

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : Chimie macromoléculaire

Par

**Katy AKOUMANY**

**Dérivés de l'exopolysaccharide d'*Alteromonas infernus*, mimétiques de glycosaminoglycanes, et développement d'une stratégie pour leur analyse structurale**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 15/11/2019

Unité de recherche : Laboratoire EM<sup>3</sup>B, Unité BRM, Ifremer Centre Atlantique  
Laboratoire CEISAM, UMR 6230, Université de Nantes - CNRS

## Rapporteurs avant soutenance :

Christine Le Narvor, Chargée de Recherche au CNRS, Université Paris Sud  
Gurvan Michel, Directeur de Recherche, Station Biologique de Roscoff

## Composition du Jury :

Examineurs : Laurence Mulard, Directrice de Recherche, Institut Pasteur  
Olivier Roger, Docteur, Nestlé  
Didier Dubreuil, Professeur, Université de Nantes

Directrice de thèse : Sylvia Collicec-Jouault, Cadre de Recherche, Ifremer Centre Atlantique  
Co-directrice de thèse : Muriel Pipelier, Maître de conférences, Université de Nantes  
Co-encadrante : Agata Zykwinska, Cadre de Recherche, Ifremer Centre Atlantique

Membre invité : Jacques Lebreton, Professeur, Université de Nantes



# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : Chimie macromoléculaire  
Par

**Katy AKOUMANY**

**Dérivés de l'exopolysaccharide d'*Alteromonas infernus*, mimétiques de glycosaminoglycanes, et développement d'une stratégie pour leur analyse structurale**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 15/11/2019  
Unité de recherche : Laboratoire EM<sup>3</sup>B, Unité BRM, Ifremer Centre Atlantique  
Laboratoire CEISAM, UMR 6230, Université de Nantes - CNRS

## Rapporteurs avant soutenance :

Christine Le Narvor, Chargée de Recherche au CNRS, Université Paris Sud  
Gurvan Michel, Directeur de Recherche, Station Biologique de Roscoff

## Composition du Jury :

Examineurs : Laurence Mulard, Directrice de Recherche, Institut Pasteur  
Olivier Roger, Docteur, Nestlé  
Didier Dubreuil, Professeur, Université de Nantes

Directrice de thèse : Sylvia Collic-Jouault, Cadre de Recherche, Ifremer Centre Atlantique  
Co-directrice de thèse : Muriel Pipelier, Maître de conférences, Université de Nantes  
Co-encadrante : Agata Zykwinska, Cadre de Recherche, Ifremer Centre Atlantique

Membre invité : Jacques Lebreton, Professeur, Université de Nantes



*En faisant scintiller notre lumière,  
nous offrons aux autres la possibilité  
d'en faire autant. [Nelson Mandela]*

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Ecosystèmes Microbiens & Molécules Marines pour les Biotechnologies (EM3B) à l'Ifremer de Nantes et dans l'équipe SYMBIOSE (laboratoire CEISAM UMR CNRS 6230) à l'Université de Nantes.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes directrices de thèse le **Docteur Sylvia Collic-Jouault** et le **Docteur Muriel Pipelier** ainsi que ma **co-encadrante** le **Docteur Agata Zykwinska** pour avoir cru en moi et m'avoir permis de réaliser cette thèse. Un grand merci pour tout ce que j'ai pu apprendre durant ces trois années de thèse. Il a toujours été très facile pour moi de venir taper à votre porte. Merci pour votre disponibilité et pour nos différents échanges scientifiques.

Dans une même mesure, je tiens à remercier le **Dr. Christine Delbarre-Ladrat** pour avoir supervisé le volet enzymologie du projet. Je n'oublie pas **Mme Corinne Sinquin** pour son expertise sur les polysaccharides ainsi que le **Dr. Véronique Verrez-Bagnis** et **Mme Laetitia Marchand**.

Un grand merci au **Pr. Jacques Lebreton** et au **Pr. Didier Dubreuil**, responsables de l'équipe Symbiose, pour leur conseil en chimie des glycosides.

J'aimerais remercier les membres du laboratoire de EM3B en commençant par la directrice du laboratoire, le **Dr. Françoise Leroy**. Merci à **Mme Isabelle Adam**, **Mme Christine Duffaud**, **Mme Sandrine Bonnetot**, **Mme Mireille Cardinal**, **Dr Christine Chopin**, **Mme Claire Donnay-Moreno**, **Mr Marc Jerome**, **Mme Kolypczuk Laetitia**, **Dr Delphine Passerini** pour m'avoir intégrée dans le laboratoire. Merci à mes camarades de bureau le **Dr Lou Lebellenger**, le **Dr Norman Wiernasz** et **Simon Begrem**. J'ai une pensée pour les stagiaires que j'ai pu côtoyer et plus particulièrement pour **Camille Guitteny** que j'ai pu encadrer 6 mois. C'était un plaisir pour moi de travailler avec toi. Je te souhaite du succès aussi bien dans ta vie professionnelle que personnelle.

Je souhaite également remercier les membres du laboratoire CEISAM que j'ai pu côtoyer et qui ont participé à la réalisation de cette thèse. Merci aux **Dr. Virginie Sylvestre**, **Dr. Laurence Arzel**, **Mme Julie Hemez** et **Mme Isabelle Louvet** pour votre aide précieuse pour les analyses de mes produits. Je remercie également **Mme Nathalie Glinel-Resson**.

Je remercie chaleureusement les membres de l'équipe SYMBIOSE à savoir le **Dr. Arnaud Tessier**, le **Dr. Monique Mathé-Allainmat**, le **Dr. Virginie Blot**, le **Dr. Sylvain Collet** et le **Dr. Fabrice Dénès**. Je remercie également mes camarades de paillasse et de bureau **Aline Charron**, **Asmaa Tebbaa**, **Manon**

**Dupuis, Krystal Gaillard, le Dr. Aymeric Siard, le Dr. Guillaume Guignard, le Dr. Nicolas Pelletier, le Dr. Florian Rouzier, le Dr. Jean Christophe Rouaud, le Dr. Maxime Horeau, le Dr. Thibaud Mabit, Pierre Lefranc, Jimmy Smadja, Valentin Boiteau, Nicolas Dinh, Johann Leblanc, Khalid Boujdi, Momtez Jmai.**

Je souhaite attirer l'attention sur le récent **Dr. Gilles-Olivier Gratien (Gillou)** pour m'avoir supporté et soutenu en master et en thèse. Merci de m'avoir écouté même je n'étais pas toujours très compréhensive... Merci à **Camille Trouillet (Miss Camchou)** une petite maman au grand cœur. J'espère que tu garderas toujours tes qualités humaines !! **Matthieu Riviere (Matthew)**, merci pour m'avoir écoutée et réconfortée. **Corentin Vince (le gitan ahah !)**, **Jessica Robin** (mon accolite de box), le **Dr. Pierre Sierocki (Pedro, mon partenaire de rédaction !)** et pour finir le **Dr Tangi Jezequez (Un tonton B. en or)**.

Merci également à mes deux stagiaires du CEISAM, **Sébastien Depienne** et **Erwan Beving**. Sans nul doute qu'ils deviendront des chimistes hors pairs !

Je remercie la team FFF, mes sœurs de cœur : **Karen Geiss, Audrey Tano, Kelly Edoua Kacou, Floriane Adamon** et **Tonya Dauge**. Maintenant 8 ans et toujours aussi proche !

Merci **Annick Onno-Langlois** pour la correction de ce manuscrit de thèse !

Bien évidemment, je remercie mes parents, **Albertine** et **Martin Akoumany**, mes frères, **Nelson** et **Silvio Akoumany**, ma belle-sœur **Lyvia Tiburce** et mes cousines avec une mention spéciale pour **Dina Banka, Déborah** et **Yvette Homawoo**.

Et pour finir, merci à toi **Marco**. Tu as fait ma connaissance pendant la pire période de ma thèse, la rédaction. Tu as su me réconforter et m'encourager.

**UN GRAND MERCI A TOUS !!!**





# Sommaire

<i>Liste des rétrosynthèses et schémas</i> .....	<i>XV</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>XVIII</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>XIX</i>
<i>Introduction générale</i> .....	<i>1</i>
<i>Chapitre 1 : Etude bibliographique</i> .....	<i>7</i>
<b>1 Les polysaccharides bactériens</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Les différents polysaccharides bactériens</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Les polysaccharides de la paroi .....	7
1.1.2 Les polysaccharides extracellulaires.....	8
<b>1.2 Compositions et structure des EPS bactériens</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Polysaccharides bactériens produits à l'échelle industrielle et leurs principales applications</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Les glycosaminoglycanes (GAG)</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Structure et rôle physiologique</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Applications des GAG</b> .....	<b>14</b>
2.2.1 Activités anticoagulantes et antithrombotiques.....	14
2.2.2 Activités anti-inflammatoires .....	15
2.2.3 Traitements contre le cancer .....	15
2.2.4 Ingénierie tissulaire .....	16
<b>3 Les GAG-mimétiques d'origine naturelle</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Animaux marins</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Algues</b> .....	<b>17</b>
3.2.1 Les macroalgues .....	17
3.2.2 Les microalgues .....	19
<b>3.3 Les bactéries</b> .....	<b>19</b>
<b>4 Modifications structurales des polysaccharides d'origine naturelle</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1 Dépolymérisation</b> .....	<b>24</b>
4.1.1 Dépolymérisation par des procédés physico-chimiques.....	24
4.1.2 La dépolymérisation par voie enzymatique .....	25

<b>4.2</b>	<b>Substitutions ou ajout de groupements fonctionnels .....</b>	<b>27</b>
4.2.1	Greffage de groupements sulfate par voie chimique.....	28
4.2.2	Greffage de groupements sulfate par voie enzymatique.....	29
<b>5</b>	<b>Synthèse des GAG-mimétiques .....</b>	<b>32</b>
<b>Chapitre 2 : Synthèse de séquences oligosaccharidiques de l'unité répétitive de l'EPS natif d'<i>A. infernus</i> .....</b>		
<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>Rappel sur les couplages glycosidiques .....</b>	<b>36</b>
2.1	Mécanisme général .....	37
2.2	Groupe activant et promoteur associé.....	40
2.3	Influence du solvant sur la stéréosélectivité de la réaction.....	43
2.4	Effet des groupes protecteurs .....	45
2.5	Difficulté des couplages avec des acides uroniques.....	47
<b>3</b>	<b>Stratégie de synthèse des trois monomères du trisaccharide.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>Synthèse de l'unité galactose Gal 30.....</b>	<b>52</b>
4.1	Synthèse de l'intermédiaire commun 31.....	53
4.1.1	Synthèse de l'allylgalactopyranoside 39b <i>via</i> la glycosylation de Fischer .....	53
4.1.2	Synthèse du thiophénylgalactopyranoside 39a et de l'allylgalactopyranoside 39b <i>via</i> la glycosylation du $\beta$ -D-galactose pentaacétate commercial .....	54
4.1.3	Introduction du groupement 4,6-O-benzylidène .....	55
4.2	Synthèse des unités galactoses 30 en série -OAll et -SPh .....	57
4.2.1	Rappel sur l'ouverture réductrice et sur l'hydrolyse de l'acétal 4,6-O-benzylidène.....	58
4.2.2	Résultat ouverture réductrice en 4 .....	61
<b>5</b>	<b>Synthèse de l'unité acide galacturonique Gala 29.....</b>	<b>64</b>
5.1	Synthèse des substrats galactosyles devant subir l'étape d'oxydation à partir de l'intermédiaire commun 31a .....	64
5.2	Rappel sur les méthodes d'oxydation .....	66
5.3	Synthèse du substrat modèle et oxydation .....	68
<b>6</b>	<b>Couplage glycosidique.....</b>	<b>72</b>
6.1	Synthèse du disaccharide $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-Gala .....	73

6.1.1	Stratégie A : le couplage direct avec l'unité uronique GalA 29 .....	73
6.1.2	Stratégie B : Glycosylation avec un analogue neutre de l'accepteur GalA.....	75
6.2	Synthèse du disaccharide $\alpha$ -GalA(1→4)-Gal .....	79
<b>7</b>	<b>Synthèse de l'unité diacide glucuronique diGlcA .....</b>	<b>84</b>
7.1	Oxydation directe du disaccharide déprotégé 62 suivant le chemin A.....	85
7.2	trOxydation du disaccharide protégé 63 suivant le chemin B.....	88
<b>8</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>91</b>
	<b>Chapitre 3 : Dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif et de ses dérivés .....</b>	<b>93</b>
<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>93</b>
<b>2</b>	<b>Obtention de dérivés GAG-mimétiques à partir de l'EPS natif.....</b>	<b>94</b>
2.1	Etude de la cinétique enzymatique de l'EPS natif.....	94
2.1.1	Choix du surfactant .....	95
2.1.2	Choix du pH .....	97
2.1.3	Optimisation de la production des extraits protéiques .....	98
2.1.4	Validation de la dépolymérisation enzymatique par HPSEC-MALS.....	99
2.2	Dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif à plus grande échelle.....	102
2.3	Etude de l'activité enzymatique dans le mélange d'extraits cellulaires et les cellules lysées	108
<b>3</b>	<b>Dépolymérisation enzymatique des dérivés GAG-mimétiques obtenus par voie chimique.....</b>	<b>109</b>
<b>4</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>111</b>
	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>113</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>117</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>133</b>

## Table des figures

Figure 1 : Structure de l'EPS d' <i>A. infernus</i> .....	2
Figure 2 : Les deux stratégies pour obtenir des fragments constitutifs de l'unité répétitive. Approche 1 : Synthèse organique du pentasaccharide Approche 2 : Dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif. ....	3
Figure 3 : Parois de bactéries à Gram positif et à Gram négatif (adaptée de Leung et al., 2006) <sup>2</sup> . ....	8
Figure 4 : Les PG (Gandhi et al., 2008) <sup>14</sup> .....	11
Figure 5 : Structure commune entre l'unité répétitive de l'héparane sulfate et de l'héparine. ....	13
Figure 6 : Les deux unités répétitives principales de l'ulvane.....	18
Figure 7 : Structure de l'unité répétitive de l'héparosane .....	20
Figure 8 : Les deux structures possibles de l'unité répétitive de l'EPS HYD657 (Oligosaccharides 1 et 2). (adapté de Le Costaouëc et al., 2012). <sup>68</sup> .....	21
Figure 9 : Structure de l'unité répétitive de l'EPS ST716 (Rougeaux et al., 1998) <sup>69</sup> .....	22
Figure 10 : Structure de l'EPS HE800 produit par la bactérie <i>Vibrio diabolicus</i> (Rougeaux et al., 1999). <sup>70</sup> .....	22
Figure 11 : Unité répétitive de l'EPS GY785 produit par la bactérie <i>Alteromonas infernus</i> (Roger et al., 2004). <sup>72</sup> .....	23
Figure 12 : Les différents groupements fonctionnels qui peuvent être introduits sur un polysaccharide (PS) ; 1) Phosphorylation, 2) Alkylation, 3) Acylation, 4) Sulfatation .....	28
Figure 13 : Sulfatations de la chondroïtine conduisant à la chondroïtine-4-sulfate et à la chondroïtine-6-sulfate.....	31
Figure 14 : Structure du pentasaccharide A et du Fondaparinux synthétisé (petitou et al., 2004). <sup>126</sup> .	32
Figure 15 : Les barrières d'énergies d'activation du passage de la forme chaise à demi-chaise pour donneur de glycosyle 4,6-O-benzylidène et 4,6-di-O-benzyle. ....	46
Figure 16 : Articles publiés sur les différentes méthodes développées pour l'ouverture régiosélective de l'acétal 4,6-O-benzylidène (Ohlin et al. <sup>191</sup> ). ....	59
Figure 17 : Régiosélectivité observée pour l'ouverture du méthyle 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzylidéneglucopyranoside (adapté de Ohlin et al. <sup>191</sup> ). ....	59
Figure 18 : Les monomères GalA 28A et Gal 30 synthétisés. ....	71
Figure 19 : Produit d'oxydation <b>74</b> formé .....	87
Figure 20 : Les composés <b>79a</b> , R' = TBDPS et R= Ac, et <b>79b</b> , R' = Tr et R= Ac.....	89
Figure 21 : Les différentes unités Glc <b>28</b> , GalA <b>29</b> , Gal <b>30</b> préparées. ....	91
Figure 22 : Exemple de production de dérivés bas poids moléculaire par l'action d'enzymes. ....	93

Figure 23 : Liaisons coupées par les activités enzymatiques hydrolases, lyases et sulfatases observées lors de la dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif avec l'extrait intracellulaire soluble (lysate) de la bactérie <i>A. infernus</i> .	94
Figure 24 : Les surfactants Triton X-100 et Tween 20.	95
Figure 25 : Analyse en gel de polyacrylamide de l'évolution de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le lysate (L) et débris cellulaires (D) dans les conditions suivantes : sans surfactant (I), avec le Tween 20 (II), avec le Triton X-100 (III), avec le Triton X-100 et le Tween 20 (IV).	96
Figure 26 : Analyse en gel de polyacrylamide de l'évolution de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps par le lysate (L) et débris cellulaires (D) dans les conditions suivantes : tampon Tris HCl pH 8 (A) et tampon acétate pH 5,6 (B).	97
Figure 27 : Analyse électrophorétique, en gels d'agarose et de polyacrylamide, de l'évolution de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le lysate (L) et les débris cellulaires (D) produits dans les conditions de culture suivantes : tryptone/48 h/30°C (1), peptone de blé/48 h/30°C (2), peptone de blé/48 h/37°C (3).	99
Figure 28 : Suivi par HPSEC-MALS (détecteur RI) de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le lysate (L) et les débris cellulaires (D) : L + EPS (I), L (II), D + EPS (III), D (IV).	100
Figure 29 : Chromatogrammes HPSEC-MALS des dérivés standards dépolymérisés par voie chimique de l'EPS ayant des poids moléculaires de 4 000, 11 500, 20 000, et 230 000 g/mol.	101
Figure 30 : Suivi analytique de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec les débris cellulaires par électrophorèse en gel de polyacrylamide 20% (A) et par HPSEC-MALS (détecteur RI) (B).	102
Figure 31 : Purification par chromatographie SEC de l'EPS natif dépolymérisé avec l'extrait débris cellulaires (D) pendant 63 h d'incubation. Les signaux UV et RI sont indiqués respectivement en bleu et en gris (A). Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide 20% de l'EPS natif, de quatre dérivés standards obtenus par voie chimique ayant des poids moléculaires de 230 000, 20 000, 11 500 et 4 000 g/mol, et des 5 fractions obtenues par fractionnement SEC (B).	103
Figure 32 : Spectre MS/MS de la structure de l'octasaccharide isolé comme l'espèce $[M-2H]^{-2}$ au rapport m/z 748.4 en mode négatif. Le code couleur est le suivant : fragments sans perte de sulfate en rouge, fragments avec un sulfate en moins en bleu et la perte d'une molécule d'eau est symbolisée par un triangle.	107
Figure 33 : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à 27% de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le mélange débris cellulaires + lysate (D+L) ou les cellules lysées (CL) obtenus à partir de la culture d' <i>A. infernus</i> réalisée en fermenteur.	108
Figure 34 : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide de la dépolymérisation du dérivé d'EPS 200 000 g/mol faiblement sulfaté et des deux dérivés d'EPS 20 000 g/mol, respectivement faiblement et hautement sulfatés, au cours du temps avec les cellules lysées (CL).	110

Figure 35 : Unité de répétition octasaccharidique et portant deux groupements sulfate observée en spectrométrie de masse.....	112
Figure 36 : Structure de l'unité répétitive de l'EPS d' <i>A. infernus</i> présente sous les deux formes nonasaccharide et octasaccharide.....	115
Figure 37. Protein extract preparation from <i>A. infernus</i> culture.....	143

## Liste des rétro synthèses et schémas

Rétro synthèse 1 : Analyse de l'unité répétitive. ....	35
Rétro synthèse 2 : Voie rétro synthétique du trisaccharide <b>27</b> . ....	49
Rétro synthèse 3 : Rétro synthèse de l'intermédiaire commun <b>31</b> . ....	53
Rétro synthèse 4 : Voies rétro synthétiques du trisaccharide ciblé en passant la synthèse du disaccharide $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA ou du disaccharide $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal. Deux stratégies possibles pour la synthèse des disaccharides : couplage direct avec une unité uronique (Stratégie A) ou couplage avec une unité neutre puis oxydation (Stratégie B). ....	72
Rétro synthèse 5 : Accès au disaccharide $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA par le couplage direct avec l'unité GalA. .	73
Rétro synthèse 6 : Accès au disaccharide $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA par couplage avec une unité neutre puis oxydation. ....	75
Rétro synthèse 7 : Accès au disaccharide $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal par couplage avec une unité neutre puis oxydation. ....	79
Rétro synthèse 8 : Schéma rétro synthétique de l'unité diGlcA .....	88
Schéma 1 : Mécanisme avec rétention de configuration (A) avec inversion de configuration (B) (adapté de Stone et al., 2008). <sup>94</sup> .....	26
Schéma 2 : Mécanisme de $\beta$ -élimination d'une lyase sur des polysaccharides acides (adapté de Lombard et al., 2010). <sup>95</sup> .....	26
Schéma 3 : Action d'une $\alpha$ -glucane lyase sur un polysaccharide neutre (Lombard et al., 2010). <sup>95</sup> .....	26
Schéma 4 : Transfert d'un groupement sulfonate par une sulfotransférase (adapté de Paul et al 2012). <sup>119</sup> .....	30
Schéma 5 : Introduction du groupement sulfate sur la glucosamine par la NDST2. ....	31
Schéma 6 : Synthèse du Fondaparinux et du pentasaccharide B.....	33
Schéma 7 : Equation générale d'un couplage glycosidique avec comme accepteur de glycosyle (a) un ose ou (b) un aglycone. ....	36
Schéma 8 : Mécanisme de la réaction de couplage glycosidique. ....	37
Schéma 9 : Mécanisme réactionnel expliquant la stéréosélectivité 1,2-trans lors de la présence d'un groupement protecteur participant en O-2. ....	38
Schéma 10 : Glycosylation assistée par un groupement de type picolinyle (adapté d'Yasomane J.P. et al 2015) <sup>140</sup> .....	39
Schéma 11 : Activation directe (A) ou distale (B) du carbone anomérique par le promoteur. ....	40
Schéma 12 : Les méthodes d'activation des hémiacétales (A), des halogénures (B), des thioéthers (C), des acétates (D) et des imidates (E).....	41

Schéma 13 : Impact du solvant sur la réactivité/stéréosélectivité de la glycosylation (adapté de Bohé et al. 2015) <sup>169</sup> .....	43
Schéma 14 : Effet éther, effet nitrile : hypothèse de la coordination du solvant (A), hypothèse de la distribution du conformère et du contre-ion (B). .....	44
Schéma 15 : Glycosyle donneur (A) désarmé ou (B) armé.....	45
Schéma 16 : Illustration de l'effet armé/désarmé (adapté de Fraser-Reid et al. <sup>174</sup> ). .....	46
Schéma 17 : Trois exemples illustrant les difficultés observées lors de couplages glycosidiques impliquant des glycosyles esters. ....	47
Schéma 18 : Synthèse du tétrasaccharide <b>26</b> .....	48
Schéma 19 : Choix du groupement 4,6-O-benzylidène.....	50
Schéma 20 : L'intermédiaire commun <b>31</b> en série -SPh et -OAll.....	52
Schéma 21 : Synthèse de l'unité Gal <b>30</b> en série SPh et OAll.....	52
Schéma 22 : Synthèse du galactoside d'allyle <b>39b</b> dans les conditions de Fischer .....	53
Schéma 23 : Synthèse du thiophénylgalactoside <b>39a</b> et du galactoside d'allyle <b>39b</b> à partir du β-D-galactose pentaacétate. ....	54
Schéma 24 : Les deux principales méthodes d'introduction de l'acétal 4,6-O-benzylidène benzaldéhyde, ZnCl <sub>2</sub> ou AL (conditions A) et BDMA, catalyse acide (conditions B). ....	56
Schéma 25 : Condition optimale pour la formation de l'intermédiaire commun <b>30</b> en série SPh et en série OAll. ....	57
Schéma 26 : Benzylation en 2 et 3 sur le 4,6-O-benzylidènethiophénylgalactoside <b>31a</b> et le 4,6-O-benzylidènegalactoside d'allyle <b>31b</b> .....	57
Schéma 27 : Les possibilités de déprotection des hydroxyles 4 et 6 de l'acétal 4,6-O-benzylidène. ...	58
Schéma 28 : Régiosélectivité de l'ouverture réductrice de l'acétal benzylidène en présence d'un acide de Lewis (voie rouge) ou d'un acide de Brønsted (voie bleue) (adapté de Ohlin et al. <sup>191</sup> ). ....	60
Schéma 29 : Mécanisme réactionnel de l'ouverture réductrice de l'acétal 4,6-O-benzylidène en présence du couple BH <sub>3</sub> -NMe <sub>3</sub> /AlCl <sub>3</sub> dans le THF (adapté de Ellervik et al. <sup>197</sup> ).....	60
Schéma 30 : Conditions les plus utilisées pour former le 4-O-benzyle et le 6-O-benzyle. ....	61
Schéma 31 : Synthèse de l'unité galactosyle <b>30</b> en série SPh. ....	62
Schéma 32 : Synthèse de l'unité galactosyle <b>30</b> en série OAll. ....	62
Schéma 33 : Stratégie de synthèse de l'unité GalA.....	64
Schéma 34 : O-alkylation régiosélective de l'acétal stannique. ....	65
Schéma 35 : Monobenzylation sélective de l'intermédiaire commun <b>31a</b> en passant par l'acétal stannique puis insertion du p-méthoxybenzyle sur l'hydroxyle 2 .....	65
Schéma 36 : Hydrolyse de l'acétale 4,6-O-benzylidène. ....	66
Schéma 37 : Méthodes d'oxydations directes d'un hydroxyle primaire en acide carboxylique.....	67



Schéma 38 : Méthodes d'oxydations séquentielles d'un hydroxyle primaire en acide carboxylique en passage par l'aldéhyde. ....	67
Schéma 39 : Substrat modèle pour l'étape d'oxydation. ....	68
Schéma 40 : Synthèse de l'ester tribenzyle <b>29d</b> . ....	68
Schéma 41 : Synthèse des unités acides galacturoniques <b>29a</b> et <b>29c</b> . ....	70
Schéma 42 : Synthèse du bromure de glucoside <b>28a</b> . ....	73
Schéma 43 : Couplage glycosidique modèle. ....	74
Schéma 44 : Couplage glycosidique entre le bromure de glucoside <b>28a</b> et les unités GalA <b>29</b> . ....	75
Schéma 45 : Synthèse de l'accepteur de glycosyle neutre <b>49</b> . ....	76
Schéma 46 : Préparation du donneur trichloroacétimide <b>28b</b> . ....	76
Schéma 47 : Préparation du disaccharide <b>51</b> avec le donneur trichloroacétimide <b>28b</b> . ....	77
Schéma 48 : Préparation du donneur N-phényltrofluoroacétimide <b>28c</b> . ....	78
Schéma 49 : Préparation du disaccharide <b>51</b> avec le donneur N-phényltrofluoroacétimide <b>28c</b> . ....	78
Schéma 50 : Libération et oxydation/estérification de l'hydroxyle primaire du disaccharide <b>51</b> . ....	78
Schéma 51 : Exemple de couplage glycosidique en présence du couple NMPTC/TMSOT. ....	80
Schéma 52 : Activation d'un thioglycosyle en présence du couple PhSCI/AgOTf. ....	81
Schéma 53 : Synthèse du disaccharide <b>55a</b> avec le donneur de glycosyle 4,6-O-benzylidène <b>38a</b> . ....	82
Schéma 54 : Synthèse du disaccharide <b>55c</b> avec le donneur 4,6-benzylidène <b>38c</b> . ....	83
Schéma 55 : Stratégie de synthèse de l'unité diGlcA, chemin A : Oxydation d'un disaccharide libre ; Chemin B : Oxydation d'un disaccharide sur lequel seul les OH primaires sont libres. ....	84
Schéma 56 : Trois exemples d'oxydation de déprotégés. ....	85
Schéma 57 : Préparation du thiophénylcellobioside déprotégé <b>62</b> . ....	86
Schéma 58 : Schéma de synthèse du substrat modèle <b>76</b> . ....	87
Schéma 59 : Essai d'oxydation du thiophénylglucoside déprotégé <b>76</b> . ....	88
Schéma 60 : Préparation du didérivé trityle <b>79a</b> . ....	89
Schéma 61 : Accès au thiophénylcellobioside benzylé <b>66</b> . ....	89
Schéma 62 : Synthèse du substrat modèle <b>80</b> . ....	90
Schéma 63 : Application des conditions d'oxydation/estérification précédemment mise au point avec le thiophénylgalactoside tribenzylé <b>41d</b> (cf paragraphe 5.3 p.66). ....	90
Schéma 64 : Schéma récapitulatif des stratégies A et B utilisées lors des couplages glycosidiques. ...	92
Schéma 65 : Unité diGlcA préparée. ....	92
Schéma 66 : Préparation des unités Glc, GalA et Gal. ....	113
Schéma 67 : Schéma bilan des unités préparées durant la thèse. ....	114
Schéma 68 : Bilan sur la préparation de l'unité diGlcA. ....	114

