expliquer par la participation de l'acétate en position 2. Ce composé est alors engagé dans l'étape de déprotection, soit une désacétylation dans les conditions classiques basiques (NaOMe/MeOH) (Zemplén, 1923) pour mener au dérivé **14** (Janczuk, 2002). Ce dernier solubilisé dans le 2, 2-diméthoxypropane en présence de l'acide 10-d, 1-camphorsulfonique conduit à un mélange de produits. La CCM indique qu'il y a présence d'un produit secondaire majoritaire. Après neutralisation du milieu et concentration, ce résidu est repris dans un mélange de méthanol-eau 10/1 et porté à reflux pendant 3h pour conduire uniquement au composé **15** (Catelani, 1988 ; Fernandez-Mayoralas, 1989) avec un rendement de 89%. Le blocage des positions 3 et 4 est suivi d'une réaction de protection des groupements hydroxyles en position 2 et 6 dans la pyridine en présence de chlorure de benzoyle. Après traitement et purification, le composé **16** (Catelani, 1988 ; Fernandez-Mayoralas, 1989) est obtenu avec un rendement de 96%. Cette étape est suivie de la déprotection du 3, 4-isopropylidène, qui se fait dans l'acide acétique en présence d'eau porté à une température de 80 °C pendant 90 min. Le composé **17** (Zuurmond, 1993) est obtenu avec un rendement de 93% après purification. Le diol **17** subit une protection sélective en position 4 sous forme d'acétyle. Cette étape est nécessaire pour ensuite réduire la position 3 du galactose. Pour ce faire, le composé **17** est mis dans les conditions expérimentales de Lemieux (1975), c'est à dire en solution dans le triéthylorthoacétate en milieu acide (acide 10-d, 1-camphorsulfonique) pour donner un orthoester intermédiaire, qui sous l'action de l'acide acétique à 80% aqueux, laissé sous agitation pendant une nuit conduit au composé **18** (Zuurmond, 1993) avec un rendement de 93%. La position 4 de l'acétyle est confirmée par une étude du spectre <sup>1</sup>H RMN. L'ouverture régiosélective observée est le résultat d'une hydrolyse acide sous contrôle cinétique (King, 1970 ; Deslongchamps, 1975). Le composé **18** subit une substitution de la fonction alcool en position 3 par le chlorure de phénoxythiocarbonyle dans un mélange (1/1) de dichlorométhane anhydre et de pyridine séchée sur potasse (Paulsen, 1992). Après traitement et purification, le produit **19** (Stick, 2005) est obtenu avec un rendement de 98%. L'halogénure est facilement réduit dans le toluène à 80 °C, par voie radicalaire selon le mécanisme proposé sur la figure 3 (Barton, 1975 ; Beckwith, 2004), avec l'hydruire de tributylétain amorcée par le 2, 2'-azobis(isobutyronitrile). Ainsi le produit **20** (Stick, 2005) désoxygéné en position 3 est obtenu avec un rendement total de 31%.

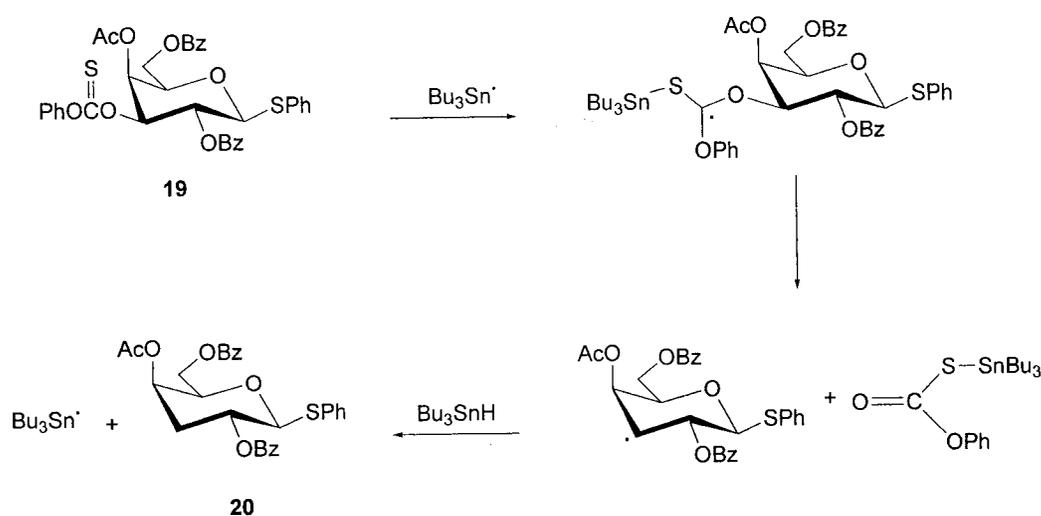


Figure 3. Mécanisme proposé de désoxygénation dans les conditions ( $\text{Bu}_3\text{SnH/AIBN}$ )

#### 4.2. Désoxygénation de la position 4 du galactose

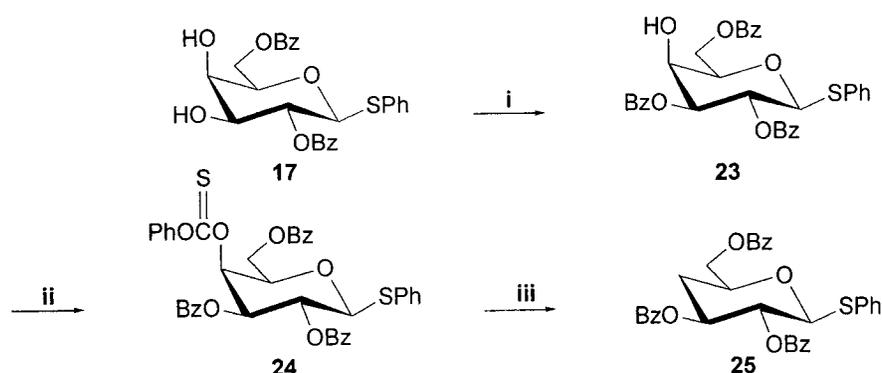


Schéma 4. (i)  $\text{Bu}_2\text{SnO}$ , Toluène, 1 nuit, reflux puis  $\text{BzCl}$ , 53% ; (ii)  $\text{PhOCOSCl}$ , Py, DMAP, DCM, 14h, 73% ; (iii)  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ , AIBN, 80 °C, 1h, 97%.

Plusieurs tentatives de protection sélective du composé **14** en position 2, 3, 6 ont été testées (Williams, 1967 ; Garegg, 1975 ; Lindberg, 2002) où la séparation des produits n'était pas facile. Notre choix s'est alors porté sur les stannylènes, en partant du diol **17**. Ce dernier possède deux hydroxyles vicinaux en positions 3 et 4, respectivement en équatorial et en axial. En présence d'oxyde de dibutylétain, il est transformé en dibutylstannylène (Slife, 1981 ; David, 1985) par ébullition dans le toluène pendant 1 nuit, avec entraînement de l'eau éliminée (Schéma 4). Cet intermédiaire est ensuite traité par le chlorure de benzoyle dans le toluène anhydre, pour donner le composé **23** benzoylé exclusivement en 3 (Nashed, 1977) avec un rendement de 53%. Cette sélectivité est difficile à prédire mais de nombreuses observations ont montré que la position 3 est souvent alkylée si le 2, 3 diol ou 3, 4 diol  $\beta$ -galactose est utilisé. L'hydroxyle libre en position 4 du composé **23** va subir une substitution par le phénoxythiocarbonyle suivi d'une réduction

radicalaire à 80 °C en présence de l'hydruire de tributylétain pour obtenir le produit 25 désoxygéné en position 4 avec un rendement de 85%.

### 4.3. Désoxygénation de la position 6 du galactose

Nous avons tenté tout d'abord de désoxygéner la position 6 du galactose en partant du composé 14. Une bromation de ce dernier n'a pas eu lieu en présence d'acrylonitrile et de la triphénylphosphine, et nous récupérons le produit de départ. Alors que réalisée sur l' $\alpha$ -D-méthylglucoside (Cicero, 1990), le produit bromé est obtenu avec un rendement de 98%. La même réaction s'est réalisée avec le  $\beta$ -D-méthylglucoside où nous récupérons toujours le produit de départ (figure 4). Nous avons supposé que c'est la position en bêta du groupement anomérique qui gêne cette bromation.

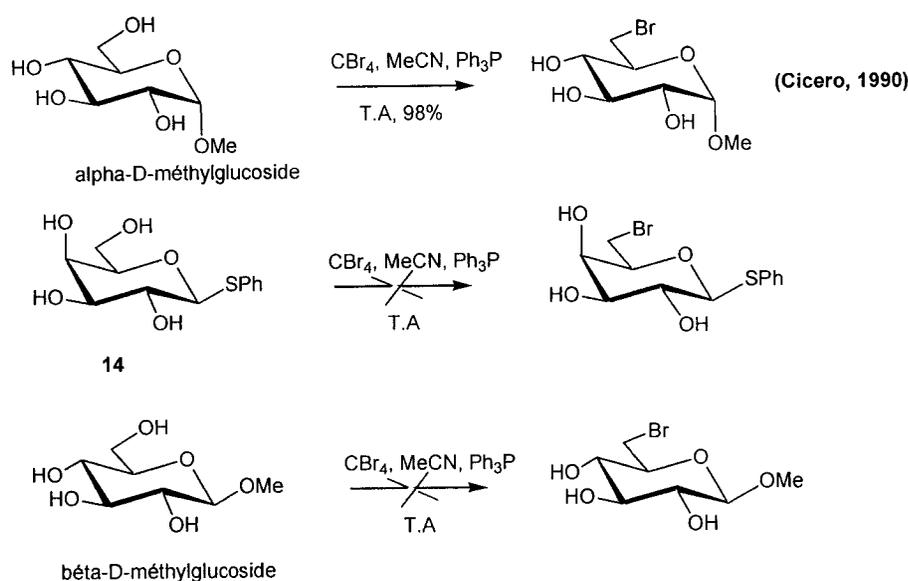


Figure 4. 1<sup>ère</sup> tentative de désoxygénation de la position 6 du galactose.

Une autre méthode est proposée pour la désoxygénation de l'alcool primaire utilisant les tosylates (Spohr, 1988). Après optimisation de la réaction, on obtient le tosylate (figure 5) avec un rendement de 82%, mais après réduction (Ueno, 1983) dans le diméthoxyéthane en présence d'hydruire de tributyl étain et d'iodure de sodium, on obtient une insaturation en position 5 du galactose au lieu du composé cible attendu.

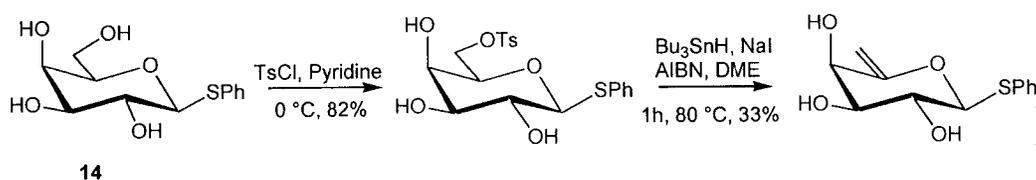


Figure 5. 2<sup>ème</sup> tentative de désoxygénation de la position 6 du galactose

La troisième tentative de désoxygénation (figure 6) utilise comme produit de départ le composé **15** qui subit une iodation (Garegg, 1980 ; Trumtel, 1990) dans le toluène à 70 °C en présence de triphénylphosphine et d'imidazole pour conduire au phényl 6-désoxy-6-iodo-3,4-O-isopropylidène-β-D-galactopyranoside avec un rendement de 27%. Ce dernier subit une réduction qui conduit au phényl 6-désoxy-3,4-O-isopropylidène-β-D-galactopyranoside avec un rendement de 47%. Cette voie a été abandonnée à cause du faible rendement des réactions et le grand nombre d'étapes.

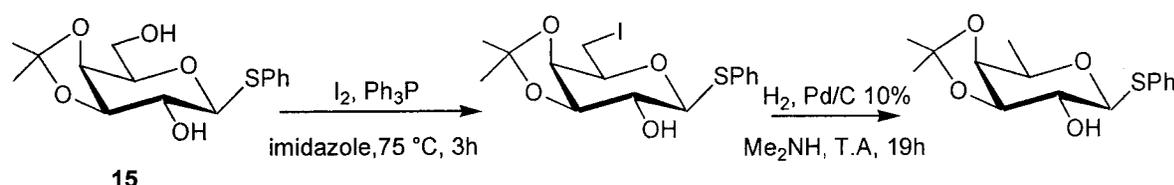


Figure 6. 3<sup>ème</sup> tentative de désoxygénation de la position 6 du galactose

Notre choix s'est alors porté sur l'utilisation d'un catalyseur neutre organométallique très efficace et qui permet une désacétylation sélective du composé **13** en position 6 (schéma 5). Cette réaction s'est réalisée à 30 °C dans le tétrahydrofurane pendant 4h en présence de chlorure di-tertiobutyl, hydroxy-étain [t-Bu<sub>2</sub>SnOH(Cl)]<sub>2</sub>. Le composé **26** (Orita, 2001) est obtenu avec un rendement de 89%. Ce composé subit le même chemin réactionnel que les autres galactoses désoxygénés, autrement dit une substitution par le phénoxythiocarbonyle suivie d'une réduction radicalaire pour engendrer le composé **28** (Asnani, 2003) avec un rendement de 70%.

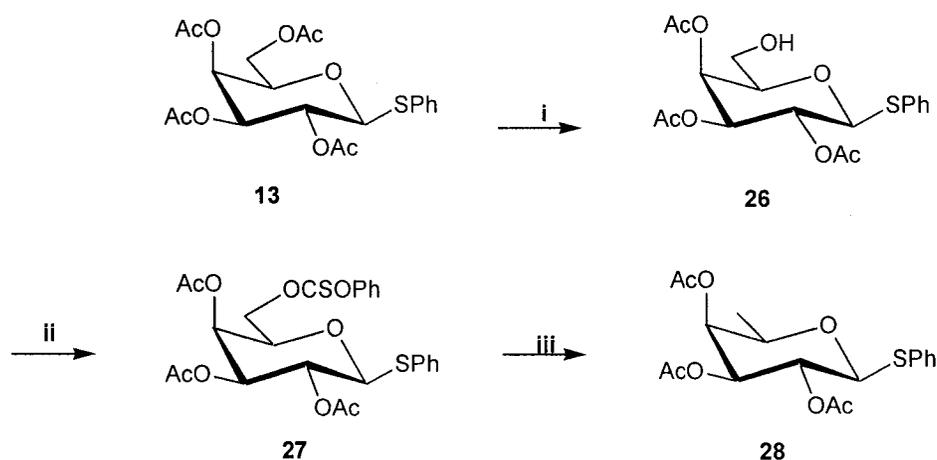


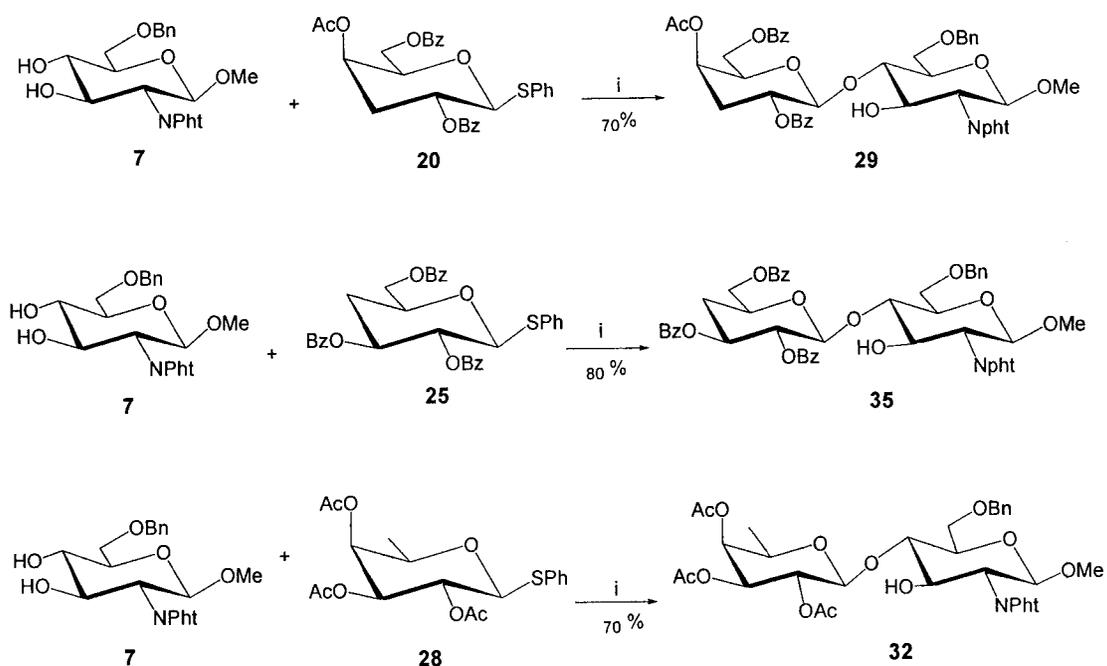
Schéma 5. (i) [t-Bu<sub>2</sub>SnOH(Cl)]<sub>2</sub>, THF, 30 °C, 4h, 89% ; (ii) PhOCSCl, Py, DCM, TA, 1h, 95% ; (iii) Bu<sub>3</sub>SnH, Toluène, 80 °C, 1h, 70%.

## 5. PREPARATION DES MIMES TRISACCHARIDES LE<sup>x</sup> DESOXYGENES EN POSITION 3, 4 ET 6

Ces trisaccharides désoxygénés seront préparés dans le but de faire une étude par RMN des milieux orientés des interactions Lewis<sup>x</sup>-Lewis<sup>x</sup> en présence de calcium.

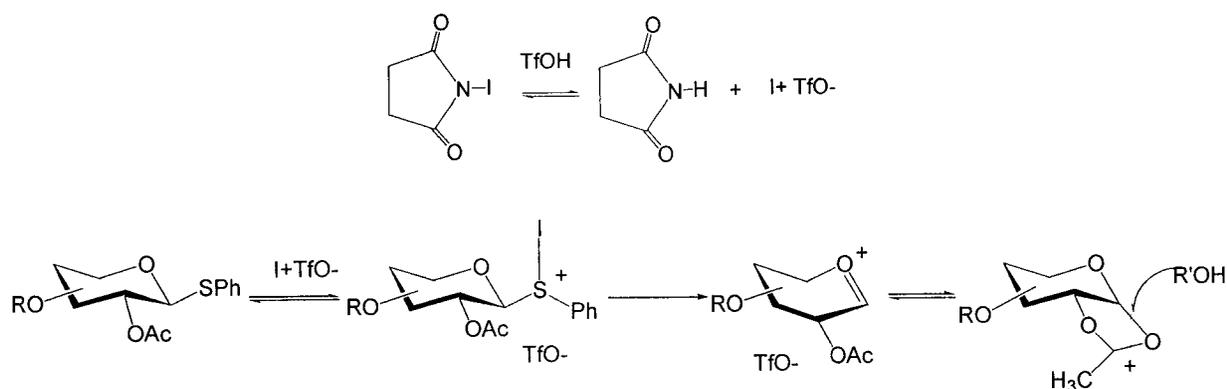
### 5.1. Préparation des blocs disaccharidiques.

Ces blocs disaccharidiques sont synthétisés selon le schéma 6 pour servir d'accepteur lors de la glycosylation avec le synthon fucose **11**.



**Schéma 6.** (i) NIS/TfOH, DCM, -30 °C, Tamis moléculaire 4Å, 1h.

La condensation entre l'accepteur **7** et les différents donneurs **20**, **25** et **28** (Schéma 6) effectuée dans le dichlorométhane par la N-iodosuccinimide en présence d'acide triflique (Veeneman, 1990) produit les disaccharides attendus **29**, **35**, **32** avec des rendements respectifs de 70%, 80% et 70%, après traitement et purification.



**Figure 7.** Mécanisme proposé pour la formation de l'ion iodonium à partir de la NIS en présence de l'acide triflique et la liaison glycosidique.

Le groupe anomère thiophényle réagit très bien dans ces conditions : il capte l'ion iodonium ( $I^+$ ), généré par l'acide triflique sur la N-iodosuccinimide, pour engendrer une espèce dont le départ, ainsi facilité, donne naissance à un ion oxocarbenium (figure 7). La participation du groupe acétyle en position 2 du donneur induit une haute stéréosélectivité, confirmée par les spectres RMN, par la constante de couplage  $J_{1,2} = 8$  Hz, ce qui correspond à une position axiale du proton porté par le carbone anomère de l'ex donneur donc à une liaison  $\beta$  formée. L'attaque régiosélective de la position 4 du diol accepteur a été confirmée par acétylation du composé **32** dans la pyridine en présence de l'anhydride acétique, en effet le spectre RMN confirme le déplacement chimique du proton OH-3 qui est passé de la valeur de 4.52 ppm à 5.75 ppm après acétylation, alors que le déplacement du proton en position 4 reste pratiquement inchangé. Il en est de même pour les composés **29** et **35**.

## 5.2. Fucosylation des blocs disaccharidiques

La liaison glycosidique désirée entre le synthon donneur **11** et les différents blocs lactosamines **29**, **35** et **32** est de configuration  $\alpha$ . Cette glycosylation se fait à  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans le toluène en présence de la N-iodosuccinimide et l'acide triflique comme promoteur. Après traitement et purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, les différents trisaccharides désoxygénés en position 3, 4 et 6 du synthon galactose sont obtenus selon le schéma 7 avec des rendements respectifs de 60 %, 37 % et 60 %.

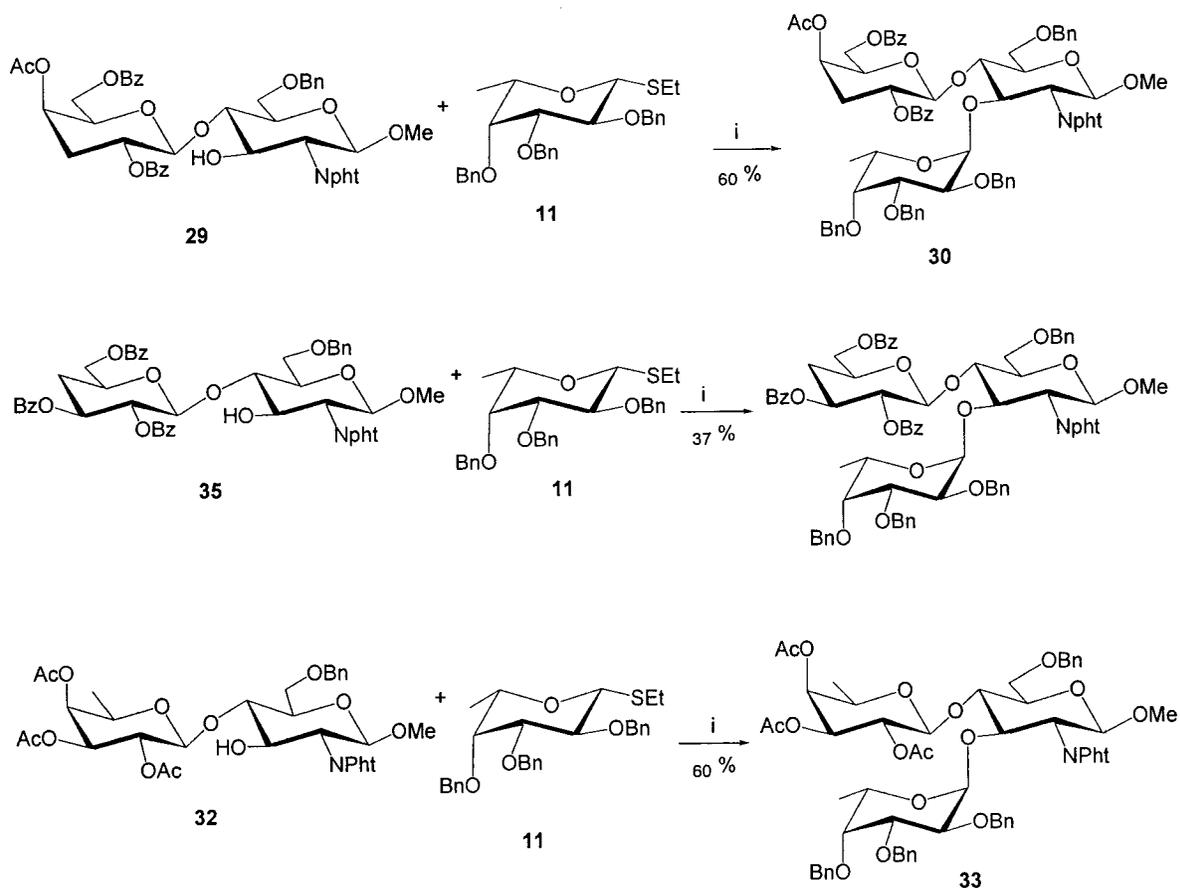
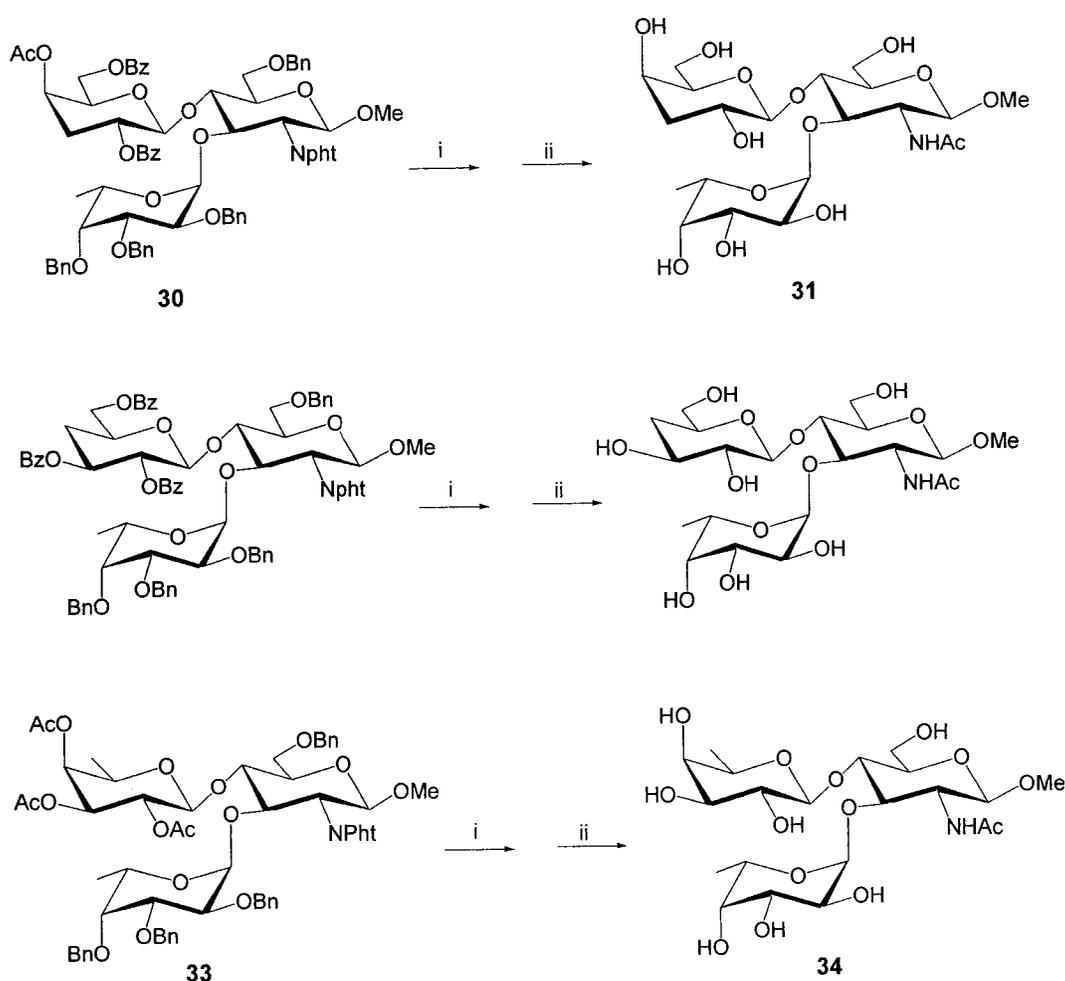


Schéma 7. (i) NIS/TfOH, Toluène,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Tamis moléculaire  $4\text{ \AA}$ , 1h.

### 5.3. Déprotection des différents trisaccharides

La première étape de déprotection des trisaccharides **30** et **33** (Schéma 8) concerne le groupe phtalimide qui sera transformé en groupe amine primaire (NPht→NH<sub>2</sub>) sous l'action de l'hydrazine monohydrate (Sasaki, 1978 ; Kahn, 1995) dans un mélange éthanol/eau à 80 °C pendant une nuit. Après évaporation, le brut est repris dans un mélange pyridine/méthanol/anhydride acétique (5/5/1) pour avoir une acétylation exclusive du groupe amine (NH<sub>2</sub>→NHAc), sans toutefois protéger les groupes hydroxyles. Autrement, l'utilisation de la méthode classique d'acétylation dans le mélange pyridine/anhydride acétique (2/1) aboutit à l'acétylation totale y compris les groupes hydroxyles. La méthode suivie nous a permis d'éliminer une étape qui est celle de la déprotection des groupements acétyles. Après une flash chromatographie, les produits obtenus subissent une hydrogénation catalytique (H<sub>2</sub>, Pd/C) qui permet de libérer les hydroxyles benzylés et de conduire aux trisaccharides désoxygénés en position 3, 4 et 6 déprotégés **31** et **34** avec un rendement de 90% après purification par séphadex.

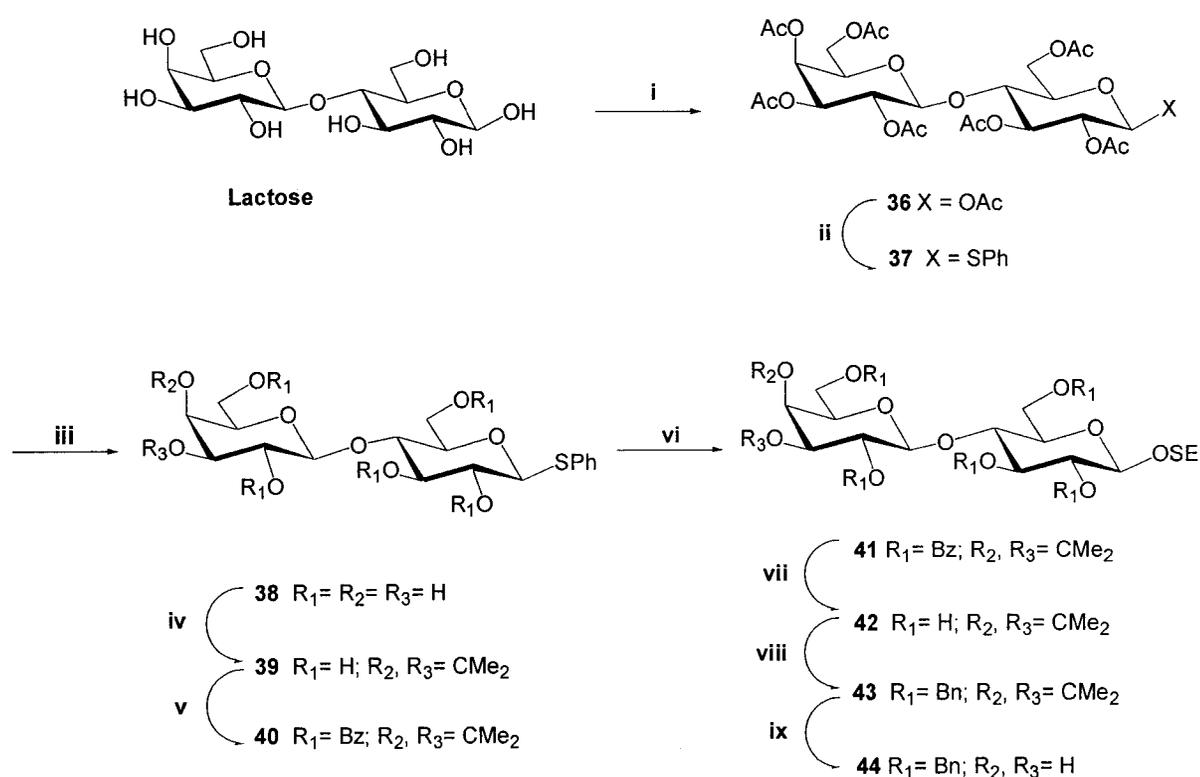


**Schéma 8.** (i) a) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 99%, EtOH, 80 °C, 14h b) Ac<sub>2</sub>O, DCM/ MeOH 1:1, TA ,1 nuit, 60% (2 étapes); (ii) H<sub>2</sub>, Pd/C 10%, MeOH, TA, 24h, 95%.

## 6. PREPARATION DU BLOC LACTOSE

Le choix du groupe protecteur du carbone anomérique est induit par son inertie vis-à-vis de toutes les étapes de glycosylations, déprotections et protections nécessaires à cette synthèse. Ce bloc **44** est synthétisé à partir du D-lactose (Schéma 9).

Le lactose est peracétylé en présence d'anhydride acétique et d'acétate de sodium ( $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NaOAc}$ ), à  $120\text{ }^\circ\text{C}$  pendant une heure. Le composé obtenu subit une addition d'un acide de Lewis ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) en présence de thiophénol dans du dichlorométhane anhydre, afin d'activer la position anomérique de la partie glucose du composé **36**. Le thioglycoside **37** (Ferrier, 1976 ; Choudhury, 1996 ; Asnani, 2003) est obtenu, après recristallisation dans le méthanol, avec un rendement de 90% exclusivement en position  $\beta$  ( $J_{1,2} = 10\text{ Hz}$ ) en raison de la participation du groupement en position 2. L'intermédiaire **37** subit une désacétylation dans les conditions de Zemplén (1926), c'est à dire par une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol. Le produit obtenu est directement engagé dans l'étape suivante.



**Schéma 9.** (i)  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , 1h, 90% ; (ii)  $\text{PhSH}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{DCM}$ , Ar, TA, 1h, 90% ; (iii)  $\text{MeOH}$ ,  $\text{NaOMe}$ , TA, 1 nuit ; (iv) 2,2-diméthoxypropane, CSA, TA, 1 nuit, 93% (2 étapes) ; (v)  $\text{BzCl}$ , Py, TA, 1 nuit, 95% ; (vi) 2-(triméthylsilyl)éthanol,  $\text{NBS/TfOH}$ ,  $\text{DCM}$ , Ar, Tamis moléculaire  $4\text{ \AA}$ , 1h, 75% ; (vii)  $\text{MeOH}$ ,  $\text{NaOMe}$ , 2h, 85% ; (viii)  $\text{NaH}$ ,  $\text{BnBr}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 95% ; (ix)  $\text{AcOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 1.5h, 91%.

Le traitement du produit **38** en milieu acide (acide 10 d, 1-camphorsulfonique) par le 2, 2-diméthoxypropane conduit à un mélange de produits, l'hydrolyse sélective en présence de méthanol/eau (10/1) des groupements acétals acycliques permet d'obtenir sélectivement le produit **39** (Barili, 1986 ; Catelani, 1988) protégé en position 3, 4 de la partie galactose par un 3, 4-isopropylidène. Cette protection sélective est réalisée avec un rendement de 93% en deux étapes. A une température de 0 °C, l'intermédiaire **39** subit une benzylation en présence de chlorure de benzoyle dans la pyridine, et l'intermédiaire **40** est récupéré avec un rendement de 95 % après une recristallisation dans l'éthanol. Le groupement thiophényle protecteur du carbone anomérique de la partie glucose du disaccharide est remplacé par un autre groupement protecteur, le triméthylsilyléthyle (Jansson, 1988) plus stable et plus résistant aux différentes conditions expérimentales de protections et de déprotections. Dans le dichlorométhane anhydre, l'intermédiaire **40** est mélangé au triméthylsilyl éthanol puis à une température de 0 °C, subit l'addition de l'acide triflique en présence de la NBS. Après neutralisation et recristallisation dans le mélange de solvants acétate d'éthyle-cyclohexane(3/1), le produit **41** est obtenu avec un rendement de 75%. La débenzylation du composé **41** se fait ensuite dans le méthanol en présence d'une quantité catalytique de sodium. Après neutralisation à la résine Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>), le mélange obtenu subit un lavage avec un mélange de solvants hexane/diéthyléther (1/1) pour éliminer le benzoate de méthyle formé, ainsi le produit **42** est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Ce dernier subit une benzylation dans le DMF en présence d'hydruure de sodium et de bromure de benzyloxy. Après traitement, le composé **43** est directement engagé dans l'étape suivante qui consiste en la déprotection du groupement 3, 4-isopropylidène. Finalement, les groupements hydroxyles des positions 3, 4 de la partie galactose sont libérés par action d'acide acétique à 80% au reflux pour conduire au composé **44** avec un rendement de 91%. Le composé **44** jouant le rôle d'accepteur en position 3 ou 4 est alors prêt pour subir une glycosylation avec un bloc trisaccharide. Théoriquement, le bloc trisaccharide devrait se coupler au bloc lactose au niveau du groupement hydroxyle en 3, en effet la réactivité de HO-3Gal est plus grande que celle de HO-4Gal donc on s'attend à ce que la glycosylation avec le trisaccharide Lewis<sup>x</sup> s'effectue régiosélectivement sur cette position. Pour cela, nous n'avons pas trouvé utile de protéger la fonction alcool HO-4Gal. Cette synthèse du bloc lactose effectuée en 9 étapes est obtenue avec un rendement global de 39.4%.

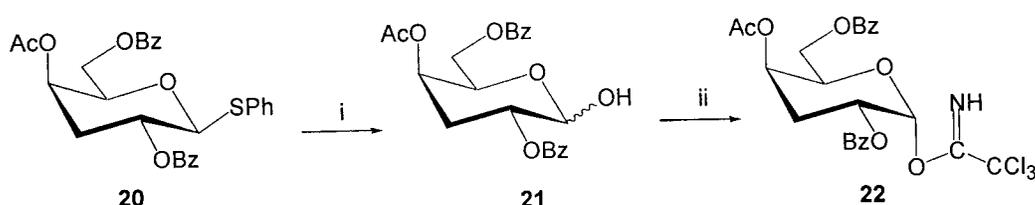


## 7. PREPARATION DU PENTASACCHARIDE LEWIS<sup>x</sup> DESOXYGENE EN POSITION 3

Le pentasaccharide désoxygéné en position 3 a été préparé dans le but d'être glycosylé par la suite à la céramide. Il jouera le rôle de donneur glycosidique vis-à-vis de l'azidosphingosine.

### 7.1. Activation de la position anomérique

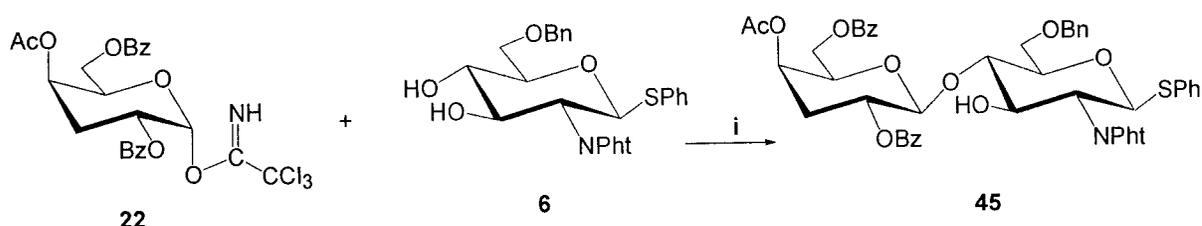
Afin de préparer le bloc lactosamine **45** précurseur du trisaccharide **46**, la position anomérique du synthon donneur est activée en remplaçant le groupement thiophényle par un groupement trichloroacétimidate. Cette étape est nécessaire pour éviter d'être confrontée à deux entités glycosylantes (composés **20** et **6**) présentant le même groupement protecteur sur le carbone anomérique : le thiophényle.



**Schéma 10.** (i) HgO, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, THF, Eau, 15 min ; (ii) Trichloroacétonitrile, DBU, DCM, 0 °C, 95%.

Pour ce faire, le produit **20** doit être déprotégé selon le schéma 10 en hémiacétal sous l'action de l'oxyde de mercure (Deiter-Juszynski, 1971 ; Schmidt, 1980) en présence du promoteur : l'éthérate de trifluorure de bore puis activé en trichloroacétimidate dans le dichlorométhane en présence de trichloroacétonitrile et de la DBU.

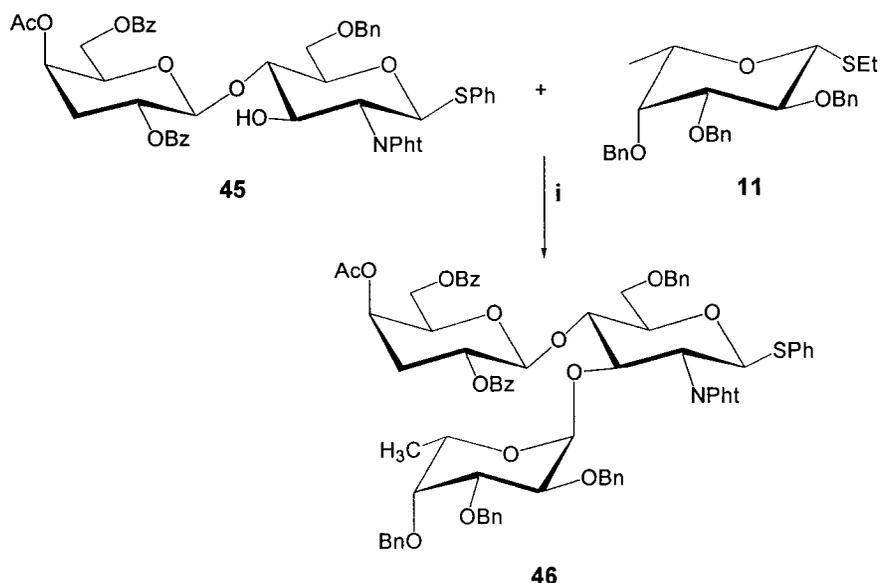
### 7.2. Préparation du bloc lactosamine



**Schéma 11.** (i) TMSOTf, DCM, Tamis moléculaire 4 Å, 0 °C, 1h, 78%.

Le couplage glycosidique entre le donneur trichloroacétimidate **22** et l'accepteur glucosamine **6** se fait dans le dichlorométhane anhydre sous l'action du promoteur TMSOTf à 0 °C pour conduire au dissaccharide **45** avec un rendement de 78%. Le sucre accepteur **6** possède deux groupements libres susceptibles d'être deux sites de glycosylation, cependant nous observons une glycosylation hautement régiosélective sur la position 4, bien que la position 3 est connue pour sa plus grande réactivité par rapport à la position 4 (Banoub, 1992) dans la série glucosamine. Ceci peut être expliqué par la présence simultanée des deux groupements phtalimide et thiophényle, relativement volumineux ce qui engendre une gêne stérique importante autour de HO-3.

### 7.3. Synthèse du trisaccharide 3'-désoxy Lewis<sup>x</sup>

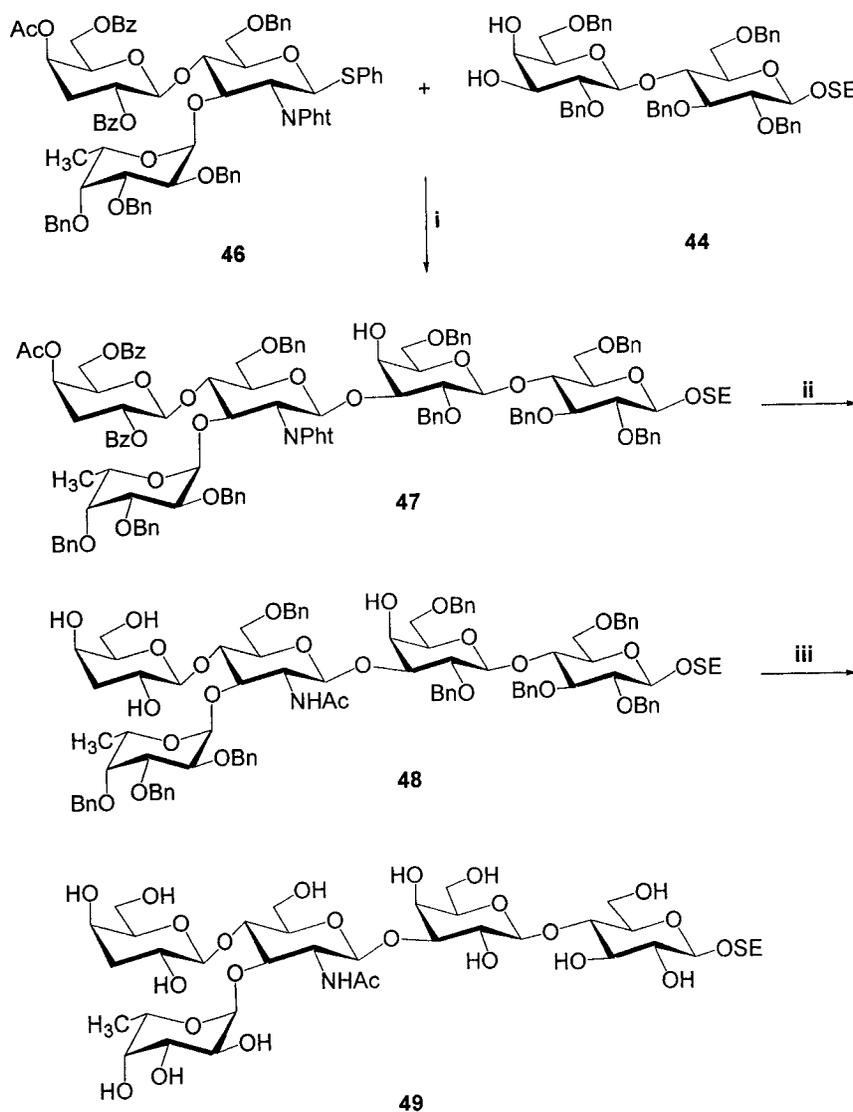


**Schéma 12.** (i) NIS/TfOH, Toluène, Tamis moléculaire 4Å, 1h, -25 °C, 75%.

La glycosylation entre le donneur **11** et l'accepteur **45**, est réalisée en présence de N-iodosuccinimide (NIS)/acide triflique (TfOH) dans le toluène anhydre à -25 °C pendant une heure. Le trisaccharide **46** est obtenu avec un rendement de 75%. La liaison glycosidique nouvellement formée est de type  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) confirmée par RMN du proton. Le système d'activation NIS/TfOH peut potentiellement activer les deux groupements thioéthyle SEt et thiophényle SPh. Cependant, dans notre cas, on assiste à la seule activation du groupement thioéthyle, et ceci s'explique par la différence de réactivité des groupes anomériques vis à vis du promoteur. En effet en comparant leurs nucléophilie, le thiophényle est stabilisé par délocalisation électronique, ce qui le rend un groupe moins nucléophile vis à vis de l'ion iodonium et donc un mauvais groupe partant par rapport au groupe thioéthyle.

