le cnam

KTH - Royal institute of technology
Stockholm

Mémoire

Présenté en vue d'obtenir

le DIPLOME D'INGENIEUR Cnam

SPECIALITE CHIMIE

OPTION TRANSFORMATIONS CHIMIQUES ET PHARMACEUTIQUES

par

Germain Fauquet

Reconnaissance biomoléculaire, Comparaison de l'impact du soufre et de l'oxygène dans la liaison glycosidique.

Soutenu le 1er avril 2011.

Membres du Jury :

Pr. Alain GUY
Pr. Clotilde FERROUD
Dr. Maité SYLLA
Dr. Philippe CICERON
Dr. Grégoire HERVE

-RESUME-

Les interactions entre carbohydrates et protéines jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques. La communication cellulaire et la prolifération cellulaire sont des exemples de processus biologiques basés sur des interactions hautement spécifiques entre les protéines et des oligosaccharides complexes. La synthèse d'analogues de carbohydrates naturels est cruciale pour l'étude et la compréhension des processus de reconnaissance et est donc devenue de plus en plus courante au cours des dernières décennies. En synthèse, les thio-analogues présentent plusieurs avantages. Le groupement thiol présente une nucléophilie et une stabilité chimique qui font des thio-analogues d'excellents précurseurs de disaccharides utiles pour la glycosidation. Ce projet vise à étudier les différences entre des oligosaccharides naturels et leurs thio-analogues dans leurs interactions avec des protéines spécifiques. Nous proposons ici une méthodologie pratique pour synthétiser les thio-analogues en positions 1, 2 et 6 du mannose. Une telle stratégie permet aussi d'accéder aux dimannosides liés en 1,2 et 1,6 par glycosidation. Nous voulons enfin introduire la méthodologie utilisée pour effectuer les tests d'inhibition par QCM de ces composés avec une lectine spécifique du mannose, la concanavaline A.

-ABSTRACT-

Interactions between carbohydrates and proteins play a key role in many biological processes. Cell-cell interactions, cell communication and cell proliferation are examples of processes based on highly specific interactions between proteins and complex oligosaccharides. The synthesis of carbohydrates mimics crucial for the study and understanding of such recognition processes has therefore become increasingly popular over the last decades. In synthesis, thiol derivatives have several advantages. Thus, the combined nucleophilicity and chemical stability properties of a sulfhydryl group provide thiol carbohydrate analogs as excellent building blocks for glycosylation processes. This project aims to investigate the differences between naturally occurring oligosaccharides and their sulfur-analogs in biomolecular interactions with specific proteins. We herein disclose a convenient methodology to synthesize 1, 2 and 6 mannose thioanalogs. Such a strategy allows access to 1,2 and 1,6 linked dimannoside in the same time by glycosilation. We also want to introduce an inhibition study methodoly to test these compounds on a mannose specific lectin (Concanavalin A) using QCM methodology.

"The mediator between head and hands must be the heart!"

Metropolis, Fritz Lang (1927)

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur O. Ramström pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche, pour la richesse de son enseignement et pour les discussions toujours intéressantes.

Je remercie Monsieur O. Norberg, doctorant à la Royal institute of technology de Stockholm pour avoir accepté d'encadrer mes travaux de recherche et pour les conseils qu'il m'a prodigués.

Mes remerciements vont également aux professeurs C. Ferroud et A. Guy, du Cnam de Paris, pour leur soutien tout au long de ce stage mais aussi tout au long de mes études. Merci d'avoir su me motiver dans les moments où j'en avais le plus besoin.

Je remercie chaleureusement tous les membres du groupe du Pf Olof Ramström pour leur amabilité, leur aide et leur gentillesse et tout particulièrement R. Caraballo et M. Sakulsombat pour leurs bons conseils mais aussi et surtout leur amitié sincère.

Je remercie le Fongécif Picardie pour avoir accepté de financer mon stage pendant neuf mois, ainsi que la société Cray Valley pour m'avoir accordé une absence de neuf mois afin de finaliser à travers ce mémoire mes études d'ingénieur Cnam.

Je remercie tout particulièrement Messieurs Philippe Cicéron et Grégoire Hervé de la R&D de la société Cray Valley, pour votre soutien inconditionnel et pour avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à ce jury.

A Anna pour sa gentillesse,
A Lele pour son ouverture d'esprit,
A Linn pour son soutien.

ABREVIATIONS :

Ac : Acétate.

Ac_2O : Anhydride acétique.

Ar : Phényl.

Bn : Benzyle.

BSA : Albumine de sérum bovin.

Bz : Benzoyle.

CCM : Chromatographie Couche mince.

Con A : Concanavaline A.

DCM : Dichlorométhane.

DIAD : Diisopropylazodicarboxylate.

DIPEA : *N*,*N*-Diisopropylethylamine.

DMF : Diméthylformamide.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

Et : Ethyl

HHL : Hippeastrum Hybrid Lectin.

HMDS : Hexamethyldisilazane.

Hz: Hertz.

Me : Méthyl.

MP : Matière première.

NIS : N-iodosuccinimide

Ph : Phényl.

ppm : Partie par million.

QCM : microbalance à quartz .

Rdt : Rendement.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

TBA : Tétrabutylammonium.

TBAOAc : Acétate de tétrabutylammonium.

TBAF : Fluorure de tétrabutylammonium.

TBDMS : *tert*-Butyldimethylsilyl ether.

Tf : Triflate ou trifluorométhanesulfonate.

THF : Tétrahydrofurane.

TMS : Tri méthyl silyle.

TPP : Triphénylphosphine.

Ts : Tosyl.

UV : Ultra violet.

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine.

-TABLE DES MATIERES-

INTRODUCTION……...…...10

1 Les sucres: propriétés et transformations chimiques……..12

1.1 Propriétés des sucres……...12

1.1.1 Conformation des sucres……...……..12

1.1.2 Effet anomère……...…….…….13

1.1.3 Nomenclature……...……..14

1.1.3.1 Noms courants des sucres et symboles de configuration…….14

1.1.3.2 Sucres substitués……..15

1.1.3.3 Formes cycliques……..16

1.1.3.4 Disaccharides……16

1.2 Transformations chimiques des sucres…….18

1.2.1 Réactions des hydroxyles……...…….18

1.2.1.1 Ethers…….……...…….18

1.2.1.2 Esters, formations d'acétates...…….19

1.2.1.3 Dérivés organostanniques…….……20

1.2.1.4 Acétates…….……...20

1.2.2 Réactions de l'hémiacétal…..…….....…….21

1.2.2.1 Protection…..……...……..21

1.2.2.2 Activation…..…….....22

1.2.2.3 Glycosidation……..……..…23

1.3 Conclusion…….…..…..24

2 Les protéines: propriétés et importance dans le vivant……..…….25

2.1 Propriétés des protéines……..…….…….25

2.1.1 De la structure primaire à la structure quaternaire…..……25

2.1.1.1 La structure primaire……..……...25

2.1.1.2 La structure secondaire……...……..26

2.1.1.3 La structure tertiaire…..…….27

2.1.1.4 La structure quaternaire…..…….…..28

2.1.1.5 Conclusion…..……..……...….28

2.1.2 Activité biologique - rôle dans le vivant…….....29

2.1.2.1 Les protéines fibreuses…..……...……..29

2.1.2.2 Les protéines globulaires…….....29
2.1.2.3 Les protéines membranaires…….……..30
2.2 Interactions des protéines avec les sucres…….……31
2.2.1 Généralités…….……...…..31
2.2.2 Cas de la Concanavaline A…….……...…..32
2.3 Conclusion……..…….……...……..33
3 Préparations des carbohydrates cibles…….……....34
3.1 Stratégie de synthèse……...……..35
3.2 Position 1…….…….……..……..36
3.2.1 Préparation du 1-thio-α-D-mannopyranoside…….……..…36
3.2.2 Préparation du Méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside…….....37
3.2.3 Conclusion…….……..38
3.3 Position 2……..…….……...39
3.3.1 Inversion…….……....41
3.3.2 Obtention du 4,6-benzylacetal-3-benzyl-2-hydroxy-methyl-α-D-mannopyranoside…….……..…….41
3.3.3 Obtention du 4,6-benzylacetal-3-benzyl-2-thioacetate-methyl-α-D-mannopyranoside…….…….……..…..42
3.3.4 Conclusion…….……..44
3.4 Position 6…….…….……....45
3.4.1 Obtention des précurseurs des disaccharides. ….……....46
3.4.1.1 Recherche des conditions adaptées à la substitution…….47
3.4.1.2 Obtention du Methyl-2,3,4-tris-(trimethylsilyl)-6-thioacetate-α-D-mannopyranoside……...…..……..49
3.4.1.3 Recherche d'un groupement protecteur adapté…….…49
3.4.2 Nouvelle stratégie……...…….51
3.4.2.1 Obtention du 6-Hydroxy-1-O-methyl-2,3,4-triacetate-α-D-mannopyranosyde……..…..……..52
3.4.2.2 Mitsunobu…….…….……..53
3.4.3 Conclusion…….……...…..55
3.5 Glycosidation…..…….……...……..56
3.5.1 Préparation du donneur…..…..…….57
3.5.2 Essais préliminaires de glycosidation...…..…….……...….58

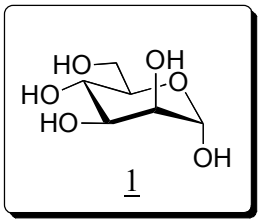
3.5.3 Amélioration du donneur...59
3.5.4 Réaction de glycosidation....60
3.5.5 Conclusion....61
4 Étude de l'interaction des molécules cibles avec différentes protéines....62
4.1 Généralités sur la technique utilisée....62
4.1.1 Principe de la QCM....62
4.1.2 Description de la méthode par inhibition indirecte....63
4.1.3 Estimation de l'EC_{50}....65
4.2 Interaction avec différentes lectines....66
4.3 Essais effectués et perspectives....66
5 Conclusion....67
6 Partie expérimental....69
7 Bibliographie....92

-INTRODUCTION-

Les sucres et en particulier leurs interactions avec les protéines présentent un rôle majeur dans la chimie du vivant. Ces interactions permettent par exemple la reconnaissance cellulaire ou encore la prolifération cellulaire [1]. Mais elles sont surtout impliquées dans de nombreuses pathologies comme le processus d'adhérence des bactéries à un tissu ou encore les processus d'inflammation des tissus. C'est pourquoi leur étude s'est beaucoup développée ces dernières années.

D'autre part et malgré l'effort fourni depuis près de 30 ans par les chimistes pour relever tous les défis qu'elle présente encore [2] la chimie des sucres reste encore une chimie assez peu développée et qui présente des problèmes majeurs en synthèse : différenciation des différentes positions, réactions parasites [3].

Cependant des groupes de recherche se sont spécialisés dans l'étude des carbohydrates. Ainsi la chimie de certains sucres commence à être largement décrite, c'est le cas du mannopyranose (1) (schéma 1). L'équipe que j'ai intégrée lors de ce stage fait partie de ces groupes de recherche. En effet, le groupe d'Olof Ramström s'est spécialisé depuis plus de 10 ans dans l'étude de ces composés. Aujourd'hui ce groupe utilise toutes les connaissances acquises en synthèse pour les mettre au service d'études biomoléculaires [4, 5] et centre son intérêt sur l'interaction des nouvelles molécules obtenues au laboratoire avec différentes protéines.



1

Schéma 1 : Mannopyranose

Il est largement démontré que le soufre et l'oxygène sont des éléments aux propriétés voisines. On peut donc imaginer qu'un sucre possédant une fonction thiol ou thioéther aurait des propriétés proches de son analogue naturel. Ainsi l'idée de remplacer un oxygène par un soufre dans la liaison glycosidique présenterait un avantage majeur en termes de schéma de synthèse [6, 7]. Tout d'abord, le soufre présente la propriété de pouvoir être oxydé et réduit très facilement [8]. De plus, le groupement thiol présente une nucléophilie et une certaine stabilité chimique qui font des thio-analogues d'excellents précurseurs de di-saccharides utiles pour la glycosidation. Malgré tout, il faut garder à l'esprit que bien que très proches le soufre et l'oxygène sont tout de même deux éléments différents. Il faut donc s'assurer que l'interaction avec la protéine spécifique de l'analogue naturel sera conservée après cette modification.

Ce projet a pour but de synthétiser une bibliothèque de 4 monosaccharides et 4 disaccharides et de tester leur affinité avec différentes protéines en comparaison avec leurs *O*-analogues.

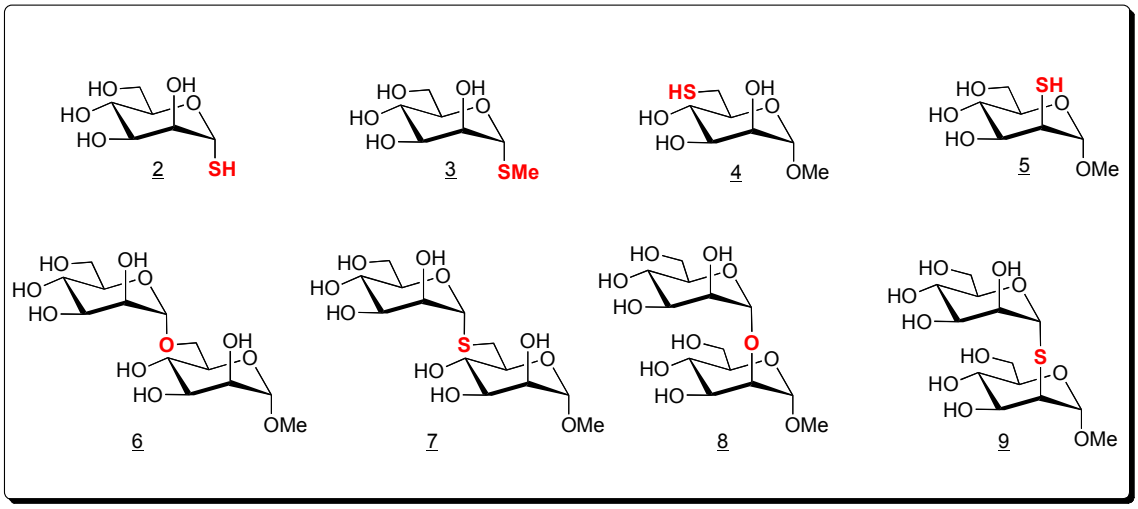


Schéma 2 : Molécules cibles.

En synthèse, nous utiliserons comme matières premières principalement l'α-D-mannopyranose mais aussi l'α-D-glucopyranose. Nous choisirons au mieux les groupements protecteurs et groupements partants de manière à obtenir la modification des différentes positions conduisant aux molécules cibles. Nous tenterons aussi de développer une voie de synthèse divergente permettant d'obtenir facilement et rapidement tous les composés nécessaires à notre étude.

Le premier chapitre de ce mémoire sera consacré à la présentation des propriétés des sucres et aux transformations chimiques pouvant être mises en œuvre sur ces composés. Nous décrirons les réactions utilisées pour modifier les hydroxyles ainsi que celles utilisées pour le carbonyle et l'hémiacétal.

Dans le second chapitre, nous détaillerons la description des protéines, leurs propriétés et rôles dans la chimie du vivant. Puis, nous nous intéresserons plus particulièrement à leurs interactions avec les sucres.

Le troisième chapitre sera consacré à la synthèse des carbohydrates cibles. Nous y présenterons les positions étudiées, c'est-à-dire les positions 1, 2, et 6.

La quatrième partie sera consacrée à l'étude des interactions de ces composés avec différentes protéines telles que la concanavaline A.

Enfin, nous exposerons en dernier lieu nos conclusions et les perspectives de ce projet.

1. Les sucres: propriétés et transformations chimiques.

1.1 Propriétés des sucres

Les sucres interviennent dans un grand nombre de processus de la chimie du vivant. Ils peuvent être utilisés pour le stockage de l'énergie (glycogène) mais sont aussi présents comme matrice de structure par exemple dans le cas de la cellulose. Mais l'importance des sucres réside surtout dans les rôles qu'ils jouent au niveau des processus biologiques [9, 10]. Ils sont bien plus divers et complexes que les protéines ou encore que les acides aminés [11]. Les monosaccharides constituent la plus petite sous unité des sucres dans ce sens qu'ils ne peuvent être hydrolysés pour obtenir des carbohydrates de masse moléculaire inférieure. Ce sont des aldéhydes ou des cétones présentant au moins deux groupement hydroxyles. Le terme qui les qualifie: carbohydrate, provient de leur formule brute générale $C_x(H_2O)_y$ littéralement des carbones hydratés [12].

1.1.1 Conformation des sucres

Le glycéraldéhyde est le plus simple des oses. Il possède un seul carbone asymétrique et n'est donc présent que sous deux formes énantiomères, R et S, représentées en Fischer de la manière suivante :

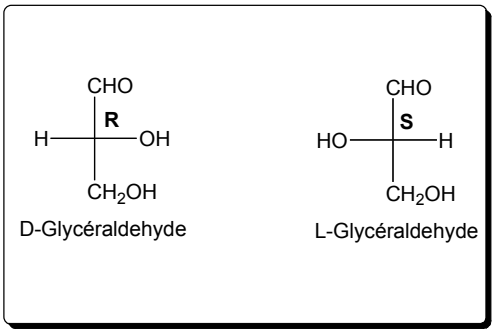


Figure 1 : Les deux énantiomères du glycéraldehyde.

La fonction aldéhyde sera toujours placée en haut de la ligne verticale, le CH_2OH terminal, en bas. Pour tous les oses, la position du OH du carbone n-1 permet de définir la nomenclature selon Fischer : D si cet OH est à droite de la ligne verticale, et L s'il est à gauche. On remarquera qu'en Fischer, et pour les oses quels qu'ils soient, les carbones sont R si OH est à droite, et S si OH est à gauche de cette ligne verticale.

Malgré son intérêt pour la représentation des sucres, la représentation de Fischer est assez éloignée de la réalité. En effet, les oses, et en particulier les hexoses et pentoses, ne se trouvent pratiquement pas dans la nature sous la forme proposée par Fischer [12]. Il s'établit un équilibre entre la forme linéaire et deux structures cycliques appelées pyranoses, provenant de l'hémiacétalisation de la fonction aldéhyde et de la fonction alcool placée sur le carbone 5.

Par exemple le D-glucose :

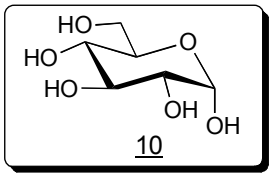


Figure 2 : L'α-D-glucopyranose.

En solution, il y a établissement d'un équilibre à partir de l'un ou l'autre des glucopyranoses, selon le schéma cité ci-après, ce phénomène se nomme la mutarotation. Ces deux formes sont obtenues par l'intermédiaire de la forme ouverte du cycle.

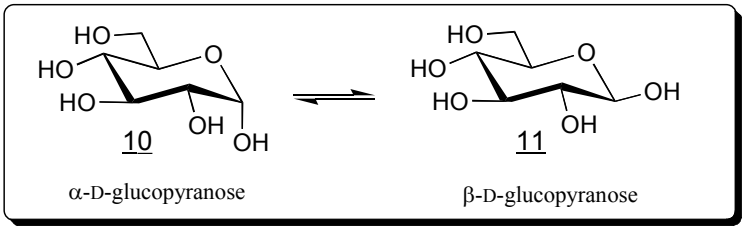


Figure 3 : Mutarotation du D-glucopyranose.

Le glucose en solution est composé à 36% de la forme α et à 64% de la forme β [13].

1.1.2 Effet anomère

Un substituant apolaire situé sur le carbone α de l'oxygène du pyrane, c'est-à-dire situé sur le carbone anomèrique, préfèrera pour des raisons stériques la position équatoriale [14]. Cela est en accord avec la théorie générale qui s'applique par exemple au cyclohexane et qui explique que si celui-ci est substitué par un groupement méthyle, ce dernier se trouvera en position équatoriale. Cette position est énergétiquement la plus favorable car elle minimise les interactions avec les atomes d'hydrogènes voisins.

Par contre, dans le cas d'un groupement polaire, toujours situé sur le carbone α de l'oxygène du pyrane, cette règle ne s'applique plus. Le substituant sera en axial, c'est l'effet anomère. L'origine de cet effet est expliquée de deux manières, il correspond à une diminution du moment dipolaire de l'isomère axial par rapport à l'isomère équatorial [13]:

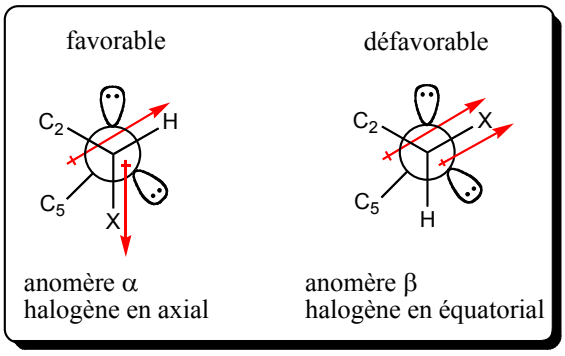


Figure 4 : Origine de l'effet anomère décrit à l'aide des moments dipolaires.

Une autre explication largement décrite aujourd'hui est le phénomène d'hyperconjugaison: Dans ce cas, une paire d'électrons non appariée de l'oxygène interagit avec l'orbitale antiliante de la liaison axiale C-X, ce qui stabilise la molécule.

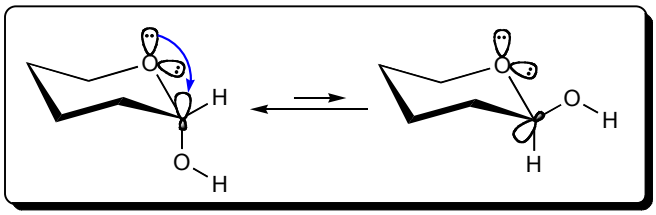


Figure 5 : Origine de l'effet anomère expliqué à l'aide de la théorie des orbitales.

Malgré tout, cette explication intéressante sur le plan théorique est très incomplète, et la stabilité de la forme α ou β dépend de beaucoup de phénomènes. Par exemple, dans le cas du mannose, elle peut dépendre de la présence d'un substituant sur le carbone 2.

1.1.3 Nomenclature

1.1.3.1 Noms courants des sucres et symboles de configuration

La famille des sucres se compose de trois groupes: les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides.

On classe le plus souvent les monosaccharides par le nombre de carbones composant leur chaîne, ainsi les principaux groupes sont le groupe des pentoses: 5 carbones et des hexoses: 6 carbones.

Pour trouver le nom systématique d'un sucre, on utilise la représentation de Fischer de manière à trouver à quelle série il appartient. Les définitions de la série droite et de la série gauche ont été données en 1.1.1. Malgré tout, les noms utilisés pour ces molécules sont le plus souvent des noms courants et recommandés, mais ne font pas partie de la nomenclature systématique. Voici un exemple de quelques sucres importants avec leurs noms courants :

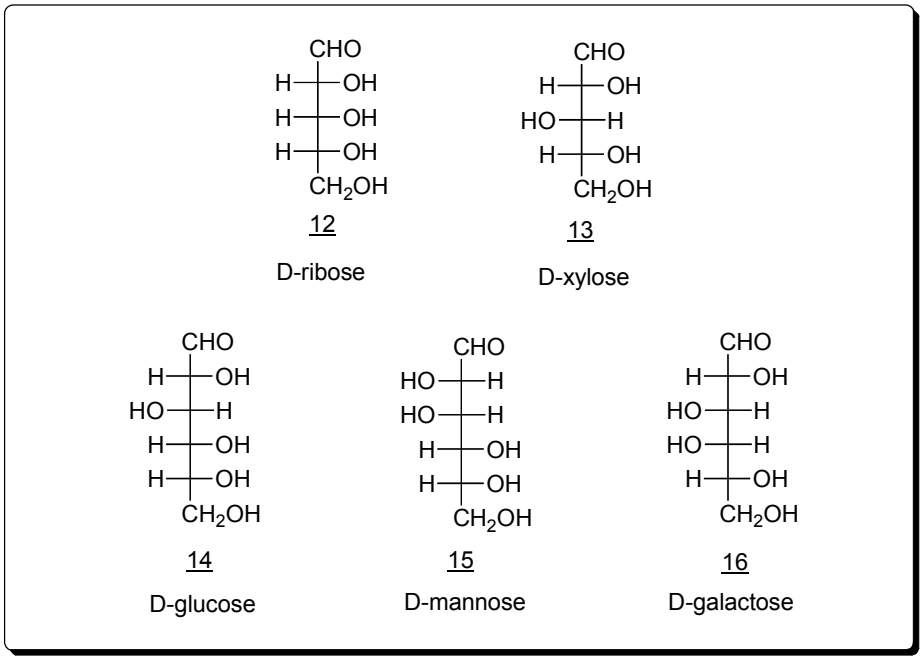


Figure 6 : Représentation de Fischer de quelques sucres.

1.1.3.2 Sucres substitués

Pour nommer un sucre substitué, on utilise le nom courant correspondant dans lequel on remplace l'hydroxyle par le substituant. Par exemple, le composé décrit figure 7 sera nommé 2-amino-2-desoxy-D-galactose.

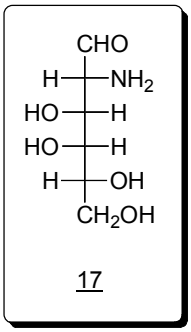


Figure 7 : Représentation de Fischer du 2-amino-2-desoxy-D-galactose.

Pour le présent rapport, les sucres substitués le seront le plus souvent sur l'oxygène. On indiquera alors cette substitution par un *O* majuscule en italique suivi d'un tiret puis du nom du substituant, et précédé d'un chiffre qui indique la position de cet oxygène sur la chaîne. On ne répétera pas les substituants identiques. Ainsi le composé présenté en figure 8 sera nommé 3,6-Di-O-benzyl-D-galactose.

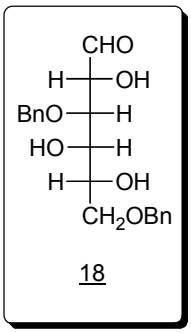


Figure 8 : Représentation de Fischer du 3,6-Di-O-benzyl-D-galactose.

1.1.3.3 Formes cycliques

On indiquera la dimension du cycle en remplaçant la terminaison "se" du nom du sucre par "furanose" dans le cas d'un cycle à 5 éléments, "pyranose" pour un cycle à 6 éléments.

Le carone hémiacétalique s'appelle anomérique. L'anomère α est celui qui en projection Fischer se trouve du même côté que l'oxygène lié au carbone asymétrique dont la configuration définit la série. Le symbole de configuration α ou β sera placé devant le symbole de la série.