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux EPS bactériens utilisés dans l'industrie : la cellulose, le dextrane, le xanthane, l'alginate et le gellane (adapté de Oner et al., 2013) <sup>5</sup> . Rdt : Rendement .....	10
Tableau 2 : Les principaux GAG (adapté de Gandhi et al., 2008) <sup>14</sup> .....	12
Tableau 3 : Les deux groupes de fucanes, polysaccharides d'algues brunes (adapté de Jiao et al., 2011). <sup>40</sup> .....	19
Tableau 4 : Essais d'optimisation du substrat modèle <b>41d</b> .....	69
Tableau 5 : Essais d'estérification des acides <b>44a</b> et <b>44c</b> . .....	70
Tableau 6 : Les conditions opératoires utilisées lors des essais de synthèse du disaccharide <b>55a</b> avec le donneur 4,6-benzylidène <b>38a</b> . .....	82
Tableau 7 : Les conditions opératoires utilisées lors des essais de synthèse du disaccharide <b>54c</b> avec le donneur 4,6-benzylidène <b>38c</b> .....	83
Tableau 8 : Essais d'oxydation du phényle thiocellobiose déprotégé <b>62</b> . .....	87
Tableau 9 : Les quantités des fractions isolées après la chromatographie d'exclusion stérique. ....	103
Tableau 10 : Composition osidique (ratio molaire) et protéique (% en poids) des quatre fractions isolées après la chromatographie d'exclusion stérique ainsi que des débris cellulaires (D). (Nd : Non déterminé) .....	104
Tableau 11 : Analyse par UHPLC-MS des fractions obtenues après la purification par chromatographie SEC de l'EPS natif dépolymérisé avec l'extrait débris cellulaires D. Les structures ont été schématisées en accord avec le « Symbol Nomenclature for Glycan » (SNFG). <sup>241</sup> .....	105
Tableau 12 : Les caractéristiques structurales principales des PS issus de microalgues (adapté de C. Delattre et al., 2016). <sup>48</sup> .....	133
Tableau 13 : Exemples de bactéries et des EPS qu'elles produisent. Ara : arabinose, Fru : Fructose, Gro: Glycerophosphate, S ou SO <sub>3</sub> : sulfate, t-: terminal (adapté de Collic-Jouault et al., 2019). <sup>245</sup> .....	136

## Liste des abréviations

<b>ACE</b>	Electrophorèse d'affinité (affinity co-electrophoresis)
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AH</b>	Acide hyaluronique
<b><i>A. infernus</i></b>	<i>Alteromonas infernus</i>
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>Ba</b>	Bacillariophyte
<b>CaZymes</b>	Carbohydrate Active enZyme
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>Cha</b>	Charophyte
<b>Ch</b>	Chlorophyte
<b>CL</b>	Cellules lysées
<b>CMC</b>	Concentration micellaire critique
<b>CPS</b>	Polysaccharide capsulaire
<b>CS</b>	Chondroïtine sulfate
<b>CSM</b>	Cellules souches mésenchymateuses
<b>Cy</b>	Cyanobactérie
<b>D</b>	Débris cellulaires
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DMAP</b>	4-diméthylaminopyridine
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -diméthylformamide
<b>DR</b>	Dérivés obtenus par dépolymérisation radicalaire
<b>DRS</b>	Dérivés obtenus par dépolymérisation radicalaire suivie d'une étape de sulfatation
<b>DS</b>	Dermatane sulfate
<b>EPS</b>	exopolysaccharide
<b>Fuc</b>	Fucose
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycanes
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GalA</b>	Acide galacturonique
<b>GalNAc</b>	<i>N</i> -acétylgalactosamine
<b>GEA</b>	Groupe électroattracteur
<b>GED</b>	Groupe électrodonneur

<b>Glc</b>	Glucose
<b>GlcA</b>	Acide glucuronique
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acétylglucosamine
<b>H</b>	Héparine
<b>HBPM</b>	Héparine de bas poids moléculaire
<b>He-CTD MS/MS</b>	Dissociation par Transfert de Charge d'hélium en tandem avec la spectrométrie de masse
<b>HHPM</b>	Héparine de haut poids moléculaire
<b>HPSEC</b>	Chromatographie liquide d'Exclusion Stérique Haute Pression
<b>HNF</b>	Héparine non fractionnée
<b>HS</b>	Héparane sulfate
<b>Ido</b>	Acide iduronique
<b>KS</b>	Kératane sulfate
<b>L</b>	Lysat
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>Man</b>	Mannose
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -acétylmuramique
<b>NIS</b>	<i>N</i> -iodosuccinimide
<b>NMPTC</b>	<i>N</i> -( <i>p</i> -Méthylphénylthio)- $\epsilon$ -caprolactame
<b>PAGE</b>	Electrophorèse en gel de poly-acrylamide
<b>PAPS</b>	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
<b>PG</b>	Protéoglycane
<b>PS</b>	Polysaccharide
<b>PTFAI</b>	<i>N</i> -phényltrifluoroacétimide
<b>Rha</b>	Rhamnose
<b>TBDPS</b>	<i>t</i> -butyldiphénylesilyles
<b>TCA</b>	Trichloroacétimide
<b>TEMED</b>	Tétraméthyléthylènediamine
<b>TFA</b>	Acide trifluoacétique
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Transforming growth factor $\beta$ 1
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>Tris</b>	2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
<b>TTBP</b>	2,4,6-tri- <i>t</i> -butylpyrimidine
<b>UHPLC-MS</b>	Chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse
<b>Xyl</b>	Xylose





## Introduction générale

Les polysaccharides sont des macromolécules biologiques ubiquitaires chez les organismes vivants. Ils sont présents dans les plantes (cellulose, pectine), les animaux (acide hyaluronique, chitine), et les algues (alginate, carraghénane). Les polysaccharides peuvent également être synthétisés par des microorganismes, en particulier des bactéries (dextrane, xanthane). Leurs propriétés biologiques et physico-chimiques ainsi que leur biodégradabilité et biocompatibilité font d'eux d'intéressants candidats pour des applications en cosmétique et agro-alimentaire, mais également pour le développement de nouveaux médicaments.

Les glycosaminoglycane ou GAG (héparine, héparane sulfate, chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, kératane sulfate et l'acide hyaluronique) sont des polysaccharides présents dans les tissus animaux et bien connus pour leur capacité à réguler des fonctions biologiques. Impliqués dans les processus physiologiques et pathologiques des cellules, les GAG ont montré leur potentiel en santé humaine en tant qu'anticoagulants, anti-inflammatoires, anti-cancéreux ainsi que dans l'ingénierie tissulaire. L'activité biologique de ces macromolécules est principalement due aux groupements anioniques (carboxyliques et sulfates), majoritairement responsables des interactions non-covalentes avec les protéines. L'héparine est le plus connu des GAG pour ses propriétés anticoagulantes et antithrombotiques. Néanmoins, l'utilisation de ces polysaccharides pose plusieurs problèmes. Du fait de leur extraction de tissus animaux, les risques de contamination par des agents pathogènes, tels que les prions ou des virus, sont importants. Ces inconvénients poussent les communautés scientifique et médicale à se tourner vers des polysaccharides analogues, encore appelés GAG-mimétiques, d'origine naturelle ou synthétique ayant des propriétés biologiques comparables.

Les microorganismes (microalgues, bactéries...) peuvent constituer une source riche de nouveaux composés. Certains microorganismes comme les bactéries produisent des polysaccharides extracellulaires nommés exopolysaccharides. Dans l'industrie, les bactéries productrices d'EPS sont cultivables dans des fermenteurs, dans des conditions stériles qui peuvent être optimisées pour obtenir des rendements satisfaisants (> 5 g/litre de culture).

L'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer) développe depuis plusieurs années des travaux sur la connaissance des océans et leurs ressources. A la suite de l'exploration des sources hydrothermales profondes, différentes bactéries productrices d'EPS ont été isolées. En particulier, la bactérie marine *Alteromonas infernus*, capable de sécréter un EPS présentant une structure atypique, a été découverte. Cet EPS est un hétéropolysaccharide acide de très haut poids moléculaire (>10<sup>6</sup> g/mol), faiblement sulfaté (10% de groupement sulfate) et branché. La structure de l'EPS d'*A. infernus* a été déterminée au cours de la thèse d'Olivier Roger menée à l'Ifremer et soutenue en 2004 (Figure 1). L'EPS présente une unité répétitive constituée de neuf monosaccharides. Ce

nonasaccharide est constitué d'une chaîne principale de trois monosaccharides avec un acide galacturonique **GalA** au centre portant une chaîne latérale en position C<sub>3</sub> et un groupement sulfate en position C<sub>2</sub>. Sur la chaîne principale, le **GalA** est substitué par un glucose (**Glc**) en position C<sub>4</sub> et un galactose (**Gal**) en position C<sub>1</sub>. La chaîne latérale est composée deux acides glucuroniques (**GlcA**), un galactose et un glucose. Chaque **GlcA** est substitué par un glucose terminal. L'originalité de cette structure est due à la complexité de son unité répétitive qui contient 3 acides uroniques en son cœur (**GlcA**, **GlcA** et **GalA**) et à la présence d'un groupement sulfate. En effet très peu de polysaccharides bactériens sont naturellement sulfatés.

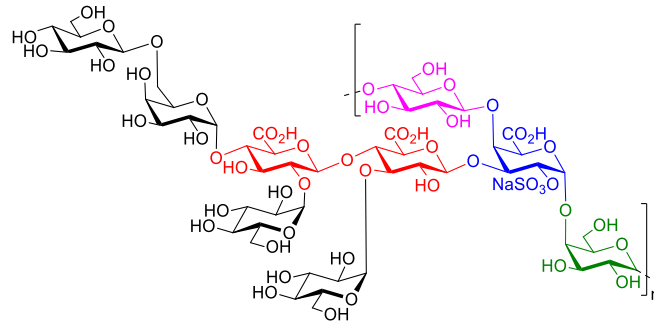


Figure 1 : Structure de l'EPS d'*A. infernus*.

Sous sa forme native, l'EPS d'*A. infernus* peut être considéré comme un GAG-mimétique par la présence des acides uroniques et des groupements sulfate. Cependant cet EPS peut être modifié pour augmenter son caractère GAG-mimétique et obtenir des dérivés présentant les caractéristiques physico-chimiques des GAG : un poids moléculaire plus bas et un taux de sulfate plus élevé. Ainsi, la modification chimique de l'EPS d'*A. infernus* a permis la préparation de dérivés de bas poids moléculaire (10 000 à 200 000 g/mol) hautement sulfatés (> 30% de groupement sulfate) dotés de propriétés GAG-mimétiques telles que des activités anti-coagulantes, anti-métastatiques ou favorisant la différenciation cellulaire. Dans ce cas, les dérivés de bas poids moléculaire ont été obtenus par dépolymérisation radicalaire. Il se peut que la structure originale de l'EPS ait pu ainsi être modifiée suite au procédé chimique avec notamment la perte de certains oses constitutifs de la chaîne latérale de l'unité répétitive.

L'objectif principal de la thèse porte sur l'élucidation structurale des dérivés de l'EPS produit par la bactérie *A. infernus*, ces dérivés présentant un fort potentiel en santé humaine. Actuellement, les dérivés bioactifs GAG-mimétiques sont obtenus par dépolymérisation radicalaire et ont des poids moléculaires compris entre 10 000 à 200 000 g/mol (ou daltons). Afin d'élucider la structure fine des dérivés bioactifs et de déterminer les éléments structuraux essentiels à l'activité biologique de ces dérivés, deux approches ont été explorées :



La première approche consistait en la synthèse du pentasaccharide qui constitue le cœur de l'unité répétitive de l'EPS (Figure 2 : Approche 1). Cette synthèse a été menée de manière convergente à partir de D-(+)-Cellobiose, du D-(+)-Galactose et du D-(+)-Glucose commerciaux pour obtenir des oligosaccharides de 2 à 5 monosaccharides et les caractériser.

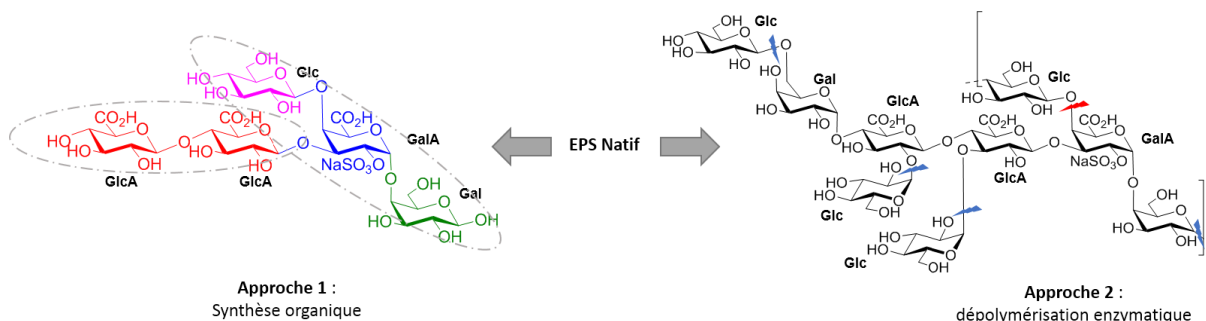


Figure 2 : Les deux stratégies pour obtenir des fragments constitutifs de l'unité répétitive. Approche 1 : Synthèse organique du pentasaccharide Approche 2 : Dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif.

La deuxième approche visait à obtenir des oligosaccharides par la dégradation enzymatique de l'EPS natif à l'aide des extraits cellulaires de la souche *A. infernus* (Figure 2 : Approche 2). En effet des études antérieures menées à l'Ifremer ont montré que des enzymes synthétisées par *A. infernus* sont capables de dépolymériser son propre EPS. Contrairement à la dépolymérisation chimique, l'utilisation des enzymes d'*A. infernus* devraient permettre de cliver de manière spécifique l'EPS et d'obtenir de manière reproductible des oligosaccharides assez homogènes conservant la structure initiale. Différentes études ont été réalisées pour isoler et caractériser de tels oligosaccharides.

Grâce aux deux approches développées, toute une librairie d'oligosaccharides présentant les motifs structuraux originaux de l'EPS d'*A. infernus* devrait être constituée pour faciliter l'analyse structurale des dérivés bioactifs actuellement obtenus par voie chimique. L'identification des motifs ou éléments structuraux devrait apporter des informations sur la relation structure-fonction de cette famille de dérivés bioactifs pour améliorer leur rapport bénéfice /risque.

La **première partie** de ce mémoire présentera une analyse de la bibliographie sur les polysaccharides bactériens, les GAG et la production de GAG-mimétiques.

Un **second chapitre** sera consacré aux résultats obtenus lors de la synthèse organique de fragments constitutifs de l'unité répétitive de l'EPS. Ces travaux ont été réalisés au sein de l'équipe SYMBIOSE (laboratoire CEISAM UMR CNRS 6230) à l'Université de Nantes.

Le **troisième chapitre** présentera et discutera des résultats obtenus lors de la dépolymérisation enzymatiques de l'EPS natif et de ces dérivés. Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire Ecosystèmes Microbiens & Molécules Marines pour les Biotechnologies (EM<sup>3</sup>B) à l'Ifremer de Nantes.

Nous avons choisi de rédiger les matériels et méthodes du chapitre dépolymérisation enzymatique en anglais afin de l'homogénéiser avec ceux du chapitre synthèse. Les matériels et méthodes sont donc présentés à la fin du manuscrit dans la partie annexe (cf Annexe 3 p.139).

Ce travail de thèse a donné lieu à un article dans un journal international à comité de lecture.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Corinne Siquin, Laëticia Marchand, Mathieu Fanuel, David Ropartz, Hélène Rogniaux, Muriel Pipelier, Christine Delbarre-Ladrat, Sylvia Collic-Jouault. Characterization of New Oligosaccharides Obtained by An Enzymatic Cleavage of the Exopolysaccharide Produced by the Deep-Sea Bacterium *Alteromonas infernus* Using its Cell Extract. *Molecules*, **2019**, *24*, 3441.

(DOI : <https://doi.org/10.3390/molecules24193441>)

Ce travail de thèse a aussi donné lieu à plusieurs communications dans des congrès nationaux et internationaux.

❖ Congrès nationaux

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. A Glycosaminoglycan mimetic derivative from a marine bacterial exopolysaccharide and innovative concepts for its structural elucidation. Journées ED sciences de la mer et du littoral, 28 février au 1<sup>er</sup> mars 2019, La Turballe, France. Poster.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. A Glycosaminoglycan mimetic derivative from a marine bacterial exopolysaccharide and innovative concepts for its structural elucidation. Journée GlycoOuest, 31 janvier 2019, Roscoff, France. Communication orale.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. A Glycosaminoglycan mimetic derivative from a marine bacterial exopolysaccharide and innovative concepts for its structural elucidation. Les 3èmes journées du GDR Gagosciences, 24-25 septembre 2018, Lille, France. Poster.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. A Glycosaminoglycan mimetic derivative from a marine bacterial exopolysaccharide

and innovative concepts for its structural elucidation. Les 27<sup>èmes</sup> journées du Groupe 21 au 25 mai 2018 Français des Glycosciences (GFG) à Nouan le Fuzelier, France. Communication orale.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. A Glycosaminoglycan mimetic derivative from a marine bacterial exopolysaccharide and innovative concepts for its structural elucidation. Journée GlycoOuest, 12 janvier 2018, Rennes, France. Communication orale.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. A Glycosaminoglycan mimetic derivative from a marine bacterial exopolysaccharide and innovative concepts for its structural elucidation. Journée des doctorants du Centre Ifremer Atlantique, 17 octobre 2017, Nantes, France. Communication orale.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. A Glycosaminoglycan mimetic derivative from a marine bacterial exopolysaccharide and innovative concepts for its structural elucidation. Journée GlycoOuest, 9 décembre 2016, Nantes, France. Communication orale.

❖ Congrès internationaux

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Christine Delbarre-Ladrat, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. Glycosaminoglycan mimetics from marine bacterial exopolysaccharides and innovative concepts for their structural elucidation. La 55<sup>ème</sup> édition des Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique (RICT), 15 au 19 juillet 2018, Nantes, France. Poster.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Christine Delbarre-Ladrat, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. Glycosaminoglycan mimetics from marine bacterial exopolysaccharides and innovative concepts for their structural elucidation. 13<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM13), 19 au 22 mai 2019, Toulouse, France. Poster.

Christine Delbarre-Ladrat, **Katy Akoumany**, Marion Le Gal, Laetitia Marchand, Claire Donnay-Moreno, Corinne Sinquin, Sylvia Collic-Jouault, Agata Zykwinska (2019). Novel enzymes to obtain bioactive oligosaccharides from a marine-derived complex exopolysaccharide. Carbohydrate Bioengineering Meeting, CBM13, 19-22 mai, Toulouse. Poster.

**Katy Akoumany**, Agata Zykwinska, Christine Delbarre-Ladrat, Jacques Lebreton, Didier Dubreuil, Muriel Pipelier, Sylvia Collic-Jouault. Glycosaminoglycan mimetics from marine bacterial exopolysaccharides and innovative concepts for their structural elucidation. 29<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium (ICS 2018), 15 au 19 juillet 2018, Lisbonne, Portugal. Poster

Quatre stagiaires ont participé à ces travaux de thèse.

- ❖ Camille Guitteny, Master 2 - Polymères et Principes Actifs d'Origine Naturelle, 6 mois
- ❖ Erwan Beving, Licence 3 Chimie, 2 mois
- ❖ Adrien Combe, Master 1 Chimie Moléculaire Thérapeutique, 2 mois.
- ❖ Sébastien Depienne, Master 1 Chimie Moléculaire Thérapeutique, 5 mois.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

### 1 Les polysaccharides bactériens

#### 1.1 Les différents polysaccharides bactériens

Les polysaccharides bactériens représentent différentes familles de macromolécules telles que les polysaccharides capsulaires ou extracellulaires et peuvent exister sous forme conjuguée comme les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides. Ils assurent la structure de la paroi des cellules bactériennes, la communication cellule-cellule et la protection de la bactérie contre le stress environnemental.<sup>1</sup>

Les polysaccharides bactériens sont classés en trois catégories en fonction de leur localisation cellulaire :

- Les polysaccharides intracellulaires : localisés dans le cytosol, ils sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie par la cellule. Ils ne seront pas développés dans ce chapitre.
- Les polysaccharides de la paroi tels que les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides (LPS).
- Les polysaccharides extracellulaires ou exocellulaires comme les polysaccharides capsulaires (CPS) et les exopolysaccharides (EPS).

##### 1.1.1 Les polysaccharides de la paroi

La paroi des bactéries est une enveloppe rigide qui contribue à l'intégrité de la cellule. Les principales familles de glycopolymères qui la composent sont les acides téichoïques, les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides.

Les parois des bactéries à Gram positif et à Gram négatif diffèrent principalement par leur architecture. La paroi des bactéries à Gram positif est composée majoritairement de peptidoglycanes ainsi que des acides lipoteichoïques et teichoïques tandis que la paroi des bactéries à Gram négatif est plus complexe. En effet, les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par une double membrane : les membranes interne et externe sont séparées et reliées entre elles par des chaînes de peptidoglycanes et des oligopeptides (Figure 3).

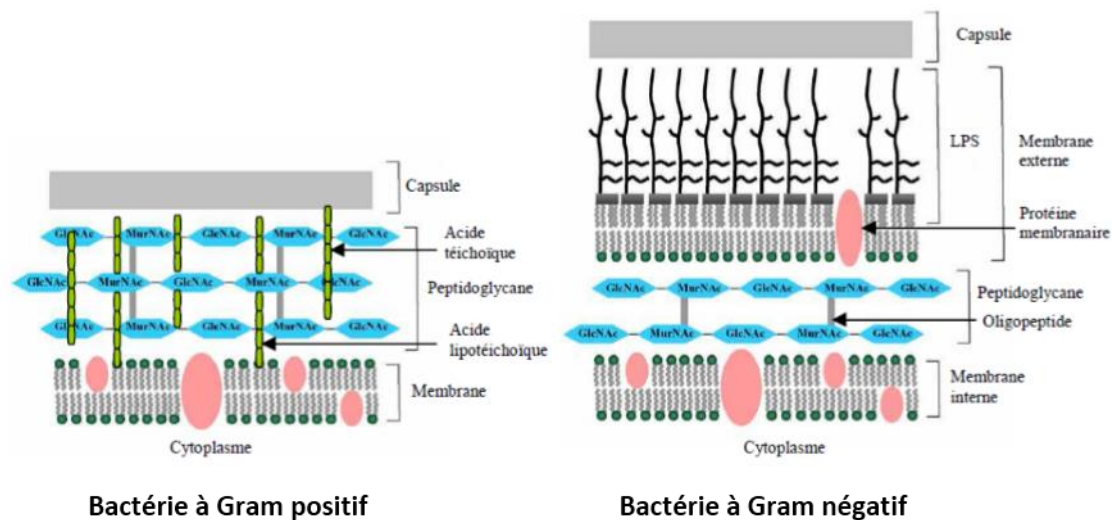


Figure 3 : Parois de bactéries à Gram positif et à Gram négatif (adaptée de Leung et al., 2006)<sup>2</sup>.

Les peptidoglycans sont des hétéropolymères formés de longues chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des unités peptidiques. Ces unités peptidiques sont formées au minimum par quatre aminoacides des séries D et L. L'unité répétitive de la partie glycanes est un disaccharide constitué de la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et de l'acide N-acétylmuramique (MurNAc) liés entre eux par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1→4).

Les lipopolysaccharides LPS sont associés à la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les LPS comprennent trois domaines structuraux : une région lipidique nommée « lipide A » ancrée dans la membrane externe, un domaine oligosaccharidique appelé « noyau » ou « core » et une chaîne polysaccharidique « chaîne O » de longueur variable spécifique de l'espèce bactérienne. Cette chaîne O est un polysaccharide antigénique et est nommée pour cette raison « antigène O spécifique » ; sa composition osidique est spécifique d'une souche. Le lipide A contient des dimères phosphorylés de  $\beta$ -(1→6)-glucosamines (GlcN) et des acides gras. Le noyau des LPS contient des unités glucose (Glc), galactose (Gal), ainsi que l'heptose (Hep) et l'acide 3-désoxy-oct-2-ulosonique (Kdo) pouvant porter des substituants (groupement phosphate, éthanolamine et acide aminé).

### 1.1.2 Les polysaccharides extracellulaires

Le terme polysaccharides extracellulaires ou encore exocellulaires comprend les polysaccharides capsulaires (CPS), associés à la surface de la membrane externe et formant une couche fine autour de la cellule et les exopolysaccharides (EPS), faiblement liés à la membrane externe, et pouvant facilement s'en détacher. Les polysaccharides extracellulaires sont produits par des bactéries à Gram négatif, à Gram positif ainsi que par les cyanobactéries. Alors que les CPS ont une fonction directement liée à la pathogénicité et à l'adhésion de la cellule bactérienne chez son hôte, les EPS

peuvent avoir différents rôles biologiques incluant l'adhésion mais aussi l'interaction cellule-cellule, la formation de biofilm et la protection contre les agressions environnementales.<sup>3</sup>

Dans ce manuscrit, l'étude bibliographique sera focalisée sur les EPS.