## 7.4. Synthèse du bloc 3'-désoxy Lewis<sup>x</sup> pentasaccharide

La première étape, est la formation du squelette pentasaccharidique par réaction de glycosylation entre le donneur **46** et le lactose **44** accepteur. Ce couplage se réalise à  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans le dichlorométhane pour engendrer le composé **47** avec un rendement de 70%. La glycosylation s'est effectuée d'une manière régiosélective sur la position 3 du diol accepteur, cette étape a été confirmée par acétylation du pentasaccharide **47** et son spectre  $^1\text{H}$  RMN confirme l'acétylation en position 4' du synthon lactose (un singulet à 1.5 ppm et une constante de couplage caractéristique du proton en position 4') ce qui permet de conclure que la glycosylation a eu lieu sur la position 3'.



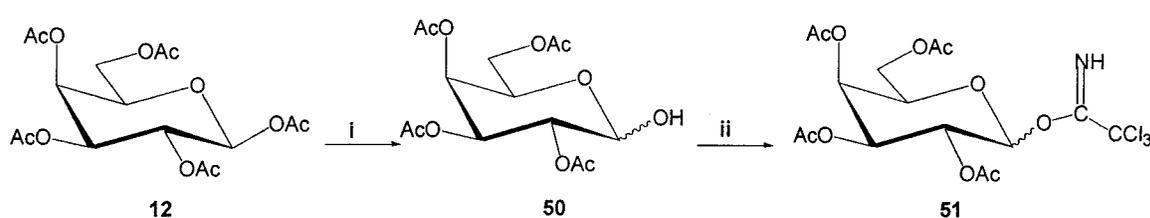
**Schéma 13.** (i) NIS/TfOH, DCM, Tamis moléculaire 4Å,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1h, 70%; (ii) a) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 99%, EtOH,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 14h b) Ac<sub>2</sub>O, DCM/ MeOH 1:1, TA, 1 nuit, 60% (2 étapes); (iii) H<sub>2</sub>, Pd/C 10%, MeOH, TA, 24h, 97%.

Cette étape est suivie d'une réduction du groupement phtalimide en amine et déprotection du résidu galactose par reflux de l'hydrazine dans l'éthanol aqueux. Après évaporation, le résidu brut subit une acétylation sélective du groupe amine pour engendrer le dérivé **48** qui, ensuite, subit une débenzylation en présence de Pd/C sous une pression de 160 Kpa d'hydrogène. Le pentasaccharide **49** est obtenu avec un rendement de 97% après purification sur séphadex.

## 8. PREPARATION DU TRISACCHARIDE LEWIS<sup>a</sup>

Le composé cible a été atteint en 6 étapes partant de la lactosamine **56** avec un rendement global de 56.8%. Cette synthèse a été réalisée dans le but de faire une étude aux rayons X après cristallisation.

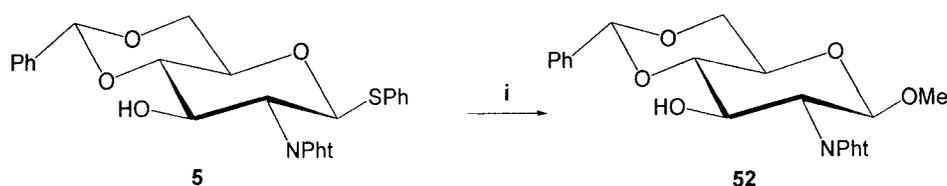
### 8.1. Activation de la position anomérique du penta-acétyl galactose.



**Schéma 14.** (i) Et<sub>2</sub>O anhydre, Benzylamine, 96 % ; (ii) Trichloroacétonitrile, DBU, DCM anhydre, 75%.

Divers groupements partants ont été testés, comme le bromogalactose où le rendement de la réaction (Reddy, 1996) de préparation de la lactosamine **56** ne dépasse pas 17%. Notre choix s'est alors porté sur le donneur trichloroacétimidate afin d'effectuer le couplage désiré avec de meilleurs rendements. La première étape qui consiste en la protection des cinq fonctions hydroxyles du galactose a été décrite auparavant (paragraphe 4.1). Cette étape est suivie de l'activation de la position anomérique par un bon groupement partant qui est le trichloroacétimidate. En effet, le carbone anomérique est désacétylé en présence de la benzylamine fraîchement distillé dans l'éther anhydre, le résidu obtenu qui, après une « flash chromatographie », est dilué dans du dichlorométhane anhydre en présence de trichloroacétonitrile et de DBU pour engendrer le composé **51**. Ce dernier est obtenu avec un rendement de 75% et doit être directement engagé dans sa glycosylation avec le synthon glucosamine **52**.

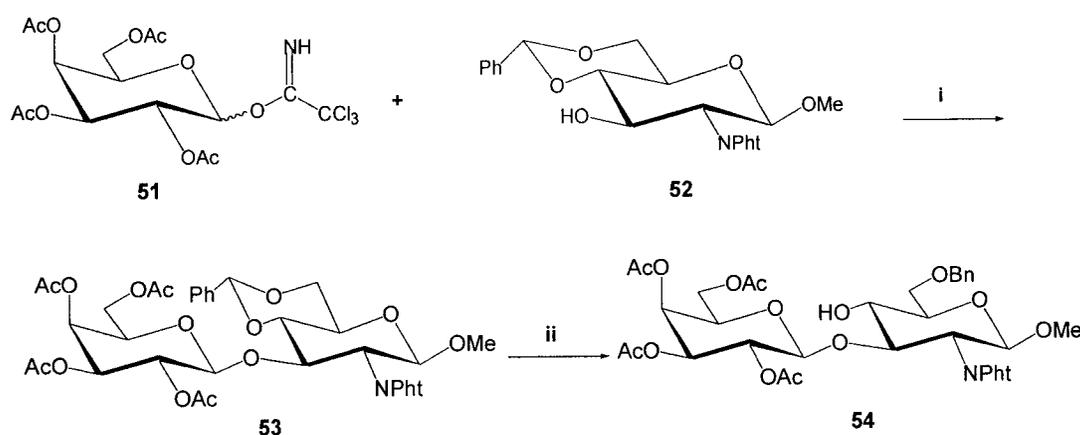
## 8.2. Préparation du synthon accepteur



**Schéma 15.** (i) NBS, méthanol, DCM, TfOH, Tamis moléculaire 4Å, 83%.

La préparation du composé **52** pouvait se faire directement à partir de la D-glucosamine. Dans notre cas le composé **5** a été déjà préparé auparavant donc on a souhaité réaliser juste une substitution nucléophile du carbone anomérique par un groupe méthoxy. Cette réaction se réalise dans un mélange de dichlorométhane anhydre et de méthanol en présence de la N-bromosuccinimide et de l'acide triflique comme promoteur. Le composé **52** obtenu avec un rendement de 83% va jouer le rôle d'accepteur dans sa glycosylation avec le donneur glycosylant : le penta-acétyl galactose activé en trichloroacétimide.

## 8.3. Préparation du bloc lactosamine précurseur du Lewis<sup>a</sup>

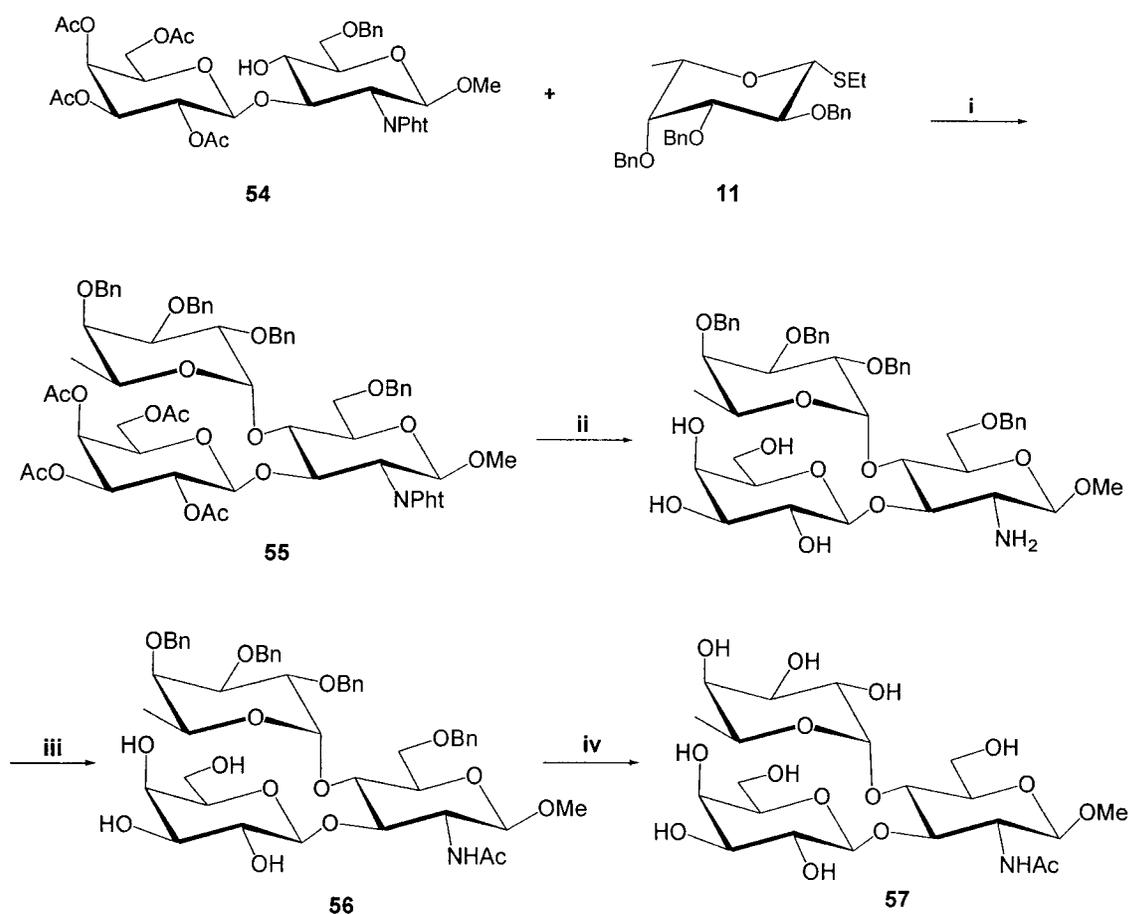


**Schéma 16.** (i) TMSOTf, DCM anhydre, Tamis moléculaire 4Å, 70% ; (ii) Et<sub>3</sub>SiH, CF<sub>3</sub>COOH, DCM anhydre, Tamis moléculaire 4Å, 72%.

Le bloc lactosamine **53** est obtenu via une réaction de glycosylation à 0 °C dans le dichlorométhane anhydre entre le donneur **51** et l'accepteur **52**. La méthode de glycosylation utilisée est une variante de la méthode de Koenigs-Knorr. Dans le cas présent, le promoteur utilisé est le triflate de triméthylsilyl. On a choisi comme accepteur le composé **52** protégé par un benzylidène simultanément en position 4 et 6 pour avoir exclusivement la glycosylation en position 3, car dans le cas où la position 4 n'est pas protégée on assiste à une glycosylation majoritaire sur ce site, citée au paragraphe 7.2. La stéréochimie de la nouvelle liaison glycosidique

établie en position 3 du synthon glucosamine est déterminée comme étant en position  $\beta$  sur la base de la constante de couplage des protons H-1 et H-2 du synthon galactose  $J_{1,2} = 8.9$  Hz. Après neutralisation, traitement et purification le disaccharide **53** est obtenu avec un rendement de 70%. Ce composé est ensuite dissous dans le dichlorométhane et un mélange d'acide trifluoroacétique et de triéthylsilane est ajouté pour une ouverture réductrice régiosélective du 4, 6-O-benzylidène. Ce type de réaction régiocontrôlée est largement décrit dans la littérature (Garegg, 1982 ; Sakagami, 2000). Le synthon **54** est obtenu avec un rendement de 72% après traitement et purification sur colonne de gel de silice.

#### 8.4. Synthèse du bloc trisaccharide Lewis<sup>a</sup>



**Schéma 17.**(i) NIS/TfOH ; Toluène anhydre, Tamis moléculaire 4Å, 85.5% ; (ii) Hydrazine monohydrate, éthanol, eau, 80 °C, 1 nuit ; (iii) Ac<sub>2</sub>O ; MeOH, DCM anhydre, TA, 1 nuit, 75% sur deux étapes ; (iv) MeOH, H<sub>2</sub>, Pd/C, TA, 12h, 95%.

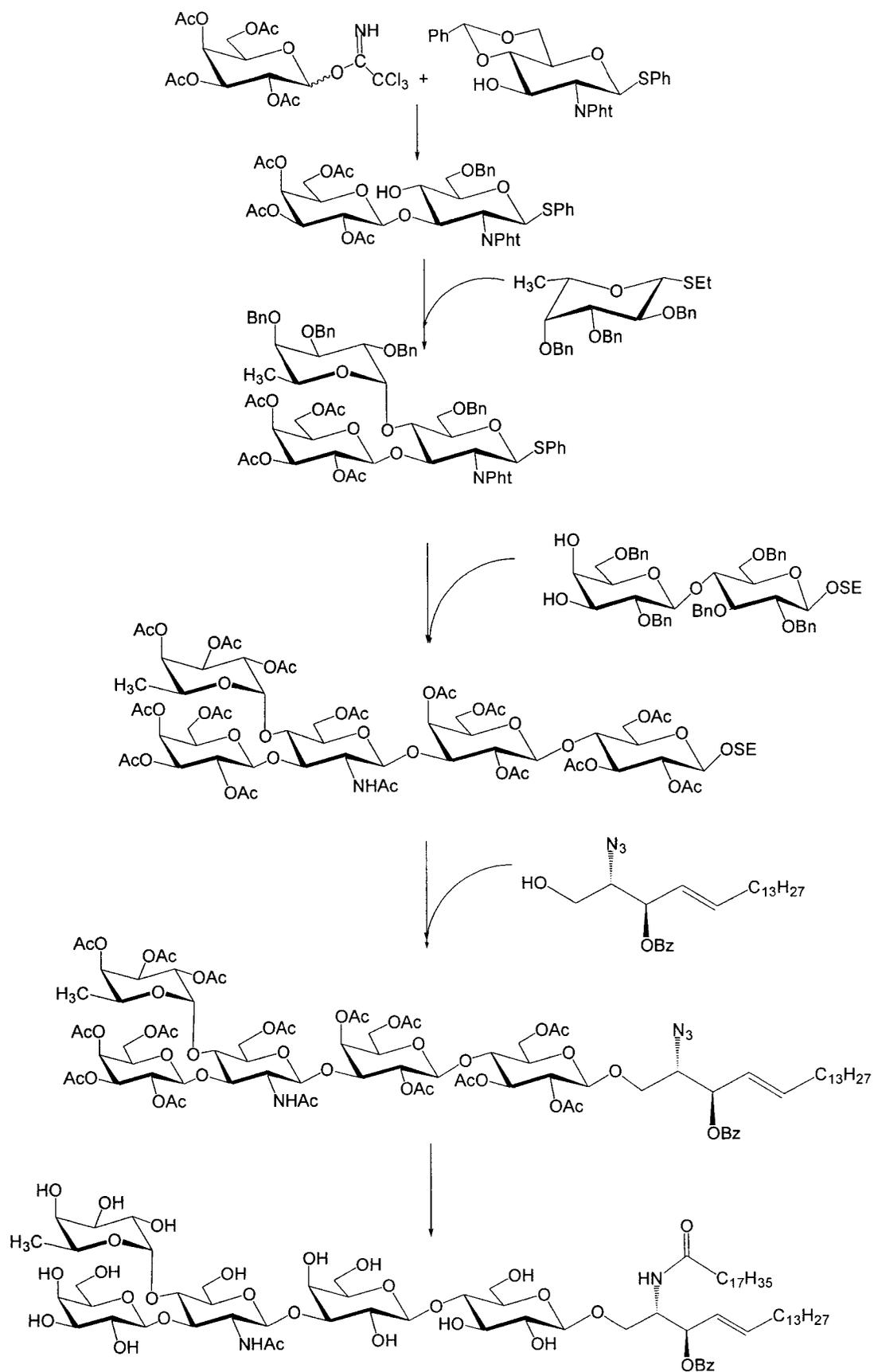
Le couplage glycosidique, entre le donneur **11** et l'accepteur **54**, est réalisé en présence de N-iodosuccinimide et d'acide triflique dans le toluène anhydre, à température ambiante pendant dix minutes : le trisaccharide **55** est obtenu avec un rendement de 85.5%. La stéréochimie de cette liaison glycosidique nouvellement formée a été déterminée par RMN du proton comme étant de

type  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) : la faible valeur de la constante de couplage entre les protons H-1 et H-2 de l'unité fucose ( $J_{1,2} = 3.4$  Hz) est caractéristique d'un couplage entre un proton axial et un proton équatorial présents sur des carbones contigus. Le trisaccharide **55** porté à 80 °C dans l'hydrazine monohydrate et éthanol subit à la fois, une réduction du groupement phtalimide en amine, et une désacétylation des fonctions alcools du synthon galactose. Après évaporation le résidu brut subit une acétylation sélective du groupe amine pour engendrer le dérivé **56** qui, ensuite, subit une débenzylation en présence de Pd/C sous une pression de 160 Kpa d'hydrogène. Le trisaccharide **57** est obtenu avec un rendement de 90% après purification sur séphadex.

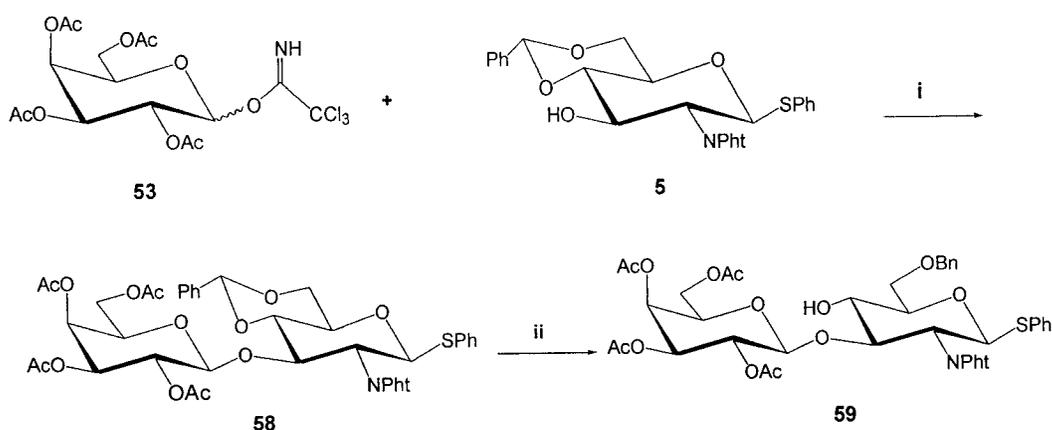
## 9. PREPARATION DU GLYCOSPHINGOLIPIDE LEWIS<sup>a</sup>

La synthèse totale du glycosphingolipide Lewis<sup>a</sup> a été effectuée en collaboration avec Zhenyuan Zhu, dans le but de faire des mesures physiques d'interaction sucre-sucre. Le choix de notre passage par le thioglycoside est un moyen de protéger temporairement la fonction hémiacétalique car la liaison C(1)-S peut persister intacte à travers un certain nombre de transformations du reste de la molécule.

## 9.1. Stratégie de synthèse



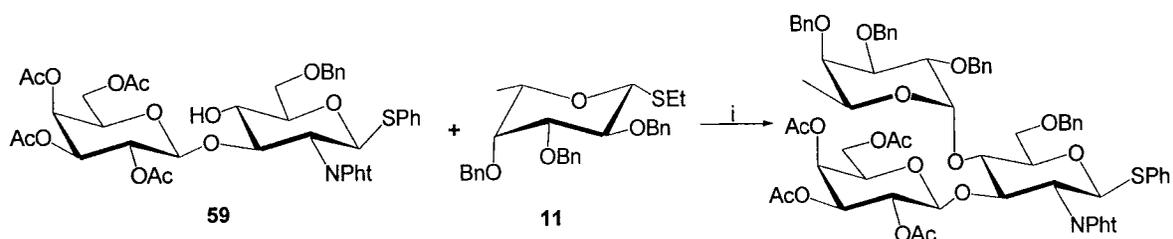
## 9.2. Préparation du bloc lactosamine



**Schéma 18.** (i) TMSOTf, DCM anhydre, Tamis moléculaire 4Å, 50% ; (ii) Et<sub>3</sub>SiH, CF<sub>3</sub>COOH, DCM anhydre, Tamis moléculaire 4Å, 85%.

Le sucre accepteur utilisé ne possède qu'un seul groupement libre susceptible d'être un site de glycosylation qui est en position 3. Le bloc lactosamine **59** a été préparé de la même manière décrite au paragraphe 8.3 avec un rendement beaucoup plus faible en raison de la gêne stérique créée par les groupes volumineux ; le phtalimide et le thiophénol auxquels s'ajoute le groupement benzyldène.

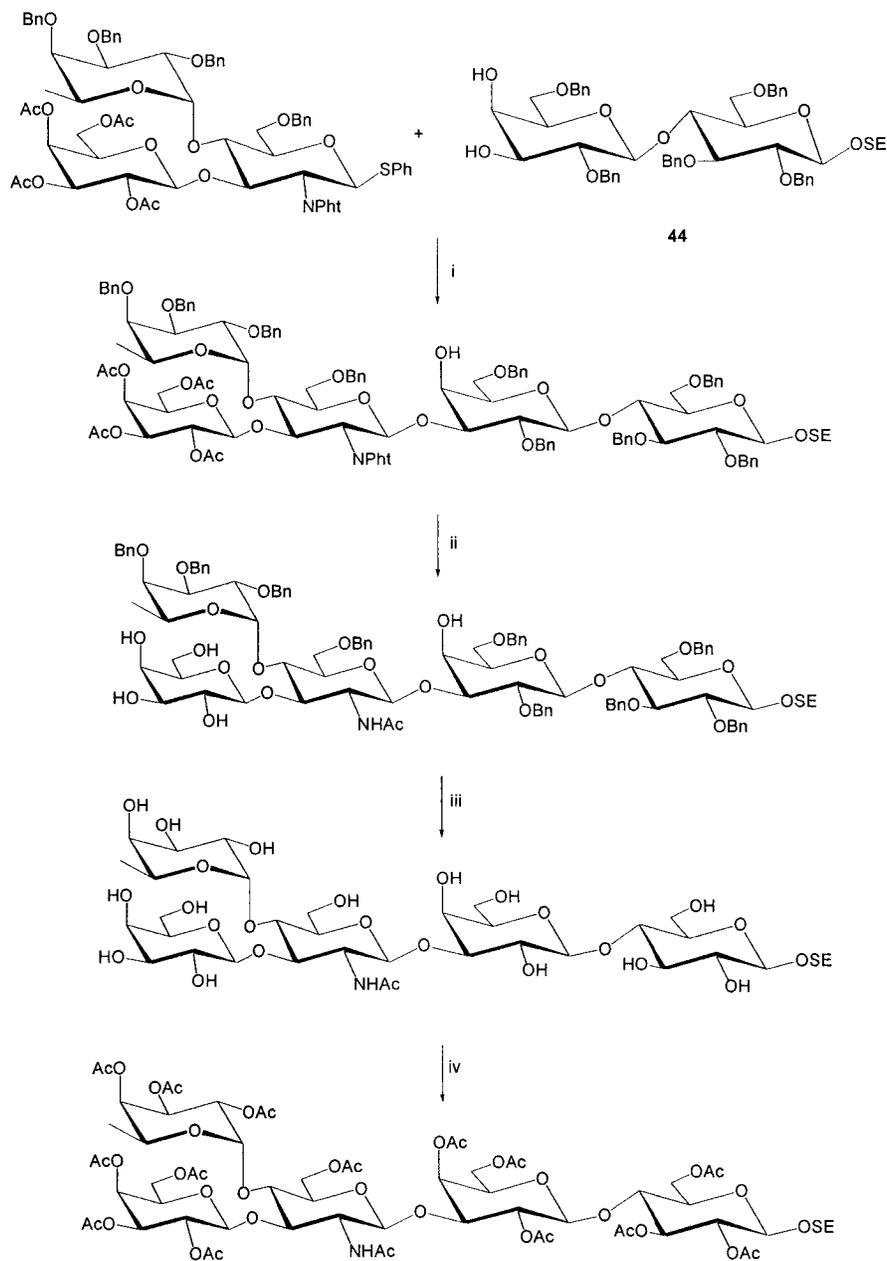
## 9.3. Fucosylation



**Schéma 19.** (i) NIS/TfOH, Toluène anhydre, Tamis moléculaire 4Å, 10 min, 85%.

La fucosylation du disaccharide lactosamine **59** par le fucose **11** est réalisé dans le toluène anhydre en présence de NIS/TfOH à température ambiante. Après 10 minutes, le trisaccharide est obtenu avec un rendement de 85%. Dans ce cas aussi l'activation du groupement anomérique ne dépend pas du promoteur utilisé mais de la différence de réactivité des groupes anomériques (paragraphe 7.3).

## 9.4. Préparation du bloc pentasaccharide

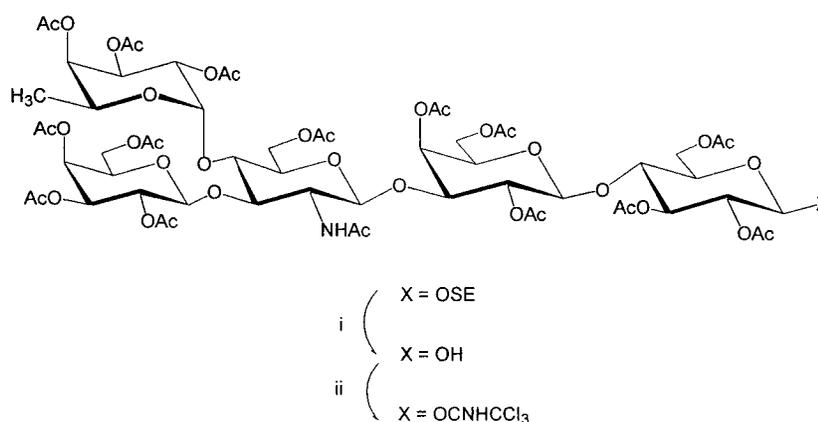


**Schéma 20.** (i) NIS/TfOH, DCM anhydre, Tamis moléculaire 4Å, -30 °C, 71% ; (ii) a) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 99%, ETOH, 80 °C, 14 h ; b) Ac<sub>2</sub>O, DCM/ MeOH 1 :1, TA, 1 nuit, 82% (2 étapes) ; (iii) H<sub>2</sub>, Pd/C 10%, MeOH, TA, 48 h, 90% ; (iv) Ac<sub>2</sub>O, Py, DMAP, 1 nuit, 82%.

La formation du pentasaccharide selon le schéma 20 est conduite dans les mêmes conditions qui ont été précédemment décrites dans le paragraphe 7.4, c'est à dire en présence du couple NIS/TfOH dans le toluène anhydre. La réaction est achevée au bout d'une heure, et le pentasaccharide désiré est obtenu avec un rendement de 71%. Les trois étapes suivantes sont effectuées dans le seul but d'uniformiser les groupes protecteurs du pentasaccharide. Les quatre

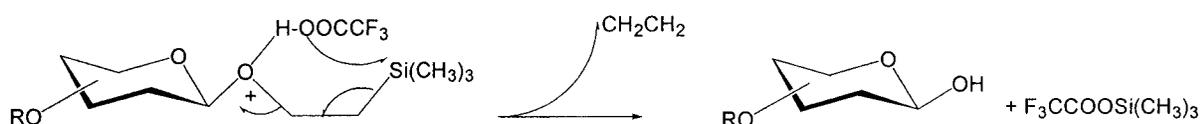
groupes acétates et le groupe phtalimido sont enlevés dans des conditions qui ne ménagent pas le groupement phtalimide, épargné dans les conditions de Zemplén. Ces conditions utilisent l'hydrazine monohydrate au reflux dans l'éthanol aqueux. Après évaporation, le résidu est directement engagé dans une acétylation ( $\text{Ac}_2\text{O}$ , MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) pour délivrer le produit désiré avec un rendement de 82% sur deux étapes. Ce dernier subit une hydrogénation catalytique en présence de palladium sous une pression d'hydrogène de quelques atmosphères pour conduire au pentasaccharide débenzylé qui est directement engagé dans l'étape suivante d'acétylation. L'acétylation est effectuée en présence d'anhydride acétique dans la pyridine qui est rendue totale par l'addition de la DMAP. Le pentasaccharide acétylé est obtenu avec un rendement de 82%.

### 9.5. Activation du carbone anomérique du pentasaccharide



**Schéma 21.** (i) TFA, DCM; (ii)  $\text{Cl}_3\text{CCN}$ , DBU, DCM, 0 °C, 1h, 75% (2 étapes).

Le composé uniformément protégé au niveau des hydroxyles, doit être déprotégé en hémiacétal puis activé (Schéma 21) afin d'effectuer la glycosylation finale qui est l'introduction de la partie azidosphingosine. La déprotection a lieu en utilisant l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Cet acide, en conditions contrôlées, protonne l'oxygène en position anomérique sur lequel se développe de ce fait une charge positive. L'entité fluorée agit alors sur le silicium (figure 8) et induit une  $\beta$  fragmentation qui libère le pentasaccharide déprotégé, de l'éthylène et le trifluoroacétate de triméthylsilyle ( $\text{CF}_3\text{COOSiMe}_3$ ).

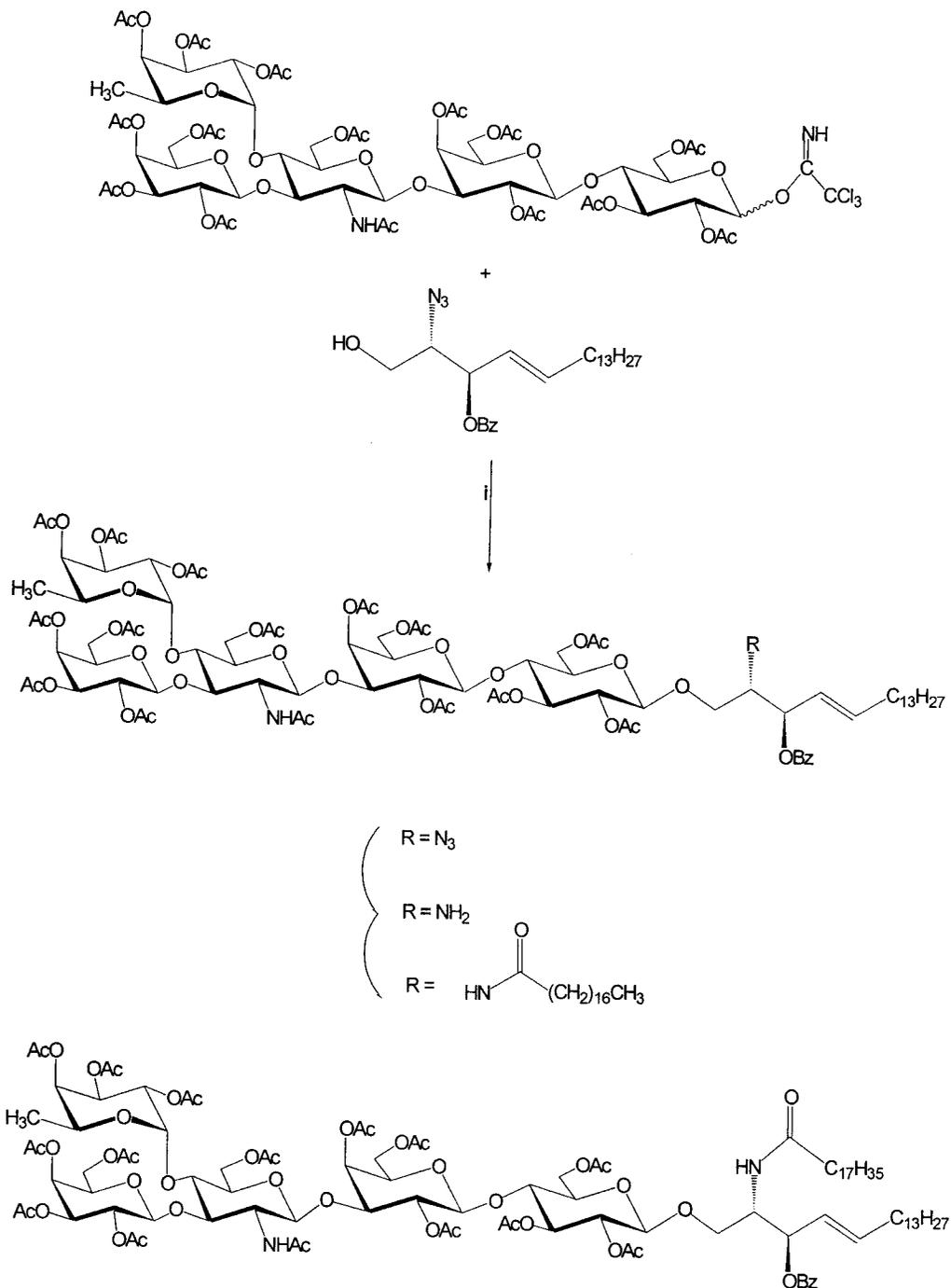


**Figure 8.** Déprotection de la position anomérique

Le pentasaccharide déprotégé obtenu est directement traité par de la trichloroacétonitrile en présence de DBU pour générer le trichloroacétimidate correspondant. Ce dernier obtenu avec un rendement de 75 % sur deux étapes est très instable et réactif. Son hydrolyse est très facile, c'est pourquoi, avant la purification, on doit parfaitement neutraliser le milieu réactionnel. La chromatographie sur colonne de silice nécessite l'ajout de quelques gouttes de triéthylamine dans l'éluant afin de neutraliser l'acidité de la silice.

## 9.6. Introduction de l'azidosphingosine

Le trichloroacétimidate réagit avec l'azidosphingosine selon le schéma 23 en présence de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (zimmermann, 1988 ; Nicolaou, 1988). La réduction du groupement azide en amine s'effectue en présence de triphénylphosphine dans un mélange benzène-eau à 50 °C durant 24 h, puis le composé obtenu est agité encore 24 h dans le dichlorométhane avec l'acide octadécanoïque, en présence de WSC pour obtenir le glycosphingolipide protégé avec un rendement de 51% sur deux étapes. Finalement, le produit final est obtenu après désacétylation sous les conditions de Zemplén avec un rendement de 90%.



**Schéma 23.** (i)  $BF_3 \cdot ET_2O$ , DCM, Tamis moléculaire 4Å, TA, 6h, 41% ; (ii)  $PPh_3$ ,  $C_6H_6$ ,  $H_2O$ , 50 °C, 24 h ; (iii) WSC, DCM, Acide octadécanoïque, 24 h, TA, 51% (2 étapes) ; (iv) NaOMe, MeOH, 1 nuit, TA, 90%.

## PARTIE EXPERIMENTALE

---

### Conditions générales

#### 1. L'appareillage

- Les spectres  $^1\text{H}$  RMN ont été enregistrés avec un spectromètre Brüker AC 250 ou un spectromètre Brüker DRX400. Les attributions ont été possibles grâce aux corrélations  $^1\text{H}/^1\text{H}$  et  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ . Les spectres  $^{13}\text{C}$  RMN ont été enregistrés à 62.9 MHz avec un Brüker AC250 et à 100.6 MHz avec un Brüker DRX400 adoptant comme référence 77 ppm comme pic central du  $\text{CDCl}_3$ .
- Les pouvoirs rotatoires sont mesurés à une température ambiante de  $20 \pm 2$  °C à l'aide d'un polarimètre numérique Perkin Elmer Model 241, en utilisant une cellule de 10 cm de longueur et de 1 mL de volume.
- Les analyses élémentaires ont été effectuées au service de Microanalyse de l'Université Pierre et Marie Curie, 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France.
- Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil capillaire BÜCHI Model 510 m.p et ne sont pas corrigées
- Les spectres de masse en ionisation chimique (CI, ammoniac) et en « Fast Atom Bombardement » (FAB) ont été obtenus avec un spectromètre JMS-700.
- Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (épaisseur : 0.2 mm, E. Merck, Darmstadt, Allemagne) ; elles ont été essentiellement révélées thermiquement après vaporisation d'un mélange acide sulfurique/éthanol dans les proportions 1/10. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées avec du gel de silice 60 (230-400 mesh, E. Merck).
- Les masses molaires et les analyses élémentaires théoriques des molécules synthétisées ont été calculées à l'aide du programme CS Chemdraw ultra 6.0.

## 2. Les solvants et les réactifs

Les réactifs et solvants anhydres utilisés sont préparés selon les procédures de la littérature :

- Le toluène est distillé sur sodium, en présence de benzophénone.
- Le dichlorométhane est séché sur chlorure de calcium puis distillé sur pentoxyde de phosphore.
- Le méthanol est séché sur tamis moléculaire.
- La pyridine est séchée sur potasse.
- L'éther est distillé sous pentoxyde de phosphore
- Le tétrahydrofurane est distillé sur sodium, en présence de benzophénone.
- La résine Dowex 50x8-400 est préalablement lavée au méthanol et séchée sous vide pendant une nuit .
- Le tamis moléculaire 4Å est séché sous vide à une température de 100 °C pendant 7h puis 3h à température ambiante.

Toutes les distillations se font sous atmosphère d'argon. Le mélange de solvants d'élution sont présentés en v/v.

### *Préparation du chlorure de ditertiobutyl, hydroxy-étain. $[tBu_2SnOH(Cl)]_2$*

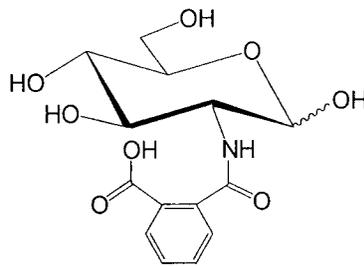
Le chlorure de ditertiobutyl étain ( $C_8H_{18}Cl_2Sn$  98%), (1g, 3.29 mmol) est dissous dans 8.25 mL de THF et 1.65 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (3 M). La solution est laissée sous une agitation lente pendant une nuit. Une fois que la réaction est terminée, les deux phases aqueuse et organique sont séparées et la phase organique est concentrée. Le produit (1020mg) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

PF : 135 °C

## 1. PREPARATION DU SYNTHON GLUCOSAMINE

2-(2-carboxybenzamido)-2-désoxy- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose

(1)

C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>8</sub> M 327.29

Le mélange de chlorhydrate de D-glucosamine (19.64g, 91.07 mmol, 1 éq), d'hydrogénocarbonate de sodium (7.7g, 1 éq) et d'anhydride phtalique (14g, 1 éq) en solution dans 100 mL d'eau, est mis sous agitation à une température de 40 °C jusqu'à dissolution totale de tous les réactifs. Ensuite, 10g de bicarbonate de sodium sont rajoutés par petites fractions toutes les cinq minutes pendant deux heures. Après la fin de l'addition, le mélange est laissé au repos pendant une heure. On acidifie la solution obtenue avec une solution de HCl (10 mL, 1.8 M) : la première addition doit être rapide pour éviter la formation du CO<sub>2</sub>, ensuite goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'un pH de 5-6. Le milieu réactionnel est ensuite concentré, puis du toluène et de l'éthanol sont ajoutés pour éliminer azéotropiquement l'eau qui reste. Le résidu qui est sous forme d'une poudre orange peut être recristallisé dans un mélange méthanol-eau (4/1). Le produit **1** (27.42g) est obtenu avec un rendement de 92% sous forme de cristaux blancs.

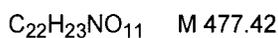
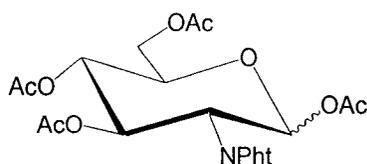
PF : 186-187 °C (méthanol-eau)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +84° (c 0.5, eau)Spectre de masse : m/z 345 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>Analyse élémentaire pour C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>8</sub>

Calculée	C 51.37	H 5.24	N 4.28
Trouvée	C 51.36	H 5.20	N 4.31

1, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl-2-désoxy-2-phthalimido- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopyranose

(2)



Sous argon, la solution **1** (27.42g, 83.77 mmol) dans le méthanol (10 mL) est refroidie à une température de 0 °C (bain de glace). La pyridine anhydre (100 mL) est additionnée suivie d'un ajout lent d'anhydride acétique (48 mL), car la réaction est exothermique. Le milieu réactionnel restera sous agitation pendant quelques minutes. Ensuite, le méthanol et l'acétate de méthyle formé sont évaporés, avant une deuxième addition d'anhydride acétique (30 mL) et de pyridine (62 mL). Le mélange est alors laissé sous agitation pendant une nuit. Le milieu réactionnel est évaporé et le résidu est dilué dans le dichlorométhane (80 mL). La phase organique est lavée par une solution d'acide chlorhydrique 1M puis par une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1). Le produit **2** (32g) est obtenu avec un rendement de 85%.  $R_f = 0.42$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1).

PF : 131 °C (méthanol)

$[\alpha]_D +98^\circ$  (c 0.5, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  495 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_{11}$

Calculée	C 55.34	H 4.86	N 2.96
Trouvée	C 55.26	H 4.79	N 2.83

Isomère 2 $\alpha$  :

**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7.90 (m, 2H, H-arom), 7.80 (m, 2H, H-arom), 6.60 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 11.6$  Hz,  $J_{3,4} = 9.5$  Hz, H-3), 6.32 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz, H-1), 5.20 (t, 1H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4), 4.75 (dd, 1H, H-2), 4.41 (m, 2H, H-6 et H-6'), 4.35 (m, 1H, H-5), 2.16, 2.15, 2.12, 2.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  170.68, 170.03, 169.77, 169.54, (C=O), 134.48 (2C-arom), 123.78 (2CH-arom), 90.47 (C-1), 70.12 (C-5), 69.29 (C-4), 66.91 (C-3), 61.46 (C-6 et C-6'), 52.73 (C-2), 20.98, 20.79, 20.77, 20.73 (4x $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

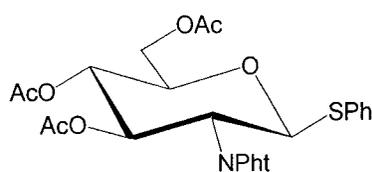
Isomère 2 $\beta$ :

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.90 (m, 2H, H-arom), 7.80 (m, 2H, H-arom), 6.55 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.90$  Hz, H-1), 5.92 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.45$  Hz,  $J_{3,4} = 9.12$  Hz, H-3), 5.25 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 10.15$  Hz, H-4), 4.50 (dd, 1H, H-2), 4.17 (m, 2H, H-6 et H-6'), 4.06 (m, 1H, H-5), 2.07, 2.03, 1.91, 1.90 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

$^{13}\text{C RMN}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.54, 169.47, 169.32, 168.64, (C=O), 134.48 (2 CH-arom), 134.48-123.78 (4 CH-arom), 72.57 (C-5), 70.44 (C-3), 68.19 (C-4), 61.44 (C-6 et C-6'), 53.42 (C-2), 20.74, 20.65, 20.61, 20.39 (4x $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

Phényl 3, 4, 6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-phtalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyrannoside

(3)


 $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_9\text{S}$  M 527.55

Le thiophénol (27.5 mL, 268.10 mmol, 4 éq) et le trifluorure de bore en solution dans le diéthyléther (21.23 mL, 167.56 mmol, 2.5 éq) sont ajoutés à une solution de **2** (32g, 67.02 mmol, 1 éq) dans le dichlorométhane anhydre (156 mL). Le mélange marron obtenu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2 jours. Le milieu réactionnel est alors neutralisé par une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Les phases sont ensuite séparées et la phase organique est lavée à l'eau. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées. Le résidu est un solide orange qui est recristallisé dans l'éthanol absolu ou dans le mélange de solvants cyclohexane- acétate d'éthyle (3/1). Le produit **3** (28.28g, 79%) est isolé.

$R_f = 0.55$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1)

$R_f = 0.62$  (toluène-acétate d'éthyle 2/1)

PF : 145-146 °C (éthanol)

$[\alpha]_D +56.1^\circ$  (c 0.86, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  545 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup>

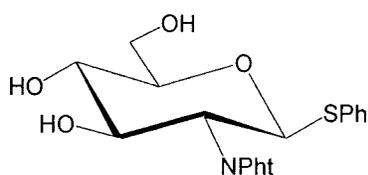
Analyse élémentaire pour  $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_9\text{S}$

Calculée	C 59.20	H 4.78	N 2.66
Trouvée	C 59.14	H.4.77	N 2.55

$^1\text{H}$  RMN (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.89 (m, 2H, H-arom), 7.78 (m, 2H, H-arom), 7.41 (m, 2H, H-arom), 7.27 (m, 3H, H-arom), 5.81 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 10.1$  Hz,  $J_{3,4} = 9.3$  Hz, H-3), 5.73 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.5$  Hz, H-1), 5.15 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 10.10$  Hz, H-4), 4.36 (dd, 1H, H-2), 4.31 (dd, 1H,  $J_{6,6'} = 12.4$  Hz,  $J_{6,5} = 4.6$  Hz, H-6), 4.22 (dd, 1H,  $J_{6',5} = 4.8$  Hz, H-6'), 3.92 (ddd, 1H, H-5), 2.12, 2.04, 1.85 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.51, 170.00, 169.38 (C=O, Ac), 167.51, 166.34 (C=O, NPht), 134.35, 133.19, 131.08, 130.92, 128.84, 128.36, 123.65 (CH-arom, C-arom), 82.98 (C-1), 75.85 (C-5), 71.56 (C-3), 68.68 (C-4), 62.16 (C-6 et C-6'), 53.53 (C-2), 20.66, 20.41, 20.37 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

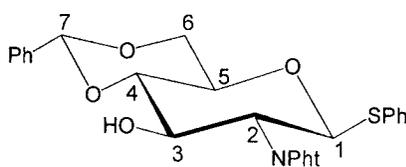
Phényl 2-désoxy-2-phthalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyrannoside (4)



$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}$  M 401.43

Le produit **3** (28g, 53.07 mmol) est mis en suspension dans un mélange de solvants eau/acétone (90 mL/180 mL). (52 mL) d'une solution d'acide chlorhydrique est ensuite additionnée et le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à une température de 60 °C pendant une nuit. La solution est alors évaporée, puis l'huile obtenue est co-évaporée avec du toluène et de l'éthanol. Le résidu **4** (21g) est une masse solide qui va être directement engagée dans l'étape suivante.  $R_f = 0.05$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1).