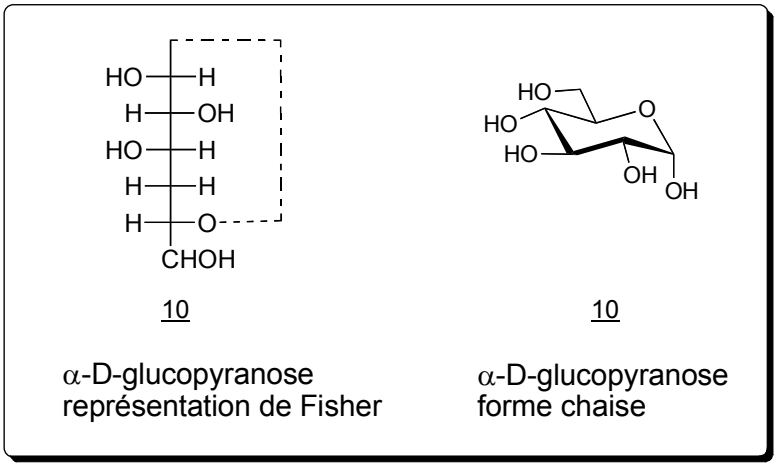


Figure 9 : Différentes représentation de l'α-D-glucopyranose.

1.1.3.4 Disaccharides

La grande diversité que présente la famille des sucres provient du fait qu'il existe un grand nombre de combinaisons différentes pour lier un monosaccharide à un autre. La formation de la liaison glycosidique peut conduire à deux stéréo-isomères. Il conviendra donc de préciser sous quelle forme anomèrique (α ou β) se trouve le sucre concerné. Deuxièmement, le nombre important de groupes hydroxyles présents sur le second carbohydrate permettra d'obtenir différents regio-isomères. Il conviendra donc aussi de préciser sur quelle position ils sont liés. Par exemple, deux résidus mannose peuvent êtres liés de plusieurs manières, ci-dessous les représentations du manβ1-6man et du manα1-2man :

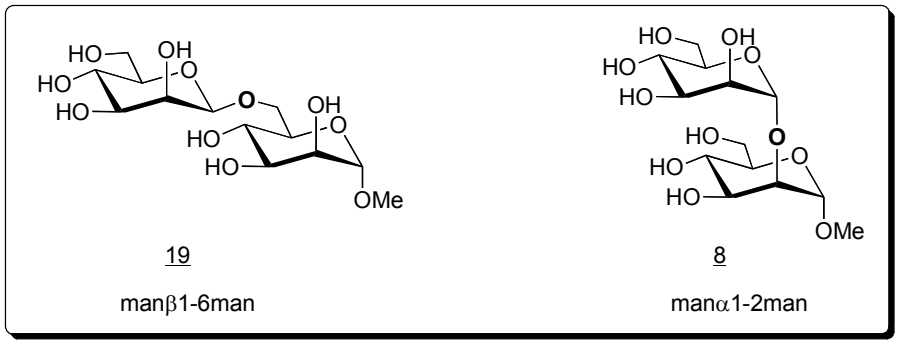


Figure 10 : Représentations cavalières du manβ1-6man et du manα1-2man.

1.2 Transformations chimiques des sucres

Dans la chimie des sucres, la notion de protection fonctionnelle prend toute son importance. C'est d'ailleurs pour cette raison que depuis les débuts de la chimie des sucres, un important travail de recherche a été effectué sur ce sujet [15]. En effet, la présence de cinq hydroxyles sur la molécule, dans le cas d'un hexo-pyranose, rend considérablement difficile la réaction sur un site isolé. Sans précaution particulière, il serait impossible de faire de la chimie sélective sur les sucres. Il sera donc nécessaire de passer par des étapes de protection, « déprotection » des différentes fonctions pour chaque schéma de synthèse. Le paragraphe qui suit a pour but de présenter les groupements les plus utilisés et les plus connus.

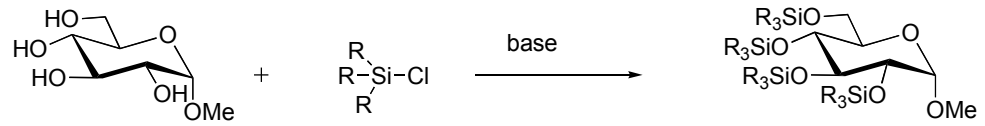
1.2.1 Réactions des hydroxyles

1.2.1.1 Ethers

Formation de dérivés silylés

Les éthers silylés sont utilisés pour protéger les groupements hydroxyles, ils présentent l'intérêt d'être peu sensibles aux bases, aux nucléophiles, et aux réactions d'oxydoréduction, ce qui fait d'eux de bons groupements protecteurs.

Schéma général de la réaction :



20 21

Schéma 1 : Formation d'éthers silylés sur le 1-méthyl-O-α-D-glucopyranose.

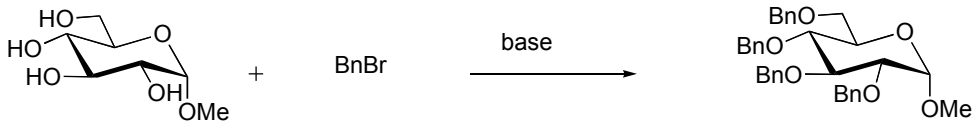
Les éthers triméthylsilylés sont souvent trop labiles pour êtres utilisés pour la protection des hydroxyles. En synthèse, on utilisera plutôt les éthers terbutyldiméthylsilylés, qui présentent une meilleure stabilité. Cependant le groupement le plus résistant reste l'éther tert-butyldiphenylsilylé. Ce groupement résiste aux conditions d'hydrolyse des acétals, mais peut présenter des problèmes d'encombrement stérique comme nous le verrons par la suite.

Tous les éthers silylés sont déprotégés en présence d'ions fluorures. Le composé le plus souvent utilisé est le fluorure de tétrabutyl ammonium ou TBAF.

Formations d'éthers benzyliques.

Les éthers benzyliques sont très employés. L'hydrure de sodium est utilisé pour déprotoner les hydroxyles alors que le bromure de benzyle est l'agent benzylant.

Schéma général de la réaction :



20 22

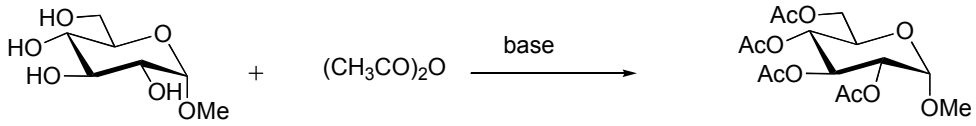
Schéma 2 : Formation d'éthers benzyliques sur le 1-méthyl-O-α-D-glucopyranose.

Les éthers benzyliques sont insensibles aux bases, aux nucléophiles et résistent à la plupart des conditions utilisées en synthèses. L'hydrogénolyse est utilisée pour leur déprotection, le plus souvent on utilise H_2 gaz en présence de palladium déposé sur charbon. Dans ce cas, il est important d'avoir en tête que le soufre est un poison du palladium en particulier si on travaille avec des thiols.

1.2.1.2 Esters, formations d'acétates.

L'acétylation mais aussi la benzoylation sont très utilisées pour la protection des sucres. On peut utiliser le chlorure d'acyle ou encore de benzoyle, mais dans le cas de l'acétylation, on préférera utiliser l'anhydride acétique pour des raisons de conversion.

Schéma général de la réaction :



20 23

Schéma 3 : Formation d'acétates sur le 1-méthyl-O-α-D-glucopyranose.

Les esters peuvent être déprotégés par hydrolyse en milieu acide ou basique mais ces réactions étant équilibrées, on utilisera le plus souvent la transestérification. En présence de méthoxyde de sodium, le méthanol étant utilisé comme solvant réactif, on va changer la nature de l'ester pour déprotéger la fonction alcool.

Schéma général de la réaction de déprotection :

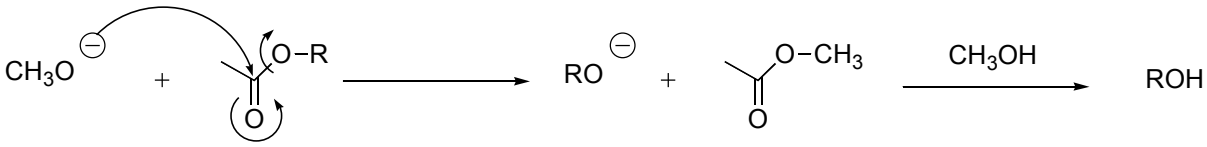
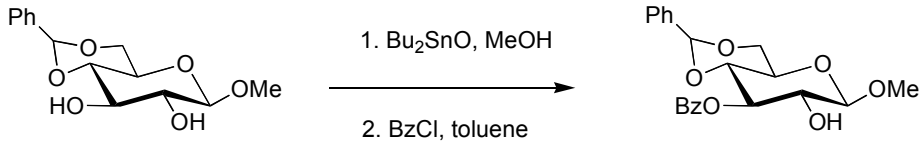


Schéma 4 : Réaction de déprotection des acétates.

1.2.1.3 Dérivés organostanniques

L'utilisation de dérivés de l'étain tels que l'oxyde de tributyl étain ou encore l'oxyde de dibutyl étain permet d'effectuer de manière régiosélective des alkylations, mais aussi des acylations, des sulfonylations, et des glycosylations. Dans l'exemple décrit ci-dessous (Schéma 5) l'utilisation de l'oxyde de dibutyl étain en quantité stoechiométrique permet l'obtention d'un dérivé stanneux qui après évaporation du méthanol et benzoylation donne le sucre substitué sélectivement en position 3 avec un rendement de 55%.



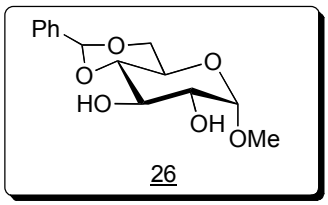
24 25

Schéma 5 : Réaction de protection à l'aide de dérivés organostanniques.

Il est à noter que le mécanisme de cette protection est complexe et encore mal décrit.

1.2.1.4 Acétals

Les acétals sont bâtis à partir d'un couple d'oxygène provenant de deux hydroxyles voisins. Voici un exemple d'acétal positionné sur les hydroxyles 4 et 6 du 1-methyl-O-mannose :



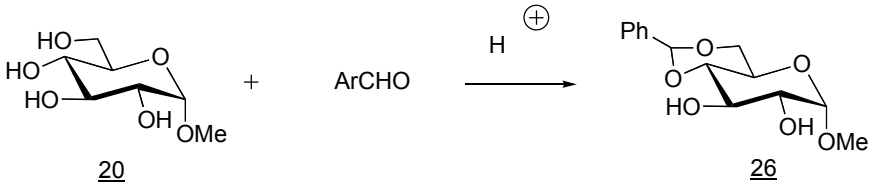
26

Figure 11: 1-méthyl-O-mannopyranose protégé en 4, 6 à l'aide d'un acétal.

On constate aisément que plus d'un acétal peut être formé sur un sucre. En général, on obtient donc un mélange des différents acétals avec un composé formé majoritairement. Ce composé majoritaire sera isolé par purification.

Formation de Benzylidène acétals.

Schéma général de la réaction:



20 26

Schéma 6 : Réaction de protection du 1-méthyl-O-mannose à l'aide de benzylidène acétals.

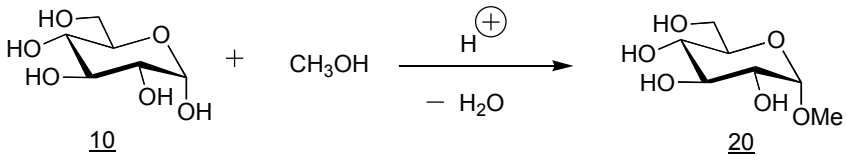
Les benzylidène acétals sont très sensibles en milieu acide. Ils sont aussi très sensibles aux réducteurs. Leur déprotection pourra donc se faire soit à l'aide d'un acide comme l'acide acétique aqueux ou bien par hydrogénolyse

1.2.2 Réactions de l'hémiacétal

1.2.2.1 Protection

Formation d'éther.

L'hydroxyle situé sur le carbone anomérique étant bien plus réactif que les autres hydroxyles, il est impératif de le différencier. Il pourra être protégé sous forme d'un éther méthylique par exemple.



10 20

Schéma 7 : Réaction de protection du mannose à l'aide d'un éther méthylique.

Cette protection est très courante, au point que certains fournisseurs ont dans leur gamme des sucres éthérifiés en position anomérique. En effet, il est à noter que certains oligosaccharides naturels sont partiellement méthylés en position anomériques.

Formation d'orthoesters.

Un orthoester est un groupe fonctionnel qui contient trois groupes alkoxy accrochés au même atome de carbone. Ils sont en général utilisés comme groupements protecteurs des esters. Les orthoesters sont facilement hydrolysés en esters en milieu acide, selon la réaction suivante:

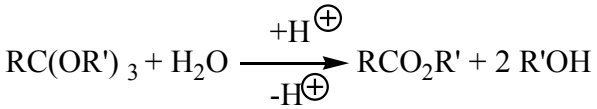
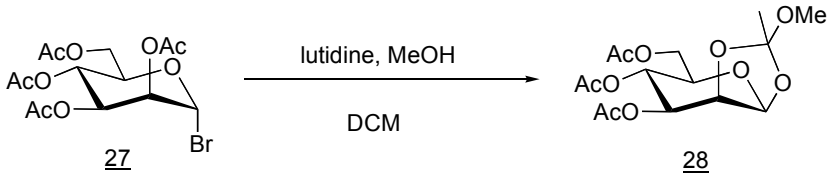


Schéma 8 : Hydrolyse des orthoesters en milieu acide.

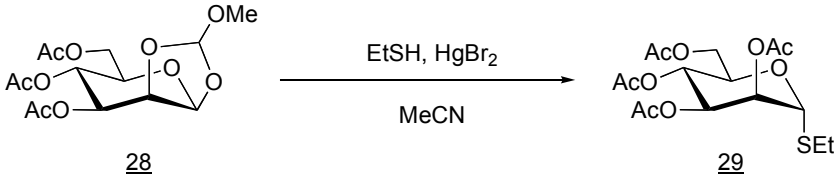
Dans le cas des sucres, on pourra utiliser l'orthoester pour protéger deux hydroxyles à la fois.



27 28

Schéma 9 : Protection en 1, 2 à l'aide d'un orthoester.

Dans ce cas, la déprotection consiste en une attaque nucléophile sur le carbone anomérique. En général, on l'utilisera pour positionner un groupement intéressant, comme ici ce groupement thio-éthanol :



28 29

Schéma 10 : Obtention sélective du thio-éther en position 1.

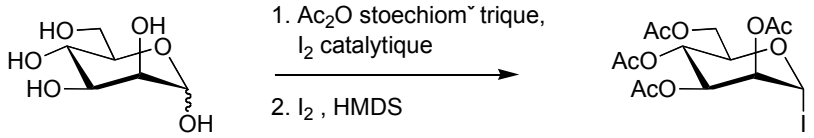
1.2.2.2 Activation

Formation d'orthoesters.

La formation d'orthoester peut aussi être considérée comme une activation. En 1.2.1.1, on a décrit l'étape de déprotection. Cette réaction pourra être utilisée pour faire réagir un nucléophile sur le carbone anomérique.

Halogénation.

L'halogénation des sucres en position 1 est une réaction d'un grande sélectivité qui permet d'obtenir des rendements très élevés. La per-O-acétylation d'un sucre avec l'anhydride acétique puis la substitution par l'iode ou le brome permet d'obtenir des rendements allant de 90 à 99% [16].



1 30

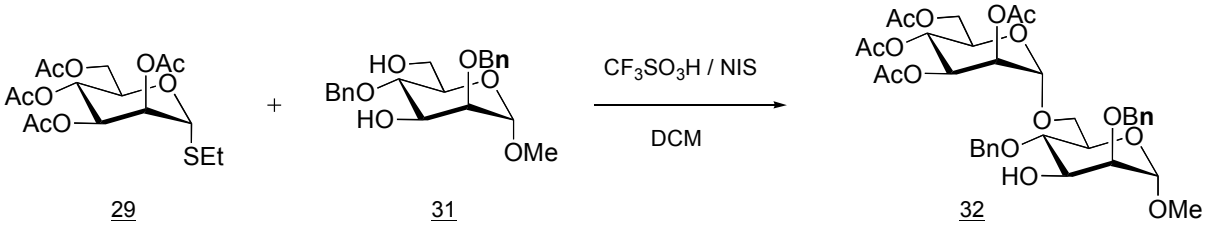
Schéma 11 : Réaction d'acétylation suivi d'une halogénation sélective en position 1.

On peut aussi effectuer la chloration de la position 1 à partir d'un sucre per-O-acétylé avec des rendements tout aussi élevés [17]. Lors des réactions d'halogénation des sucres, on obtiendra toujours l'énantiomère alpha.

1.2.2.3 Glycosidation

Deux monosaccharides peuvent réagir ensemble pour former une liaison glycosidique. Cette réaction s'appelle la glycosidation. Une réaction de glycosidation se fait toujours entre le carbone anomérique d'un des sucres et un des quatre hydroxyles situés sur les carbones 2 à 6 de l'autre [12].

D'importants efforts ont été faits dans le domaine de la glycochimie pour développer des méthodes fiables de glycosidation [18, 19, 20].



29 31 32

Schéma 12 : Exemple de réaction de glycosidation.

La réaction décrite ci-dessus met en jeu deux sucres, le 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-1-éthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside 29 sera nommé le donneur glycosidique, il réagira sur le carbone anomérique. Le méthyl-2,4-dibenzyl-α-D-mannopyranoside 31 sera l'accepteur, il réagira par un des hydroxyles situés sur les carbones 2 à 6.

Comme pour l'hémiacétal, l'acétal peut avoir deux configurations différentes α ou β. Par contre, l'acétal une fois formé est très stable et gardera sa configuration.

La liaison glycosidique peut cependant être hydrolysée en milieu acide dilué. Elle conduit alors à l'obtention des saccharides composant le polysaccharide hydrolysé.

1.3 Conclusion

L'intérêt que présente la maîtrise de la chimie des sucres, bien que peu reconnu aujourd'hui, est grand. Elle pourrait par exemple permettre le développement de nouveaux médicaments. Mais celle-ci est encore vue aujourd'hui, notamment par les industriels, comme une chimie d'une importante complexité et les développements ne vont pas dans ce sens.

D'autre part, mieux comprendre le rôle des sucres dans leurs interactions avec les protéines permet d'approfondir notre compréhension des mécanismes du vivant et donc d'être plus apte à intervenir sur les dysfonctionnements liés à la maladie. C'est dans ce but que la partie 2 de ce rapport a pour sujet les protéines, car notre volonté est de rapprocher ces deux familles de composés pour étudier leurs interactions.

2. Les protéines: propriétés et interactions avec les sucres.

Les protéines sont des molécules biologiques d'une grande complexité. Cette complexité ne provient pas uniquement de leur structure moléculaire mais aussi de leur structure dans l'espace. Elles sont considérées comme une famille de molécules très importante en biochimie puisqu'elles jouent un grand nombre de rôles dans le vivant. Elles ont d'abord été étudiées pour leur rôle dans la cellule puisqu'elles constituent le composant essentiel de la structure de celle-ci. Mais elles peuvent aussi avoir un rôle de catalyseur. On leur donne alors le nom d'enzymes. Les enzymes sont des catalyseurs ayant une très haute spécificité. Enfin et pour se rapprocher du problème traité dans ce rapport, elles peuvent avoir un rôle de récepteur spécifique.

2.1 Propriétés des protéines

Les protéines que nous observons dans la nature ont évolué, sous certaines conditions de pressions, de manière à remplir chacune une fonction spécifique. Leur spécificité découle de leur structure tridimensionnelle, nous allons voir dans cette première partie comment elle est obtenue.

2.1.1 De la structure primaire à la structure quaternaire

Une protéine est une macromolécule biologique composée par un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (liaison amide). C'est en général une molécule linéaire qui peut comporter jusqu'à 20 acides aminés différents. On parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 50 acides aminés, pour des tailles plus petites, on parle de peptide et de polypeptide. Il existe une grande variété de protéines différentes. Une des propriétés les plus remarquables des protéines est leur capacité à former une structure globulaire, nous verrons dans ce chapitre ce que cela signifie [21].

2.1.1.1 La structure primaire

L'ordre dans lequel les acides aminés s'enchaînent est codé par le génome et constitue la structure primaire de la protéine, encore appelée séquence. Concrètement, la structure primaire est représentée par une succession de 20 symboles différents correspondant aux 20 acides aminés (fig 12).

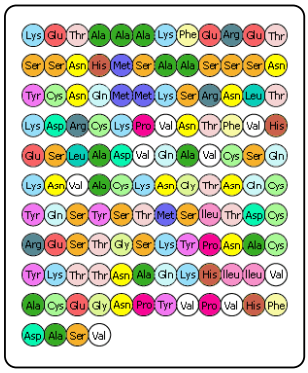


Figure 12 : Exemple de structure primaire d'une protéine.

2.1.1.2 La structure secondaire

La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale d'une protéine. L'existence de structures secondaires vient du fait que les repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont limités et que seules certaines conformations sont possibles. Ainsi, une protéine peut être décrite par une séquence d'acides aminés mais aussi par un enchaînement d'éléments de structure secondaire.

Certaines conformations se trouvent nettement favorisées car stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette peptidique. Il existe trois principales catégories de structures secondaires selon l'échafaudage de liaisons hydrogènes, et donc selon le repliement des liaisons peptidiques : les hélices, les feuillets et les coudes. Du fait que la structure secondaire est un repliement local, on peut trouver plusieurs types de structure secondaire sur la même protéine.

Le premier type de structure secondaire est l'hélice alpha **:** Elle est formée par l'enroulement régulier d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. Les atomes d'azote et d'oxygène du squelette protéique sont reliés entre eux par des liaisons hydrogène parallèles à l'axe de l'hélice.

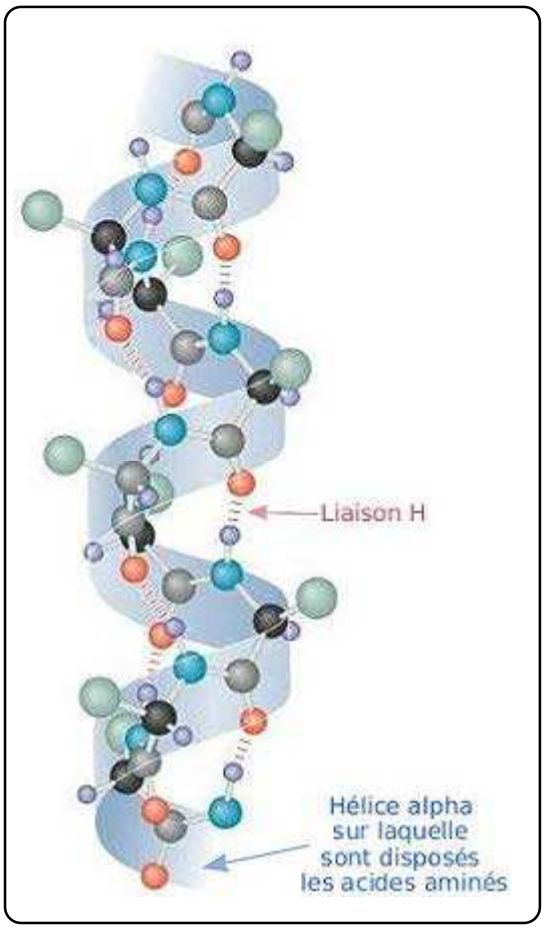


Figure 13: Représentation de la structure en hélice α d'une protéine.

Les feuillets β se matérialisent sous forme d'un pli successif avec différentes ondulations de la chaîne polypeptidique, ils peuvent êtres parallèles ou anti-parallèles (fig 14). C'est une structure plus lâche et plus plane que l'hélice alpha.

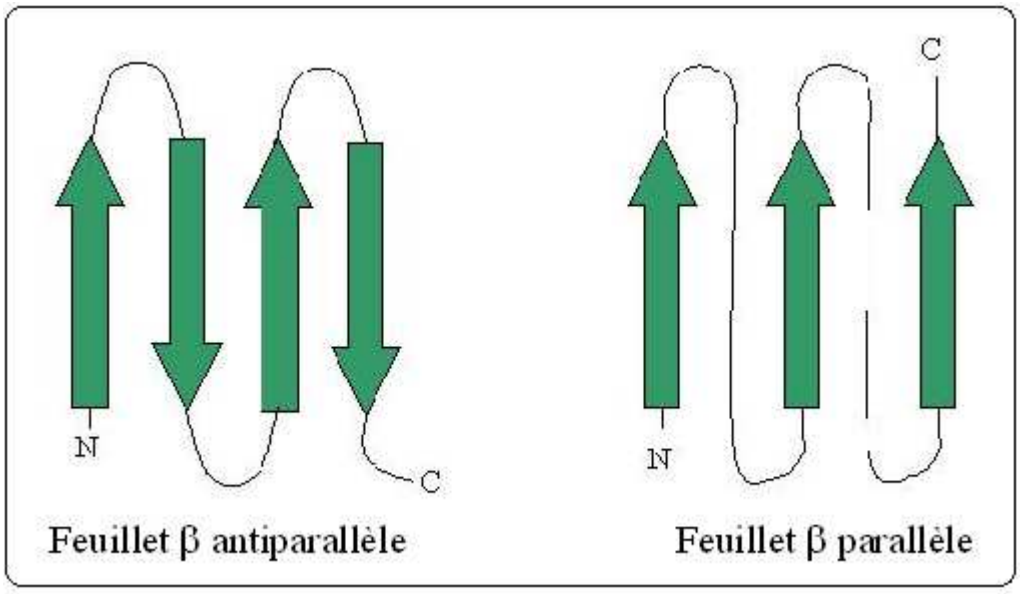


Figure 14 : Représentation de la structure en feuillets β d'une protéine.

Enfin les coudes ne sont pas des structures périodiques. Il s'agit plutôt d'un repliement particulier du squelette carboné localisé sur 3 ou 4 acides aminés consécutifs. Les coudes permettent bien souvent de relier 2 structures secondaires périodiques.

2.1.1.3 La structure tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine correspond à la forme globale de la chaîne polypeptidique dans l'espace. On parle plus couramment de structure tridimensionnelle. La structure tertiaire est généralement stabilisée par des interactions non locales, le plus souvent la formation d'un noyau hydrophobe, mais aussi par des liaisons hydrogène ou encore des ponts di-sulfure. Une structure tridimensionnelle n'est pas figée, elle peut se modifier (se tordre, se déformer) sous l'effet de la fixation d'une molécule (par exemple un ligand) ou sous l'effet de la variation d'un paramètre (pH, température). Elle est intimement liée à sa fonction. Lorsque cette structure est détruite, la protéine perd sa fonction: elle est dénaturée.