## **1.2 Compositions et structure des EPS bactériens**

Les EPS bactériens sont des polymères de haut poids moléculaire produits par les bactéries et relargués dans le milieu environnant. Ces glycopolymères sont composés d'un enchaînement de résidus osidiques aussi nommés monosaccharides ou monomères liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ils peuvent être séparés en deux catégories : les homopolysaccharides, constitués d'un seul type de monosaccharide et les hétéropolysaccharides, composés de monosaccharides différents. Les EPS sont généralement caractérisés par une unité répétitive ; l'alginate bactérien représente une exception à cela. Les monomères constitutifs de l'unité répétitive peuvent être de différentes natures : neutres, acides ou aminés. La nature des monomères apporte aux polysaccharides le caractère ionique. Les monomères les plus fréquemment rencontrés chez les EPS bactériens sont les hexoses comme Glc, Gal, ou le D-mannose (Man), ainsi que les acides uroniques tels que l'acide D-glucuronique (GlcA) et l'acide D-galacturonique (GalA). Des désoxyoses (méthyl-pentoses) sont aussi décrits, il s'agit du L-fucose (Fuc) et du L-rhamnose (Rha). Les pentoses tels que le D-ribose (Rib), D-xylose (Xyl) et le D-arabinose (Ara) sont rarement observés. Les hexosamines les plus courantes sont GlcNAc et GalNAc.<sup>4,5</sup> La composition osidique de l'unité répétitive, son degré de polymérisation et de ramification ainsi que la présence de substituants organiques (acétyle, acide pyruvique) ou inorganiques (phosphates, sulfates) ont une influence sur les propriétés fonctionnelles (chimiques, physico-chimiques, biologiques) de l'EPS. Le type de liaisons chimiques retrouvées au sein des structures a également une incidence sur la rigidité des liaisons entre les monomères. Les liaisons  $\beta$ -(1→4) ou  $\beta$ -(1→3), plutôt rigides, et les liaisons  $\alpha$ -(1→6) et  $\alpha$ -(1→2), plutôt flexibles, sont souvent retrouvées dans les séquences polysaccharidiques.<sup>6</sup>

## **1.3 Polysaccharides bactériens produits à l'échelle industrielle et leurs principales applications.**

La production industrielle des EPS par des bactéries présente plusieurs avantages : (i) la bactérie sécrète le polysaccharide dans son milieu de culture rendant l'extraction plus facile, (ii) les conditions de fermentation (pH, température, agitation, composition du milieu...) sont compatibles avec un développement industriel (iii) les paramètres peuvent être optimisés pour produire un EPS avec un rendement optimal et sans variabilité de sa structure chimique et de ses propriétés physico-chimiques et biologiques. Toutefois, le principal verrou technologique à débloquent afin d'aboutir à une

production rentable pour la commercialisation est le rendement de production.<sup>7</sup> De plus, une pureté élevée est nécessaire pour qu'un EPS bactérien puisse être utilisé dans le domaine de la santé. Tous ces points à respecter entraînent généralement des coûts élevés de production et par conséquent un nombre limité de polysaccharides bactériens sont commercialisés à l'échelle industrielle.<sup>5</sup> Le Tableau 1 présente cinq EPS bactériens utilisés dans l'industrie : le dextrane, le xanthane, l'alginate, le gellane et la cellulose. A noter que la cellulose et l'alginate utilisés industriellement sont principalement issus de plantes, respectivement des plantes terrestres et des algues brunes marines.

Tableau 1 : Cinq EPS bactériens utilisés dans l'industrie : la cellulose, le dextrane, le xanthane, l'alginate et le gellane (adapté de Oner et al., 2013)<sup>5</sup>. Rdt : Rendement

EPS	Monomères	Charge	Produit par	Rdts	Application
<b>Dextrane</b>	Glc	Neutre	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	~7-8 g/L (12h de culture)	Epaississant, gélifiant
<b>Xanthane</b>	Glc, Man, GlcA	Anionique	<i>Xanthomonas campestris</i>	52,1 g/L (6 jours)	Texturant
<b>Alginate</b>	Acide guluronique, acide mannuronique	Anionique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>		Gélifiant
<b>Gellane</b>	Glc, Rha, GlcA	Anionique	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	13,8 g/L (6 jours)	Stabilisant, gélifiant
<b>Cellulose</b>	Glc	Neutre	<i>Gluconacetobacter Xylinus</i>	~3 g/L	

Le premier EPS bactérien produit à l'échelle industrielle et commercialisé est le dextrane synthétisé par la bactérie lactique à Gram positif du genre *Leuconostoc*. C'est un homopolysaccharide de glucose utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour ses propriétés gélifiantes. Le xanthane est produit par la bactérie à Gram négatif *Xanthomonas campestris*. C'est un hétéropolysaccharide et son unité répétitive est un pentasaccharide composé de Glc, Man et GlcA. Le xanthane est utilisé notamment dans l'industrie agro-alimentaire en tant que texturant. L'alginate est secrété par les bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas* et *Azotobacter*. C'est un hétéropolysaccharide anionique et linéaire composé d'acide mannuronique et d'acide guluronique de la série L.<sup>8</sup> Ce polymère est utilisé pour ses propriétés de gélification notamment comme matrice de microencapsulation de biomolécules ainsi que dans des procédés de biotransformation en tant que matrice pour l'immobilisation d'enzymes et de cellules.<sup>9</sup> Le gellane est produit par la bactérie à Gram négatif *Sphingomonas paucimobilis* et est composé des monomères Glc, Rha et GlcA.<sup>10</sup> Il est aussi un agent gélifiant, le Gelrite®, notamment utilisé pour solidifier les milieux de culture à haute température pour l'étude des microorganismes thermophiles.<sup>11</sup>



## 2 Les glycosaminoglycanes (GAG)

### 2.1 Structure et rôle physiologique

Les GAG sont localisés dans le tissu conjonctif des animaux. Très présent dans l'organisme, ce tissu soutient, entoure et comble de nombreux organes. Il en existe différentes variétés et l'intégrité de ce tissu est indispensable au bon fonctionnement de nombreux autres tissus et organes (e.g. peau, cartilage, os, cornée, tendon, muscle, nerfs périphériques...). Les GAG sont présents à la surface des cellules animales et dans la matrice extracellulaire (MEC). Ils interagissent avec différentes protéines de signalisation impliquées dans les processus immunitaires et inflammatoires telles que les cytokines (e.g. les interleukines, les chimiokines, les facteurs de croissance) et aussi les molécules d'adhésion (e.g. les sélectines et les intégrines). Ces GAGs sont donc impliqués dans des nombreux processus physiologiques et pathologiques.<sup>12,13</sup>

Les GAG sont, pour la plupart, liés de façon covalente à une protéine cœur « core protein », elle-même attachée à la membrane plasmique. Ce complexe GAG-protéine forme le protéoglycane (PG) (Figure 4). La biosynthèse du PG débute par la synthèse de la protéine sur laquelle un tétraholoside particulier ou région de liaison « linker » se greffe *via* les sérines. À partir de cette structure d'ancrage, une chaîne polysidique se forme par élongation avec l'ajout alterné d'un nombre variable d'unités d'oses acides (ou d'oses neutres) et d'oses aminés. Cette chaîne polysidique subit ensuite des modifications comme la *N*-déacétylation, *N*-sulfatation, *C*<sub>5</sub> épimérisation, 2-*O*-sulfatation, 6-*O*-sulfatation et 3-*O*-sulfatation. De cette biosynthèse organisée en multi-étapes, une immense diversité structurale des chaînes de GAG (variabilité de taille, du taux de *N*- et *O*-sulfatation...) est obtenue.

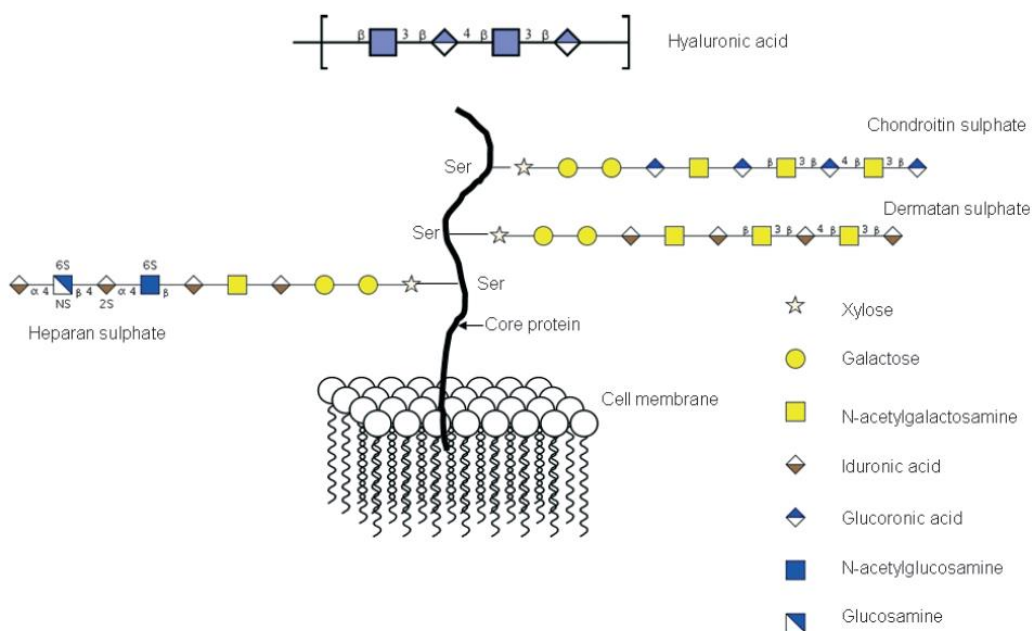
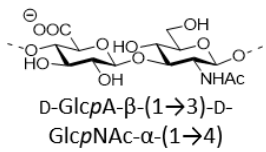
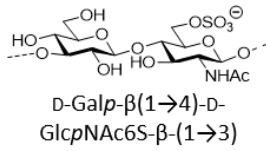
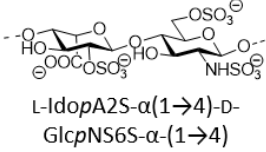
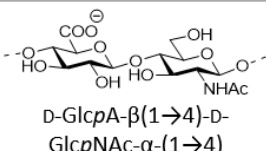
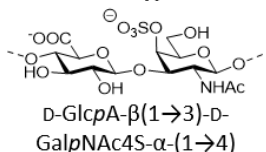
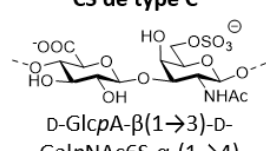
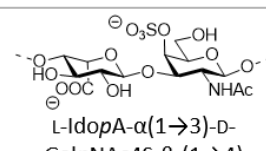


Figure 4 : Les PG (Gandhi et al., 2008)<sup>14</sup>

En terme de structure, les GAG sont des hétéropolysaccharides linéaires, anioniques, ayant un poids moléculaire compris entre 10 000 et 100 000 g/mol. Leur unité répétitive est un disaccharide composé d'un acide uronique (GlcA ou acide iduronique (IdoA)) ou d'un résidu neutre (Gal) et d'une hexosamine (glucosamine ou galactosamine).

Le Tableau 2 décrit les GAG.

Tableau 2 : Les GAG (adapté de Gandhi et al., 2008)<sup>14</sup>

GAG	Unité répétitive	Poids moléculaire (kg/mol)	Localisation	Rôle physiologique
<b>Acide hyaluronique (AH)</b>	 D-GlcA-β(1→3)-D-GlcNAc-α(1→4)	4 – 8 000	Dans les fluides synoviaux ou dans les tissus conjonctifs lâches de la MEC	Maintien de l'hydratation, impliqué dans l'adhésion et migration cellulaire, croissance tumorale, interaction avec le récepteur CD44 Rôle dans la cicatrisation organogénèse
<b>Kératane sulfate (KS)</b>	 D-Galp-β(1→4)-D-GlcNAc6S-β(1→3)	4 - 19	KS I : Cornée, cartilage KS II : Cartilage	Hydratation des tissus Homéostasie tissulaire
<b>Héparine (H)</b>	 L-IdoA2S-α(1→4)-D-GlcNAc6S-α(1→4)	10 - 12	Présent dans les mastocytes au sein des granules de stockage cytoplasmique (cellules foie, peau et poumon)	Interaction avec les molécules extracellulaires et cellulaires Communication intercellulaire, différenciation, prolifération, adhésion
<b>Héparane sulfate (HS)</b>	 D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4)	10 - 70	Exprimées à la surface de toutes les cellules de la MEC des mammifères	Interaction avec les molécules extracellulaires et cellulaires Communication intercellulaire, différenciation, prolifération, adhésion
<b>Chondroïtine sulfate (CS)</b>	<b>CS de type A</b>  D-GlcA-β(1→3)-D-GalpNAc4S-α(1→4) <b>CS de type C</b>  D-GlcA-β(1→3)-D-GalpNAc6S-α(1→4)	5 - 50	GAG le plus abondant. Présent dans le cartilage, tendon, ligament, aorte	Confère les propriétés élastiques et de résistances à la compression au tissu Homéostasie tissulaire
<b>Dermatane sulfate (DS)</b>	 L-IdoA-α(1→3)-D-GalpNAc4S-β(1→4)	14 - 40	Peau, vaisseaux sanguins, valves cardiaques	Prolifération Hydratation Homéostasie tissulaire

L'acide hyaluronique (AH) est le seul GAG non-sulfaté. Il a un poids moléculaire compris entre 4 000 et 8 000 000 g/mol. Son unité répétitive est composée des résidus GlcA et GlcNAc en suivant l'enchaînement : -D-GlcpA- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcpNAc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-. En plus de ne pas être sulfaté, il a la particularité de n'être lié ni à une protéine ni à la membrane des cellules. Il est généralement retrouvé dans les fluides synoviaux ou dans les tissus conjonctifs lâches de la MEC.

L'héparine et l'héparane sulfate (HS) font partie de GAG sulfatés. L'héparine est exclusivement sécrétée et stockée dans les mastocytes des tissus conjonctifs (cellules du système immunitaire) des cellules du foie, de la peau et du poumon. Les chaînes d'héparane sulfate sont exprimées à la surface de toutes les cellules de la matrice extracellulaire des mammifères. L'héparine a un poids moléculaire compris entre 10 000 et 70 000 g/mol et l'héparane sulfate entre 10 000 et 12 000 g/mol.

L'héparine et HS ont une structure commune représentée en Figure 5. Tous les deux possèdent un résidu glucosamine et un résidu acide D-GlcA ou son épimère en C<sub>5</sub>, L-IdoA. Toutefois, ces deux glycopolymères diffèrent par la nature, le taux de leurs substituants (acétate ou sulfate) et par la nature de l'acide uronique majoritaire.<sup>15</sup> L-IdoA est majoritaire dans l'héparine (supérieur à 70%) alors qu'il est présent entre 30 et 50% dans les chaînes HS.

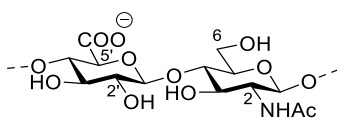


Figure 5 : Structure commune entre l'unité répétitive de l'héparane sulfate et de l'héparine.

L'unité glucosamine peut posséder un groupement sulfate ou acétate en N-2. Cette position reste très rarement non substituée. De plus, des groupements sulfates peuvent également être présents en O-3, O-6 (glucosamine) et O-2' (acide uronique). Contrairement à HS, la plupart des glucosamines de l'héparine sont N-sulfatées (85% versus 40 à 60% pour HS). Au vu de toutes ces modifications possibles, 48 motifs disaccharidiques différents peuvent être obtenus, ce qui conduit à une grande diversité de chaînes pour ces deux polymères. Ainsi, les deux polymères sont généralement représentés par leurs unités répétitives majoritaires : D-GlcpA- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcpNAc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) pour HS, L-IdopA2S- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcpNS6S- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) pour l'héparine.

Il existe d'autres GAG sulfatés tels que la chondroïtine sulfate (CS), le kératane sulfate (KS) et le dermatane sulfate (DS).<sup>14</sup> L'unité répétitive des CS est constituée d'un GlcA et d'une GalNAc. La CS de type A est sulfatée en O-4 du GalNAc et suit l'enchaînement suivant : D-GlcpA- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-D-GalpNAc4S- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Tandis que la CS de type C est sulfatée en O-6 du GalNAc et suit l'enchaînement suivant : D-GlcpA- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-D-GalpNAc6S- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Le poids moléculaire de leur chaîne varie entre 5 000 et 50 000 g/mol. Les CS sont les GAG les plus abondants. Ils sont essentiellement retrouvés dans les MEC des tissus. C'est le GAG principal de l'aggrécane, un PG qui comporte également quelques chaînes de KS. Les chaînes de KS ont une unité répétitive composée de Gal et GlcNAc. Cette unité répétitive suit

l'enchaînement suivant : D-Galp- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcpNAc6S- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Les KS sont séparés en trois catégories, KSI, KSII, KSIII, en fonction de la structure de l'oligosaccharide qui lie les KS à la protéine. Ils ont un poids moléculaire compris entre 4 000 et 19 000 g/mol. Ils sont principalement localisés dans les cornées ainsi que dans le cartilage. Les DS sont composés de IdoA et de GalNAc et l'unité répétitive suit l'enchaînement suivant : L-IdopA- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)-D-GalpNAc4S- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Les DS ont un poids moléculaire qui varie entre 14 000 et 40 000 g/mol. Ils sont présents au niveau de la peau, des vaisseaux sanguins et des valves cardiaques.

La haute affinité des PG pour certains ligands qui ont un rôle physiologique comme les facteurs de croissance, les molécules d'adhésion, les composants de la matrice, les enzymes et les inhibiteurs d'enzymes s'explique par les différentes interactions observées entre les GAG et les protéines. Les fonctions acides et sulfates confèrent aux chaînes des GAG une charge partielle négative à pH physiologique, ce qui leur permet d'interagir *via* des liaisons ioniques avec les protéines. De plus, d'autres interactions non covalentes sont également observées comme les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les interactions de van der Waals.<sup>14-16</sup>

## 2.2 Applications des GAG

Au vu de l'implication des PG et des GAG dans les processus physiologiques et pathologiques, les GAG ont fait l'objet de différentes études afin d'évaluer leurs activités biologiques. Ils ont montré leur potentiel dans différentes applications.

### 2.2.1 Activités anticoagulantes et antithrombotiques

Les traitements anticoagulants sont utilisés pour prévenir la formation de caillots sanguins (thrombus) dans les vaisseaux pouvant engendrer des thromboses ou des phlébites, ou encore éliminer le caillot déjà formé. Ils permettent la prévention de maladies graves telles que les embolies pulmonaires ou cérébrales, au cours desquelles ces caillots migrent et bouchent les vaisseaux pulmonaires ou cérébraux. Les propriétés anticoagulantes et antithrombotiques de l'héparine sont connues depuis 1916.<sup>17</sup>

L'héparine est extraite industriellement de tissus animaux (principalement du porc), elle est commercialisée sous deux grandes catégories selon leur poids moléculaire : les héparines de haut poids moléculaire ou non fractionnée (HHPM ou HNF) avec des poids moléculaires de chaînes compris entre 12 000 et 30 000 g/mol et l'héparine de bas poids moléculaires (HBPM) obtenue après dépolymérisation chimique ou enzymatique de l'HNF, générant ainsi des chaînes aux alentours de 5 000 g/mol. Les HNF présentent une biodisponibilité et un temps de demi-vie très faibles, elles sont donc généralement injectées par voie intraveineuse tandis que les HBPM avec une biodisponibilité et un temps de demi-vie plus élevé sont administrées par voie sous-cutanée.<sup>17</sup> Les deux catégories d'héparine sont utilisées en traitement prophylactique et curatif avec un risque hémorragique plus

faible pour les HBPM. En cas de complications hémorragiques, la protamine est utilisée et a également été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis. Cet antidote est efficace sur HNF mais moins efficace sur HBPM. En 2007 aux Etats Unis, des accidents mortels chez des patients traités à l'héparine ont été observés. Ces accidents étaient dus à la contamination de certains lots d'héparine avec des chaînes de chondroïtine sulfate naturellement très sulfatées.<sup>18</sup> L'extraction de tels composés de tissus animaux reste le principal inconvénient mais d'autres contaminations avec des virus et des prions sont également possibles.

D'autres GAG tels que HS, CS et DS présentent des activités antithrombotiques et un mélange de ces trois GAG est commercialisé sous le nom de Danaparoïde qui est un héparinoïde de BPM.<sup>19</sup>

### 2.2.2 Activités anti-inflammatoires

L'inflammation est une réponse du système immunitaire à une agression externe (agent pathogène) ou interne (cellules endommagées).<sup>20</sup> L'inflammation induit des modifications dans la perméabilité vasculaire, le recrutement et l'accumulation des leucocytes ainsi que la libération de médiateurs de l'inflammation tels que des cytokines.<sup>21</sup> Certains agents pathogènes (ou facteurs pathogéniques) induisant une réponse inflammatoire, peuvent causer des dommages cellulaires. De plus, il existe des maladies auto-immunes (sclérose en plaque) et auto-inflammatoires provoquant un dysfonctionnement de l'immunité innée.

En se liant à différentes protéines impliquées dans l'inflammation telles que les cytokines, les protéines du système du complément mais aussi les sélectines, les GAG régulent des étapes importantes de l'inflammation.<sup>22</sup> Plusieurs études ont montré les propriétés anti-inflammatoires de l'héparine notamment par inhibition de l'activation des cellules inflammatoires grâce à son interaction avec les médiateurs et enzymes libérées lors de la réponse inflammatoire.<sup>23</sup>

AH a également été étudié pour ses propriétés anti-inflammatoires dans les fibroses cystiques.<sup>24</sup> De plus, AH peut-être pro et anti-inflammatoire en fonction de la taille de ses chaînes. Contrairement aux dérivés de l'AH de bas poids moléculaire, les chaînes de haut poids moléculaire seraient capables d'induire une réponse immune localement.<sup>25</sup>

### 2.2.3 Traitements contre le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par un développement anarchique des cellules. A l'heure actuelle, avec plus de 9 millions de décès par an dans le monde, le cancer est classé comme la maladie au plus haut taux de morbidité et mortalité.<sup>26</sup>

Les GAG et les PG sont impliqués dans des processus physiologiques liés au cancer. En effet, ils interagissent avec des médiateurs impliqués dans la croissance tumorale et le processus de métastatisation tels que les facteurs de croissance, les sélectines et les cytokines, et permettent d'inhiber l'angiogenèse et l'intravasation des cellules tumorales. Des modifications de l'expression de

ces polysaccharides apparaissent dans plusieurs étapes de la progression des tumeurs. De ce fait, les GAG et les PG peuvent servir de marqueurs et aider au diagnostic de ces pathologies.<sup>27</sup>

L'effet de l'héparine dans le traitement des cancers est actuellement très étudié notamment chez les patients atteints de cancer et présentant des accidents thromboemboliques. L'effet antimétastatique des héparines est observé et semble surtout important lors de la phase précoce de la métastatisation grâce à l'inhibition des sélectines mais aussi celle de l'héparanase, enzyme qui dégrade les héparanes sulfates et qui est sur-exprimée dans les tumeurs.<sup>28</sup>

#### 2.2.4 Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire<sup>29</sup> regroupe les méthodes permettant de produire des tissus vivants à partir de cellules humaines afin de restaurer, maintenir ou améliorer leur fonction. Au vu de leur biocompatibilité, de leurs propriétés physiologiques (interaction avec les facteurs de croissance), les GAG et les PG sont des candidats de choix pour des applications en ingénierie tissulaire.

Les GAG sont adsorbables sur des cultures cellulaires. Par exemple, l'adsorption des chaînes d'AH sulfaté sur des cultures tissulaires a pu promouvoir la différenciation cellulaire des kératinocytes.<sup>30</sup> Il est également possible de construire des systèmes multicouches en jouant avec des composants de charges opposées. En effet, des interactions ioniques peuvent être envisagées avec une plateforme chargée positivement dans la mesure où les GAG ont une charge globale négative. L'intérêt de ce type de systèmes est de pouvoir incorporer des molécules bioactives impliquées dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire telles que les facteurs de croissance et les chemokines. Macdonal *et al.*<sup>31</sup> décrivent la préparation de telles plateformes avec les polyanions héparane sulfate et chondroïtine sulfate, et le facteur de croissance FGF-2, impliqué dans la prolifération et différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

La formation de GAG en hydrogel est aussi intéressante car elle permet l'incorporation de biomolécules et de cellules sans les endommager, créant ainsi un biomatériau.<sup>27</sup> Les hydrogels sont injectables *in situ* à l'endroit souhaité et évitent ainsi les procédures invasives. Ren *et al.*<sup>32</sup> décrivent la formation de nanoparticules comprenant une matrice minéralisée de GAG-collagène ainsi que le facteur de croissance BMP-9 impliqué dans la différenciation des CSM en ostéoblastes.<sup>33</sup> Kim *et al.*<sup>34</sup> ont développé des hydrogels dans lesquels l'AH est lié de manière covalente à une culture cellulaire des CSM. Ensuite, le facteur de croissance TGF- $\beta$ 3 a été introduit à différentes concentrations, et son effet sur la différenciation chondrogénique a été évalué sur 9 semaines. Les auteurs expliquent que ce type de biomatériau permettrait d'améliorer la reconstruction du cartilage *in vivo*.

Les différentes applications présentées montrent l'intérêt des GAG en santé. Cependant, l'utilisation de ces polysaccharides issus d'animaux pose plusieurs problèmes. Du fait de leur extraction

de tissus animaux, les risques de contamination par des agents pathogènes, tels que les prions ou des virus, sont importants. Ces inconvénients poussent les scientifiques à se tourner vers des polysaccharides analogues, encore appelés GAG-mimétiques, d'origine naturelle ou synthétique ayant des propriétés biologiques similaires. Ces deux aspects, GAG-mimétiques d'origine naturelle et GAG-mimétiques synthétiques, feront l'objet de deux parties distinctes.

### 3 Les GAG-mimétiques d'origine naturelle

#### 3.1 Animaux marins

Comme pour les animaux terrestres, les GAG sont aussi présents chez les animaux marins tels que les concombres de mer, les mollusques ainsi que dans les cartilages des chondrichthyens\*.<sup>35</sup> L'extraction de GAG comme CS et AH a été décrite à partir d'animaux marins.<sup>36</sup> Par exemple, il est possible d'extraire des chaînes de CS à partir de cartilages de requins et de squelettes de raies.<sup>37,38</sup> Néanmoins, la surexploitation de certaines ressources marines conduit souvent à l'extinction de ces espèces entraînant ainsi diverses anomalies écologiques.<sup>39</sup> C'est la raison pour laquelle des méthodes d'extraction de ces GAG à partir de déchets ou sous-produits issus de la pêche, comme les viscères, la tête et le squelette de ces animaux marins, sont en cours de développement.<sup>36</sup>

Les GAGs issus des animaux marins présentent des structures équivalentes ou parfois très proches des GAGs des mammifères et présentent souvent les mêmes propriétés biologiques.<sup>35</sup>

#### 3.2 Algues

##### 3.2.1 Les macroalgues

Les macroalgues sont également sources de polysaccharides (PS) qui sont principalement des constituants de leurs parois cellulaires. Les algues vertes (Chlorophycées), les algues rouges (Rhodophycées) et les algues brunes (Phaeophycées) produisent des PS particulièrement recherchés pour leurs propriétés texturantes (gélifiantes, épaississantes). Divers PS tels que les ulvanes, les carraghénanes, les alginates et les fucanes sont produits par ces macroalgues.

##### Les polysaccharides issus des algues vertes

Les ulvanes sont les principaux PS des algues vertes.<sup>40</sup> Ce sont des hétéropolysaccharides complexes essentiellement composés de xylose (Xyl), Rha, IdoA et de GlcA, et dont les deux unités répétitives majoritaires sont présentées sur la Figure 6.<sup>40,41</sup> Leur taux de sulfate est compris entre 16 et 23%.<sup>41</sup> Ils sont extraits avec des rendements compris entre 8 et 29% du poids d'algue sèche en fonction des protocoles d'extraction et de purification. Les ulvanes sont des polysaccharides

---

\* Les chondrichthyens sont des vertébrés marins aux squelettes cartilagineux.

intéressants pour des applications dans les domaines de la santé, de l'agriculture et de l'agroalimentaire.<sup>42</sup>

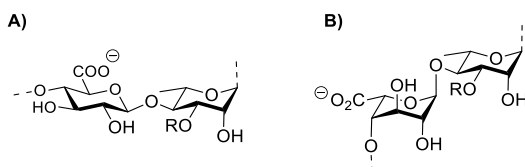


Figure 6 : Les deux unités répétitives principales de l'ulvane.

Parmi les PS de macroalgues vertes sont également retrouvés des D-galactanes sulfatés et hautement ramifiés, des arabinanes non sulfatés et des mannanes sulfatés.