Phényl 4, 6-O-benzylidène-2-désoxy-2-phthalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyrannoside (5)



$\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{S}$  M 489.54

Le produit **4** (21g, 52.31 mmol, 1 éq) est dissous dans du N, N-diméthylformamide (70 mL), l' $\alpha,\alpha$ -diméthoxytoluène (23.55 mL, 156.93 mmol, 3 éq) et l'acide 10-d, l-camphorsulfonique (1.21g, 5.231 mmol, 0.1 éq) sont rajoutés. On monte directement le ballon sur un évaporateur rotatif à une température de 45 °C pour éliminer le méthanol au fur et à mesure qu'il se forme. Au bout d'une heure la réaction est terminée. Le mélange est concentré et purifié par

chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 4/1→2.5/1.5). Le produit **5** (24.16g, 93% sur 2 étapes) est ainsi obtenu sous forme d'une poudre blanche.

$R_f = 0.36$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 2.5/1.5)

$R_f = 0.54$  (toluène-acétate d'éthyle 3/1).

$[\alpha]_D +34.2^\circ$  (c 1.3, chloroforme)

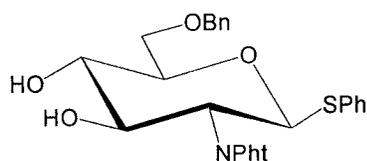
Spectre de masse :  $m/z$  507 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  7.90 (m, 2H, H-arom), 7.78 (m, 3H, H-arom), 7.53 (m, 2H, H-arom), 7.43 (m, 4H, H-arom), 7.32 (m, 3H, H-arom), 5.75 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.0$  Hz, H-1), 5.62 (s, 1H, H-7), 4.67 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.2$  Hz,  $J_{3,4} = 8.7$  Hz, H-3), 4.48 (dd, 1H,  $J_{6,6'} = 10.10$  Hz,  $J_{6,5} = 3.75$  Hz, H-6), 4.38 (dd, 1H, H-2), 3.88 (t, 1H,  $J_{6,5} = 10.1$  Hz, H-6'), 3.73 (ddd, 1H,  $J_{5,4} = 8.7$  Hz, H-5), 3.64 (t, 1H, H-4), 2.84 (s, 1H, OH).

**<sup>13</sup>C RMN (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  134.33-126.40 (CH-arom), 123.95, 123.47 (C=O, NPht), 102.02 (C-7), 84.35 (C-1), 81.92 (C-4), 70.35 (C-5), 69.74 (C-3), 66.63 (C-6 et C-6'), 55.59 (C-2).

Phényl 6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-1-thio-β-D-glucopyranoside

(6)



$C_{27}H_{25}NO_6S$  M 491.56

Au produit **5** (24g, 49.02 mmol, 1 éq), dissous dans le dichlorométhane anhydre (180 mL), le triéthylsilane (39.04 mL, 245.02 mmol, 5 éq) est ajouté. Le mélange est mis sous agitation à une température de 0 °C. L'acide trifluoroacétique (18.88 mL, 245.02 mmol, 5 éq) est ajouté goutte à goutte et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. Après 30 minutes, la réaction est terminée : le milieu réactionnel est neutralisé par une solution aqueuse saturée d'hydrogencarbonate de sodium. Les phases sont séparées et la phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, concentrée et purifiée par chromatographie sur colonne sur gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1→1/2). Le produit **6** (16.86g, 69%) est ainsi obtenu sous forme d'une poudre blanche.

$R_f = 0.51$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/2).

$[\alpha]_D +25.2^\circ$  (c 1.3, chloroforme)

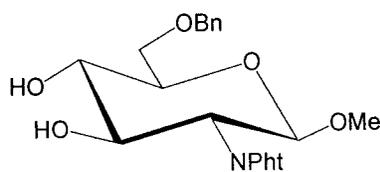
Spectre de masse :  $m/z$  509 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

**$^1\text{H}$  RMN (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.00-7.10 (m, 14H, H-arom), 5.62 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.2$  Hz, H-1), 4.63 (d, 1H,  $J_{\text{gem}} = 11.9$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.57 (d, 1H,  $J_{\text{gem}} = 11.9$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.36 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 10.3$  Hz,  $J_{3,4} = 7.7$  Hz, H-3), 4.26 (dd, 1H, H-2), 3.70 (m, 4H, H-4, H-5, H-6 et H-6'), 3.32 (s large, 1H, OH), 2.88 (s large, 1H, OH).

**$^{13}\text{C}$  RMN (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  168.05, 167.41 (C=O, NPht), 140.00, 120.00 (CH-arom); 83.49 (C-1), 78.87 (C-4), 73.51 ( $\text{PhCH}_2$ ), 72.65 (C-3), 72.24 (C-5), 69.82 (C-6), 55.60 (C-2).

Méthyl 6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside

(7)



$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_7$  M 413.42

Sous argon et sous agitation magnétique, le composé **6** (4g, 81.7 mmol) est dissous dans (40 mL) de dichlorométhane en présence de 4 g de tamis moléculaire 4Å. Le milieu réactionnel est ensuite portée à  $-10$  °C puis (3.3 mL) de méthanol et 4g de N-bromosuccinimide sont rajoutés. L'acide trifluorométhanesulfonique (360  $\mu\text{L}$ ) dilué dans (20 mL) de dichlorométhane anhydre est ensuite ajouté goutte à goutte. La réaction est terminée au bout d'une heure. Le milieu est neutralisé par 400  $\mu\text{L}$  de triéthylamine puis filtré sur célite. Le mélange est lavé avec 20 mL de thiosulfate de sodium, puis deux fois avec 30 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1) ainsi, 2.75g du produit **7** est obtenu sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 81.5%.

$R_f = 0.23$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1).

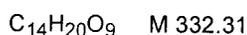
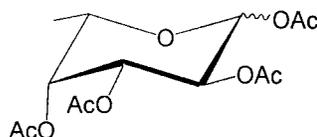
**$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7.80 (m, 2H, H-arom), 7.68 (m, 2H, H-arom), 7.36 (m, 5H, H-arom), 5.11 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.37$  Hz, H-1), 4.63 (2d, 2H,  $J_{\text{gem}} = 12.1$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.31 (m, 1H, H-3), 4.12 (m, 1H, H-2), 3.80 (m, 2H,  $J_{6a,6b} = 10.5$  Hz, H-6a et H-6b), 3.61 (m, 2H, H-4, H-5), 3.32 (s large, 5H, OH,  $\text{OCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  168.4 (C=O, NPht), 133.97 (C-arom), 128.38, 127.69, 123.35 (CH-arom), 99.08 (C-1), 74.36 (C-4), 73.55 ( $\text{PhCH}_2$ ), 73.03 (C-3), 71.56 (C-5), 69.90 (C-6), 56.65 (C-2), 56.24 ( $\text{OCH}_3$ ).

## 2. PREPARATION DU SYNTHON FUCOSE

### 1, 2, 3, 4-tétra-O-acétyl- $\alpha, \beta$ -L-fucopyranose

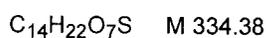
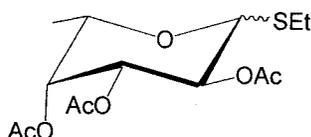
(8)



Le L-fucose (3g, 18.27 mmol, 1 éq) est traité avec un mélange d'anhydride acétique-pyridine (90 mL 2/1) porté à 100 °C pendant une heure. La réaction étant terminée, le produit est concentré puis l'excès d'anhydride acétique est éliminée par co-évaporation avec (2x25 mL) de toluène. L'huile jaune obtenue est séchée sous P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pendant une nuit puis directement engagée dans l'étape suivante. R<sub>f</sub> = 0.4 (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1)

### Ethyl 2, 3, 4-tri-O-acétyl-1-thio- $\alpha, \beta$ -L-fucopyranoside

(9)



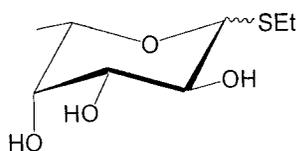
Sous argon, à la solution **8** (6.62g, 19.93 mmol, 1 éq) dans du dichlorométhane anhydre (17 mL) contenant du tamis moléculaire 4Å (7.5g) et refroidie à 0 °C est additionné l'éthanthiol (7.75 mL, 21.92 mmol, 1.1 éq) puis goutte à goutte l'éthérate de trifluorure de bore (7.75 mL, 59.79 mmol, 3 éq). L'agitation est maintenue à température ambiante jusqu'à la fin de la réaction. On neutralise alors le milieu réactionnel par une solution aqueuse glacée d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée. On filtre ensuite le produit brut sur silice utilisant comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1) pour ôter les sels formés. On obtient ainsi un mélange des 2 isomères  $\alpha$  et  $\beta$  sous forme d'une huile, avec un rendement de 94.7% sur les deux étapes.

R<sub>f</sub> = 0.4 (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1).

Spectre de masse : m/z 352.2 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

Ethyl 1-thio- $\alpha,\beta$ -L-fucopyrannoside.

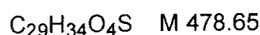
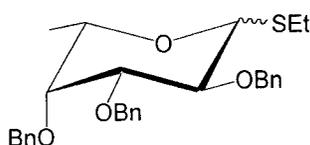
(10)



Le mélange d'isomères **9** (6.31g, 18.8 mmol) est dissous dans le méthanol (65 mL) dans lequel une quantité catalytique de sodium est ajoutée. L'agitation est maintenue à température ambiante jusqu'à la fin de la réaction. La réaction étant terminée le méthylate de sodium en excès est neutralisé par la résine Amberlite IR 120 ( $\text{H}^+$ ). Le milieu réactionnel est filtré puis concentré sous vide. L'huile jaune obtenue (3.47g, 88.4%) est directement engagée dans l'étape suivante.

Ethyl 2, 3, 4-tri-O-benzyl-1-thio- $\alpha,\beta$ -L-fucopyrannoside

(11)



Le produit **10** (3.47g, 16.69 mmol, 1 éq) est dissous dans le N, N-diméthylformamide (120.81 mL). Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C et le bromure de benzyle (14.94 mL, 2.5 éq/OH) est rajouté au milieu. Ensuite, l'hydruure de sodium (2.41g, 2 éq/OH) est rajouté par petites fractions car la réaction est très exothermique. Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit. Une fois la réaction terminée, l'excès de bromure de benzyle est neutralisé par le méthanol. Le mélange est partitionné entre le toluène et l'eau, la phase organique est lavée avec de l'eau puis concentrée. Le produit obtenu **11** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 13/1). On sépare ainsi les deux isomères **11 $\alpha$**  et **11 $\beta$**  (5.5g, 61%) : l'isomère  $\beta$  est obtenu, après recristallisation dans l'éthanol, sous forme de cristaux blancs, et l'isomère  $\alpha$  est récupéré sous forme d'une huile jaune.

PF : 49 °C (éthanol)

Isomère  $\alpha$   $R_f = 0.22$  cyclohexane-acétate d'éthyle 4/1)

Isomère  $\beta$   $R_f = 0.14$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 4/1)

$[\alpha]_D^{+7}$  (c 0.8, chloroforme).

Spectre de masse :  $m/z$  490 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $C_{29}H_{34}O_4S$

Calculée C 72.77 H 7.16

Trouvée C 72.91 H 7.21

### Isomère $\beta$

$^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.44-7.30 (m, 15H, H-arom), 5.04 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.8$  Hz, Ph- $\underline{CH}_2$ ), 4.94 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.2$  Hz, Ph- $\underline{CH}_2$ ), 4.85 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.20$  Hz, Ph- $\underline{CH}_2$ ), 4.80 (d, 2H,  $J_{gem} = 10.3$  Hz,  $\underline{CH}_2$ -Ph), 4.74 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.8$  Hz, Ph- $\underline{CH}_2$ ), 4.37 (d, 1H,  $J_{1,2} = 9.5$  Hz, H-1), 3.86 (t, 1H,  $J_{2,3} = 9.5$  Hz, H-2), 3.66 (m, 1H, H-4), 3.61 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 2.9$  Hz, H-3), 3.52 (dq, 1H,  $J_{5,6} = 6.4$  Hz,  $J_{5,4} = 2.9$  Hz, H-5), 2.82 (q, 1H,  $^3J = 7.50$  Hz,  $\underline{CH}$ -CH3), 2.78 (q, 1H,  $^3J = 7.5$  Hz,  $\underline{CH}$ -CH3), 1.34 (t, 3H,  $^3J = 7.5$  Hz,  $\underline{CH}_2$ - $\underline{CH}_3$ ), 1.12 (d, 3H, H-6).

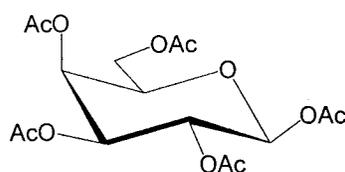
$^{13}C$  RMN (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  128.50-127 (C-arom), 84.91 (C-1), 84.42 (C-3), 78.30 (C-2), 76.38 (C-4), 75.68 (Ph- $\underline{CH}_2$ ), 74.49 (C-5), 74.46 (Ph- $\underline{CH}_2$ ), 72.83 (Ph- $\underline{CH}_2$ ), 24.65 ( $\underline{CH}_2$ -CH<sub>3</sub>), 17.21 ( $\underline{CH}_2$ - $\underline{CH}_3$ ), 14.96 (C-6).

## 3. PREPARATION DU SYNTHON GALACTOSE

### 3.1 Galactose désoxygéné en position 3

1, 2, 3, 4, 6-penta-O-acétyl- $\beta$ -D-galactopyranose

(12)



$C_{16}H_{22}O_{11}$  M 390.34

A un mélange d'anhydride acétique (250 mL) et d'acétate de sodium anhydre (25g) chauffé à 140 °C, est ajouté lentement le D(+) Galactose (50g). Maintenu une heure sous agitation, le milieu réactionnel est ensuite laissé revenir à température ambiante, puis versé dans un mélange eau/glace (350 mL). Le penta-acétate de galactose précipité est essoré et lavé par une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium. Après extraction par un système (dichlorométhane/eau), la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Le résidu obtenu, recristallisé dans l'éthanol est sous forme de cristaux blancs (60.66g, 56%).  $R_f = 0.45$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1)

PF 141-142 °C (éthanol)

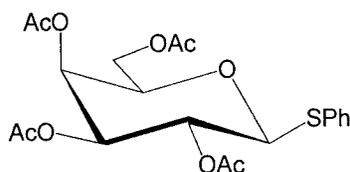
PF<sub>lit</sub> 142 °C (éthanol)

Spectre de masse :  $m/z = 408$  (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H RMN (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.60 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.7 Hz, H-1), 5.34 (d, 1H J<sub>3,4</sub> = 8.7 Hz, H-4), 5.25 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> = 10 Hz, H-2), 4.98 (dd, 1H, H-3), 4.09-3.93 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 2.06 et 2.02 (2s, 6H, OAc), 1.95, 1.93, 1.91 (3s, 9H, OAc).

*Phényl 2, 3, 4, 6-penta-O-acétyl-1-thio-β-D-galactopyrannoside*

(13)



C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>S M 440.47

Au penta-acétate de β-Galactose (28g) solubilisé dans du dichlorométhane anhydre (170 mL), en présence de thiophénol (11 mL, 1.5 éq) et 17g de tamis moléculaire 4Å, est ajouté goutte à goutte à 0 °C de l'éthérate de trifluorure de bore (45.48 mL, 5 éq). Après une nuit sous agitation à température ambiante, la réaction est terminée. Une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium est ajoutée au milieu réactionnel. La phase organique lavée à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH neutre, est séchée sur du sulfate de magnésium, puis évaporée. Le résidu récupéré est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1). Le composé **13** (28.43g) est isolé avec un rendement de 90%.

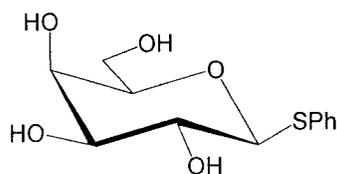
R<sub>f</sub> = 0.54 (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.43 (m, 2H, H-arom), 7.23 (m, 3H, H-arom), 5.33 (m, 1H, H-4), 5.15 (t, 1H, J<sub>2,3</sub> = 9.9 Hz, H-2), 5.01 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub> = 3.35 Hz, H-3), 4.69(d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 10.0 Hz, H-1), 4.12-4.02 (2dd, 2H, J<sub>6a,6b</sub> = 11.3 Hz, H-6a, H-6b), 3.90 (t, 1H, H-5), 2.01, 1.99, 1.94, 1.87 (4s, 12H, OAc).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.76, 169.66, 169.43, 168.87 (4C, C=O), 132.10-131.90 (C-arom), 128.43-127.6 (CH-arom), 87.75 (C-1), 73.90 (C-5), 71.46 (C-3), 66.88 (C-2), 61.26 (C-6), 20.32, 20.16, 20.10, 20.06 (C-CH<sub>3</sub>CO).

Phényl 1-thio-β-D-galactopyrannoside

(14)

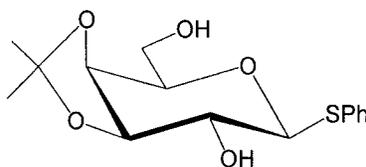
C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>S M 272.32

La désacétylation du composé **13** à l'aide d'une solution décimolaire de méthylate de sodium dans du méthanol (190 mL) conduit au composé **14** qui est sous forme d'un solide blanc. Après neutralisation par de la résine Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>), filtration et concentration sous vide, ce composé est directement engagé dans l'étape suivante.

R<sub>f</sub> = 0.2 (acétate d'éthyle-méthanol 6/1)

Phényl 3, 4-O-isopropylidène-1-thio-β-D-galactopyrannoside

(15)

C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>S M 312.38

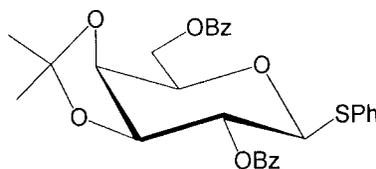
A une solution de phényl 1-thio-β-D-galactopyrannoside (16g, 58.75 mmol) dans le 2,2-diméthoxypropane (587.57 mL) est ajouté de l'acide 10-d, l-camphorsulfonique (0.54g, 2.35 mmol, 0.04 éq). Le mélange ainsi formé sous atmosphère d'argon est maintenu sous agitation pendant 48 heures. La réaction étant terminée, le milieu réactionnel est neutralisée par de la triéthylamine (23.5 mmol, 3.25 mL) et laissé sous agitation pendant 15 min puis concentré et co-éaporé avec du toluène pour éliminer les traces de la triéthylamine. Le résidu obtenu, dilué dans une solution méthanol-eau (10/1) (588 mL), est porté à reflux jusqu'à l'obtention du composé **15** uniquement. L'hydrolyse est totale au bout de trois heures. Le mélange est ensuite concentré puis co-éaporé avec le toluène. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/3). Ainsi, le produit **15** est obtenu avec un rendement de 89%. R<sub>f</sub> = 0.4 (cyclohexane- acétate d'éthyle 1/3).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.54 (m, 2H, H-arom), 7.34-7.29 (m, 3H, H-arom), 4.49 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 10.1 Hz, H-1), 4.17 (dd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 2.1 Hz, J<sub>4,3</sub> = 5.5 Hz, H-4), 4.14-4.10 (m, 1H, H-3), 4.01-3.95 (m, 1H, H-6a), 3.89-3.78 (m, 2H, H-6b, H-5), 3.58 (dd, 1H, H-2), 1.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  132.1, 131.9 (C-arom), 128.9-127.9 (CH-arom), 110.3 ( $\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_2$ ), 87.5 (C-1), 79.1, 76.9, 73.7, 71.3 (C-2, C-3, C-4, C-5), 62.3 (C-6), 27.9, 26.2 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

Phényl 2, 6-di-O-benzoyl-3, 4-O-isopropylidène-1-thio- $\beta$ -D-galactopyrannoside

(16)



$\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{S}$  M 520.59

Le produit **15** (10g, 32 mmol) est dissous dans la pyridine (100 mL). Le mélange est refroidi à une température de 0 °C (bain de glace) et le chlorure de benzoyle (10.3 mL, 89.6 mmol, 1.4 éq/OH) est additionné en une seule fois. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant une nuit à température ambiante. Lorsque la réaction est terminée, une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium est versée dans le mélange. La phase organique est ensuite extraite au dichlorométhane, lavée par une solution d'acide chlorhydrique diluée, puis par l'eau. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous vide. Le produit brut peut être purifié par chromatographie sur colonne de silice utilisant comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 3/1) ou par recristallisation dans l'éthanol. Le composé **16** (16g) est obtenu avec un rendement de 96%.

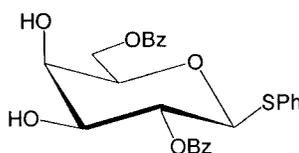
$R_f = 0.38$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 3/1)

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.13-7.08 (m, 15H, H-arom), 5.38 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 10.1$  Hz,  $J_{2,3} = 6.9$  Hz, H-2), 4.84 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.1$  Hz, H-1), 4.78 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 12.0$  Hz,  $J_{6a,5} = 3.5$  Hz, H-6a), 4.66 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 8.3$  Hz, H-6b), 4.45 (m, 1H, H-3), 4.39 (dd, 1H,  $J_{4,3} = 5.41$  Hz,  $J_{4,5} = 2$  Hz, H-4), 4.27 (m, 1H, H-5), 1.65 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.3, 165.4 (C=O), 133.7, 133.2, 131.7 (C-arom), 129.9, 129.8, 129.7, 129.7, 128.7, 128.4, 128.3, 127.6 (CH-arom), 111.08 ( $\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_2$ ), 86 (C-1), 77.23, 74.44, 73.67, 71.90 (C-2, C-3, C-4, C-5), 64.1 (C-6), 27.6, 26.3 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

Phényl 2, 6-di-O-benzoyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyrannoside

(17)



$\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{S}$  M 480.53

Le produit **16** (16g, 30.7 mmol) est dissous dans l'acide acétique (859 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à une température de 80 °C avant d'être dilué avec de l'eau (225 mL). Le milieu est laissé sous agitation pendant 1.5h. Lorsque la réaction est terminée, le milieu réactionnel est concentré sous vide, puis le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1). Le produit **17** (13.7g, 93%) obtenu est sous forme d'une poudre blanche.

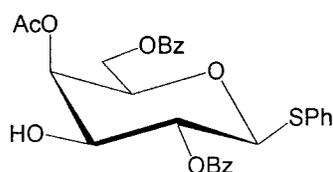
$R_f = 0.3$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1).

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.13-7.18 (m, 15H, H-arom), 5.27 (t, 1H,  $J_{2,3} = 9.6$  Hz, H-2), 4.88 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.1$  Hz, H-1), 4.76 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11.6$  Hz,  $J_{6a,5} = 5.3$  Hz, H-6a), 4.64 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 7.2$  Hz, H-6b), 4.15 (m, 1H, H-4), 3.99 (m, 1H, H-5), 3.91 (m, 1H, H-3).

$^{13}\text{C RMN}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167.1, 166.5 (C=O), 133.5, 133.3, 132.8, 132.3 (C-arom), 130, 129.7, 129.5, 129.3, 128.8, 128.4, 127.8 (CH-arom), 86.1 (C-1), 76.13, 73.70, 72.24, 68.90 (C-2, C-3, C-4, C-5), 63.41 (C-6).

*Phényl 4-O-acétyl-2, 6-di-O-benzoyl-1-thio-β-D-galactopyranoside*

(18)



$\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{S}$  M 522.57

Le produit **17** (2.5g, 5.21 mmol, 1 éq) est dissous dans le triéthylorthoacétate (16.43 mL). Le milieu est acidifié par l'acide 10-d, l-camphorsulfonique (278.53mg, 1.19 mmol, 0.23 éq) et la solution est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes avant de recevoir l'acide acétique à 80% aqueux (32.86 mL). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Lorsque la réaction est terminée, le mélange est concentré sous vide et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (toluène-acétate d'éthyle 2/1). Le produit **18** (2.52g) isolé est de rendement 93%.

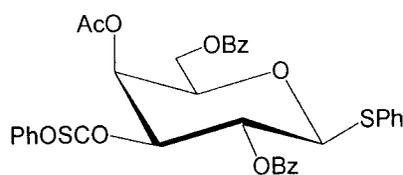
$R_f = 0.46$  (toluène-acétate d'éthyle 2/1)

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.11-7.17 (m, 15H, H-arom), 5.55 (m, 1H, H-4), 5.37 (t, 1H,  $J_{2,3} = 9.8$  Hz, H-2), 4.9 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.0$  Hz, H-1), 4.5 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.11 (m, 2H, H-3, H-5), 2.22 (s, 3H, OAc).

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.9, 166.5, 166.0 (C=O), 133.45, 133.24, 132.16 (C-arom), 129.89, 129.7, 128.76, 128.40, 128.39, 127.84 (CH-arom), 86.5 (C-1), 74.95, 72.33, 71.45, 70.03 (C-2, C-3, C-4, C-5), 62.77 (C-6), 20.72 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

*Phényl 2, 6-di-O-benzoyl-3-acétyl-4-phénoxythiocarbonyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyrannoside*

(19)



$\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{S}_2$  M 658.74

A une solution de **18** (1.52g, 1.913 mmol, 1 éq) dans 10 mL de dichlorométhane et 10 mL de pyridine sous argon est ajouté goutte à goutte (0.8 mL, 2 éq) de chlorure de phénoxythiocarbonyle à température ambiante. La réaction est maintenue sous agitation pendant 14h. Le mélange est ensuite concentré, puis filtré sur une colonne de silice utilisant comme solvant de l'acétone. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice utilisant comme éluant (toluène-acétate d'éthyle 9/1). Le produit **19** (1.87g) est obtenu avec un rendement de 98%.  $R_f = 0.58$  (toluène- acétate d'éthyle 9/1)

$[\alpha]_D^{20} +46.1^\circ$  (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  676 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{S}_2$

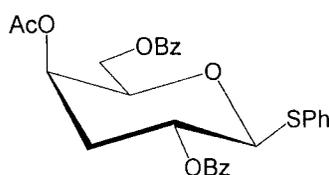
Calculée	C 63.81	H 4.59
Trouvée	C 63.79	H 4.50

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.12 (m, 4H, H-arom), 7.55-7.20 (m, 14H, H-arom), 6.95 (m, 2H, H-arom), 5.97 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.8$  Hz,  $J_{3,4} = 3.4$  Hz, H-3), 5.92 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 0.8$  Hz, H-4), 5.79 (t,  $J_{1,2} = 10.1$  Hz, H-2), 5.06 (d, 1H, H-1), 4.62 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 4.8$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.4$  Hz, H-6a), 4.49 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 5.2$  Hz, H-6b), 4.29 (ddd, 1H, H-5), 2.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  193.89 (C=S), 169.90 (C=O, Ac), 165.92, 165.06(2 C=O, Bz), 153.15, 132.66, 129.30, 129.12 (C-arom), 133.51, 133.32, 132.33, 129.97, 129.69, 129.58, 129.39, 128.81, 128.50, 128.44, 128.02, 126.74, 126.58, 121.73, 121.48 (CH-arom), 87.06 (C-1), 80.91, 74.70, 67.93, 66.67 (C-2, C-3, C-4, C-5), 62.43 (C-6), 20.60 ( $\text{CH}_3$ ).

Phényl 2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy-4-O-acétyl-1-thio-β-D-xylo-hexopyrannoside

(20)

C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>S M 506.57

Le composé **19** (1g, 1.51 mmol, 1 éq) est dissous dans le toluène anhydre sous argon. L'hydruure de tributyl étain (818 μL, 2 éq) et (14.95mg, 0.06 éq) d'AIBN sont alors ajoutées. Le mélange est porté pendant une heure à 80 °C. La réaction terminée le mélange est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant l'éluant (toluène-acétate d'éthyle 6/1). Le composé **20** (0.65g) isolé est obtenu avec un rendement de 85%. R<sub>f</sub> = 0.55 (toluène-acétate d'éthyle 6/1)

[α]<sub>D</sub> - 32.12° (c 1, chloroforme)

Spectre de masse : m/z 524 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>S

Calculée C 66.38 H 5.17

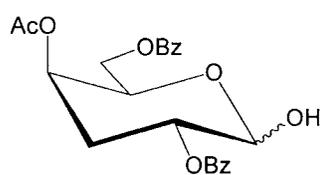
Trouvée C 66.54 H 5.13

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.07 (m, 4H, H-arom), 7.64- 7.48 (m, 8H, H-arom), 7.29-7.18 (m, 3H, H-arom), 5.33 (m, 2H, H-2, H-4), 5.00 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 9.9 Hz, H-1), 4.54 (dd, 1H, J<sub>5,6a</sub> = 7.5 Hz, J<sub>6a,6b</sub> = 11.5 Hz, H-6a), 4.49 (dd, 1H, J<sub>5,6b</sub> = 5.1 Hz, H-6b), 4.15 (ddd, 1H, J<sub>4,5</sub> = 1.2 Hz, H-5), 2.67 (ddd, 1H, J<sub>2,3e</sub> = 5.0 Hz, J<sub>3e,3a</sub> = 14.1 Hz, J<sub>3e,4</sub> = 3.2 Hz, H-3e), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.99 (ddd, 1H, J<sub>2,3a</sub> = 11.3 Hz, J<sub>3a,4</sub> = 3.0 Hz, H-3a).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.26 (C=O, Ac), 166.12, 165.27 (2 C=O, Bz), 129.65, 129.57 (C-arom), 133.31, 133.28, 131.99, 129.76, 129.73, 128.81, 128.45, 127.68 (CH-arom), 88.33 (C-1), 76.77 (C-5), 67.34 (C-2), 66.44 (C-4), 63.15 (C-6), 34.61 (C-3), 21.00 (CH<sub>3</sub>).

2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy-4-O-acétyl-D-xylo-hexopyrannose

(21)

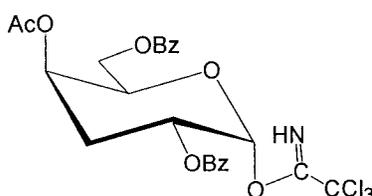
C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub> M 414.41

On dissout le composé **20** (315mg, 0.621 mmol, 1 éq) dans (2 mL) de THF et (0.4 mL) d'eau ; Dans un autre ballon et sous agitation on mélange (202mg, 1.5 éq) d'oxyde de mercure HgO, avec 2 mL de THF et (0.25 mL, 3.2 éq) de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O. Cette suspension est rajoutée à l'aide d'une pipette de pasteur goutte à goutte au mélange précédent. Après la fin de l'addition le mélange est laissé sous agitation pendant 15 min. Une fois la réaction terminée, la solution est concentrée puis reprise dans de l'éther. Le mélange est successivement lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, une solution d'iodure de potassium 10% dans l'eau, séché sur sulfate de magnésium puis concentré. Le résidu obtenu est directement engagé dans l'étape suivante.

R<sub>f</sub> = 0.4 (toluène-acétate d'éthyle 4/1).

2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy-4-O-acétyl-β-D-xyllo-hexopyrannosyl trichloroacétimidate

(22)



C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>8</sub> M 558.79

A une solution du composé **21** (5.16g, 14.81 mmol, 1 éq) dans 220 mL de dichlorométhane anhydre, est additionné à 0 °C du trichloroacétonitrile (17.08 mL, 170.37 mmol, 11.5 éq), ensuite goutte à goutte est ajoutée de la DBU (2.23 mL, 14.81 mmol, 1 éq). Le mélange est laissé sous agitation pendant une heure à 0 °C. Après la fin de la réaction le milieu est concentré puis filtré par une courte colonne sur gel de silice (toluène-acétate d'éthyle 6/1). Le composé **22** (6.61g) est obtenu sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 95%. R<sub>f</sub> = 0.53 (toluène-acétate d'éthyle 4/1), [α]<sub>D</sub> +20° (c 0.9, chloroforme)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.59 (s, 1H, NH), 8.01-7.99 (m, 4H, arom), 7.58-7.54 (m, 2H, arom), 7.45-7.40 (m, 4H, arom), 6.65 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 3.2 Hz, H-1), 5.60-5.54 (m, 1H, H-2), 5.41 (m, 1H, H-4), 4.55-4.451 (m, 1H, H-5), 4.46-4.37 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.45-2.43 (m, 1H, H-3a), 2.42-2.41 (m, 1H, H-3e), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.16 (C=O, Ac), 166.03, 165.49 (2 C=O, Bz), 160.69 (C=NH), 133.51-128.39 (aromatic C, CH), 93.06 (C-1), 69.57 (C-5), 67.34 (C-4), 66.52 (C-2), 62.36 (C-6), 28.36 (C-3), 20.96 (CH<sub>3</sub>).

Spectre de masse : (HRMS) C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>8</sub> (M+Na<sup>+</sup>) m/z :

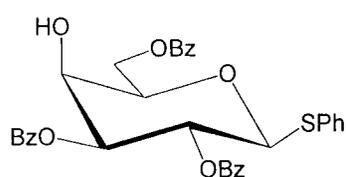
Calculée 580.0303

Trouvée 580.0316

## 3.2. Galactose désoxygéné en position 4

Phényl 2, 3, 6-tri-O-benzoyl-1-thio-β-D-galactopyrannoside

(23)



Le composé **17** (6g, 12.5 mmol, 1 éq) est dissous dans 300 mL de toluène anhydre auquel on ajoute (3.42g, 13.76 mmol, 1.1 éq) d'oxyde de dibutyl étain. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant une nuit en évacuant l'eau avec un séparateur Dean Stark. Le mélange est ensuite concentré sous vide, le résidu est repris sous argon dans le toluène anhydre et le chlorure de benzoyle (1.6 mL, 1.1 éq) est rajouté. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2h. Le toluène est évaporé sous vide et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1). Le produit **23** (3.87g) est obtenu avec un rendement de 53%.

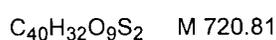
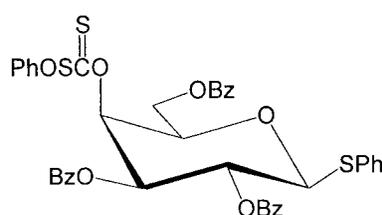
$R_f = 0.52$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1)

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.09-7.99 (m, 5H, H-arom), 7.54-7.20 (m, 10H, H-arom), 5.86 (t, 1H,  $J_{2,3} = 9.9$  Hz, H-2), 5.44 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, H-3), 5.03 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.0$  Hz, H-1), 4.76-4.66 (2dd, 2H,  $J_{6a,6b} = 11.7$  Hz, H-6a, H-6b), 4.17 (m, 1H, H-5), 2.69 (m, 1H, H-4).

$^{13}\text{C RMN}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.39, 165.73, 165.33 (C=O), 133.5, 133.3, 132.25, 132.3 (C-arom), 129.83, 129.77, 128.84, 128.44, 128.36, 127.9 (CH-arom), 86.83 (C-1), 76.22, 75.15, 67.80, 67.57 (C-2, C-3, C-4, C-5), 63.48 (C-6).

Phényl 2, 3, 6-tri-O-benzoyl-4-phénoxythiocarbonyl-1-thio-β-D-galactopyrannoside

(24)



Sous argon, à une solution de **23** (3.5g, 5.98 mmol, 1 éq) dans un mélange de 52.5 mL de dichlorométhane anhydre et 52.5 mL de pyridine en présence de DMAP (730mg, 1 éq), est rajoutée du chlorure de phénoxythiocarbonyle (2.5 mL, 17.95 mmol, 3 éq). Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit. La réaction est terminée une fois que tout le produit de départ aurait disparu. La solution est concentrée puis reprise dans du dichlorométhane, lavée avec de l'eau et séchée sur sulfate de magnésium. Le résidu est ensuite concentré puis filtré sur une colonne de silice avec de l'éther diéthylique. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (toluène-acétate d'éthyle 15/1). Le produit **24** (3.15g) obtenu avec un rendement de 73%.

$R_f = 0.64$  (toluène-acétate d'éthyle 9/1).

$[\alpha]_D^{25} +73.73^\circ$  (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse : (HRMS)  $C_{40}H_{33}O_9S_2$  ( $M+H^+$ )  $m/z$  :

Calculée 721.1566

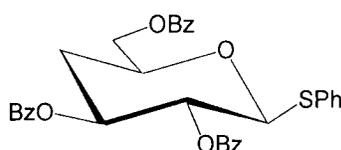
Trouvée 721.1565

$^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.12- 7.99 (m, 7H, H-arom), 7.57-7.01 (m, 18H, H-arom), 6.49 (m, 1H, H-4), 5.91 (t, 1H,  $J_{2,3} = 10$  Hz, H-2), 5.73 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.4$  Hz, H-3), 5.14 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.1$  Hz, H-1), 4.73 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11.4$  Hz,  $J_{6a,5} = 7.14$  Hz, H-6a), 4.64 (dd, 1H,  $J_{6b,6a} = 11.5$  Hz,  $J_{6b,5} = 5.8$  Hz, H-6b), 4.45 (m, 1H, H-5).

$^{13}C$  RMN (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  194.96 (C=S), 165.92, 165.46, 165.10 (C=O), 153.3 (O-Ph), 133.50, 133.35, 132.30, 132.32 (C-arom), 129.80, 129.76, 129.60, 129.44, 128.88, 128.37, 128.06, 126.74, 126.60 (CH-arom), 87.14 (C-1), 77.32, 74.74, 72.41, 67.95 (C-2, C-3, C-4, C-5), 62.07 (C-6).

Phényl 2, 3, 6-tri-O-benzoyl-4-désoxy-1-thio- $\beta$ -D-xylo-hexopyrannoside

(25)



$C_{33}H_{28}O_7S$  M 568.64

Le composé **24** (3g, 4.16 mmol, 1 éq) est dissous dans 13 mL de toluène anhydre sous argon. L'hydrure de tributyl étain (2.46 mL, 9.15 mmol, 2.2 éq) et (41mg, 0.25 mmol, 0.06 éq) d'AIBN sont alors ajoutés. Le mélange est porté pendant 30 min à 80 °C. La réaction terminée, le mélange est concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de

gel de silice en utilisant l'éluant (toluène-acétate d'éthyle 6/1). Le produit **25** (2.3g, 97%) est obtenue sous forme de cristaux blancs après recristallisation dans l'éthanol.

$R_f = 0.55$  (toluène-acétate d'éthyle 9/1)

$[\alpha]_D +66.86^\circ$  (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  586.2 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $C_{33}H_{28}O_7S$

Calculée C 69.7 H 4.96

Trouvée C 68.5 H 4.86

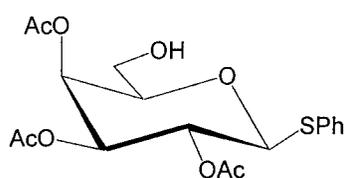
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.12-7.96 (m, 5H, H-arom), 7.53-7.20 (m, 15H, H-arom), 5.46 (m, 2H, H-2, H-3), 4.99 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.8$  Hz, H-1), 4.58-4.48 (2 dd, 2H,  $J_{6a,6b} = 11.7$  Hz,  $J_{6a,5} = 3.8$  Hz,  $J_{6b,5} = 6.3$  Hz, H-6a, H-6b), 4.16 (m, 1H, H-5), 2.53 (m, 1H, H-4a), 1.94 (m, 1H, H-4b).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  166.16, 165.82, 165.4 (C=O), 133.30, 133.26, 132.67, 132.52 (C-arom), 129.81, 129.78, 129.72, 128.80, 128.45, 128.38, 127.97 (CH-arom), 86.37 (C-1), 73.70, 72.68, 70.83 (C-2, C-3, C-5), 65.87 (C-6), 32.87 (C-4).

### 3.3. Galactose désoxygéné en position 6

Phényl 2, 3, 4-tri-O-acétyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyrannoside

(26)



$C_{18}H_{22}O_8S$  M 398.43

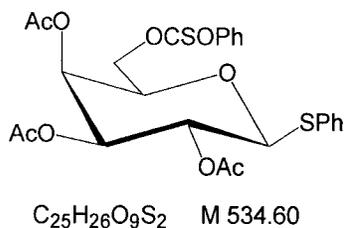
A une solution du composé **13** (10g, 22.72 mmol, 1 éq) dans 114 mL de méthanol et 114 mL de tétrahydrofurane anhydre, on ajoute (648mg, 1.13 mmol, 0.05 éq) de chlorure de di-tertobutyl, hydroxy-étain [tBu<sub>2</sub>SnOH (Cl)]<sub>2</sub>. Le milieu maintenu sous argon est porté à une température de 30 °C pendant 4h. Une fois la réaction terminée, le mélange est concentré puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1). Le produit désacétylé en position 6 (8.05g) est obtenu avec un rendement de 89%.  $R_f = 0.51$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/3).

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.48-7.46 (m, 2H, H-arom), 7.31-7.26 (m, 3H, H-arom), 5.39 (m, 1H, H-4), 5.22 (t, 1H,  $J_{2,3} = 9.9$  Hz, H-2), 5.06 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz, H-3), 4.75 (d, 1H,  $J_{1,2} = 9.85$  Hz, H-1), 3.78 (m, 1H, H-6a), 3.70 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 5.7$  Hz,  $J_{6b,6a} = 11.54$  Hz, H-6b), 3.5 (m, 1H, H-5), 2.78 (m, 1H, OH), 2.08, 2.06, 1.95 (3s, 9H, 3xOAc).

$^{13}\text{C RMN}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.66, 169.83, 169.27 (C=O, Ac), 132.28, 131.86 (C-arom), 128.70, 128.65, 127.73 (CH-arom), 85.99 (C-1), 77.12, 71.87, 67.63, 67.28 (C-5, C-4, C-3, C-2), 60.45 (C-6), 20.57, 20.38, 20.36 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

*Phényl 2, 3, 4-tri-O-acétyl, 6-phénoxythiocarbonyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside*

(27)



Sous argon, à une solution de **26** (8g, 20.1 mmol, 1 éq) dans un mélange de 72 mL dichlorométhane et 72 mL de pyridine, est rajoutée du chlorure de phénoxythiocarbonyle (3.35 mL, 24.12 mmol, 1.2 éq). Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit. La réaction est terminée une fois que tout le produit de départ aurait disparu. La solution est concentrée puis filtrée sur colonne de silice utilisant de l'acétone. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1). (10.20g) du produit **27** est obtenu avec un rendement de 95% sous forme d'une poudre blanche.

$R_f = 0.44$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1)

Spectre de masse : (HRMS)  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_9\text{S}_2\text{N}$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ ) $^+$  m/z :

Calculée        552.1362

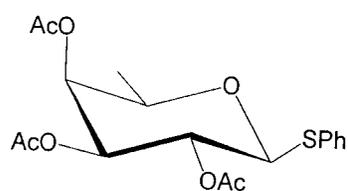
Trouvée        552.1365

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.61-7.43 (m, 4 H-arom), 7.37-7.11 (m, 6 H-arom), 5.55 (m, 1H, H-4), 5.32 (m, 1H,  $J_{2,3} = 9.9$  Hz, H-2), 5.14 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz, H-3), 4.81 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.07$  Hz, H-1), 4.65 (2dd, 2H,  $J_{6b,6a} = 11.4$  Hz, H-6a, H-6b), 4.20 (m, 1H, H-5), 2.18, 2.14, 2.03 (3s, 9H, 3xOAc).

$^{13}\text{C RMN}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  194.65 (C=S), 170.12, 169.92, 169.36 (C=O), 153.3 (O-Ph), 132.45, 132.37 (C-arom), 129.55, 128.91, 128.14, 126.67, 121.73 (CH-arom), 86.66 (C-1), 74.02, 71.83, 67.35, 67.12 (C-2, C-3, C-4, C-5), 70.62 (C-6), 20.78, 20.65, 20.52 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

Phényl 2, 3, 4-tri-O-acétyl,6-O-désoxy-1-thio-β-D-fucopyrannoside

(28)

C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>S M 382.43

Sous argon, le composé **27** (10g, 18.7 mmol, 1 éq) est dissous dans 400 mL de toluène anhydre. L'hydrure de tributyl étain (10 mL, 37.41 mmol, 2 éq) et l'AIBN (184mg, 1.12 mmol, 0.06 éq) sont alors rajoutés. Le milieu réactionnel est porté pendant 1h à 80 °C. Le mélange est ensuite concentré sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (toluène-acétate d'éthyle 4/1). Le composé **28** est obtenu sous forme d'une huile (5g, 70%).  
R<sub>f</sub> = 0.4 (toluène-acétate d'éthyle 4/1)

Spectre de masse : (HRMS) C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>SN (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> m/z :

Calculée 400.1425

Trouvée 400.1430

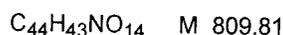
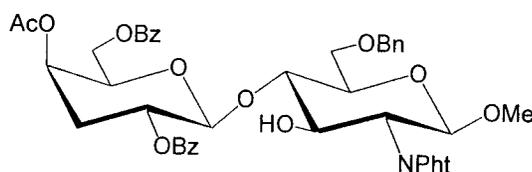
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.55-7.52 (m, 2H, H-arom), 7.35-7.32(m, 3H, H-arom), 5.26 (m, 2H, H-2, H-4), 5.08 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub> = 3.35 Hz, J<sub>3,2</sub> = 9.8 Hz, H-3), 4.73 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 9.8 Hz, H-1), 3.86 (m, 1H, H-5), 2.17, 2.11, 1.99 (3s, 9H, 3xOAc), 1.26 (d, 3H, J<sub>6,5</sub> = 6.4 Hz, H-6).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.57, 170.08, 169.45 (C=O, Ac), 132.22 (C-arom); 129.50, 128.80, 127.86 (CH-arom), 86.36 (C-1), 73.06, 72.35, 70.25, 67.27 (C-2, C-3, C-4, C-5), 20.80, 20.59, 20.56 (C-CH<sub>3</sub>CO), 16.39 (C-6).