Les protéines peuvent être divisées de manière informative en trois classes, corrélées avec leurs structures tertiaires : Les protéines globulaires, les protéines fibreuses et les protéines membranaires. La plupart des protéines globulaires sont solubles en milieu biologique, ce sont par exemple des enzymes. Les protéines fibreuses sont souvent des protéines de structure. On compte parmi elles, le collagène ou encore la kératine. Les protéines membranaires sont souvent des récepteurs ou des guides permettant aux molécules chargées, de pénétrer à l'intérieur de la cellule.

2.1.1.4 La structure quaternaire

La structure quaternaire des protéines regroupe l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes, par des liaisons non-covalentes. Ce sont des liaisons dites faibles (liaison H, liaison ionique, interactions hydrophobes et force de Van der Waals) qui ont pour rôle de créer les liaisons inter chaîne.

L'effet hydrophobe est un facteur prépondérant dans l'assemblage des éléments structuraux, y compris dans l'association des sous-unités. Chacune de ces chaînes est appelée monomère (ou sous-unité) et l'ensemble oligomère.

2.1.1.5 Conclusion

La structure tridimensionnelle d'une protéine a autant d'importance que sa structure primaire. C'est elle qui donne à la protéine sa fonction et sa spécificité. La perte de cette structure entraîne la perte de l'activité de la protéine. Il faudra donc veiller à effectuer les tests dans des conditions proches de celle du milieu dans lequel elle évolue à l'état naturel.

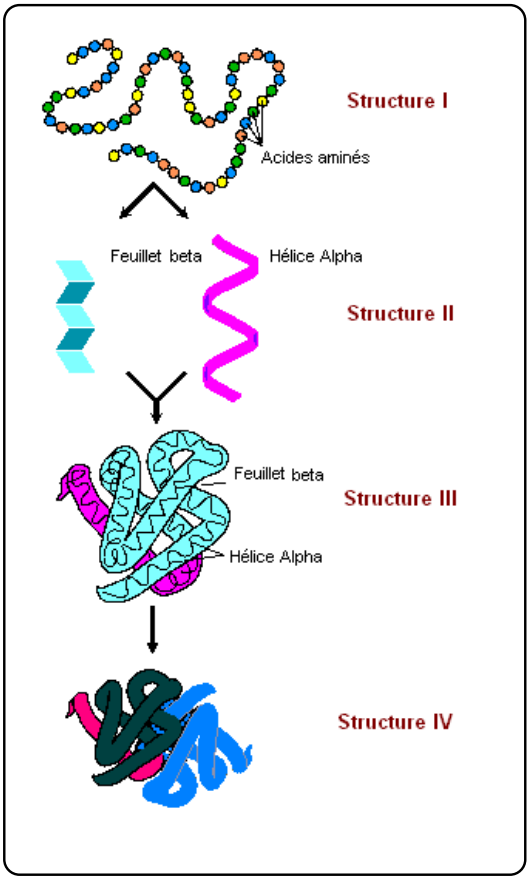


Figure 15 : Schéma regroupant les 4 sous unités de la structure d'une protéine.

2.1.2 Activité biologique, rôle dans le vivant

Comme nous l'avons sommairement décrit dans la partie précédente (2.1.1.3), les protéines sont divisées en trois classes: Les protéines globulaires, les protéines fibreuses et les protéines membranaires. Nous nous proposons ici de rentrer un peu plus avant dans le détail du rôle que peuvent prendre ces trois types de protéines dans la chimie du vivant et des phénomènes mis en jeu.

2.1.2.1 Les protéines fibreuses

Les protéines fibreuses ont un rôle structurel apporté par leur structure en forme de filaments ou de fibrilles. À la différence des protéines globulaires, elles sont pratiquement insolubles dans l'eau, et ne jouent jamais le rôle d'enzyme. On compte parmi elles le collagène ou encore la kératine.

Les kératines forment des tissus protecteurs du corps, tel l'épiderme, les cheveux ou encore les ongles. La kératine des cheveux est une protéine en hélice α qui forme une fibre allongée. Elle est adaptée à une fonction de résistance grâce à l'enroulement de brins α. La résistance de cette structure est augmentée par des liaisons covalentes entre les chaînes polypeptidiques, les ponts di-sulfure.

Le collagène est très répandu dans le règne animal. C'est la principale protéine des tissus conjonctifs et du squelette des vertébrés. Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Pour se faire, la molécule de collagènes est constituée de trois chaînes peptidiques hélicoïdales dont la structure est renforcée par des liaisons hydrogènes.

2.1.2.2 Les protéines globulaires

Les protéines globulaires sont solubles en milieu aqueux. Elles peuvent jouer le rôle d'enzymes, de messagers ou transporteur. Les protéines globulaires présentent un repliement prononcé. C'est chez les protéines globulaires que la relation structure-activité est la plus importante. Une protéine dénaturée, c'est-à-dire ayant perdu sa structure tridimensionnelle, parce que isolée dans un milieu qui ne correspond pas à son milieu naturel (changement de pH, de température) perdra sa fonction.

Les enzymes sont des protéines globulaires. Elles sont spécialisées dans la catalyse des réactions biologiques. Ce sont des catalyseurs d'une grande spécificité, qui ne catalysent qu'une seule réaction. Pratiquement toutes les réactions biologiques sont catalysées par des enzymes.

2.1.2.3 Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont des protéines localisées au sein de la cellule au niveau d'une membrane, par exemple la membrane plasmique. Les fonctions des protéines membranaires peuvent être aussi variées que celle des protéines solubles (globulaires) : activités enzymatiques, fonction structurale.

En raison de leur localisation spécifique à l'interface de deux compartiments différents, les protéines membranaires peuvent cependant présenter des fonctions additionnelles tout à fait spécifiques comme le transport de molécules à travers la membrane, ou encore la réception - transmission de signaux à travers la membrane.

2.2 Interactions des protéines avec les sucres

2.2.1 Généralités : les lectines

Les lectines sont des protéines se liant spécifiquement et de façon réversible à certains carbohydrates. On les appelle aussi glycoprotéines [22]. On les trouve en forte concentration dans la plupart des graines de légumineuses sèches, mais aussi de façon plus large dans la nature : autres familles de plantes, champignons et chez les animaux.

Elles sont généralement constituées de plusieurs sous unités. Parfois identiques, parfois différentes, elles sont le plus souvent au nombre de quatre. Le plus souvent liées de façon non-covalente, ces sous-unités peuvent parfois être liées par des ponts disulfure.

Les lectines se lient spécifiquement à un carbohydrate en utilisant un mécanisme d'interaction et de reconnaissance similaire à celui utilisé par les enzymes, concept clé serrure [24] (figure 16). Le mot lectine venant en effet du latin *legere*, signifiant "sélectionner" [25]. La fixation est en général d'autant plus forte que la chaîne composant le carbohydrate est longue. Il faut noter que le maximum d'association est obtenu avec le sucre terminal.

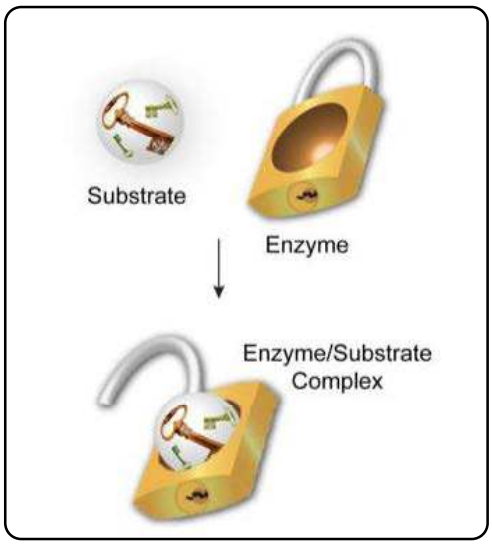


Figure 16 : Représentation du concept clé serrure

Elles ont un rôle prépondérant dans les processus biologiques de reconnaissance impliquant la protéine et la cellule. Elles sont un acteur de la régulation de l'adhésion cellulaire ou encore de la reconnaissance cellulaire [23]. On pense aujourd'hui que ces récepteurs présents à la surface de la cellule sont responsables de la suppression de certaines glycoprotéines dans l'appareil circulatoire. Par exemple, certaines lectines sont présentes sur la surface des cellules hépatiques de mammifère chargées de la reconnaissance des résidus de galactose.

Les lectines sont également connues pour jouer un rôle important dans le système immunitaire [23]. En se liant spécifiquement par exemple aux glucides que l'on trouve exclusivement sur les agents pathogènes, les rendant ainsi inaccessibles à des cellules potentiellement hôtes. Certaines lectines spécifiques du mannose jouent ce rôle.

2.2.2 Cas de la Concanavaline A

La concanavaline A (ConA) est une glycoprotéine de la famille des lectines. Elle se lie spécifiquement par affinité au D-mannose et au D-glucose. Cette molécule est produite par le haricot sabre (*Canavalia ensiformis*) où elle s'accumule dans le fruit (fève). Elle fut la première lectine identifiée, d'abord connue sous le terme d'hémaglutinine. Elle fut extraite par Peter Hermann Stillmark en 1888.

Comme la majorité des lectines, la ConA est un homotétramère, chaque sous-unité lie deux hétéroatomes : un atome de calcium, Ca^{2+} et un métal de transition (généralement du manganèse : Mn^{2+}), ainsi qu'un site de fixation au sucre. La Concanavaline A possède donc 4 sites de fixation, correspondants aux 4 sous unités qui la composent. Sa structure tertiaire a été élucidée (voir figure 17), et l'on connaît bien les bases moléculaires de ses interactions avec les métaux qui la composent, et de son affinité pour le mannose et le glucose.

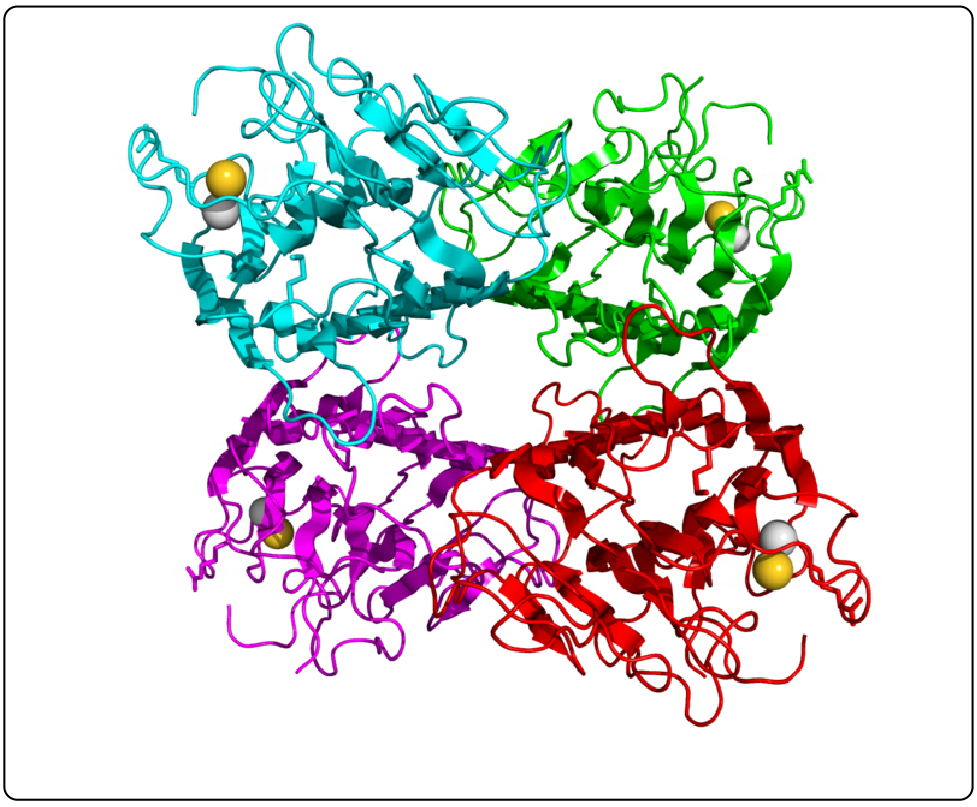


Figure 17 : la Concavaline A avec ces 4 sites de fixation.

Une partie importante des chaînes polypeptidiques existe sous la forme de plis β. C'est par ces régions que s'effectue l'association entre monomères.

La poche du site de fixation est très proche des atomes de calcium et de manganèse. Elle est composée de résidus d'acides aminés de tyrosines, asparagines, leucine, sérine et arginine indiquant une cavité nettement hydrophile.

Il est important de souligner que si la Concanavaline A est un récepteur spécifique du D-mannose, son association est respectivement 4 et 20 fois plus grande avec le di- et le trisacccharide.

La Concanavaline A a été largement étudiée car elle interagit avec divers récepteurs contenant des carbohydrates, à commencer par les marqueurs de groupe sanguin. Mais aussi et surtout, elle est supposée médier l'interaction entre les oligosaccharides (alpha-mannosyl) de la surface du virus VIH et les lymphocytes humains.

2.3) Conclusion

On a vu dans cette partie, que la famille des protéines présente une grande diversité de structure. Les fonctions biologiques qu'elle assure sont nombreuses et primordiales dans la chimie du vivant.

La grande complexité des protéines, surtout liée à leur structure 3D qui peut être dénaturée lorsqu'elles sont retirées de leur milieu naturel, implique que c'est encore l'expérimentation qui est la plus à même d'apporter des résultats tangibles aujourd'hui.

Les parties 3 et 4 sont dédiées à cette expérimentation, et pour commencer, la partie 3 est consacrée à la synthèse des molécules que nous voulons étudier en présence des protéines telles que la Con A que nous venons de présenter.

3. Préparations des carbohydrates cibles.

Les molécules cibles présentées en figure 18, en particulier les disaccharides liés en position 2 et en position 6, ont été choisies de manière à mimer les structures des parties terminales de carbohydrates spécifiques de la concanavaline A [26].

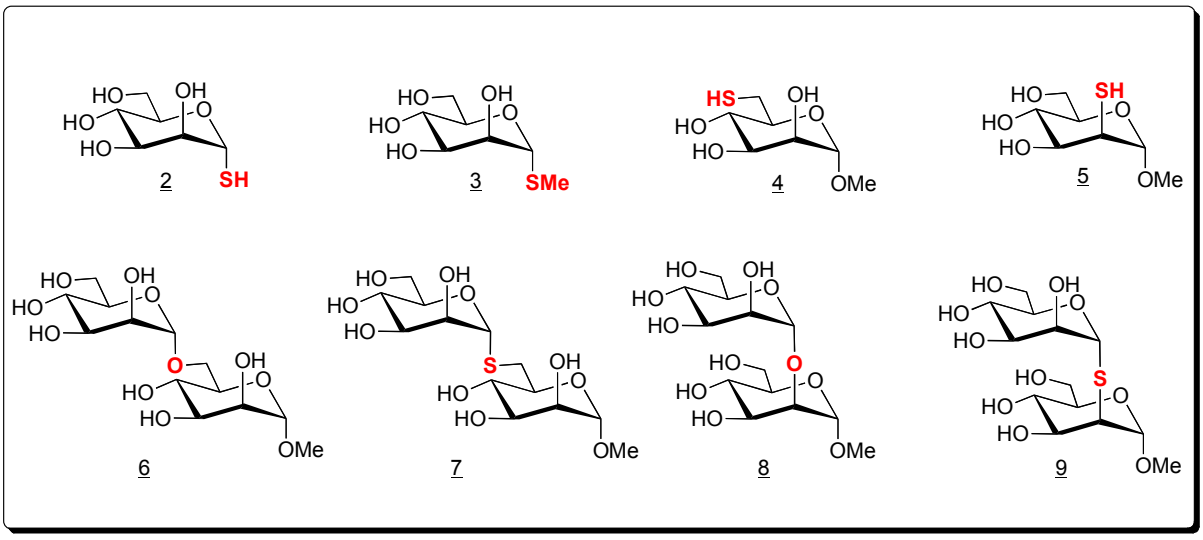


Figure 18 : Molécules cibles.

Les saccharides présentant un groupement méthoxyle en position 1 sont des molécules connues pour intervenir dans les interactions avec les protéines à l'état naturel [12]. C'est pourquoi nous avons choisi de l'utiliser comme groupement protecteur de la position 1 de la plupart de nos molécules.

Le choix de la voie de synthèse à utiliser pour obtenir les différents thioanalogues dépend beaucoup du sucre que l'on cherche à modifier, mais aussi de la position à modifier sur ce sucre.

En effet, si la position anomérique et la position 6 se différencient aisément des autres positions, de par leur réactivité spécifique, il n'en est pas de même lorsque l'on cherche à travailler sur les positions 2, 3 et 4 qui possèdent des réactivités assez proches. La modification de ces positions requiert une stratégie de synthèse hautement plus élaborée. Dans ce chapitre, nous développerons les voies de synthèses utilisées pour l'obtention des composés décrits ci-dessus.

3.1) Stratégie de synthèse

Notre volonté dans la partie synthèse de ce projet est de proposer une voix d'obtention rapide (nombre d'étapes réduit) et facile (utilisation de réactions connues) pour l'obtention des différents thio-analogues.

L'idée directrice de la stratégie mise en place est que la plupart des monosaccharides testés sont obtenus lors d'une étape « clé » conduisant à la synthèse du disaccharide. Nous verrons en quoi cette stratégie présente une grande force mais aussi des faiblesses.

Cette partie du rapport se décline en trois chapitres correspondants aux trois positions étudiées :

Nous verrons que les modifications de la position 1 utilisent un protocole connu dans le laboratoire et ont bien fonctionné. Nous avons pris le parti d'utiliser un « raccourci » pour l'obtention du méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside qui, malgré quelques problèmes, s'est avéré fructueux.

La modification de la position 2 met en jeu une stratégie plus élaborée qui permet l'obtention de trois molécules cibles. Malgré les problèmes rencontrés, nous avons réussi à conserver le schéma de synthèse de départ et à le mener à bien.

Il n'en a pas été de même pour les modifications de la position 6. Les problèmes rencontrés ont été nombreux et parfois insolubles nous conduisant ainsi à revoir plusieurs fois notre stratégie.

3.2 Position 1

La modification de la position 1 n'implique pas de stratégie complexe. La stratégie que nous avons utilisée pour l'obtention du 1-thio-α-D-mannopyranoside a été développée dans le groupe de recherche du Professeur Ramström. Pour l'obtention du méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside, nous verrons qu'une stratégie avait été pensée à l'origine mais que l'idée nous est venue de tester une voie d'obtention en une étape. L'obtention des analogues naturels de ces sucres ne nécessite pas de synthèse puisqu'ils sont commerciaux.

3.2.1 Préparation du 1-thio-α-D-mannopyranoside

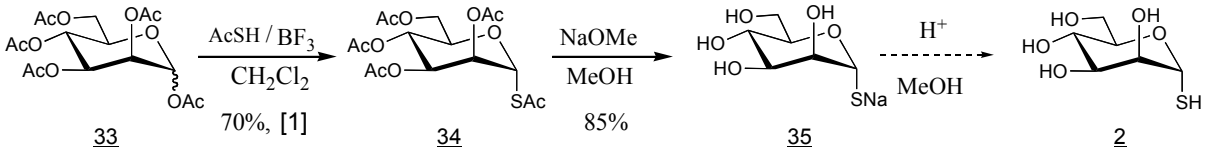
Pour la synthèse du 1-thio-α-D-mannopyranoside, nous avons donc repris les travaux du Dr Z. Pei [27]. Il propose une synthèse en trois étapes (Schéma 13). A partir du 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acétyl-D-mannopyranose disponible commercialement, on effectue la substitution du groupement acétyl en position 1 par un thio-acétate . On va ensuite effectuer la déprotection du sucre en hydrolysant les acétates présents sur toutes les positions. La dernière étape consistant à protoner le sel de sodium obtenu lors de la déprotection ne sera pas traitée ici. En effet, elle a lieu lors de la dissolution du composé dans le tampon utilisé pour les tests d'inhibition en QCM.



33 34 35 2

Schéma 13 : Stratégie d'obtention du 1-thio-α-D-mannopyranoside

Cette stratégie de synthèse a été utilisée avec succès, les réactifs utilisés sont décrits en schéma 14 ci-dessous. Il est a noter que les rendements obtenus sont très proches de ceux publiés.



33 34 35 2

Schéma 14 : Obtention du 1-thio-α-D-mannopyranoside

L'étape clé de cette voie de synthèse est la substitution du groupement acétate en position 1 par un thio-acétate. On part du mélange racémique d'énantiomères α et β du 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétyl-D-mannopyranose pour ne conduire qu'à l'énantiomère α. L'utilisation de BF_3 va permettre, en orientant l'approche de l'ion thio-acétate, d'obtenir de manière sélective le 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-1-S-acétyl-1-thio-α-D-mannopyranose 34(Schéma 15).

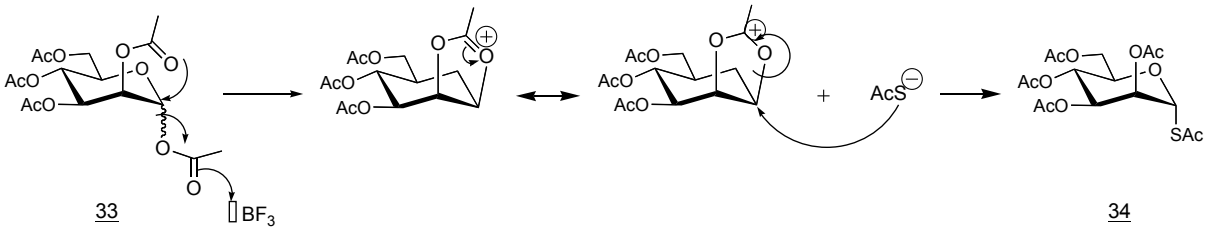


Schéma 15 : Mécanisme d'action de BF_3

Lors du départ du groupement acétate situé en position anomèrique avec le BF_3, le doublet situé sur l'oxygène du carbonyle va attaquer le carbone devenu déficitaire en électrons et former un intermédiaire cyclique. À partir de cet intermédiaire, seule l'attaque par la face α de la molécule est possible conduisant à l'énantiomère α.

3.2.2 Préparation du Méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside

La stratégie d'obtention du méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside utilise une synthèse elle aussi en trois étapes (Schéma 16). Elle consiste à partir de la même matière première, le 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose, à substituer sélectivement le groupement acétate en position 1 par un halogène [16, 28], puis de substituer cet halogène (brome ou iode) par un groupement SMe à l'aide du méthanethiol. La dernière étape étant la déprotection du sucre.

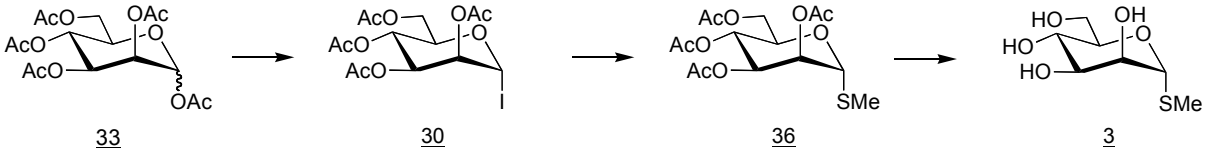


Schéma 16 : Stratégie d'obtention du Méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside

Le mécanisme de la deuxième étape de cette réaction utilise la propriété qu'ont les halogènes positionnés sur le carbone anomérique à orienter la substitution vers l'obtention de l'énantiomère α.

Cependant, cette voie de synthèse bien que largement décrite comme efficace, nous est apparue trop indirecte. Nous avons eu l'idée après l'obtention des premiers résultats avec le 1-thio-α-D-mannopyranoside, d'utiliser celui-ci pour obtenir directement en une étape le 1-SMe [29].

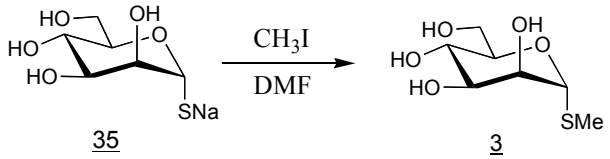
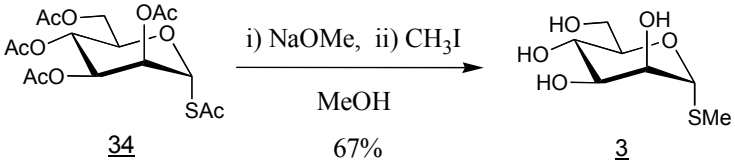


Schéma 17 : Obtention du méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside en une étape.

La réaction marche, cependant le produit obtenu est difficile à purifier. La DMF est un solvant qui a tendance à diffuser lors des colonnes chromatographiques et n'a pu être totalement éliminée. Nous avons donc consulté la littérature et avons trouvé un protocole proposant de faire la déprotection des acétates et la substitution en position 1 en « two steps, one pot » dans le méthanol (Schéma 18).



34 67% 3

Schéma 18 : Obtention du méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside *en* « two steps, one pot ».

Avec cette nouvelle méthode, le produit est obtenu et purifié sans problème. Aucune colonne n'est requise. Une simple évaporation permet d'éliminer à la fois les sous produits et les matières premières en excès. Le rendement est correct et sûrement bien meilleur que le rendement total d'un schéma en trois étapes.

3.2.3 Conclusion

Les deux molécules cibles modifiées en position 1 ont été obtenues avec des rendements nous permettant de fabriquer aisément une quantité suffisante pour les tests biologiques.

Une voie d'obtention directe du 1-SMe est proposée et pourra venir remplacer la voie d'obtention traditionnelle plus fastidieuse.

3.3 Position 2

La modification de la position 2 est théoriquement beaucoup plus difficile que celle de la position 1 ou même de la position 6 qui sera traitée dans le chapitre suivant. Comme nous l'avons déjà évoqué, les réactivités des positions 2, 3 et 4 sont très proches. La stratégie que nous avons dû développer passe par des étapes de protection / déprotection complexes mais sans lesquelles il serait impossible de travailler de manière sélective. Bien sûr, déployer une telle stratégie ne va pas sans des pertes importantes en rendement. C'est pourquoi nous proposons un protocole de synthèse divergent, visant à réduire le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention des trois molécules cibles modifiées en position 2 (schéma 19).