### **Les polysaccharides issus des algues rouges**

Les algues rouges produisent deux PS : les agars et les carraghénanes.<sup>40,43</sup> Ces deux polysaccharides sont composés d'unité Gal de la série L pour les agars et de la série D pour les carraghénanes. Ces résidus Gal sont liés par des liaisons de type  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)- et  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Ces polysaccharides peuvent comprendre, par unité disaccharidique, aucun groupement sulfate (agarose), un groupement sulfate ( $\kappa$ - ou kappa- carraghénanes), deux groupements sulfates (i- ou iota-carraghénanes) ou trois groupements sulfates ( $\lambda$ - ou lambda- carraghénanes).<sup>43</sup>

Les agars sont extraits essentiellement des algues *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia*, *Gracilariopsis* et *Porphyra*. Leurs propriétés gélifiantes et épaississantes font d'eux des PS d'intérêt dans les industries agro-alimentaires et chimiques.<sup>43</sup> Du fait de leur faible teneur en sulfates (2 à 5%), ils font peu l'objet d'études pour des applications en santé. Les carraghénanes sont isolés des algues des genres *Kappaphucus*, *Chondrus*, *Gigartina*, *Euchema* et *Hypnea*.<sup>40</sup> Ils sont considérés comme hautement sulfatés (20 à 40% de sulfate). Ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire en tant que texturants et ils ont fait l'objet d'études pour des applications médicales en tant qu'anticoagulants, antitumoraux et antiviraux.

### **Les polysaccharides issus des algues brunes**

Les algues brunes produisent des polysaccharides anioniques qui sont principalement des alginates et des fucanes. Les alginates ont déjà été présentés dans ce manuscrit (cf paragraphe 1.3 p.9). Les fucanes sont des polysaccharides sulfatés dont la chaîne principale est composée de L-fucose (Fuc) et peut être substituée par d'autres oses tels que Xyl, GlcA, Man, Glc et Gal ainsi que par des groupements acétates.<sup>40</sup> Les fucanes sont divisés en deux groupes (Tableau 3).<sup>40</sup> Le premier groupe comprend les fucanes isolés des espèces *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Analipus japonicus*, *Cladosiphon okamuranus*, et *Chorda filum*. Le second inclut les espèces *Ascophyllum nodosum* et *Fucus vesiculosus*. Ces deux groupes se distinguent par le type de liaisons osidiques. Dans le premier groupe, des liaisons de type  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) sont présentes sur la chaîne principale alors que ce sont plutôt des liaisons



de type  $\alpha$ -(1→3) et  $\alpha$ -(1→4) dans le deuxième groupe. Isolé au début du XX<sup>ème</sup> siècle, le fucoidane est le fucane le plus étudié. Il est issu des algues brunes *Ascophyllum nodosum* et *Fucus vesiculosus* et il est hautement sulfaté (jusqu'à 40% en sulfate). Tout comme les alginates, les fucanes possèdent des propriétés gélifiantes. En santé, ils sont étudiés pour l'ingénierie tissulaire.

Tableau 3 : Les deux groupes de fucanes, polysaccharides d'algues brunes (adapté de Jiao et al., 2011).<sup>40</sup>

Groupe	Espèces	Type de liaison
1	<i>Laminaria saccharina</i> , <i>L. digitata</i> , <i>Anelipus japonicus</i> , <i>Cladosiphon okamuranus</i> , <i>Chorda filum</i>	$\alpha$ -L-Fucp-(1→3)-
2	<i>Ascophyllum nodosum</i> and <i>Fucus vesiculosus</i>	$\alpha$ -L-Fucp-(1→3) et $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-

Les PS algaux sulfatés sont dotés de diverses propriétés en santé tels que des propriétés anticoagulantes, anti-inflammatoires, antivirales ou encore antitumorales.<sup>40,44,45</sup> Les résultats sont encourageants mais les PS algaux restent hétérogènes en terme de structure et des biodisponibilités faibles sont parfois observées du fait des hauts poids moléculaires des PS issus des algues.<sup>40</sup> Ces PS sont également utilisables en ingénierie tissulaire, pour leurs propriétés gélifiantes, ainsi que dans l'industrie cosmétique.<sup>43,45,46</sup>

### 3.2.2 Les microalgues

Les microalgues sont des organismes unicellulaires eucaryotes et photosynthétiques<sup>†,47,48</sup> Elles sont cultivables en grandes quantités dans des photobioréacteurs ou en bassin. Elles présentent l'avantage de croître facilement et de produire des molécules à haute valeur ajoutée telles que des vitamines, des stérols et des polysaccharides.<sup>49</sup> Plusieurs espèces tels que des Bacillariophyte (Ba), Charophyte (Cha) et Chlorophyte (Ch) sont décrites comme productrices d'EPS et de CPS (cf Annexe 1, Tableau 12 p.133). Les Cyanobactéries (Cy), bien que non classées dans les microalgues, sont également capables de produire des EPS.

Les PS issus de microalgues peuvent trouver des applications dans les domaines de l'agroalimentaire, de la cosmétique et de la santé.<sup>50</sup>

### 3.3 Les bactéries

Les bactéries sont une source de polysaccharides exocellulaires d'intérêt industriel. Cette source devrait dans le futur devenir importante avec le développement croissant des procédés biotechnologiques de production considérés plus sûrs.

<sup>†</sup> La photosynthèse est un mécanisme bioénergétique des organismes. Elle permet la production de matière organique (carbone) par le biais de l'énergie lumineuse.

Certaines bactéries possèdent les enzymes nécessaires à la biosynthèse de GAG ou de polysaccharides ayant une structure proche des GAG. Les polysaccharides produits sont généralement peu sulfatés et ne comportent pas de monomère IdoA.<sup>51</sup>

L'héparosane, bioprécurseur non sulfaté de l'héparine et de l'héparane sulfate, est un polysaccharide acide dont l'unité répétitive disaccharidique est composée de GlcA et GlcNAc en suivant cette séquence :  $(\rightarrow 4)\text{-D-GlcpA-}\beta\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-D-GlcpNAc-}\alpha\text{-(1}\rightarrow)$  (Figure 7). Il est produit soit naturellement par les bactéries sauvages comme *Pasteurella multocida* type D<sup>52</sup> et *Escherichia coli* K5<sup>53</sup>, soit par des bactéries recombinantes comme *E. coli* K-12<sup>54</sup> ou *Bacillus subtilis*<sup>55</sup>. La bactérie *P. multocida* type D produit un héparosane de haut poids moléculaires (HPM), 200 000 à 300 000 g/mol, tandis que *E. coli* K5 produit des chaînes d'héparosane de bas poids moléculaires (BPM), 10 000 à 20 000 g/mol. Il est également possible de produire un polysaccharide d'environ 84 000 g/mol avec *E. coli* K5.<sup>56</sup>

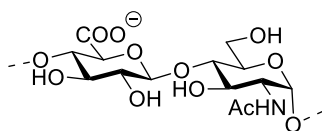


Figure 7 : Structure de l'unité répétitive de l'héparosane

Un polysaccharide non sulfaté de structure proche de la chondroïtine est produit naturellement par la bactérie *E. coli* K4 ; le CPS K4 qu'elle produit est substitué par un fructose.<sup>57</sup> Ce polysaccharide est aussi produit chez des bactéries recombinantes *Bacillus subtilis*<sup>55</sup> et *E. coli*<sup>58</sup>.

La production d'acide hyaluronique existe naturellement chez les bactéries à Gram positif *Streptococcus pyogenes* et *S. thermophilus*<sup>59</sup> ainsi que chez la bactérie à Gram négatif *P. multocida*<sup>60</sup>. Toutefois, certaines espèces de *Streptococcus* sont potentiellement pathogènes. Les souches recombinantes souvent décrites pour la production de l'AH sont les bactéries *Bacillus subtilis*<sup>61,62</sup>, *Lactococcus lactis*<sup>63</sup> et aussi la levure *Pichia pastoris*<sup>64</sup>. L'utilisation de bactéries pour produire l'acide hyaluronique est une voie prometteuse. Cette voie fait d'ailleurs l'objet d'études industrielles afin d'éliminer totalement les matières premières animales.<sup>36</sup>

La biodiversité marine liée à la diversité des écosystèmes, constitue un vaste champ d'investigation pour la découverte de PS originaux GAG-mimétiques. Les recherches menées sur l'étude d'écosystèmes marins très particuliers ou atypiques ont permis la découverte de nouvelles espèces animales et microbiennes : habitats marins profonds (sources hydrothermales, zones de suintement froid, bois coulés, etc...), sédiments côtiers et de subsurface, bassins hypersalins anoxiques, mares d'eau à forte salinité situées sur la colonne corallienne des atolls de Polynésie où se développent des tapis microbiens appelés « kopara », biotopes néo-calédoniens, eaux australes de l'Océan Antarctique, Océan Arctique, Océan Indien, Océan Pacifique, Océan Atlantique, mers

tropicales ou tempérées... Ainsi, les bactéries marines présentent un fort potentiel pour la production de GAG mimétiques. A la biodiversité des bactéries marines est associée une large diversité structurale des PS produits avec des structures souvent atypiques. Les genres bactériens *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas* et *Vibrio* sont souvent cités comme producteurs de PS (cf Annexe 2, Tableau 13, p.136 ).

Au cours de différentes campagnes océanographiques organisées par l'Ifremer pour explorer les sources hydrothermales profondes, plusieurs bactéries aérobies et mésophiles, productrices d'EPS, des genres *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* et *Vibrio* ont été isolées.

Issues des échantillons collectés lors de la campagne Hydronaut en 1987 sur la dorsale du Pacifique Oriental, les souches HYD1644<sup>65,66</sup>, HYD721<sup>67</sup> et HYD657<sup>68</sup> productrices d'EPS de haut poids moléculaire (>10<sup>6</sup> g/mol) ont été étudiées. La souche HYD657 ou *Alteromonas macleodii* subsp *fijiensis* biovar deepsane produit un hétéropolysaccharide anionique (Figure 8). La chaîne principale de l'unité répétitive se compose d'un GlcA, d'un Gal et d'un GlcA (oligosaccharide 1) ou d'un Glc, d'un GalA et d'un Gal (oligosaccharide 2) avec un groupement lactate en position C<sub>3</sub> du GlcA de l'oligosaccharide 1 et un groupement O-sulfate en position C<sub>2</sub> du GalA de l'oligosaccharide 2. L'EPS HYD657 nommé deepsane est commercialisé sous le nom d'Abyssine<sup>®</sup>. Il est utilisé en cosmétique en tant qu'apaisant pour diminuer des irritations cutanées dues à des agressions chimiques, mécaniques ou UV.



Figure 8 : Les deux structures possibles de l'unité répétitive de l'EPS HYD657 (Oligosaccharides 1 et 2). (adapté de Le Costaouëc et al., 2012).<sup>68</sup>

La bactérie *Alteromonas macleodii* subspecies *fijiensis* est une bactérie aérobique, mésophile et hétérotrophe qui a été isolée de fluides collectés dans des sources hydrothermales dans le bassin nord des îles Fidji lors de la campagne Starmer en 1989. Elle produit l'EPS ST716 lors de sa phase de croissance. Cet EPS est un hétéropolysaccharide acide dont l'unité répétitive est un hexasaccharide avec une chaîne principale composée d'un Glc, d'un GalA et d'un Gal (Figure 9). Le GalA est substitué en position C<sub>3</sub> par une chaîne latérale composée de deux GlcA et d'un Man. Le monomère Man contient un substituant pyruvate sur le diol 4,6.

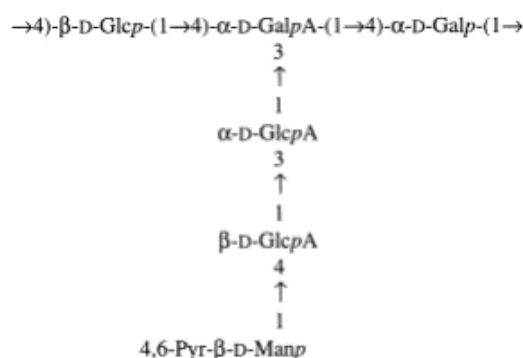


Figure 9 : Structure de l'unité répétitive de l'EPS ST716 (Rougeaux et al., 1998) <sup>69</sup>

Prélevée en 1991, lors de la campagne Hero au niveau d'une faille de la côte du Pacifique Oriental, la souche *Vibrio diabolicus* produit l'EPS HE800 (Figure 10).<sup>70</sup> Cette bactérie a été isolée des téguments dorsaux de l'annélide polychète *Alvinella pompejana*. L'EPS HE800 est un hétéropolysaccharide linéaire et acide non sulfaté dont l'unité de répétition est un tétrasaccharide composé d'un GlcNAc, de deux GlcA et d'un GalNAc en suivant la séquence :  $\rightarrow 3) - \beta\text{-D-GlcpNAc} - (1 \rightarrow 4) - \beta\text{-D-GlcpA} - (1 \rightarrow 4) - \beta\text{-D-GlcpA} - (1 \rightarrow 4) - \alpha\text{-D-GalpNAc} - (1 \rightarrow$ .

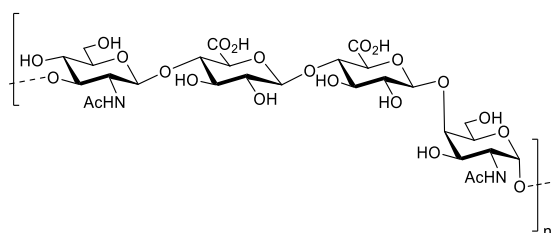


Figure 10 : Structure de l'EPS HE800 produit par la bactérie *Vibrio diabolicus* (Rougeaux et al., 1999).<sup>70</sup>

La bactérie *Alteromonas infernus* a été collectée en 1991 durant la mission franco-mexicaine Guaynaut, dans des échantillons prélevés à 2000 m de profondeur au niveau de la source hydrothermale nommée « Claire » et située dans le bassin de Guaymas du Golfe de Californie (27°0.94'N, 111°24.50'W).<sup>71</sup> Cette bactérie a été isolée à partir de prélèvements de fluides effectués au sein de populations denses de vers tubicoles géants, *Riftia pachyptila*. C'est une bactérie à Gram négatif, non-pathogène, mésophile, aérobie stricte et hétérotrophe, en forme de bâtonnet d'un diamètre de 0,6 à 0,8  $\mu\text{m}$  et d'une longueur de 1,4 à 2  $\mu\text{m}$ . Son unique flagelle polaire lui assure mobilité. Au cours de sa phase de croissance, la bactérie *A. infernus* produit l'EPS GY785 qui ressemble à l'EPS HYD657 ainsi qu'à l'EPS ST716.

En 2004, l'unité répétitive nonasaccharidique de l'EPS GY785 a été décrite (Figure 11).<sup>72</sup> La chaîne principale est un trisaccharide contenant en son centre un GalA ainsi qu'un Glc et un Gal en suivant la séquence :  $\rightarrow 4) - \beta\text{-D-Glcp} - (1 \rightarrow 4) - \alpha\text{-D-GalpA2S} - (1 \rightarrow 4) - \alpha\text{-D-Galp} - (1 \rightarrow$ . Le GalA est substitué par une chaîne latérale composée de deux GlcA, un Gal et un Glc qui suit la séquence :  $\beta\text{-D-Glcp} - (1 \rightarrow 6) - \beta\text{-D-Galp} - (1 \rightarrow 4) - \alpha\text{-D-GlcAp} - (1 \rightarrow 4) - \beta\text{-D-GlcAp} - (1 \rightarrow$ . Chaque GlcA est substitué par un Glc terminal. De plus, le GalA est sulfaté en O-2. L'EPS natif se caractérise par son haut poids moléculaire ( $>10^6$  g/mol)

et sa teneur en sulfate (10%). Elle est certes faible en comparaison avec d'autres polysaccharides extraits de tissus animaux (GAG) ou d'algues (carraghénanes), mais la présence de groupement sulfate est rare chez les EPS bactériens.

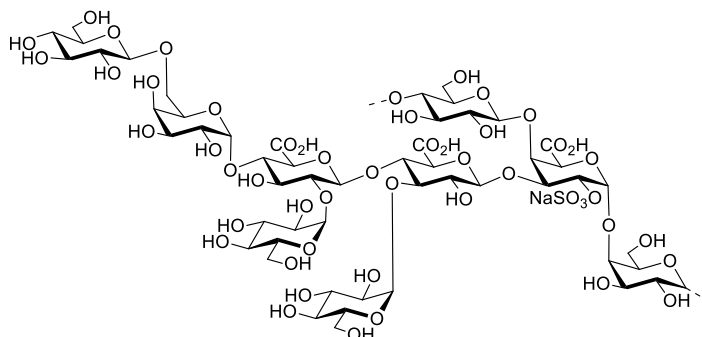


Figure 11 : Unité répétitive de l'EPS GY785 produit par la bactérie *Alteromonas infernus* (Roger et al., 2004).<sup>72</sup>

Les propriétés GAG-mimétiques des EPS natifs HE800 et GY785 produits respectivement par les bactéries *A. infernus* et *V. diabolicus* ont été décrites. L'EPS HE800 natif de haut poids moléculaire (>10<sup>6</sup> g/mol) et ses dérivés de bas poids stimulent la régénération tissulaire, en particulier, de l'os<sup>73</sup> et de la peau<sup>74</sup>. La production de la MEC caractéristique du cartilage par des chondrocytes incorporés au sein d'un hydrogel composé d'hydroxypropyle méthylcellulose-silanisée (HPMC-Si) et enrichi en EPS GY785 natif a également été montrée *in vivo* dans un modèle murin.<sup>75</sup> Cependant les applications des EPS natifs sont assez limitées à cause de leurs hauts poids moléculaires.

En conclusion, différents polysaccharides dotés de propriétés biologiques sont isolables de sources naturelles. À l'état natif, certains sont intéressants pour des applications en santé (ex. EPS GY785, EPS HE800). Toutefois, des modifications sont souvent nécessaires (réduction de leur taille, ajout de substituants) pour accroître leur activité biologique et obtenir des molécules GAG-mimétiques fortement intéressants en thérapeutique. Ces modifications seront présentées dans le paragraphe suivant.

## 4 Modifications structurales des polysaccharides d'origine naturelle

La modification structurale est souvent nécessaire pour améliorer les propriétés GAG-mimétiques des PS d'origine naturelle. Ces modifications impliquent généralement la dépolymérisation des PS et/ou l'ajout de groupements fonctionnels tels que des groupements sulfates. Ces deux types de modifications seront développés dans deux parties distinctes.

### 4.1 Dépolymérisation

#### 4.1.1 Dépolymérisation par des procédés physico-chimiques

Concernant les procédés chimiques de dépolymérisation, l'hydrolyse acide est utilisée pour dépolymériser partiellement ou totalement un polysaccharide.<sup>76</sup> Les coupures ont lieu au niveau de la liaison glycosidique en suivant un mécanisme de type substitution nucléophile. Différents acides peuvent être utilisés tels que l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, l'acide sulfurique ou l'acide trifluoroacétique. Cette méthode, notamment utilisée pour l'obtention d'oligosaccharides de petite taille (< 1000 g/mol), est l'étape indispensable avant l'analyse structurale.<sup>77,78</sup>

Il est aussi possible de dépolymériser un polysaccharide en présence de radicaux libres, HO<sup>•</sup> qui clivent les liaisons glycosidiques des polysaccharides.<sup>79,80</sup> Les radicaux libres peuvent être produits par l'action de rayon gamma ou d'ozone sur l'eau, mais aussi à partir de peroxyde d'hydrogène en présence ou non de cation métallique. Une étape de réduction en présence d'hydrure comme NaBH<sub>4</sub> est nécessaire afin de réduire l'extrémité réductrice du dérivé produit.<sup>81,82</sup> La dépolymérisation radicalaire permet la production de polysaccharides de bas poids moléculaires dont la masse peut être modulée par le rapport peroxyde d'hydrogène/polysaccharide, la température de réaction, le pH ou encore par le choix du métal. Cette méthode présente l'avantage de produire des fragments saccharidiques plus homogènes en taille par rapport à l'hydrolyse acide.<sup>80,83</sup>

Il existe des méthodes de dégradation chimique plus spécifiques telles que la dégradation de Smith<sup>84</sup> (coupure entre deux hydroxyles vicinaux suivie de la réduction des aldéhydes formés avec NaBH<sub>4</sub>), la dégradation des acides uroniques par le lithium<sup>85</sup> et la  $\beta$ -élimination<sup>86</sup> (spécifique aux acides uroniques). Ces méthodes sont généralement utilisées pour l'élucidation structurale de polysaccharides.

Des méthodes physiques peuvent être utilisées pour dépolymériser les PS.<sup>87,88</sup> Ce sont des méthodes généralement simples à mettre en œuvre et adaptables à l'échelle industrielle. Elles ne nécessitent pas d'éliminer des réactifs résiduels car la plupart n'utilisent pas de réactifs spécifiques tels que des initiateurs de réactions. Ces méthodes reposent principalement sur l'irradiation (rayonnements UV ou  $\beta$ , utilisation d'isotope radioactif) ainsi que sur la sonication.

Les méthodes d'irradiation permettent d'accéder à des rendements élevés et elles utilisent des mécanismes de scissions radicalaires. Toutefois, plus les doses d'irradiation sont élevées, plus le coût sera élevé. L'isotope radioactif  $^{60}\text{Co}-\gamma$  est la source la plus courante de rayonnement gamma.<sup>89</sup> L'irradiation du polysaccharide peut avoir lieu à l'état solide, liquide ou sous forme de gel. Contrairement à l'irradiation gamma, aucune source radioactive n'est utilisée lors de l'irradiation par faisceau d'électron.<sup>90</sup>

La sonication est une méthode utilisant des ultrasons. Elle a l'avantage de ne pas modifier la structure chimique des polysaccharides.<sup>4,91</sup> Les réactions ont lieu en solution et ce sont les microbulles de cavitation formées par l'action des ultrasons qui induisent la dégradation des polymères par l'action de forces de cisaillement à proximité de la zone où les microbulles sont créées.

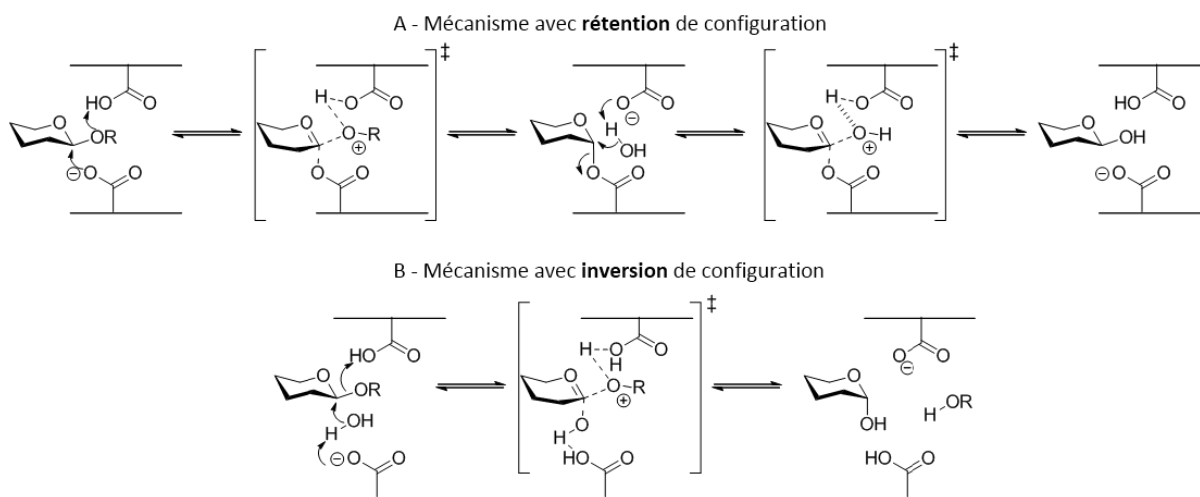
#### 4.1.2 La dépolymérisation par voie enzymatique

L'action des enzymes est spécifique sur leur substrat ; la dépolymérisation des polysaccharides à l'aide d'enzymes est donc un procédé mieux contrôlé, notamment en terme de liaisons clivées et de son avancement. L'optimisation des conditions de la réaction enzymatique, en particulier la température, le pH et le rapport enzyme/substrat peut permettre d'obtenir des oligosaccharides avec de bons rendements.

Ces enzymes sont des CAZymes (Carbohydrate-Active enZymes) dont cinq types catalytiques sont répertoriés dans la base de données CAZY<sup>92</sup> depuis 1998. Trois d'entre elles sont impliquées dans la dépolymérisation des polysaccharides :

- **Glycoside hydrolases (GHs)** : enzymes de dépolymérisation hydrolytiques.
- **Polysaccharide Lyases (PLs)** : enzymes de dépolymérisation par  $\beta$ -élimination.
- **Activités auxiliaires (AAs)**<sup>93</sup> : enzymes impliquant des réactions d'oxydoréduction. Ce type d'enzyme inclut les « Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenases » (LPMOs) qui clivent les liaisons par oxydation.

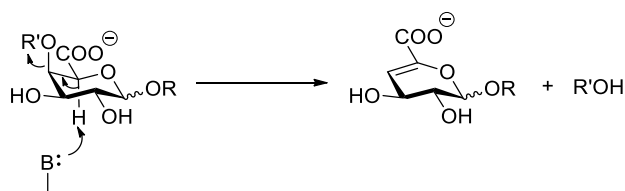
Les GHs hydrolysent les liaisons glycosidiques en passant par un mécanisme avec rétention ou inversion de configuration du carbone anomérique lors de la catalyse (Schéma 1).<sup>94</sup>



*Schéma 1 : Mécanisme avec rétention de configuration (A) avec inversion de configuration (B) (adapté de Stone et al., 2008).<sup>94</sup>*

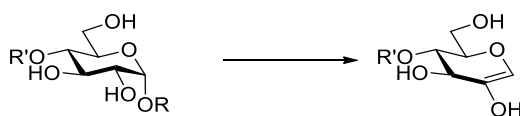
La catalyse acide/base est assurée par la présence de deux acides aminés dans le site actif de l'enzyme. L'un des acides aminés jouera le rôle de l'acide tandis que l'autre sera la base. Dans le cas de la rétention de configuration, la base attaque le carbone anomérique, formant ainsi l'intermédiaire glycosyle-enzyme, puis l'eau vient attaquer le carbone anomérique (Schéma 1A). Tandis que l'inversion de configuration résulte de l'attaque directe de la molécule d'eau sur le carbone anomérique (Schéma 1B).

Les PLs agissent majoritairement sur des polysaccharides acides par un mécanisme de  $\beta$ -élimination en clivant la liaison (1 $\rightarrow$ 4).<sup>94</sup> La déprotonation du carbone en C<sub>5</sub> induit la formation de la double liaison en C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> et l'élimination du groupement en C<sub>4</sub> (Schéma 2).



*Schéma 2 : Mécanisme de  $\beta$ -élimination d'une lyase sur des polysaccharides acides (adapté de Lombard et al., 2010).<sup>95</sup>*

Il existe également des lyases capables de cliver les liaisons impliquant des polysaccharides neutres tels que l'exo-(1 $\rightarrow$ 4)-glucane lyase.<sup>96,97</sup> Ces lyases induisent la formation d'une insaturation en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> (Schéma 3).



*Schéma 3 : Action d'une  $\alpha$ -glucane lyase sur un polysaccharide neutre (Lombard et al., 2010).<sup>95</sup>*



La dépolymérisation enzymatique de PS fait l'objet de nombreux travaux depuis plusieurs années. La première enzyme lyase active sur les ulvanes a été décrite par Lahaye *et al.*<sup>98</sup>. La double liaison caractéristique de l'activité lyase a pu être caractérisée par RMN. Les travaux de Lahaye *et al.* ont permis l'analyse structurale de l'ulvane isolé chez *Ulva* sp. D'autres enzymes actives sur l'ulvane ont été mises en évidence chez des souches bactériennes. La bactérie à Gram négatif *Nonlabens ulvanivorans* est un exemple. En effet, une nouvelle enzyme de type lyase a été purifiée dans le surnageant de culture de cette bactérie *N. ulvanivorans*.<sup>99</sup> Cette enzyme a ensuite été séquencée et surexprimée chez *E. Coli*. La flavobactérie *Formosa agariphila* possède également des enzymes actives sur l'ulvane. De récents travaux ont permis d'identifier douze enzymes impliquées dans le processus de dégradation enzymatique de ce PS.<sup>100</sup> La dégradation enzymatique des carraghénanes est également étudiée. Les enzymes capables de cliver les carraghénanes, nommées carraghénases, sont principalement isolées des microorganismes appartenant au groupe des gammaproteobactéries, *Bacteroidetes*, et *Planctomycete*.<sup>101</sup> Les carraghénases sont généralement des glycoside hydrolases spécifiques des liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Ces enzymes ont été utilisées afin de dépolymériser des k- et i-carraghénanes.<sup>102</sup> Les oligosaccharides produits ont été caractérisés par RMN et spectrométrie de masse.