## 4. PREPARATION DU TRISACCHARIDE LE<sup>x</sup> DESOXYGENE EN POSITION 3

### 4.1. Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-3 mime Lewis<sup>x</sup>

*Méthyl (4-O-acétyl-2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy-β-D-xylo-hexopyrannosyl)-(1→4)-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyrannoside* (29)



Les composés **7** (1.5g, 3.62 mmol, 1 éq) et **20** (1.83g, 3.61 mmol, 1 éq) sont dissous dans 100 mL de dichlorométhane anhydre dans lequel on ajoute 10g de tamis moléculaire 4Å. Le mélange est laissé sous argon et sous agitation à température ambiante pendant 40 min puis refroidi à  $-30$  °C. La NIS (1.63g, 7.25 mmol, 2 éq) est ajoutée, suivie d'une addition goutte à goutte de l'acide triflique (97.32  $\mu$ L, 48.33 mmol, 0.15 éq/NIS). La température du bain est maintenue à  $-30$  °C pendant une heure, ensuite le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré sur célite, puis la phase organique est lavée avec une solution saturée de  $NaHCO_3$ , une solution de thiosulfate de sodium puis l'eau. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée puis concentrée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (toluène- acétate d'éthyle 9/1). (2.04g) de **29** est obtenu avec un rendement de 70%.

$R_f = 0.54$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1)

Spectre de masse : (HRMS) pour  $C_{44}H_{47}O_7N_2$  ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup> m/z :

Calculée 827.3027

Trouvée 827.3043

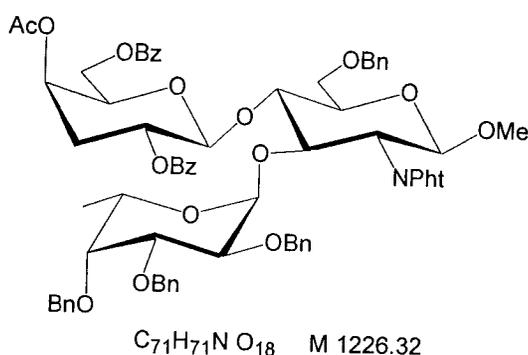
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.11- 7.25 (m, 19H, H arom), 5.35 (ddd, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz,  $J_{2,3a} = 5.2$  Hz,  $J_{2,3b} = 12.0$  Hz, H-2'), 5.23 (m, 1H, H-4'), 5.14 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.5$  Hz, H-1), 4.82 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.1$  Hz, H-1'), 4.65 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 3.3$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.6$  Hz, H-6'a), 4.56 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 8.1$  Hz,  $J_{3,4} = 10.9$  Hz, H-3), 4.33 (dd, 1H,  $J_{gem} = 12.3$  Hz,  $PhCH_2$ ), 4.28 (m, 2H, H-6b, H-2), 4.22 (dd, 1H,  $J_{gem} = 11.6$  Hz,  $PhCH_2$ ), 4.17-4.13 (m, 1H, H-5'), 3.81 (m, 1H, H-4), 3.71-3.61 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 3.45 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 2.56 (ddd, 1H,  $J_{3'a,4'} = 8.2$  Hz,  $J_{2,3a} = 5.1$

Hz,  $J_{3'a,3'b} = 3.0$  Hz, H-3'a), 2.19 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.92 (ddd, 1H,  $J_{2',3'b} = 14.7$  Hz,  $J_{3'b,4'} = 11.9$  Hz,  $J_{3'a,3'b} = 3.0$  Hz, H-3'b).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.9, 166.9, 164.9 (COCH<sub>3</sub>, 2×COPh), 133.8, 133.4, 133.1, 132.1, 129.7, 129.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.4, 127.2, 125.2 (19 CH-arom), 131.7, 129.3, 128.9 (3 C-arom), 103.0 (C-1), 98.9 (C-1'), 82.2, 75.0, 74.0, 69.7, 67.7, 67.1 (6×CH, C-3, C-4, C-5, C-2', C-4', C-5'), 73.0 (Ph-CH<sub>2</sub>), 68.0 (C-6), 62.9 (C-6'), 56.5, 55.7 (C-2', OCH<sub>3</sub>), 32.9 (C-3'), 20.8 (CH<sub>3</sub>CO).

#### 4.2. Synthèse du désoxy-3 mime trisaccharide Le<sup>x</sup>

*Méthyl (4-O-acétyl-2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy-β-D-xyllo-hexopyrannosyl)-(1→4)-[(2, 3, 4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyrannosyl)-(1→3)]-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyrannoside* (30)



Les produits **29** (2g, 2.47 mmol, 1 éq) et **11** (2.71g, 5.68 mmol, 2.3 éq) sont dissous dans 80 mL de toluène anhydre contenant 10g de tamis moléculaire 4Å. Ce mélange est agité pendant 30 min à température ambiante. La N-iodosuccinimide (1.27g, 5.68 mmol, 2.3 éq) et l'acide trifluorométhanesulfonique (44.8 μL, 0.23 éq) sont additionnés à -30 °C. Après une heure, la réaction est finie. Le milieu est neutralisé par de la triéthylamine, filtré sur célite, puis concentré. Le résidu est repris dans le dichlorométhane, lavé par de l'eau, une solution de thiosulfate de sodium puis par une solution saturée en chlorure de sodium. La solution est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 3/2). Le produit **30** (1.81g) est obtenu avec un rendement de 60%.

$R_f = 0.5$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 3/2)

$[\alpha]_D -2.05^\circ$  (c 0.5, chloroforme)

Spectre de masse : (HRMS) (FAB) C<sub>71</sub>H<sub>71</sub>O<sub>18</sub>N (M+Na)<sup>+</sup> m/z :

Calculée 1248.4569

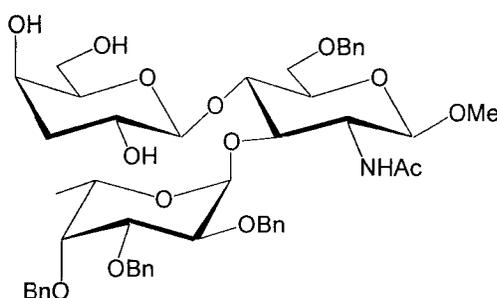
Trouvée 1248.4586

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.16-7.06 (m, 34H, H-arom), 5.14 (m, 1H, H-2''), 5.09 (m, 1H, H-4''), 4.98 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.4$  Hz, H-1), 4.92-4.89 (m, 3H, H-1', H-1'',  $\text{PhCH}_2$ ), 4.84 (m, 1H, H-5'), 4.76 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 9.0$  Hz,  $J_{3,4} = 10.5$  Hz, H-3), 4.69-4.66 (m, 3H,  $3 \times \text{PhCH}_2$ ), 4.50 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.2$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.45-4.42 (m, 2H, H-6''b, H-2), 4.38 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.4$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.29 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.4$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.26-4.16 (m, 2H, H-4, H-6a''), 4.09-4.02 (m, 2H, H-3', H-6b), 3.87 (dd, 1H,  $J_{1',2'} = 3.7$  Hz,  $J_{2',3'} = 10.2$  Hz, H-2'), 3.80-3.76 (m, 2H, H-5'', H-6a), 3.72 (m, 1H, H-4'), 3.51 (m, 1H, H-5), 3.38 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.43 (m, 1H, H-3''b), 1.62 (m, 1H, H-3''a), 1.3 (m, 3H,  $J_{5',6'} = 6.5$  Hz, H-6').

$^{13}\text{C}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.7, 165.9, 164.8 ( $\text{COCH}_3$ ,  $2 \times \text{COPh}$ ), 139.0, 138.7, 138.2, 137.9, 131.7, 129.6 (6 C arom), 133.9, 133.3, 133.2, 129.7, 129.5, 128.7, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 127.3, 127.0, 126.9, 126.8, 123.4 (34C-H arom), 100.8 (C-1), 99.2 (C-1''), 97.6 (C-1'), 79.7, 77.7, 75.1, 75.0, 74.6, 73.7, 72.7, 68.0, 67.0, 66.4 ( $10 \times \text{CH}$ , C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', C-2'', C-4'', C-5''), 74.1, 73.6, 72.8, 72.8 ( $4 \times \text{CH}_2\text{Ph}$ ), 67.7 (C-6), 61.5 (C-6''), 56.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.1 (C-2), 23.2 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 32.9 (C-3''), 20.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 16.8 (C-6').

#### 4. 3. Déprotection du désoxy-3 mime trisaccharide $\text{Le}^x$

Méthyl (3-désoxy- $\beta$ -D-xyllo-hexopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2, 3, 4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-O-benzyl-2-désoxy-2-acétamido- $\beta$ -D-glucopyranoside



$\text{C}_{49}\text{H}_{61}\text{NO}_{14}$  M 888.01

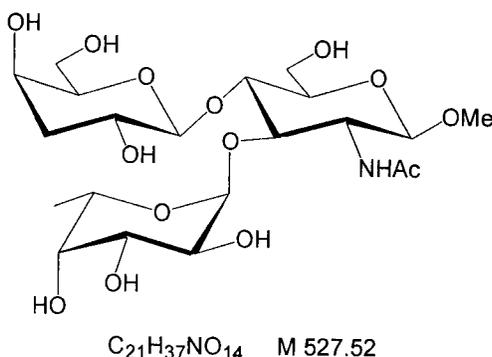
(1.81g, 1.47 mmol) du composé **30** sont placés dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant et muni d'une agitation magnétique, en présence de 136 mL d'éthanol 99%, 8 mL d'hydrazine monohydrate et 8 mL d'eau. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant une nuit. Une fois que la réaction est finie, la suspension est concentrée et l'eau résiduelle est co-évaporée à l'aide de l'acétate d'éthyle. Le résidu est séché sous  $\text{P}_2\text{O}_5$  et directement engagé dans l'étape suivante.

$R_f = 0.27$  (dichlorométhane-méthanol 10/1).

Au résidu séché, on ajoute 45 mL de méthanol, 45 mL de dichlorométhane et 9 mL d'anhydride acétique. Le mélange est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant une nuit. La réaction étant finie, le milieu réactionnel est concentré et le résidu subit une flash chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane-méthanol 15/1).

$R_f = 0.21$  (dichlorométhane-méthanol 15/1).

Méthyl (3-désoxy-β-D-xyllo-hexopyrannosyl)-(1→4)-[α-L-fucopyrannosyl-(1→3)]-2-désoxy-2-acétamido-β-D-glucopyrannoside (31)



900mg du trisaccharide benzylé sont mis en solution dans (72 mL) de méthanol. Le produit est hydrogéné en présence de 270mg de palladium sur charbon 10% pendant 12 heures sous une pression de 160 KPa. La réaction est suivie par CCM (éluant :acétate d'éthyle-isopropanol-eau 3/3/2). Une fois que la réaction est finie, le mélange est filtré sur célite puis concentré. Le résidu est purifié sur séphadex et on obtient 500mg du produit **31** avec un rendement de 95%.  $R_f = 0.35$  (acétate d'éthyle-isopropanol-eau 3/3/2).

Spectre de masse : (HRMS) pour  $C_{21}H_{37}O_{14}N$  ( $M+Na$ )<sup>+</sup> m/z :

Calculée 550.2112

Trouvée 550.2128

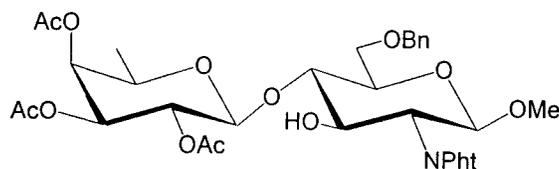
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 5.12 (d, 1H,  $J_{1,2} = 4.0$  Hz, H-1'), 4.89 (m, 1H, H-5'), 4.49 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz, H-1), 4.46 (d, 1H,  $J_{1',2''} = 7.9$  Hz, H-1''), 4.04-3.94 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 3.93-3.84 (m, 4H, H-2, H-4, H-3', H-6b), 3.77 (m, 1H, H-3), 3.72-3.59 (m, 6H, H-6''a, H-6''b, H-6a, H-5, H-2'', H-2'), 2.19 (m, 1H, H-3''b), 1.73 (m, 1H, H-3''b), 1.19 (d, 3H,  $J_{5',6'} = 6.6$  Hz, H-6').

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 174.8 (C=O), 104.0 (C-1), 102.1 (C-1''), 99.0 (C-1'), 78.4-65.8 (11 CH, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 62.1 (C-6''), 60.2 (C-6), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 52.4 (C-2), 36.9 (C-3''), 22.6 (CH<sub>3</sub>-CO), 15.7 (C-6').

## 5. PREPARATION DU MIME TRISACCHARIDE LE<sup>x</sup> DESOXYGENE EN POSITION 6

### 5. 1. Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-6 mime Le<sup>x</sup>

Méthyl (2, 3, 4-tri-O-acétyl-6-désoxy-β-D-fucopyrannosyl)-(1→4)-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyrannoside (32)



C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>14</sub> M 685.67

Les composés **7** (1.5g, 3.62 mmol, 1 éq) et **28** (1.38g, 3.60 mmol, 1 éq) sont dissous dans 100 mL de dichlorométhane anhydre dans lequel on ajoute 10g de tamis moléculaire 4Å. Le mélange est laissé sous argon et sous agitation à température ambiante pendant 40 min puis refroidi à -30 °C. La NIS (1.63g, 7.25 mmol, 2 éq) est ajoutée, suivie d'une addition goutte à goutte de l'acide triflique (97.32 µL, 48.33 mmol, 0.15éq/NIS). La température du bain est gardée à -30 °C pendant une heure, ensuite le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré sur célite, puis la phase organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>, une solution de thiosulfate de sodium puis l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis concentrée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (toluène- acétate d'éthyle 2/1). (1.74g) de **32** est obtenu avec un rendement de 70%.

R<sub>f</sub> = 0.37 (toluène-acétate d'éthyle 2/1)

[α]<sub>D</sub> +5.86° (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse : (HRMS) C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>14</sub> (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> m/z :

Calculée 703.2714

Trouvée 703.2720

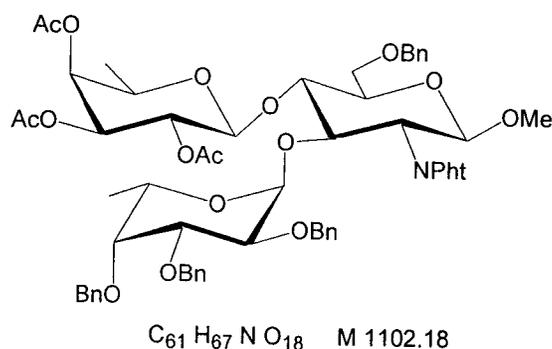
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,74 -7.41 (m, 9H, H arom), 5.20 (dd, 1H, J<sub>4',3'</sub> = 0.6 Hz, J<sub>4',5'</sub> = 3.3 Hz, H-4'), 5.18 (dd, 1H, J<sub>2',1'</sub> = 2.5 Hz, J<sub>2',3'</sub> = 10.5 Hz, H-2'), 5.14 (d, 1H, J<sub>1-2</sub> = 8.4 Hz, H-1), 4.94 (dd, 1H, J<sub>3',2'</sub> = 10.5 Hz, J<sub>3',4'</sub> = 3.5 Hz, H-3'), 4.79 (dd, 1H, J<sub>gem</sub> = 12.0 Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.55 (dd, 1H, J<sub>gem</sub> = 12.0 Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.45 (dd, 1H, J<sub>3,2</sub> = 10.9 Hz, J<sub>3,4</sub> = 8.3 Hz, H-3), 4.43 (d, 1H, J<sub>1,2'</sub> = 8.0 Hz, H-1'), 4.19 (dd, 1H, J<sub>2,1</sub> = 8.5 Hz, J<sub>2,3</sub> = 10.9 Hz, H-2), 3.82-3.71 (m, 4H, H-

5', H-4, H-6a, H-6b), 3.69 -3.65 (m, 1H, H-5), 3.46 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.19 (d, 3H, J = 6.3 Hz, H-6').

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.4, 169.9, 169.1 (3×COCH<sub>3</sub>), 133.9, 128.4, 127.8, 123.3 (9 CH-arom), 131.8 (C-arom), 100.9 (C-1), 99.1 (C-1'), 81.1, 74.1, 70.9, 69.7, 69.5, 69.4, 68.7 (7×CH, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3, C-4', C-5'), 73.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 67.7 (C-6), 56.7, 55.8 (C-2', OCH<sub>3</sub>), 20.6, 20.5, 20.4 (3×COCH<sub>3</sub>), 15.7 (C-6').

## 5.2. Synthèse du désoxy-6 mime Le<sup>x</sup>

*Méthyl (2, 3, 4-tri-O-acétyl-6-désoxy-β-D-fucopyrannosyl)-(1→4)-[(2, 3, 4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyrannosyl-(1→3)]-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyrannoside* (33)



Les produits **32** (2g, 2.91 mmol, 1 éq) et **11** (3.21g, 6.70 mmol, 2.3 éq) sont dissous dans le toluène anhydre (80 mL) contenant le tamis moléculaire 4Å (10g). Ce mélange est agité pendant 30 min à température ambiante. La N-iodosuccinimide (1.5g, 6.70 mmol, 2.3 éq) et l'acide trifluorométhanesulfonique (52.5 µL, 0.67mmol 0.23 éq) sont additionnés à -30 °C. Après une heure la réaction est finie. Le milieu est neutralisé par de la triéthylamine, filtré sur célite, puis concentré. Le résidu est repris dans le dichlorométhane, lavé par de l'eau, une solution de thiosulfate de sodium puis par une solution saturée en chlorure de sodium. La solution est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice, éluant (toluène-acétate d'éthyle 3/2). (1.92g) est obtenu avec un rendement de 60%.

R<sub>f</sub> = 0.4 (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/3)

[α]<sub>D</sub> -42.2° (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse : (HRMS) C<sub>61</sub>H<sub>70</sub>O<sub>18</sub>N<sub>2</sub> (M+NH<sub>3</sub>)<sup>+</sup> m/z :

Calculée 1014.4487

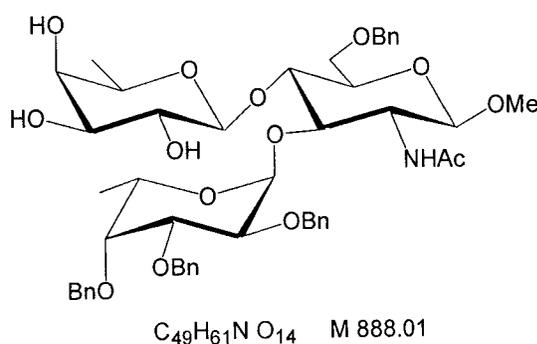
Trouvée 1014.4454

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.42-7.29 (m, 20H, H-arom), 6.03 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, NHAc), 5.16 (m, 2H, H-1', H-4''), 5.07 (dd, 1H,  $J_{1'',2''} = 8.1$  Hz,  $J_{2'',3''} = 10.3$  Hz, H-2''), 5.01 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 11.8$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.90-4.71 (m, 8H, H-1, H-3'',  $6 \times \text{PhCH}_2$ ), 4.64 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.0$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.51 (d, 1H,  $J_{1'',2''} = 8.1$  Hz, H-1''), 4.46 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.0$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.37 (m, 1H, H-5''), 4.20-4.15 (m, 2H, H-3, H-2''), 4.00-3.94 (m, 2H, H-3', H-4), 3.92-3.88 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 4.80$  Hz,  $J_{6a,6b} = 10.3$  Hz, H-6a), 3.85- 3.82 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 3.90$  Hz,  $J_{6a,6b} = 10.3$  Hz, H-6b), 3.70-3.61 (m, 3H, H-2, H-4', H-5), 3.48 (m, 1H, H-5''), 3.41 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.85 (s, 3H, OAc), 1.19 (d, 3H,  $J_{5',6'} = 6.5$  Hz, H-6'), 1.13 (d, 3H,  $J_{5'',6''} = 6.4$  Hz, H-6'').

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.3, 170.2, 170.0, 169.6 (4 C=O), 138.8, 138.6, 138.1, 138.0 (4 C-arom), 128.4, 128.3, 128.2, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1 (24 CH-arom), 100.6 (C-1), 99.2 (C-1''), 96.6 (C-1'), 79.6, 77.2, 76.4, 74.2, 73.6, 72.8, 72.5, 70.9, 70.2, 69.0, 68.8, 66.5 (11 $\times$ CH, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 74.3, 73.3, 73.2, 72.8 (4 $\times$  $\text{CH}_2$ Ph), 68.7 (C-6), 56.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.1 (C-2), 23.2 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 20.7, 20.6, 20.5 (3 $\times$  $\text{COCH}_3$ ), 16.6 (C-6'), 16.0 (C-6'').

### 5.3. Déprotection du désoxy-6 mime Lewis<sup>x</sup>

Méthyl (6-désoxy- $\beta$ -D-fucopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[[2, 3, 4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyrannosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-6-O-benzyl-2-désoxy-2-acétamido- $\beta$ -D-glucopyrannoside

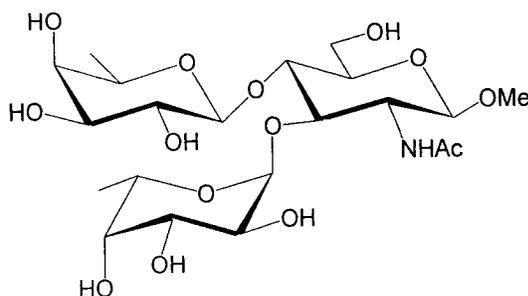


(1.92g, 1.74 mmol) du composé **36** sont placés dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant et muni d'une agitation magnétique, en présence de 136 mL d'éthanol 99%, 8 mL d'hydrazine monohydrate et 8 mL d'eau. Le milieu réactionnel est maintenu au reflux pendant une nuit. Une fois la réaction finie, la suspension est concentrée et l'eau résiduelle est co-évoluée à l'aide de l'acétate d'éthyle. Le résidu est séché sous  $\text{P}_2\text{O}_5$  et directement engagé dans l'étape suivante.  $R_f = 0.36$  (dichlorométhane-méthanol 20/1).

Au résidu séché, on ajoute 45 mL de méthanol, 45 mL de dichlorométhane et 9 mL d'anhydride acétique. Le mélange est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant une nuit. La réaction étant finie le milieu réactionnel est concentré et le résidu subit une flash chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane-méthanol 20/1) ensuite engagé directement dans l'étape suivante.

$R_f = 0.2$  (dichlorométhane-méthanol 20/1)

Méthyl (6-désoxy-β-D-fucopyrannosyl)-(1→4)-[α-L-fucopyrannosyl-(1→3)]-2-désoxy-2-acétamido-β-D-glucopyrannoside (34)



$C_{21}H_{37}NO_{14}$  M 527.52

900mg du trisaccharide benzylé sont mis en solution dans 72 mL de méthanol. Le produit est hydrogéné en présence de 270mg de palladium sur charbon 10% pendant 12 heures, sous une pression de 160 Kpa. La réaction est suivie par CCM (acétate d'éthyle/isopropanol/eau 1/1/1). Une fois que la réaction est finie, le mélange est filtré sur célite puis concentré. Le résidu est purifié sur séphadex G25. On obtient 500mg du produit 34 avec un rendement de 95%.

$R_f = 0.45$  (acétate d'éthyle-isopropanol-eau 1/1/1)

$[\alpha]_D +53.6^\circ$  (c 1.0, eau)

Spectre de masse : (HRMS) (FAB)  $C_{21}H_{37}O_{14}N Na$  (M+Na)<sup>+</sup> m/z :

Calculée 550.2112

Trouvée 550.2133

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 5.09 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 4.0$  Hz, H-1'), 4.85 (m, 1H, H-5'), 4.46 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.7$  Hz, H-1), 4.41 (d, 1H,  $J_{1'',2''} = 7.8$  Hz, H-1''), 4.00 (dd, 1H,  $J_{6a,5} = 2.3$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12.2$  Hz, H-6a), 3.93 (dd, 1H,  $J_{3',2'} = 10.6$  Hz,  $J_{3',4'} = 3.4$  Hz, H-3'), 3.87-3.80 (m, 5H, H-2, H-4, H-5', H-4', H-6b), 3.72-3.62 (m, 4H, H-2', H-3'', H-4'', H-5''), 3.58 (m, 1H, H-3), 3.49 (s, 3H, OAc), 3.45 (dd, 1H,  $J_{2'',1''} = 7.8$  Hz,  $J_{2'',3''} = 9.8$  Hz, H-2''), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.22 (d, 3H,  $J_{6'',5''} = 6.45$  Hz, H-6''), 1.16 (d, 3H,  $J_{6',5'} = 6.5$  Hz, H-6').

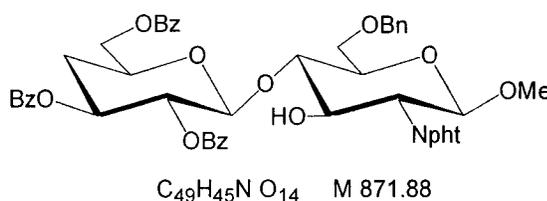
$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  174.8 (C=O), 102.2 (C-1), 102.0 (C-1''), 98.9 (C-1'), 75.7, 75.3, 74.0, 72.9, 72.3, 71.4, 71.1, 70.6, 69.4, 68.1, 67.0 (11 CH, C-3, C-4, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5', C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 60.1 (C-6), 57.5 ( $\text{C}\text{H}_3\text{CO}$ ), 56.0 (C-2), 22.5 ( $\text{NHCOCH}_3$ ), 16.1 (C-6'), 15.6 (C-6'').

## 6. PREPARATION DU LE<sup>x</sup> DESOXYGENE EN POSITION 4

### 6.1. Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-4 mime Le<sup>x</sup>

*Méthyl (2, 3, 6-tri-O-benzoyl-4-désoxy- $\beta$ -D-xylo-hexopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyrannoside*

(35)



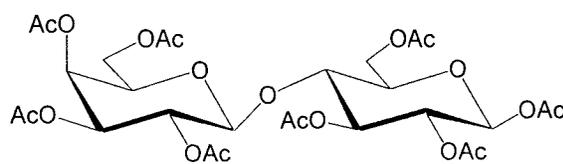
Les composés **7** (248mg, 0.6 mmol, 2 éq) et **25** (174.3mg, 0.3 mmol, 1 éq) sont dissous dans 4 mL de dichlorométhane anhydre dans lequel on ajoute 500 mg de tamis moléculaire 4Å. Le mélange est laissé sous argon et sous agitation à température ambiante pendant 30 min puis refroidi à 0 °C. La NIS (135mg, 0.6 mmol, 2 éq) est ajoutée, suivie d'une addition goutte à goutte de l'acide triflique (8  $\mu\text{L}$ , 0.09 mmol, 0.3 éq). La température du bain est gardée à 0 °C pendant 30 min, ensuite le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré sur célite, puis la phase organique est lavé avec une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , une solution de thiosulfate de sodium puis l'eau. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis concentrée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1). (300mg) de **35** sont obtenus avec un rendement de 80%.

$R_f = 0.45$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 3/2)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.08-7.24 (m, 24H, H-arom), 5.51 (dd, 1H,  $J_{1,2'} = 8.0$  Hz,  $J_{2,3'} = 9.8$  Hz, H-2'), 5.42 (ddd, 1H,  $J_{2,3'} = 10.0$  Hz,  $J_{3',4'a} = 5.2$  Hz,  $J_{3',4'b} = 16.2$  Hz, H-3'), 5.11 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.5$  Hz, H-1), 4.79 (d, 1H,  $J_{1,2'} = 7.9$  Hz, H-1'), 4.67 (dd, 1H,  $J_{5',6'a} = 2.6$  Hz,  $J_{6'a,6'b} = 11.8$  Hz, H-6'a), 4.52 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.8$  Hz,  $J_{3,4} = 8.4$  Hz, H-3), 4.35 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.2$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.27- 4.20 (m, 2H, H-2, H-6'b), 4.19 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 12.2$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.15-4.09 (m, 1H, H-5'), 3.88 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 8.5$  Hz,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4), 3.66-3.62 (m, 1H, H-5), 3.56-3.45 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.43 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.47 (ddd, 1H,  $J_{3',4'a} = 1.7$  Hz,  $J_{4'a,5'} = 5.1$  Hz,  $J_{4'a,4'b} = 7$  Hz, H-4'a), 1.85 (dd, 1H,  $J_{3',4'b} = 11.7$  Hz,  $J_{4'b,5'} = 24$  Hz, H-4'b).

## 7. PREPARATION DU BLOC LACTOSE

(2, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-1, 2, 3, 6-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyrannose (36)



L'acétate de sodium (12g, 146 mmol, 1 éq) est mélangé à l'anhydride acétique (250 mL, 2.63 mol, 18 éq). Le mélange est mis sous agitation à une température de 120 °C pendant 30 minutes. Le lactose monohydrate (50g, 0.15 mol, 1 éq) est ajouté par petites quantités. Le milieu est maintenu sous agitation pendant une heure à 110 °C. La réaction est terminée lorsque le milieu est homogène et d'une coloration jaune. La solution est alors versée dans l'eau glacée (2000 mL) et agitée pendant une nuit. Le précipité formé est ensuite filtré et lavé abondamment à l'eau. Les eaux mères récupérées sont extraites au dichlorométhane. La phase organique résultant de ce lavage est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous vide. Le produit **36** recristallisé dans l'éthanol absolu est sous forme d'une mousse blanche (89.50g, 90%).  $R_f = 0.37$  (toluène-acétate d'éthyle 1/1)

$[\alpha]_D +6^\circ$  (c 0.7, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  696 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $C_{28}H_{38}O_{19}$

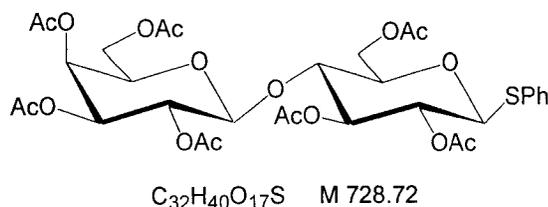
Calculée	C 49.56	H 5.64
Trouvée	C 49.50	H 5.53

**$^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  5.71 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.29$  Hz, H-1), 5.38 (dd, 1H,  $J_{3,4'} = 3.44$  Hz,  $J_{4',5'} < 1$  Hz, H-4'), 5.27 (t, 1H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9.25$  Hz, H-3), 5.14 (dd, 1H,  $J_{2,3'} = 10.36$  Hz,  $J_{2,1'} = 8.23$  Hz, H-2'), 5.07 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.25$  Hz,  $J_{2,1} = 8.29$  Hz, H-2), 4.97 (dd, 1H,  $J_{3,2'} = 10.36$  Hz,  $J_{3,4'} = 3.44$  Hz, H-3'), 4.50 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 8.23$  Hz, H-1'), 4.48 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 12.20$  Hz,  $J_{6a,5} = 2.00$  Hz, H-6a), 4.14 (m, 3H, H-6b, H-6'a et H-6'b), 3.85 (m, 2H, H-5', H-4), 3.77 (m, 1H, H-5), 2.18, 2.15, 2.13, 2.10, 2.08, 2.07, 2.06, 1.99 (s, 3H, OAc).

**$^{13}C$  RMN (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  170.34, 170.29, 170.19, 170.11, 170.04, 169.59, 169.53, 168.98, 168.83 (C=O, Ac), 100.92 (C-1'), 91.46 (C-1), 75.62 (C-4), 73.41 (C-5), 72.56 (C-3), 70.90 (C-3'), 70.66 (C-5'), 70.42 (C-2), 68.90 (C-2'), 66.52 (C-4'), 61.67 (C-6'a, C-6'b), 60.77 (C-6a, C-6b), 20.81, 20.79, 20.72, 20.62, 20.61, 20.58, 20.57, 20.48 (8 OAc).

Phényl (2, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-2, 3, 6-tri-O-acétyl-1-thio-β-D-glucopyrannoside

(37)



Le produit **36** (58.28g, 85.9 mmol, 1 éq) est dissous dans le dichlorométhane anhydre (600 mL) à température ambiante. Sous agitation et un flux d'argon, le thiophénol (13.2 mL, 128.8 mmol, 1.5 éq) et le trifluorure de bore, en solution dans le diéthyléther (54 mL, 429.4 mmol, 5 éq) sont ajoutés, le mélange reste sous agitation pendant une heure. Lorsque la réaction est terminée, le milieu est neutralisé avec une solution aqueuse saturée en hydrogénocarbonate de sodium jusqu'à l'obtention d'un pH 7-8. Ensuite, les phases sont séparées : la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane et les phases organiques réunies sont lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées. Le résidu est recristallisé dans le méthanol. Le produit **37** (61.96g) est ainsi obtenu avec un rendement de 99%.

$R_f = 0.48$  (toluène-acétate d'éthyle 1/1)

PF : (méthanol) 160-162 °C

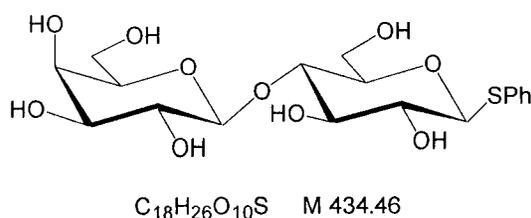
$[\alpha]_D -15.4^\circ$  (c 2.0, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  746.3 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.64-6.61 (m, 5H, H-arom), 5.36 (dd, 1H,  $J_{4,3} = 3.40$  Hz,  $J_{4,5} = 1$  Hz, H-4'), 5.24 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 9.20$  Hz,  $J_{3,2} = 9.10$  Hz, H-3), 5.12 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.40$  Hz,  $J_{2,1} = 7.90$  Hz, H-2'), 4.97 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 10.40$  Hz,  $J_{3,4} = 3.40$  Hz, H-3'), 4.92 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 10.15$  Hz,  $J_{2,3} = 9.10$  Hz, H-2), 4.70 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.15$  Hz, H-1), 4.55 (dd, 1H,  $J_{6b,6a} = 11.90$  Hz,  $J_{6b,5} = 2.00$  Hz, H-6b), 4.49 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.90$  Hz, H-1'), 4.23 (m, 3H, H-6, H-6'a, H-6'b), 4.00 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.90$  Hz,  $J_{4,3} = 9.20$  Hz, H-4), 3.89 (m, 1H, H-5'), 3.67 (ddd, 1H,  $J_{5,4} = 9.90$  Hz,  $J_{5,6a} = 5.60$  Hz,  $J_{5,6b} = 2.00$  Hz, H-5), 2.29, 2.25, 2.23, 2.18, 2.17, 2.12, 2.10 (s, 3H, OAc).

Phényl (β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-1-thio-β-D-glucopyrannoside

(38)

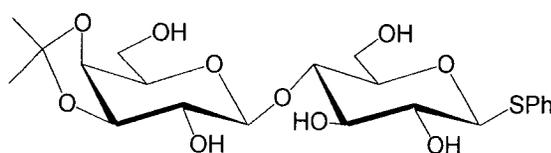


Le produit **37** (62g, 85 mmol, 1 éq) est dissous dans le méthanol (870 mL). Le sodium (2.05g, 89 mmol, 1.05 éq) est alors additionné par petites quantités et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. La solution est ensuite neutralisée avec de la résine amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>) jusqu'à pH 7. Le mélange est filtré et évaporé sous vide. Le produit **38** (40.25g) obtenu sous forme d'une poudre blanche est directement engagé dans l'étape suivante.

R<sub>f</sub> = 0.05 (acétate d'éthyle)

Spectre de masse : m/z 452.3 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>.

*Phényl (3, 4-O-isopropylidène-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-1-thio-β-D-glucopyrannoside* (39)



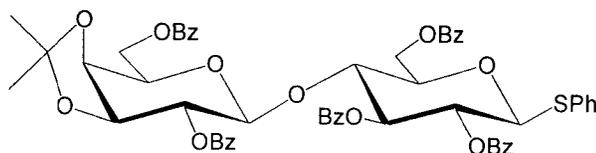
C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>S M 474.52

Le produit **38** (40.25g, 92.6 mmol, 1 éq) est mis en suspension dans le 2, 2-diméthoxypropane (500 mL) avec l'acide 10-d, 1-camphorsulfonique (8.61g, 37.1 mmol, 0.4 éq). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Un précipité blanc est ainsi obtenu et le milieu réactionnel est neutralisé par la triéthylamine. Le précipité est filtré et les eaux de filtration sont évaporées puis hydrolysées dans (300 mL) d'un mélange de solvants méthanol/eau :10/1 pour éliminer le diméthoxypropane restant. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé et une masse blanche est récupérée et rajoutée au précipité préalablement isolé. Le produit **39** obtenu (37.8g, 93% sur 2 étapes) sera directement engagé dans l'étape suivante.

R<sub>f</sub> = 0.93 (dichlorométhane-méthanol 1/1)

Spectre de masse : m/z 492.5 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

*Phényl (2, 6-di-O-benzoyl-3, 4-O-isopropylidène-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-2, 3, 6-tri-O-benzoyl-1-thio-β-D-glucopyrannoside* (40)



C<sub>56</sub>H<sub>50</sub>O<sub>15</sub>S M 995.05

Le produit **39** (25.72g, 54.2 mmol, 1 éq) est dissous dans la pyridine (170 mL). Le mélange est refroidi à une température de 0 °C et le chlorure de benzoyle (44 mL, 379 mmol, 1.4éq/OH)

est additionné en une seule fois. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation durant une nuit à température ambiante. Lorsque la réaction est finie, une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium est versée dans le mélange. La phase organique est ensuite extraite au dichlorométhane, lavée par une solution d'acide chlorhydrique diluée, puis par l'eau. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous vide. Le produit brut est ensuite recristallisé dans l'éthanol absolu, et le solide blanc **40** est obtenu avec un rendement de 88%.

$R_f = 0.20$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 3/1)

PF :172-175 °C (éthanol)

$[\alpha]_D +38^\circ$  (c 0.36, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  1012.5 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $C_{56}H_{50}O_{15}S$

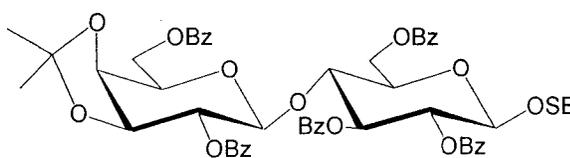
Calculée C 67.59 H 5.06

Trouvée C 67.59 H 5.11

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.11- 7.96 (m, 10H, H-arom), 7.54 -7.15 (m, 20H, H-arom), 5.79 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 9.7$  Hz,  $J_{3,4} = 9.3$  Hz, H-3), 5.46 (t, 1H,  $J_{2,3} = J_{2,1} = 9.7$  Hz, H-2), 5.18 (t, 1H,  $J_{2,3} = J_{2,1} = 7.60$  Hz, H-2'), 4.93 (d, 1H,  $J_{1,2} = 9.76$  Hz, H-1), 4.70 (dd, 1H,  $J_{6b,6a} = 13.7$  Hz,  $J_{6b,5} = 1.8$  Hz, H-6b), 4.64 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.6$  Hz, H-1'), 4.52 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 13.7$  Hz,  $J_{6a,5} = 5.0$  Hz, H-6a), 4.30 (d, 1H,  $J_{3,2} = 7.6$  Hz,  $J_{3,4} = 5.5$  Hz, H-3'), 4.27 (dd, 1H,  $J_{6'b,6'a} = 11.4$  Hz,  $J_{6'b,5'} = 4.8$  Hz, H-6'b), 4.18 (dd, 1H,  $J_{4,3} = 10.1$  Hz,  $J_{4,5} = 9.3$  Hz, H-4), 4.13 (dd, 1H,  $J_{4,3'} = 5.5$  Hz,  $J_{4,5'} = 2.0$  Hz, H-4'), 3.94 (ddd, 1H,  $J_{5,4} = 10.1$  Hz,  $J_{5,6a} = 5.0$  Hz,  $J_{5,6b} = 1.8$  Hz, H-5), 3.87 (ddd, 1H,  $J_{5,6'a} = 7.5$  Hz,  $J_{5,6'b} = 4.8$  Hz,  $J_{5,4'} = 2.0$  Hz, H-5'), 3.70 (dd, 1H,  $J_{6'a,6'b} = 11.4$  Hz,  $J_{6'a,5} = 7.5$  Hz, H-6'a), 1.57, 1.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub> acétonide).

**<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  165.91, 165.79, 165.53, 165.11, 164.83 (C=O), 131.80, 129.80, 129.78, 129.20, 129.15 (C-arom), 133.40-128.00 (25 CH-arom.), 110.83 (C acétonide), 100.17 (C-1'), 85.82 (C-1), 77.04 (C-5), 76.97 (C-3'), 75.34 (C-4), 73.78 (C-3), 73.59 (C-2'), 73.085 (C-4'), 71.27 (C-5'), 70.35 (C-2), 62.76 (C-6a, C-6b), 62.68 (C-6'a,C-6'b), 27.38, 26.12 (CH<sub>3</sub> acétonide).

2-(triméthylsilyl)éthyl (2, 6-di-O-benzoyl-3, 4-O-isopropylidène-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-2, 3, 6-tri-O-benzoyl-β-D-glucopyranoside (41)



Le produit **40** (39g, 39.2 mmol, 1 éq) est dissous dans le dichlorométhane anhydre (600 mL) en présence de 2-(triméthylsilyl)éthanol (8.43 mL, 58.8 mmol, 1.5 éq) et de tamis moléculaire 4Å (50g). Le milieu réactionnel est laissé sous un flux d'argon, sous agitation et à température ambiante pendant 30 minutes. La N-bromosuccinimide (17.44g, 98 mmol, 2.5 éq) est alors ajouté au milieu réactionnel qui est porté à une température de 0°C durant 15 minutes. Ensuite, l'acide trifluorométhanesulfonique (1.74 mL, 19.6 mmol, 0.5 éq) est additionné et le milieu est laissé sous agitation pendant 15 minutes. Lorsque la réaction est terminée, le mélange est neutralisé par la triéthylamine jusqu'à l'obtention d'un pH basique. Une solution aqueuse de thiosulfate de sodium est alors versée dans le milieu réactionnel pour éliminer l'excès de N-bromosuccinimide. Les phases aqueuses et organiques sont alors séparées et la phase organique est lavée successivement par de l'eau et une solution saturée en NaCl, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Le produit brut doit être purifié par cristallisation dans le mélange de solvants (acétate d'éthyle/cyclohexane :75/25). Le produit **41** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (29.54g, 75%).  $R_f = 0.57$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 65/35).

$[\alpha]_D +25.2^\circ$  (c 0.6, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  1021.3 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $C_{55}H_{58}O_{16}$

Calculée C 65.85 H 5.83

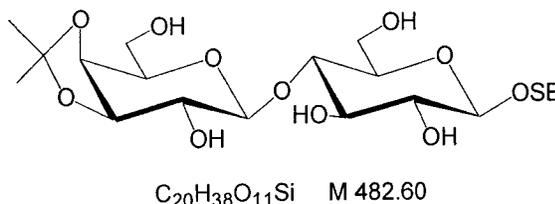
Trouvée C 65.97 H 5.99

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.20-7.30 (m, 25H, H-arom), 5.76 (dd, 1H,  $J_{3,2} = 9.8$  Hz,  $J_{3,4} = 9.2$  Hz, H-3), 5.44 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.8$  Hz,  $J_{2,1} = 7.9$  Hz, H-2), 5.19 (dd, 1H,  $J_{2,1'} = 7.8$  Hz,  $J_{2,3'} = 6.9$  Hz, H-2'), 4.71 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.9$  Hz, H-1), 4.65 (dd, 1H,  $J_{6b,6a} = 12.1$  Hz,  $J_{6b,5} = 1.8$  Hz, H-6b), 4.62 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 7.8$  Hz, H-1'), 4.49 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 12.1$  Hz,  $J_{6a,5} = 4.6$  Hz, H-6a), 4.30 (dd, 1H,  $J_{6'b,6'a} = 11.5$  Hz,  $J_{6'b,5} = 4.8$  Hz, H-6'b), 4.27 (dd, 1H,  $J_{3',2'} = 6.9$  Hz,  $J_{3',4'} = 5.6$  Hz, H-3'), 4.23 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.9$  Hz,  $J_{4,3} = 9.2$  Hz, H-4), 4.11 (dd, 1H,  $J_{4',3'} = 5.6$  Hz,  $J_{4',5'} = 2.1$  Hz, H-4'), 3.97-3.93 (m, 1H, O-CH-CH<sub>2</sub>Si), 3.86 (ddd, 1H,  $J_{5,4} = 9.9$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.6$  Hz,  $J_{5,6b} = 1.8$  Hz, H-5), 3.83 (ddd, 1H,  $J_{5',6'a} = 7.5$  Hz,  $J_{5',6'b} = 4.8$  Hz,  $J_{5',4'} = 2.1$  Hz, H-5'), 3.67 (dd, 1H,  $J_{6'a,6'b}$

= 11.5 Hz,  $J_{6'a,5'} = 7.5$  Hz, H-6'a), 3.57-3.54 (m, 1H, O-CH-CH<sub>2</sub>Si), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.95-0.80 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Si), 0.02 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.97, 165.88, 165.64, 165.16, 164.87 (C=O), 133.39-128.09 (CH-arom), 129.96, 129.82, 129.56, 129.49, 129.29 (C-quat), 110.85 (O-C-O), 100.41 (C-1) 100.15 (C-1'), 77.08 (C-3'), 75.51 (C-4), 73.62 (C-2'), 73.13 (C-4'), 72.88 (C-5'), 72.82 (C-3), 71.91 (C-2), 71.29 (C-5), 67.54 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Si), 62.77 (C-6'a, C-6'b), 62.71 (C-6a, C-6b), 27.41 (CH<sub>3</sub>), 26.14 (CH<sub>3</sub>), 17.82 (CH<sub>2</sub>Si), 0.52 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

2-(triméthylsilyl)éthyl (3, 4-O-isopropylidène-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-β-D-glucopyrannoside (42)

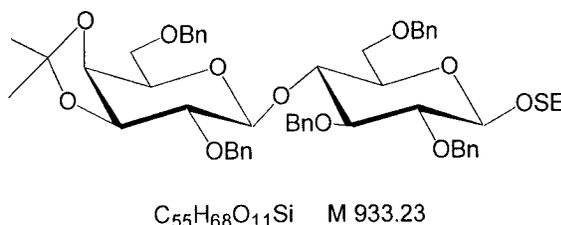


Sous agitation et à température ambiante, le produit **41** (29.54g, 29.4 mmol) est mis en suspension dans le méthanol (500 mL). Une solution de méthanolate de sodium préalablement préparée (1.25g de sodium dans 30 mL de méthanol) est alors additionnée au milieu réactionnel. La réaction est terminée une fois que l'ensemble soit solubilisé. Ensuite, la solution est neutralisée par la résine amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>) puis filtrée. Le filtrat obtenu est ensuite évaporé, séché et le résidu solide est trituré dans un mélange de solvants hexane/diéthyléther (1/1) pour éliminer le benzoate de méthyle formé lors de la réaction. Le produit **42** est ainsi obtenu sous forme d'une poudre blanche (12.09g, 85%), qui sera directement engagé dans l'étape suivante.