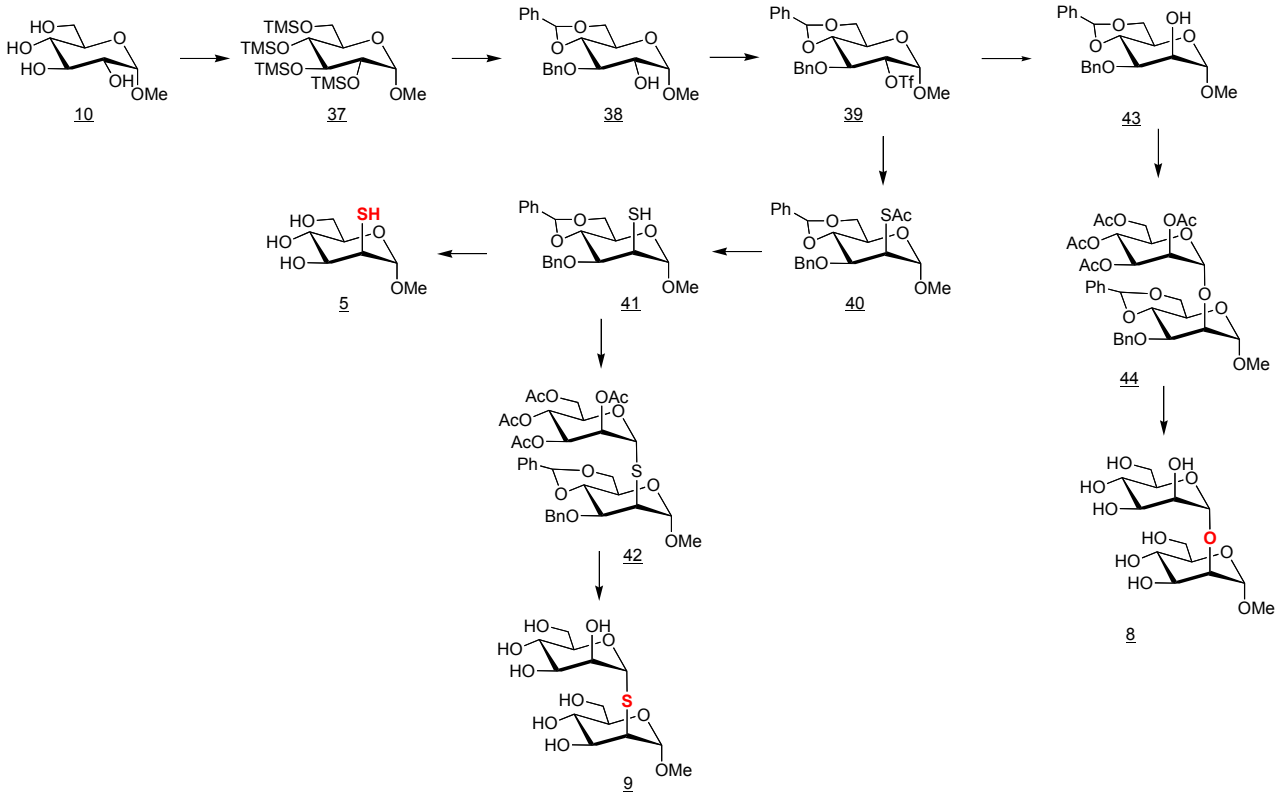


Schéma 19 : Stratégie d'obtention des composés modifiés en position 2.

La matière première utilisée est le 1-méthyl-*O*-α-D-glucopyranose, disponible commercialement. Nous avons eu l'idée d'utiliser un protocole décrit par C.C. Wang [30] qui décrit l'obtention d'un glucopyranoside 43 ne présentant que la position 2 disponible (**43**). Ce composé est obtenu en deux étapes à partir du per-O-triméthylsilyl-1-méthoxy-α-D-glucopyranoside avec un rendement global assez élevé. Le but est ensuite d'effectuer une inversion de la configuration du carbone n°2 [31] en passant par un triflate puis en effectuant une substitution. Le triflate (**39**) est un composé clé de la stratégie de synthèse divergente. A partir de celui-ci, on peut, soit obtenir les thio-analogues (**5** et **9**) en commençant par une substitution du triflate par un thio-acétate, soit obtenir le disaccharide (**8**) en substituant le triflate par un hydroxyle. Le composé **9** est obtenu lors d'une étape de deprotection qui pourrait présenter des problèmes, nous verrons par la suite pourquoi. Les composés **42** et **44** sont obtenus par déprotection sélective puis glycosidation.

La procédure d'obtention du méthyl-4,6-benzylacétal-3-benzyl-α-D-glucopyranoside développée par le Dr Wang [32, 33] s'est avérée efficace et nous avons réussi à obtenir des rendements proches de ceux décrits dans la publication (Schéma 20).

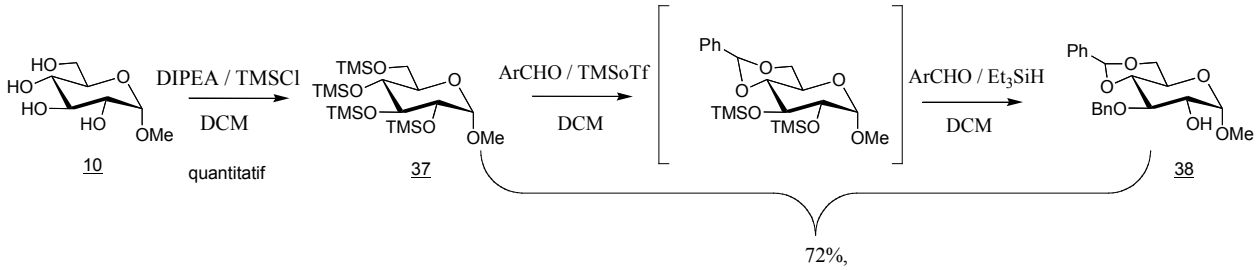


Schéma 20 : Préparation du méthyl-4,6-benzylacétal-3-benzyl-α-D-glucopyranoside

La publication décrit les intermédiaires obtenus et nous nous sommes intéressés au chemin réactionnel emprunté. Cela nous a amené à proposer un mécanisme décrit en schéma 21. On peut y constater que les triméthylsilyles sont essentiels pour la bonne marche de la réaction. En effet, c'est en pratiquant des échanges successifs entre les molécules de benzaldéhyde et les groupements TMS que la benzylation va avoir lieu. Dans ces conditions la position 2 n'est presque pas benzylée.

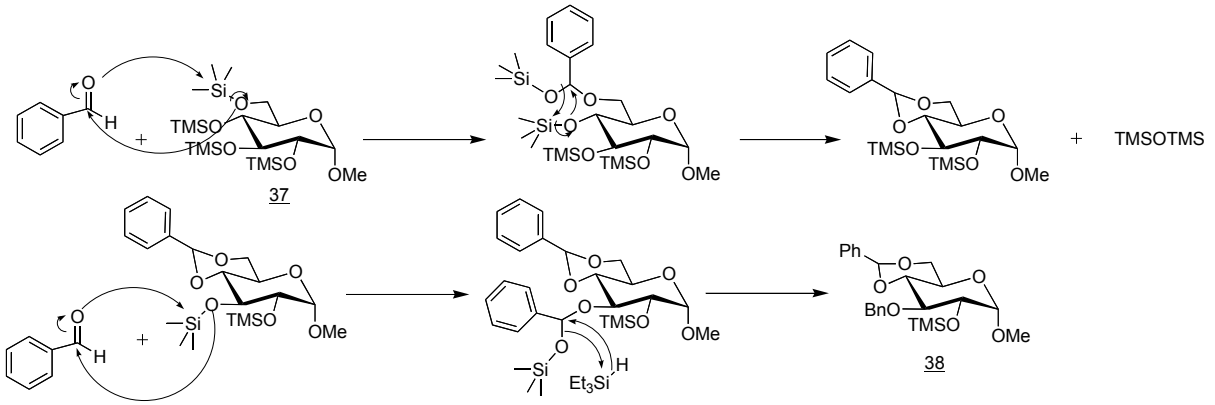


Schéma 21 : Mécanisme proposé pour la benzylation sélective des positions 3, 4 et 6.

Le Dr Wang décrit une étape de déprotection du groupement TMS restant en position 2 à la fin de cette réaction. Or, lorsque nous avons effectué la réaction, le produit obtenu est déjà déprotégé. Nous nous expliquons mal ce phénomène puisque les silyles sont résistants aux conditions basiques. Malgré tout, nous verrons par la suite que la résistance de ces groupements est limitée.

3.3.1 Inversion

L'inversion de configuration du carbone 2 commence avec la triflation de l'hydroxyle libre. Cette réaction se fait aisément en utilisant l'anhydride triflique et on obtient un rendement excellent de 95% (Schéma 22).

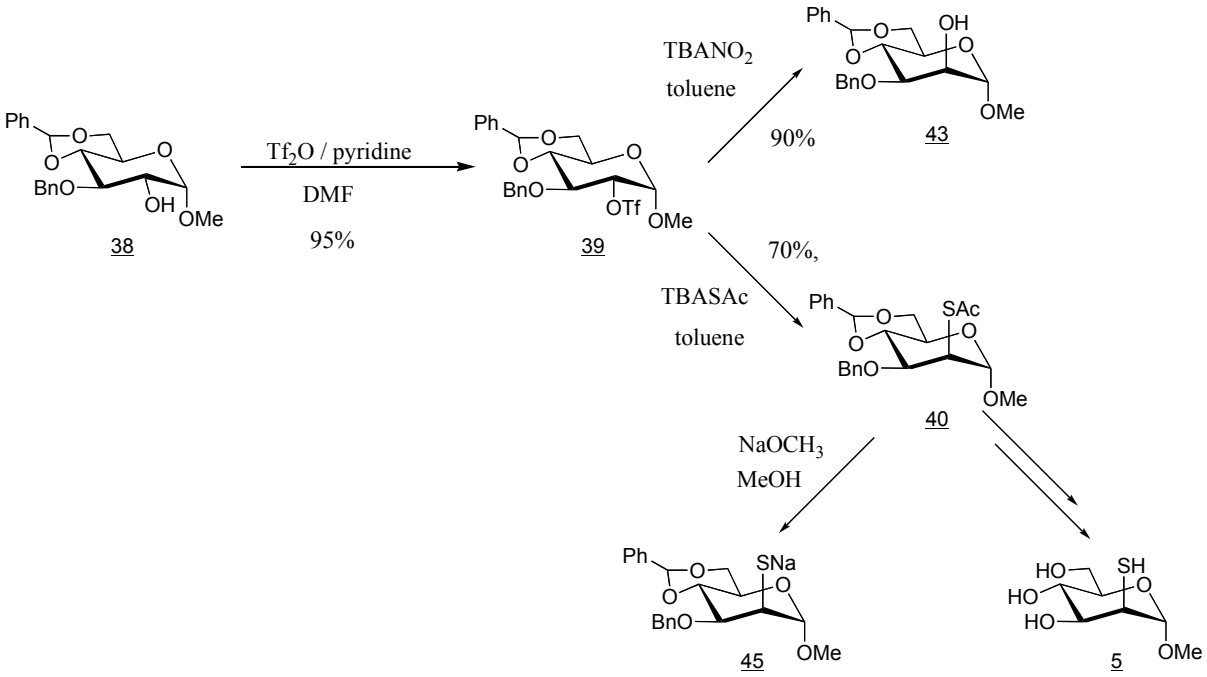


Schéma 22 : Etape d'inversion de configuration des composés en position 2.

3.3.2 Obtention du 4,6-benzylacétal-3-benzyl-2-hydroxy-méthyl-α-D-mannopyranoside

L'obtention du composé **43** se fait à l'aide du nitrite de tétrabutylammonium [34]. Le rendement est élevé (Schéma 22) ce qui est assez surprenant car si l'on compare avec les résultats obtenus par le Dr Pei [31], on constate que l'inversion de configuration du carbone 2 qu'il avait tenté sur un galactopyranoside (Schéma 23) dans les mêmes conditions n'avait pas fonctionné.

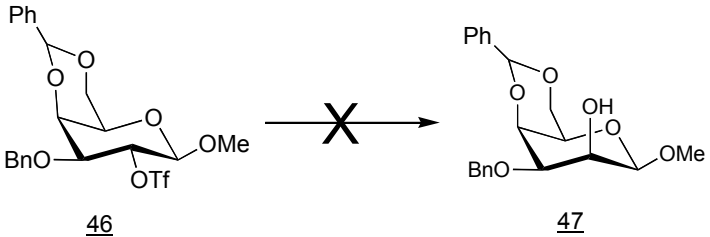
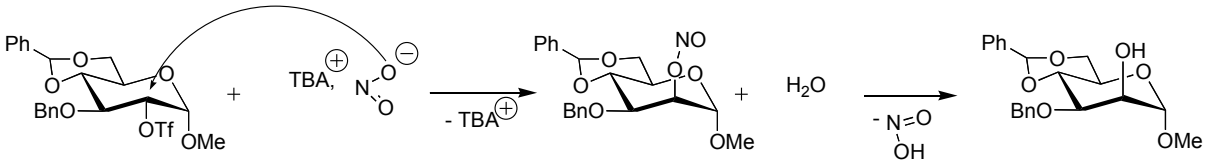


Schéma 23 : Inversion d'un analogue galactopryanoside du composé **39**.

Le mécanisme de la réaction passe par une attaque d'un des oxygènes de l'ion nitrite sur le carbone 2 du sucre avec départ du triflate (Schéma 24). On peut aussi avoir l'attaque de l'azote du nitrite qui a lieu conduisant ainsi au dérivé nitro. L'hydrolyse du nitrite a lieu lors du traitement.

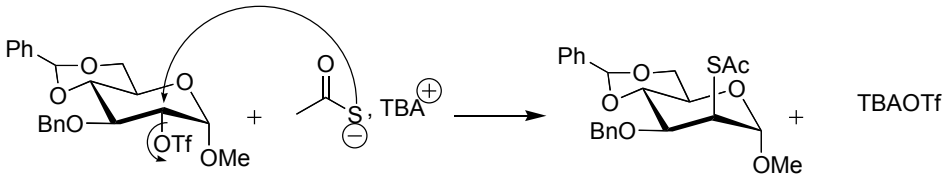


39 43

Schéma 24 : Mécanisme de l'inversion au nitrite de tétrabutylammonium.

3.3.3 Obtention du 4,6-benzylacetal-3-benzyl-2-thioacetate-methyl-α-D-mannopyranoside

Le mécanisme permettant l'obtention du thioanalogue en position est proche de celui utilisant le nitrite de tétrabutylammonium, mais le nucléophile utilise ici est un thioacétate.



39 40

Schéma 25 : Mécanisme de l'inversion au thioacétate

Dans le deux cas, on utilise le TBA comme contre ion du nucléophile. C'est un réactif assez difficile à séparer par colonne car il diffuse. Nous aurions sûrement dû utiliser le potassium comme contre ion mais au vu des mauvais résultats du Dr Z. Pei, nous avons préféré utiliser un nucléophile plus fort, ce que sont en général les réactifs ayant comme contre ion le TBA. La réaction fonctionnant bien, il serait peut-être intéressant d'effectuer ce test, qui devrait grandement faciliter l'étape de purification.

Si le composé **43** est déjà « prêt » pour l'étape de glycosidation, il n'en est pas de même pour le composé **40**. Nous devons effectuer des réactions de déprotection sélectives sur celui-ci (Schéma 26). Or, nous allons voir que les réactions mises en jeu peuvent se révéler problématiques.

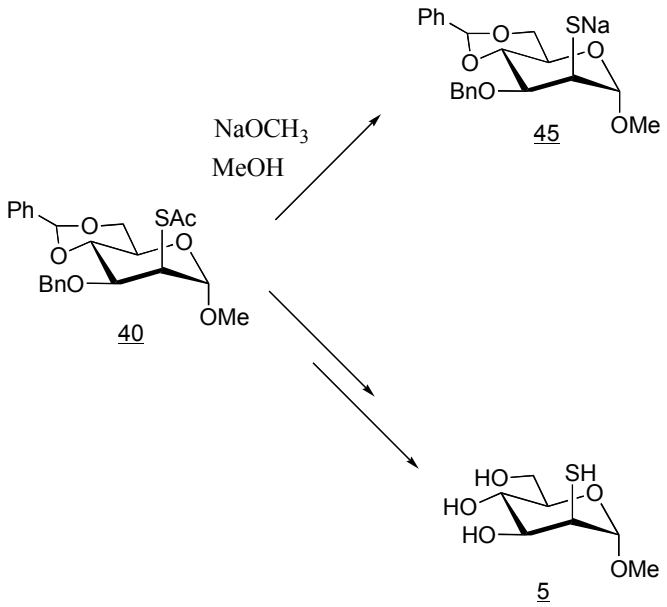


Schéma 26 : Déprotection sélective du composé **40**.

L'obtention du composé **45** se fait sans problème par réaction avec le méthylate de sodium. Seul un essai préliminaire a été effectué et la masse obtenue est trop faible pour que la purification donne un rendement exploitable.

Par contre la préparation du composé **5** est plus complexe à réaliser, il va falloir déprotéger d'une part le thioacétate et d'autre part les benzyles. On sait que la déprotection des benzyles s'effectue aisément par hydrogénolyse avec comme catalyseur le palladium. Mais il est aussi connu que le soufre est un poison du palladium, il faut donc tenir compte de cette donnée pour choisir l'ordre dans lequel nous allons effectuer les déprotections.

Nous avons donc prévu de déprotéger d'abord les benzyles alors que le soufre est bloqué par le groupement acétate puis dans un deuxième temps le soufre alors qu'il ne peut plus poser de problème. Ce protocole a été tenté plusieurs fois, mais l'hydrogénolyse ne fonctionne pas du tout. Nous nous demandons s'il est possible que le soufre agisse comme poison même sous sa forme protégée. Une autre possibilité pour effectuer la déprotection pourrait être le traitement en milieu acide.

3.3.4 Conclusion

Une voie de synthèse divergente, permettant d'obtenir les deux précurseurs des di-saccharides liés en position 2, a pu être développée. L'étape de glycosidation sera traitée ultérieurement.

Les étapes de déprotection conduisant au monosaccharide cible **5** n'ont pu être menées à bien. Cependant, seuls quelques essais préliminaires ont été tentés et les conditions de l'hydrogénolyse pourraient encore être améliorées.

3.4 Position 6

La stratégie mise en œuvre pour l'obtention des composés modifiés en position 6 est elle aussi divergente (Schéma 27). L'idée est de faire une activation de manière sélective de la position 6 [35], puis de protéger les autres positions. On effectue ensuite la substitution par le thioacétate de sodium qui, après déprotections sélectives, va permettre d'obtenir le composé **54** qui pourra être utilisé pour l'obtention du disaccharide ou donner directement une molécule cible, le 6-thioacétate-1-méthyl-α-D-mannopyranoside (composé **4**). A partir du composé **50**, on peut aussi effectuer une substitution par l'acétate de potassium pour obtenir le composé **51** qui, après déprotection, pourra être utilisé dans la synthèse du disaccharide **6**.

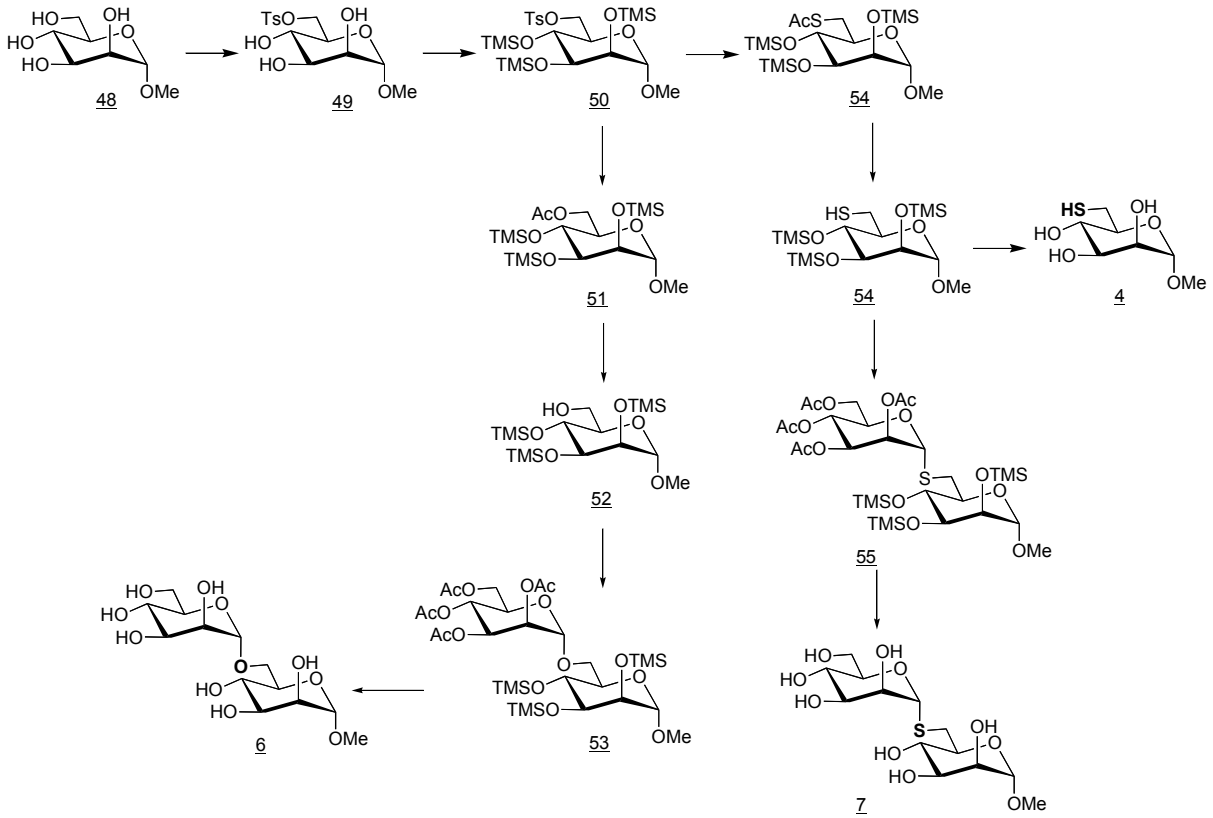


Schéma 27 : Stratégie d'obtention des mannopyranoses modifiés en position 6

3.4.1 Obtention des précurseurs des disaccharides : composés 52 et 54

La première partie de la synthèse a bien fonctionné, l'activation de la position 6 se fait sélectivement en présence de chlorure de tosyle [36]. Le rendement est convenable et l'étape suivante de protection avec le chlorure de triméthylsilyle se passe bien elle aussi.

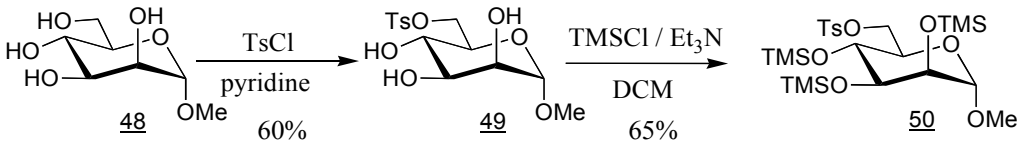


Schéma 28 : Obtention du 2,3,4-triméthylsilyl-6-tosyl-1-methyl-*O*-α-D-mannopyranoside.

Pour s'assurer que le groupement tosyle a bien été introduit en position 6, on utilise la technique du cosy, ou en anglais correlation spectroscopy, c'est à dire de la RMN 2D qui permet de tracer une « carte » sur laquelle les protons sont présents sur une diagonale centrale et les interactions entre protons sont des points d'intersections situés en dehors de cette diagonale. En remontant les différentes interactions entre protons, on peut ainsi retrouver la place de chacun d'eux sur le sucre et avoir une idée précise de la position d'un groupement protecteur ou d'une modification de fonction sur la molécule.

En figure 19, est représenté le spectre COSY du 6-tosyl-1-methyl-*O*-α-D-mannopyranoside :

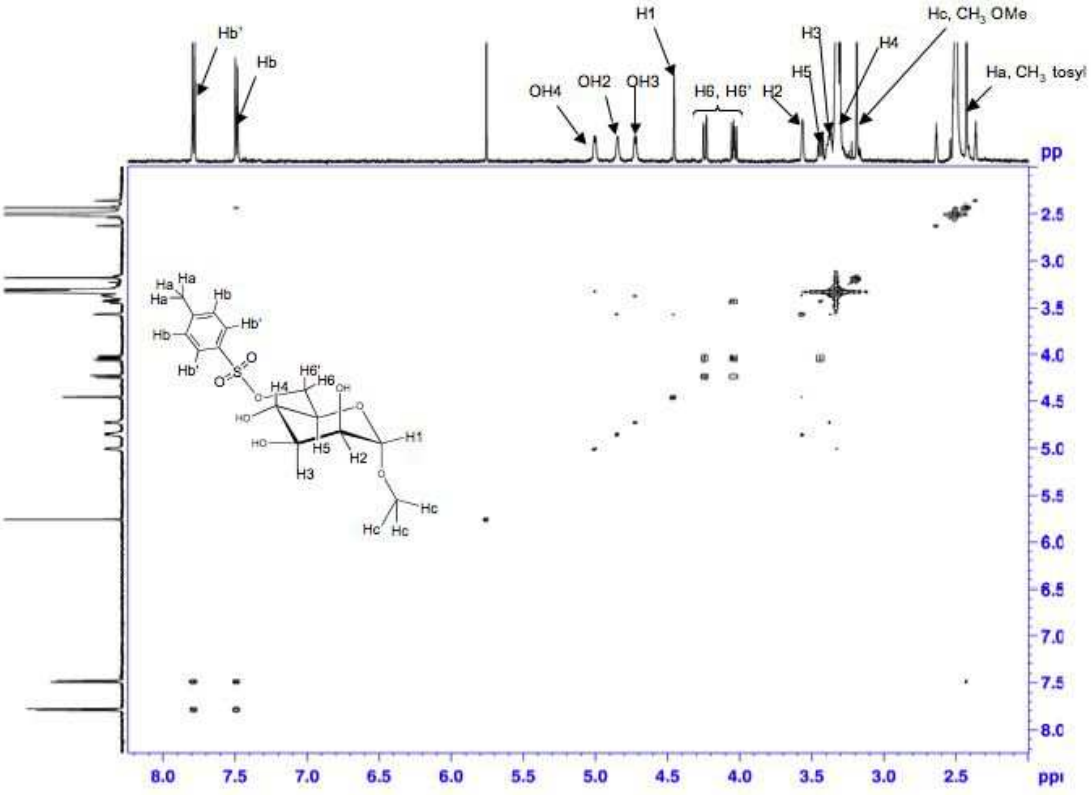


Figure 19 : Spectre cosy du 6-tosyl-1-methyl-*O*-α-D-mannopyranoside.

Sur le spectre du 6-tosyl-1-methyl-*O*-α-D-mannopyranoside représenté ci-dessus on constate d'abord que celui-ci est très utile pour retrouver l'emplacement des différents protons situés sur les positions 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 6' du cycle. S'il est assez facile grâce à la RMN 1D de replacer le proton 1 (en général le plus déblindé) et les protons 6 et 6' (forme du signal en double doublet), il serait assez difficile de positionner les 4 autres. Ici, on y parvient facilement, en remontant les interactions entre protons. Mais pour pouvoir positionner le tosyle, on va utiliser une caractéristiques très intéressantes du spectre COSY, c'est à dire la capacité à voir les interactions au travers des hétéroatomes. On obtient ici 3 singulets correspondant à OH2, 3 et 4. L'oxygène en 1 étant substitué par un méthyle, on a donc le tosyle qui est en position 6.