Les deux souches d'*Alteromonas* produisant les EPS HYD657 et GY785 sont décrites comme capables de dégrader l'EPS qu'elles produisent.<sup>103,104</sup> En effet, des activités enzymatiques ont été identifiées dans les extraits protéiques issus de ces bactéries. Pour la bactérie *A. infernus* qui produit l'EPS GY785, des activités enzymatiques de type lyase, hydrolase et sulfatase ont été décrites.<sup>103</sup>

## 4.2 Substitutions ou ajout de groupements fonctionnels

Quelques exemples de groupements fonctionnels qui peuvent être introduits sur les polysaccharides sont représentés sur la Figure 12.<sup>105</sup> Ces groupements sont introduits dans le but d'améliorer l'activité biologique de la molécule (sulfatation, phosphorylation...) ou pour faciliter l'analyse structurale de la molécule (alkylation, acylation).<sup>106-108</sup>

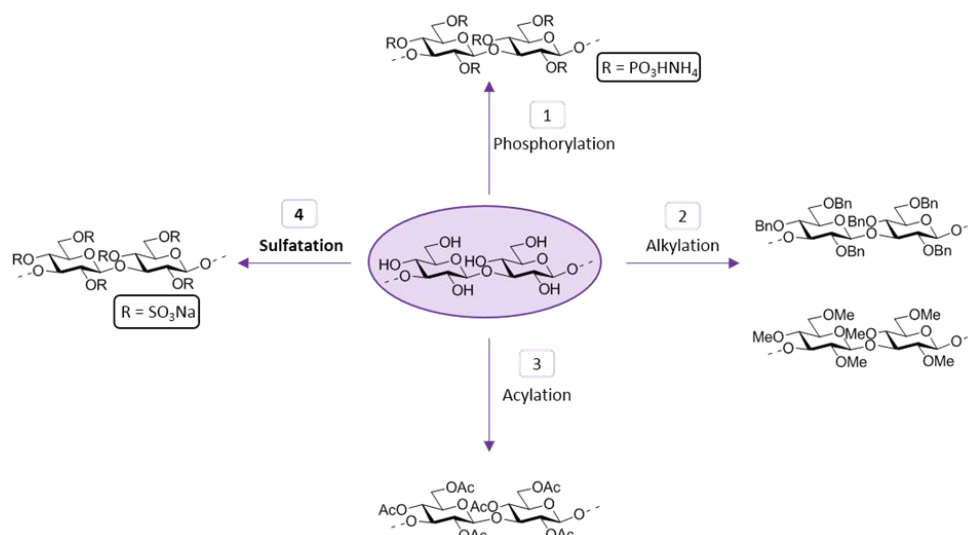


Figure 12 : Les différents groupements fonctionnels qui peuvent être introduits sur un polysaccharide (PS) ; 1) Phosphorylation, 2) Alkylation, 3) Acylation, 4) Sulfatation

Le degré de sulfatation et la distribution des groupements sulfate sont liés aux bioactivités du polymère.<sup>14</sup> L'introduction des groupements sulfates sur les PS est donc nécessaire pour obtenir des dérivés GAG-mimétiques. C'est pour cette raison que l'insertion de groupements sulfates sera principalement considérée dans cette partie.

#### 4.2.1 Greffage de groupements sulfate par voie chimique

Le chlorure de sulfuryle (SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ainsi que l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et ses dérivés (acide chlorosulfurique, acide sulfamique) ont été les premiers agents de sulfatation utilisés.<sup>109</sup> Ces acides forts présentent l'inconvénient de couper les liaisons glycosidiques, ce qui entraîne la dépolymérisation du polysaccharide.<sup>109,110</sup> Pour éviter ces réactions secondaires, des agents plus doux comme le trioxyde de soufre complexé à un amide (*N,N*-diméthylformamide)<sup>111</sup> ou une amine (pyridine, triéthylamine)<sup>110</sup> sont décrits. L'éponge à proton 2-méthyl-2-butène peut être utilisée pour éviter la dégradation des polysaccharides durant l'étape de sulfatation.<sup>112</sup> De manière générale, la sulfatation obtenue est aléatoire mais quelques travaux décrivent des méthodes de sulfatations régiosélectives.<sup>109</sup> Ces méthodes ne seront pas développées dans ce manuscrit.

Plusieurs publications présentent l'introduction de groupements sulfate sur des polysaccharides afin de générer des dérivés GAG-mimétiques. Le dextrane sulfaté et le chitosane sulfaté sont identifiés comme ayant des propriétés anticoagulantes et antivirales.<sup>111,113</sup> La cellulose sulfatée a des propriétés antimalariales.<sup>114</sup> Le chitosane sulfaté et la cellulose sulfatée sont également développés pour des applications en ingénierie tissulaire.<sup>113</sup>

Les dérivés de l'EPS GY785 de bas poids moléculaires faiblement sulfatés obtenus par dépolymérisation radicalaire (EPS DR) ou hautement sulfatés (EPS DRS) ont été étudiés lors de

multiples travaux. Les propriétés anticoagulantes de l'EPS GY785 ont été étudiées pour les dérivés de l'EPS ayant une taille comprise entre 24 000 et 35 000 g/mol, sursulfatés à 20% (EPS DRS-20) et 40% (EPS DRS-40).<sup>83</sup> Les dérivés EPS DRS-20 et EPS DRS-40 ainsi que l'EPS natif ont été comparés à l'HBPM. Il en est résulté que les deux dérivés sur-sulfatés présentent des activités anticoagulantes. Les EPS DRS peuvent moduler le système du complément.<sup>115</sup> Le système du complément est impliqué dans la défense contre les infections, la destruction des agents infectieux, dans le contrôle des réponses inflammatoires et dans la modulation des réponses immunes spécifiques.<sup>116</sup> Le système du complément est catégorisé dans l'immunité innée. En 2004, Courtois *et al.*<sup>115</sup> ont montré les propriétés immuno-régulatrices de l'EPS natif et de ses dérivés EPS DRS sur ce système. Les dérivés EPS DRS ont également été étudiés pour des applications anticancéreuses. Ils présentent des propriétés intéressantes pour empêcher la dissémination des cellules cancéreuses (métastases) dans le cas de l'ostéosarcome. En 2016, Heymann D. *et al.*<sup>117</sup> ont étudié l'effet de différentes tailles des EPS DRS (4 000, 8 000 et 15 000 g/mol) sur les lignées cancéreuses. *In vitro*, seul l'EPS DRS de 15 000 g/mol s'est avéré être le plus efficace pour inhiber à 90% l'invasion cellulaire des cellules d'ostéosarcome. De plus, *in vivo*, ce même dérivé est capable de bloquer significativement l'établissement de métastases pulmonaires. L'EPS GY785 possède également des propriétés biologiques valorisables en médecine régénératrice du cartilage. La présence du dérivé hautement sulfaté EPS DRS-40 de 20 000 g/mol a favorisé la prolifération et la différenciation *in vitro* des CSM en chondrocytes par l'interaction avec le facteur de croissance TGF- $\beta$ 1.<sup>118</sup>

La sulfatation chimique permet donc de produire des dérivés GAG-mimétiques. La sulfatation enzymatique peut être une alternative pour introduire des groupements sulfate de façon régiosélective. Cette alternative sera discutée dans le paragraphe suivant.

#### 4.2.2 Greffage de groupements sulfate par voie enzymatique

Les groupements sulfates sont introduits par les enzymes nommées sulfotransférases. Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement sulfonate à partir du cofacteur 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) sur une fonction alcool ou amine d'un mono-, oligo ou polysaccharide (Schéma 4).<sup>119</sup>

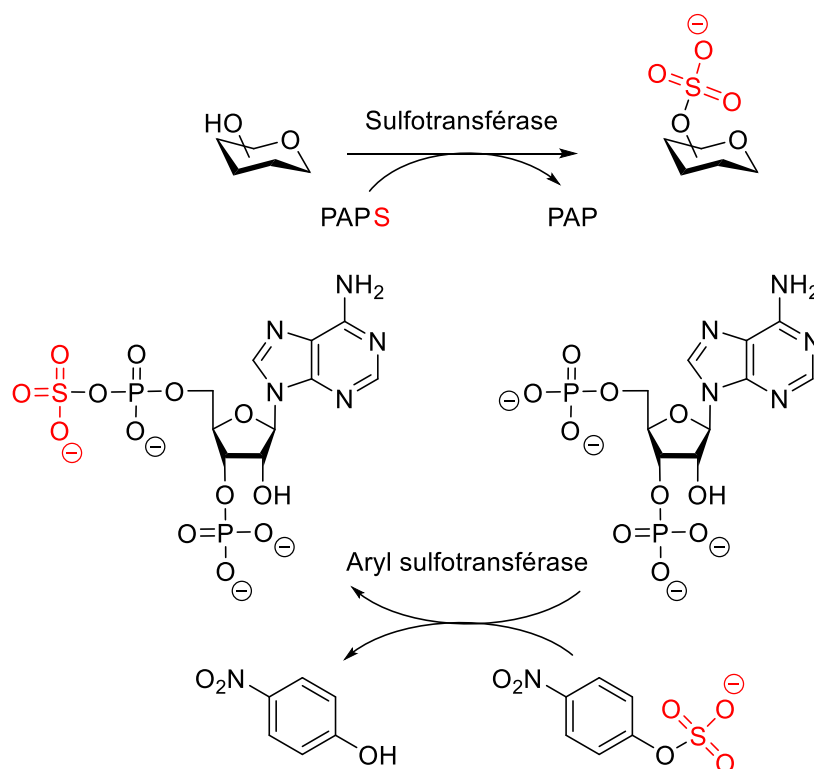


Schéma 4 : Transfert d'un groupement sulfonate par une sulfotransférase et recyclage du cofacteur grâce à une aryl sulfotransférase (adapté de Paul et al 2012).<sup>119</sup>

Les sulfotransférases sont soit présentes dans le cytoplasme soit associées à la membrane cellulaire.<sup>119</sup> Les sulfotransférases cytoplasmiques sulfatent des petites molécules comme les hormones, les bioamines et les neurotransmetteurs. Les sulfotransférases membranaires sont plutôt actives sur des macromolécules telles que les polysaccharides ou les protéines. Les sulfotransférases sont décrites comme hautement spécifiques de leurs substrats, et elles n'utilisent que le PAPS comme donneur de groupement sulfonate. En raison du prix très élevé du PAPS (150€ pour 1 mg, Sigma-Aldrich®) et des difficultés que demanderait sa synthèse organique, son utilisation est limitée. Des approches permettant de régénérer le PAPS dans la réaction enzymatique ont été développées.<sup>120,121</sup>

Des exemples de la littérature illustrent l'insertion de groupement sulfate par voie enzymatique. Par exemple, Zhou *et al.* ont converti la chondroïtine en chondroïtine 4-sulfate et en chondroïtine 6-sulfate à l'aide des chondroïtine 4-sulfotransférases et chondroïtine 6-sulfotransférases (Figure 13).<sup>122</sup> La structure des polysaccharides produits a été validée par RMN et spectrométrie de masse.

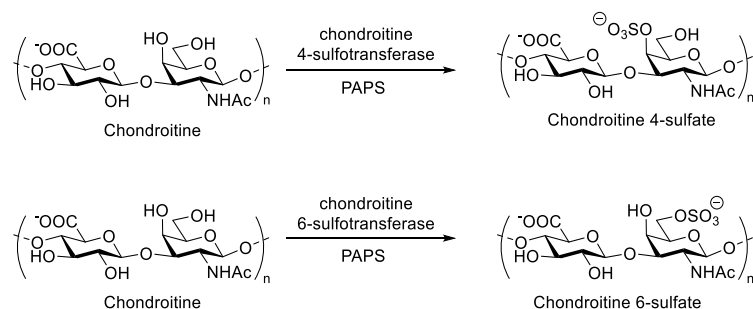


Figure 13 : Sulfatations de la chondroïtine conduisant à la chondroïtine-4-sulfate et à la chondroïtine-6-sulfate.

Après avoir cloné et surexprimé les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'héparane sulfate, Kuberan B. *et al.*<sup>123</sup> ont pu modifier un pentasaccharide issu de l'héparosane. Lors de l'une des étapes de synthèse, l'enzyme *N*-déacétylase-*N*-sulfotransférase 2 (NDST2) a permis de remplacer le groupement acétate par un groupement sulfate sur le résidu *N*-acétyl-glucosamine en présence de PAPS (Schéma 5).

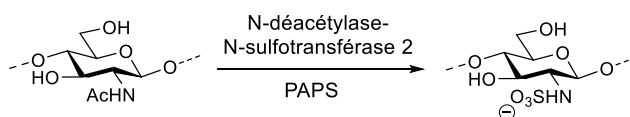


Schéma 5 : Introduction du groupement sulfate sur la glucosamine par la NDST2.

Ces exemples montrent à quel point l'utilisation des enzymes pour sulfater des composés est précise par rapport à la sulfatation chimique. Toutefois, la spécificité de ces enzymes vis-à-vis de leur substrat saccharidique et du PAPS reste un point limitant.

Plusieurs méthodes de modifications de polysaccharides issus de ressources naturelles ont été présentées. Les polysaccharides peuvent être dépolymérisés afin de réduire leur taille et d'améliorer leur bioactivité. Des méthodes de dépolymérisation chimique, physique et enzymatique ont été décrites. L'ajout de groupements sulfate est généralement nécessaire pour accroître les activités GAG-mimétiques. Des exemples d'introduction de ces groupements par voie chimique et enzymatique ont été développés. Ces méthodes de modifications des polysaccharides sont certes performantes mais elles ne permettent pas toujours d'avoir des molécules extrêmement bien définies et pures. Il existe d'autres façons de produire des GAG-mimétiques bien définis et purs. En effet, les GAG-mimétiques peuvent être synthétisés par synthèse organique, chimie enzymatique ou chemo-enzymatique. Ces méthodes seront brièvement présentées dans le paragraphe suivant.

## 5 Synthèse des GAG-mimétiques

La synthèse organique permet l'obtention de composés chimiques, plus ou moins complexes et bien définis en terme de structure. Dans le cas des polysaccharides, les synthèses sont compliquées et se limitent souvent à la production d'oligosaccharides d'environ dix monomères. Elles demandent un nombre conséquent d'étapes et les rendements globaux sont rarement excellents. Cependant, ces quantités peuvent être suffisantes pour des études d'activités biologiques, pour des standards analytiques ou pour confirmer la structure de fragments oligosaccharidiques isolés de sources naturelles.<sup>124,125</sup>

La synthèse organique permet aussi de démontrer la structure d'une séquence osidique active. Dans le cas de l'héparine, pentasaccharide **A** où tous les éléments structuraux impliqués dans la liaison avec le principal inhibiteur des enzymes du système de la coagulation, l'antithrombine, ont pu être identifiés.<sup>126</sup> Sa synthèse a été réalisée en plus de 60 étapes (Figure 14).<sup>127</sup> Cette molécule synthétique possède des activités biologiques similaires à l'HBPM, elle inhibe plus le facteur Xa que la thrombine (enzymes procoagulantes ayant un rôle majeur dans le système de la coagulation). Par la suite, cette synthèse a conduit au Fondaparinux, l'analogue méthylé du pentasaccharide **A**.<sup>126</sup> En 2001, la molécule Fondaparinux a été officiellement enregistrée sous le nom d'Arixtra® (SR 90107/Org 31540) aux USA et en Europe. Actuellement, ce médicament, commercialisé par le groupe GSK, est utilisé pour la prévention de la thrombose veineuse après des chirurgies réparatrices du genou et de la hanche. En comparaison avec l'HBPM, le risque de thrombose est diminué de 50% en utilisant une quantité plus faible de fondaparinux que d'HBPM.<sup>126</sup>

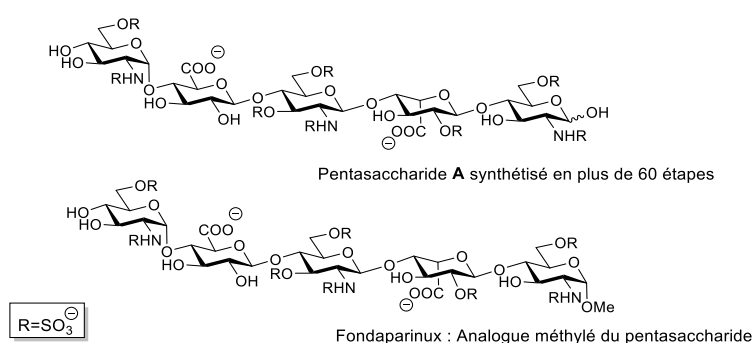


Figure 14 : Structure du pentasaccharide **A** et du Fondaparinux synthétisé (Petitou et al., 2004).<sup>126</sup>

La production de GAG-mimétiques est également possible en utilisant la catalyse enzymatique. Cette approche permet la synthèse d'oligosaccharides ou de certains polysaccharides dans des conditions plus douces. Les réactions ont généralement lieu à des températures comprises entre 20 et 37°C et dans des tampons aqueux.<sup>128</sup> De plus, une excellente stéréosélectivité de la liaison glycosidique

formée et une excellente régiosélectivité des substituants ajoutés sont observées car les enzymes sont spécifiques de la liaison à créer.

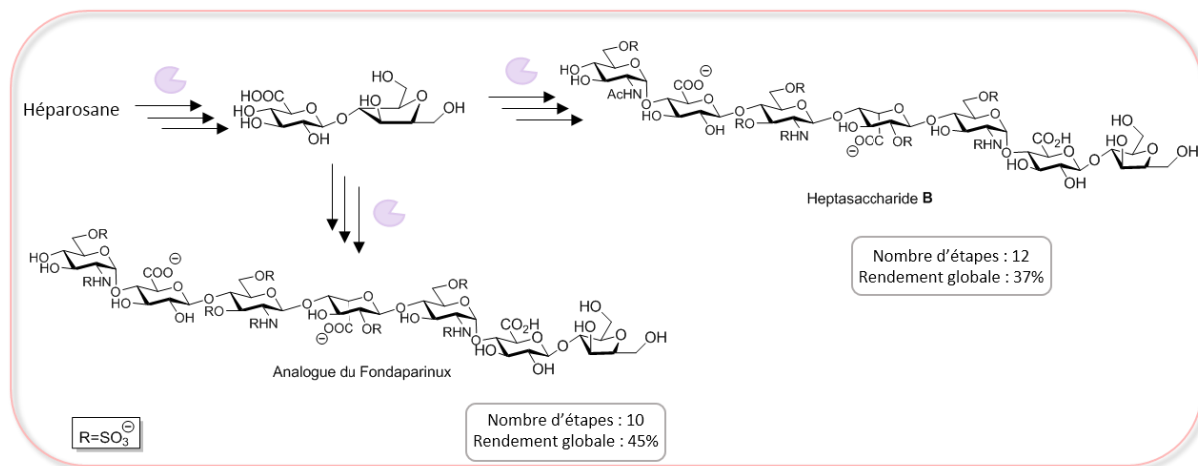


Schéma 6 : Synthèse du Fondaparinux et du pentasaccharide B.

Xu *et al.*<sup>129</sup> décrivent la synthèse d'un analogue du Fondaparinux et du heptasaccharide **B** à partir d'un disaccharide obtenu de l'héparosane (Schéma 6). L'élongation du disaccharide est possible grâce à des glycosyltransférases. L'analogue du Fondaparinux et l'heptasaccharide **B** sont obtenus en 10 (1778,5 g/mol) et 12 (1816,5 g/mol) étapes avec des rendements globaux respectifs de 45 et 37%.



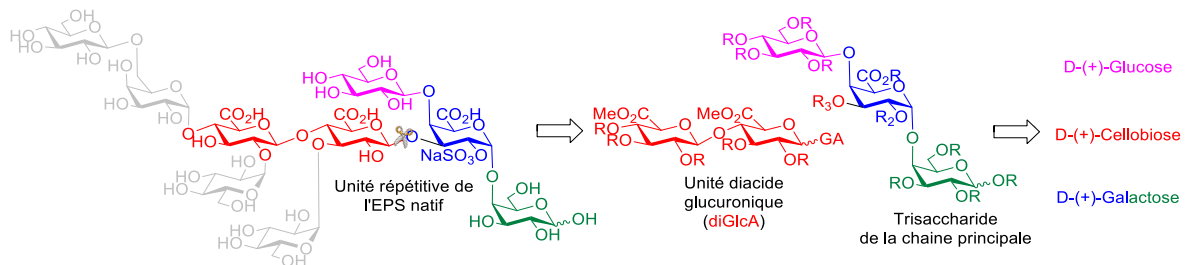


## Chapitre 2 : Synthèse de séquences oligosaccharidiques de l'unité répétitive de l'EPS natif d'*A. infernus*

### 1 Introduction

Pour rappel, l'objectif principal de la thèse est de trouver une méthode simple pour l'élucidation structurale des dérivés bioactifs de l'EPS natif d'*A. infernus*. Une des méthodes envisagées consiste en la synthèse organique de fragments oligosaccharidiques bien définis de l'unité répétitive nonasaccharidique de l'EPS natif afin de créer des références analytiques. Ces dernières constitueront une banque de données utilisable pour aider à l'élucidation structurale des dérivés bioactifs de l'EPS natif obtenus par dépolymérisation chimique et/ou enzymatique.

Il a fallu déterminer le motif de l'unité répétitive à synthétiser en priorité. Plusieurs raisons ont amené à choisir le pentasaccharide central coloré composé de deux **GlcA**, un **GalA**, un **Gal** et un **Glc** représenté ci-dessous sur la Rétrosynthèse 1. Le pentasaccharide contient la chaîne principale trisaccharidique,  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-**Glc**p-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-**Gal**pA2S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-**Gal**p-(1 $\rightarrow$ ), ainsi que le motif triacide uronique,  $\rightarrow 4$ - $\alpha$ -D-**Glc**Ap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-**Glc**Ap-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-**Gal**pA2S-(1 $\rightarrow$ ), qui semblent être en partie conservés lors de l'hydrolyse acide<sup>130</sup> et enzymatique<sup>103</sup>. De plus, les fonctions acides carboxyliques et sulfates sont à la base des activités biologiques des GAG.<sup>14</sup>



Rétrosynthèse 1 : Analyse de l'unité répétitive.

Synthétiser le pentasaccharide sulfaté en 18 mois est rapidement devenu un challenge ambitieux. C'est pourquoi il a fallu déterminer un motif moins complexe à préparer. La synthèse du trisaccharide de la chaîne principale,  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-**Glc**p-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-**Gal**pA2S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-**Gal**p-(1 $\rightarrow$ ), a rapidement semblé le plus judicieux que celle du trisaccharide triacide,  $\rightarrow 4$ - $\alpha$ -D-**Glc**Ap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-**Glc**Ap-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-**Gal**pA2S-(1 $\rightarrow$ ). En effet, la synthèse du triacide implique soit des glycosylations entre des unités uroniques, soit l'oxydation simultanée de trois hydroxyles primaires. Ces raisons nous ont amenés à choisir le trisaccharide de la chaîne principale. Ce trisaccharide sera obtenu après les couplages glycosidiques séquentiels entre les unités glucose (**Glc**), acide galacturonique (**GalA**),

galactose (Gal) issus logiquement de la fonctionnalisation des produits commerciaux correspondants D-(+)-Glucose et D-(+)-Galactose.

L'étape clé de la synthèse du pentasaccharide est donc le couplage glycosidique qui permet de "lier" les unités glycosidiques entre elles. La prochaine partie sera un rappel général sur les couplages glycosidiques, en outre pour mieux appréhender et comprendre la complexité de cette réaction.

## 2 Rappel sur les couplages glycosidiques

Le couplage glycosidique est "la" réaction clé en glycochimie. Il permet de fonctionnaliser le carbone anomérique d'un sucre en créant une nouvelle liaison glycosidique. Le couplage glycosidique, également appelé glycosylation<sup>†</sup>, est une réaction de substitution nucléophile entre un ose (Schéma 7a), dont le carbone anomérique est le centre électrophile, et n'importe quel type de nucléophile (Schéma 7b) en présence d'un promoteur qui initie la réaction. Lorsque le nucléophile est un ose, dont un OH est forcément libre, la glycosylation conduit à un disaccharide et par couplages successifs à des oligosaccharides.

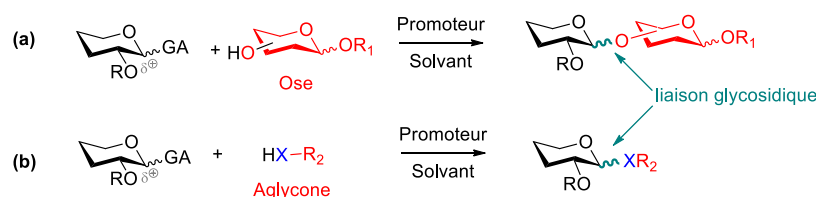


Schéma 7 : Equation générale d'un couplage glycosidique avec comme accepteur de glycosyle (a) un ose ou (b) un aglycone.

Dans les paragraphes suivants, après un détail général du mécanisme de glycosylation, les différents paramètres clés impliqués dans cette réaction seront exposés afin de souligner leur impact sur la réactivité et la stéréosélectivité du couplage qui sont particulièrement complexes à contrôler. Ces paragraphes ne se veulent pas exhaustifs, d'autant plus qu'un grand nombre d'excellentes revues et/ou livres<sup>131,132</sup> détaille la glycosylation ; malgré tout ils cherchent seulement à mettre en évidence les difficultés liées à cette réaction.

<sup>††</sup> Si rigoureusement le terme de "glycosylation" est un anglicisme, il est devenu courant en français pour désigner le couplage glycosidique.

## 2.1 Mécanisme général

Le couplage glycosidique implique trois partenaires :

- L'électrophile ; c'est un glycosyle dont le carbone anomérique est rendu électrophile par l'introduction d'un groupe électroattracteur dit « Groupe Activant (GA) ». Ce partenaire glycosyle est communément appelé « donneur de glycosyle ».

- Le nucléophile ; c'est une espèce aglycone ou glycosyle défini comme "accepteur de glycosyle". Il porte une fonction OH pour les réactions dites "classiques" de couplages glycosidiques qui sont plus précisément des *O*-glycosylations. Les réactions impliquant des nucléophiles aminés, sulfurés ou carbonés sont également largement développées donnant ainsi respectivement des *N*-, *S*- ou *C*-glycosylations.

- Le promoteur ; c'est le partenaire indispensable puisqu'il permet d'initier le couplage en se complexant au GA, le rendant meilleur groupe partant et exaltant ainsi l'électrophilie du carbone anomérique. Il facilite donc l'attaque de l'accepteur sur le carbone anomérique.

Le mécanisme général du couplage glycosidique est, succinctement, schématisé ci-dessous à partir d'un sucre donneur d'anométrie  $\alpha^{\S}$  (Schéma 8).

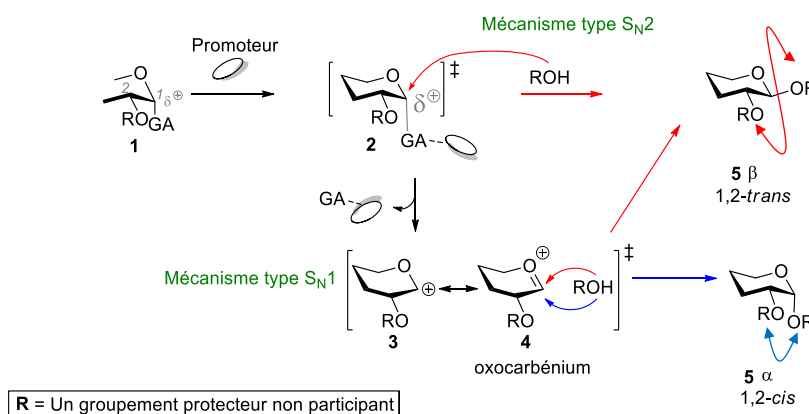
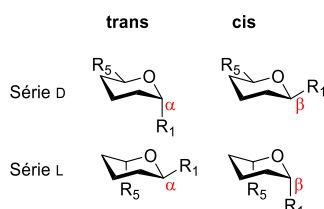


Schéma 8 : Mécanisme de la réaction de couplage glycosidique.