$R_f = 0.15$  (acétate d'éthyle)

Spectre de masse :  $m/z$  500 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

2-(triméthylsilyl)éthyl (2, 6-di-O-benzyl-3,4-O-isopropylidène-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-2, 3, 6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyrannoside (43)

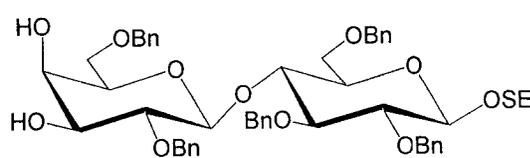


Le produit **42** (19.83g, 41.1 mmol, 1 éq) est dissous dans le N, N-diméthylformamide (500 mL), le bromure de benzyle (29.3 mL, 246.5 mmol, 1.2 éq/OH) est ajouté, et le milieu réactionnel est ramené à 0 °C. L'hydrure de sodium (9.9g, 411 mmol, 2 éq/OH) est alors introduit dans le mélange par petits ajouts successifs. Lorsque la réaction est terminée, le méthanol (100 mL) est versé dans le milieu réactionnel pour transformer l'excès de bromure de benzyle. Le N, N-diméthylformamide soit évaporé et le résidu est repris dans le diéthyléther. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Ainsi, le produit **43** (36.5g, 95%) est obtenu sous forme d'huile marron. Le produit brut sera directement engagé dans l'étape suivante.

$R_f = 0.32$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 4/1)

Spectre de masse :  $m/z$  951 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

2-(triméthylsilyl)éthyl (2, 6-di-O-benzyl-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-2, 3, 6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyrannoside (44)



$C_{52}H_{64}O_{11}Si$  M 893.17

Le produit **43** (14g, 15 mmol) est dissous dans l'acide acétique (420 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à une température de 80 °C avant d'être dilué avec de l'eau (110 mL). Le mélange est laissé sous agitation, à une température de 80 °C pendant 1.5h. Lorsque la réaction est terminée, le milieu réactionnel est concentré sous vide, puis le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1). Ainsi le produit **44** (12.2g, 91%) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

$R_f = 0.40$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1)

PF : 80-81 °C (heptane)

$[\alpha]_D +10.0^\circ$  (c 0.4, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  911.4 ( $M+NH_4$ )<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.17-7.38 (m, 25H, H-arom), 5.02 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.9$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.95 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.9$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.86 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.5$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.82 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.9$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.76 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.9$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.71 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.5$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.63 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.49 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.48 (d, 1H,  $J_{1,2'} = 7.7$  Hz, H-1'), 4.47 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.2$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.44 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.8$  Hz, H-1), 4.23 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.2$  Hz, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.09-4.02 (m, 1H, O-CH-CH<sub>2</sub>), 4.04 (t, 1H,  $J_{3,4} = J_{3,2} = 9.5$  Hz, H-3), 3.99 (m, 1H, H-4'), 3.83 (m, 2H, H-6a et H-6b), 3.66 (dd, 1H,  $J_{6'a,6'b} = 11.0$  Hz,

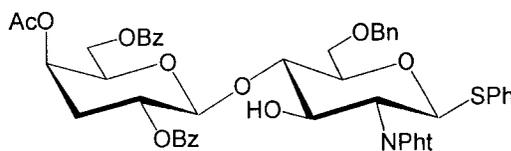
$J_{6'a,5'} = 5.0$  Hz, H-6'a), 3.64 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.63 (t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4), 3.52 (dd, 1H,  $J_{6'b,6'a} = 11.0$  Hz,  $J_{6'b,5'} = 5.0$  Hz, H-6'b), 3.47 (m, 4H, H-2', H-3', H-2, H-5), 3.38 (t<sub>large</sub>, 1H,  $J_{5',6'a} = J_{5',6'b} = 5.0$  Hz,  $J_{5',4'} < 1$  Hz, H-5'), 2.50 (d<sub>large</sub>, 1H,  $J = 3.5$  Hz, OH), 2.41 (d<sub>large</sub>, 1H,  $J = 4.6$  Hz, OH), 1.10-1.05 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 139.11, 138.66, 138.28, 138.22, 137.91 (C-arom); 128.47-127.20 (CH-arom), 103.11 (C-1), 102.59 (C-1'), 76.69 (C-3), 75.18 (CH<sub>2</sub>-Ph), 75.04 (C-5), 74.87 (CH<sub>2</sub>-Ph), 74.83 (CH<sub>2</sub>-Ph), 73.46 (C-2'), 73.41 (CH<sub>2</sub>-Ph), 73.12 (CH<sub>2</sub>-Ph), 72.78 (C-5'), 68.72 (C-4'), 68.59 (C-6'a, C-6'b), 68.31 (C-6a, C-6b), 67.37 (O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 18.44 (O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.43 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

## 8. PREPARATION DU PENTASACCHARIDE Le<sup>x</sup> DESOXYGENE EN POSITION 3

### 8.1. Préparation du bloc lactosamine précurseur du désoxy-3 mime Le<sup>x</sup>

*Phényl (4-O-acétyl-2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy-β-D-xylo-hexopyrannosyl)-(1→4)-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-1-thio-β-D-glucopyrannoside* (45)



C<sub>49</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>13</sub>S M.887.95

Le mélange des produits **6** (1.4g, 2.84 mmol, 1 éq) et **22** (2.38g, 4.26 mmol, 1.5 éq) est dissous dans 51 mL de dichlorométhane dans lequel on ajoute 5.5g de tamis moléculaire 4Å sous argon. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 40 min. Le mélange est refroidi à 0 °C et le triflate de triméthylsilyl (773.2 μL, 4.26 mmol, 1.5 éq) est ajouté goutte à goutte. Une heure après, la réaction est finie et le mélange est filtré sur célite lavé par une solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>, l'eau, séché sur MgSO<sub>4</sub> puis concentré sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice utilisant comme éluant (toluène-acétate d'éthyle 9/1). Le composé **45** (1.89g) est obtenu avec un rendement de 75%.

$R_f = 0.4$  (toluène- acétate d'éthyle 4/1)

$[\alpha]_D +17.4^\circ$  (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse : (HRMS)  $C_{49}H_{49}N_2O_{13}S$  ( $M+NH_4^+$ )  $m/z$  :

Calculée 905.2955

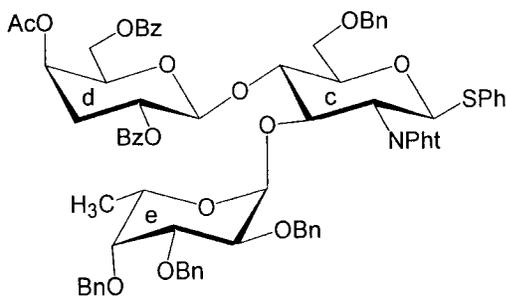
Trouvée 905.2969

$^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.11-7.20 (m, 24H, H-arom), 5.63 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.5$  Hz, H-1c), 5.36 (m, 1H, H-2d), 5.23 (m, 1H, H-4d), 4.82 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-1d), 4.66 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 3.3$  Hz,  $J_{6,6'} = 11.6$  Hz, H-6d), 4.65 (d, 1H,  $J = 1$  Hz, OH-3c), 4.59 (ddd, 1H,  $J_{2,3} = 10.3$  Hz,  $J_{3,4} = 8.2$  Hz, H-3c), 4.39 (dd, 1H, H-2c), 4.33, 4.27 (2d, 2H,  $J = 12$  Hz,  $PhCH_2$ ), 4.20 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 8.6$  Hz, H-6'd), 4.15 (ddd, 1H,  $J_{4,5} = 1.1$  Hz, H-5d), 3.81 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4c), 3.73 (ddd, 1H,  $J_{4,5} = 9.8$  Hz,  $J_{5,6} = 4.2$  Hz,  $J_{5,6'} = 1.3$  Hz, H-5c), 3.693 (dd, 1H,  $J_{6,6'} = 11$  Hz, H-6c), 3.63 (dd, 1H, H-6'c), 2.57 (ddd, 1H,  $J_{2,3} = 5.2$  Hz,  $J_{3,3'} = 14.3$  Hz,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, H-3d), 2.19 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.93 (ddd, 1H,  $J_{2,3'} = 11.9$  Hz,  $J_{3',4} = 3.1$  Hz, H-3'd).

$^{13}C$  RMN (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  169.96 (C=O, Ac), 167.96, 167.41 (2C=O, NPht), 166.19, 164.90 (C=O, Bz), 138.26, 132.14, 131.69, 131.54, 129.28, 128.98 (C-arom), 133.97, 133.89, 133.45, 133.15, 132.29, 129.72, 129.70, 129.54, 128.93, 128.70, 128.48, 128.43, 128.36, 128.18, 128.12, 127.65, 127.41, 127.28, 125.19, 123.48, 123.19 (CH-arom), 103.04 (C-1d), 83.28 (C-1c), 82.20 (C-4c), 77.96 (C-5c), 75.10 (C-5d), 72.98 ( $PhCH_2$ ), 70.86 (C-3C), 68.26 (C-6c), 67.65 (C-2d), 67.08 (C-4d), 62.96 (C-6d), 54.95 (C-2c), 32.94 (C-3d), 20.83 ( $CH_3$ ).

## 8.2. Synthèse du bloc trisaccharide mime $Le^x$

*Phényl (4-O-acétyl-2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy- $\beta$ -D-xylo-hexopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2, 3, 4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyrannosyl-(1 $\rightarrow$ 3))-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyrannoside* (46)



$C_{76}H_{73}NO_{17}S$  M. 1304.46

Les produits **45** (1g, 1.12 mmol, 1 éq) et **11** (1.34g, 2.81 mmol, 2.5 éq) sont dissous dans le toluène anhydre (36 mL) contenant le tamis moléculaire 4Å (7g). Ce mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante. La N-iodosuccinimide (518mg, 2.3 éq) et l'acide trifluorométhanesulfonique (20.5  $\mu$ L, 0.23 éq) sont additionnés à  $-25$  °C. Après une heure, la réaction est finie. Le milieu est neutralisé par de la triéthylamine, filtré sur célite, puis

concentré. Le résidu est repris dans le dichlorométhane, lavé par de l'eau, une solution de thiosulfate de sodium, puis par une solution saturée en chlorure de sodium. La solution est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis concentré sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Toluène-acétate d'éthyle 9/1).

$R_f = 0.62$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 3/2).

$[\alpha]_D + 3.3^\circ$  (c 1.0, chloroforme).

Spectre de masse : (HRMS)  $C_{76}H_{73}NO_{17}S Na (M+Na)^+$  m/z:

Calculée 1326.4497

Trouvée 1326.4515

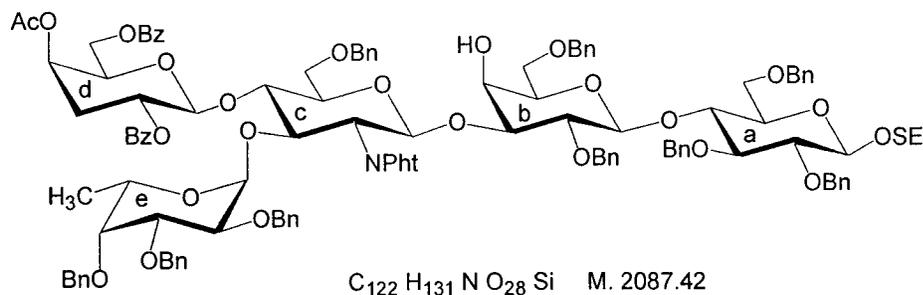
**$^1H$ RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  8.15-7.07 (m, 39H, H-arom), 5.48 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10.6$  Hz, H-1c), 5.14 (ddd, 1H,  $J_{1,2} = 8.4$  Hz,  $J_{2,3} = 5.1$  Hz,  $J_{2,3'} = 11.8$  Hz, H-2d), 5.11 (m, 1H, H-4d), 4.93 (d, 1H, H-1d), 4.91 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz, H-1e), 4.90, 4.67 (2d, 2H,  $J = 11.8$  Hz,  $PhCH_2$ ), 4.85, 4.51 (2d, 2H,  $J = 12.0$  Hz,  $PhCH_2$ ), 4.84 (q, 1H,  $J_{4,5} < 1$  Hz,  $J_{5,6} = 6.4$  Hz, H-5e), 4.78 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.0$  Hz,  $J_{3,4} = 9.3$  Hz, H-3c), 4.69, 4.65 (2d, 2H,  $J = 11.9$  Hz,  $PhCH_2$ ), 4.54 (dd, 1H, H-2c), 4.40 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 3.9$  Hz,  $J_{6,6'} = 11.0$  Hz, H-6d), 4.24 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.2$  Hz, H-4c), 4.19 (dd, 1H,  $J_{5,6'} = 6.9$  Hz, H-6'd), 4.07 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.3$  Hz,  $J_{3,4} = 2.5$  Hz, H-3e), 4.01 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 2.9$  Hz,  $J_{6,6'} = 11.3$  Hz, H-6c), 3.88 (dd, 1H, H-2e), 3.82-3.78 (m, 2H, H-5d, H-6'c), 3.72 (dd, 1H, H-4e), 3.56 (dd, 1H, H-5c), 2.42 (ddd, 1H,  $J_{3,3'} = 14.0$  Hz,  $J_{3,4} = 3.0$  Hz, H-3d), 1.90 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.66 (ddd, 1H,  $J_{3,4} = 3.2$  Hz, H-3'd), 1.29 (d, 3H, H-6e).

**$^{13}C$  RMN (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  169.71 (C=O, Ac), 165.85, 164.84 (2 C=O, Bz), 138.93, 138.63, 138.18, 137.98, 132.46, 129.47 (C-arom), 134.08, 133.39, 133.27, 132.23, 129.75, 129.51, 128.74, 128.70, 128.50, 128.48, 128.23, 128.18, 128.07, 127.86, 127.62, 127.41, 127.03, 126.78 (CH-arom), 100.89 (C-1d), 97.80 (C-1e), 84.32 (C-1c), 79.70 (C-3e), 79.33 (C-4e), 77.53 (C-5c), 74.99 (C-4c), 74.34 (C-2e), 73.91 (C-3c), 73.67 (C-5d), 74.13, 73.54, 72.98, 72.43 (4  $PhCH_2$ ), 67.95 (C-2d), 67.87 (C-6c), 66.98 (C-4d), 66.45 (C5-e), 61.45 (C-6d), 55.51 (C-2c), 32.98 (C-3d), 20.84 ( $CH_3$ ), 16.82 (C-6e).



8.3. Préparation du désoxy-3 pentasaccharide Le<sup>x</sup>

*2-(triméthylsilyl)éthyl (4-O-acétyl-2, 6-di-O-benzoyl-3-désoxy-β-D-xylo-hexopyrannosyl)-(1→4)-[(2, 3, 4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyrannosyl-(1→3)]-6-O-benzyl-2-désoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyrannoside-(1→3)-(2, 6-di-O-benzyl-β-D-galactopyrannosyl)-(1→4)-2, 3, 6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyrannoside* (47)



Les produits 46 (153mg, 0.117 mmol, 1 éq) et 44 (104mg, 1 éq) sont dissous dans le dichlorométhane (7.3 mL) anhydre dans lequel le tamis moléculaire 4Å (0.7g) a été rajouté. Ce mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 30 min. Le mélange est ramené à une température de -30 °C, la NIS (52.7mg, 0.234 mmol, 2 éq) est rajoutée puis, goutte à goutte, on additionne l'acide triflique (4 µL, 0.035 mmol, 0.15 éq/NIS). On dilue l'acide triflique dans le dichlorométhane (40 µL de TfOH dans 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) et on prélève 100 µL. Le mélange est laissé sous agitation pendant une heure à température ambiante. Une fois la réaction finie, le mélange est neutralisé par de la triéthylamine, filtré sous célite, lavé successivement avec une solution de thiosulfate de sodium, eau, et une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium, filtrée, puis concentrée. Le résidu obtenu est purifié par une chromatographie sur colonne de silice (toluène-acétate d'éthyle 6/1). Le composé 47 (171mg) est obtenu avec un rendement de 70%.

R<sub>f</sub> = 0.33 (toluène-acétate d'éthyle 6/1)

[α]<sub>D</sub> +6.18° (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse : (HRMS) (FAB) C<sub>122</sub>H<sub>131</sub>NO<sub>28</sub>SiNa (M+Na<sup>+</sup>) m/z :

Calculée 2108.8525

Trouvée 2108.8557

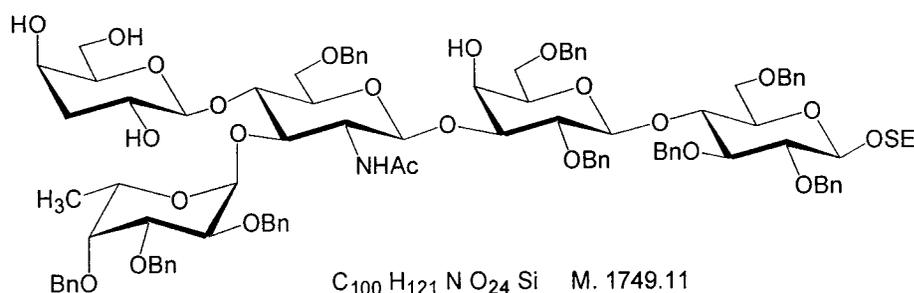
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.05-7.18 (m, 59H, H-arom), 5.30 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.4 Hz, H-1c); 5.14 (m, 2H, H-4d, H-2d); 4.95, 4.70 (2d, 2H, J = 10.5 Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.91 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.2 Hz, H-1d), 4.87 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 3.7 Hz, H-1e), 4.80 (m, 1H, H-5e), 4.77 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> = 10.4 Hz, J<sub>3,4</sub> = 8.7 Hz, H-3c), 4.28 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 7.6 Hz, H-1a), 4.26 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.2 Hz, H-1b), 4.50 (dd, 1 H, H-2c), 4.49 (d, 1H, J = 12.1 Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.79, 4.45 (2d, 2H, J = 12.0 Hz, PhCH<sub>2</sub>),

4.46, 4.23 (2d, 2H,  $J = 11.9$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.20 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 9.2$  Hz, H-4c), 4.29-4.14 (m, 4H,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.04 (m, 1H, H-5c), 4.05-3.92 (m, 3H), 3.73-3.67 (m, 3H), 3.59-3.44 (m, 4H), 3.42-3.30 (m, 6H), 3.00 (m, 1H), 2.44 (ddd, 1H,  $J_{2,3} = 5.0$  Hz,  $J_{3,3'} = 14.4$  Hz,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, H-3d), 1.91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.67 (ddd, 1H,  $J_{2,3'} = 11.6$  Hz,  $J_{3,4} = 3.2$  Hz, H-3'd), 1.29 (d, 3H,  $J_{5,6} = 6.4$  Hz, H-6e), 1.06-0.95 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.03 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.73 (C=O, Ac), 165.88, 164.83 (2 C=O, Bz), 139.00, 138.91, 138.74, 138.62, 138.47, 138.27, 138.19, 137.69, 131.13, 129.52 (C-arom), 133.73, 133.39, 133.33, 129.77, 129.50, 128.71, 128.58, 128.54, 128.34, 128.24, 128.21, 128.18, 128.17, 128.07, 128.05, 128.00, 127.94, 127.84, 127.73, 127.62, 127.53, 127.43, 127.42, 127.35, 127.14, 127.04, 127.00, 126.77, 126.52, 126.21 (CH-arom), 102.97 (C-1b), 101.93 (C-1a), 100.93 (C-1d), 98.89 (C-1c), 97.69 (C-1e), 83.14, 82.78, 81.82, 79.58, 77.98, 77.54, 75.88, 75.17, 74.87, 74.58, 73.78, 72.75, 72.53, 68.01, 67.50, 66.97, 66.45, (CH), 75.33, 74.85, 74.14, 74.01, 73.75, 73.27, 72.86, 72.42, 68.40 ( $\text{PhCH}_2$ ), 68.10 ( $\text{OCH}_2\text{Si}$ ), 67.96, 67.77, 67.18 (C-6a, C-6b, C-6c), 61.52 (C-6d), 56.25 (C-2c), 33 (C-3d), 20.84 ( $\text{OAc}$ ), 18.37 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 16.84 (C-6e), -1.47 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).

#### 8.4. Déprotection du désoxy-3 pentasaccharide $\text{Le}^x$

2-(triméthylsilyl)éthyl (3-désoxy- $\beta$ -D-xylo-hexopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2, 3, 4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyrannosyl-(1 $\rightarrow$ 3))-2-acétamido-6-O-benzyl-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyrannoside-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 6-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2, 3, 6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyrannoside (48)

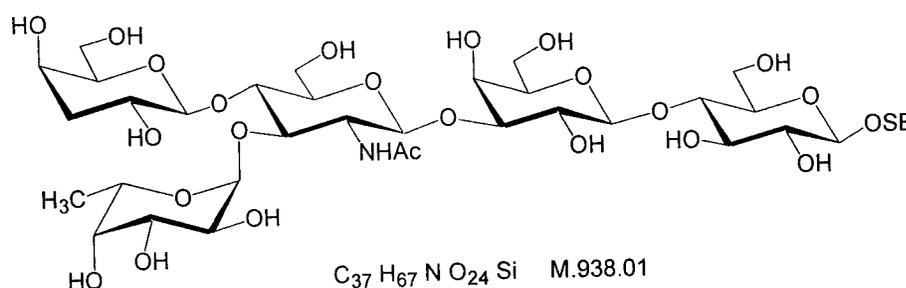


Le composé **47** (480mg, 0.23 mmol) est dissous dans 68 mL d'éthanol auquel on rajoute 4 mL d'hydrazine monohydrate 99% et 4 mL d'eau. On porte au reflux et on laisse sous agitation pendant 14h. Une fois la réaction terminée, la solution est concentrée et co-évaporée avec de l'acétate d'éthyle. Le résidu obtenu est séché sous  $\text{P}_2\text{O}_5$  puis directement engagé dans l'étape suivante.  $R_f = 0.64$  (dichlorométhane-méthanol 15/1).

511mg du résidu est dissous dans un mélange de 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et 10 mL de MeOH auquel on rajoute 2 mL d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit. La solution est ensuite concentrée et directement engagée dans l'étape de débenzylation.

$R_f = 0.4$  (dichlorométhane-méthanol 15 /1)

2-(triméthylsilyl)éthyl (3-désoxy- $\beta$ -D-galactopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[( $\alpha$ -L-fucopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-2-acétamido-2-désoxy- $\beta$ -D-glucopyrannoside-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\beta$ -galactopyrannosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2- $\beta$ -D-glucopyrannoside (49)



le composé 48 (104mg) subit une hydrogénation catalytique (160 Kpa) en présence de (35mg) de palladium 10% sur charbon dans 10 mL de méthanol. La réaction est finie après 24 heures. Le produit obtenu est filtré ensuite purifié sur une colonne de séphadex (G10-120) utilisant l'eau comme éluant. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc amorphe (54mg, 97%).  $R_f = 0.25$  (isopropanol/acétate d'éthyle/eau : 3/3/1)

$[\alpha]_D -106.25^\circ$  (c 0.4, chloroforme-méthanol 1/1)

Spectre de masse: (FAB)  $\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{NO}_{24}\text{SiNa}$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  m/z : 960.372

Analyse élémentaire pour  $\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{NO}_{24}\text{Si}$

Calculée	C 47.38	H 7.20	N 1.49
Trouvée	C 47.43	H 7.22	N 1.51

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5.13 (d, 1H,  $J = 3.97$  Hz, H-1e), 4.88 (m, 1H, H-5e), 4.87 (m, 1H), 4.72 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1), 4.50 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-1), 4.47 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz, H-1), 4.44 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-1), 4.16 (d, 1H,  $J = 3.3$  Hz), 4.07-3.95 (m, 6H), 3.92-3.85 (m, 3H), 3.81-3.62 (m, 16H), 3.61-3.55 (m, 4H), 3.28 (m, 1H, H-2), 2.18 (ddd, 1H,  $J_{2,3} = 5.0$  Hz,  $J_{3,3'} = 14.1$  Hz,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, H-3d), 2.03 (s, 3H, NHAc), 1.72 (ddd, 1H,  $J_{2,3'} = 11.7$  Hz,  $J_{3,4} = 3.0$  Hz, H-3'd), 1.17 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-6e), 1.02 (2dt, 2H,  $J_{\text{gem}} = 12.9$  Hz,  $J_{\text{vic}} = 5.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 0.028 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  175.08 (C=O, NHAc), 103.91, 103.3, 102.92, 101.73, 99.02 (C-1a, C-1b, C-1c, C-1d, C-1e), 82.44, 78.64, 78.43, 75.52, 75.23, 75.11, 74.89, 73.18, 73.07,

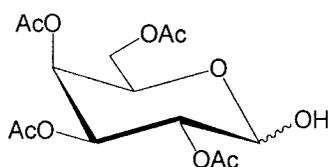
72.36, 70.33, 69.57, 68.67, 68.06, 67.00, 66.10, 65.83 (CH), 68.81 (OCH<sub>2</sub>Si), 62.08, 61.32, 60.41, 60.01 (C-6a, C-6b, C-6c, C-6d), 56.35 (C-2c), 36.94 (C-3d), 22.61 (CH<sub>3</sub>), 17.92 (CH<sub>2</sub>Si), 15.68 (C-6e), -2.17 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

## 9. PREPARATION DU TRISACCHARIDE Le<sup>a</sup>

### 9.1. Activation de la Position Anomérique du Galactose

#### 2, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl- $\alpha$ , $\beta$ -D-galactopyranose

(50)



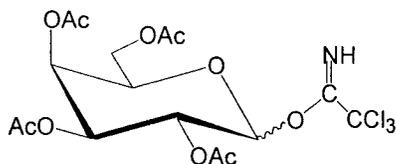
C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub> M 348,30

A une solution de penta-acétyl galactose **12** (6g, 15.38 mmol, 1 éq) dans l'éther (100 mL), on additionne à 0 °C, goutte à goutte (16.8 mL, 153.8 mmol, 10 éq) de benzylamine. Après 2h30 mn, la réaction est finie et le mélange réactionnel est dilué dans du dichlorométhane (360 mL). La benzylamine est ensuite extraite avec l'acide chlorhydrique (1M). La phase organique est lavée avec de l'eau jusqu'à obtention d'un pH neutre, la solution est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée. Le sirop obtenu est directement engagé dans l'étape suivante.

R<sub>f</sub> = 0.43 (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1)

#### 2,3, 4, 6-tétra-O-acétyl- $\alpha$ , $\beta$ -D-galactopyranosyl trichloroacétimidate

(51)



C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>10</sub> M 492.69

A une solution de tétra-O-acétyl-galactopyranose (5.16g, 14.81 mmol, 1 éq) dans 220 mL de dichlorométhane anhydre, est additionné à 0 °C (17.08 mL, 170.37 mmol, 11.5 éq) de trichloroacétonitrile, et goutte à goutte (2.23 mL, 14.81 mmol, 1 éq) de DBU. Le mélange est laissé sous agitation à 0 °C pendant une heure. Après la fin de la réaction le milieu est concentré, filtré, puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-

acétate d'éthyle 1/1). Le mélange d'isomères **51** (5.47 g) est obtenu avec un rendement de (75%).

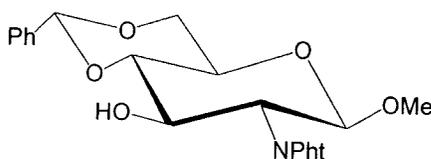
Anomère  $\alpha$  :  $R_f = 0.53$  (cyclohexane- acétate d'éthyle 1/1).

$^1\text{H RMN}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.47 (s, 1H, NH), 6.41 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1), 5.37 (m, 1H, H-4), 5.26-5.14 (m, 2H, H-2, H-3), 4.25 (t, 1H,  $J_{5,6} = 7.4$  Hz, H-5), 3.93 (dd, 2H,  $J_{6a,6b} = 11.3$  Hz, H-6a, H-6b), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.83 (s, 9H, 3xOAc).

## 9.2 Préparation du Synthone Glucosamine

Méthyl 4, 6-O-benzylidène-2-désoxy-2-phthalamido- $\beta$ -D-glucopyrannoside

(52)



$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_7$  M 443.49

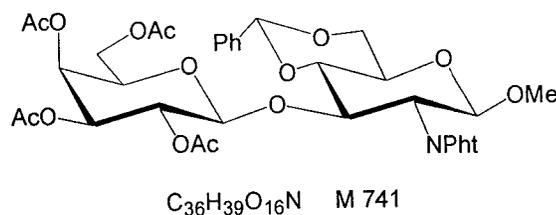
4g du produit **5** sont dissous dans 40 mL de dichlorométhane anhydre auquel on ajoute 3.31mL de méthanol et 4g de tamis moléculaire 4Å. Le milieu est porté à  $-10$  °C. Sous agitation, est rajouté 4g de N-bromosuccinimide puis, goutte à goutte, une solution de 360  $\mu\text{L}$  d'acide trifluorométhanesulfonique dans 20 mL de dichlorométhane anhydre. La réaction est terminée au bout d'une heure. Le milieu est neutralisé par de la triéthylamine, filtré sur célite, lavé avec du thiosulfate de sodium puis de l'eau. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice, (éluant :cyclohexane-acétate d'éthyle 2/1). (2.68g) de **52** est obtenu avec un rendement de 83%.

$R_f = 0.56$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1)

$^1\text{H RMN}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.82-7.90 (m, 2H, Pht), 7.73-7.79 (m, 2H, Pht), 7.45-7.54 (m, 2H, Ph), 7.38-7.43 (m, 3H, Ph), 5.68 (s, 1H, PhCH), 5.30 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.47$  Hz, H-1), 4.65 (ddd, 1H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.5$  Hz,  $J_{3,\text{OH}} = 3.5$  Hz, H-3), 4.42 (dd, 1H,  $J_{5,6a} = 4.4$  Hz,  $J_{6a,6b} = 10.2$  Hz, H-6a), 4.24 (dd, 1H, H-2), 3.86 (dd, 1H,  $J_{5,6b} = 10.1$  Hz, H-6b), 3.7 (ddd, 1H,  $J_{4,5} = 8.7$  Hz, H-5), 3.45 (dd, 1H, H-4), 3.5 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.5 (d, 1H, OH).

### 9.3. Préparation du Bloc Lactosamine Précurseur du Trisaccharide Le<sup>a</sup>

Méthyl 4, 6-O-benzylidène-2-désoxy-3-O-(2, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl-galactopyranosyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyranoside (53)



Sous argon, les composés **52** (2.3g, 5.59 mmol, 1 éq) et **51** (4.13g, 8.39 mmol, 1.5 éq) sont dissous dans le dichlorométhane anhydre (88 mL) contenant du tamis moléculaire 4Å (9g). Le mélange est laissé sous agitation pendant 40 minutes à température ambiante. Ensuite, le milieu réactionnel est amené à une température de 0 °C (bain de glace) et le triflate de triméthylsilyl (1.54 mL, 8.39 mmol, 1.5 éq) est ajouté goutte à goutte. Au bout d'une heure, la réaction est terminée et le mélange est neutralisé par de la triéthylamine, filtré sur célite puis concentré. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 1.2/1). Ainsi, le produit **53** (2.9g, 70%) est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

R<sub>f</sub> = 0.35 (cyclohexane-acétate d'éthyle 1 /1) ;

R<sub>f</sub> = 0.38 (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/3).

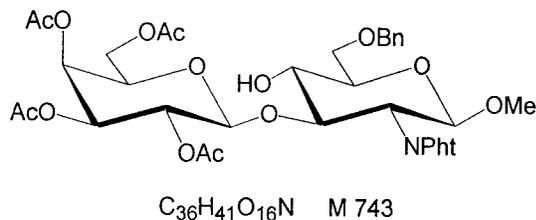
Spectre de masse : m/z 759.2 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.91-7.29 (m, 9H, H-arom), 5.61 (s, 1H, PhCH), 5.22 (dd, 1H, J<sub>4,3'</sub>=3.3 Hz, H-4'), 5.11 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.52 Hz, H-1), 5.01 (dd, 1H, J<sub>2,1'</sub> = 8 Hz, J<sub>2,3'</sub>=10.34 Hz, H-2'), 4.77 (m, 2H, H-3', H-3), 4.58 (d, 1H, J<sub>1,2'</sub> = 8 Hz, H-1'), 4.42 (dd, 1H, J<sub>6'a,6'b</sub> = 10.5 Hz, J<sub>6'a,5'</sub> = 4.8 Hz, H-6'a), 4.32 (dd, 1H, J<sub>2,1'</sub>=8.5 Hz, J<sub>2,3'</sub>=10.4 Hz, H-2), 4.06 (dd, 1H, J<sub>6b,6a</sub>=11 Hz, J<sub>6b,5</sub> = 8.2 Hz, H-6b), 3.87 (m, 3H, H-6'b, H-6a, H-4), 3.67 (m, 1H, H-5'), 3.51 (m, 1H, H-5), 3.41 (s, 3H, OMe), 2.1, 1.94, 1.87, 1.6 (4s, 12H, 4 OAc).

<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.22, 170.01, 169.97 (4 C=O, OAc), 168.79 (2 C=O, Phth), 136.94, 134.19, 131.63, 129.23, 128.31, 125.96 (C-arom, C-Harom), 101.40 (PhCH), 100.37 (C-1'), 99.51 (C-4), 80.99 (C-1), 75.53 (C-5), 70.92 (C-5'), 70.20 (C-3), 69.07 (C-3), 68.66 (C-6), 66.55 (C-2'), 66.21 (C-4'), 60.70 (C-6'), 56.93 (OMe), 55.10 (C-2), 20.55, 20.49, 20.37, 20.02 (4 CH<sub>3</sub>CO).

Méthyl 6-O-benzyl-2-désoxy-3-O-(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyrannosyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyrannoside

(54)



Au composé **53** (2.8g, 3.77 mmol, 1 éq) dissous dans 80 mL de dichlorométhane anhydre contenant du tamis moléculaire 4Å (8g), on ajoute le triéthylsilane (3.05 mL, 18.89 mmol, 5 éq). Le milieu est porté à 0 °C et l'acide trifluoroacétique (2.9 mL, 37.78 mmol, 10 éq) est rajouté goutte à goutte. Après la fin de l'addition, le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure. Après la fin de la réaction, le milieu est filtré puis neutralisé par une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Les phases sont séparées et la phase organique est lavée par une solution aqueuse de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1). Ainsi 2.02g du produit **54** est obtenu avec un rendement de 72.15% sous forme d'une poudre blanche.

R<sub>f</sub> = 0.47 (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/3)

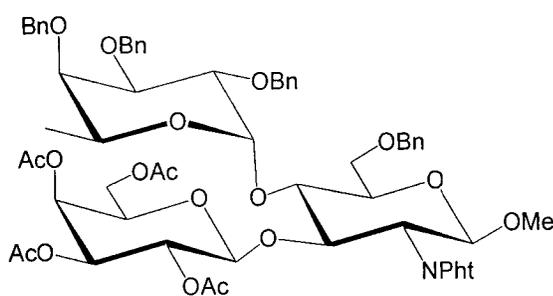
Spectre de masse : m/z 761.3 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.83-7.34 (m, 9H, H-arom), 5.30 (dd, 1H, J<sub>4,3</sub> = 3.4 Hz, J<sub>4,5</sub> < 1Hz, H-4'); 5.14 (dd, 1H, J<sub>2,1'</sub> = 8.0 Hz, J<sub>2,3'</sub> = 10.4 Hz, H-2'), 4.95 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.4 Hz, H-1), 4.82 (dd, 1H, J<sub>3,2'</sub> = 10.5 Hz, J<sub>3,4'</sub> = 3.4 Hz, H-3'), 4.65 (2d, 2H, J<sub>gem</sub> = 12.3 Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.49 (m, 1H, H-3), 4.43 (d, 1H, J<sub>1,2'</sub> = 8.0 Hz, H-1'), 4.24 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> = 10.7 Hz, H-2), 4.11 (m, 2H, H-6'a, H-6'b), 4.05 (s, 1H, OH), 3.95 (m, 2H, H-6a, H-5'), 3.75 (m, 1H, H-6b), 3.64 (m, 1H, H-5), 3.41 (s, 3H, OMe), 2.12, 2.04, 1.88, 1.45 (4s, 12 H, 4 OAc).

**<sup>13</sup>C RMN (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 170.23, 169.93, 169.79, 168.63 (4 C=O, Ac et 2 C=O, Phth), 138.19, 134.28, 131.40, 128.19, 127.41, 127.38, 123.51 (C-arom, CH-arom), 100.93 (C-1'), 98.82 (C-4), 82.11 (C-1), 75.48 (C-5), 73.37 (PhCH<sub>2</sub>), 70.99 (C-5'), 70.65 (C-3'), 69.71 (C-3), 69.31 (C-6), 68.33 (C-2'), 66.65 (C-4'), 61.39 (C-6'), 56.53 (OMe), 54.54 (C-2), 20.42, 20.36, 20.24, 19.60 (4 CH<sub>3</sub>, OAc).

9.4 Synthèse du trisaccharide Le<sup>a</sup>

Méthyl 6-O-benzyl-2-désoxy-3-O-(2, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyrannosyl)-4-O-(2, 3, 4-tri-O-benzyl-α-L-fucopyrannosyl)-2-phthalimido-β-D-glucopyrannoside (55)



C<sub>63</sub>H<sub>69</sub>O<sub>20</sub>N M 1159.65

Les produits **54** (2.02g, 2.71 mmol, 1 éq) et **11** (2.6g, 5.43 mmol, 2 éq) sont dissous dans le toluène anhydre (95 mL) contenant du tamis moléculaire 4Å (9.5g). Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante. La N-iodosuccinimide (1.4g, 6.25 mmol, 2.3 éq) est ajoutée ensuite l'acide triflique (0.625 mmol, 115 µL, 0.23 éq) est additionné goutte à goutte. La réaction est instantanée. Après dix minutes la réaction est finie. Le milieu réactionnel est neutralisé par de la triéthylamine, ensuite filtré sur célite puis concentré. Le résidu est repris dans le dichlorométhane, la phase organique est lavée successivement à l'eau, une solution saturée de thiosulfate de sodium puis par une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée. Le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (toluène/acétate d'éthyle : 3/1). 2.69g du produit **55** est obtenu sous forme d'un solide blanc amorphe avec un rendement de 85.5%.

R<sub>f</sub> = 0.42 (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1).

Spectre de masse : m/z 1177.8 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour C<sub>63</sub>H<sub>69</sub>O<sub>20</sub>N

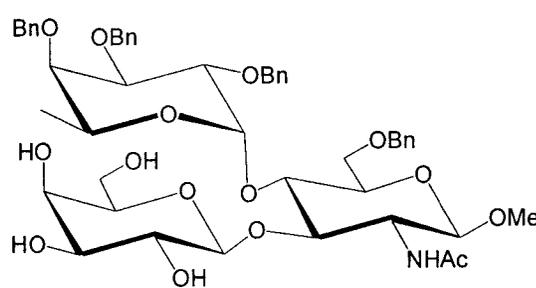
Calculée	C 65.21	H 5.99	N 1.20
Trouvée	C 65.32	H 6.07	N 1.05

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.87 (m, 4H, Pht), 7.48-7.29 (m, 20H, H-arom), 5.25 (dd, 1H, J<sub>4,3'</sub> = 3.36 Hz, J<sub>4,5'</sub> <1 Hz, H-4'), 5.23 (d, 1H, J = 3.85 Hz), 5.04 (m, 2H), 4.91 (m, 4H), 4.79 (m, 4H), 4.47 (m, 3H, H-5'), 4.26 (m, 4H, H-6'), 4.03 (m, 4H), 3.81 (m, 1H), 3.7 (m, 2H), 3.59 (m, 1H), 3.38 (s, 3H, OMe), 2.03 (s, 6H, 2 OAc), 1.88, 1.76 (2s, 6H, 2 OAc), 1.35 (d, J<sub>6'',5''</sub> = 6.56 Hz, 3H, H-6'').

$^{13}\text{C}$  RMN (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.06, 169.89, 169.74, 169.25 (4 C=O, Ac et 2 C=O, Phth), 138.7, 138.63, 138.24, 138.19, 139.59, 128.67, 128.35, 128.33, 128.3, 128.24, 128.22, 128.14, 127.74, 127.57, 127.46, 127.38, 127.33, 127.29, 126.93, 123.56 (C-arom, CH-arom), 100.45 (C-1'), 98.71 (C-1), 97.60 (C-1''), 80.79 (C-4''); 76.26, 75.48, 74.40, 72.77, 70.96, 70.14, 67.71 (CH, cycle), 74.88, 73.84, 73.01, 72.13 (4  $\text{PhCH}_2$ ), 67.08 (C-6), 6.22 (C-5''), 59.67 (C-6''), 56.33 (OMe), 56.04 (C-2), 20.55, 20.40, 20.35 (Ac), 16.88 (C-6'').

## 9.5 Déprotection du trisaccharide Le<sup>a</sup>

*Méthyl 6-O-benzyl-2-désoxy-3-O-( $\beta$ -D-galactopyrannosyl)-4-O-(2, 3, 4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyrannosyl)-2-N-acétamido- $\beta$ -D-glucopyrannoside* (56)



$\text{C}_{49}\text{H}_{61}\text{NO}_{15}$  M. 904.01

(2.69g, 2.31 mmol) du composé **55** sont placés dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant et muni d'une agitation magnétique, en présence de 600 mL d'éthanol 99%, 35 mL d'hydrazine monohydrate et 35 mL d'eau. Le milieu réactionnel est maintenu au reflux pendant une nuit. La réaction étant finie, la suspension est concentrée et l'eau résiduelle est co-évacuée à l'aide de l'acétate d'éthyle. Le résidu est séché sous  $\text{P}_2\text{O}_5$  et directement engagé dans l'étape suivante.  $R_f = 0.38$  (dichlorométhane-méthanol 10/1).

Au résidu séché, on ajoute 160 mL de méthanol, 160 mL de dichlorométhane et 32 mL d'anhydride acétique. Le mélange est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant une nuit. La réaction étant finie, le milieu réactionnel est concentré et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 8/1). Une deuxième colonne a été réalisée en utilisant comme éluant (cyclohexane/acétate d'éthyle : 1/1). (1.57g) du produit **56** est obtenu avec un rendement de 75% sur deux étapes.  $R_f = 0.54$  (dichlorométhane-méthanol 8/1).

Spectre de masse :  $m/z$  921.4 ( $\text{M} + \text{NH}_4$ )<sup>+</sup>

Analyse élémentaire pour  $C_{49}H_{61}O_{15}N$

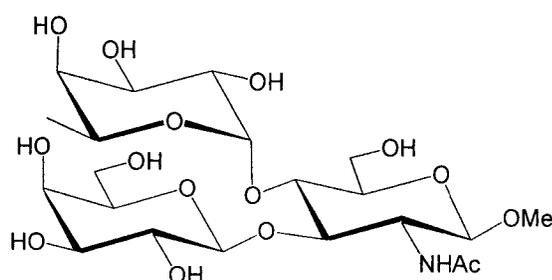
Calculée C 65.10 H 6.80 N 1.55

Trouvée C 65.11 H 6.99 N 1.71

$^1H$  RMN (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  7.58-7.43 (m, 20H, H-arom), 5.26 (d, 1H,  $J_{1,2''} = 3.8$  Hz, H-1''), 5.06 (m, 2H, H-5'', PhCH<sub>2</sub>), 4.91 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 4.79 (m, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 4.61 (m, 3H,  $J_{1,2''} = 6.82$  Hz, H-1', PhCH<sub>2</sub>), 4.5 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.92$  Hz, H-1), 4.28 (dd, 1H, H-4), 4.23 (dd, 1H, H-3''), 4.17-3.99 (m, 7H, H-6a, H-2, H-3, H-2'', H-6'a, H-4'', H-6b), 3.97 (m, 1H, H-4'), 3.85 (m, 2H, H-5, H-6'b), 3.69 (m, 1H, H-2'), 3.61 (m, 5H, H-3', H-5', OMe), 2.15 (s, 3H, NHAc), 1.41 (d, 3H,  $J_{6',5''} = 6.4$  Hz, H-6'').

$^{13}C$  RMN (100.6 Hz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  174.24 (O=C, NHAc), 140.50, 140.41, 139.63, 139.56 (4C, Ph), 130.02, 129.74, 129.66, 129.49, 129.45, 129.40, 129.21, 129.11, 128.84, 128.74 (C-arom, CH-arom), 105.10 (C-1'), 103.51 (C-1), 98.67 (C-1''), 80.79 (C-4''), 81.21, 79.82, 78.21, 77.50, 77.18, 76.65, 75.00, 74.07, 72.51, 70.18, 68.38 (11CH, cycle), 76.63, 76.08, 74.74, 73.45 (4PhCH<sub>2</sub>), 69.18 (C-6), 63.56 (C-6'), 57.29 (OMe), 57.13 (C-2), 23.43 (NHAc), 17.32 (C-6'').

Méthyl 2-désoxy-3-O- $\beta$ -D-galactopyrannosyl-4-O- $\alpha$ -L-fucopyrannosyl-2-acétamido- $\beta$ -D-glucopyrannoside(57)



$C_{21}H_{37}NO_{15}$  M. 543.52

Dans un hydrogénateur, (1.57g, 1.73 mmol) du composé **56** est dissous dans (250 mL) de méthanol. Sous agitation magnétique, 1g de palladium sur charbon à 10% est ajouté et le milieu est mis sous une pression d'hydrogène de 1.6 bar pendant 12 heures. La réaction est suivie par CCM. Une fois, la réaction finie, le milieu est filtré sur célite puis concentré. 890mg du produit **57** sont obtenus avec un rendement de 95%.

$R_f = 0.26$  (acétate d'éthyle-isopropanol-eau 3/3/2)

Spectre de masse : HRMS (FAB)  $C_{21}H_{37}NO_{15}Na$  (M+Na)<sup>+</sup> m/z :

Calculée 566.2061

Trouvée 566.2072

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4.98 (d, 1H,  $J_{1'',2''}=3.9$  Hz, H-1''), 4.83 (m, 1H, H-5''), 4.45 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 7.7$  Hz, H-1'), 4.42 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.5$  Hz, H-1), 4.02 (t, 1H,  $J=9.3$  Hz, H-4''), 3.96 (dd, 1H,  $J = 10.3$  Hz), 3.84 (m, 4H, H-4', H-2, H-3'', H-6'a), 3.77 (m, 2H, H-6'b, H-2''), 3.7 (m, H-6a, H-6b, 2H), 3.59 (dd, 1H,  $J = 9.8$  Hz,  $J=3.36$  Hz), 3.53 (m, 2H), 3.45 (m, 4H, NHAc), 2.00 (s, 3H, OMe), 1.14 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, H-6'').