Il faut ensuite substituer le groupement tosyl par un acétate (schéma 29), de manière à obtenir un hydroxyle libre en position 6 après déprotection sélective.

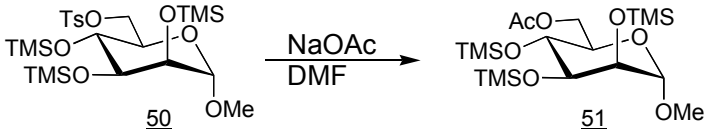
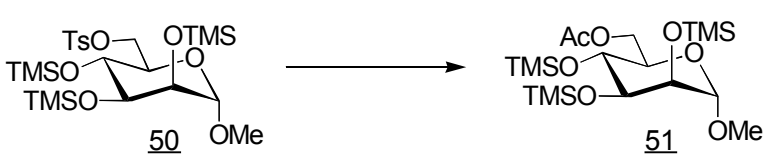


Schéma 29 : Condition pour l'obtention du 6-acétate.

Malheureusement l'étape de substitution se déroule mal. Il est connu que les groupements triméthylsilyles sont de mauvais groupements protecteurs car ils sont trop labiles. Nous avons tout de même voulu essayer sur le mannose car le groupe de recherche n'avait pas d'expérience à ce niveau. Or, lorsque l'on tente la substitution, celle-ci n'a pas lieu et à la place du composé **51**, on obtient la déprotection totale du sucre (Composé **48**).

3.4.1.1 Recherche de conditions adaptées à la substitution

Devant ce résultat négatif, nous avons essayé de trouver des conditions de substitution qui préserveraient les groupements TMS (Table 1). Si la déprotection des TMS est tout à fait compréhensible, l'obtention directe d'une fonction alcool à partir du tosyle dans ces conditions nous apparaît moins évidente. Les quelques publications relatives à ce sujet ont toutes des conditions très spécifiques [37, 38].



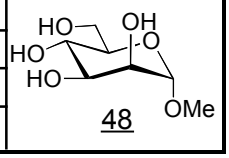
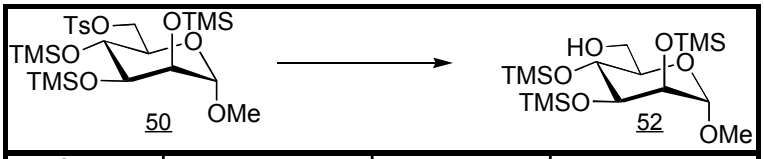
réactif	catalyseur	solvant	produit
NaOAc	/	DMF	
TBAOAc	NAI	THF	
TBAOAc	/	THF	
TBAOAc	/	CH_3CN	

Table 1 : étude de la substitution du groupement tosyl en position 6

Nous avons essayé d'augmenter le caractère nucléophile du réactif en remplaçant le sodium [39] par le tétrabutylammonium [40] comme contre ion de l'acétate. Nous pensions ainsi favoriser la substitution et limiter les réactions secondaires. Nous avons aussi essayé de modifier la nature du solvant. Les solvants testés sont tous aprotiques et ont une polarité plus ou moins élevée. La catalyse à l'iodure de sodium a aussi été essayée mais sans résultat. Dans tous les cas, on obtient le composé **48**.

Nous avons donc pensé tester différentes conditions de déacétylation en essayant de s'inspirer de conditions décrites dans la littérature. Le but est de vérifier que ces conditions étaient assez douces pour ne pas déprotéger les TMS (Table 2). L'utilisation de K_2CO_3 [41] et de NaOMe dans le méthanol [42] conduit à la déprotection des TMS et à l'obtention du composé **48**.



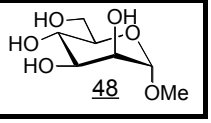
réactif	catalyseur	solvant	produit
K_2CO_3	/	MeOH	
NaOMe	/	MeOH	
MeOH	Mg	MeOH	

Table 2 : déprotection sélective du groupement tosyl.

Le travail de M. Sridhar décrit une méthode de déprotection des tosyls qui permet d'obtenir directement l'hydroxyle correspondant [43]. Bien que cette méthode ne soit pas décrite en présence de TMS, nous l'avons testée. Malheureusement elle ne donne pas plus de résultat.

3.4.1.2 Obtention du Méthyl-2,3,4-tris-(trimethylsilyl)-6-thioacetate-α-D-mannopyranoside

La substitution du tosyle doit aussi conduire à l'obtention du thiol en position 6. Dans ce cas, la réaction a lieu. Le rendement reste moyen (Schéma 30), mais on peut attribuer ce résultat positif à la différence de basicité du thioacétate de potassium et de l'acétate de potassium. Le thioacétate étant moins basique, il est plus disponible pour la substitution et entraîne donc moins de réactions secondaires.

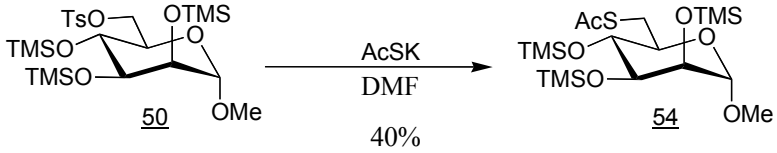


Schéma 30 : Substitution du groupement tosyle par le thioacétate en position 6.

3.4.1.3 Recherche d'un groupement protecteur adapté

Les problèmes rencontrés en présence de groupement triméthylsilyle, nous ont amené à développer une stratégie qui utiliserait un groupement protecteur plus résistant. Un groupement nous a semblé particulièrement adapté, le groupement ter-butyldiméthylsilyle : TBDMS [44] qui est connu pour être un silyle beaucoup moins labile que le groupement TMS. La stratégie utilisée reste la même (Schéma 31).

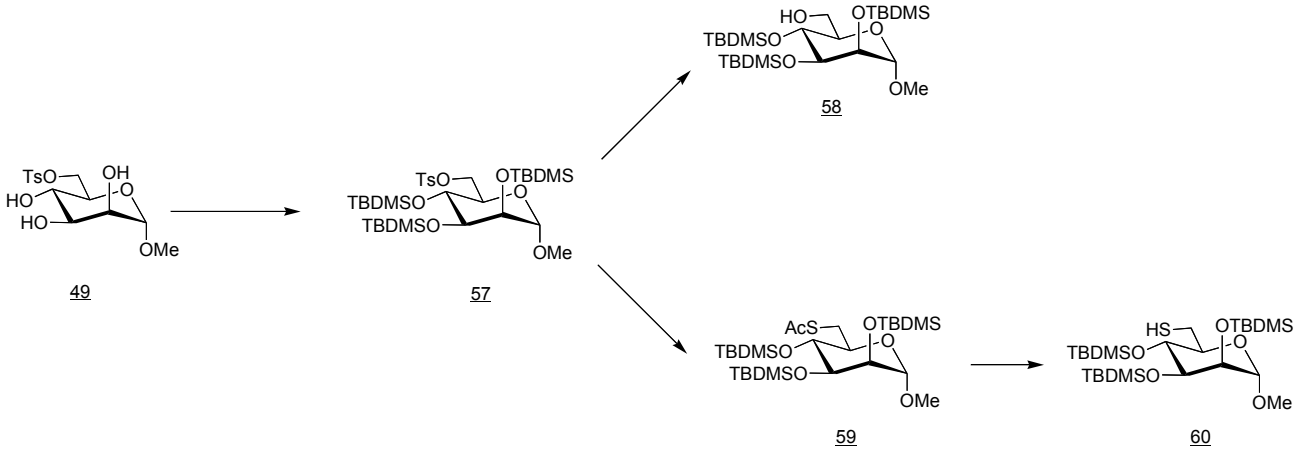


Schéma 31 : Utilisation du TBDMS comme groupement protecteur.

Les conditions utilisées pour la réaction de protection sont du même type que celles utilisées pour le TMS (Schéma 32).

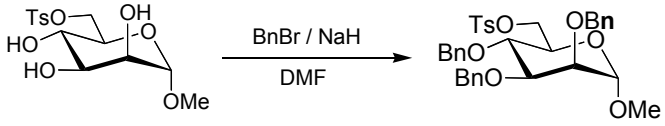


49 57

Schéma 32 : Protection des positions 2,3 et 4 à l'aide du groupement TBDMS.

Malheureusement la réaction n'a pas lieu et au lieu d'obtenir le composé **57** décrit ci-dessus, on obtient la protection d'une position seulement. Nous n'avons pas réussi à déterminer précisément par RMN quelle position est protégée. Nous pensons que ce sont des problèmes d'encombrement stériques qui empêchent cette réaction.

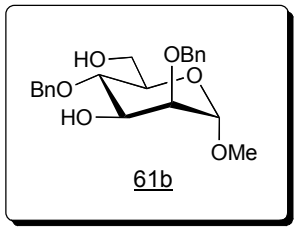
Nous nous sommes alors résolus à utiliser un groupement que nous avions laissé de côté au départ car il pourrait poser des problèmes lors de la déprotection, le groupement Bn [45].



49 61

Schéma 33 : Benzylation des positions 2, 3 et 4.

Cette réaction n'a pas lieu non plus. On obtient uniquement la protection des positions 2 et 4 ; et de manière plus inattendue, on constate que le groupement tosyle est déprotégé (composé **61b**).



61b

Figure 20: Méthyl-2,4-dibenzyl-α-D-mannopyranose

Ces résultats semblent confirmer le problème d'encombrement stérique dont le tosyle pourrait être la cause. Il a donc fallu revoir totalement la stratégie utilisée.

3.4.2 Nouvelle stratégie

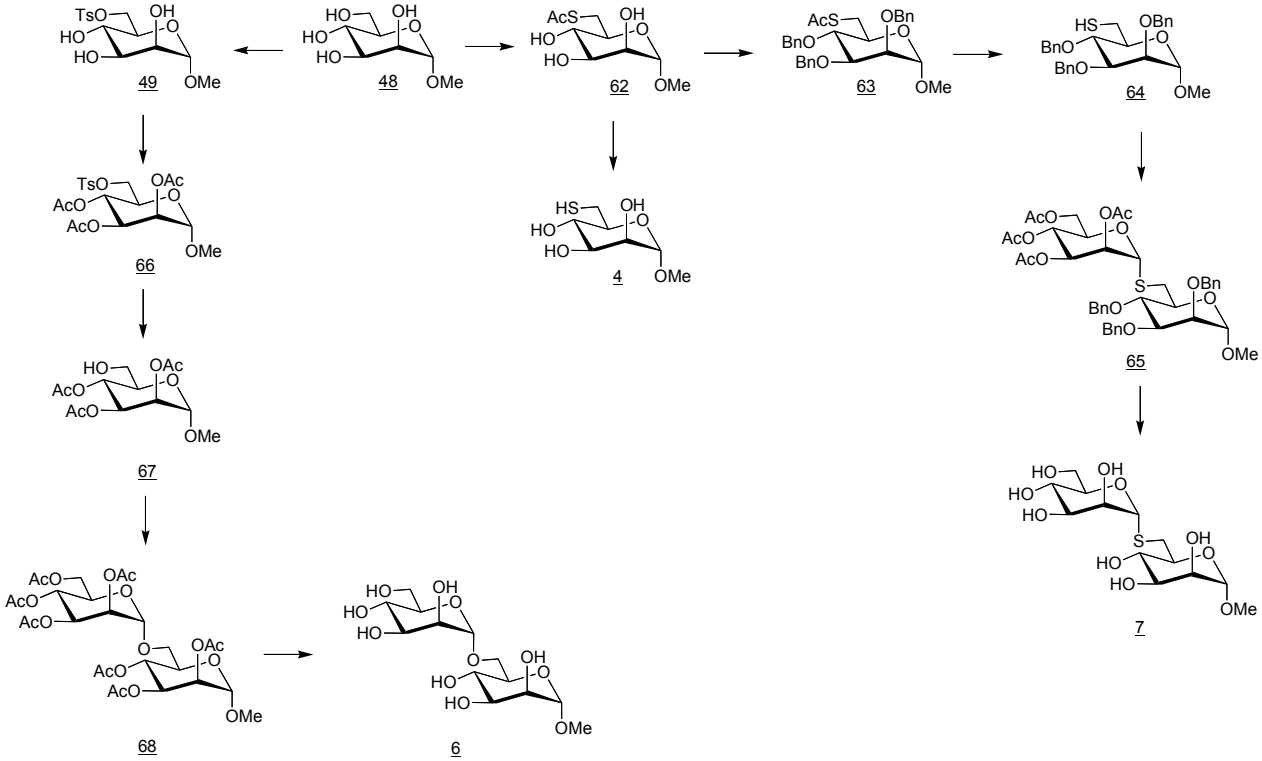


Schéma 34 : 2ème stratégie d'obtention des molécules cibles modifiées en position 6.

Dans cette nouvelle stratégie, on se propose d'utiliser la même matière première, le 1-O-méthyl-α-D-mannopyranoside. On positionne un tosyle en position 6 puis les autres positions sont acétylées de manière à les protéger (Composé **66**). On va ensuite effectuer la substitution du tosyle pour obtenir une fonction hydroxyle qui pourra être utilisée pour la glycosidation (Composé **67**). Cette partie de la nouvelle stratégie est très proche de la première. L'utilisation d'acétate doit permettre de limiter les problèmes d'encombrement.

Malheureusement, la même voie de synthèse ne peut pas être utilisée pour obtenir le thiol, car comme on le voit sur les différentes stratégies, on va utiliser un thioacétate qui serait déprotégé de manière non sélective et rendrait le composé inutilisable pour la glycosidation.

On se propose donc d'effectuer directement la substitution du thio-acétate par une réaction de Mitsunobu sur le 1-*O*-méthyl-α-D-mannopyranoside [46] pour obtenir le composé **62**. Celui-ci peut alors être déprotégé pour obtenir directement une molécule cible, le composé **4**. Il peut aussi être utilisé pour l'obtention du disaccharide **7**. On va alors protéger toutes les positions libres avec des groupements benzyles, puis déprotéger sélectivement le thioacétate qui pourra ensuite être utilisé pour la glycosidation.

3.4.2.1 Obtention du 6-hydroxy-1-*O*-méthyl-2,3,4-triacétate-α-D-mannopyranosyde

L'activation va à nouveau se faire grâce au chlorure de tosyle, mais dans un premier temps celui-ci joue le rôle de groupement protecteur de la position 6 [47]. On effectue l'acétylation des hydroxyles libres à l'aide de l'anhydride acétique [48]. Enfin la substitution du tosyle par le groupement hydroxyle se fait grâce au nitrite de potassium selon un mécanisme décrit en 3.2.1.1.

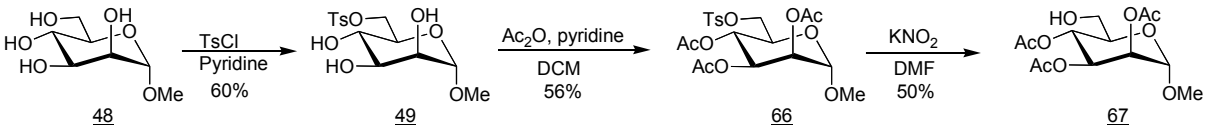


Schéma 35 : Obtention du 6-hydroxy-1-*O*-méthyl-2,3,4-triacétate-α-D-mannopyranosyde.

Les rendements obtenus lors de cette suite réactionnelle sont certes moyens, mais on obtient le précurseur du disaccharide (composé **67**). Lors de l'acétylation, on utilise la pyridine pour arracher les protons des hydroxyles (schéma 36). Puis c'est l'ion énolate formé qui attaque l'anhydride acétique pour donner l'acétate.

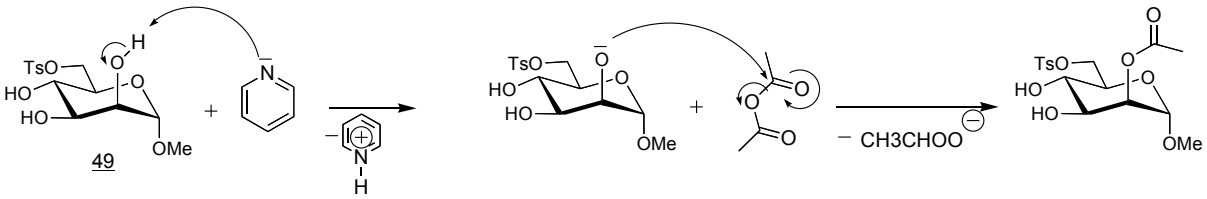


Schéma 36 : Mécanisme de la réaction d'acétylation.

3.4.2.2 Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu est effectuée en présence de triphénylphosphine et de diisopropyl azodicarboxylate qui sont les réactifs permettant l'inversion de la configuration de l'ester dans cette réaction (Schéma 38). L'acide utilisé est l'acide thioacétique [46]. Malgré le fait qu'aucune inversion de configuration ne soit utile dans ce schéma de synthèse, utiliser la réaction de Mitsunobu apporte ici la régiosélectivité nécessaire. La réaction fonctionne bien et le rendement obtenu est élevé (Schéma 37).

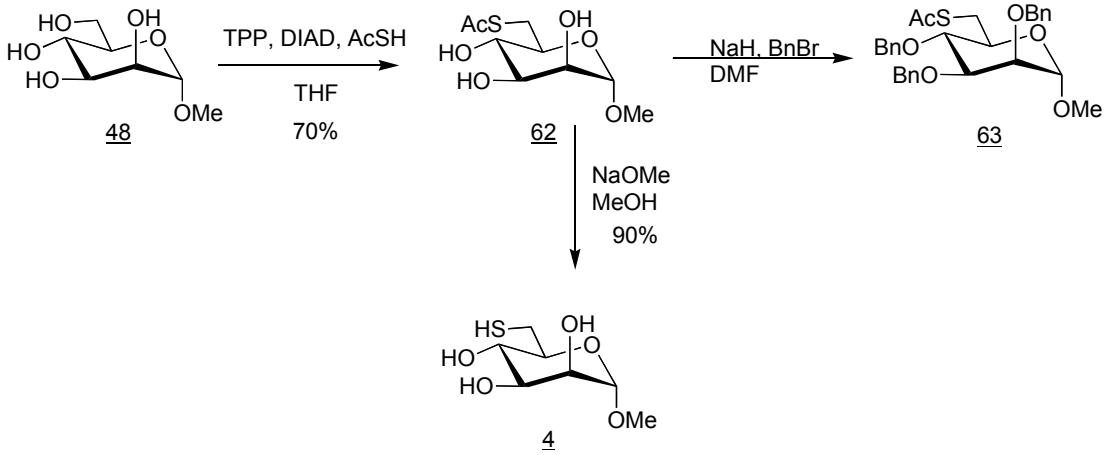


Schéma 37 : Condition d'obtention des dérivés thio en position 6.

La régio-spécificité est apportée par le fait que la réaction de Mitsunobu n'a lieu que sur les alcools primaires et secondaires, et est très favorisée sur les alcools primaires. Le mécanisme généralement accepté est illustré au schéma 38. Il se fait en 3 étapes. Lors de la première étape, la TPP réagit rapidement avec le DIAD pour former un adduit zwitterionique, communément appelé la « bétaïne de Mitsunobu », lequel se protone en présence du nucléophile pour former un sel de phosphonium. Dans l'étape d'activation de l'alcool, le groupement phosphore est transféré à l'alcool pour former un sel d'oxyphosphonium et l'hydrazine est réduite dans le même temps. Finalement, le nucléophile déprotoné réagit avec le sel d'oxyphosphonium dans une réaction S_N2 pour conduire au produit de stéréochimie inverse et l'oxyde de triphénylphosphine.

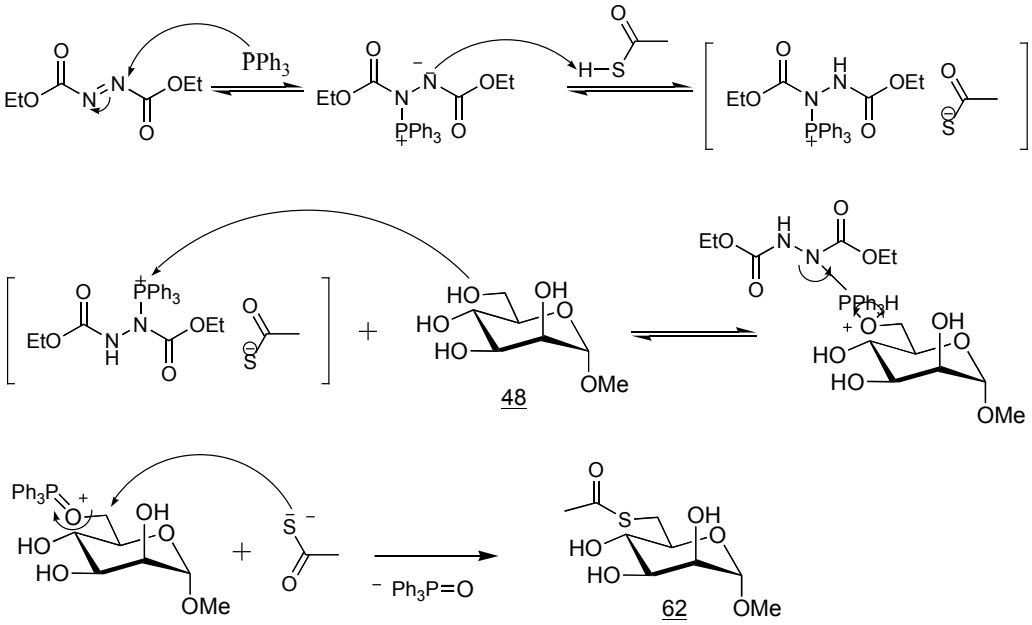


Schéma 38 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu.

La fin du schéma réactionnel se divise en deux parties (Schéma 39). Le composé **4** est obtenu par déprotection de l'acétate en présence de méthoxyde de sodium. Alors que le composé **63**, précurseur du disaccharide, est obtenu par protection des hydroxyles libres avec le bromure de benzyle en présence d'hydrure de sodium.

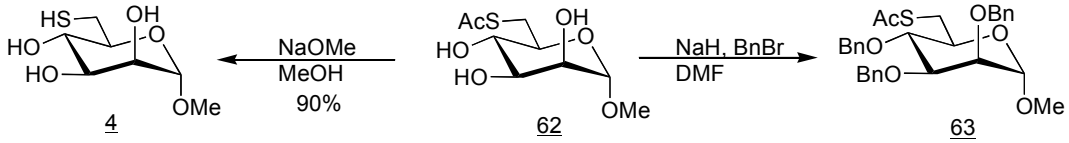


Schéma 39 : Condition d'obtention des dérivés thios en position 6.

Le composé **4** issu de la déprotection est obtenu avec un rendement élevé. L'intérêt des conditions utilisées ici est qu'elles ne nécessitent pas d'effectuer une colonne séparative. L'étape de purification consiste uniquement en une évaporation du solvant et du sous produit obtenu (Schéma 40).

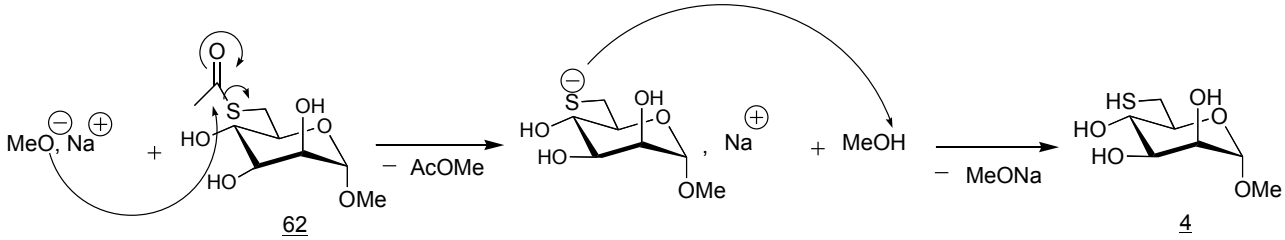


Schéma 40: Mécanisme de déprotection du thioacétate en présence de méthoxyde de sodium

Si la déprotection du composé **62** ne pose pas de problème, sa protection avec le bromure de benzyle (Schéma 39) est difficile, la réaction a lieu, mais le rendement est faible et l'essai préliminaire n'a pas donné assez de produit pour pouvoir effectuer une purification avec un rendement acceptable**.**

3.4.3 Conclusion

La stratégie mise en place à l'origine n'a pu être menée à bien. Les étapes de protection de ce sucre sont le point critique de la modification de la position 6. En particulier, les groupements silylés sont à éviter.

La deuxième stratégie mise en place fonctionne bien, notamment l'utilisation de la réaction de Mitsunobu pour la substitution de la position 6 est une réussite. Cette stratégie à permis d'obtenir le monosaccharide cible et les deux précurseurs de di-saccharides.

3.5 Glycosidation

Une fois les quatre précurseurs obtenus, on peut procéder à l'étape de glycosidation. Le but est d'obtenir un dimère qui sera plus proche du composé naturel qui pourrait interagir avec la protéine en milieu biologique [49]. Nous avons choisi de dédier un chapitre de ce rapport à cette réaction car elle a posé des problèmes intéressants à traiter. Le schéma général de la réaction de glycosidation que nous avons utilisée est décrit en schéma 41. Le composé de droite constituera ici le donneur (voir partie 1.2.2.3) et le composé de gauche l'accepteur de la réaction.

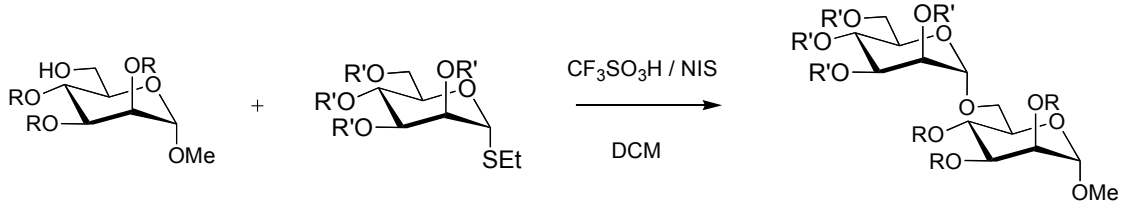


Schéma 41 : Schéma général de la glycosidation.