<sup>§</sup> La nomination  $\alpha/\beta$  de l'anomère est dépendante de la configuration relative *cis/trans* entre le groupement sur la position anomérique C<sub>1</sub> et le groupement sur carbone C<sub>5</sub> pour un pyranose. Si les groupements en C<sub>1</sub> et C<sub>5</sub> ont une configuration *trans* l'un par rapport à l'autre, alors le glycosyle est d'anométrie  $\alpha$ . S'ils sont en *cis* alors le glycosyle est  $\beta$ .



Le promoteur se complexe, de façon covalente ou non, au groupe activant pour conduire à l'intermédiaire **2** activé pour lequel la liaison glycosidique est fragilisée et le caractère  $\delta^+$  du carbone anomérique ( $C_1$ ) accentué. Si l'activation est douce, c'est-à-dire qu'elle permet juste d'allonger la liaison  $C_1$ -GA, un mécanisme de type  $S_N2$  peut être envisagé et l'attaque du nucléophile ROH se fait avec inversion de Walden pour conduire à l'anomère **5 $\beta$** . La position du GA introduit sur le carbone anomérique du donneur de glycosyle induit alors la stéréosélectivité de la réaction.

Si l'activation est plus forte, conduisant à la rupture de la liaison  $C_1$ -GA, un mécanisme de type  $S_N1$  a lieu. Le départ du complexe "GA-promoteur" conduit au carbocation **3** en équilibre avec sa forme mésomère oxocarbenium **4**. A ce stade le carbone anomérique étant plan, l'attaque du nucléophile ROH peut se faire par les deux faces pour conduire aux deux anomères **5 $\beta$**  et **5 $\alpha$** .

Un contrôle exclusif suivant une  $S_N2$  est impossible de par la formation très facile de l'intermédiaire carbocation/oxocarbenium (**3/4**) particulièrement stable. La difficulté de ce couplage glycosidique réside notamment dans le contrôle de la stéréosélectivité.

Le seul cas favorable à un bon contrôle de la stéréosélectivité lors de la glycosylation est la formation des stéréoisomères dit « 1,2-trans » pour lesquels le groupe en position anomérique est en trans du groupe en  $C_2$ . Le stéréoisomère 1,2-trans est l'anomère  $\beta$  dans le cas d'un sucre de la série D pour lequel le groupe en  $C_2$  est en position équatorial (cas du Gal et Glu par exemple) alors que c'est l'anomère  $\alpha$  lorsque le groupe en  $C_2$  est en position axial (cas du Man). Le contrôle de la stéréosélectivité est assuré par un groupe participant en  $C_2$  c'est-à-dire un groupe (généralement groupe protecteur) qui, comme son nom l'indique, participe au mécanisme. Les groupes participants les plus communs sont de type acyle tels que les substituants *O*-acétyle, *O*-benzoyle et *O*-pivaloyle pour les hydroxyles et *N*-phthaloyle ou *N*-trichloroéthoxycarbonyle pour les amines.

L'explication de l'excellente stéréosélectivité 1,2-trans est présentée sur le Schéma 9 avec un acétate comme groupe participant.

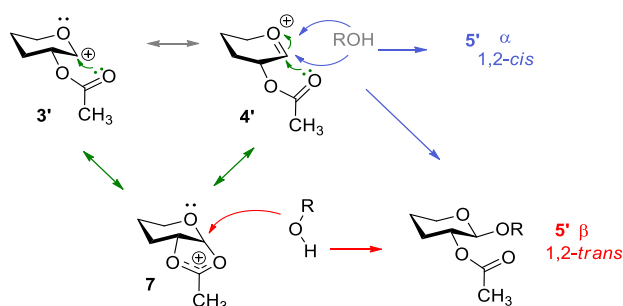


Schéma 9 : Mécanisme réactionnel expliquant la stéréosélectivité 1,2-trans lors de la présence d'un groupement protecteur participant en O-2.

A partir des formes mésomères carbocation **3'**/oxocarbénium **4'**, le groupement acétate peut stabiliser la charge  $\oplus$  en formant l'intermédiaire acétoxonium **7** (voie verte). L'acétoxonium **7** ne peut être attaqué que sur sa face  $\beta$  (voie rouge) et le produit de couplage 1,2-trans **5' $\beta$**  sera exclusivement formé. Cependant, l'acétoxonium **7** étant tendu de par la contrainte du bicyclic, il peut s'ouvrir en faveur des formes carbocation **3'**/oxocarbénium **4'**, laissant alors la possibilité au nucléophile d'attaquer suivant les deux faces de l'électrophile conduisant aux deux stéréoisomères **5' $\beta$**  / **5' $\alpha$** . Plus le nucléophile est faible plus cet équilibre peut avoir lieu et moins la stéréosélectivité sera bonne. La présence d'un groupement participant en axial, permet également un excellent contrôle 1,2-trans de la stéréosélectivité, mais conduit alors très majoritairement à l'anomère  $\alpha$  (en série D).

D'autres groupements participants ont été développés permettant le contrôle de la stéréochimie du centre anomérique.<sup>133-138</sup> La stéréosélectivité peut être induite par un transfert d'aglycone en intramoléculaire ou par liaison hydrogène entre le groupement participant et l'accepteur de glycosyle. Par exemple, les groupements protecteurs de type picolinyle et picoloyle assistent l'attaque de l'accepteur de glycosyle par liaison hydrogène et la stéréochimie du centre anomérique dépend de l'orientation axiale ou équatoriale de groupe protecteur.<sup>136,139,140</sup> Le Schéma 10 montre comment le groupe picolinyle en C<sub>3</sub> d'un thioglucopyranoside, donc en équatorial vers la face inférieure, permet un excellent contrôle en faveur de l'anomère  $\alpha$ .

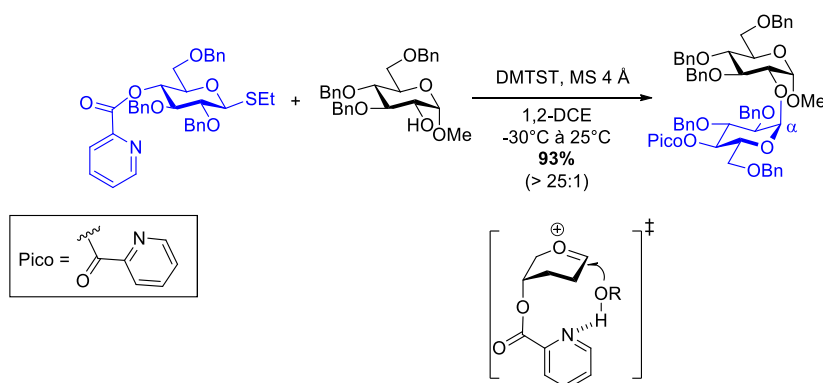


Schéma 10 : Glycosylation assistée par un groupement de type picolinyle (adapté d'Yasomane J.P. et al 2015)<sup>140</sup>.

A part ces cas précis, le contrôle de la stéréosélectivité des couplages glycosidiques est particulièrement délicat. De façon plus générale, les réactions de glycosylation sont connues pour être très substrats dépendantes aussi bien en termes de réactivité que de stéréosélectivité. Elles sont dépendantes de nombreux paramètres tels la nature du groupe activateur et du promoteur associé ou la nature du solvant et des différents groupes protecteurs. Les paragraphes suivants présenteront l'impact particulier de ces trois paramètres sur la réactivité/stéréosélectivité du couplage glycosidique.

Même si les conditions de températures, concentrations et nombre d'équivalents participent également, ils seront négligés dans ces paragraphes.

## 2.2 Groupe activant et promoteur associé

Le Groupe Activant (GA) est par définition un groupe électroattracteur qui rend le carbone anomérique  $\delta^{\oplus}$ . L'activation du GA par le promoteur se fait par l'attaque d'un atome nucléophile du GA sur le promoteur, augmentant l'électrophilie du carbone anomérique. Deux types d'activations sont définis suivant la nature du GA (Schéma 11) :

- l'activation « directe » : L'hétéroatome X lié en C<sub>1</sub>, généralement seul atome nucléophile, présent sur le GA, attaque le promoteur E<sup>⊕</sup> (Schéma 11A). C'est le cas de figure le plus courant avec les hémiacétals, les halogénures de glycosyles, et les thioacétals qui suivent ce mécanisme.

- l'activation « distale » : une conjugaison n-σ-π existe à partir de l'atome d'oxygène lié en C<sub>1</sub> qui rend l'atome Y plus nucléophile et permet l'attaque sur le promoteur E<sup>⊕</sup> (Schéma 11B).

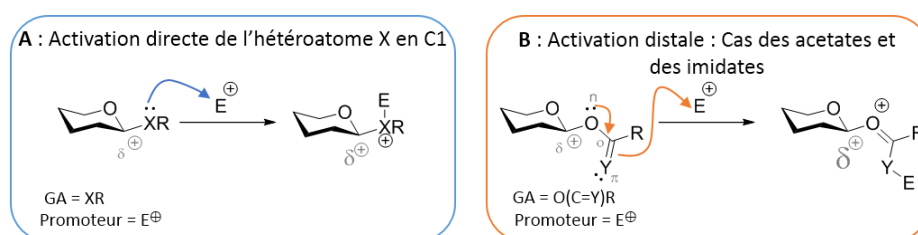


Schéma 11 : Activation directe (A) ou distale (B) du carbone anomérique par le promoteur.

Les méthodes d'activations des GA sont largement décrites dans la littérature<sup>141,142</sup>, seuls quelques exemples généraux sont présentés sur le Schéma 12. Les hémiacétals, halogénures, et thioacétals illustrent la méthode d'activation directe alors que les acétates et les imidates suivent une activation distale.

Les hémiacétals peuvent être activés en présence d'un acide de Brønsted en quantité catalytique selon les conditions développées par Emil Fischer<sup>143</sup> en 1893 (Schéma 12A). Ils sont également activables avec des acides de Lewis tels que Sn(OTf)<sub>2</sub><sup>144</sup>, Cu(OTf)<sub>2</sub><sup>145</sup>. Également, une activation de type Mitsunobu (PPh<sub>3</sub>, RCO<sub>2</sub>N=NCO<sub>2</sub>R) permet d'avoir un bon groupe partant sur le carbone anomérique. Dans ce dernier exemple, l'oxyde de triphénylphosphine sera libéré après l'attaque de l'accepteur de glycosyle. Toutefois, la présence de ce sous-produit peut induire des difficultés lors de l'étape de purification.

Les halogénures de glycosyles sont activés sur l'atome d'halogène à l'aide d'agents halogénophiles (Schéma 12B). Koenigs et Knorr<sup>146</sup> puis Fischer et Armstrong<sup>147</sup> sont les premiers à introduire les bromures et chlorures de glycosyles activés par des sels d'argent tels qu'Ag<sub>2</sub>O et Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.<sup>148</sup> Ces métaux carbonates et oxydes ont l'avantage de jouer à la fois le rôle de promoteur et de base pour neutraliser les traces d'acides. D'autres agents halogénophiles, comme les sels de mercures, ont été étudiés, notamment par Helferich et Zemplén, en tant que promoteurs dans les couplages glycosidiques avec les bromure ou chlorure de glycosyles.<sup>149</sup>

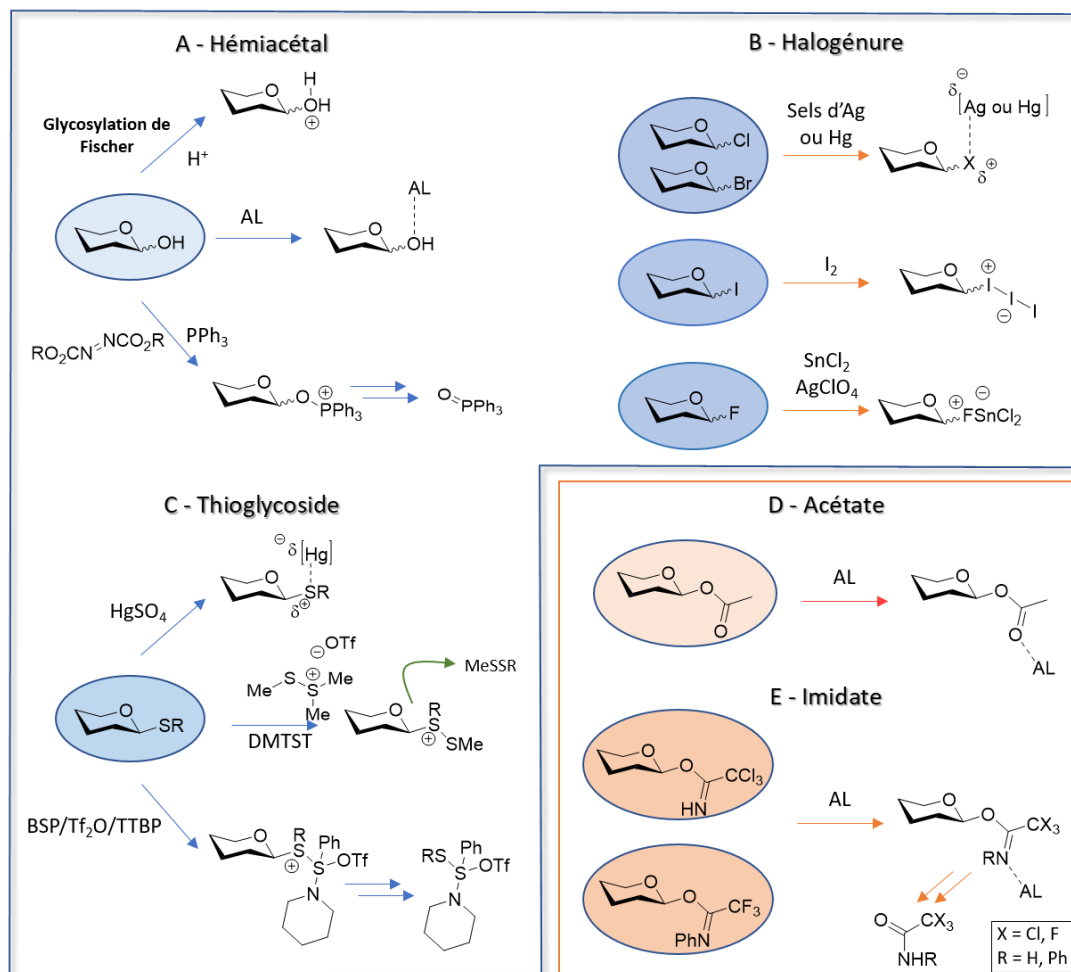


Schéma 12 : Les méthodes d'activation des hémiacétales (A), des halogénures (B), des thioéthers (C), des acétates (D) et des imidates (E)

Les iodures de glycosyles ont longtemps été peu utilisés du fait de leur instabilité. Récemment, des méthodes de préparation de ces glycosyles permettant de les isoler ont été décrites.<sup>150,151</sup> Leur activation lors de couplages glycosidiques a été développée en présence de diode (I<sub>2</sub>).

Les fluorures de glycosyles sont de bonnes alternatives aux autres halogénures de glycosyles du fait de leur meilleure stabilité due à la force de la liaison C-F. Ils sont activés en présence du couple promoteur SnCl<sub>2</sub>-AgClO<sub>4</sub> suivant une méthode développée par Mukaiyama et son équipe<sup>152</sup> en 1981. Toutefois, il

reste difficile de les définir comme plus réactifs ou efficaces dans le sens où les couplages glycosidiques sont très dépendants des substrats.

Les groupements de type thioéther -SR ont l'avantage d'être des groupements protecteurs stables de la position anomérique. Ils sont activés sur l'atome de soufre dans des conditions réactionnelles spécifiques. Trois exemples sont illustrés sur le Schéma 12C. Les premiers couplages ont été décrits avec des promoteurs de type mercure II comme  $\text{HgSO}_4$ .<sup>153</sup> Des promoteurs soufrés, comme les réactifs (méthylthio)sulfonium triflate<sup>154,155</sup> (DMTST) et pipéridine 1-benzènesulfinyl<sup>156</sup> (BSP) ont aussi été développés. Ils ont la particularité de former une liaison S-S lors de l'activation du GA, ce qui induit le départ d'un disulfure quand la liaison anomérique se rompt.<sup>157</sup> L'éponge à proton 2,4,6-tri-tert-butylpyrimidine (TTBP) peut être utilisée pour piéger les traces d'acides formées lors de la glycosylation.

L'activation des glycosyles acétates, de type "activation distale", a lieu sur l'oxygène du carbonyle en présence d'un acide de Lewis tel que TMSOTf ou  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (Schéma 12D). Les glycosyles trichloroacétimidates (TCA) ont été introduits en 1980 par Schmidt et son équipe<sup>158</sup>. Ils font partie des donneurs de glycosyles les plus utilisés lors des couplages glycosidiques. Leurs activations ont lieu en présence d'une quantité catalytique d'acides de Lewis ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ <sup>159, 160</sup> ou TMSOTf<sup>161</sup>) avec libération de de trichloroacétamide  $\text{Cl}_3\text{C}-\text{CONH}_2$ . L'utilisation de sel d'argent ( $\text{AgOTf}$ ),<sup>162</sup> d'indium ( $\text{InBr}_3$ ,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{In}(\text{OTf})_3$ ),<sup>163</sup> de samarium ( $\text{Sm}(\text{OTf})_3$ ),<sup>164</sup> de lanthanides ( $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{Tb}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ )<sup>165</sup> et de résine acide type Amberlyst® 15H<sup>166</sup> a également été décrite dans la littérature.

Les glycosyles N-phényltrifluoroacétimide (PTFAI) ont été introduits en 2001 par Yu *et al.*<sup>167</sup>. Ils sont activés en présence d'un acide de Lewis comme TMSOTf ou  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ . Leurs méthodes de préparation et d'activation a fait l'objet d'une revue en 2010 par Yu *et al.*<sup>168</sup> Les glycosyles PTFAI sont décrits comme légèrement plus stables que les TCA mais ces deux glycosyles ont des réactivités comparables.

Pour conclure sur l'activation du donneur de glycosyle, de nombreuses méthodes sont décrites mais il est difficile d'anticiper quelles conditions choisir pour un substrat donné.



### 2.3 Influence du solvant sur la stéréosélectivité de la réaction

Le mécanisme présenté initialement Schéma 8 (cf p. 37) pour définir la glycosylation et qui se limite juste à une compétition  $S_N1/S_N2$  est en réalité très simplifié. Le Schéma 13 ci-dessous se veut plus précis et traduit la complexité de cette étape en soulignant tout particulièrement l'impact du solvant sur la réactivité/stéréosélectivité.

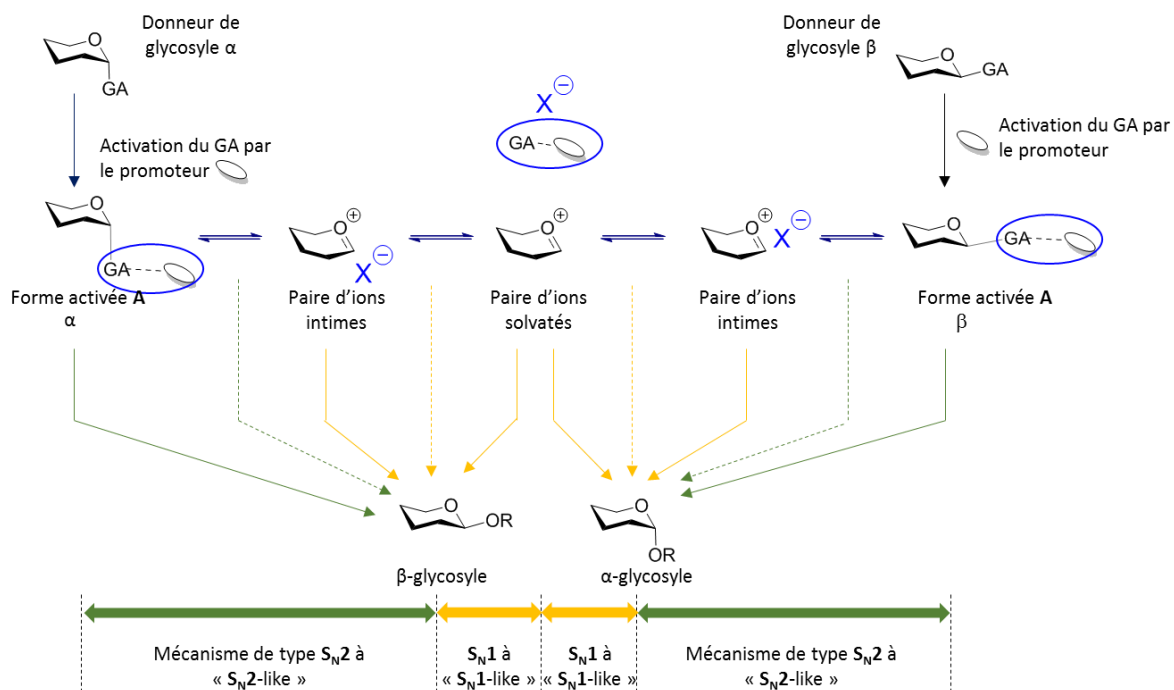


Schéma 13 : Impact du solvant sur la réactivité/stéréosélectivité de la glycosylation (adapté de Bohé et al. 2015)<sup>169</sup>.

Comme décrit précédemment, la réaction commence avec le promoteur qui se complexe, de façon covalente ou non, au groupe activant. Le caractère  $\delta^{\oplus}$  du carbone anomérique est accentué et la liaison glycosidique est allongée donc fragilisée. Dans un solvant apolaire, il existe un équilibre subtil entre la forme activée A, où la liaison glycosidique est encore sous forme covalente, et la forme "paire d'ions intime" où l'oxocarbenium et son contre ion X<sup>-</sup> restent fortement associés. Il n'y a pas de réelle séparation entre les ions et le contre ion X<sup>-</sup> conserve la position initiale du GA. Lors de l'attaque de l'accepteur de glycosyle, le mécanisme sera de type S<sub>N</sub>2 ou S<sub>N</sub>2-like suivant si l'attaque se fait respectivement sur l'espèce activée A ou sur la paire d'ion intime.

A contrario, dans un solvant polaire, les ions sont solvatés (paire d'ions solvatés) et l'oxocarbenium est libre de son contre ion. L'accepteur de glycosyle peut donc attaquer les deux faces de l'oxocarbenium *via* un mécanisme de type S<sub>N</sub>1.

A part l'influence de la polarité, un effet tout particulier des solvants type éther ou nitrile a été mis en évidence dans la stéréosélectivité des glycosylations. Les solvants de type éther favorisent la formation des liaisons d'anométrie  $\alpha$  tandis que les solvants de type nitrile permettent la formation des liaisons d'anométrie  $\beta$ . Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ces observations, connues sous le nom d'**effet éther/effet nitrile**.

La première hypothèse est la "coordination du solvant" (Schéma 14A). Les solvants de types éthers, tels que l'éther diéthylique, s'insèrent sur la face  $\beta$  dû à l'effet anomérique inverse<sup>170\*\*</sup>, et seul la face  $\alpha$  peut être attaquée par l'accepteur de glycosyle. Dans un solvant de type nitrile comme l'acétonitrile, l'acétonitrile s'insère sur la face  $\alpha$ , ce qui explique la formation majoritaire d'une liaison d'anométrie  $\beta$ .

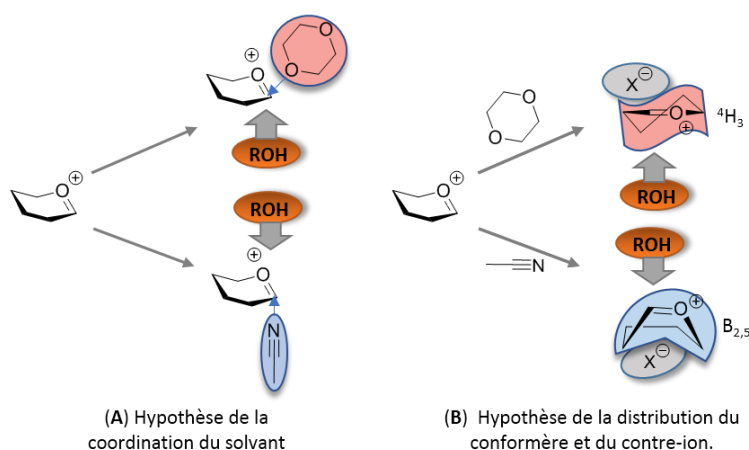


Schéma 14 : Effet éther, effet nitrile : hypothèse de la coordination du solvant (A), hypothèse de la distribution du conformère et du contre-ion (B).

La seconde hypothèse, nommée "distribution du contre-ion et du conformère", repose sur des études théoriques (Schéma 14B).<sup>171</sup> Ces études montreraient que dans les solvants de type éthers tels que le toluène et le 1,4-dioxane, la formation de l'intermédiaire demi-chaise  $^4H_3$ , avec  $X^-$  qui masquerait la face  $\beta$ , serait favorisée. Cela expliquerait la formation majoritaire du produit thermodynamique d'anométrie  $\alpha$ . Dans l'acétonitrile, le cycle pyranose adopterait principalement une conformation bateau  $B_{2,5}$  avec le contre-ion  $X^-$  qui boquerait la face  $\alpha$ . Seul l'insertion du nucléophile en  $\beta$  serait possible.

En conclusion, le solvant joue un rôle important dans la stéréosélectivité de la glycosylation. C'est donc un paramètre important à prendre en compte lors de la mise au point de cette réaction.

\*\* L'effet anomérique inverse explique l'orientation en équatorial du groupement chargé positivement en  $C_1$

## 2.4 Effet des groupes protecteurs

La modulation de la réactivité de l'accepteur glycosyle et du donneur de glycosyle suivant la nature des groupements protecteurs est connue comme l'effet armé/désarmé.<sup>172</sup> Pour le donneur de glycosyle, c'est principalement le groupement protecteur en C<sub>2</sub> qui module la réactivité en stabilisant ou non le carbocation en C<sub>1</sub> (Schéma 15A).

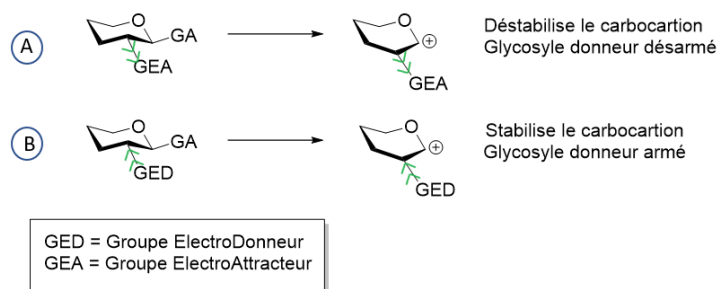


Schéma 15 : Glycosyle donneur (A) désarmé ou (B) armé.

Un groupement électro-attracteur GEA (ester, Schéma 15A) en C<sub>2</sub> déstabilise le carbocation en C<sub>1</sub>, qui est alors plus difficile à former. Le donneur de glycosyle est moins réactif, il est dit "désarmé". A l'inverse, un groupement électro-donneur GED (benzyle, Schéma 15B) stabilise le carbocation et le donneur de glycosyle plus réactif est alors dit "armé". Dans les cas des accepteurs de glycosyle, ils sont dits « désarmés » si les groupements protecteurs diminuent sa nucléophilie, et ils sont « armés » si les groupements protecteurs augmentent sa nucléophilie.