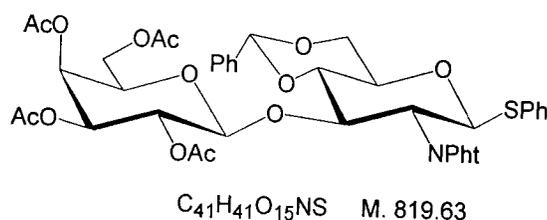
$^{13}\text{C}$  RMN(100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  174.82 (C=O), 103.25 (C-1), 102.13 (C-1'), 98.43 (C-1''), 76.47, 75.76, 75.13, 72.77, 72.63, 72.26, 70.76, 69.45, 68.67, 68.10, 67.18 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-3, C-4, C-5, C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 61.99 (C-6), 60 (C-6'), 57.44 (OMe), 55.85 (C-2), 22.63 (NHAc), 15.73 (C-6'').

## 10. PREPARATION DU GLYCOSPHINGOLIPIDE $\text{Le}^a$

### 10.1. Préparation du Bloc Lactosamine précurseur du trisaccharide $\text{Le}^a$

*Phényl 4, 6-O-benzylidène-2-désoxy-3-O-(2, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl-galactopyrannosyl)-2-phthalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyrannoside*

(58)



Le mélange de produits **5** (414mg, 0.846 mmol, 1 éq) et **53** (500mg, 1.015 mmol, 1.2 éq) sont dissous dans 30 mL de dichlorométhane anhydre dans lequel on ajoute 400mg de tamis moléculaire 4Å sous argon. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 40 min. Le mélange est refroidi à 0 °C et le triflate de triméthylsilyl (166  $\mu\text{L}$ , 830  $\mu\text{mol}$ , 1 éq) est ajouté goutte à goutte. Une heure après, la réaction est finie et le mélange est neutralisé par de la triéthylamine, lavé avec une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , de  $\text{NaCl}$  puis d'eau. Le mélange est séché sur sulfate de magnésium filtré sur célite puis concentré. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 1/1)

$R_f = 0.4$  (cyclohexane/acétate d'éthyle : 1/1). Le rendement est de 46%

$[\alpha]_D^{25} +24.5^\circ$  (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  ( $\text{M}+\text{NH}_4$ ) $^+$  837.5

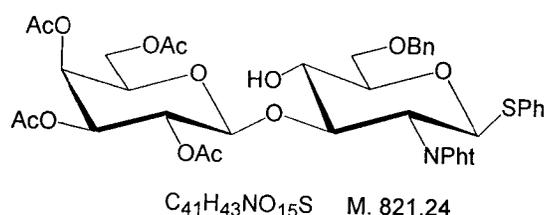
Analyse élémentaire pour  $C_{41}H_{41}NO_{15}S$

Calculée	C 60.06	H 5.04	N 1.71
Trouvée	C 59.85	H 5.16	N 1.63

$^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.42-7.29 (m, 14H, H-arom), 5.61 (s, 1H, PhCH), 5.60 (d, 1H,  $J = 10.6$  Hz, H-1), 5.22 (d, 1H,  $J = 3.3$  Hz, H-4'), 5.01 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 8$  Hz,  $J_{1,2} = 10.4$  Hz, H-2'), 4.78 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.8$  Hz,  $J_{3,4} = 3.2$  Hz, H-3'), 4.77 (d, 1H,  $J = 10.4$  Hz, H-6a), 4.58 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-1'), 4.44 (t, 1H,  $J = 10.4$  Hz, H-2), 4.43 (dd, 1H,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, H-6b), 4.05 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 11.0$  Hz,  $J_{2,3} = 8.2$  Hz, H-3), 2.10, 1.95, 1.87, 1.56 (s, 12H, 4 x OAc).

$^{13}C$  RMN (100.6 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  170.19, 169.98, 169.94, 168.76, 168.29, 166.65 (C = O), 136.87, 131.32 (C-arom), 134.52-123.14 (CH-arom); 101.41 (PhCH), 100.32 (C-1'), 84.19 (C-1), 80.68, 76.48, 70.89, 70.45, 70.21, 69.09, 66.51 (C-3, 4, 5, 2', 3', 4', 5'), 68.52 (C-6), 60.67 (C-6'), 54.21 (C-2), 20.54, 20.48, 20.35, 19.97 (4 x OAc)

*Phényl 6-O-benzyl-2-désoxy-3-O-(2, 3, 4, 6-tétra-O-acétyl- $\beta$ -D-galactopyrannosyl)-2-phtalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyrannoside* (59)



Au composé **58** (382mg, 0.466 mmol, 1 éq) dissous dans (10 mL) de dichlorométhane anhydre contenant 1g de tamis moléculaire 4Å, on ajoute (0.37 mL, 2.33 mmol, 5 éq) de triéthylsilane. Le milieu est porté à 0 °C et l'acide trifluoroacétique (0.36 mL, 4.66 mmol, 10 éq) est rajouté goutte à goutte. Après la fin de l'addition, le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure. Après la fin de la réaction, le milieu est filtré puis neutralisé par une solution aqueuse saturée de  $NaHCO_3$ . Les phases sont séparées et la phase organique est lavée par une solution aqueuse de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (cyclohexane-acétate d'éthyle 1/1). Ainsi 325mg du produit **59** est obtenue avec un rendement de 85% sous forme d'une poudre blanche.

$R_f = 0.47$  (cyclohexane-acétate d'éthyle 2/3)

$[\alpha]_D^{+28}$  (c 1.0, chloroforme)

Spectre de masse :  $m/z$  839.4.  $(M+NH_4)^+$

Analyse élémentaire pour  $C_{41}H_{43}NO_{15}S$

Calculée	C 59.52	H 5.27	N 1.70
Trouvée	C 59.73	H 5.43	N 1.70

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.93-7.19 (m, 14H, H-arom), 5.47 (d, 1H,  $J = 10.4$  Hz, H-1), 5.32 (dd, 1H,  $J = 0.7$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, H-4'), 5.17 (dd, 1H,  $J = 8$  Hz,  $J = 10.5$  Hz, H-2'), 4.82 (dd, 1H,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 10.4$  Hz, H-3'), 4.67 (d, 1H,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.63 (d, 1H,  $J = 12.5$  Hz,  $\text{PhCH}_2$ ), 4.53 (dd, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 10.2$  Hz, H-3), 4.41 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-1'), 4.39 (t, 1H,  $J = 10.5$  Hz, H-2), 2.16, 2.08, 1.91, 1.67 (s, 12H, 4 x OAc).

$^{13}\text{C RMN}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.36, 170.06, 169.95, 168.82, 168.45, 167.00 (C = O), 138.35, 132.39, 131.39 (C-arom), 134.53-123.71 (CH-arom), 100.95 (C-1'), 83.69 (C-1), 82.92 (C-4), 79.80 (C-5), 73.44 ( $\text{Ph-CH}_2$ ), 71.13 (C-5'), 70.75 (C-3'), 69.65 (C-6) 69.58 (C-3); 68.39 (C-2'), 66.72 (C-4'), 61.43 (C-6'), 53.85 (C-2), 20.55, 20.50, 20.37, 19.87 (4 x OAc).



# CHAPITRE 4

## MODELISATION DE L'INTERACTION DU DIMERE LEWIS X

---

### 1. INTRODUCTION

La recherche et la synthèse de nouveaux composés chimiques et biochimiques sont aujourd'hui souvent associées à une étude par modélisation moléculaire. La modélisation moléculaire est un terme général qui englobe différentes techniques de graphisme moléculaire et de chimie computationnelle permettant de dessiner, afficher, simuler, analyser, calculer et stocker les propriétés des molécules. Dans les stations de calcul modernes, les molécules sont visualisées sous différentes formes et manipulées en trois dimensions. Les objets visualisés peuvent être issus de bases de données structurales tels que PDB (Protein Data Bank) et CSD (Cambridge Structural Data) ou construits à partir de fragments élémentaires, ou par homologie de séquences dans le cas des protéines. Restera dans ce cas à calculer, à l'aide des techniques d'analyse conformationnelle, les géométries tridimensionnelles les plus vraisemblables pour la molécule étudiée. Le comportement des molécules peut être simulé de façon statique ou dynamique. Cette dernière inclut notamment le comportement et la flexibilité des molécules en solution, les mécanismes réactionnels et interactions mises en jeu dans la catalyse enzymatique, la reconnaissance ou la complexation.

Les techniques expérimentales les plus aptes à résoudre les structures tridimensionnelles sont principalement la diffraction (rayons-X, électrons, neutrons) pour des solides cristallins ou semi-cristallins et la résonance magnétique nucléaire à haute résolution pour des solutions diluées ou des milieux orientés (phages, cristaux liquides). Dans beaucoup de cas, la modélisation moléculaire vient en complément de ces techniques car les données expérimentales ne suffisent pas à résoudre complètement la structure.

La modélisation des glucides n'a pas bénéficié du même essor que celui des protéines par suite de l'intérêt tardif porté aux sucres et de leur relative complexité. On rencontre beaucoup de difficultés lors de la modélisation des oligosaccharides car ils présentent un très grand nombre de



conformations généralement trop dynamiques pour une étude par RMN, les données cristallographiques sont peu nombreuses car les monocristaux étant très difficiles à obtenir. Elle nécessite la mise en œuvre de paramètres énergétiques particuliers. Des méthodes appropriées ont été développées pour l'analyse conformationnelle d'oligosaccharides dans différents milieux (Imberty, 2000). Plus récemment, la recherche dans ce domaine s'est fortement développée et des champs de forces, plus ou moins adaptés à l'étude des sucres ont été élaborés (CHARMM, MM3, GROMOS, AMBER).

## 2. OUTILS DE LA MODELISATION MOLECULAIRE

Les molécules peuvent adopter plusieurs conformations. La stabilité relative de ces conformations peut être évaluée par le calcul de l'énergie potentielle qui leur est associée. Trois méthodes principales de calcul de l'énergie sont mises en œuvre, elles sont généralement couplées à des méthodes de recherche de conformations (rotation systématique autour des liaisons, algorithmes de grille, etc...) et des minimiseurs mathématiques permettant de calculer les minima de la fonction d'énergie. Ces trois méthodes de calculs théoriques sont la mécanique quantique (QM) (*ab initio* ou semi-empirique), la mécanique moléculaire (MM) et la dynamique moléculaire (DM).

### 2.1. Les méthodes quantiques

Ces méthodes sont basées sur le calcul des orbitales moléculaires (OM). Leur complexité augmente rapidement avec le nombre d'électrons, impliquant des temps de calcul souvent rédhibitoires qui limitent l'usage à de petites molécules ou nécessitent le recours à de nombreuses approximations.

L'équation centrale dans la mécanique quantique est l'équation de Schrödinger, qui s'écrit sous les états stationnaires,

$$\hat{H}\Psi = E\Psi$$

$\hat{H}$  est l'Hamiltonien qui incorpore tous les termes d'énergie, aussi bien ceux apportés par les noyaux (énergie cinétique et potentielle) que ceux apportés par les électrons.  $\Psi$  est la fonction d'onde du système, fonction des coordonnées des noyaux, des électrons et contient toute l'information du système,  $E$  est l'énergie totale. Les propriétés moléculaires qui peuvent être calculées sont la géométrie, les spectres de vibration, les spectres d'absorption UV, les moments dipolaires, les spectres électroniques et les fonctions responsables de la réactivité chimique (Orbitales HOMO, LUMO, etc...). Les principales variantes sont la méthode de Hückel et les méthodes de champ auto-cohérent (Self consistent Field, SCF).



La méthode de Hückel est la plus simple parmi toutes les méthodes. Elle ne prend en compte que les électrons  $\pi$  et utilise des approximations assez draconiennes. Malgré cela, elle permet d'interpréter une grande part de la réactivité chimique.

Les méthodes de champ auto-cohérent (Self Consistent Field, SCF) prennent en compte les électrons  $\sigma$  et  $\pi$ , et reposent sur des calculs plus élaborés que la méthode de Hückel. On distingue deux variantes, suivant la manière dont les termes d'énergie électroniques sont calculés :

Les méthodes *ab initio* dont tous les termes énergétiques sont calculés et dont les temps de calcul sont très longs, et les méthodes semi-empiriques où les termes les plus difficiles à calculer sont négligés ou estimés à partir de données expérimentales. Les temps de calcul sont considérablement raccourcis, mais la méthode est tributaire des composés qui ont servi à l'étalonner. Selon la nature des approximations utilisées, on distingue plusieurs variantes (MNDO, AM1, ...).

## 2.2. Mécanique moléculaire

La mécanique moléculaire est basée sur l'approximation de Born-Oppenheimer selon laquelle les électrons sont beaucoup plus rapides que les noyaux et ces derniers sont donc implicitement traités. La mécanique moléculaire est une méthode empirique où les atomes (les noyaux) sont représentés par des masses ou des sphères, et les liaisons par des ressorts de différentes forces. Les valeurs de ces forces proviennent de données expérimentales de spectroscopie vibrationnelle (IR, Raman), de données de diffraction de rayons X ou de valeurs obtenues par les méthodes *ab initio*. Le calcul de l'ensemble de ces forces, selon les règles établies pour les oscillateurs harmoniques, permet d'obtenir l'énergie moléculaire et de déterminer la structure tridimensionnelle.

L'énergie conformationnelle est la sommation de termes d'interactions évalués à partir de tables précalculées (les champs de forces) contenant les constantes d'élongation, de déformation angulaire, de torsion, d'attraction et répulsion électrostatique. L'énergie stérique s'exprime par l'équation suivante :

$$E = E_{\text{stretching}} + E_{\text{bending}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}} + E_{\text{hydrogen}}$$

Chacun de ces termes est représenté par une fonction analytique dont les constantes ont été déterminées empiriquement.

Le terme "Stretching" représente l'élongation des liaisons.

Le terme "Bending" représente la variation des angles.

Le terme "Torsion" se rapporte à l'énergie de torsion des angles dièdres.



Le terme "Vdw" rend compte des énergies d'interaction non covalente entre atomes non liés.  
 Le terme "Elec" rend compte des énergies d'interaction électrostatiques entre atomes non liés.  
 Le terme "Hydrogen" rend compte des liaisons hydrogènes.

L'énergie stérique peut être divisée en deux groupes :

- Interaction entre atomes liés par deux ou trois liaisons chimiques (énergie de *stretching*, *bending*, ...)
- Interaction entre atomes non liés (ou séparés de plus de trois liaisons chimiques), énergie électrostatique, de liaisons hydrogènes, de van der Waals.

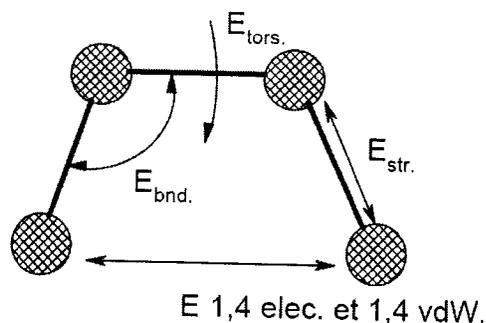


Figure 1. Les déformations en mécanique moléculaire.

La structure 3D d'une molécule résulte des interactions intramoléculaires et des interactions avec le solvant. La recherche des conformations consiste donc à déterminer les minima de l'énergie globale d'interaction qui en général est réduite aux interactions intramoléculaires. La minimisation de l'énergie consiste à modifier par incréments la géométrie jusqu'à obtenir un minimum local. Aucun algorithme de minimisation ne permet de garantir de façon absolue l'obtention du vrai minima (ou minimum global). C'est pourquoi il est fortement conseillé, après une minimisation d'explorer l'espace conformationnel en utilisant des techniques de recherche conformationnelle qui consistent à effectuer un grand nombre de minimisations à partir de points différents, puis à choisir le minimum. Différentes méthodes sont disponibles pour trouver le minimum de la fonction d'énergie potentielle par exemple la méthode de la plus grande pente et celle du gradient conjugué.

La méthode de la plus grande pente, ou "Steepest descent" (SD) (Wiberg, 1977), consiste à rechercher la direction de la plus grande pente au cours de laquelle la fonction d'énergie décroît le plus rapidement. La direction de minimisation suivie sera celle indiquée par l'opposé du gradient. Cette méthode permet en général de déterminer rapidement une direction de minimisation, mais converge mal au voisinage d'un minima.

La méthode du gradient conjugué, ou "Conjugated Gradient" (CG) (Powell, 1977), permet de prendre en compte les valeurs du gradient mais aussi la direction de déplacement de l'étape précédente. Cette méthode donne en général une meilleure convergence que la méthode de la plus grande pente.

L'avantage principal de la mécanique moléculaire par rapport aux autres méthodes est la rapidité des calculs. Ceci est dû à une simplification des équations du champ de force. La simplification considérable des calculs qui en résulte permet de travailler sur des molécules de grande taille, telles que les macromolécules biologiques, ou des systèmes comportant un grand nombre de molécules. En revanche, cette méthode ne prend pas en compte la structure électronique moléculaire. Il est donc impossible d'étudier des systèmes dans lesquels les effets électroniques sont prédominants. Ainsi, la validité des résultats (résultats des énergies) ne dépend que de la paramétrisation originale des constantes internes au champ de force. La recherche conformationnelle ne peut pas explorer tout l'espace et il est donc impossible d'être certain d'avoir atteint le minimum absolu. Pour explorer davantage l'espace conformationnel disponible d'une molécule nous avons recours à d'autres méthodes comme celle de la dynamique moléculaire.

### 2.3. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire a pour but de calculer les mouvements des molécules, le plus souvent à partir des énergies de la mécanique moléculaire, en appliquant les lois de la mécanique classique. Ces mouvements correspondent à des vibrations autour d'un minimum ou au passage d'un minimum à un autre minimum d'énergie. Ainsi la dynamique moléculaire permet de s'extraire d'un minimum local. C'est une technique qui permet de simuler l'évolution des systèmes dans le temps. Elle prend en compte l'effet de la température, de la pression et du temps, calcule les trajectoires des atomes et rend compte de la flexibilité des molécules, leur comportement en solution ou les modes de vibration.

#### 2.3.1 Principe de la dynamique moléculaire

Le principe est basé sur le fait que chaque atome de la molécule est considéré comme une masse ponctuelle dont le mouvement est déterminé par l'ensemble des forces exercées sur lui par les autres atomes en fonction du temps. Les forces exercées sont considérées comme constantes. La molécule est donc perçue comme une entité dynamique dont les atomes modifient leurs positions spatiales au cours du temps. A une température donnée, une vitesse initiale est attribuée à chaque atome. A partir de ces vitesses, considérées constantes, la position des atomes change en  $v_i \delta t$ , où  $v_i$  est la vitesse de l'atome  $i$  et  $\delta t$  est l'incrément de temps. Avec ces nouvelles coordonnées, on

détermine les forces qui agissent sur chaque atome (équation 1) selon le champ de force et le potentiel utilisé, et selon la seconde loi de Newton, on attribue les nouvelles vitesses et positions. L'équation 1 régie la relation entre la force et l'accélération.

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} \quad (1)$$

$\vec{F}_i$  est le vecteur force agissant sur l'atome  $i$ ,  $m_i$  est la masse de l'atome  $i$ ,  $\vec{a}_i$  est le vecteur accélération de l'atome  $i$  et,  $\vec{r}_i$  la position de l'atome  $i$ .

Grâce aux vitesses et aux positions de chaque atome dans le temps, il est possible d'évaluer les données macroscopiques, comme l'énergie cinétique et la température. L'énergie cinétique se calcule selon la formule :

$$E_c = \sum_{i=1}^N \frac{P_i^2}{2m_i} \quad (2)$$

où  $P_i$  est la quantité de mouvement de l'atome  $i$ .

La température s'obtient à partir de l'énergie cinétique et elle est lentement augmentée par étapes successives de la température initiale à la température de simulation, amenant ainsi le système moléculaire à un état d'équilibre.

$$E_c = \frac{k_B T}{2} (3N - N_c) \quad (3)$$

$k_B$  est la constante de Boltzmann,  $N_c$  le nombre de contrainte,  $3N - N_c$  le nombre total de degré de liberté.

La force  $\vec{F}_i$  qui s'exerce sur un atome  $i$  se trouvant en position  $\vec{r}_i(t)$  est déterminée par différentiation (ou calcul du gradient) de la fonction d'énergie potentielle au voisinage de la position  $\vec{r}_i(t)$  :

$$\vec{F}_i = - \frac{dE(r_1, \dots, r_n)}{dr_i(t)} \quad (4)$$

L'énergie potentielle  $E$  se calcule à partir des paramètres du champ de force de la mécanique classique. Dans un premier temps, les accélérations atomiques sont calculées à partir des forces s'exerçant sur chaque atome. Ensuite, à l'aide des équations de la cinématique, les vitesses de chaque atome sont évaluées à partir des accélérations atomiques précédemment calculées. Enfin, les positions des atomes sont calculées grâce aux vitesses atomiques selon :



$$\vec{a}_i = \frac{d\vec{v}_i}{dt} \text{ et } \vec{v}_i = \frac{d\vec{r}_i}{dt} \quad (5)$$

Pour générer les trajectoires du système moléculaire, il suffit d'intégrer les équations de mouvement de manière itérative jusqu'à l'intervalle de temps choisi. L'intégration de l'équation de Newton se fait dans de faibles intervalles de temps  $\Delta t$ , en général 1-10 fs. (1 fs =  $10^{-15}$  s) pour des systèmes moléculaires.

$$(\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2}) \quad (6)$$

Cet intervalle de temps doit être plus petit que la période du mouvement de la plus haute fréquence (par exemple la vibration d'élongation d'une liaison C-H). Une simulation de dynamique moléculaire permet de générer des trajectoires de l'ordre du millier de ps (1 ps =  $10^{-12}$  s). Si le complexe moléculaire comporte de nombreux atomes, le temps de calcul s'en trouvera allongé.

### 2.3.2 Etapes d'une dynamique

Une dynamique moléculaire se compose de quatre phases distinctes :

#### **Initialisation**

La dynamique moléculaire requiert un jeu de coordonnées et vitesses initiales. La géométrie de départ utilisée provient d'une structure établie expérimentalement lorsque c'est possible, sinon elle est générée à partir du champ de force utilisé. L'énergie du système est minimisée afin d'éliminer toutes les interactions fortement défavorables, qui, si elles étaient conservées, perturberaient la simulation. Les vitesses initiales sont attribuées selon une statistique de Boltzmann.

#### **Chauffage**

La structure initiale minimisée correspond à une température au voisinage du zéro absolu. La simulation étant réalisée à température ambiante, le système est graduellement chauffé en incrémentant la température par pas de 5 à 20 K. Pour cela, l'énergie cinétique est régulièrement ajoutée au système en attribuant aléatoirement les vitesses à chaque atome. Lorsque la température désirée est atteinte, le programme bascule automatiquement en période d'équilibration. La durée de cette période dépend de la taille du système moléculaire.

### ***Equilibration***

Une fois la température d'étude atteinte, le système doit être équilibré afin d'avoir une température stable. Dans ce but, les vitesses sont périodiquement ajustées sur le critère de la température. Une fenêtre est définie autour de la température d'étude (généralement  $T$  plus ou moins 5 ou 10 K) et lorsque la température sort des bornes fixées, les vitesses sont réévaluées afin de ramener la température dans la gamme permise. Les fluctuations doivent être assez faibles pour entamer la période de production. Les petits systèmes moléculaires sont difficiles à équilibrer et de larges fluctuations sont couramment observées ( $\pm 20$  K).

### ***Production***

Une fois la phase d'équilibration achevée, on laisse le système évoluer librement sans aucune intervention sur les vitesses. L'énergie totale doit être conservée durant cette période, ce qui est le cas si le système a été chauffé suffisamment lentement et équilibré correctement. Pendant cette période les données sont enregistrées pour une analyse ultérieure ; les coordonnées cartésiennes, vitesses, termes d'énergie, température sont sauvegardés à intervalles réguliers (fréquence d'enregistrement des données choisie par l'utilisateur). La durée totale de la simulation, donnée par le nombre de pas, le pas d'intégration (1fs), est généralement gouvernée par le temps de calcul. Celui-ci augmente avec le nombre d'atomes et limite les durées de trajectoires dynamiques. En principe, la dynamique doit durer assez longtemps pour atteindre un régime de mouvement statistique.

## **3. CHAMPS DE FORCES UTILISES POUR LES HYDRATES DE CARBONES**

Les champs de forces en mécanique moléculaire ont été développés pour décrire une variété de systèmes, tels que les composés organiques, les protéines et les acides nucléiques. Cependant les caractéristiques d'un groupe fonctionnel particulier peuvent dépendre de l'environnement chimique, il n'est donc pas possible de transférer les paramètres d'énergie potentielle de mécanique moléculaire développés pour un cas spécifique à la description du même groupe dans un environnement différent. Pour cette raison, les fonctions d'énergie potentielle et les ensembles de paramètres développés pour des protéines ou pour les molécules organiques générales peuvent ne pas être appropriés pour des systèmes d'hydrate de carbone. Plusieurs fonctions d'énergie potentielle d'hydrate de carbone et/ou ensembles de paramètres sont disponibles dans la littérature. Les champs de forces suivants sont largement appliqués ou ont été conçus particulièrement pour les hydrates de carbone.

- Les champs de force MM2 et MM3 sont des champs de force de mécanique moléculaire au début conçus pour les hydrocarbures mais maintenant applicable à un éventail de



composés (Allinger, 1977, 1989, 1990), Tvaroska et Pérez (1986) ont édité une version modifiée pour des oligosaccharides appelés MM2CARB.

- Le champ de force GROMOS a été développé pour des simulations de dynamique moléculaire des protéines, nucléotides, les solutions d'hydrate de carbone polaires ou apolaires ou dans leur forme cristalline et a été modifié pour inclure l'effet exo-anomérique (Ott, 1996).
- Le champ de force CHARMM est conçu pour modéliser (mécanique et dynamique moléculaire) les systèmes macromoléculaires (Brooks, 1983), plusieurs améliorations ont été proposées pour les hydrates de carbone (Ha, 1988 ; Reiling, 1996).
- Le champ de force AMBER a été développé pour des simulations des protéines et d'acides nucléiques (Weiner, 1984). La modification de ce champ de force pour une analyse conformationnelle des oligosaccharides a été faite par (Homans, 1990) et (Glennon, 1994) et plus récemment Momany et Willet (2000), qui ont présenté un champ de force particulièrement modifié pour des liaisons  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Woods *et al.* ont développés les paramètres GLYCAM qui sont intégrables avec AMBER (Woods, 1996) pour la simulation des glycoprotéines et oligosaccharides en dynamique moléculaire.
- La version d'AMBER utilisé dans MACROMODEL (Mohamadi, 1990) a été étendue aux paramètres des hydrates de carbones et validée par calcul de l'énergie libre des sucres simples et disaccharides (Senderowitz, 1997).
- Le champ de force TRIPOS, conçu pour simuler les peptides et les petites molécules organiques (Clark, 1989) a été amélioré en rajoutant d'autres paramètres pour l'analyse conformationnelle des oligosaccharides, y compris les fragments de glycopeptides et de glycosaminoglycane sulfatés, par (Imberty, 1991, 1999) et Perez (1995) TRIPOS-PIM.

Les applications de ces champs de force et l'ensemble des paramètres à un certain nombre de cas ont donné une image cohérente entre la structure et l'énergie des molécules d'hydrates de carbone.

#### 4. ETUDE COMPUTATIONNELLE DES OLIGOSACCHARIDES

L'épitope oligosaccharidique des antigènes A, B, H et les systèmes Lewis ont été le sujet de beaucoup d'investigations structurales. Les cartes d'énergie de tous les fragments de disaccharides ont été établies par les méthodes de mécanique moléculaire (Bizik, 1995 ; Imberty, 1995). En plus de l'étude par la RMN "classique" et les études de modélisation moléculaire, certains de ces oligosaccharides ont été cristallisés.



Dès les années 1980, la modélisation indique que les oligosaccharides Lewis sont des molécules fondamentalement plus rigides que les autres saccharides (Lemieux, 1980 ; Biswas, 1980). Dans chaque molécule une forte interaction non liante se produit entre les résidus galactose et fucose, liés au résidu GlcNAc. La conclusion principale de cette première recherche était les similitudes saisissantes montrées par les trisaccharides Le<sup>a</sup> et Le<sup>x</sup> d'une part et par les tétrasaccharides Le<sup>b</sup> et Le<sup>y</sup> d'autre part. Ces similitudes peuvent être corrélées avec les similitudes précédemment rapportées des minimums globaux des disaccharides  $\beta\text{Gal}(1\rightarrow3)\beta\text{GlcNAc}$  et  $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{GlcNAc}$  (LacNAc). La seule différence résulte de la position du groupement N-acétyle selon qu'il soit d'un côté ou de l'autre de la molécule, dépendant ainsi de la liaison voisine 1-3 ou 1-4. Récemment, une exploration approfondie de l'espace conformationnel des oligosaccharides Lewis a été effectuée en utilisant l'approche CICADA (Imberty, 1995), ils ont conclu que les oligosaccharides Le<sup>a</sup> et Le<sup>b</sup> sont légèrement moins rigides que leur homologues Le<sup>x</sup>. Une étude de modélisation tenant compte de l'effet du solvant, a conclu que les oligosaccharides de Lewis, pouvant produire plusieurs conformères qui dépendent fortement du solvant (Bizik, 1996). En dépit de leur rôle biologique bien connu, la première structure cristallisée d'un antigène du groupe sanguin c'est à dire, Le<sup>x</sup>:  $(\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)[\alpha\text{Fuc}(1\rightarrow3)]\beta\text{GlcNAc})$ , a été rapporté seulement en 1996 (Perez, 1996 ; Yvelin, 1996). La molécule de Le<sup>x</sup>, aussi bien que plusieurs analogues, a été le sujet de beaucoup d'études par RMN tel que l'effet nOe (Miller, 1992), NOESY et ROESY (Poveda, 1997).

## 5. THEORIE ET METHODE

La structure du Lewis<sup>x</sup> cristallisé au sein de notre laboratoire par Yvelin en 1996 a été extraite de la banque de données cristallographique CSD (Cambridge Structural Database). Avant d'effectuer une simulation par dynamique moléculaire du dimère Lewis<sup>x</sup>, nous avons d'abord optimisé la structure par mécanique moléculaire avec le programme SYBYL 7.0 (SYBYL, 2004) utilisant le champ de force TRIPOS et les paramètres PIM (Perez, 1995), afin d'obtenir une structure de départ présentant une géométrie et une conformation convaincante pour ensuite l'utiliser en dynamique moléculaire. L'optimisation de la géométrie a été faite tout d'abord avec la méthode simplex suivie d'une optimisation de 500 itérations avec le gradient conjugué (méthode de Powell), d'une tolérance de 0.05 kcal.mol<sup>-1</sup> en utilisant les charges Gasteiger-Marsili. Le fichier mol2 contenant les charges est ensuite converti en fichier pdb afin d'être lu par les logiciels utilisés par la suite. Les calculs de dynamique moléculaire effectués dans cette thèse ont été réalisés grâce au programme AMBER V7 (Case, 2002). AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) représente un ensemble de programmes permettant d'effectuer des simulations de dynamique moléculaire. Il a été développé par Peter Albert Kollman et *al*, particulièrement pour des biomolécules. Le champ de forces utilisé dans cette étude est parm99 corrigé par Glycam 2000 (Wang, 2000 ; Woods, 1995, 2000) qui est bien adapté aux hydrates de



carbone. Le programme AMBER permet l'utilisation du modèle de solvation TIP3P (Jorgensen, 1983), et d'ajuster différents paramètres tels que la taille de la boîte périodique, le nombre de molécules de solvant, etc. Lors de notre étude nous avons utilisé 2058 molécules d'eau avec Ca<sup>2+</sup> et 1462 sans Ca<sup>2+</sup>. L'utilisation de molécules de solvant explicites augmente de façon considérable le temps de calcul d'une simulation puisque le système atteint parfois 10000 atomes. L'hydratation s'est effectuée avec l'interface graphique de Leap.

Le processus de simulation d'une dynamique moléculaire se fait avec le module SANDER du programme AMBER v7, ce processus est divisé en plusieurs étapes. Les valeurs des *cutoffs* (distance limite où les interactions de Van der Waals sont prises en compte pendant la simulation) est de 10Å.

La première étape consiste à minimiser uniquement le solvant par mécanique moléculaire utilisant l'algorithme de minimisation "steepest-descent" pendant 500 pas, suivi d'une deuxième minimisation de 500 pas avec la méthode du gradient conjugué, afin d'obtenir une meilleure diminution de l'énergie. La tolérance de gradient est de 0.0001 et les positions atomiques du soluté sont maintenues fixes avec des contraintes harmoniques de 500 Kcal/mol.

En utilisant le même nombre de pas et la même méthode que la première étape, nous effectuons dans la deuxième étape une minimisation par mécanique moléculaire sans contrainte de tout le système (solvant + soluté), et ceci dans le but de réorganiser les molécules de solvant.

La troisième étape porte sur le calcul dynamique sous de faibles contraintes sur le soluté, de l'ordre de 10 kcal/mol, où le système est chauffé de 0 à 300 K pendant 20 ps avec un temps de couplage thermique "Time for bath coupling" (tautp) de 1ps, en maintenant le volume constant (important dans le cas où on a des contraintes). Les contraintes de liaison pour les hydrogènes sont appliquées grâce à l'option SHAKE (Ryckaert, 1977, 1985), on peut donc utiliser un pas de temps de 2 fs. Le calcul électrostatique au cours de la dynamique a été effectué avec l'algorithme PME (Particle Mesh Ewald) (Darden, 1993).

La quatrième étape consiste en une dynamique du système de 2 ns par étapes successives de 100 ps (20 pas) sans contrainte, à pression constante (P= 1bar). On obtient une trajectoire complète de 2 ns et 20 ps. On ne conserve pour l'analyse que les dix dernières étapes qui correspondent à la dernière nanoseconde.

La concaténation s'effectue grâce à Ptraj et le dimère est placé systématiquement au centre de la boîte. La visualisation des trajectoires s'est faite avec le logiciel VMD (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey, 1996). L'énergie libre de la simulation est calculée en utilisant l'approche



MMGBSA (Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area) (Massova, 1999). L'énergie de solvation implicite est calculée utilisant le modèle Generalized Born (Bashford, 2000) qui est basé sur des paramètres dérivés d'AMBER (Jayaram, 1998). Le RMSD (Root Mean Square Deviation) entre deux conformations superposées est donnée par l'équation :

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \langle \Delta r^2 \rangle}$$

Où N est le nombre d'atomes et  $\Delta r^2$  l'écart quadratique moyen entre deux structures.

## 6. ANALYSES ET RESULTATS

Nous avons réalisé un calcul de deux trajectoires d'une durée de 2 ns pour le dimère Lewis X, à une température de 300 K et une pression constante d'1 bar. La première simulation a été effectuée sans ions calcium et la deuxième simulation a été réalisée en présence de 6 ions calcium et 12 ions chlorures pour neutraliser le système. Ce nombre d'ions est en accord avec les conditions expérimentales de la RMN de nos collaborateurs. L'analyse de la dynamique moléculaire s'est effectuée avec les modules CARNAL et PTRAJ du programme AMBER (Case, 1997).

### 6.1. Analyse des énergies d'interaction et détermination de la constante de dissociation

L'approche MM-GBSA (Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area) permet de calculer l'énergie libre d'interaction ou l'énergie libre absolue des molécules en solution. Le calcul s'est effectué sur le dimère en présence et en absence de calcium sur 1 nanoseconde (tableau 4).

En examinant le tableau 4, nous remarquons principalement une différence de l'énergie électrostatique. En effet la valeur  $\Delta E_{\text{elect}}$  en présence de calcium est de  $-2.47$  kcal/mol alors que sans calcium la valeur est de  $-0.48$  kcal/mol, nous déduisons que la présence de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  est favorable à l'interaction et que son effet est uniquement électrostatique. L'énergie de solvation est la même dans les deux cas étudiés, ceci nous permet de déduire que le solvant n'a pas un effet important sur la variation d'énergie.



**Tableau 4.** Energies du dimère Lewis<sup>x</sup>-Lewis<sup>x</sup> avec et sans calcium

	AVEC CALCIUM		SANS CALCIUM		DIFFERENCE ENTRE DELTA AVEC Ca <sup>2+</sup> ET DELTA SANS Ca <sup>2+</sup>
	DELTA		DELTA		
	MEAN	STD	MEAN	STD	
ELEC	<b>-2.47</b>	1.22	<b>-0.48</b>	1.19	<b>-1.99</b>
VDW	-15.02	2.06	-15.63	2.10	0.61
INT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GAS	-17.49	3.24	-16.11	3.09	-1.38
GBSUR	-2.13	0.25	-2.13	0.21	0.00
GB	12.40	2.26	13.25	2.35	-0.85
GBSOL	10.26	2.11	11.12	2.11	-0.86
GBELEC	9.93	2.10	10.77	2.18	-0.84
GBTOT	<b>-7.23</b>	2.07	<b>-4.99</b>	2.19	<b>-2.24</b>

En général le calcul d'entropie s'effectue pour des macromolécules ayant un grand degré de liberté (chaîne alcane) ou pour évaluer le mouvement important des hélices de l'ARN et de l'ADN. Nous considérons qu'il y a un faible mouvement du dimère qui se produit au cours des simulations. Aussi le calcul de l'entropie est souvent ignoré dans le cas de ligands de même taille ce qui est notre cas.

Le calcul de la constante de dissociation  $K_d$  s'effectue selon l'équation :  $\Delta G = -RT \ln (1/K_d)$

La valeur trouvée pour le dimère avec calcium est de :  $K_d = 5.47 \mu\text{M}$ .

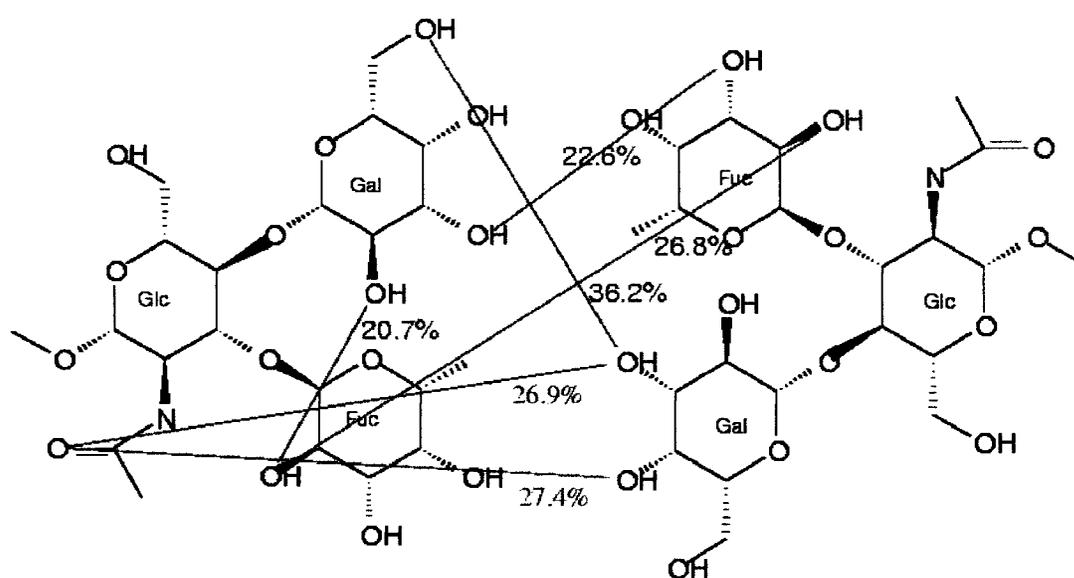
## 6.2. Analyse des liaisons hydrogènes

Les groupements hydroxyles ont une liberté de rotation élevée, et peuvent participer à la création des liaisons hydrogènes. En raison des nombreuses orientations possibles, la prévision du réseau de liaisons hydrogène est une tâche difficile.

L'analyse des liaisons hydrogènes a été réalisée avec le module CARNAL qui calcule le pourcentage de présence de liaisons hydrogènes au cours d'une simulation. La distance entre l'atome donneur et l'atome accepteur défini comme inférieur à 3.5 Å et l'angle entre le vecteur atome accepteur et l'hydrogène est inférieur à 45°. Des calculs ont été faits, en considérant l'interaction entre le monomère 1 qui joue le rôle de donneur et le monomère 2 d'accepteur et *vice versa*. D'autres calculs ont été réalisés entre l'eau et le trisaccharide. Le nombre de liaisons hydrogènes intermoléculaires sont résumés dans le tableau 5.

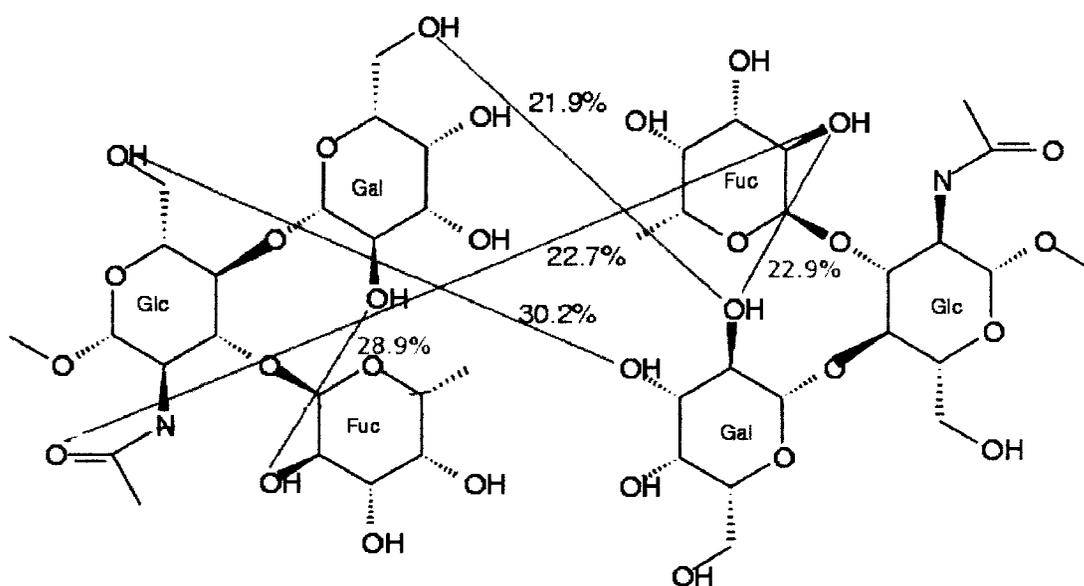
**Tableau 5.** Nombre de liaisons hydrogènes en moyenne sur une dynamique d'une durée de 1 nanoseconde.

Donneur	Accepteur	Sans Ca <sup>2+</sup>	Avec Ca <sup>2+</sup>
Monomère 1	Monomère 1	0.80	0.92
Monomère 2	Monomère 2	0.70	0.81
Monomère 1	Monomère 2	0.64	0.49
Monomère 2	Monomère 1	1.16	0.82
Somme		3.3	3.04
Dimère	Eau	8.04	8.26
Eau	Dimère	17.51	17.58



**Figure 2.** Liaisons hydrogènes en temps de vie supérieure à 20%, établies entre les deux monomères, en absence de l'ion calcium





**Figure 3.** Liaisons hydrogènes en temps de vie supérieures à 20% établies entre les deux monomères, en présence de l'ion calcium

Le pourcentage de présence des liaisons hydrogènes est différent dans les deux simulations réalisées entre le monomère 1 jouant le rôle de donneur et le monomère 2 jouant le rôle d'accepteur et *vice versa* ; ce qui n'est pas logique car la structure du dimère est symétrique. Nous supposons alors que l'exploration d'une trajectoire de 2 ns n'est pas suffisante pour observer l'inversion de comportement des deux monomères. Le tableau 5 indique qu'il y a plus de liaisons hydrogènes en absence de l'ion calcium qu'en sa présence. Ce ne sont pas les mêmes liaisons. La somme des pourcentages montre que nous sommes en présence de 1.8 liaisons hydrogènes au cours du temps sans l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  et 1.31 liaisons hydrogènes avec l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci s'explique par le fait qu'il y a des liaisons qui sont engagées avec l'ion calcium et donc diminution des liaisons hydrogènes.

Le pourcentage de présence de liaisons hydrogènes dans l'interaction entre le dimère et le solvant qu'il soit donneur ou accepteur est quasiment identique (tableau 5) ; ceci suppose que le solvant n'induit pas de modification profonde sur les liaisons hydrogènes. Ceci confirme le résultat obtenu auparavant avec le calcul d'énergie d'interaction

Nous ne pouvons pas comparer le nombre de liaisons hydrogènes car le nombre de molécules d'eau se trouvant dans la boîte de solvant est différent dans la cas où il y a présence ou absence de calcium. En effet il y a 2058 molécules d'eau avec l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  contre 1462 molécules sans l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ . La boîte est ajustée à la taille du système.

Des liaisons intramoléculaires existent entre le résidu galactose et le résidu fucose. Le pourcentage de présence est élevé en présence de calcium qu'en son absence. En effet, il y a présence de 29% d'une liaison hydrogène dans le monomère 1 entre la position 2 du fucose et la position 2 du galactose d'une durée de 290 ps. Le pourcentage de présence d'une liaison dans le monomère 2 est de 23% d'une durée de 230 ps. Tandis que sans calcium on observe une liaison intramoléculaire de 21% d'une durée de 210 ps

### 6.3. Analyse des angles glycosidiques

L'angle dièdre  $\Phi$  est défini entre les atomes [OCOC] et l'angle  $\Psi$  [COCC] (figure 4). La variation des angles glycosidiques permet d'expliquer la flexibilité des monomères. Les angles glycosidiques  $\Psi$  et  $\Phi$  explorent des régions similaires en présence et en absence de calcium.