On utilise comme catalyseur le N-iodosuccinimide en présence d'un acide fort trifluorométhanesulfonique (ou acide triflique) pour effectuer la réaction. Ces conditions sont depuis longtemps décrites dans la littérature [50, 51, 52], mais cette réaction est parfois difficile à obtenir. Le mécanisme réactionnel est le suivant :

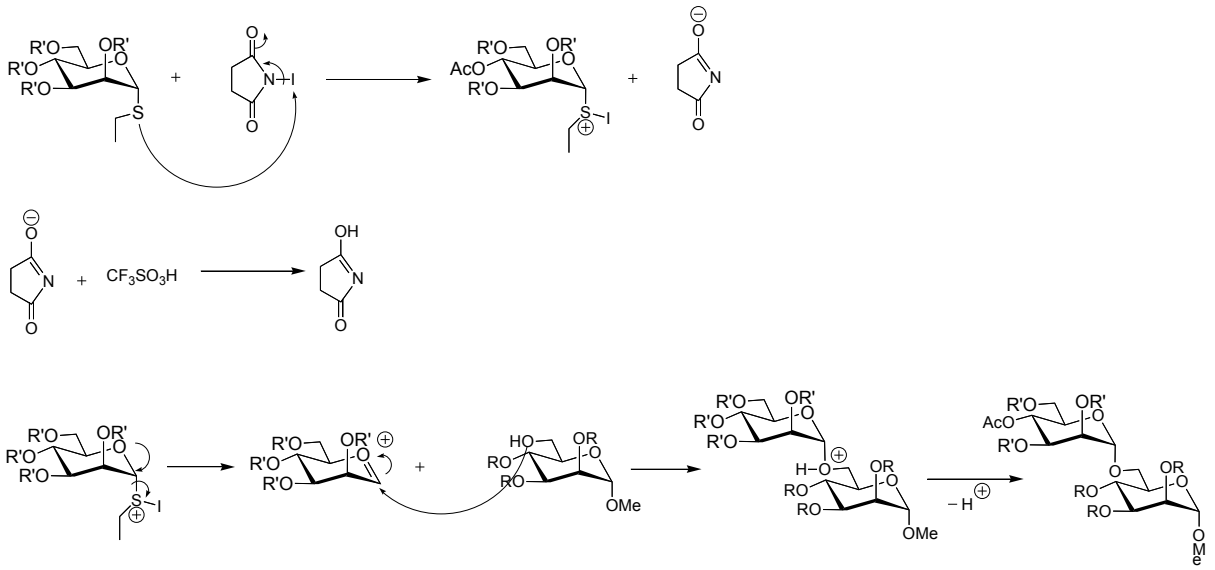


Schéma 42 : Mécanisme général de la réaction de glycosidation.

3.5.1 Préparation du donneur glycosidique

La préparation du donneur glycosidique est une étape clé de la glycosidation. Il faut choisir les bons groupements protecteurs en fonction des conditions utilisées pour la réaction mais aussi lors de la déprotection [53]. Dans notre cas, les conditions utilisées pour la réaction de glycosidation sont fortement acides. On peut donc utiliser par exemple les éthers benzyliques ou encore les esters. Par contre, lors de l'étape de déprotection, la présence de soufre pourrait une nouvelle fois poser des problèmes avec les esters benzyliques, c'est pourquoi nous avons décidé de travailler avec des acétates comme esters (Schéma 43) .

Le groupement situé sur le carbone anomérique a lui aussi son importance. Il doit être assez labile pour pouvoir être substitué facilement lors de la réaction (Schéma 41). Pendant longtemps un halogène était utilisé dans une réaction basée sur la réaction de Koenigs-Knorr [54]. Un important travail a été fait pour permettre l'utilisation de nouvelles conditions. C'est ainsi que fut développée la méthode utilisée ici dans laquelle une extrémité non-réductrice de l'oligosaccharide est utilisée pour allonger la chaîne. Le groupement partant que nous avons utilisé est l'ester thio-éthanoïque.

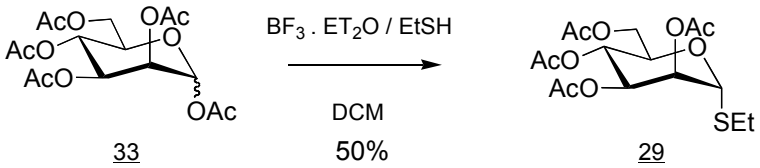


Schéma 43 : Préparation du donneur glycosidique.

La préparation du donneur se fait à partir du 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétyl-α-D-mannopyranose, lui-même obtenu facilement par acétylation de l'α-D-mannopyranose. On utilise le diéthyléther de BF_3 et l'acide thioacétique, le rendement obtenu est de 50%. Le BF_3 permet de d'orienter la réaction en chélatant deux oxygènes de la molécule (Schéma 44), il libère ainsi une face du sucre ce qui fait que l'on obtient sélectivement l'anomère α lors de l'attaque du thioacétate.

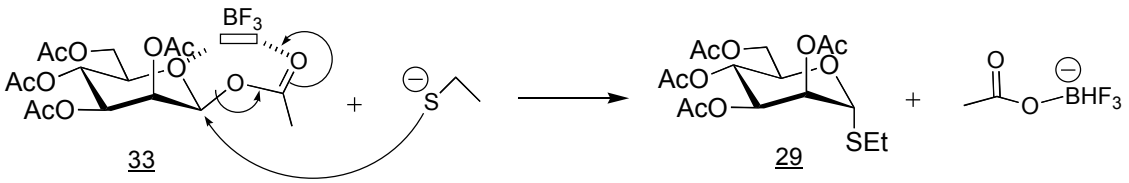


Schéma 44 : Mécanisme d'obtention du donneur glycosidique.

3.5.2 Essais préliminaires de glycosidation

Les premiers essais de glycosidation ont été menés, en petites quantités, sur les composés modifiés en position 2. Le composé 43 et son thio-analogue, le composé 41, ont été utilisés comme accepteur dans la réaction décrite en 3.4, le donneur utilisé est le composé 29 décrit ci-dessus.

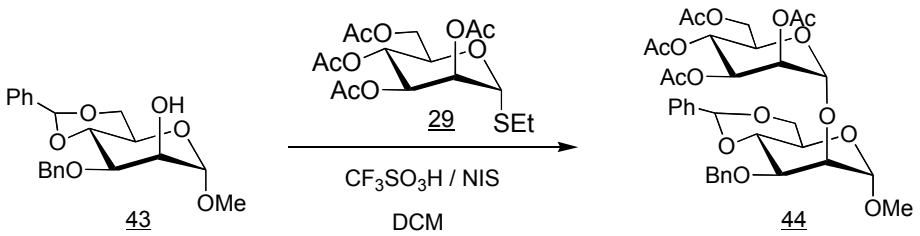


Schéma 45 : Réaction de glycosidation en position 2 avec le dérivé hydroxylé.

La différence de réactivité entre le composé 13 et le composé 17 est un facteur à prendre en compte lors des premiers essais. En effet, le thiol ne devrait théoriquement pas être un aussi bon nucléophile que l'alcool, ce qui pourrait entraîner des différences de rendements ou peut être un problème avec la réaction.

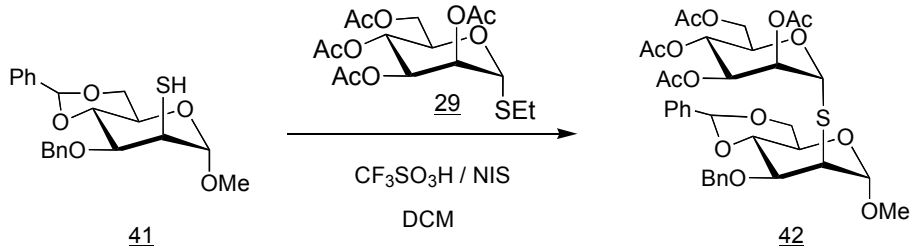


Schéma 46 : Réaction de glycosidation en position 2 avec le dérivé thio.

Malheureusement aucune des deux réactions testées n'a donné de résultat. Il n'y a pas de différence significative entre l'utilisation du composé naturel et son thio-analogue. Nous nous sommes donc orientés vers la modification des groupements présents sur le donneur pour augmenter la réactivité.

3.5.3 Amélioration du donneur

Pour résoudre notre problème de réactivité lié au donneur glycosidique, nous nous sommes penchés vers la littérature pour d'une part confirmer notre idée et essayer de trouver une solution à celle-ci, c'est-à-dire des groupements protecteurs plus adaptés. Tout d'abord les travaux du Dr X. Deng confirment que le donneur doit porter des groupements protecteurs choisis avec soin pour que la réaction ait lieu [55]. En effet, ces travaux effectués dans le but d'obtenir des oligosaccharides contenant jusqu'à onze motifs utilisent toujours un donneur protégé à l'aide de groupes apportant une assistance électronique.

Pour choisir la formule de notre nouveau donneur, deux articles ont particulièrement attiré notre attention. Dans son travail H. H. Jensen propose le concept de donneur à réactivité augmentée. Il y décrit l'influence des groupements esters, attracteurs d'électrons, qui ont tendance à diminuer la réactivité du donneur. Alors que les groupements benzyles donneurs d'électrons ont tendance à renforcer sa réactivité [54]. L'introduction du concept de donneur à réactivité fortement augmentée se trouve aussi décrite dans les travaux de L. K. Mydock [56] qui propose un classement simple des groupements en fonction de leur éléctronégativité et de leur positionnement (Figure 21).

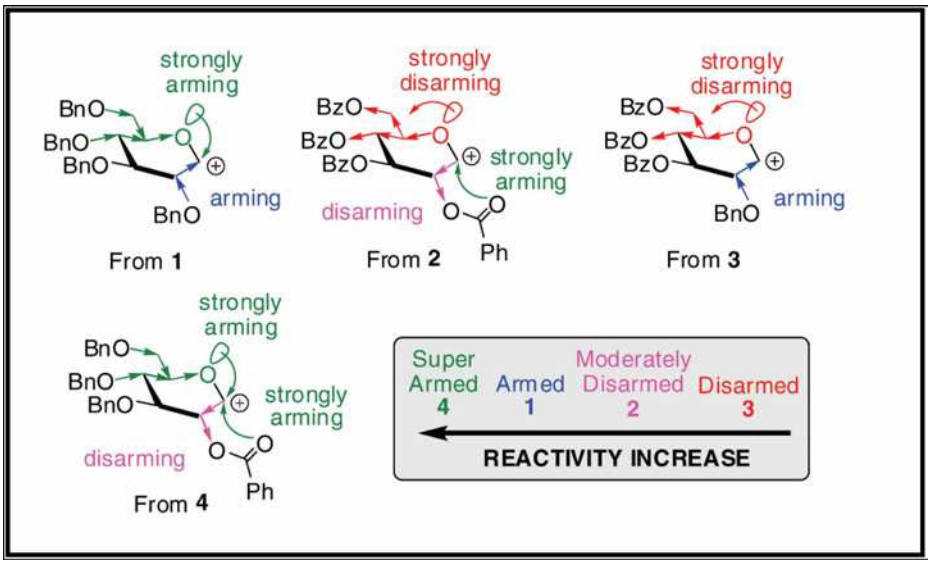
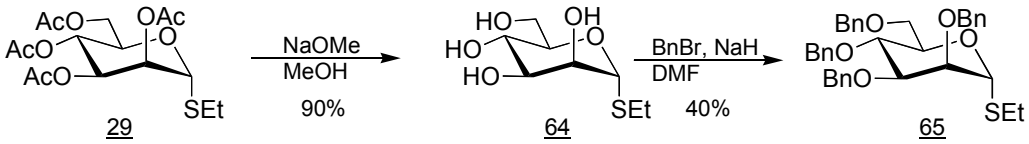


Figure 21 : Effet électronique des groupements protecteurs sur la réactivité de la position 1.

On retrouve bien les effets électroniques des différents groupements décrits ci-dessus. Les éthers (benzyle) qui renforcent fortement la réactivité quelle que soit leur position sur le sucre. Les esters (benzoyle) qui en position 3, 4 et 5 diminuent fortement la réactivité, mais qui peuvent fortement la renforcer s'ils sont situés en position 2. A partir de ces éléments théoriques, nous avons donc entrepris de modifier la structure du donneur.

A partir du composé **29** qui constituait le précédent donneur, nous avons entrepris d'effectuer la déprotection des acétates et de les substituer par des groupements benzyles. La réaction de déprotection fonctionne bien, son rendement est élevé. Par contre la réaction de benzylation a un rendement modéré.

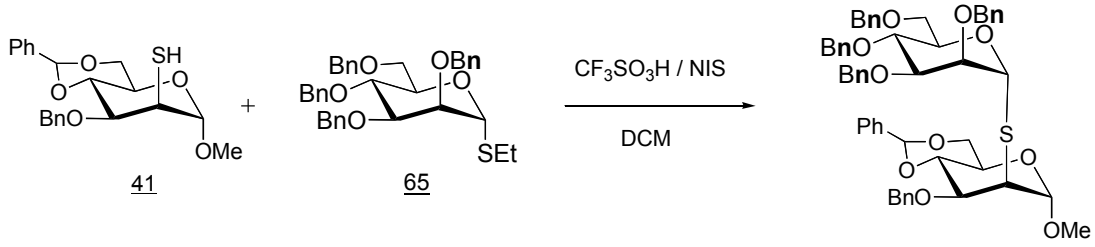


29 64 65

Schéma 47 : Obtention du 1-S-Ethyl-2,3,4,6-tétrabenzyl-α-D-mannopyranoside.

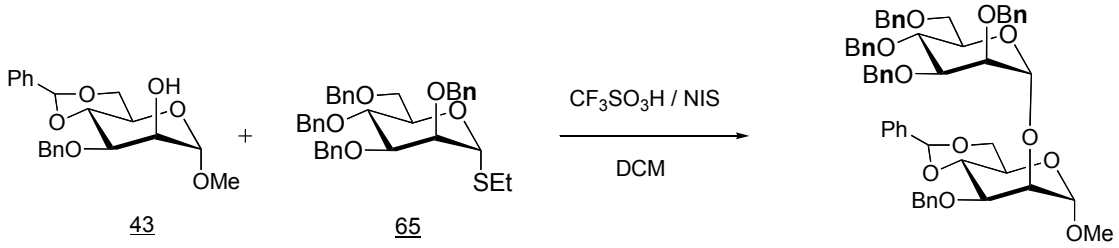
3.5.4 Réactions de glycosidation

A partir du nouveau donneur glycosidique, les réactions de glycosidation ont été menées avec succès sur les composés modifiés en position 2. Cette réaction est très rapide, elle est terminée en 15 min. Mais elle est aussi très sensible notamment à l'humidité.



41 65 66

Schéma 48 : Conditions d'obtention du thio-disaccharide **66**.



43 65 67

Schéma 49 : Conditions d'obtention du O-disaccharide **67**.

Lorsque le donneur est benzylé, la réaction fonctionne bien. Cependant, seul les essais sur quantité réduite ont été menés. La purification n'étant pas parfaite le rendement n'est pas décrit ici. Il faut ajouter qu'une spectrométrie de masse a été effectuée sur les composés **66** et **67** et confirme l'obtention du disaccharide.

3.5.5 Conclusion

Les problèmes rencontrés lors de la glycosidation, nous ont permis de mieux cerner qu'elles étaient les effets électroniques qui gouvernent la réactivité de cette réaction. En particulier, le donneur glycosidique doit être équipé de groupements donneurs d'électrons (Figure 19) pour que la réaction ait lieu.

Deux des quatre di-saccharides ont été obtenus**,** mais ne présentent pas la pureté nécessaire à une publication du spectre RMN. Cependant, les bons résultats étant confirmés par la spectrométrie de masse, il ne fait pas de doute que la réaction donne les produits attendus et qu'elle peut être renouvelée sur une plus grande quantité.

4. Etude de l'intéraction des molécules cibles avec différentes protéines.

4.1 Généralités sur la technique utilisée

4.1.1 Principe de la microbalance à quartz : la QCM

Une microbalance à quartz est un cas particulier de microbalance piézoélectrique. Elle est en général réalisée en déposant deux électrodes conductrices de part et d'autre d'un quartz (Figure 22). Ce matériau est un membre de la famille des cristaux présentant un effet piézoélectrique. C'est-à-dire la capacité d'émettre une oscillation acoustique lorsqu'on lui applique un courant alternatif.

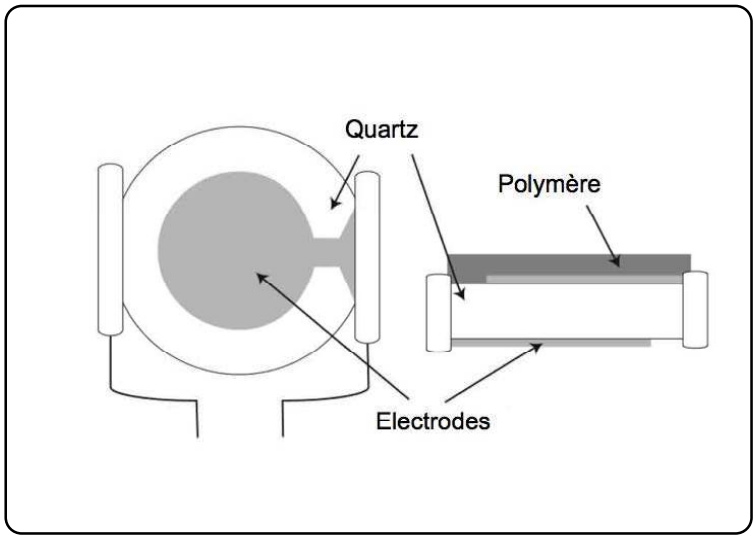


Figure 22 : Vue de dessus et en coupe d'un cristal.

Le principe de base de la microbalance est de générer une perturbation. Dans le cas de la microbalance à quartz, il s'agit de l'épaisseur du substrat dans laquelle est confinée l'onde acoustique. La fréquence d'oscillation du quartz est partiellement dépendante de l'épaisseur du cristal. En fonctionnement normal, toutes les variables influençant restent constantes; donc une variation de fréquence est directement liée à un changement d'épaisseur. Lorsqu'une molécule vient se lier à la surface du cristal par exemple par liaisons faibles, l'épaisseur augmente, et par conséquent la fréquence des oscillations diminue. Ce changement de fréquence peut être quantifié et corrélé précisément à la variation de la masse.

La QCM fut d'abord utilisée en phase gaz, plus récemment elle a été développée en phase liquide. En phase liquide, elle est reconnue comme très efficace pour déterminer l'affinité des molécules (protéines, en particulier) sur des surfaces fonctionnalisées par des sites de reconnaissance [57].

Une microbalance à quartz présente une très grande sensibilité et peut mesurer des masses de quelques nano grammes par cm^2 . C'est grâce à cette grande précision qu'elle est venue concurrencer les méthodes établies comme l'immunodiffusion 2D [58].

4.1.2 Description de la méthode par inhibition indirecte

La méthode par inhibition indirecte est la méthode utilisée pour effectuer les tests. Dans cette méthode, on dépose par injections répétées, une couche de mannane sur un quartz préalablement recouvert d'une couche de polystyrène (Figure 23). On va ensuite combler toutes les aspérités de la surface par plusieurs injections d'albumine de sérum bovin : BSA. Celle-ci permet d'éviter que des molécules de la protéine testée ne soient retenues par simple phénomène physique dans des cavités qui seraient présentes sur la surface.

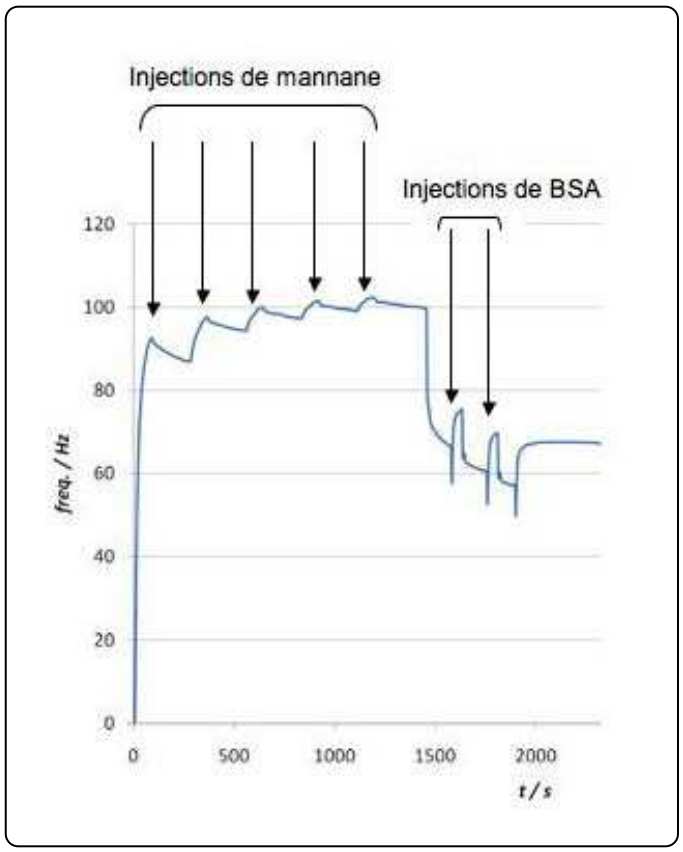


Figure 23 : Préparation de la surface du cristal

Cette étape de préparation terminée, le test peut alors commencer. De multiples injections de la protéine étudiée vont être effectuées déterminant ainsi la valeur de référence pour la protéine seule. On va ensuite injecter la même protéine dans laquelle a été rajouté le sucre à tester.

Il va alors y avoir compétition entre le sucre testé comme inhibiteur et la surface de mannane présente sur le quartz. Plus le sucre testé sera bon inhibiteur et plus la protéine en présence sera bloquée par celui-ci. Elle ne sera donc plus disponible pour la surface de Mannane.

Le signal obtenu correspond à une diminution de la masse reçue par le cristal, donc à une diminution de la fréquence de vibration. Les courbes correspondant à la réception du signal sont donc décroissantes.

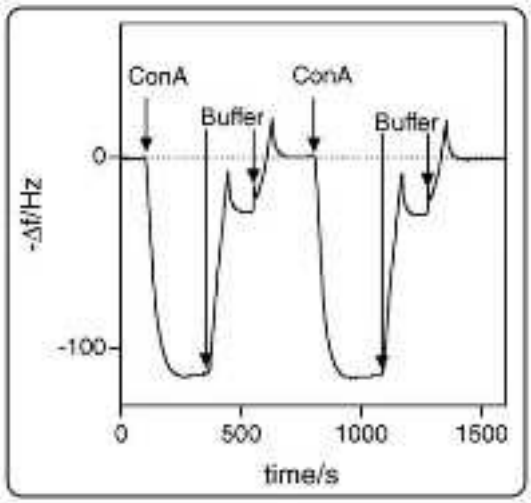


Figure 24 : Exemple de courbe d'inhibition de la Con A.

Elles sont d'abord redressées. Puis on extrait chaque partie de l'expérience correspondant aux différentes injections. On obtient, après traitement, des courbes du type de celle décrite en Figure 25, donnant la fréquence de résonance en fonction du temps.

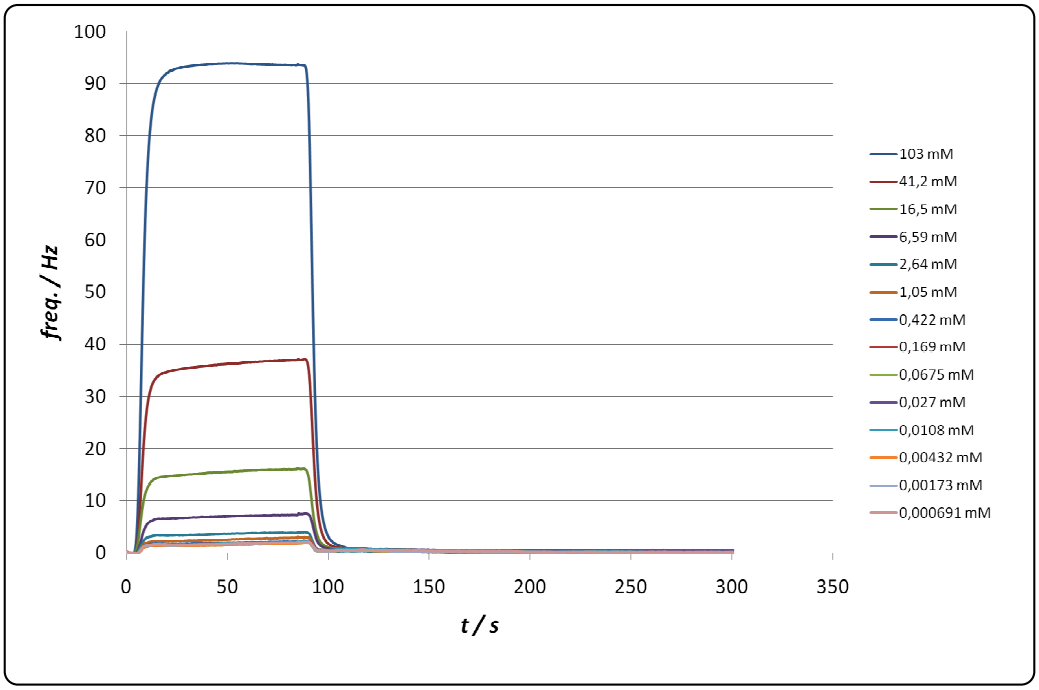


Figure 25 : Exemple de superposition des courbes d'inhibions du 1-methyl-O-mannopyranose à différentes concentrations.

Ces courbes représentent la variation de fréquence, qui a été redressée, en fonction du temps pour des injections à différentes concentrations. On constate aisément que la variation de fréquence est proportionnelle à la quantité de carbohydrate injecté.

Pour terminer, on va tracer la fréquence obtenue en fonction du logarithme de la concentration en carbohydrate étudié. Si aucun problème n'est survenu pendant le test, on obtient une courbe similaire à celle décrite figure 26. C'est à partir de cette courbe que l'on va obtenir le EC_{50}. Nous allons voir dans la partie suivante en quoi consiste cette valeur.

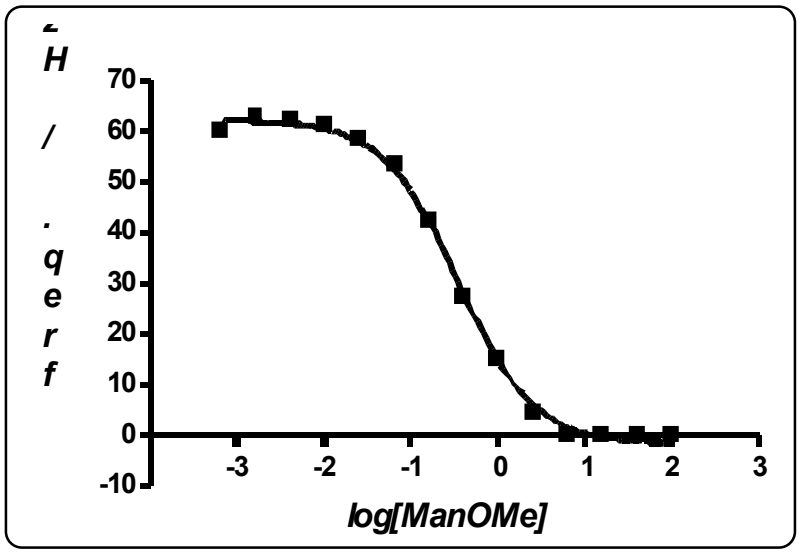


Figure 26 : Courbe représentant la fréquence obtenu en fonction du log de la concentration en 1-méthyl-O-mannopyranose.