Paulsen et son équipe<sup>173</sup> ont mis en évidence la différence de réactivité entre un glycosyle donneur acétylé et un glycosyle donneur benzylé dès 1982, mais ce n'est qu'en 1988, que Fraser-Reid et López attribuent la différence de réactivité à la nature du groupement protecteur en C<sub>2</sub>. Fraser-Reid *et al.* le démontrent notamment avec le coulage glycosidique présenté sur Schéma 16.<sup>174</sup> Les auteurs étudient la glycosylation entre deux glucosyles **8** et **9** activés en anomérique par un même GA de type pentenyle. Le groupement benzyle en C<sub>2</sub> arme le glucosyle **8** et doit favoriser la formation du carbocation en présence du promoteur. A l'inverse, le groupement acétate en C<sub>2</sub> du glucosyle acétylé **9** doit limiter la formation du carbocation en désarmant ce glycosyle. Ainsi, le glucosyle benzylé **8** devra jouer le rôle de donneur de glycosyle et le glucosyle acétylé **9**, avec son hydroxyle libre en C<sub>6</sub>, est sensé jouer préférentiellement le rôle d'accepteur de glycosyle. Bien qu'en position anomérique le glucosyle **9** possède le même groupe activant que le glucosyle **8**, sa désactivation par l'acétate en C<sub>2</sub> devrait l'empêcher de se comporter en tant que glycosyle donneur et de réagir sur lui-même par un homocouplage. Expérimentalement, seul le disaccharide **10** est obtenu et aucune trace du produit d'homocouplage **11** n'est observée, confirmant ainsi que le glycosyle **9** est désactivé et ne peut pas

jouer le rôle de donneur de glycosyle. Les auteurs soulignent bien ainsi l'impact du substituant en C<sub>2</sub> sur l'aspect armé/désarmé du donneur de glycosyle.

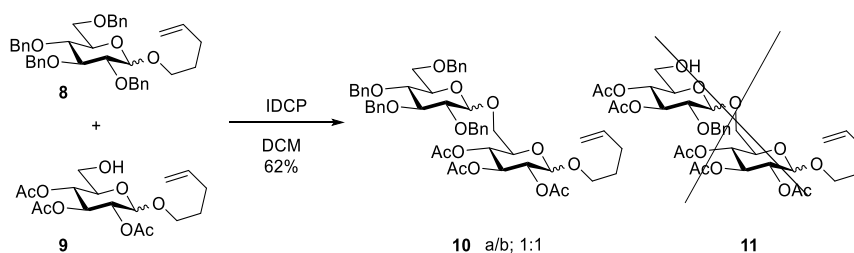


Schéma 16 : Illustration de l'effet armé/désarmé (adapté de Fraser-Reid et al.<sup>174</sup>).

Le groupement 4,6-*O*-benzylidène est également connu pour désactiver le donneur de glycosyle. La présence du 4,6-*O*-benzylidène crée un système bicyclique de type décaline sur lequel il est peu favorable de former un carbocation plan du fait des contraintes stériques. Fraser-Reid et al.<sup>175</sup> expliquent qu'avec un telle contrainte de cycle, il est difficile pour le cycle de l'ose de passer d'une conformation chaise à demi-chaise. La barrière d'énergie d'activation du passage de la forme chaise à demi-chaise est beaucoup plus importante que dans le cas d'un donneur de glycosyle 4,6-di-*O*-benzyle (Figure 15). Ainsi un couplage glycosidique impliquant un donneur de glycosyle protégé en 4,6 par un benzylidène sera plus difficile que dans le cas d'un donneur de glycosyle per-benzylé.

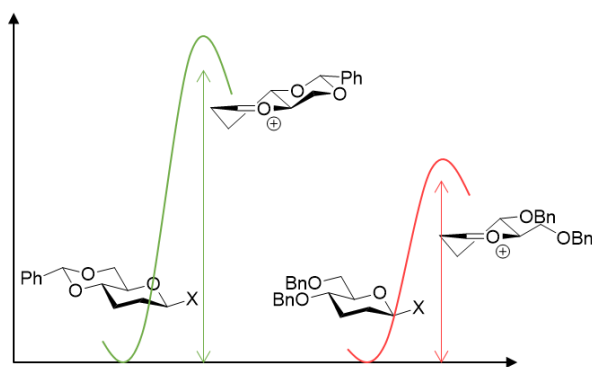
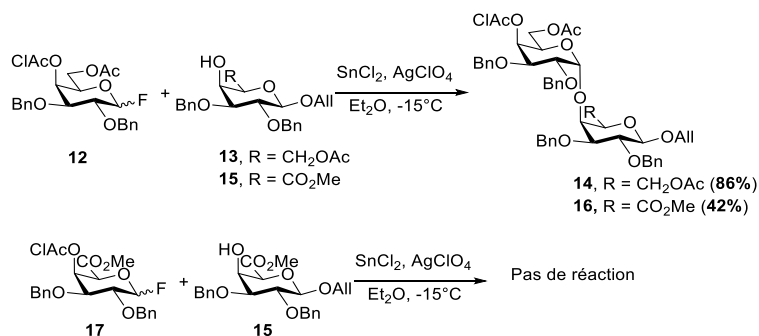


Figure 15 : Les barrières d'énergies d'activation du passage de la forme chaise à demi-chaise pour donneur de glycosyle 4,6-*O*-benzylidène et 4,6-di-*O*-benzyle.

Les groupements protecteurs ont donc une influence sur la réactivité du donneur et de l'accepteur de glycosyle. Certains groupements fonctionnels, comme les fonctions acides carboxyliques, ont également une influence considérable. Ce point sera abordé dans le paragraphe suivant.

## 2.5 Difficulté des couplages avec des acides uroniques

La fonction acide carboxylique en C<sub>5</sub> (ou ester correspondant) désactive les partenaires du couplage glycosidique qu'ils soient donneur ou accepteur de glycosyle. Cette désactivation est notamment mise en évidence au travers des trois exemples de couplages illustrés dans le schéma ci-dessous. (Schéma 17).<sup>176</sup>



*Schéma 17 : Trois exemples illustrant les difficultés observées lors de couplages glycosidiques impliquant des glycosyles esters.*

Les trois couplages glycosidiques sont similaires : un galactosyle donneur fluoré en position anomérique est activé dans les conditions de Mukaiyama<sup>152</sup> et mis en présence d'un galactosyle accepteur dont l'hydroxyle en 4 est libre. La seule variable est la position 5 des oses qui est soit un groupe ester CO<sub>2</sub>Me soit un CH<sub>2</sub>OAc. Le premier couplage glycosidique entre les deux partenaires neutres **12** et **13** (R = CH<sub>2</sub>OAc en C<sub>5</sub>) permet de former le disaccharide **14** attendu. Lorsque le partenaire galactosyle donneur **15**, un galactosyle uronique (R = CO<sub>2</sub>Me en C<sub>5</sub>), est mis en réaction avec le même galactosyle donneur neutre **12**, le disaccharide **16** n'est formé qu'avec 42% de rendement. Dans le cas du couplage entre deux partenaires acides **15** et **17**, aucune formation du disaccharide n'est obtenue. Cette chute drastique de rendement lors de ces couplages confirme bien l'impact désactivant d'un groupe acide ou ester en position C<sub>5</sub> des glycosyles sur la réactivité des partenaires.

Toutefois, un grand nombre de publications illustre la synthèse d'oligosaccharides acides avec d'excellents couplages. C'est le cas pour la synthèse du tétrasaccharide acide **26** décrit par Westman et son équipe<sup>177</sup> (Schéma 18). Le premier couplage glycosidique implique le bromiduronate de méthyle<sup>178</sup> **18** en tant que donneur de glycosyle et le thioglucopyranoside **19** comme accepteur de glycosyle. Le bromure **18** est activé par le triflate d'argent en présence de 2,6-di-tertbutyl-4-méthylpyridine (DTBMP) dans le dichlorométhane. Le DTBMP, éponge à proton, permet de piéger les traces d'acides trifliques libérées dans le milieu. Le produit de couplage attendu est obtenu avec un rendement de 60% bien que le donneur de glycosyle soit désarmé en C<sub>2</sub> par le groupement acétate. Ce dernier assure la stéréosélectivité 1,2-*trans* de la réaction. Dans le second couplage, l'ester thioéther donneur **21**, désactivé par la présence du -OAc en C<sub>2</sub>, est mis en réaction avec l'accepteur

neutre **22** en présence de DMTST afin d'isoler le disaccharide **23** avec un très bon rendement de 80%. La stéréosélectivité est également assurée par le groupe participant en C<sub>2</sub> (benzoyle). Enfin, le disaccharide accepteur **24**, obtenu après la déprotection adéquate de **23**, est mis en réaction avec le disaccharide thioéther **20** en présence de DMTST, et le tétrasaccharide protégé **25** est obtenu avec 79%.

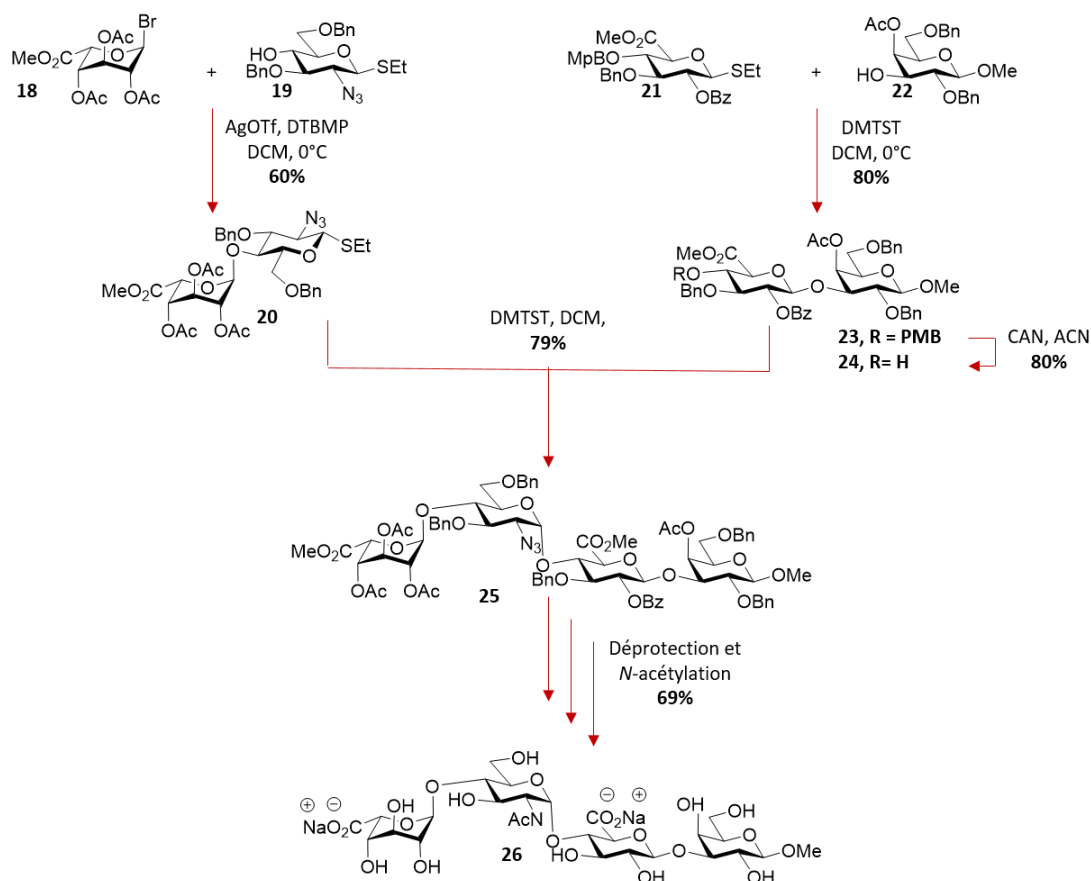


Schéma 18 : Synthèse du tétrasaccharide **26**.

Pour conclure, même si les glycosyles esters sont connus pour être moins réactifs, il est possible d'obtenir de bons rendements lors des couplages glycosidiques. Des optimisations sont systématiquement nécessaires pour préparer les produits de couplages avec les meilleurs rendements possibles.

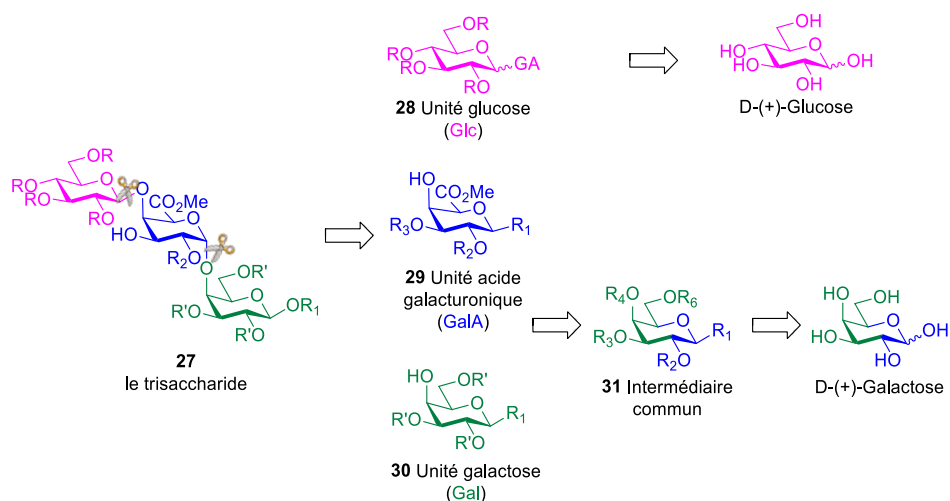
Finalement, plusieurs paramètres sont modulables pour améliorer la stéréosélectivité, la réactivité ainsi que le rendement d'un couplage glycosidique. Il n'y a pas de règles empiriques qui permettent de définir exactement les conditions à utiliser en fonction d'un substrat donné. Seules des règles générales, comme celles présentées dans ce paragraphe, permettent de proposer des conditions de références initiales qui seront à optimiser et affiner en fonction des résultats

expérimentaux. C'est notamment pour cela que les couplages glycosidiques sont connus pour être très substrats dépendants.

Comme mentionné dans l'introduction, nous avons privilégié la synthèse du trisaccharide. La stratégie envisagée sera détaillée dans le paragraphe suivant.

### 3 Stratégie de synthèse des trois monomères du trisaccharide

La rétrosynthèse du trisaccharide **27** est présentée ci-dessous (Rétrosynthèse 2).



#### Rétrosynthèse 2 : Voie rétrosynthétique du trisaccharide **27**.

La rétrosynthèse du trisaccharide **27** propose classiquement deux couplages glycosidiques qui impliquent les unités **Glc 28**, **GalA 29** et **Gal 30**. Les unités glucosyle **Glc 28** et galactosyle **Gal 30** seront respectivement impliquées en tant que glycosyle donneur et glycosyle accepteur. Quant à elle, l'unité galacturonique **GalA 29** devra jouer le double rôle donneur/accepteur dans les deux couplages successifs. Logiquement ces unités proviendront de la fonctionnalisation de leur sucre parent commercial le D-(+)-glucose et le D-(+)-galactose.

Au sein du trisaccharide, l'unité **Glc** étant d'anomérie  $\beta$ , un groupe participant en position  $C_2$  est nécessaire afin d'avoir la stéréosélectivité souhaitée lors du couplage. Une synthèse simple du glycosyle donneur **Glc 28** a été proposée par per-acétylation qui permet d'installer le groupe participant acétate en  $C_2$  mais également d'avoir, en position anomérique, le groupe acétate qui est, en lui-même, un groupe activant et qui permet d'introduire facilement d'autres GA tels qu'un brome, un thioéther et un trichloroacétimide.

L'unité **Gal 30**, accepteur de glycosyle, est impliquée dans la glycosylation par son hydroxyle 4. Un jeu de protection/déprotection est à prévoir afin de libérer l'hydroxyle 4.

L'unité **GalA 29** est la plus complexe des trois unités. Tous ses hydroxyles sont fonctionnalisés différemment : les hydroxyles 1 et 4 sont impliqués dans les liaisons glycosidiques au sein de la chaîne principale, l'hydroxyle en 3 participe à la liaison glycosidique avec la ramification di-glucuronique (**GlcA-GlcA**), l'hydroxyle en 2 est sulfaté et l'hydroxyle en 6 doit être oxydé en acide carboxylique. Il faut donc des groupements protecteurs différents sur tous les hydroxyles afin qu'ils puissent être déprotégés indépendamment les uns des autres. De plus, un groupement participant en C<sub>2</sub> est à exclure car la liaison formée après couplage est d'anométrie  $\alpha$ .

Les unités **GalA 29** et **Gal 30** provenant de la fonctionnalisation du galactose, une synthèse *via* un intermédiaire commun **31** permettrait de diminuer le nombre d'étapes.

Le cahier des charges pour l'intermédiaire commun **31** est le suivant :

- Fonctionnalisation en 4 et 6 :

Il faut pouvoir libérer l'hydroxyle 4, impliqué dans une liaison glycosidique sur chacune des unités galactoses (**GalA**, **Gal**) et l'hydroxyle 6 qui est à oxyder en acide carboxylique sur l'unité galacturonique **GalA** alors qu'il est protégé sur l'unité **Gal**. Pour jouer facilement sur les OH en 4 et 6, le groupe protecteur 4,6-*O*-benzylidène est le plus adéquat. Un intermédiaire 4,6-*O*-benzylidène de type **32** permettra l'hydrolyse acide de l'acétal pour libérer le diol **33** dont l'hydroxyle primaire sera oxydé/estérifié pour conduire à l'unité **34** (Schéma 19). Sur cette unité, l'hydroxyle 4 est libre afin de participer au couplage glycosidique dans la suite de la synthèse. De plus, l'avantage considérable du 4,6-*O*-benzylidène est de permettre, en fonction des conditions réactionnelles, de libérer régiosélectivement l'hydroxyle 4 ou 6. Ainsi, à partir de l'intermédiaire commun type **32**, une ouverture réductrice en 6 conduit au motif 4-*O*-benzyléther **35** dont seul le OH en 6 est libre et qui pourra être un substrat modèle pour l'étude de l'étape d'oxydation/estérification en 6, connue comme une étape complexe. A l'inverse l'ouverture réductrice en 4 conduit au 6-*O*-benzyléther **37** motif constitutif de l'unité **Gal**, avec le OH en 4 de libre pour le couplage glycosidique

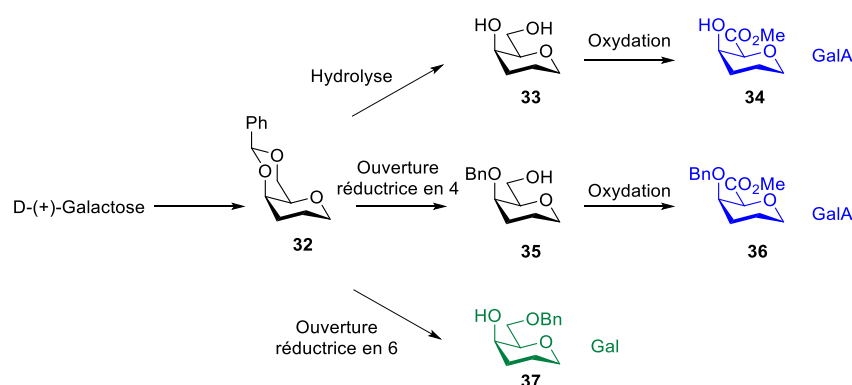


Schéma 19 : Choix du groupement 4,6-*O*-benzylidène.



- Fonctionnalisation de la position anomérique ; choix de R<sub>1</sub> :

Le groupe en position anomérique sur l'intermédiaire commun **31**, d'après la Rétrosynthèse 2 (cf p.49), devra être un groupe protecteur sur l'unité Gal **30** et devra être un groupe activant ou un groupe protecteur sur l'unité GalA **29** respectivement suivant son implication dans le couplage avec Glc **28** ou Gal **30**.

Le groupement thiophényle (SPh) est un candidat de choix en tant que R<sub>1</sub> puisqu'il répond au critère de "groupe protecteur", car il est stable dans de nombreuses conditions, et qu'il devient un bon groupe activant en présence de promoteurs adéquats. Un autre de ses avantages est d'être un précurseur pour l'introduction de différents groupements activant tel que F, Br, Cl, OH, TCA, OAc offrant ainsi un panel d'optimisations pour le couplage glycosidique si nécessaire.

Malgré ces avantages, un problème est à envisager lors du couplage glycosidique entre les unités GalA **29** (donneur de glycosyle) et Gal **30** (accepteur de glycosyle). Provenant du même intermédiaire commun, les deux unités auront un SPh en anomérique. Ce groupement activant étant présent sur l'accepteur de glycosyle, des réactions secondaires d'homocouplages risquent d'avoir lieu nécessitant des conditions réactionnelles particulièrement difficiles à maîtriser.

La seconde alternative pour le groupement R<sub>1</sub> en anomérique est le groupement *O*-Allyle. Ce groupement étant uniquement un groupe protecteur, il faudra envisager des étapes supplémentaires de déprotection de l'hydroxyle anomérique/introduction du groupement activant (TCA ou SPh) sur l'unité GalA mais en contre-partie tout risque d'homocouplage serait ainsi évité.

- Fonctionnalisation des hydroxyles en 2 et 3.

Seule l'unité GalA **29** doit posséder des groupements protecteurs différents sur les hydroxyles 2 et 3 afin de permettre une sulfatation sélective en 2 et le couplage glycosidique en 3. Des protections différentes des unités GalA **29** et Gal **30** sont à envisager, et par conséquent, les deux hydroxyles seront laissés libres sur l'intermédiaire commun.

En conclusion, l'intermédiaire commun envisagé sera un dérivé 4,6-*O*-benzylidène-β-D-galactopyranoside qui sera décliné en deux séries suivant la nature du groupe R<sub>1</sub> en anomérique. Les appellations "série SPh" et "série -OAll" seront trivialement utilisées pour simplifier la nomenclature des dérivés. Ainsi, l'intermédiaire commun en série -SPh est suivant une nomenclature rigoureuse le phényle 4,6-*O*-benzylidène-β-D-galactopyranoside **31a** et l'intermédiaire commun en série -OAll est l'allyl 4,6-*O*-benzylidène-β-D-galactopyranoside **31b** (Schéma 20).

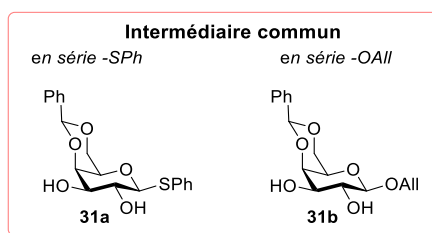


Schéma 20 : L'intermédiaire commun **31** en série -SPh et -OAll.

Le choix de l'intermédiaire commun étant expliqué, les synthèses des unités galactose **Gal 30** et acide galacturonique **GalA 29** seront détaillées dans les paragraphes suivants.

## 4 Synthèse de l'unité galactose **Gal 30**

Pour rappel, l'unité galactose **Gal 30** doit avoir seulement l'hydroxyle de libre en 4 pour permettre le couplage glycosidique avec l'unité galacturonique **GalA 29**. Les hydroxyles en 2 et 3, n'étant pas fonctionnalisés sur le trisaccharide, ils seront protégés de façon identique sous forme d'éthers benzylés. Outre leur stabilité, le choix de ces groupements s'explique par la synthèse envisagée *via* l'intermédiaire clé 4,6-*O*-benzylidène qui, en une seule étape d'ouverture réductrice, permet de déprotéger l'hydroxyle en 4 tout en générant l'éther de benzyle en 6. Ainsi, les hydroxyles de l'unité galactose **Gal 30** pourront être libérés simultanément par hydrogénolyse lors de l'étape de déprotection finale.

Deux étapes seront donc à envisager à partir de l'intermédiaire commun **31** pour élaborer l'unité **Gal 30** (Schéma 21) : la di-benzylation des hydroxyles en 2/3 et l'ouverture réductrice de l'acétal 4,6-*O*-benzylidène

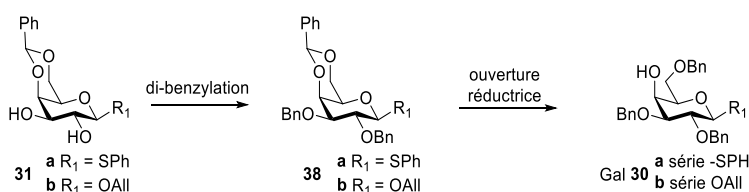
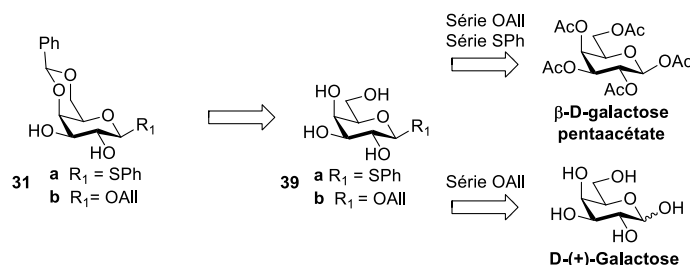


Schéma 21 : Synthèse de l'unité **Gal 30** en série SPh et OAll.

Au préalable de la description de ces deux étapes conduisant à l'unité **Gal 30**, la synthèse de l'intermédiaire commun en série -SPh et -OAll sera détaillée.

## 4.1 Synthèse de l'intermédiaire commun 31

La rétrosynthèse de l'intermédiaire **31** est représentée ci-dessous (Rétrosynthèse 3).



Rétrosynthèse 3 : Rétrosynthèse de l'intermédiaire commun **31**.

L'intermédiaire commun 4,6-*O*-benzylidène **31** peut être obtenu par acétalisation régiosélective du galactosyle libre **39** qui peut être préparé facilement à partir du β-D-galactose pentaacétate commercial quel que soit la série. Dans le cas de la série -OAll, l'allylgalactopyranoside **39b** peut être obtenu en une seule étape par glycosylation de Fischer à partir du D-(+)-Galactose.

### 4.1.1 Synthèse de l'allylgalactopyranoside **39b** via la glycosylation de Fischer

L'avantage de la glycosylation de Fischer est que les hydroxyles n'ont pas besoin d'être protégés.

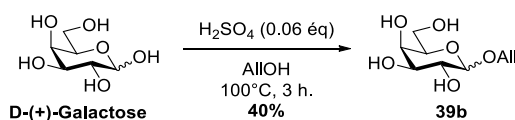


Schéma 22 : Synthèse de l'allylgalactopyranoside **39b** dans les conditions de Fischer

La préparation de l'allylgalactopyranoside **39b** par une glycosylation de Fischer a été réalisée en suivant les conditions décrites par Zhao<sup>179</sup> et Otey<sup>180</sup>. Le D-(+)-Galactose commercial est mis en réaction en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique concentré au reflux de l'alcool allylique. L'alcool allylique joue à la fois le rôle de solvant et de l'accepteur de glycosyle. La réaction est régiosélective mais non stéréospécifique car une fois l'oxocarbénium plan formé dans le milieu, l'attaque de l'alcool allylique est possible aussi bien sur la face α que sur la face β (cf Schéma 8 p.37). Lors du suivi de la réaction sur plaque CCM, la formation des deux anomères et de plusieurs sous-produits est observée. Différents essais de purifications ont été réalisés pour séparer les deux anomères sans succès (Cristallisation, purification sur gel de silice). Finalement,

l'allylgalactopyranoside **39b** a été isolé sous la forme du mélange des deux anomères (ratio non déterminable en RMN) avec un rendement de 40% après purification du gel de silice.

Au vu du faible rendement, des difficultés de purification et de l'impossibilité à séparer les deux anomères, cette voie a été abandonnée. La synthèse de l'allylgalactopyranoside **39b** a été étudiée *via* la *O*-glycosylation du  $\beta$ -D-galactose pentaacétate commercial.