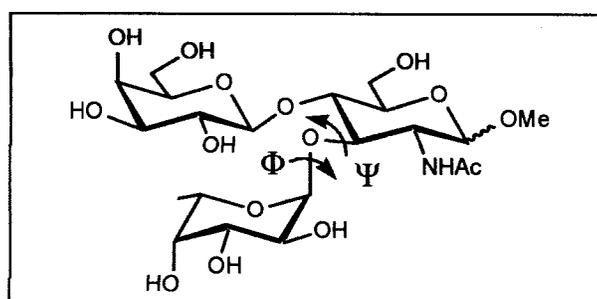


Figure 4. Les angles  $\Psi$  et  $\Phi$  dans le Trisaccharide Lewis<sup>x</sup>

L'analyse des cartes d'angles des figures 5 et 6 montre une différence de comportement des monomères 1 et 2. En effet les cartes d'angles ne sont pas identiques en présence et en absence de calcium. Il existe une région qui est explorée en présence de l'ion calcium (figure 6) alors qu'elle ne l'est pas en son absence (figure 5). En examinant cette région, nous remarquons qu'un ion calcium s'approche d'une distance de 4Å des atomes d'oxygène 3 et 4 du résidu fucose du monomère 1 (figure 7) pendant un temps de 40 ps, ce qui confère une conformation particulière au monomère 2.

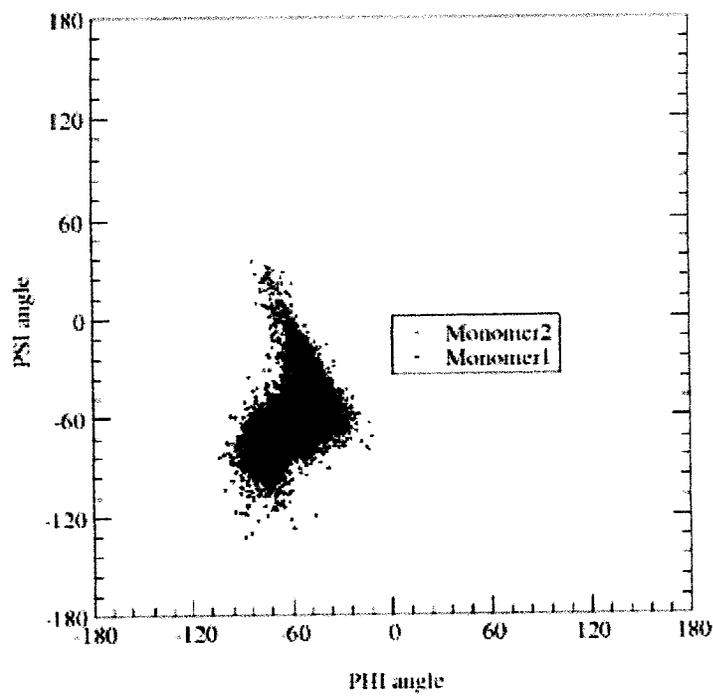


Figure 5. Variation des angles  $\Psi$  et  $\Phi$  des résidus Glucosamine-Galactose sans calcium

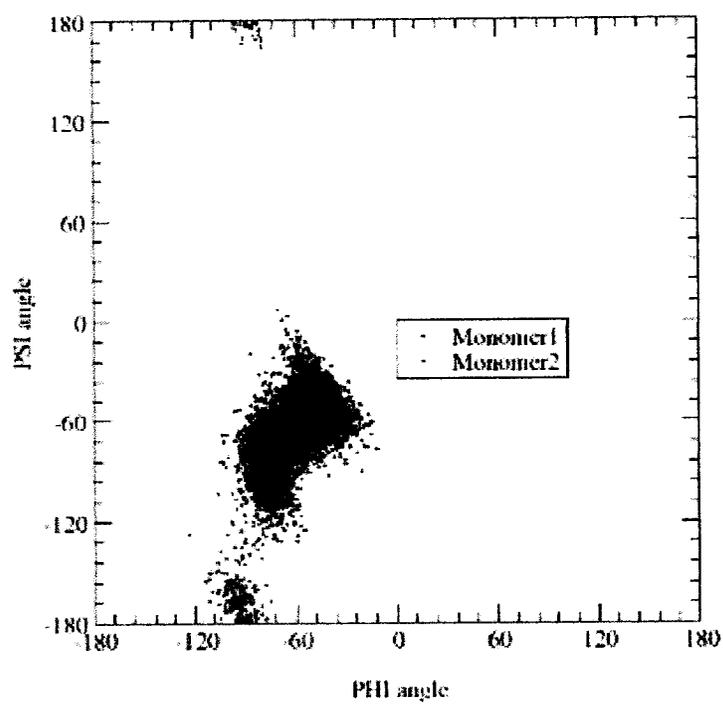
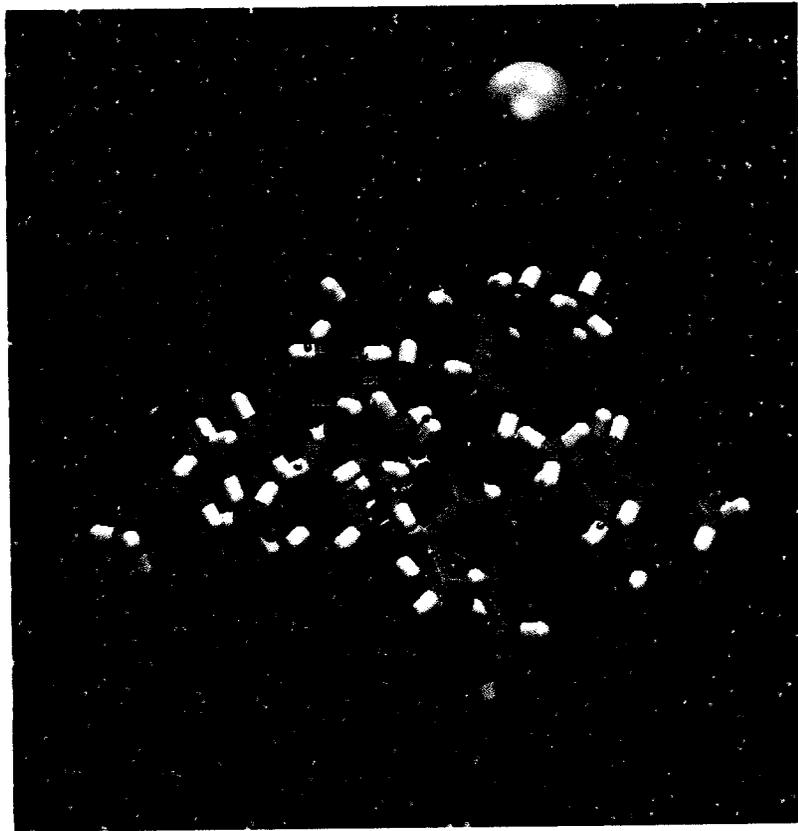


Figure 6. Variation des angles  $\Psi$  et  $\Phi$  des résidus Glucosamine-Galactose en présence de calcium





**Figure 7.** Approche du calcium du résidu fucose du monomère 1 lors des variations des angles  $\Psi$  et  $\Phi$  des résidus Glucosamine-Galactose du monomère 2

Dans le cas des variations d'angles  $\Psi$  et  $\Phi$  des résidus glucosamine et fucose du monomère 2, (figure 8 et 9), on observe le même comportement des deux monomères. Cependant, en présence de calcium il y a une région qui est explorée et montre une jonction des deux lobes (figure 8). Nous expliquons cette jonction par la formation d'un complexe du dimère en présence de calcium. En effet, à une distance de 4 Å, nous observons une approche de l'ion calcium de l'atome d'oxygène 4 du résidu galactose du monomère 1 (figure 10) pendant un temps de 40 ps.

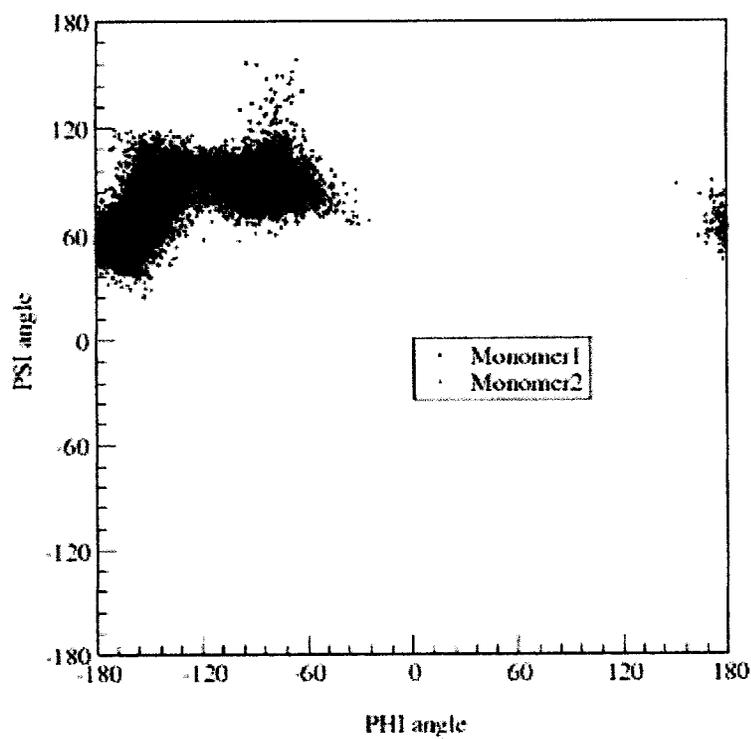


Figure 8. Variation des angles  $\Psi$  et  $\Phi$  des résidus Glucosamine-Fucose en présence de calcium

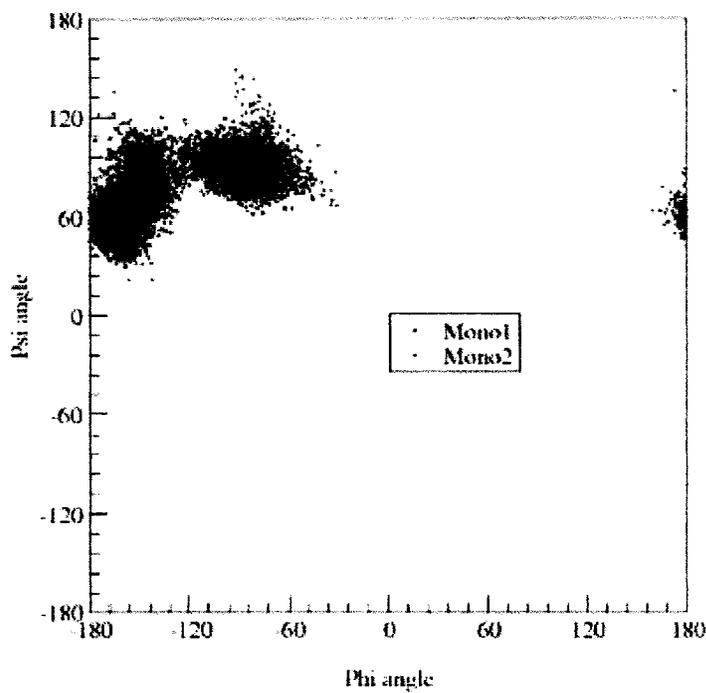
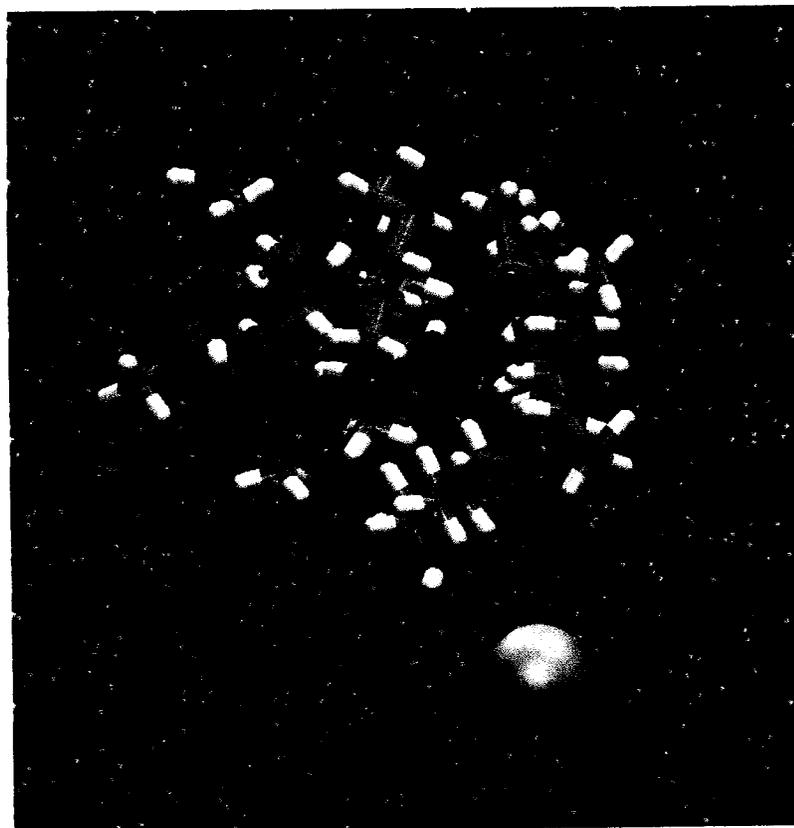


Figure 9. Variation des angles  $\Psi$  et  $\Phi$  des résidus Glucosamine-Fucose sans calcium





**Figure 10.** Approche du calcium du résidu Glactose du monomère 1 lors des variations des angles  $\Psi$  et  $\Phi$  des résidus Glucosamine-Fucose du monomère 2

L'étude de la variation des angles glycosidiques  $\Psi$  et  $\Phi$  nous permet d'affirmer qu'il y a formation de deux complexes où l'approche de l'ion  $Ca^{2+}$  d'un monomère permet à l'angle de l'autre monomère de réagir.

#### 6.4. Analyse des fluctuations RMSD pour le dimère $Lewis^x$ - $Lewis^x$

Le calcul des fluctuations RMSD de la structure permet de vérifier la stabilité structurale. Le calcul s'est effectué avec le module CARNAL.

Le graphique de l'évolution au cours du temps du RMSD par rapport à la structure de départ est représenté sur la figure 11. Ce graphique nous montre que l'équilibration du système est obtenue avec et sans ions calcium.

Tableau 6. Analyse des RMSD pour le dimère Lewis<sup>x</sup>-Lewis<sup>x</sup>

Nom	Sans Ca <sup>2+</sup>				Avec Ca <sup>2+</sup>			
	Moy	Dev	Max	Min	Moy	Dev	Max	Min
Dimère	2.241	0.817	4.563	0.466	2.814	0.637	3.908	0.409
Monomère 1	1.198	0.250	1.918	0.354	1.318	0.362	2.113	0.338
Monomère 2	1.243	0.303	2.175	0.357	1.248	0.432	2.458	0.318
Calcium					<b>17.182</b>	3.599	23.991	0.196

En examinant le tableau 6, nous remarquons que la valeur du RMSD du dimère en présence de l'ion calcium est légèrement supérieure à la valeur sans calcium. Ceci montre que le dimère possède plus de mouvement avec calcium que sans. Nous déduisons alors, que le calcium ne fige pas le dimère. Les monomères 1 et 2 ont quasiment les mêmes valeurs de RMSD en présence et en absence de l'ion Ca<sup>2+</sup>.

Le RMSD très élevé des ions calcium indique que ceux-ci n'ont pas de positions fixes mais fluctuent tout au long de la trajectoire.

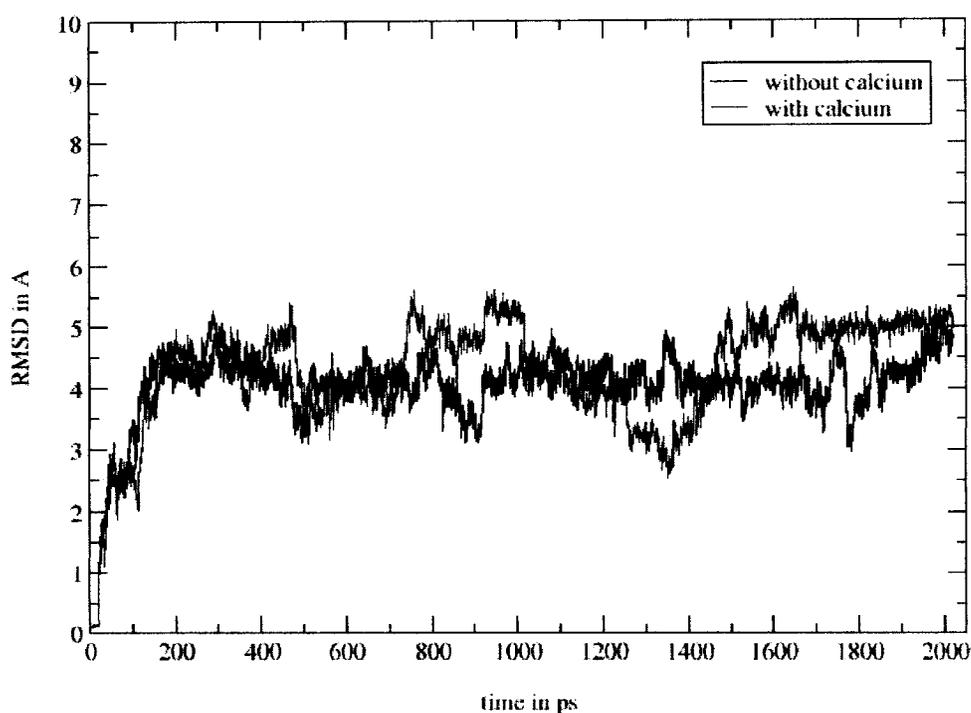
Figure 11. variation du RMSD du dimère Lewis<sup>x</sup> avec et sans ion calcium

Tableau 7. Analyse des RMSD des résidus des deux monomères 1 et 2.

Nom	Sans Calcium		Avec Calcium	
	RMS	Dev	RMS	Dev
Gal1	0.27	0.09	0.41	0.13
Glc1	0.48	0.13	0.62	0.09
Fuc1	0.31	0.05	0.27	0.06
Gal2	0.51	0.16	0.39	0.17
Glc2	0.51	0.12	0.53	0.12
Fuc2	0.31	0.06	0.30	0.06

Les valeurs des RMSD des deux monomères séparés sont présentés dans le tableau 7. Nous remarquons que les résidus fucose des deux monomères 1 et 2 (figures 12 et 13) varient dans la même gamme en présence de calcium que sans. Il est de même pour le résidu glucosamine 2 (figure 14).

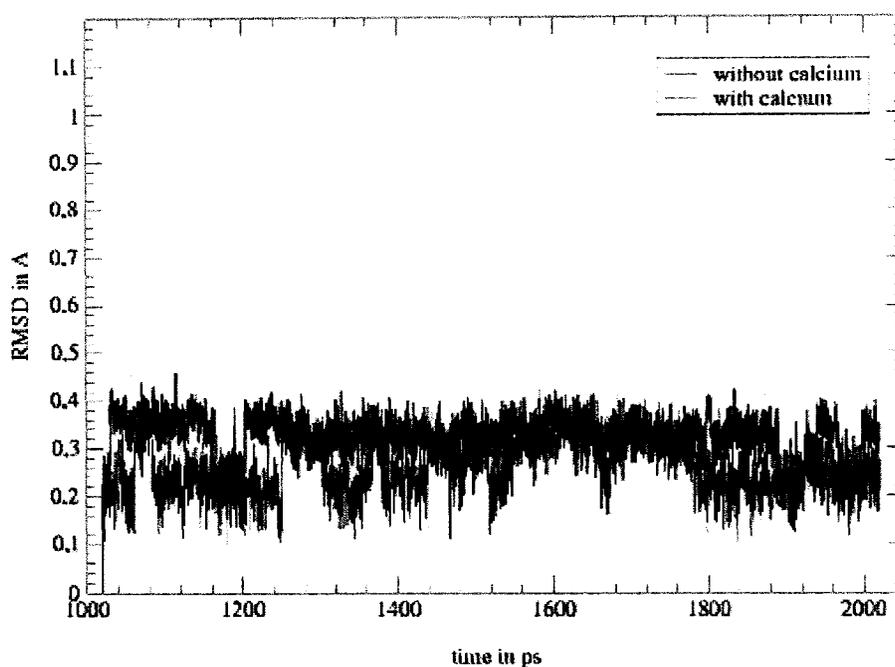


Figure 12. Variation du RMSD du résidu fucose du monomère 1 avec et sans ion calcium

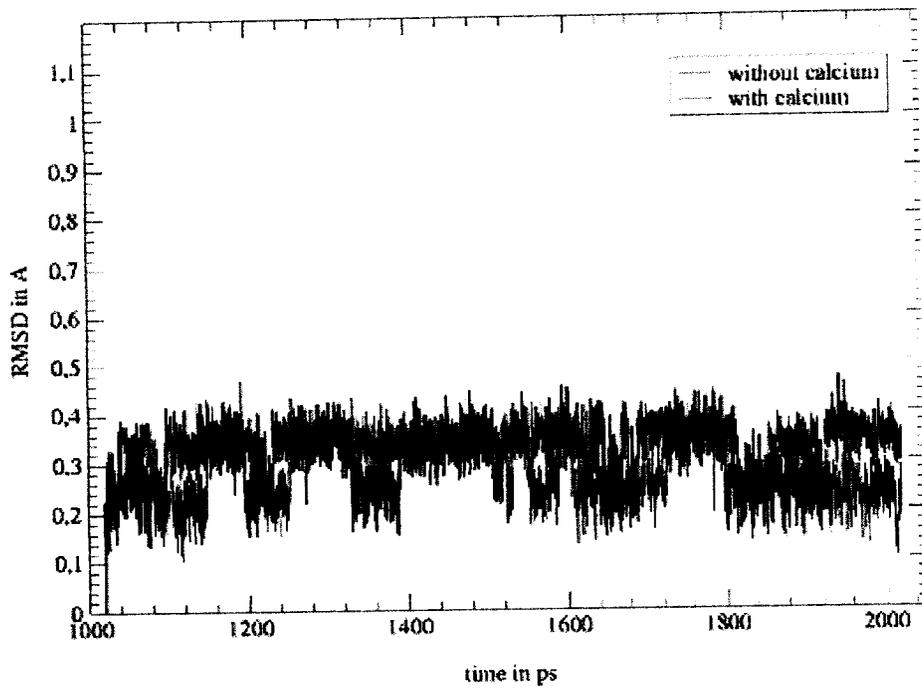


Figure 13. Variation du RMSD du résidu fucose du monomère 2 avec et sans ion calcium

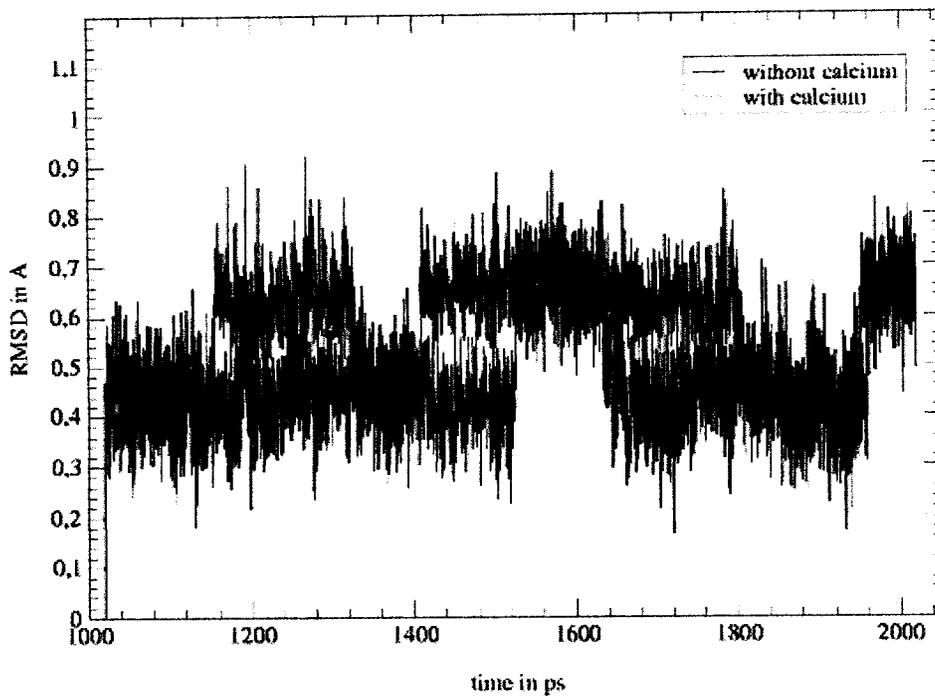


Figure 14. Variation du RMSD du résidu glucosamine du monomère 2 avec et sans ion calcium

Cependant les résidus Galactose et glucosamine du monomère 1 varient plus avec l'ion calcium que sans (figures 12 et 13) en effet les valeurs des RMSD sont très différents. Le résidu galactose

du monomère 2 (figure 15), présente un RMSD plus faible avec calcium (RMS = 0.39) que sans calcium (RMS = 0.51) (tableau 7).

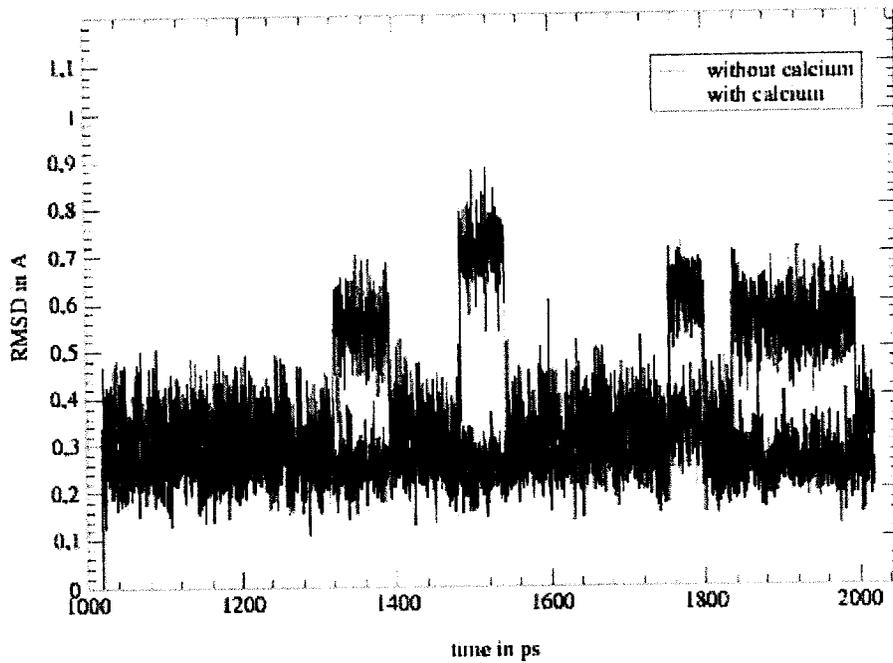


Figure 15. Variation du RMSD du résidu galactose du monomère 1 avec et sans ion calcium

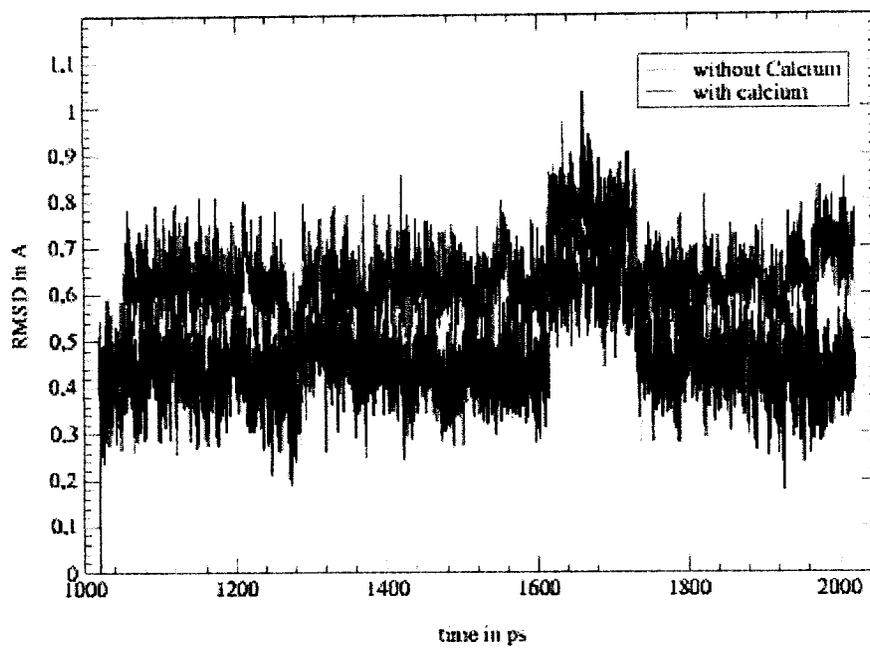
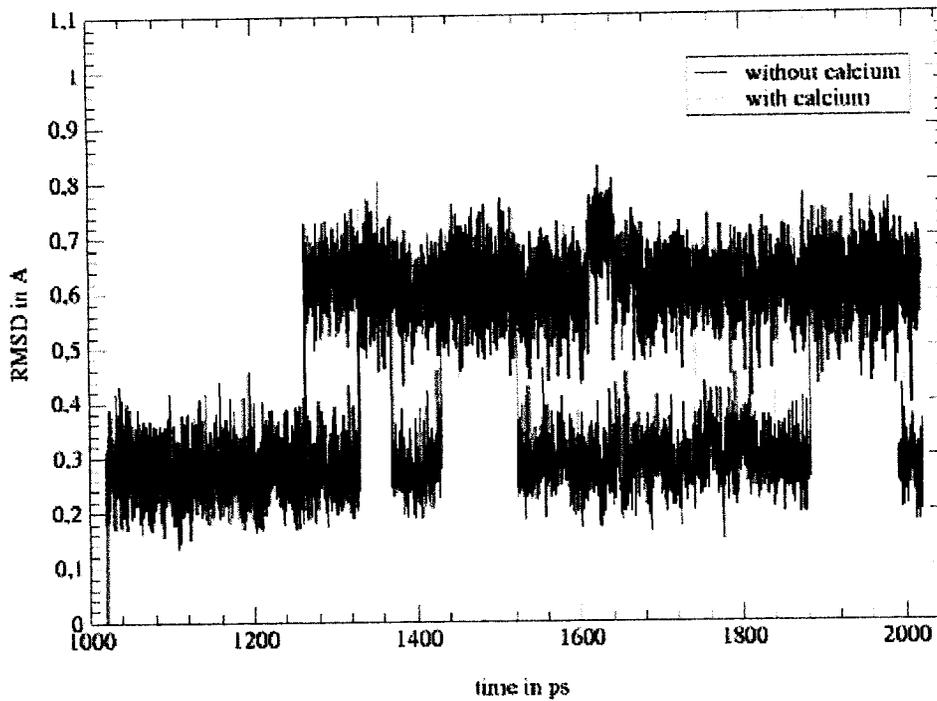


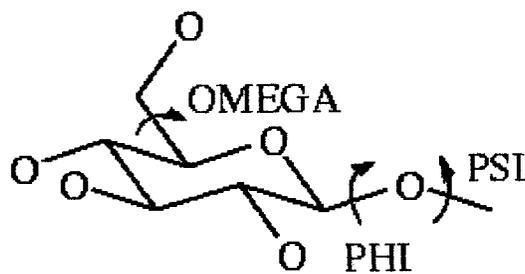
Figure 16. Variation du RMSD du résidu glucosamine du monomère 1 avec et sans ion calcium



**Figure 17.** Variation du RMSD du résidu galactose du monomère 2 avec et sans ion calcium

Ces différences de valeurs des RMSD sont dues aux variations de l'angle dièdre oméga.

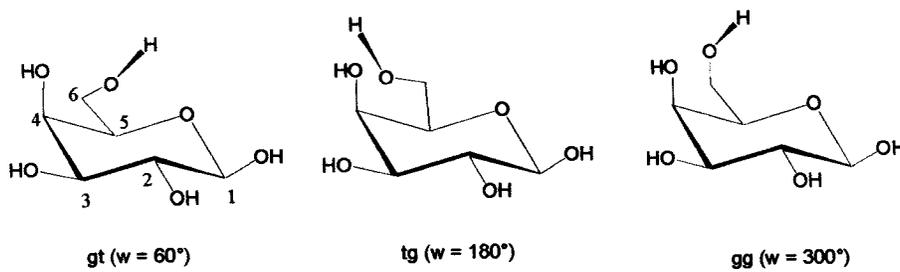
### 6.5. Analyse des RMSD et corrélation avec l'angle $\omega$



**Figure 18.** Les angles de rotation dans un saccharide

L'angle oméga (figure 18) est présent sur le résidu galactose et le résidu glucosamine. Cet angle peut prendre trois conformations définies comme gauche trans, trans gauche et gauche gauche (figure 19). Les différentes conformations en corrélation avec la variation du RMS du résidu galactose sont représentés sur la figure 20.

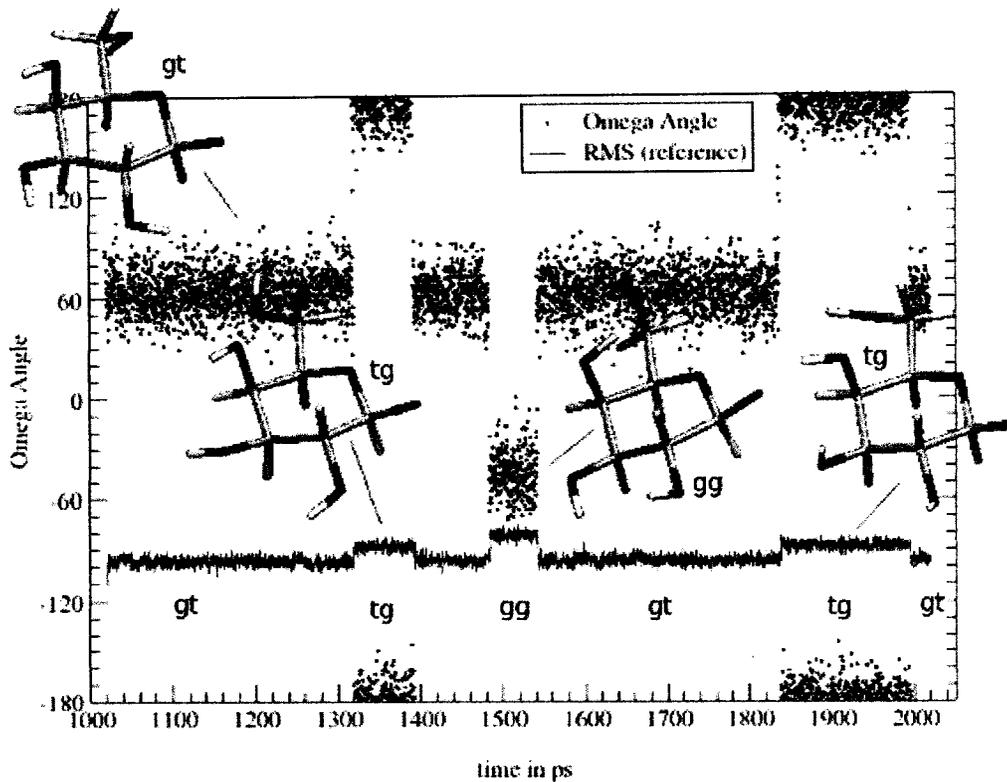




**Figure 19.** Les rotations gt, tg et gg de l'angle de torsion oméga du résidu galactose.

Les fluctuations de l'angle oméga sont beaucoup plus importantes en présence de l'ion calcium que pendant son absence. Ceci nous conduit à affirmer que le calcium est responsable de ces mouvements. L'analyse visuelle de la trajectoire ne nous permet pas de corrélérer directement ces transitions avec la présence d'un ion calcium à proximité du résidu galactose. Par contre on observe, une approche significative d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  du côté du résidu glucosamine. Nous assistons certainement à un effet électrostatique entre la glucosamine et l'ion calcium qui engendre une complète réorganisation des charges, ce qui explique ces transitions. Néanmoins, on ne peut conclure sans effectuer un calcul quantique.

L'interaction de l'ion calcium avec le résidu glucosamine ressentie sur le résidu galactose a été observée aussi dans les variations d'angles glycosidiques (avec et sans en ions  $\text{Ca}^{2+}$ ).



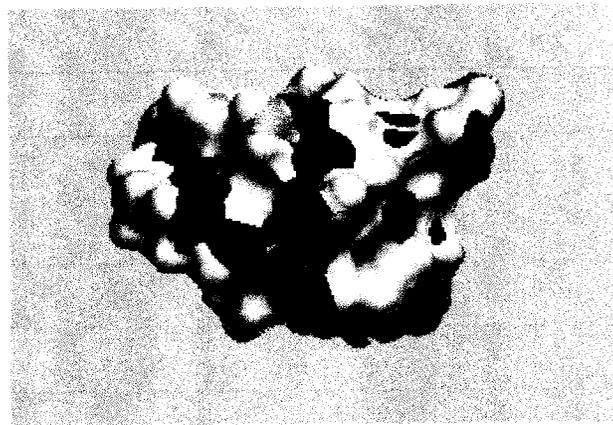
**Figure 20.** Corrélation entre l'angle  $\omega$  et le RMS du résidu galactose du monomère 1. L'échelle du RMS a été modifiée pour des raisons de lecture.

## 6.6. Analyse des distances calcium-dimère

Dans cette analyse, nous nous intéressons aux interactions électrostatiques concernant les atomes se trouvant à une distance de moins de  $10\text{\AA}$ . Durant toute la trajectoire, on n'observe pas une chélation du dimère, ce qui est cohérent avec les études expérimentales qui concluent sur un effet faible de l'ion calcium sur la dimérisation du trisaccharide  $Le^x$ .

### 6.6.1. Analyse Globale

L'analyse s'est effectuée sur le dimère  $Le^x$  qui est assimilé à une sphère de rayon  $6.4\text{\AA}$ , ce qui correspond approximativement au rayon entre le centre de gravité du dimère et l'extrémité de la structure. Les atomes d'oxygène, se situant à l'extrémité de cette sphère (figure 21) sont ceux impliqués dans l'interaction avec le calcium.



**Figure 21.** Surface accessible au solvant du dimère  $Le^x$  montrant une certaine forme sphérique

Les distances entre le centre de gravité du dimère et les six ions calciums sont calculés avec le module CARNAL. On retranche la valeur de  $6.4\text{\AA}$  de façon à avoir une approximation à peu près fidèle de la proximité des ions calcium aux extrémités du dimère.

La figure 22 représente des distances inférieures à  $10\text{\AA}$  entre les ions  $Ca^{2+}$  et la « surface » moléculaire du dimère. Cette figure montre une approche en quasi permanence d'un ion calcium, cependant on n'observe pas sur un laps de temps significatif, l'approche de deux ions  $Ca^{2+}$  simultanément. Cette approche successive d'un ion calcium nous laisse supposer que le dimère  $Le^x$  ne peut interagir qu'avec un seul calcium.

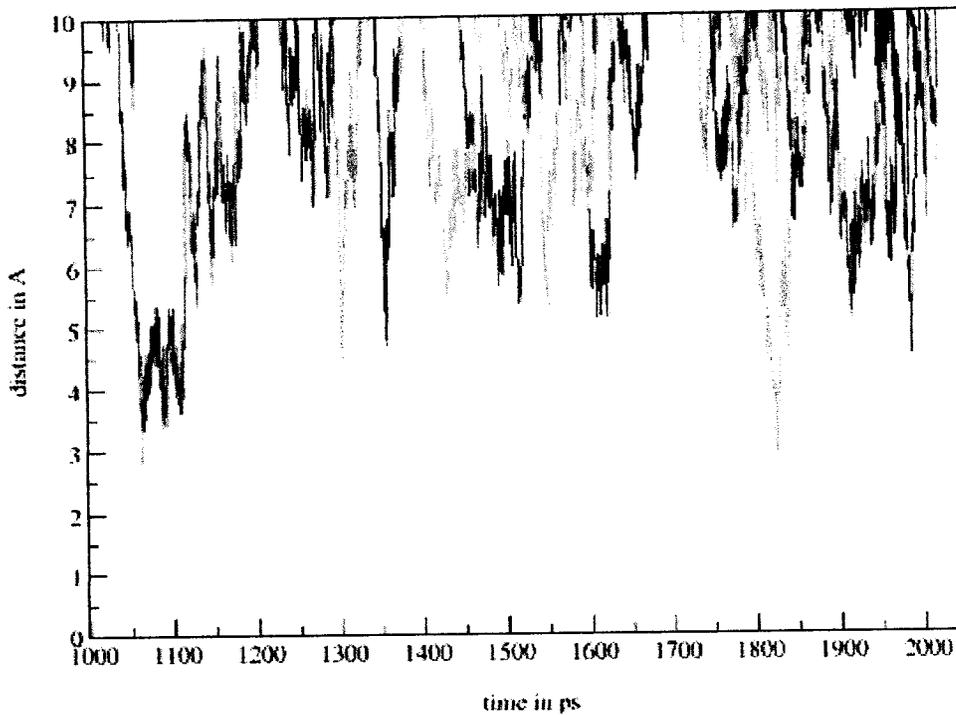
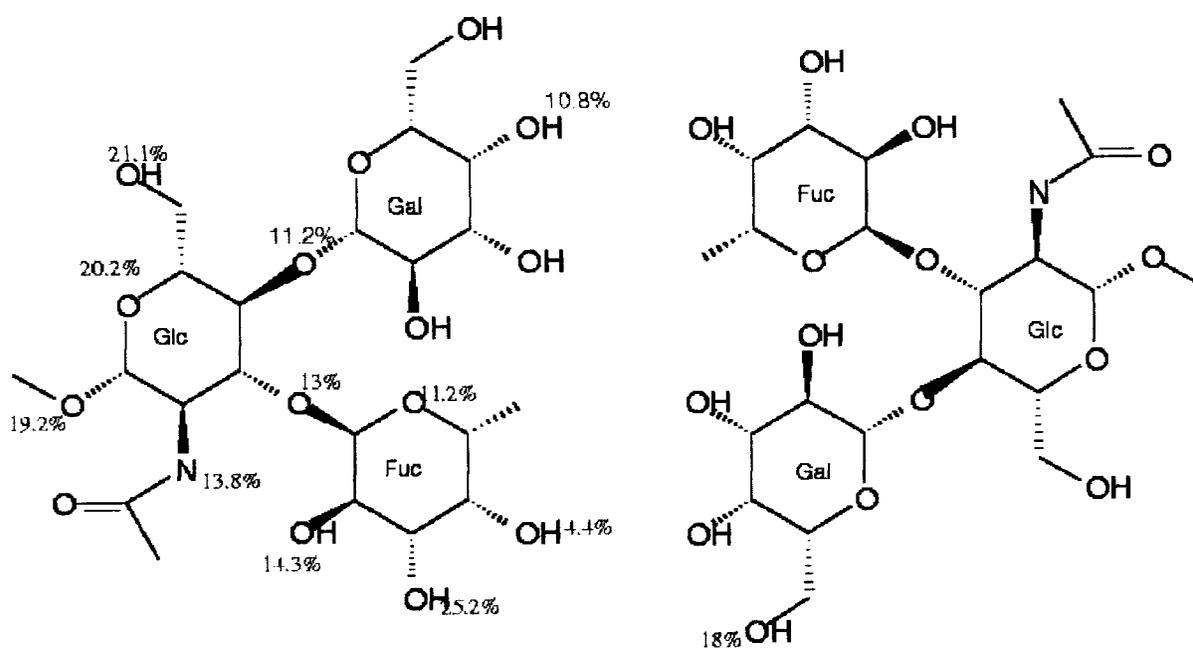


Figure 22. Distance entre le dimère et l'ion calcium en fonction du temps.

### 6.6.2. Analyse locale

L'analyse locale est réalisée en mesurant tout le long de la trajectoire les distances entre les ions calcium et les oxygènes du dimère. Ce n'est pas une tâche facile, du fait que nous sommes en présence de 6 ions  $\text{Ca}^{2+}$ , 12 ions chlorures, 2 atomes d'azote et 32 atomes d'oxygène susceptibles de créer des interactions électrostatiques. Nous mesurons le temps de présence en pourcentage, c'est à dire le pourcentage de temps sur la trajectoire où il existe une distance inférieure à  $10\text{\AA}$  entre l'atome considéré et un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . La figure 23 représente les interactions observées sur plus de 10% du temps.



**Figure 23.** Pourcentage des interactions calcium-oxygène

Nous observons que les deux monomères n'ont pas les mêmes interactions avec le calcium. Nous supposons que le temps d'exploration de la dynamique (2 nanoseconde) est insuffisant pour observer un comportement symétrique. Cette différence s'est également manifestée lors des autres analyses.

Nous remarquons que la glucosamine semble la plus impliquée avec l'ion calcium. Les oxygènes du résidu glucosamine ont tous une importance essentielle. Il en est de même pour le résidu fucose. Quant au résidu galactose, seul l'oxygène 5 et 6 forment des interactions conséquentes avec l'ion calcium. Cependant, on ne peut pas affirmer qu'un oxygène est plus important qu'un autre.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Le Lewis<sup>x</sup> est un sucre qui est présent dans la tête polaire de certains glycolipides. Des études antérieures semblaient indiquer qu'un Lewis<sup>x</sup> est capable de reconnaître un autre Lewis<sup>x</sup> en présence de calcium. Cette reconnaissance moléculaire joue un rôle important dans l'embryogenèse. En collaboration avec des physiciens, cette hypothèse a pu être vérifiée par des mesures d'adhésion spécifiques entre vésicules de lipides faites par micromanipulation. Cette adhésion n'a pas lieu avec un autre sucre pris au hasard. En effet, la mesure d'adhésion des vésicules portant un Lewis<sup>x</sup> et un Lewis<sup>a</sup> s'avère très faible (Gourier, 2005) devant celle réalisée avec la même tête polaire, c'est à dire Lewis<sup>x</sup>-Lewis<sup>x</sup>.

Afin de préciser quantitativement le caractère préférentiel de l'interaction et identifier la partie responsable de la reconnaissance homotypique nous avons modifié la molécule en des positions clefs. Ceci va nous permettre de mesurer l'effet produit sur l'énergie d'adhésion. Le pentasaccharide désoxygéné en position 3 du résidu galactose précurseur du glycolipide a été préparé pour la première fois et donc servira de mesure d'adhésion de vésicules par micromanipulation. La stratégie de synthèse étant élaborée pour les différentes désoxygénations du résidu galactose, il sera aisé de préparer les différents glycosphingolipides correspondants.

Au cours de cette synthèse, nous avons aussi pu préparer pour la première fois trois mimes trisaccharides Lewis<sup>x</sup> désoxygénés en position 3, 4 et 6 du résidu galactose dans le but de faire des études par RMN des milieux orientés qui sont en cours.

Le trisaccharide Lewis<sup>a</sup> a été préparé dans le but de faire plusieurs études biologiques qui sont en cours.