4.1.3 Estimation de l'EC_{50}

L'EC_{50} correspond à la valeur pour laquelle la moitié de la protéine utilisée est inhibée par le carbohydrate etudié. Le besoin d'utiliser une valeur médiane provient de la forme des courbes obtenues lors des tests d'inhibition. En effet, sur la figure 25, on constate bien que vouloir utiliser un maximum d'inhibition est impossible puisque l'on tend vers une asymptote. Ce phénomène s'explique par le fait qu'à un certain niveau de concentration en sucre, on a de plus en plus de mal à atteindre les derniers sites de la protéine. On utilise donc l' EC_{50} obtenu par régression non linéaire à partir de l'équation (1), dans laquelle Δf_{min} est la différence minimum de fréquence, Δf_{max} est la différence maximum de fréquence et C la concentration en carbohydrate testé.

$$f = f\text{min} + ((f\text{max} _ f\text{min}) / (1 + 10(C _ \log EC50))$$

Equation (1)

Cette valeur est la valeur référence pour décrire la capacité à inhiber des sucres.

4.2 Interaction avec différentes lectines

Pour ce projet, nous nous proposons d'effectuer les tests d'inhibition des molécules cibles sur la concanavaline A et sur l'Hippeastrum Hybrid Lectin (HHL). Notre objectif se décline en deux parties.

Pour chaque protéine, nous voulons comparer la capacité d'inhibition de chaque thio-analogue avec son homologue naturel. Ceci passe par la méthode décrite ci-dessus et le calcul de l' EC_{50}.

Mais nous voulons aussi, vérifier la spécificité de l'interaction. En effet, la concanavaline A largement utilisée, est un recepteur spécifique des résidus α-D-mannoside et α-D-glucoside. Dans leurs précédents travaux, les membres du groupe du Professeur Ramström l'ont comparée à d'autres protéines non-spécifiques de ces résidus pour vérifier que c'est bien le phénomène d'inhibition que l'on observe lors des essais et pas un autre [59, 60]. En effet, on a vu que certains phénomènes physiques comme la présence de cavités pouvaient interférer sur la mesure. C'est ce type de phénomène, mais aussi des phénomènes d'interactions non spécifiques qui pourraient fausser la mesure.

Nous avons voulu profiter de ce projet pour introduire le test d'une léctine qui n'avait jamais été utilisée auparavant dans ce groupe l'Hippeastrum Hybrid Lectin.

Cette protéine est, comme la concanavaline A, composée de 4 sous-unités identiques. Elle est le récepteur des résidus α mannose. Contrairement à la concanavaline A, elle n'a pas d'affinité avec les résidus α glucose. La HHL présente un intérêt tout particulier pour notre projet car elle est en particulier le récepteur des structures 1,3 et 1,6 mannose.

4.3 Essais effectués et perspectives

Seuls les essais préparatoires aux tests biologiques ont pu être effectués dans le temps imparti. Nous avons d'abord mené une étude visant à réduire le nombre de lavages au tampon nécessaire à la récupération d'une surface « propre », c'est-à-dire débarrassée de toute liaison avec des carbohydrates.

Nous avons aussi profité de cette étude préparatoire pour vérifier la stabilité des Quartz recouvert de mannane dans le temps. Nous avons constaté que ceux ci ont une stabilité supérieure à un mois au congélateur, nous pouvons donc préparer à l'avance des surfaces pour tests.

Cependant, les tests biologiques n'ont pas encore été effectués. Les tests étant longs et coûteux, on préfère les effectuer une fois que tous les composés ont été obtenus.

5. Conclusion.

Nous avons, au cours de ce projet, réalisé une nouvelle synthèse du Méthyl-1-thio-α-D-mannopyranoside. Celui-ci est obtenu directement à partir du 1-thio-α-D-mannopyranose per-acétylé, diminuant ainsi le nombre d'étapes.

Une voie de synthèse divergente permettant l'obtention de 3 dérivés du mannose modifiés en position 2 a aussi été développée. Elle utilise la procédure d'inversion proposée par le Dr Pei et montre que celle-ci fonctionne bien sur le mannose. Les rendements obtenus pour cette voie de synthèse sont particulièrement élevés. Par exemple, le 4,6-benzylidèneacétal-3-benzyl-2-hydroxy-1-méthyl-O-α-D-mannopyranoside (Composé **43**) est obtenu avec un rendement de 62% sur quatre étapes.

La stratégie d'obtention des dérivés modifiés en position 6 du mannose s'est avérée infructueuse, mais nous a permis de renforcer notre connaissance des étapes de protection / déprotection sur le mannose. Nous avons constaté que les groupements protecteurs silylés et / ou encombrants ne sont pas adaptés. Nous avons alors proposé une nouvelle stratégie. L'utilisation des conditions de Mitsunobu pour différencier la position 6 s'est avérée être un succès. Mais nous avons dû utiliser le groupement benzyle pour protéger les autres positions, ce qui rend les étapes de déprotection plus compliquées. Ici, on constate que les rendements sont beaucoup plus faibles. Le 6-hydroxy-1-méthoxy-2,3,4-triacétate-α-D-mannopyranoside (composé **67**) est obtenu avec un rendement d'environ 20 % seulement, ce qui semble peu logique puisque l'hydroxyle en position 6, alcool primaire, devrait être plus facile à différencier que celui en position 2. Nous pensons notamment que les rendements de la tosylation et de l'acétylation pourraient être augmentés en travaillant sur les conditions opératoires.

Lors de l'étape de glycosidation, la préparation du donneur se révèle être une étape clé. Nous n'avons pas réussi à utiliser notre stratégie qui évite l'utilisation d'ethers benzyliques pour protéger le donneur. L'utilisation de groupements activateurs comme les groupements benzyle permet d'augmenter grandement la réactivité de celui-ci et est primordiale pour le bon déroulement de cette réaction. Les di-saccharides liés en 1-2 ont été obtenus lors d'essais préliminaires. La réaction de glycosidation étant mieux cernée, il est maintenant possible de l'utiliser pour obtenir les di-saccharides liés en 1-6 à partir des précurseurs déjà synthétisés.

Les différentes voies de synthèse développées se sont révélées être suffisamment efficaces pour permettre la synthèse de quatre des six thio-analogues du mannose en quantité suffisante (de 300 mg à 1g) pour pouvoir effectuer les déprotections puis les tests biologiques ; trois sont déjà déprotégés.

Les di-saccharides liés en 1-2 ont depuis été obtenus en quantité suffisante pour pouvoir effectuer les déprotection puis les tests biologiques.

Les tests biologiques, longs et coûteux, seront effectués une fois que tous les composés seront disponibles.

Mais au-delà de la préparation des composés et des tests biologiques qui peuvent être menés sur ceux-ci, nous pensons surtout avoir contribué à prouver que, malgré sa réputation de manque de sélectivité, la chimie des sucres est tout de même une chimie envisageable. Bien sûr, elle présente des problèmes mais ceux ci peuvent, comme dans toute chimie, être solutionnés. Nous pensons aussi avoir contribué à prouver que la chimie des sucres n'est pas uniquement une chimie de spécialistes. Les méthodes que nous avons utilisées relèvent de la chimie organique académique, mais ont pu être adaptées à la préparation de composés complexes.

6. Partie expérimentale.

Les solvants anhydres ainsi que les différents solvants organiques usuels ont été utilisés sans distillation préalable. Si rien n'est mentionné, les réactifs commerciaux ont été utilisés sans purification préalable.

Les réactions nécessitant des conditions anhydres ont été effectuées dans de la verrerie séchée au pistolet chauffant juste avant emploi : la présence d'azote, s'il y a lieu, est toujours spécifiée.

Les chromatographies de contrôle sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur gel de silice 60 F_{254} ou sur gel d'alumine 60 F_{254} neutre déposés sur des feuilles d'aluminium.

Les CCM ont été visualisées à l'aide d'une lampe UV à 254 nm et/ou ont été révélées à l'acide sulfurique dilué dans le méthanol, à la ninhydrine ou encore au permanganate de potassium.

Les produits ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice 60 de granulométrie 0,063-0,200 mm (Merck).

Caractérisation des produits : *RMN*

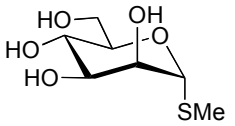
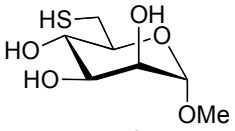
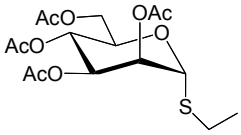
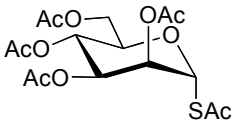
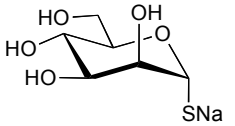
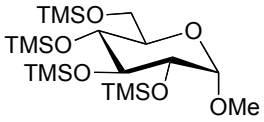
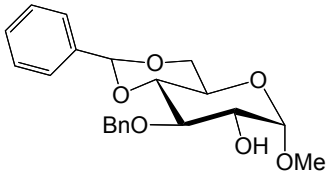
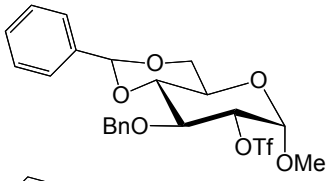
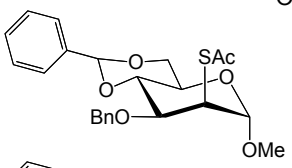
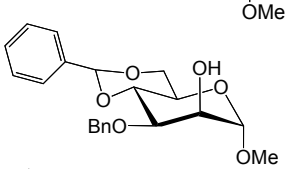
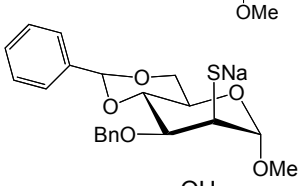
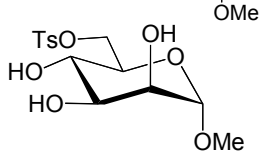
Les spectres RMN ont été enregistrés à 500 MHz en proton sur un spectromètre Bruker DMX 500. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm).

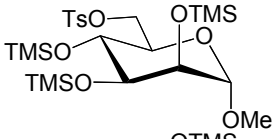
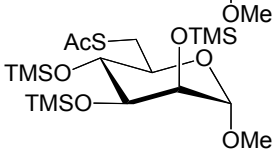
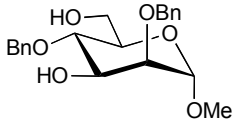
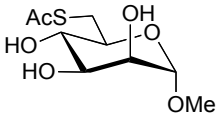
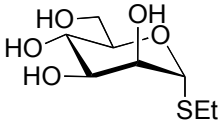
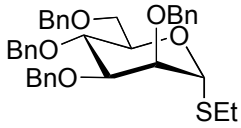
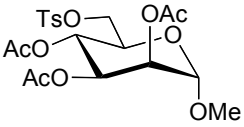
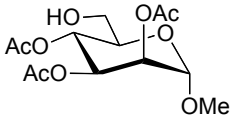
Pour les spectres dans le $CDCl_3$, ils ont été calibrés par rapport au pic du solvant $CDCl_3$ pris comme référence interne :
- 7,26 ppm en proton

Pour les spectres dans le DMSO-d_6, les déplacements chimiques ont été calibrés par rapport au pic du solvant DMSO-d_6 pris comme référence interne :
- 2,50 ppm (centre du multiplet) en proton

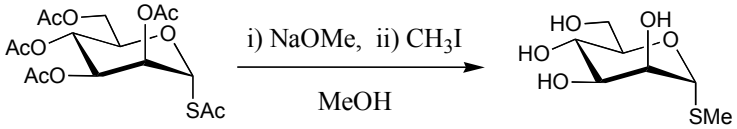
Pour les spectres dans le D_2O, les déplacements chimiques ont été calibrés par rapport au pic du solvant D_2O pris comme référence interne :
- 2,05 ppm (centre du multiplet) en proton

Dans les spectres RMN du ^1H, l'allure des signaux est décrite comme suit : singulet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet (m), doublet de triplet (dt), doublet de doublet dédoublé (ddd).

Product	N°	Page	Name
	**3**	69	Methyl-1-thio-α-D-mannopyranoside
	**4**	69	6-thio-1-O-methyl–α-D-mannopyranoside
	**29**	70	1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-1-ethyl-1-thio-α-D-mannopyranoside
	**34**	70	2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-S-acetyl-α-D-mannopyranose
	**35**	71	1-Thio-α-D-mannopyranose sodium salt
	**37**	71	1,2,3,4,6-penta-trimethylsillylated-1-O-methyl-α-D-glucopyranoside
	**38**	72	4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-1-O-Methyl -α-D-glucopyranoside
	**39**	72	3-Benzyl-4,6-benzylideneacetal-2-triflate-1-O-methyl-α-D-glucopyranoside
	**40**	73	4,6-benzylidenelacetal-3-benzyl-2-thioacetate-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside
	**43**	73	4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-2-hydroxy-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside
	**45**	74	4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-2-thio-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside sodium salt
	**49**	74	1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranoside

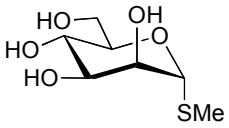
	**50**	75	2,3,4-tris-(trimethylsilyl)-6-tosyl-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside
	**54**	75	1-O-Methyl-2,3,4-tris-(trimethylsilyl)-6-thioacetate-α-D-mannopyranoside
	**61b**	76	1-O-Methyl-2,4-dibenzyl-α-D-mannopyranoside
	**62**	76	6-thioacetate-1-O-methyl-a-D-mannopyranoside
	**64**	77	1-thioethyl-α-D-mannopyranoside
	**65**	77	2,3,4,6-tetrabenzyl-1-thioethyl-α-D-mannopyranoside
	**66**	78	2,3,4-O-acetyl-1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranoside
	**67**	78	6-Hydroxy-1-O-methyl-2,3,4-triacetate-α-D-mannopyranoside

1-O-Methyl-1-thio-α-D-mannopyranoside **(3)**



34 3

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-S-acetyl-1-thio-α-D-mannopyranose (**34**) (330 mg, 0.813 mmol) was dissolved in MeOH (≈ 5ml) at room temperature and sodium methoxide (87.8 mg, 1.626 mmol) was added. The reaction was allowed to stir overnight. Then methyl iodide was added and the reaction was conducted for 3 hrs more and checked by TLC (Silica, EtOAc/EtOH: 8/2). After consumption of the starting material, the reaction mixture was evaporated.

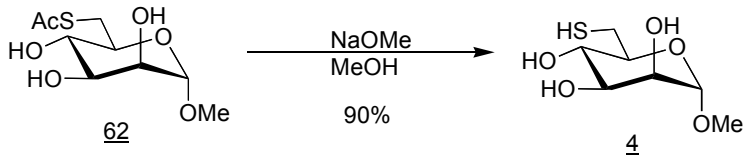


3

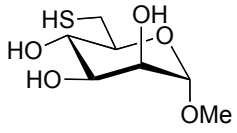
^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz) δ = 5.21 (d, 1H, H-1), 4.06 (dd, 1H, H-3), 3.98 (m, 1H, H-5), 3.90 (m, 1H, H-2), 3.79 (m, 2H, H-6), 3.66 (t, 2H, H-4), 2.16 (s, 3H, SMe).

Aspect: Yellow solid, sticky
Rf value: 0.29 (silica, EtOAc / EtOH: 8/2)

1-O-Methyl-6-thio−α-D-mannopyranoside **(4)**



6-thioacetate-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside **62** (47 mg, 0.186 mmol) was dissolved in methanol (≈ 1ml), then sodium methoxide (20 mg, 0.372 mmol) was added. The mixture was stirred for one hour, checked by TLC (silica, EtOAc/EtOH: 8/2). The reaction mix was then evaporated.

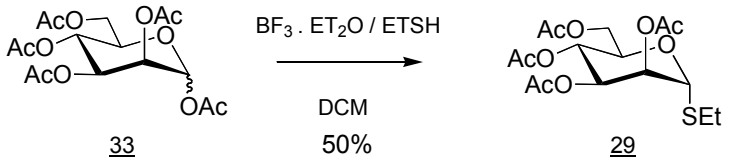


4

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz) δ = 4.73 (d, 1H, H-1), 3.94 (dd, 1H, H-4), 3.86 (m, 1H, H-3), 3.75 (dd, 1H, H-2), 3.59 (t, 1H, H-5), 3.43 (s, 3H, OMe), 2.84 (m, 1H, H-6), 2.68 (m, 1H, H-6').

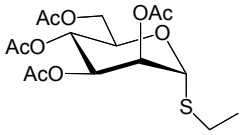
Aspect: brown solid
Rf value: 0.24 (silica, EtOAc)

1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-1-ethyl-1-thio-α-D-mannopyranoside **(29)**



33 29

1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-α-D-mannopyranose **33** (100 mg, 0.256 mmol) was dissolved in DCM (≈ 6ml) and thioethanol (56.8 µl, 0.768 mmol) was added under nitrogen at 0°C. Then $BF_3.Et_2O$ (253 µl, 2.16 mmol)was added slowly. The reaction was allowed to proceed for 24 hrs. The mixture was then poured on ice and DCM, washed with $NaHCO_3$, water, brine, and dried on $MgSO_4$, before evaporation.

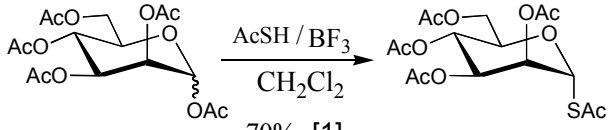


29

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 5.34 (dd, 1H, H-4), 5.31 (t, 2H, H-6, H-6'), 5.27 (dd, 1H, H-5), 3.40 (m, 1H, H-2), 4.32 (dd, 1H, H-3), 4.1 (dd, 1H, H-1), 2.57-2.7 (m, 2H, SEt), 2.17 (s, 3h, OAc), 2.1 (s, 3h, OAc), 2.05 (s, 3h, OAc), 1.99 (s, 3h, OAc).

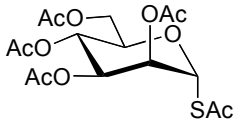
Aspect: brown oil
Rf value: 0.37 (silica, Hex/EtOAc: 1/1)

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-S-acetyl-α-D-mannopyranose (**34**)



33 70%, [1] 34

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-α-D-mannopyranose **33** (0.666 g, 1.73 mmol) and thioacetic acid (0.526 g, 6.9 mmol) were dissolved in dry dichloromethane (7 ml) at 0 °C, and $BF_3 \cdot Et_2O$ (2.26 ml, 18 mmol) was added dropwise over a period of 10 min. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 24 hrs under nitrogen protection. The resulting reaction mixture was diluted with dichloromethane (20 ml), poured onto ice-cold water, and extracted with dichloromethane. The combined organic phases were washed with saturated $NaHCO_3$, water and brine, dried over $MgSO_4$, and filtered.

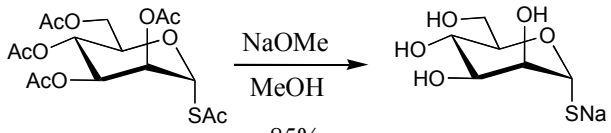


34

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 5.98 (d, 1H, H-1), 5.34 (t, 1H,, H- 4), 5.33 (dd, 1H, H-2), 5.10 (dd, 1H, H-3), 4.29 (dd, 1H, H-6), 4.07 (dd, 1H, H-6'), 3.93 (ddd, 1H, H-5), 2.43 (s, 3H, SAc), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H,OAc).

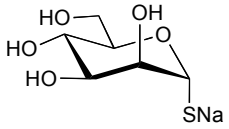
Aspect: yellowish oil
Rf value: 0.27 (silica, Hex/EtOAc: 2/1)

1-Thio-α-D-mannopyranose sodium salt **(35)**



34 35

1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranoside **49** (0.238 g, 0.587 mmol) was dissolved in methanol (3 ml) at room temperature, and sodium methoxide (0.064 g, 1.175 mmol) was added. The reaction mixture was stirred under nitrogen protection resulting in a white precipitation, which was washed with cold methanol to give a sticky solid, product **35**.

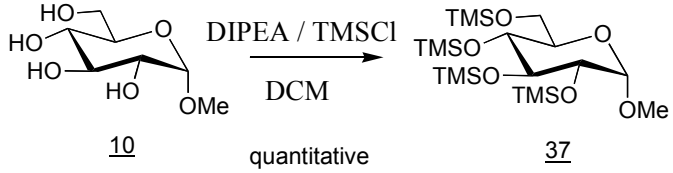


35

^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz) δ = 5.44 (d, 1H, H-1), 4.29 (dd, 1H, H-3), 4.04 (m, 1H, H-5), 4.13 (m, 1H, H-2), 3.78 (m, 2H, H-6), 3.61 (t, 2H, H-4).

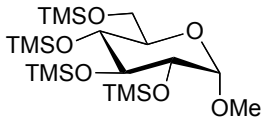
Aspect: yellow solid
Rf value: 0.13 (silica, Hex/EtOAc: 2/1)

1,2,3,4,6-penta-trimethylsillyl-1-O-methyl-α-D-glucopyranoside **(<u>37</u>)**



<u>10</u> quantitative <u>37</u>

1-O-Methyl-α-D-Glucopyranose **<u>10</u>** (5.36 g, 0.28 mol) and DIPEA (17.83 g, 0.137 mol) was dissolved in 200 ml of DCM and put under nitrogen at O°C. TMSCl (18 g, 0.166 mol) was added dropwise. Reaction mix was stirred from 0°C to room temperature for 24 hrs. Then the mixture was evaporated and diluted in hexane. A precipitate appears and shaking is needed. After extraction the mixture was filtrated on celite.

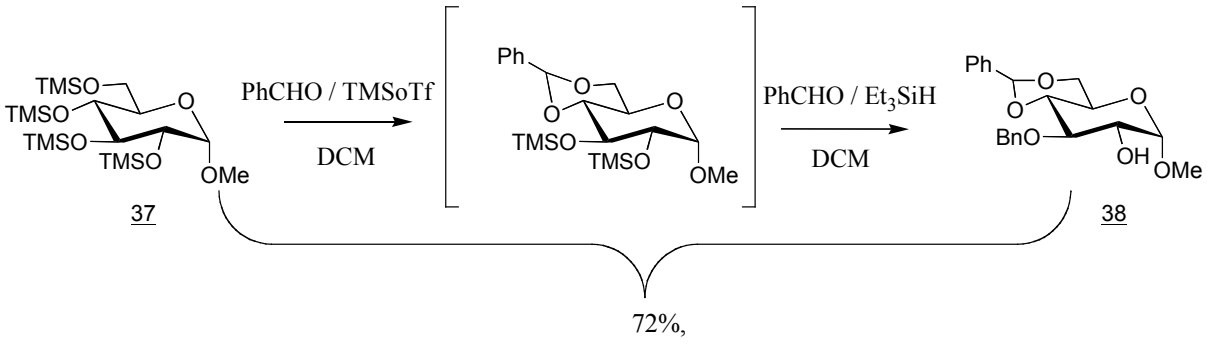


<u>37</u>

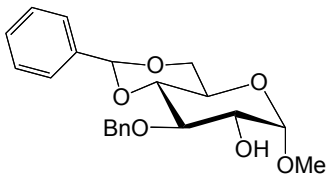
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 4.61 (d, 1H, H-1), 3.75 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.67 (dd, 1H, H-5), 3.50 (m, 1H, H-4), 3.47 (m, 1H, H-2), 3.43 (m, 1H, H-3), 3.34 (s, 3H, OMe), 0.15 (t, 27H, OTMS), 0.12 (s, 9H, OTMS).

Aspect: Yellow oil
Rf value: 0.81 (silica, Hex/EtOAc: 1/1)

4,6-Benzylideneacetal-3-benzyl-1-O-methyl-α-D-glucopyranoside **(38)**



Per-O-trimethylsilyl-1-O-methyl-α-D-glucopyranoside **37** (1.18 g, 2.44 mmol) was dissolved in DCM (50 ml) with benzaldehyde (261 µl, 2.56 mmol) and pre-dried at -78°C for one hour. Then TMSoTf (66 µl, 0.366 mmol) was added dropwise. The reaction was allowed to proceed for 2 hrs. Then Et_3SiH (428 µl, 2.68 mmol) was added and the reaction was allowed to proceed for 5 more hours. After consumption of the starting materials, the reaction mixture was dissolved in ethyl acetate and washed twice with $NaHCO_3$. The aqueous phase was extracted 3 times with ethyl acetate. The organic phases were combined and washed with brine, and dried on $MgSO_4$, before evaporation.

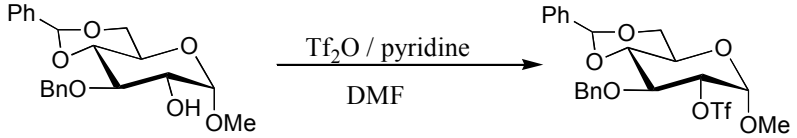


38

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.17-7.41 (m, 10H, OBn), 4.86 (d, 1H, OBn), 4.71 (d, 1H, H-1), 4.69 (d, 1H, OBn), 4.20 (dd, 1H, H-3), 3.71-3.76 (m, 2H, H-2, H-4), 3.61-3.69 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.55 (t, 1H, H-5), 3.36 (s, 3H, OMe).

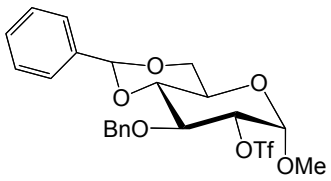
Aspect: yellow solid
Rf value: 0.13 (silica, Hex/EtOAc: 2/1)

3-Benzyl-4,6-benzylideneacetal-2-triflate-1-O-methyl-α-D-glucopyranoside **(39)**



38 39

3-Benzyl-4,6-benzylideneacetal-1-O-methyl-α-D-glucopyranoside **(38)** (1.07g, 2.87 mmol) was dissolved in DCM (15 ml) and pyridine (1.85 ml, 0.023 mol) was added at -15°C then Tf_2O (0.96 ml, 5.75mmol) in solution in DCM (≈3 ml) was added drop wise. After 4 hrs, the reaction mixture was dissolved in DCM, washed with 1M HCl, then $NaHCO_3$, water, brine, and dried on $MgSO_4$, before evaporation.