Nous avons effectué deux simulations de dynamique moléculaire dans des conditions similaires du dimère Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>), avec et sans ions calciums. Un examen visuel des trajectoires montre que le dimère existe sans calcium et que l'ajout de celui-ci n'entraîne pas de changement profond de la structure du dimère. Nous n'observons pas de chélation et les interactions du Ca<sup>2+</sup> avec le dimère sont faibles. Ces résultats sont en accords avec les données expérimentales (Miller, 1992 ; Berthault, 1996 ; Poveda, 1997 ; Geyer, 1999 ; 2000 ; Gourier 2004) obtenues précédemment.



L'approche MMGBSA permet de déterminer l'énergie libre du dimère. Elle est négative en présence ou non de calcium et montre que la dimérisation se forme plus facilement avec ce dernier. Cette analyse montre que l'interaction est purement électrostatique avec un rôle du solvant qui est identique dans les deux simulations. La constante de dissociation est de  $5,43 \mu\text{M}$  ce qui est dans la gamme des valeurs rencontrées en biologie. Cette constante est à comparer avec celles rencontrées lors de l'adhésion avec les intégrines. Par exemple, la constante de dissociation de l'intégrine  $\beta 1$  avec la fibronectine est d'environ  $0,5 \mu\text{M}$  (Vitte, 2004). Il semble donc que l'adhésion via les intégrines est dix fois plus puissante que via les Lewis<sup>x</sup>. Ce résultat nous apparaît cohérent au vu des différences de tailles des systèmes, en effet, une interaction protéine/protéine implique plus de contacts qu'une simple adhésion sucre/sucre.

L'analyse des liaisons hydrogène montre que le calcium n'engendre pas la formation de nouvelles liaisons hydrogènes. De même, le rôle du solvant est identique avec ou sans calcium. Si on s'intéresse aux liaisons hydrogènes intermoléculaires avec et sans calcium, présentent sur plus de 20% du temps, nous remarquons que le réseau semble légèrement différent.

La visualisation des variations de RMS au cours du temps montre que l'équilibration du système est atteint pour les deux simulations. Le calcium ne fige pas le dimère, au contraire le RMSD du dimère se montre légèrement plus élevé en présence d'ions calcium. Une analyse des RMSD par résidu indique que seulement les résidus galactose et la glucosamine du monomère1 montrent des variations significatives avec ou sans  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces différences de RMSD s'expliquent uniquement par une fluctuation plus importante de l'angle oméga. Une étude de dynamique moléculaire sur de longues trajectoires (50 ns) de monosaccharides (Kirschner, 2001) démontre que les transitions gt, tg et gg (figure 19) s'observent, dans l'eau seule, moins régulièrement et sur des gammes de temps plus longues que lorsque nous sommes en présence de calcium. Lors de ces transitions de l'angle oméga, un ion calcium est systématiquement proche du dimère. Cette systématique n'est pas un hasard. Étonnamment, ce n'est jamais sur le résidu où se fait la rotation de l'angle que l'approche de l'ion s'effectue mais sur un résidu voisin. Par exemple, lors de la transition gauche trans (gt) vers gauche gauche (gg) du galactose un ion calcium est proche du  $\text{OCH}_3$  de la glucosamine adjacente. Ce mouvement interne de l'angle oméga ne peut être élucidé avec nos méthodes de mécanique moléculaire. Nous avons extrait les coordonnées de chaque étape de ces transitions et une étude par mécanique quantique via la méthode DFT est en cours pour comprendre ces effets.

Puisque les interactions avec le calcium apparaissent être purement électrostatique, nous avons recherché les proximités des ions avec les atomes dimères inférieures à  $10\text{\AA}$ . En effet, l'énergie électrostatique décroît en fonction de l'inverse de la distance et donc une valeur de  $10\text{\AA}$  est raisonnable pour envisager une interaction.



Dans une première analyse nous avons observé les mouvements globaux du  $\text{Ca}^{2+}$  le long de la trajectoire. Nous avons déterminé qu'il y avait toujours un et un seul ion calcium à proximité du dimère. Effectivement, nous observons une approche successive d'un ion calcium qui s'approche puis s'éloigne tandis qu'un autre ion effectue le même mouvement. Nous pouvons conclure que le dimère Lewis<sup>x</sup> n'interagit qu'avec un seul cation.

Une analyse locale montre que le calcium s'approche en majorité vers la glucosamine et le fucose. Le galactose montre une interaction via les oxygènes O-5 et O-6. L'importance du fucose par rapport au galactose avait déjà été proposée dans le processus de dimérisation (Kojima, 1994). La mise en évidence du rôle essentiel de la glucosamine avec le calcium nous amène à penser que le lactose, qui joint la glucosamine et la céramide, a peut être un rôle important dans cette interaction. Deux simulations de dynamique moléculaire, dans les mêmes conditions, sont en cours au laboratoire avec le pentasaccharide Lewis<sup>x</sup>. Toutefois, les proximités oxygène – calcium sont assez difficiles à interpréter en terme d'importance de tel ou tel atome. En effet, tous les oxygènes du trisaccharide interviennent, un moment ou à un autre, avec le calcium ou en formant des liaisons hydrogène. Là encore, une série d'études de dynamiques moléculaires avec des désoxygénations systématiques et la détermination de chaque énergie libre est en cours de réalisation dans notre équipe.

Les variations d'angles glycosidiques et cartes d'angles dièdres sont des outils importants pour l'analyse conformationnelle des sucres. Le Lewis<sup>x</sup> apparaît comme une molécule rigide en regard d'autres mono et di-saccharides. Cette rigidité, déjà démontré expérimentalement lors d'études antérieures (Lemieux, 1980 ; Biswas, 1980 ; Imberty, 1995) est dû, d'une part, à l'encombrement stérique conséquent à la proximité des liaisons glycosidiques de la glucosamine et, d'autre part, à l'établissement de la liaison hydrogène entre les oxygènes O-2 du galactose et du fucose.

En étudiant les cartes d'angles obtenues avec et sans calcium (Chapitre 4 : figures 5, 6, 8 et 9) nous observons des zones d'angles qui ne sont rencontrées qu'en présence de ce cation. Ces zones correspondent à des conformations que prend le Lewis<sup>x</sup> uniquement avec le calcium. Sur l'ensemble de la trajectoire ces conformations s'observent trois fois. Dans un premier temps, nous étions tentés de conclure à l'existence d'un complexe, mais le temps de vie de ces conformations est trop court puisqu'il est, à chaque fois, de 40ps.

Nous émettons l'hypothèse que ces structures sont impliquées dans la transmission du signal biologique sucre/sucre. En effet, le Lewis<sup>x</sup>, a en plus de sa propriété d'adhésion, un rôle de signalisation cellulaire. Il fait nul doute que la transmission de ce signal se fait via un changement conformationnelle réversible sur un laps de temps constant. De plus, l'étude des structures de ces



conformations (Chapitre 4 : figures 7 et 10) montre l'approche importante, inférieure à 4Å, d'un ion calcium vers le résidu fucose (O-3 et O-4) ou le galactose (O-4). Il s'en suit une variation d'angle  $\Phi$  et  $\Psi$  de l'autre monomère pour les résidus Glc-Gal, pour l'approche du fucose, et Glc-Fuc, pour celle du galactose. C'est également cette influence d'une approche d'un ion sur un monomère qui influe sur la conformation de l'autre monomère qui nous autorise à penser à une forme de transduction de signal. De plus, du fait de la rigidité du trisaccharide, ces changements conformationnelles localisés seront très certainement répercutés sur la conformation du lactose adjacent. Un schéma ci-dessous de notre hypothèse illustre ceci.

L'équipe d'Hakomori a beaucoup travaillé sur la signalisation qu'induit le Lewis<sup>x</sup> en présence de calcium en lui donnant le nom explicite de glycosynapse (Hakomori, 2002). A notre connaissance ce travail est la première ébauche d'une explication moléculaire de ce concept.

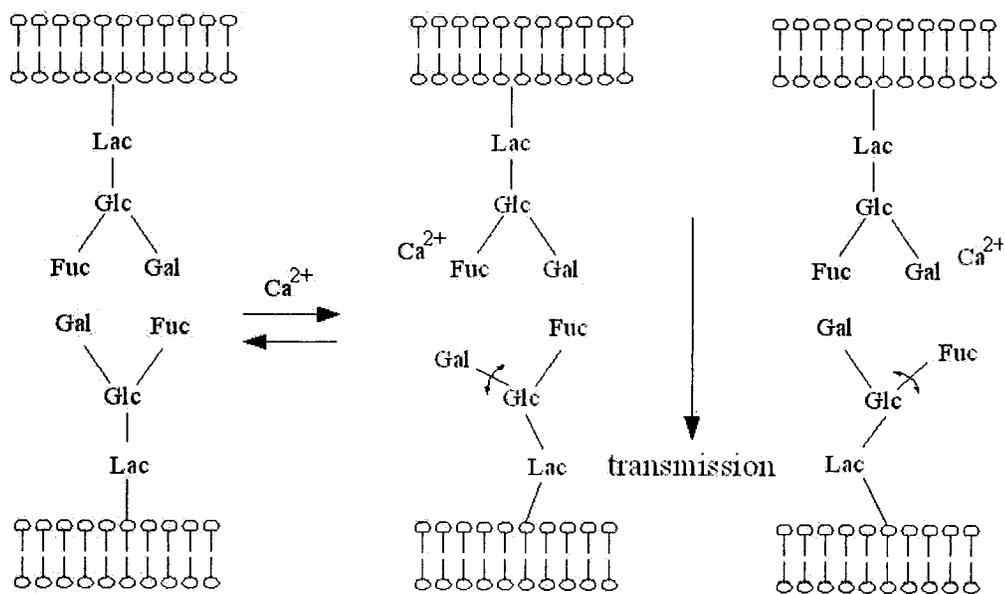


Schéma proposé pour la transmission de signal entre deux glycosphingolipides portant un trisaccharide Lewis X

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

Allinger, N. L. **1977**

*Conformational analysis.130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms.* J. Am. Chem. Soc. **99**: 8127

Allinger, N. L., *et al.* **1990**

*A molecular mechanics force field (MM3) for alcohols and ethers* J. Am. Chem. Soc. **112**: 8293

Allinger, N. L., *et al.* **1989**

*Molecular Mechanics. The MM3 Force Field for Hydrocarbons* J. Am. Chem. Soc. **111**: 8551

Appelmelk, B. J., *et al.* **2000**

*Why Helicobacter pylori has Lewis antigens* Trends Microbiol. **8**: 565-70

Appelmelk, B. J., *et al.* **2000**

*H pylori and Lewis antigens* Gut **47**: 10-1

Asnani, A., *et al.* **2003**

*Synthesis of Lewis X trisaccharide analogues in which glucose and rhamnose replace N-acetylglucosamine and fucose, respectively* Carbohydr. Res. **338**: 1045-54

Axford, J. **1997**

*Glycobiology and medicine: an introduction* J. R. Soc. Med. **90**: 260-4

Azurmendi, H. F., *et al.* **2002**

*Conformational studies of Lewis X and Lewis A trisaccharides using NMR residual dipolar couplings* Biopolymers **63**: 89-98

### B

Baker, B. R., *et al.* **1954**

*Puromycin.Synthetic studies.V.6-dimethylamino-9-(2'-acetamino-beta-D-glucopyranosyl)purine.* J. Org. Chem. **19**: 1786

Banoub, J. **1992**

*Synthesis of oligosaccharides of 2-Amino-2-deoxy Sugars* Chem. Rev. **92**: 1167



- Barili, P. L., *et al.* **1986**  
*New results in the isopropylideneation of galactopyranosides. Useful intermediates for the synthesis of galactose derivatives.* Tetrahedron **27**: 2307
- Barton, D. H. R., *et al.* **1975**  
*A new method for the deoxygenation of secondary alcohols* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 1574
- Bashford, D., *et al.* **2000**  
*Generalized born models of macromolecular solvation effects* Annu. Rev. Phys. Chem. **51**: 129-52
- Beckwith, A. L. J., *et al.* **2004**  
*The Mechanism of Bu<sub>3</sub>SnH-Mediated Homolytic Aromatic Substitution* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **116**: 97
- Berthault, P., *et al.* **1996**  
*Solution structure of a Lewis(x) analogue by off-resonance <sup>1</sup>H NMR spectroscopy without use of an internal distance reference* J. Biomol. NMR **8**: 23-35
- Biswas, M., *et al.* **1980**  
*Conformational analysis of the milk oligosaccharides* Biopolymers **19**: 1555-66
- Bizik, F., *et al.* **1995**  
*Conformational analysis of disaccharide fragments of blood group determinants in solution by molecular modeling* Chem. Pap. **49**: 202-14
- Bizik, F., *et al.* **1996**  
*On the flexibility of the Lewis<sup>x</sup>, Lewis<sup>a</sup>, sialyl Lewis<sup>x</sup>, sialyl Lewis<sup>a</sup> oligosaccharides. Conformational analysis in solution by molecular modeling* Chem. Pap. **50**: 84-96
- Boons, G. J. **1996**  
*Strategies in oligosaccharide synthesis* Tetrahedron **52**: 1095
- Boubelik, M., *et al.* **1998**  
*Lex glycosphingolipids-mediated cell aggregation* Glycobiology **8**: 139-46
- Bowers, S. G., *et al.* **1998**  
*Application of 2,5-Dimethylpyrrole group as a new and orthogonal amine-protecting group in oligosaccharide synthesis* J. Org. Chem **63**: 4570
- Brégant, S., Zhang, Y., Mallet, J. M., Brodzki, A., Sinaÿ, P. **2000**  
*Synthesis of a neoglycolipid: a model for study of carbohydrate-carbohydrate interaction* Glycoconjugate J. **16**: 757
- Brimacombe. **1972**  
*Alkylation of monosaccharides using sodium hydride* Methods Carbohydr. Chem. **VI**: 376



Brooks, B., *et al.* **1983**

*CHARMM: A program for macromolecules energy, minimization, and dynamics calculations*  
J. Comput. Chem **4**: 187-217

## C

Case, D. A. **2002**

*Amber 7* University of California, San Francisco

Catelani, G., *et al.* **1988**

*An improved preparation of 3,4-O-isopropylidene derivatives of alpha and beta D-galactopyranosides* Carbohydr. Res. **182**: 297

Chowdhury, U. S. **1996**

*Synthesis of a versatile tetrasaccharide of sialyl Le X and Le X antigens* Tetrahedron **52**: 12775

Cicero, D., *et al.* **1990**

*Synthesis of furanoid and pyranoid derivatives of 6-deoxy-4-thio-D-galactose* Tetrahedron **46**: 1131

Clark, M., *et al.* **1989**

*Validation of the general purpose Tripos 5.2 Force field* J. Comput. Chem. **10**: 982-1012

Classon, B., *et al.* **1989**

*Syntheses of p-trifluoroacetamidophenyl 3-O-[2-acetamido-2-deoxy-3-O-(alpha-L-fucopyranosyl)-beta-D-glucopyranosyl]-beta-D-galactopyranoside and of p-trifluoroacetamidophenyl 3-O-[2-acetamido-2-deoxy-3-O-(alpha-L-fucopyranosyl)-4-O-(beta-D-galactopyranosyl)-beta-D-glucopyranosyl]-beta-D-galactopyranoside, A trisaccharide and a tetrasaccharide fragment of the Le<sup>x</sup> tumour-associated antigen.* J. Carbohydr. Chem. **8**: 543

Cordon-Cardo, C., *et al.* **1986**

*Immunohistologic expression of blood-group antigens in normal human gastrointestinal tract and colonic carcinoma* Int. J. Cancer **37**: 667-76

## D

Darden, T., *et al.* **1993**

*Particle mesh Ewald: an N.log(N) method for Ewald sums in large systems* J. Chem. Phys. **98**: 10089-92

Das, S. K., *et al.* **2003**

*A mild and convenient indium (III) chloride-catalyzed synthesis of thioglycosides* Carbohydr. Res. **338**: 2237



- David, S., *et al.* **1985**  
*Regioselective manipulation of hydroxyl groups via organotin derivatives* Tetrahedron **41**: 643
- Davis, B. G. **2000**  
*Recent developments in oligosaccharide synthesis* J. Chem. Soc., Perkin Trans.1: 2137
- Debenham, J., *et al.* **1997**  
*Recent advances in N-protection for amino sugar synthesis* Liebigs Ann. Chem: 791
- Dejter-juszynski, M., *et al.* **1971**  
*Studies on the koenigs-Knorr reaction. Part II. Synthesis of an alpha-L-linked disaccharide from tri-O-benzyl-alpha-L-fucopyranosyl bromide* Carbohydr. Res. **18**: 219
- Dejter-juszynski, M., *et al.* **1973**  
*Studies on the koenigs-knorr reaction. Part IV: The effect of participating groups on the stereochemistry of disaccharide formation* Carbohydr. Res. **28**: 61
- DeNinno, M. P., *et al.* **1995**  
*A method for the selective reduction of carbohydrate 4,6-O-benzylidene acetals* Tetrahedron Letters **36**: 669
- Deslongchamps, P. **1975**  
*Stereoelectronic control in the cleavage of tetrahedral intermediates in the hydrolysis of esters and amides* Tetrahedron **31**: 2463
- Dwek, R. A. **1995**  
*Glycobiology: "towards understanding the function of sugars"* Biochem. Soc. Trans **23**: 1-25
- E**
- Eggens, I., *et al.* **1989**  
*Specific interaction between Lex and Lex determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells* J. Biol. Chem. **264**: 9476-84
- Esnault, J., *et al.* **2001**  
*New Highly Hydrophobic Lewis x glycolipids: Synthesis and monolayer behaviour* Eur. J. Org. Chem. 253-60
- F**
- Fenderson, B. A., *et al.* **1984**  
*A multivalent lacto-N-fucopentaose III-lysyllysine conjugate decompacts preimplantation mouse embryos, while the free oligosaccharide is ineffective.* J. Exp. Med. **160**: 1591
- Fernandez-Mayoralas, A., *et al.* **1989**  
*Convenient synthesis of substituted pyranoid glycals from thiophenyl glycosides and glycosyl phenylsulfones* Tetrahedron Letters **30**: 2537



Ferrier, R. J., *et al.* **1976**

*Synthesis of 1,2-trans-related 1-thioglycoside esters* Carbohydr. Res. **52**: 63

Ferrier, R. J., *et al.* **1980**

*1,2-Trans-1-Thioglycosides*. Methods Carbohydr. Chem. **VIII**: 251

Flowers, H. M. **1971**

*Studies on the Koenigs-Knorr reaction. Part I. Synthesis of 6-O-alpha-D-glucopyranosyl-D-galactose and 3-O-alpha-D-glucopyranosyl-D-galactose* Carbohydr. Res. **18**: 211

Fügedi, P., *et al.* **1987**

*Thioglycosides as glycosylating agents in oligosaccharide synthesis*. Glycoconjugate J. **4**: 97

## G

Garegg, P. **1984**

*Some aspects of regio-, stereo-, and chemoselective reactions in carbohydrate chemistry* Pure & Appl. Chem. **56**: 845

Garegg, P., *et al.* **1981**

*A novel, reductive ring-opening of carbohydrate benzylidene acetals, with unusual regioselectivity* Carbohydr. Res. **93**: C10

Garegg, P., *et al.* **1982**

*A novel, reductive ring-opening of carbohydrate benzylidene acetals* Carbohydr. Res. **108**: 97

Garegg, P., *et al.* **1979**

*Improved synthesis of 3,4,6-tri-O-benzyl-alpha-D-mannopyranosides* Acta Chem. Scan. B **33**: 39

Garegg, P., *et al.* **1985**

*Synthesis of 6- and 6'-deoxy derivatives of methyl 4-O-alpha-D-galactopyranosyl-beta-D-galactopyranoside for studies of inhibition of pyelonephritogenic fimbriated E. coli adhesion to urinary epithelium-cell surfaces* Carbohydr. Res. **137**: 270

Garegg, P., *et al.* **1980**

*Novel reagent system for converting a hydroxy-group into an iodo-group in carbohydrate with inversion of configuration* J. Chem. Soc., Perkin Trans.1: 2866

Gege, C., *et al.* **2002**

*Carbohydrate-carbohydrate recognition between Lewis X blood group antigens, mediated by calcium ions* Eur. J. Org. Chem. **15**: 2475

Geyer, A., *et al.* **1999**

*Carbohydrate-carbohydrate recognition between Lewis X glycoconjugates*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **38**: 1466



Geyer, A., *et al.* **2000**

*Calcium-Dependent Carbohydrate-Carbohydrate Recognition between Lewis(X) Blood Group Antigens This research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Fonds der Chemischen Industrie* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **39**: 3245-9

Glennon, T., *et al.* **1994**

*A force field monosaccharides and (1-4) linked polysaccharides.* J. Comput. Chem. **15**: 1019

Gourier, C., *et al.* **2004**

*Specific and non specific interactions involving Le( X ) determinant quantified by lipid vesicle micromanipulation* Glycoconjugate J. **21**: 165-74

Gourier, C., *et al.* **2005**

*The Natural Lewis  $\alpha$ -Bearing Lipids Promote membrane Adhesion. Influence of Ceramide on Carbohydrate-Carbohydrate Recognition* Angew Chem. Int. Ed. Engl.

## H

Ha, S. N., *et al.* **1988**

*A revised potential-energy surface for molecular mechanics studies of carbohydrates* Carbohydr. Res. **180**: 207

Hakomori, S. **1991**

*New directions in cancer therapy based on aberrant expression of glycosphingolipids: anti-adhesion and ortho-signaling therapy* Cancer Cells **3**: 461-70

Hakomori, S. **2002**

*Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**: 10231-3

Hakomori, S. **2002**

*Inaugural Article: The glycosynapse* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**: 225-32

Hakomori, S. **2003**

*Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane* Curr. Opin. Hematol. **10**: 16-24

Hakomori, S., *et al.* **1997**

*Glycosphingolipid antigens and cancer therapy* Chem. Biol. **4**: 97-104

Hasegawa, A., *et al.* **1991**

*A facile, large-scale preparation of the methyl 2-thioglycoside of N-acetylneuraminic acid, and its usefulness for the alpha-stereoselective synthesis of sialoglycosides* Carbohydr. Res. **212**: 277-81

Hecht, S. M. **1999**

*Bioorganic chemistry carbohydrates* 1-624



- Hendrix, M., Wong, C. H. **1996**  
*A chemoenzymatic approach to carbohydrate-cell mediated cell adhesion* Pure & Appl. Chem. **68**: 2081
- Henry, B., *et al.* **1999**  
*NMR study of a Lewis(X) pentasaccharide derivative: solution structure and interaction with cations* Carbohydr. Res. **315**: 48-62
- Hindsgaul, O., *et al.* **1982**  
*Synthesis of type 2 human blood-group antigenic determinants. The H, X, and Y haptens and variations of the H type 2 determinant as probes for the combining site of the lectin I of Ulex europaeus* Carbohydr. Res. **109**: 109-42
- Hirano, S. **1971**  
*Some phthaloyl derivatives of 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose* Carbohydr. Res. **16**: 229
- Homans, S. W. **1990**  
*A molecular mechanical force field for the conformational analysis of oligosaccharides: comparison of theoretical and crystal structures of Man alpha1-3Man beta1-4 GlcNAc* Biochemistry **29**: 9110
- Hotta, K., *et al.* **1994**  
*Synthetic studies on sialoglycoconjugates 54: Synthesis of I-active ganglioside analog* J. Carbohydr. Chem. **13**: 175
- Hudson, C. S., *et al.* **1915**  
*Conversion of galactose pentacetate to an isomeric form* J. Org. Chem. **37**: 1589
- Hummel, G., *et al.* **1997**  
*A versatile synthesis of the lactoneo-series antigens- Synthesis of sialyl dimer Lewis X and of dimer Lewis Y* Tetrahedron Letters **38**: 1173-6
- Humphrey, W. *et al.* **1996**  
*VMD: visual molecular dynamics* J. Mol. Graph. **14**: 33-8, 27-8
- I**
- Imberty, A. **1999**  
*Perspectives in structural biology* Eds., Indian Academy of Sciences and Universities Press: Hyderabad 392-409
- Imberty, A., *et al.* **1991**  
*Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A* Glycobiology **1**: 631-42

Imberty, A., *et al.* **1995**

*Computer simulation of histo-blood group oligosaccharides: energy maps of all constituting disaccharides and potential energy surfaces of 14 ABH and Lewis carbohydrate antigens* Glycoconjugate J. **12**: 331-49

Imberty, A., *et al.* **2000**

*Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations* Chem. Rev. **100**: 4567-88

## J

Jain, R. K., *et al.* **1992**

*Synthesis of oligosaccharides containing the Lewis X-antigenic trisaccharide ( $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-GlcpNAc) at their nonreducing ends* Carbohydr. Res. **226**: 91-100

Jain, R. K., *et al.* **1996**

*Selectin ligands: 2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-pivaloyl- $\alpha$ /beta-galactopyranosyl halide as novel glycosyl donor for the synthesis of 3-O-sulfo Le<sup>x</sup> and Le<sup>a</sup> type structures.* Chemical communications: 65

Jain, R. K., *et al.* **1994**

*Total synthesis of 3'-O-sialyl, 6'-O-sulfo Lewis X, NeuAc- $\alpha$ 2-3(6-O-SO<sub>3</sub>Na)Gal $\beta$ 1-4(Fuc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc- $\beta$ -OMe : A major capping group of GLYCAM-I* J. Am. Chem. Soc **116**: 12123-4

Janczuk, A. J., *et al.* **2002**

*The synthesis of deoxy- $\alpha$ -Gal epitope derivatives for the evaluation of an anti- $\alpha$ -Gal antibody binding* Carbohydr. Res. **337**: 1247-59

Jansson, K., *et al.* **1988**

*2-(Trimethylsilyl)ethyl Glycoside. synthesis, anomeric deblocking, and transformation into 1,2-trans 1-O-acyl sugars* J. Org. Chem. **53**: 5629

Jaquinet, J., *et al.* **1979**

*Synthesis of blood group substances. Part 7. Synthesis of the branched trisaccharide O- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose* J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1: 314

Jaquinet, J., *et al.* **1979**

*Synthesis of blood group substances. Part 8. A synthesis of the branched trisaccharide 2-acetamido-2-deoxy-4-( $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-D-glucopyranosyl* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 319

Jayaram, B., *et al.* **1998**

*Solvation free energy of biomacromolecules: Parameters for a Modified Generalized Born Model Consistent with the AMBER Force Field* J. Phys. Chem. B. **102**: 9571-76



Jorgensen, W. L., *et al.* **1983**

*Comparison of simple potential functions for simulating liquid water* J. Chem. Phys. **79**: 926

## K

Kanie, O., *et al.* **1994**

*Orthogonal glycosylation strategy in oligosaccharide synthesis* J. Am. Chem. Soc. **116**: 12073

Kanie, O., *et al.* **1996**

*Orthogonal glycosylation strategy in synthesis of extended blood group B determinant* Tetrahedron Letters **37**: 4551

Kannagi, R., *et al.* **1983**

*New globoseries glycosphingolipids in human teratocarcinoma reactive with the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, stage-specific embryonic antigen 3* Journal of biological chemistry **258**: 8934

Khan, M. N. **1995**

*Kinetic evidence for the occurrence of a stepwise mechanism in hydrazinolysis of phthalimide* J. Org. Chem. **60**: 4536

King, J. F., *et al.* **1970**

*Remarkable stereoselectivity in the hydrolysis of dioxolenium ions and orthoesters fused to anchored six-membered rings* Can. J. Chem. **48**: 1754

Kirschner, K. N., *et al.* **2001**

*Solvent interactions determine carbohydrate conformation* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **98**: 10541-5

Koenigs, W., *et al.* **1901**

*Ueber einige derivate des traubenzuckers und der galactose* Chemische Berichte **34**: 957

Kojima, N., *et al.* **1994**

*Further studies on cell adhesion based on Le(x)-Le(x) interaction, with new approaches: embryoglycan aggregation of F9 teratocarcinoma cells, and adhesion of various tumour cells based on Le(x) expression* Glycoconjugate J. **11**: 238-48

Kojima, N., *et al.* **1989**

*Specific interaction between gangliosylceramide (Gg3) and sialosylactosylceramide (GM3) as a basis for specific cellular recognition between lymphoma and melanoma cells* J. Biol. Chem. **264**: 20159-62

Kojima, N., *et al.* **1992**

*Cell adhesion in a dynamic flow system as compared to static system* J. Biol. Chem. **267**: 17264



Koshy, K. M., *et al.* **1999**

*Divalent cation-mediated interaction between cerebroside sulfate and cerebroside: an investigation of the effect of structural variations of lipids by electrospray ionization mass spectrometry* Biophys. J. **77**: 306-18

Kristen, H., *et al.* **1988**

*Introduction of a new selective oxidation procedure into carbohydrate chemistry-An efficient conversion of D-galactose into L-fucose.* J. Carbohydr. Chem. **7**: 277

## L

Lemieux, R. U., *et al.* **1982**

*Syntheses of derivatives of lacto-N-biose. 1,4,6-Di-O-acetyl-3-(tetra-O-acetyl-beta-D-galactopyranosyl)-2-deoxy-2-phthalimido-alpha, beta-D-glucopyranosyl chloride* Can. J. Chem. **60**: 58

Lemieux, R. U., *et al.* **1980**

*The conformations of oligosaccharides related to the ABH and Lewis human blood group determinants* Can. J. Chem. **58**: 631

Lemieux, R. U., *et al.* **1975**

*The chemical synthesis of 2-O-(alpha-L-fucopyranosyl)-3-O-(alpha-D-galactopyranosyl)-D-galactose. The terminal structure of the blood-group B Antigenic determinant* J. Am. Chem. Soc. **97**: 4069

Lemieux, R. U., *et al.* **1976**

*Synthesis of 2-Amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranosides* ACS Symp. Ser. **39**: 90-115

Lindberg, J., *et al.* **2002**

*Synthesis of galactoglycerolipids found in the HT29 human colon carcinoma cell line* Tetrahedron **58**: 5109

Lönn, H. **1985**

*Synthesis of a tetra- and a nona-saccharide which contain alpha-L-fucopyranosyl groups and are part of the complex type of carbohydrate moiety of glycoproteins.* Carbohydr. Res. **139**: 115

Lönn, H. **1985**

*Synthesis of a tri- and a hepta-saccharide which contain alpha-L-fucopyranosyl groups and are part of the complex type of carbohydrate moiety of glycoproteins* Carbohydr Res **139**: 105

Lubineau, A., *et al.* **1993**

*First synthesis of the 3' sulfated Lewis A, putative ligand for the leucocyte homing receptor* J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1419-20

Lubineau, A., *et al.* **1994**

*First synthesis of the 3' sulfated Lewis A pentasaccharide, The most potent human E-selectin ligand so far* Bioorganic & Medicinal Chemistry **2**: 1143-51



Lubineau, A., *et al.* **1994**

*Regioselective sulfation of galactose derivatives through the stannylene procedure. New synthesis of the 3'-O- sulfated Lewis A trisaccharide* Tetrahedron Letters **35**: 8795-6

## M

Mandel, U., *et al.* **1991**

*Lewis blood group antigens in salivary glands and stratified epithelium: lack of regulation of Lewis antigen expression in ductal and buccal mucosal lining epithelia* Vox Sang **61**: 205-14

März, J., *et al.* **1992**

*Synthesis of selectively deprotectable asparagine glycoconjugates with a Lewis A antigen side chain.* Synlett: 589

Massova, I. *et al.* **1999**

*Computational alanine scanning to probe protein-protein interactions: A novel approach to evaluate binding free energies* J. Am. Chem. Soc. **121**: 8133-43

McEver, R. P., *et al.* **1995**

*Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions* J. Biol. Chem **270**: 11025

McGarvey, G. J., *et al.* **1997**

*Chemical, enzymatic and structural studies in molecular glycobiology* Liebigs Ann. Chem. 1059

Miller, K. E., *et al.* **1992**

*Solution structure of the Lewis X oligosaccharide determined by NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations* Biochemistry **31**: 6703-9

Mohamadi, F., *et al.* **1990**

*MacroModel - An integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics* J. Comput. Chem. **11**: 440

Momany, F. A., *et al.* **2000**

*Computational studies on carbohydrates: in vacuo studies using a revised AMBER force field, AMB99c, designed for alpha-(1→4) linkages.* Carbohydr. Res. **326**: 194

Mootoo, D. R., *et al.* **1988**

*"Armed" and "Disarmed" n-pentenyl glycosides in saccharide couplings leading to oligosaccharides* J. Am. Chem. Soc. **110**: 5583

Mukaiyama, T., *et al.* **1981**

*An efficient method for glucosylation of hydroxy compounds using glucopyranosyl fluoride* Chemistry Letters **431**: 431-32



Murakami, T., *et al.* **1996**

*Efficient stereocontrolled synthesis of D-erythro-sphingosine from N-benzoyl-D-glucosamine* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 823

Muramatsu, T. **1988**

*Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis* J. Cell Biochem. **36**: 1-14

## N

Nashed, M. A., *et al.* **1977**

*Selective substitution at the 3-position in a 3,4-O-dibutyl-stannylene-D-galactopyranose derivative. An improved synthesis of 2,4,6-tri-O-benzyl-D-galactose* Carbohydr. Res. **56**: 419

Nicolaou, K. C., *et al.* **1988**

*A practical and enantioselective synthesis of glycosphingolipids and related compounds. Total synthesis of globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub>)* J. Am. Chem. Soc **110**: 7910-2

Nicolaou, K. C., *et al.* **1990**

*Total synthesis of the tumor-associated Lex family of glycosphingolipids* J. Am. Chem. Soc. **112**: 3693

Nikrad, P. V., *et al.* **1993**

*Use of human-milk fucosyltransferase in the chemoenzymic synthesis of analogues of the sialyl Lewis(a) and sialyl Lewis(x) tetrasaccharides modified at the C-2 position of the reducing unit* Carbohydr. Res. **250**: 145-60

Nilsson, M., *et al.* **1988**

*Synthesis of a dimeric Lewis X hexasaccharide derivative corresponding to a tumor-associated glycolipid* Carbohydr. Res. **183**: 71-82

Nilsson, M., *et al.* **1989**

*Synthesis of carbohydrate derivatives corresponding to a tumor-associated glycolipid: A trimeric Lewis X nonasaccharide and a trimeric N-acetyl lactosamine hexasaccharide* J. Carbohydr. Chem. **8**: 613

Numomura, S., *et al.* **1994**

*Total synthesis of sulfated Le(x) pentaosyl ceramide* Carbohydr. Res. **263**: C1-6

## O

Ogawa, T., *et al.* **1981**

*Synthesis of phenyl 6-O-acyl-3-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio-beta-D-glucopyranoside* Carbohydr. Res. **95**: 308



Ogawa, T., *et al.* **1984**

*Synthetic approach to glycan chains of a glycoprotein and a proteoglycan* Pure & Appl. Chem. **56**: 779

Orita, A., *et al.* **2001**

*Highly efficient deacetylation by use of the neutral organotin catalyst [tBu<sub>2</sub>SnOH(Cl)]<sub>2</sub>* Chemistry **7**: 3321-7

Ott, K. H., *et al.* **1996**

*Parametrization of GROMOS force field for oligosaccharides and assessment of efficiency of molecular dynamics simulations.* J. Comput. Chem. **17**: 1068

## P

Paulsen, H. **1987**

*Advances in selective chemical syntheses of complex oligosaccharides* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **21**: 155

Paulsen, H., *et al.* **1992**

*Synthesis of modified derivatives of 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose for the examination of substrate specificities of core 1-beta-3-Gal-transferase and core 3-beta-3-GlcNAc-transferase involved in the biosynthesis of O-glycoproteins.* Liebigs Ann. Chem. 735

Paulsen, H., *et al.* **1992**

*Synthesis of modified derivatives of the disaccharide beta-D-Gal-(1-3)-alpha-D-galNAc for the examination of substrate specificities of core 2-beta-6-GlcNAc-transferase and alpha-3-sialyltransferase involved in the biosynthesis of O-glycoproteins.* Liebigs Ann. Chem. 747

Perez, S., *et al.* **1995**

*Modelling of Biomolecular Structures and Mechanisms* Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht: 425-54

Perez, S., *et al.* **1996**

*Crystal and molecular structure of a histo-blood group antigen involved in cell adhesion: the Lewis<sup>x</sup> trisaccharide* Glycobiology **6**: 537-42

Pincet, F., *et al.* **2001**

*Ultraweak sugar-sugar interactions for transient cell adhesion* Biophys. J. **80**: 1354-8

Poveda, A., *et al.* **1997**

*Solution conformation and dynamics of a tetrasaccharide related to the Lewis<sup>x</sup> antigen deduced by <sup>1</sup>H NMR NOESY, ROESY, and T-ROESY measurements* Carbohydr. Res. **300**: 3-10

Powell, M. J. D. **1977**

*Restart procedures for the conjugate gradient method.* Mathematical programming **12**: 241-54



## R

Rana, S. S., *et al.* **1983**

*A facile synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-4-O-alpha-L-fucopyranosyl-3-O-beta-D-galactopyranosyl-D-glucopyranose, the Lewis a blood-group antigenic determinant, and related compounds* Carbohydr. Res. **117**: 101

Reddy, G. V., *et al.* **1996**

*Synthesis of precursors for the dimeric 3-O-SO<sub>3</sub>Na Lewis X and Lewis A structures* Carbohydr. Res. **280**: 261

Reiling, S., *et al.* **1996**

*Force field parameters for carbohydrates.* J. Comput. Chem. **17**: 450

Ryckaert, J. P. **1985**

*Special geometrical constraints in the molecular dynamics of chain molecules* Mol. Phys. **55**: 549-56

Ryckaert, J. P., *et al.* **1977**

*Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes* J. Comput. Phys. **23**: 327-41

## S

Sakagami, M., *et al.* **2000**

*A selective ring opening reaction of 4,6-O-benzylidene acetals in carbohydrates using trialkylsilane derivatives* Carbohydr. Res. **41**: 5547

Sakamoto, J., *et al.* **1986**

*Expression of Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>b</sup>, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines* Cancer Res. **46**: 1553-61

Sasaki, T., *et al.* **1978**

*Convenient synthesis of some Purine 8,5' -Imino cyclonucleosides* J. Org. Chem. **43**: 1978

Sato, S., *et al.* **1987**

*Total synthesis of X hapten, III3 Fuc alpha-nLc4 Cer* Carbohydr. Res. **167**: 197-210

Sato, S., *et al.* **1988**

*A total synthesis of dimeric Lex antigen, III3V3Fuc2nLc6Cer: Pivaloyl auxiliary for stereocontrolled glycosylation* Tetrahedron Letters **29**: 5267

Schmidt, R. R. **1986**

*New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides-are there alternatives to the Koenigs-Knorr method?* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **25**: 212



- Schmidt, R. R. **1989**  
*Recent developments in the synthesis of glycoconjugates* Pure&Appl. Chem. **61**: 1257
- Schmidt, R. R., *et al.* **1982**  
*Diastereoselective synthesis of D, L-sphingosine* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **21**: 210
- Schmidt, R. R., *et al.* **1980**  
*Facile synthesis of alpha and beta-O-glycosyl imidates; preparation of glycosides and disaccharides* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **19**: 731
- Schmidt, R. R., *et al.* **1983**  
*Synthese von 1-thioghysiden* Liebigs Ann. Chem. 1249
- Schmidt, R. R., *et al.* **1991**  
*Glycosylation with highly reactive glycosyl donors: Efficiency of the inverse procedure* Tetrahedron Letters **32**: 3353
- Senderowitz, H., *et al.* **1997**  
*A quantum mechanically derived all-atom force field for pyranose oligosaccharides. AMBER parameters and free energy simulations.* J. Org. Chem. **62**: 1427
- Siuzdak, G., *et al.* **1993**  
*Evidence of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Carbohydrate Association through Ion Spray Mass Spectroscopy* J. Am. Chem. Soc. **115**: 2877
- Sliedregt, L. A. J. M., *et al.* **1993**  
*Use of 4-nitrophenylthio-beta-D-glycosides in oligosaccharide synthesis: A critical evaluation* Synlett: 335
- Slife, C. W., *et al.* **1981**  
*"Standardized intermediates" for oligosaccharide synthesis. Precursors of beta linked, interior D-galactopyranose units having chain extension at position 4, or positions 4 and 2.* Carbohydr. Res. **93**: 219-30
- Spohr, U., *et al.* **1988**  
*Synthetic, conformational, and immunochemical studies of modified Lewis b and Y human blood-group determinants to serve as probes for the combining site of the lectin IV of Griffonia simplicifolia* Carbohydr. Res. **174**: 211-37
- Stick, R. V., *et al.* **2005**  
*From glycoside hydrolases to thioglycosidases: the synthesis of thioglycosides.* Tetrahedron assymetry **16**: 321
- SYBYL. **2004**  
SYBYL 7.0, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA



## T

- Toepfer, A., *et al.* **1994**  
*Efficient synthesis of the Lewis Antigen X (Le X) Family.* Liebigs Ann. Chem **65**: 449
- Toepfer, A., *et al.* **1992**  
*An efficient synthesis of the Lewis X (Lex) antigen family* Tetrahedron Letters **33**: 5161
- Toepfer, A., *et al.* **1993**  
*An efficient synthesis of the Lewis A antigen pentasaccharide moiety* J. Carbohydr. Chem. **12**: 809
- Toshima, K., *et al.* **1993**  
*Recent progress in O-glycosylation methods and its application to natural products synthesis* Chem. Rev. **93**: 1503-31
- Tromas, C., *et al.* **2001**  
*Adhesion Forces between LewisX Determinant Antigens as Measured by Atomic Force Microscopy* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **40**: 3052-5
- Trumtel, M., *et al.* **1990**  
*Syntheses of trisaccharide C-D-E and tetrasaccharide B-C-D-E fragments found in orthosomycins* Carbohydr. Res. **202**: 257-75
- Tvaroska, I., *et al.* **1986**  
*Conformational-energy calculations for oligosaccharides: a comparison of methods and a strategy of calculation.* Carbohydr. Res. **149**: 389

## U

- Ueno, Y., *et al.* **1983**  
*A radical deoxygenation of primary alcohols by use of tri-n-butyltin hydride-sodium iodide, and its application to a radical cyclization* Chemistry Letters 795

## V

- Varki, A. **1993**  
*Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct* Glycobiology **3**: 97-130
- Veeneman, G. H., *et al.* **1990**  
*Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters* Tetrahedron **31**: 1331
- Vitte, J., *et al.* **2004**  
*Beta-1 integrin-mediated adhesion may be initiated by multiple incomplete bonds, thus accounting for the functional importance of receptor clustering* Biophys J **86**: 4059-74



Von dem bruch, K., *et al.* **1994**

*Synthesis of N-glycopeptide clusters with Lewis X antigen side chains and their coupling to carrier proteins* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **33**: 101

## W

Wang, G., *et al.* **2000**

*Lewis antigens in <i>Helicobacter pylori</i>: biosynthesis and phase variation* Mol. Microbiol. **36**: 1187-96

Wang, J., *et al.* **2000**

*How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules* J. Comput. Chem. **21**: 1049

Weiner, S. J., *et al.* **1984**

*A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins* J. Am. Chem. Soc. **106**: 765

Wiberg, K. B. **1977**

*Intramolecular interactions in molecular mechanics calculations.* Computers & Chemistry **1**: 221-3

Williams, J. M., *et al.* **1967**

*Selective acylation of pyranosides-I. Benzoylation of methyl alpha-D-glycopyranosides of mannose, glucose and galactose.* Tetrahedron **23**: 1369

Windmüller, R., *et al.* **1994**

*Efficient synthesis of lactoneo series antigens H, Lewis X, and Lewis Y* Tetrahedron Letters **35**: 7927-30

Wong, C. H. **1997**

*A chemo-enzymatic approach to the study of carbohydrate-based biological recognitions* Pure & Appl. Chem. **69**: 419

Woods, R. J., *et al.* **1996**

*The application of molecular modeling techniques to the determination of oligosaccharide solution conformations* Reviews in computational chemistry, Lipkowitz and D.B Boyd Eds., VCH Publishers: New York **9**: 129-65

Woods, R. J., *et al.* **2000**

*Restrained electrostatic potential atomic charges for condensed phase simulations of carbohydrates* J. Mol. Struct. (Theochem) **527**: 149-56

Woods, R. J., *et al.* **1995**

*Molecular mechanical and molecular dynamical simulations of glycoproteins and oligosaccharides.1. GLYCAM\_93 parameter developement.* J. Phys. Chem. **99**: 3832



## Y

Yan, L., *et al.* **1996**

*Generalizing glycosylation: Synthesis of the blood group antigens Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, and Le<sup>x</sup> using a standard set of reaction conditions* J. Am. Chem. Soc. **118**: 9239

Yu, S., *et al.* **2002**

*Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-to-carbohydrate interaction between (KDN)GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3-like epitope* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**: 2854-9

Yvelin, F., *et al.* **1996**

*Crystal structure of the Lewis X trisaccharide* Carbohydrate Letters **1**: 475-82

## Z

Zeisig, R., *et al.* **2004**

*Effect of sialyl Lewis X-glycoliposomes on the inhibition of E-selectin-mediated tumour cell adhesion in vitro* Biochimica et Biophysica Acta **1660**: 31-40

Zemplèn, G. **1926**

*Abbau der reduzierenden biosen, I: Direkte konstitutions-Ermittlung der cellobiose.* Chem. Ber. **59**: 1254

Zemplèn, G., *et al.* **1923**

*über die natriumverbindungen der glucose und die verseifung der acylierten zucker* Chem. Ber. **26**: 1705

Zemplèn, G., *et al.* **1929**

*über die verseifung acetylierter Zucker und verwandter-substanzen* Chem. Ber. **62**: 1613

Zhang, Y., *et al.* **1995**

*Synthesis of a Nonasaccharide with two Lewis X trisaccharides Anchored onto a Branched Trimannoside* Tetrahedron assymetry **6**: 1195

Zhang, Y., *et al.* **2001**

*A one pot synthesis of mono- and di-lactosyl sphingosines* Glycoconjugate J. **18**: 557-63

Zhang, Z., *et al.* **1996**

*Conversion of p-methoxyphenyl glycosides into the corresponding glycosyl chlorides and bromides, and into thiophenyl glycosides* Carbohydr. Res. **295**: 41-55

Zimmermann, P., *et al.* **1988**

*Azidosphingosine glycosylation in glycosphingolipid synthesis* J. Carbohydr. Chem. **7**: 435