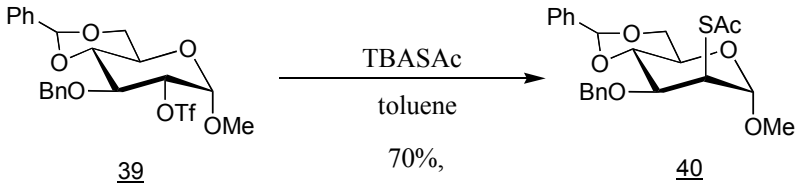


39

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.30-7.51 (m, 10H, OBn), 5.59 (s, 1H, H-1), 4.99 (d, 1H, H-2), 4.88 (d, 1H, OBn), 4.79 (d, 1H, OBn), 4.76 (dd, 1H, H-3), 4.35 (dd, 1H, OBn), 4.16 (t, 1H, H-4), 3.92 (m, 1H, H-5), 3.69-3.80 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.50 (s, 3H, OMe)

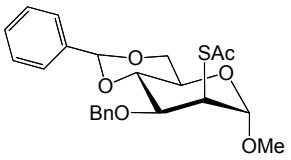
Aspect: yellow solid
Rf value: 0.75 (silica, Hex/EtOAc: 1/1)

4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-2-thioacetate-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside **(40)**



39 40

TBASAc (4.32 g, 0.132 mmol) was added to a solution of 3-Benzyl-4,6-benzylideneacetal-2-triflate-1-*O*-methyl-α-D-glucopyranoside **(39)** (1.33 g, 2.64 mmol) in dry toluene (35 ml). After 23 hrs, the reaction was completed, the mixture was diluted in DCM and washed with water and brine then dried on $MgSO_4$, before evaporation.

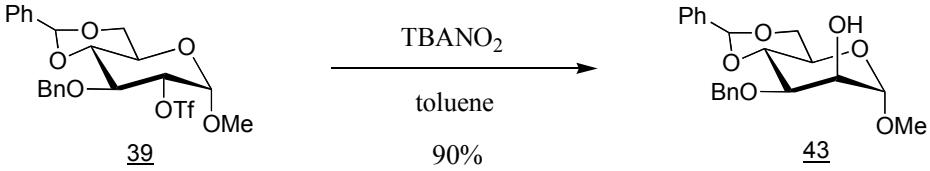


40

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.49 (dd, 2H, OBn), 7.27-7.40 (m, 8H, OBn), 5.59 (s, 1H, H-1), 4.73 (s, 1H, OBn), 4.66 (dd, 2H, OBn), 4.38 (dd, 1H, H-2), 4.28 (dd, 1H, H-3), 4,24 (dd, 1H, H-4), 3.84(m, 1H, H-5), 3.79 (t, 1H, H-6), 3.69 (t, 1H, H-6'), 3.36 (s, 3H, SAc), 2.39 (s, 3H, OMe).

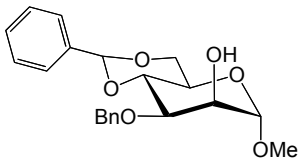
Aspect: brown solid
Rf value: 0.15 (silica, Hex/EtOAc: 6/1)

4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-2-hydroxy-1-methyl-O-α-D-mannopyranoside **(43)**



39 43

$TBANO_2$ (100 mg, 0.34 mmol) was added to a solution of 4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-2-tosyl-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside **(39)** (35 mg, 0.069 mmol) in dry toluene. After 53 hrs, the reaction was completed, the mixture was diluted in DCM and washed with water and brine then dried on $MgSO_4$, before evaporation.

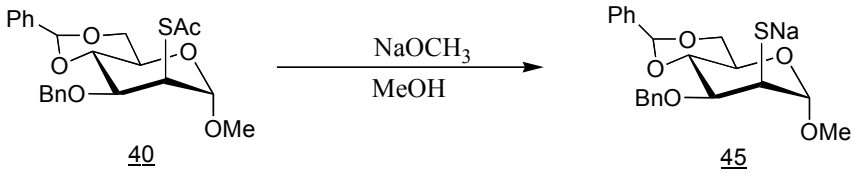


43

^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.49 (dd, 2H, OBn), 7.27-7.41 (m, 8H, OBn), 5.62 (s, 1H, OBn), 4.85 (d, 1H, OBn), 4.77 (s, 1H, H-1), 4.71 (d, 1H, OBn), 4.28 (dd, 1H, H-5), 4.10 (t, 1H, H-4), 4.06 (d, 1H, H-2), 3.91 (dd, 1H, H-3), 3.78-3.87 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.38 (s, 3H, OMe).

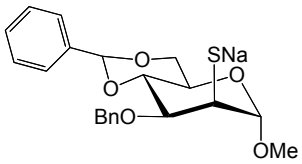
Aspect: yellow solid
Rf value: 0.12 (silica, Hex/EtOAc: 3/1)

4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-2-thio-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside sodium salt **(45)**



40 45

4,6-benzylideneacetal-3-benzyl-2-thioacetate-1-O-methyl-α-D-mannopyranoside (43 mg, 0.1 mmol) was dissolved in methanol (1 ml) then sodium methoxyde (11 mg, 0.25 mmol) was added. The reaction was allowed to proceed for 1.5 hrs. Then the reaction mixture was evaporated.

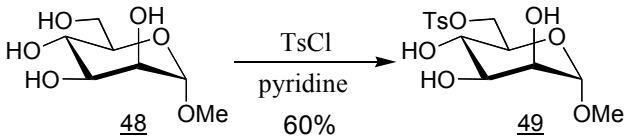


45

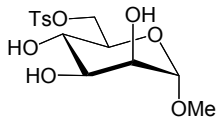
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.5 (dd, 2H, OBn), 7.29-7.42 (m, 8H, OBn), 5.6 (s, 1H, OBn), 5.12 (s, 1H, H-1), 4.69 (dd, 2H, OBn), 4.28 (dd, 1H, H-5), 4.17 (d, 1H, H-3), 3.94 (t, 1H, H-4), 3.86 (dd, 2H, H-6, H-6'), 3.60 (d, 1H, H-2), 3.38 (s, 3H, OMe).

Aspect: brown solid
Rf value: 0.42 (silica, DCM)

1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranoside **(49)** *(Kondo, 1986; Wu et al., 2002)*



1-O-Methyl-α-D-mannopyranoside **48** (1 g, 5.15 mmol) was dissolved in dry pyridine (3 ml) at 0°C, then tosyl chloride (1.08 g, 5.665 mmol) in dry pyridine (2 ml) was added slowly. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight under nitrogen protection. After consumption of the starting material, the reaction mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with 2 M HCl, water and brine, dried and concentrated.

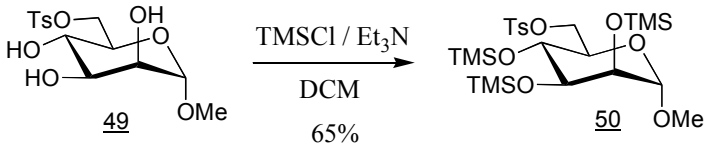


49

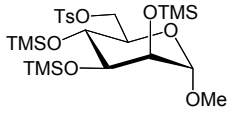
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.81 (d, 2H, OTs), 7.35 (d, 2H, OTs), 4.70 (s, 1H, H-1), 4.38 (dd, 1H), 4.29 (dd, 1H), 3.69–3.78 (m, 3H), 3.34 (s, 3H, OMe), 2.45 (s, 3H, OTs).

Aspect: solid yellow
Rf value: 0.25 (silica, EtOAc/EtOH: 95/5)

1-O-Methyl-2,3,4-tris-(trimethylsilyl)-6-tosyl-α-D-mannopyranoside **(<u>50</u>)**



1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranoside **<u>49</u>** (50 mg, 0.153 mmol) has been dissolved in dicholoromethane (10 ml) and put under nitrogen sparge. Triethylamine (600 µl, 4.57 mmol) has been added and then trimethylsilyl chloride (80 µl, 0.57 mmol) was poured slowly. The reaction was allowed to proceed overnight, checked by TLC (Silica, Hex/EtOAc: 1/1). The reaction mixture was then evaporated to remove the dichloromethane and diluted with hexane. The obtained mixture was then filtered on celite.

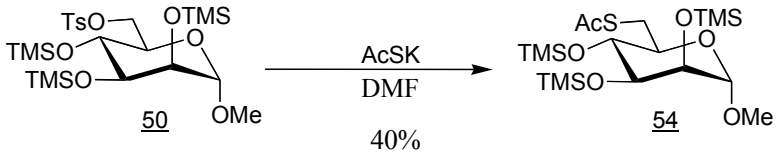


<u>50</u>

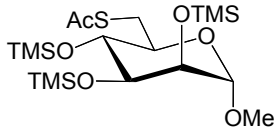
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.77 (d, 2H, OTs), 7.30 (d, 2H, OTs), 4.35 (d, 1H, H-1), 4.27 (dd, 1H, H-3), 4.06 (m, 1H, H-4), 3.70 (s, 1H, H-2), 3.65 (m, 3H, H-6, H-6', H-5) 3.24 (s, 3H, OTs), 2.42 (s, 3H, OMe), 0.12 (s, 9H, OTMS), 0.09 (s, 9H, OTMS), 0.06 (s, 9H, OTMS).

Aspect: yellow to brown oil
Rf value: 0.87 (Silica, Hex/EtOAc: 1/1)

1-O-Methyl-2,3,4-tris-(trimethylsilyl)-6-thioacetate-α-D-mannopyranoside **(54)**



Compound **50** (20 mg, 0.04 mmol) has been dissolved in DMF (3 ml) and potassium thioacetate (11.5 mg, 0.1 mmol) was then added dropwise. The reaction was allowed to proceed at 40°C under nitrogen for 11 hrs, then dissolved in ether and washed with water and evaporated.

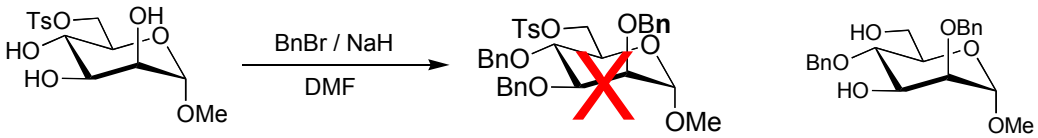


54

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 4.43 (d, 1H, H-1), 3.74 (dd, 1H, H-2), 3.68 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.61 (dd, 1H, H-5), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.32 (s, 3H, OAc), 2.82 (dd, 1H, H-4), 2.33 (s, 3H, OMe), 0.18 (s, 9H, OTMS), 0.15 (s, 9H, OTMS), 0.12 (s, 9H, OTMS).

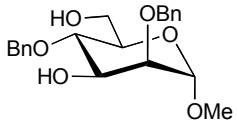
Aspect: oil
Rf value: 0.76 (Silica, Hex/EtOAc: 1/1)

2,4-dibenzyl-1-O-Methyl-α-D-mannopyranoside **(61b)**



49 61 61b

Compound **49** (930 mg, 2.7 mmol) was dissolved in DMF (30 ml), NaH (512 mg, 21 mmol) was then added on the solution at 0°C. BnBr (2.5 ml, 21 mmol) was then added and the reaction mixture was allowed to warm from 0°C to room temperature. When the reaction was completed, the reaction mixture was dissolved in Et_2O and extracted with water, then the 2 phases were separated. The aqueous phase was extracted 2 times with Et_2O. The combined organic phases were then combined and extracted 3 times with water, washed with brine, and dried on $MgSO_4$, before evaporation.

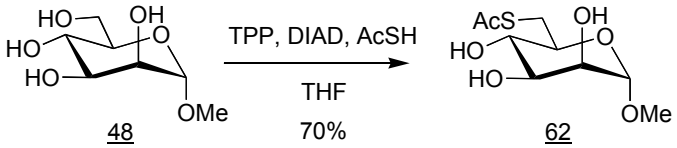


61b

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.27-7.38 (m, 10H, OBn), 4.85 (d, 1H, H-1), 4.74 (d, 1H, OBn), 4.63 (d, 1H, OBn), 4.57 (d, 1H, OBn), 4.47 (d, 1H, OBn), 4.39 (t, 1H, H-5), 4.18 (dd, 1H, H-3), 4.07 (d, 1H, H-4), 3.9 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.67 (dd, 1H, H-2), 3.56 (s, 3H, OMe).

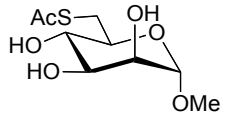
Aspect: solid yellow
Rf value: 0.33 (Silica, Hex/EtOAc: 1/1)

1-O-methyl-6-thioacetate-α-D-mannopyranoside **(62)**



48 62

Triphenylphosphine (486 mg, 1.85 mmol) was dissolved in THF under nitrogen and DIAD (375 mg, 1.85 mmol) was added at 0°C and the mixture was stirred for one hour. On the other side thioacetic acid (141 mg, 1.85 mmol) was added on 1-O-methyl-α-D-mannopyranoside **48** (300 mg, 1.55 mmol) at 0°C. This solution was then added on the first and reaction was allowed to proceed for one night. THF was then evaporated and water was added. The TPP oxyde was filtered and aqueous solution was washed with a mixture of 2:1 diethylether and hexane. Then water was evaporated and the product was dissolved in ethyl acetate and dried on $MgSO_4$.

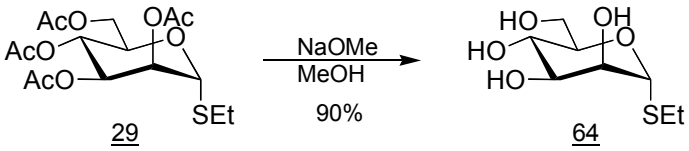


62

^{1}H NMR (DMSO, 500 MHz) δ = 5.19 (d, 1H, H-1), 5.02 (d, 1H, H-2), 3.75 (m, 1H, H-3), 3.67 (d, 1H, H-4), 3.48 (m, 1H, H-6, H-6'), 3.23 (s, 3H, SAc), 2.97 (m, 1H, H-5), 2.33 (s, 3H, OMe).

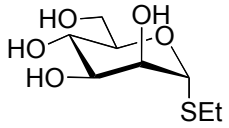
Aspect: brown solid
Rf value: 0.46 (Silica, Hex/EtOAc: 2/8)

1-thioethyl-α-D-mannopyranoside **(64)**



29 64

1-thioethyl-2,3,4,6-tetraacetate-*α-D-mannopyranoside* **29** (1.7 g, 4 mmol) was dissolved in methanol (50 ml), then sodium methoxyde (0.25 g, 5 mmol) was added and reaction mix was stirred at room temperature for 3 hrs then evaporated.

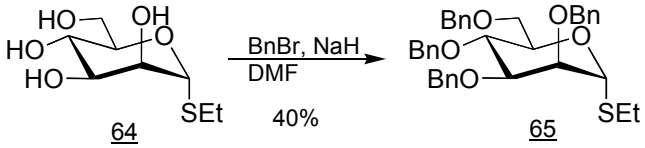


64

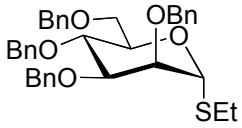
^{1}H NMR (D_2O, 500 MHz) δ = 5.32 (s, 1H, H-1), 4.04 (m, 1H, H-3), 4.00 (m, 1H, H-2), 3.89 (dd, 1H, H-5), 3.78 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.66 (t, 1H, H-4), 2.6-2.74 (m, 2H, SEt), 1.27 (m, 3H, SEt).

Aspect: brown solid
Rf value: 0.14 (Silica, DCM/MeOH: 9/1)

2,3,4,6-tetrabenzyl-1-thioethyl-α-D-mannopyranoside **(65)**



1-thioethyl-*α-D-mannopyranoside* **64** (1.9 g, 4 mmol) was dissolved in DMF and stirred while adding sodium hydride (1.8 g, 0.045 mol) at 0°C. Then benzyl bromide (3.4 g, 0.02 mol) was added and stirred at room temperature for 3 hrs. The mixture was then dissolved in ether and washed with water. The water phase was extracted with ether, and then the combined organic phases were dried on $MgSO_4$ and evaporated.

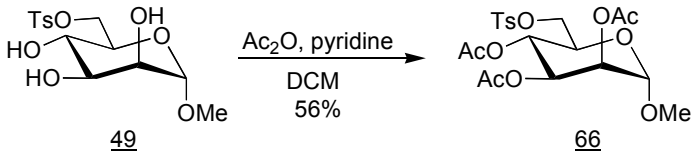


65

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.20-7.46 (m, 20H, OBn), 5.45 (s, 1H, H-1), 4.93 (d, 1H, OBn), 4.78 (d, 1H, OBn), 4.72 (d, 2H, OBn), 4.62 (dd, 2H, OBn), 4.56 (m, 2H, OBn), 4.18 (ddd, 1H, H-3), 4.08 (t, 1H, H-2), 3.85-3.91 (m, 3H, H-6, H-6', H-5), 3.76 (dd, 1H, H-4), 2.56-2.72 (m, 2H, SEt), 1.29 (t, 3H, SEt).

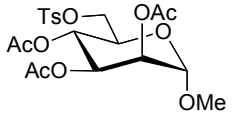
Aspect: yellow solid
Rf value: 0.21 (Silica, Hex/EtOAc: 6/1)

2,3,4-O-triacetyl-1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranoside **(66)**



49 66

1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranosyde **49** (280 mg, 0.08 mmol) was dissolved in DCM (5 ml) and pyridine (3 µl, 0.04 mmol) was added. Then acetic anhydride (31 µL, 0.32 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 28 hrs. The reaction mixture was poured on DCM and ice, washed with HCl 1N, then $NaHCO_3$, water and brine, dried on $MgSO_4$ and finally evaporated.

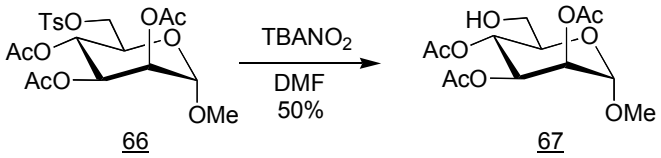


66

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 7.80 (d, 1H, OTs), 7.36 (d, 1H, 0Ts), 5.30 (dd, 1H, H-3), 5.20 (m, 1H, H-2), 5.15 (t, 1H, H-4), 4.64 (d, 1H, H-1), 4.13 (m, 2H, H-6, H-6'), 4.00 (m, 1H, H-5), 3.36 (s, 3H, OTs), 2.46 (s, 3H, OMe), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc).

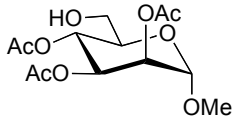
Aspect: yellow solid
Rf value: 0.56 (Silica, EtOAc /EtOH: 9/1)

6-Hydroxy-1-O-methyl-2,3,4-triacetyl-α-D-mannopyranoside **(<u>67</u>)**



<u>66</u> <u>67</u>

Tetrabutylammonium nitrite (100 mg, 0.35 mmol) was added to a solution of *2,3,4-O-triacetyl-1-O-Methyl-6-O-tosyl-α-D-mannopyranosyde* **(<u>66</u>)** (35 mg, 0.07 mmol) in dry toluene. The reaction was allowed to perform during 20 hrs. Then the reaction mix was dissolved in DCM, washed with water, brine and dried with $MgSO_4$ and finally evaporated.



<u>67</u>

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 5.39 (dd, 1H, H-4), 5.21-5.27 (m, 2H, H-3, H-2), 4.73 (s, 1H, H-1), 3.68-3.78 (m, 2H, H-6, H-6'), 3.60-3.66 (m, 1H, H-5), 3.40 (s, 3H, OMe), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.O8 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 1H, OH).

Aspect: yellow solid
Rf value: 0.65 (Silica, EtOAc /EtOH: 9/1)

7. Bibliographie.

[1] G. J. L. Bernardes, D. P. Gamblin, B. G. Davis, Angew. Chem. Int. Ed. **2006**, *45*, 4007-4011.

[2] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, Science, **2001**, 5512, *291*, 2357-2364.

[3] C. H. Wong, Acc. Chem. Res. **1999**, *32*, 376-385.

[4] O. Norberg, L. Deng, M. Yan, O. Ramström, Bioconjug Chem, **2009**, *20*, 2364-2370.

[5] O. Ramström, S. Lohmann, T. Bunyapaiboonsri, J. M. Lehn, Chem. Eur. J. **2004**, *10*, 1711-1715.

[6] X. Wu, T. Lipinski, E. Paszkiewicz, D. R. Bundle. Chem. Eur. J. **2008**, *14*, 6474-6482.

[7] S. Knapp, D. S. Myers, J. Org. Chem. **2002,** *67,* 2995-2999.

[8] G. J. L. Bernardes, E. J. Grayson, S. Thompson, J. M. Chalker, J. C. Errey, F. El Oualid, T. D. W. Claridge, B. G. Davis, Angew. Chem. Int. Ed. **2008**, *47*, 2244 –2247.

[9] A. Varki, Glycobiology, **1993**, 2, *3*, 97-130.

[10] K. A. Karlsson, TiPS, **1991**, *12*, 265-272.

[11] P. H. Seeberger, Nature, **2009**, 6, *5*, 368-372.

[12] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler. Essentials of Glycobiology, **1999**.

[13] S. J. Angyal, Angew. Chem. Internat. Edit. **1969**, 3, *8*, 157-166.

[14] S. David, Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres, **1995**.

[15] Y. M. Choy, A. M. Unrau, Carbohyd. Res, **1971**, *17*, 439-443.

[16] B. Mukhopadhyay, K. P. Ravindranathan Kartha, D. A. Russel, R. A. Field, J. Org. Chem. **2004**, *69*, 7758-7760.

[17] Q. Wang, J. Fu, J. Zhang, Carbohyd. Res, **2008**, *343*, 2989-2991.

[18] S. N. Lam, J. Gervay-Hague, J. Org. Chem. **2005**, *70*, 8772-8779.

[19] A. Miyagawa, M. Carmelita, Z. Kasuya, K. Hatanaka, Bull. Chem. Soc. Jpn, **2006**, 2, *79*, 348-356.

[20] A. Miyagawa, H. Kurosawa, T. Watanabe, T. Koyama, D. Terunuma, K. Matsuoka, Carbohyd. Polym, **2004**, *57*, 441-450.

[21] C. Branden, J. Tooze, Introduction to Protein Structure, **1999.**

[22] H. Lis, N. Sharon, Chem. Rev. **1998**, *98*, 637-674

[23] N. Sharon, Protein Science, **1998**, *7*, 2042-2048.

[24] C. Bertozzi, M. Bednarski, Carbohydrate Research. **1992**, *223*, 243-253.

[25] H. J. Gabius, Biochimica et Biophysica Acta, **2002**, *1572*, 163-164.

[26] S. Park, I. Shin, Angew. Chem. Int. Ed. **2002**, 17, 41, 3180-3182.

[27] Z. Pei, R. Larsson, T. Aastrup, H. Anderson, J-M. Lehn, O. Ramström, Biosens. Bioelectron. **2006**, *22*, 42-48.

[28] K. Jansson, G. Noori, G. Magnusson, J. Org. Chem, **1990**, *55*, 3181-3185.

[29] P. V. Murphy, J. L. O'Brien, A. B. Smith, Carb Res, **2001**, *334*, 327-335.

[30] C. C. Wang, S. S. Kulkarni, J. C. Lee, S. Y. Luo, S. C. Hung, Nature Protocols, **2008**, 1, *3*, 97-113.

[31] Z. Pei, H. Dong, R. Caraballo, O. Ramström, Eur. J. Org. Chem. **2007**, 4927-4934.

[32] C. C. Wang, J. C. Lee, S. Y. Luo, S. S. Kulkarni, Y. W. Huang, C. C. Lee, K. L. Chang, S. C. Hung. Nature. **2007**, *446*, 896-899.

[33] P. G. Wang, Nature Chem. Bio. **2007**, 3, 6, 309-310.

[34] H. Dong, Z. Pei, O. Ramström, J. Org. Chem. **2006**, *71*, 3306-3309.

[35] J. J. Reina, O. S. Maldonado, G. Tabarani, F. Fieschi, J. Rojo, Bioconjugate Chem, **2007**, 3, *18*, 963-969.

[36] Z. Pei, H. Anderson, T. Aastrup, O. Ranström, Biosens. Bioelectron. **2005**, *21*, 60-66.

[37] T. Ankner, G. Hilmersson, Org. Lett, **2008**, 3, *11*, 503-506.

[38] F. Batt, O. Piva, F. Fache, tetrahedron letters, **2008**, *49*, 566-568.

[39] G. D. Vite, T. A. Spencer, J. Org. Chem., **1988**, 11, *53*, 2555–2560.

[40] S. Lemaire, G. Giambastiani, G. Prestat, G. Poli, Eur. J. Org. Chem. **2004**, 2840-2847.

[41] J. I. Luengo, J. G. Gleason, Tetrahedron Letters. **1992**, 46, *33*, 6911-6914.

[42] H. N. Yu, C. C. Ling, D. R. Bundle, J. Chem. Soc., Perkin Trans. **2001**, *1*, 832-837

[43] M. Sridhar, B. A. Kumar, R. Narender, Tetrahedron Letters. **1998**, *39*, 2847-2850.

[44] S. Hanashima, Y. Mizushina, T. Yamazaki, K. Ohta, S. Takahashi, H. Sahara, K. Sakagushi, F. Sugawara, Bioorg. Med. Chem. **2001**, *9*, 367-376.

[45] T.W. Greene, P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis. **2007**.

[46] G. Adiwidjaja, J. S. Brunck, K. Polchow, J. Voss, Carb. Res. **2000**, *325*, 237-244.

[47] R. Rosseto, N. Bibak, R. Deocampo, T. Shah, A. Gabrielan, J. Hajdu, J. Org. Chem. **2007**, *72*, 1691-1698.

[48] I. Hamachi, T. Nagae, S. Shinkai, J. Am. Soc. **2000**, *122*, 12065-12066.

[49] K. Pachamuthu, R. R. Schmidt, Chem. Rev. **2006,** *106*, 160-187.

[50] T. Ogawa, K. Beppu, S. Nakabayashi, Carbohyd. Res, **1981**, *93*, C6-C9.

[51] R. K. Jain, X. Liu, S. R. Oruganti, E. V. Candrasekaran, K. L. Matta, Carb. Res. **1995**, 271, 185-196.

[52] R. K. Jain, K. L. Matta, Carb. Res. **1996**, *282*, 101-111.

[53] D. Crich, M. Smith, J. Am. Chem. Soc. **2001,** *123*, 9015-9020.

[54] H. H. Jensen, C. M. Pedersen, M. Bols, Chem. Eur. J. **2007**, *13*, 7576-7582.

[55] X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky, Angew. Chem. Int. Ed. **2004**, *43*, 2562-2565.

[56] L. K. Mydock, A. V. Demchenko, Org. Lett. **2008**, 11, *10*, 2103-2106.

[57] C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault, Biosens. Bioelectron. **1999**, *14*, 663–670.

[58] T. Murata, T. Usui, Biosci. Biotech. Biochem. **1997**, *61*, 1059-1066.

[59] D. N. Moothoo, B. Canan, R. A. Field, J. H. Naismith, Glycobiology. **1999**, 6, *9*, 539-545.

[60] Y. Pei, H. Yu, Z. Pei, M. Theurer, C. Ammer, S. Andre, H. J. Gabius, M. Yan, O. Ramström, Anal. Chem. **2007**, *79*, 6897-6902.

[61] H. Driguez, Chem. Bio. Chem, **2001**, *2*, 311-318.