#### 4.1.2 Synthèse du thiophénylgalactopyranoside **39a** et de l'allylgalactopyranoside **39b** *via* la glycosylation du $\beta$ -D-galactose pentaacétate commercial

A partir du  $\beta$ -D-galactose pentaacétate, les étapes de synthèse sont les mêmes en série -SPh et -OAll. La première étape est une glycosylation (*S*-glycosylation en série -SPh et *O*-Glycosylation en série -OAll) et la seconde étape est la déprotection de tous les hydroxyles du sucre. Préparer le thiophénylgalactopyranoside **39a** et l'allylgalactopyranoside **39b** à partir du  $\beta$ -D-galactose pentaacétate permet de s'assurer de la stéréosélectivité de la réaction car la présence du groupement participant acétate en C<sub>2</sub> induit un contrôle 1,2-*trans* lors de la glycosylation (cf Schéma 9 p.38).

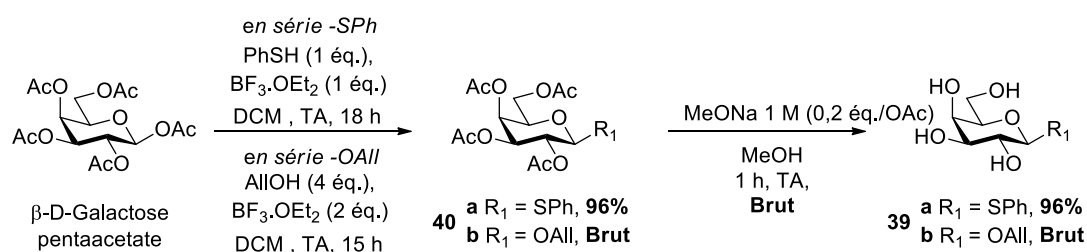


Schéma 23 : Synthèse du thiophénylgalactopyranoside **39a** et de l'allylgalactopyranoside **39b** à partir du  $\beta$ -D-galactose pentaacétate.

Le  $\beta$ -D-galactose pentaacétate commercial est activé par l'éthérate de trifluorure de bore dans le dichlorométhane en présence de thiophénol<sup>181</sup>, en série -SPh, ou en présence de l'alcool allylique<sup>182</sup>, en série -OAll (Schéma 23). Le thiophénylgalactopyranoside acétylé **40a** est précipité dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane. Après filtration et séchage sous vide, le produit **40a** est isolé avec un rendement de 96% et une excellente stéréosélectivité. En série -OAll, l'anomère  $\beta$  majoritaire et des traces de l'anomère  $\alpha$  sont observés dans le brut réactionnel lors de l'analyse RMN. La formation de l'anomère  $\alpha$  s'explique par l'existence minoritaire de l'intermédiaire oxocarbenium, par rapport à l'acétoxocarbenium, après l'activation par le promoteur (cf Schéma 9 p.38). L'allylgalactopyranoside

acétylé **40b** est jugé suffisamment pur pour être engagé dans l'étape suivante sans purification intermédiaire.

La déprotection des hydroxyles a lieu en suivant les conditions de Zemplén. Les galactosyles acétylés **40** sont solubilisés dans le méthanol en présence d'une solution de méthanolate de sodium 1 M dans le MeOH fraîchement préparée<sup>††</sup>. Le milieu réactionnel est neutralisé avec la résine acide Amberlite® IR120. Après filtration et évaporation, le thiophénylgalactopyranoside **39a** est obtenu avec un rendement de 96% et l'allylgalactopyranoside **39b** est isolé avec un rendement quantitatif (*en prenant en compte les traces de l'anomère  $\alpha$  toujours présentes*). Dans les deux séries, les galactosyles **39** sont préparés avec une pureté suffisante pour être engagés sans purification dans l'étape suivante.

A ce stade, les intermédiaires thiophénylgalactopyranoside **39a** et l'allylgalactopyranoside **39b** ont été synthétisés. L'introduction du groupement 4,6-*O*-benzylidène sera l'étape suivante afin de préparer l'intermédiaire commun **31**.

### 4.1.3 Introduction du groupement 4,6-*O*-benzylidène

Avant de présenter les résultats obtenus lors de la formation de l'intermédiaire commun **31**, deux conditions d'introduction du groupement 4,6-*O*-benzylidène seront brièvement présentées dans le prochain paragraphe.

#### 4.1.3.1 Méthodes d'introduction

L'acétal 4,6-benzylidène est classiquement utilisé en glycochimie car il permet la protection simultanée du diol 4,6. Ici, deux méthodes d'introduction de ce groupement seront illustrées (Schéma 24).

---

<sup>††</sup> Les solutions de MeONa sont systématiquement fraîchement préparées par dissolution du sodium dans le méthanol.

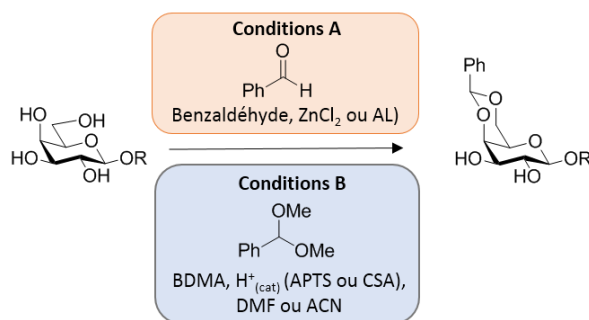


Schéma 24 : Les deux principales méthodes d'introduction de l'acétal 4,6-O-benzylidène benzaldéhyde, ZnCl<sub>2</sub> ou AL (conditions A) et BDMA, catalyse acide (conditions B).

Deux méthodes sont principalement décrites pour introduire le groupement 4,6-*O*-benzylidène : en présence (i) de benzaldéhyde et de ZnCl<sub>2</sub><sup>183</sup> (ou autre acide de Lewis) (Conditions A) ou (ii) de l'acétal diméthyle du benzaldéhyde (BDMA) et d'une catalyse acide (APTS, CSA) dans le diméthylformamide<sup>184</sup> ou l'acétonitrile<sup>185</sup> (Conditions B). Dans les conditions A, de l'eau est libérée dans le milieu lors de la formation de l'acétal rendant la réaction réversible. Pour limiter cet équilibre, le benzaldéhyde est généralement utilisé comme solvant et un desséchant peut également être ajouté au milieu réactionnel pour piéger l'eau formée. Les conditions B sont une alternative intéressante aux conditions précédentes car, en présence de l'acétal diméthyle du benzaldéhyde, le sous-produit de réaction est le méthanol et la réaction d'acétalisation est alors beaucoup moins réversible.

#### 4.1.3.2 Résultats

Plusieurs essais d'acétalisation des galactosyles **39** ont été réalisés en utilisant les conditions précédemment décrites. Trois paramètres ont été étudiés : la nature du réactif (benzaldéhyde et BDMA), de l'acide Lewis (APTS et CSA) et en présence ou non de desséchant.<sup>182,186</sup> Différentes méthodes de purifications ont été utilisées (chromatographie sur gel de silice et recristallisation dans le méthanol). Les conversions et les rendements sont apparus peu reproductibles (25% à 76%). Finalement, la faible reproductibilité a été attribuée à de l'eau résiduelle fortement associée aux galactosyles sous leur forme solide. Finalement, il est indispensable de sécher les galactosyles **39** au moins 24 h au dessiccateur sous vide et en présence de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> afin de pouvoir effectuer l'acétalisation de façon reproductible et avec de bons rendements. Dans les conditions optimales, le diol 4,6 **39** est mis en présence de l'acétal diméthyle du benzaldéhyde (1,8 eq.) et d'acide camphorsulfonique (0,05 eq) dans l'acétonitrile (Schéma 25). En suivant ces conditions, le 4,6-*O*-benzylidènethiophenylgalactopyranoside **31a** et l'allyl 4,6-*O*-benzylidènégalaactopyranoside **31b** ont pu être isolés après recristallisation dans le méthanol avec des rendements respectifs de 91% et 95% (c'est lors de cette étape de cristallisation que l'anomère  $\alpha$  en série -OAll est éliminé).

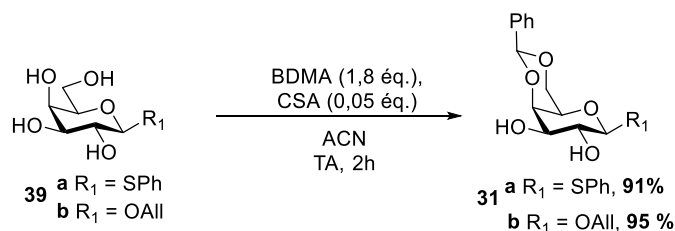


Schéma 25 : Condition optimale pour la formation de l'intermédiaire commun 31 en série SPh et en série OAlI.

En conclusion, l'intermédiaire commun **31** a été préparé en 3 étapes avec un rendement global de 87% en série -SPh et de 95% en série -OAlI. Les deux dernières étapes de synthèse, benzilylation et ouverture réductrice, permettant d'accéder aux unités galactoses **Gal 30** en série -SPh et -OAlI seront présentées dans la partie suivante.

## 4.2 Synthèse des unités galactoses 30 en série -OAlI et -SPh

Avec l'intermédiaire clé **31** entre les mains dans les deux séries, seules deux étapes sont nécessaires pour préparer l'unité **Gal 30** et, comme déjà mentionné précédemment dans le Schéma 21 (cf p.52), la première étape est la protection des hydroxyles libres sous forme d'éther de benzyle.

L'intermédiaire commun **31** est mis en présence d'hydrure de sodium et de bromure de benzyle dans un mélange *N,N*-diméthylformamide/tétrahydrofurane en ratio 1 : 1 (Schéma 26).

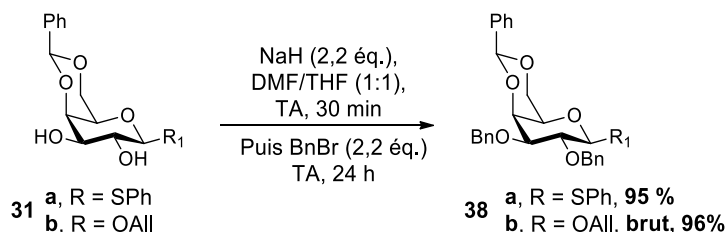


Schéma 26 : Benzilylation en 2 et 3 sur le 4,6-O-benzylidène-thiophényl-galactopyranoside **31a** et l'allyl 4,6-O-benzylidène-galactopyranoside d'allyle **31b**

Après traitement classique (hydrolyse/extraction), le galactopyranoside d'allyle benzylé **38b** est isolé avec un rendement de 96% brut et sa pureté, estimée par RMN, est suffisante pour ne pas nécessiter de purification.

Quant au thiophényl-galactopyranoside benzylé **38a**, il précipite lors du traitement aqueux. Après filtration et séchage sous vide, le thiophényl-galactopyranoside benzylé **38a** pur est isolé avec un rendement de 95%.

L'étape suivante de la synthèse est l'ouverture réductrice régiosélective du 4,6-*O*-benzylidène. Un court rappel bibliographique sur l'ouverture réductrice de cet acétal fera l'objet du prochain paragraphe, avant de présenter nos résultats.

#### 4.2.1 Rappel sur l'ouverture réductrice et sur l'hydrolyse de l'acétal 4,6-*O*-benzylidène

Comme pour tout acétal, les conditions les plus connues pour déprotéger le diol correspondant est l'hydrolyse acide. L'acétal 4,6-*O*-benzylidène peut également subir une ouverture réductrice qui est régiosélective suivant les conditions opératoires (Schéma 27) :

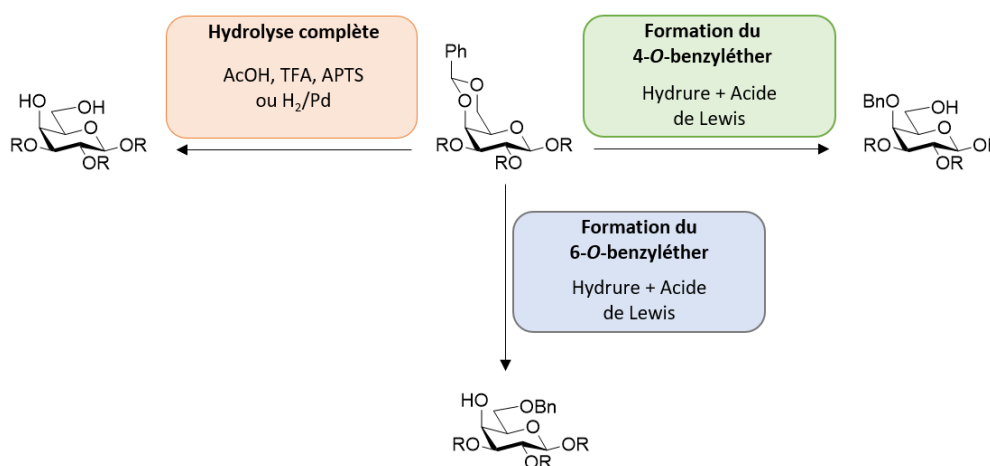


Schéma 27 : Les possibilités de déprotection des hydroxyles 4 et 6 de l'acétal 4,6-*O*-benzylidène.

L'acétal 4,6-*O*-benzylidène peut être hydrolysé en milieu acide en présence d'AcOH<sup>187</sup>, TFA<sup>188</sup> ou APTS<sup>189</sup> afin de libérer le diol 4,6. Comme tous les groupements de types benzyles, il est aussi sensible à l'hydrogénolyse en présence de Pd/C<sup>190</sup> sous atmosphère de dihydrogène pour donner le diol 4,6.

L'ouverture réductrice du groupement 4,6-*O*-benzylidène permet soit de libérer l'hydroxyle 4 en formant le 6-*O*-benzyléther, soit de former le 4-*O*-benzyléther en laissant libre l'hydroxyle 6. Depuis les années 70, les ouvertures réductrices du 4,6-*O*-benzylidène sont de plus en plus illustrées dans la littérature (Figure 16) avec de plus ou moins bonnes régiosélectivités (Figure 17).



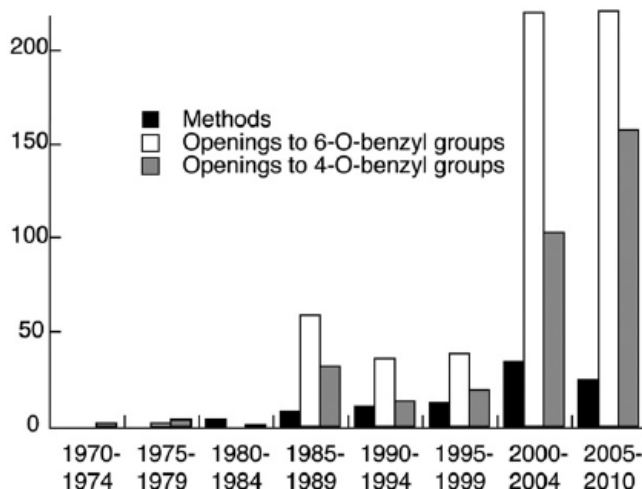


Figure 16 : Articles publiés sur les différentes méthodes développées pour l'ouverture régiosélective de l'acétal 4,6-O-benzylidène (Ohlin et al.<sup>191</sup>).

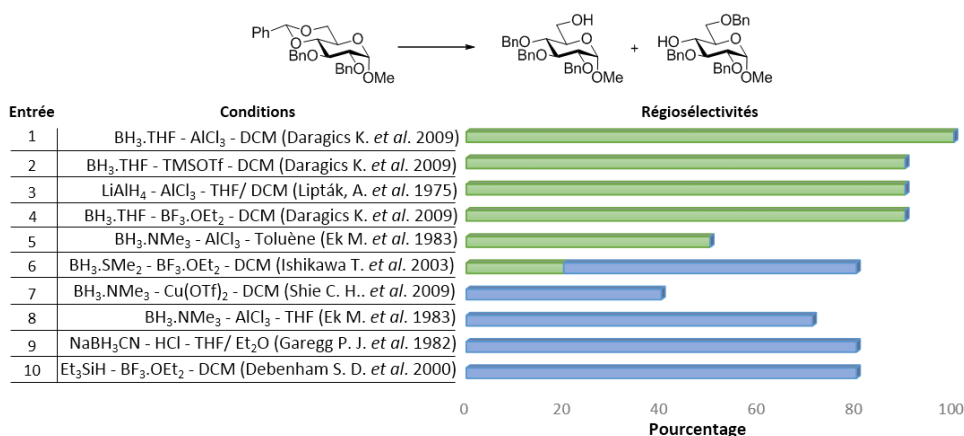


Figure 17 : Régiosélectivité observée pour l'ouverture du méthyle 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-glycopyranoside (adapté de Ohlin et al.<sup>191</sup>).

De manière générale, les ouvertures réductrices ont lieu en présence d'un hydrure et d'un acide de Lewis ou de Brønsted. A titre d'exemple, le régioisomère 4-O-benzyléther peut être préparé dans les conditions LiAlH<sub>4</sub>-AlCl<sub>3</sub> développées par Gorin et Lipták (Figure 17, entrée 3).<sup>192,193</sup> La combinaison NaBH<sub>3</sub>CN/HCl/THF, développée par Garegg, permet de préparer le régioisomère 6-O-benzyléther (Figure 17, entrée 9).<sup>194,195</sup> Dans ces deux exemples, l'utilisation d'un acide de Lewis donne accès au 4-O-benzyléther tandis que le 6-O-benzyléther est obtenu en présence d'un acide de Brønsted. La régiosélectivité serait due à la différence d'encombrement stérique entre l'acide de Lewis et l'acide de Brønsted. Garegg a proposé un mécanisme pour expliquer la différence de régiosélectivité observée en fonction de la nature de l'acide utilisé (Schéma 28).<sup>191</sup>

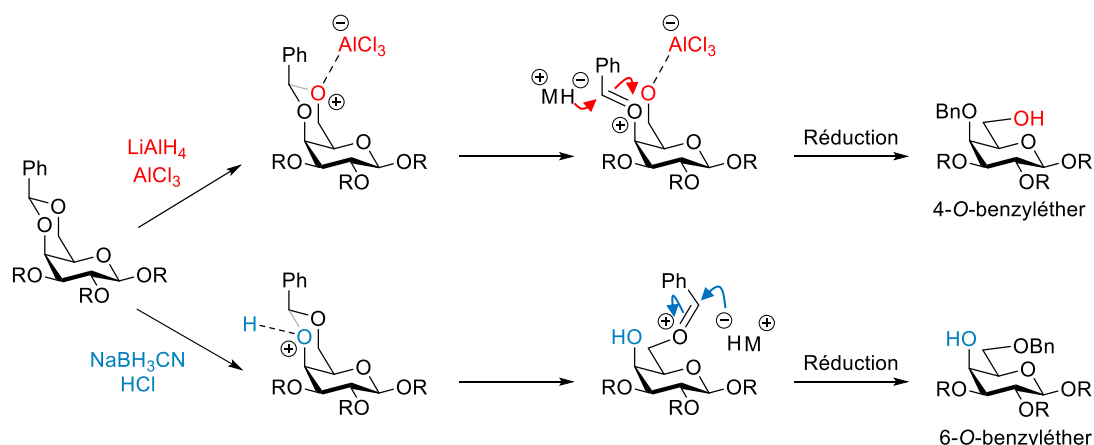


Schéma 28 : Régiosélectivité de l'ouverture réductrice de l'acétal benzyle en présence d'un acide de Lewis (voie rouge) ou d'un acide de Brønsted (voie bleue) (adapté de Ohlin et al.<sup>191</sup>).

L'acide de Lewis,  $\text{AlCl}_3$ , aurait plutôt tendance à se complexer avec l'oxygène en  $\text{C}_6$  moins encombré. L'oxonium formé fragilise la liaison  $\text{Ph-C-O}_6^+$  qui finit par se rompre, et l'hydrure réduit la double liaison. Ainsi, le régioisomère **4-O-benzyléther** est formé et l'hydroxyle 6 est libre. A l'inverse, l'acide de Brønsted,  $\text{HCl}$ , se complexerait avec l' $\text{O}_4$ , légèrement plus basique. Ce qui expliquerait pourquoi le régioisomère **6-O-benzyléther** est formé en présence d'un acide de Brønsted.

L'association de l'hydrure  $\text{BH}_3\cdot\text{NMe}_3$  avec un acide de Lewis comme  $\text{AlCl}_3$  donne des régiosélectivités différentes en fonction du solvant utilisé.<sup>196</sup> Dans le toluène, l'éther **4-O-benzyléther** est formé (Figure 17, entrée 5) tandis que l'éther **6-O-benzyléther** est obtenu dans le THF (Figure 17, entrée 8).-Ellervik a décrit le mécanisme ci-dessous pour expliquer la différence de régiosélectivité observée (Schéma 29).<sup>197</sup>

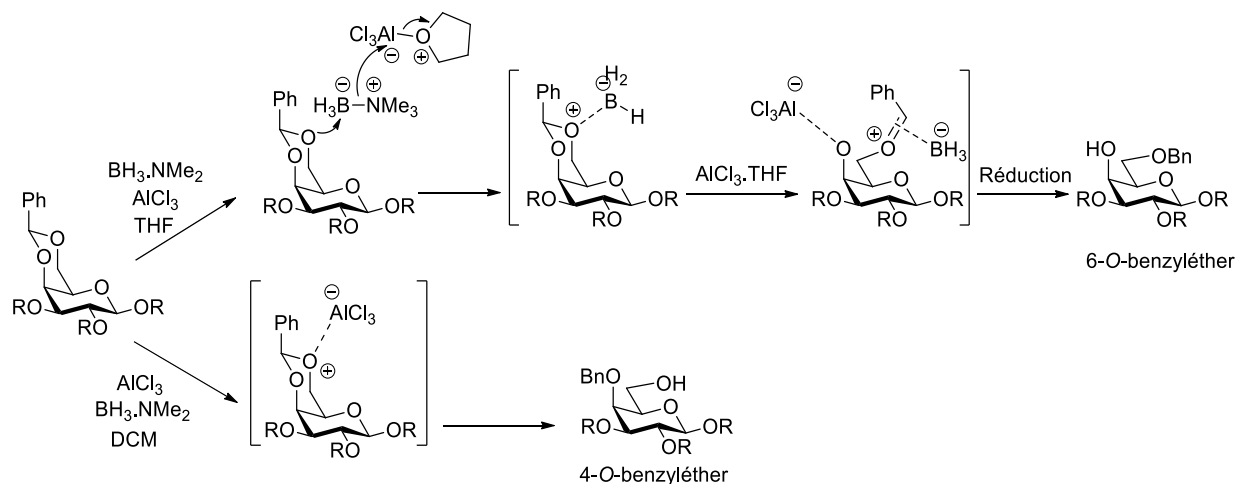


Schéma 29 : Mécanisme réactionnel de l'ouverture réductrice de l'acétal 4,6-O-benzylidène en présence du couple  $\text{BH}_3\cdot\text{NMe}_3/\text{AlCl}_3$  dans le THF (adapté de Ellervik et al.<sup>197</sup>).

Dans le THF, solvant polaire,  $\text{AlCl}_3$  est solvato et son électrophilie est diminuée. L'espèce la plus électrophile du milieu devient le complexe  $\text{BH}_3\cdot\text{NMe}_2$ . L'oxygène en  $\text{C}_6$  vient chélater le complexe

BH<sub>3</sub>.NMe<sub>2</sub> et le dissocie. Ensuite, une deuxième molécule de AlCl<sub>3</sub> chélate l'oxygène en C<sub>4</sub>, rompant ainsi la liaison O<sub>4</sub>-C-Ph. L'hydrure réduit alors l'oxocarbénium pour former le régioisomère 6-O-benzyléther. A contrario, AlCl<sub>3</sub> est l'espèce la plus électrophile dans un solvant apolaire comme le dichlorométhane car il n'est pas solvato et le même mécanisme que celui décrit par Garegg avec AlCl<sub>3</sub>/LiAlH<sub>4</sub> a lieu (Schéma 28, voie bleu). Ce qui explique la formation du 4-O-benzyléther avec la combinaison BH<sub>3</sub>.NMe<sub>2</sub>/AlCl<sub>3</sub> dans le dichlorométhane (Figure 17, entrée 5). Ce mécanisme a été confirmé par RMN du <sup>11</sup>B dans le THF-d<sub>8</sub>. Au cours de la réaction, le pic correspondant au complexe Me<sub>3</sub>N.BH<sub>2</sub> n'est pas observé mais la formation du BH<sub>2</sub> est, elle, constatée. Ces observations RMN sont en accord avec la dissociation du complexe BH<sub>3</sub>.NMe<sub>2</sub> dans les conditions BH<sub>3</sub>.NMe<sub>2</sub>/AlCl<sub>3</sub> dans le THF.

En conclusion, plusieurs conditions sont décrites pour former le 4-O-benzyléther et le 6-O-benzyléther. Les conditions les plus courantes pour préparer le 4-O-benzyléther sont BH<sub>3</sub>.THF/AlCl<sub>3</sub> dans le THF et LiAlH<sub>4</sub>/AlCl<sub>3</sub> dans l'éther (Schéma 30). Pour former le 6-O-benzyléther, les conditions les plus utilisées sont NaCNBH<sub>3</sub>/HCl dans le THF et l'éther, BH<sub>3</sub>.NMe<sub>3</sub>/AlCl<sub>3</sub> dans le THF et Et<sub>3</sub>SiH/AL dans l'éther.

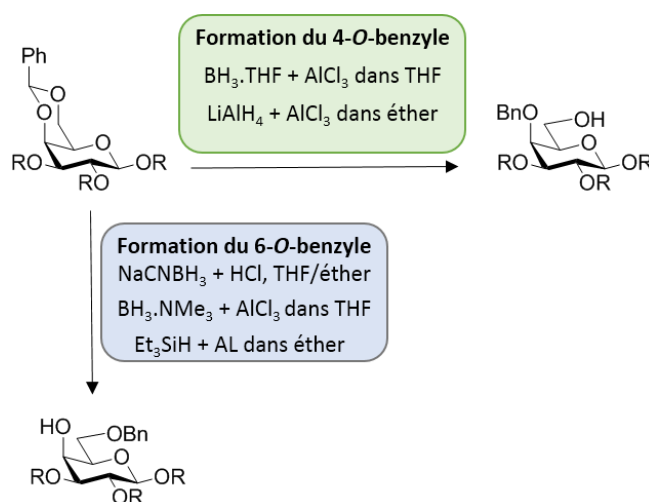


Schéma 30 : Conditions les plus utilisées pour former le 4-O-benzyle et le 6-O-benzyle.

Les méthodes d'ouverture réductrice du 4,6-O-benzylidène ont été revues. Les résultats obtenus lors de l'ouverture réductrice en 4 du thiophénylgalactopyranoside benzylés **38a** et de l'allylgalactopyranoside benzylé **38b** seront présentés dans le prochain paragraphe.

#### 4.2.2 Résultat ouverture réductrice en 4

Les unités galactosyles Gal **30** série -SPh et série -OAll ont l'hydroxyle 4 de libre. La combinaison NaBH<sub>3</sub>CN/HCl/THF a été choisie car elle permet la formation du régioisomère 6-O-benzyléther (Figure 17, entrée 9).<sup>194,198</sup>

L'ouverture réductrice du thiophénylgalactopyranoside benzylé **38a** a lieu en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , d'une solution d'HCl 4 M dans le 1,4-dioxane et de l'orange de méthyle dans le THF (Schéma 31).

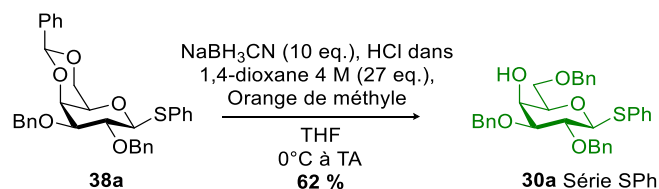


Schéma 31 : Synthèse de l'unité galactosyle **30** en série SPh.

$\text{NaBH}_3\text{CN}$  est introduit dans le milieu en amont de la solution d'acide chlorhydrique. Lors de l'ajout de la solution d'acide, un fort dégagement gazeux, correspondant à  $\text{H}_2$ , est observé. L'ajout de cette solution doit être poursuivi jusqu'à  $\text{pH} \sim 3$ , le  $\text{pH}$  optimal de la réaction.<sup>191</sup> En effet, la première étape du mécanisme de la réaction est la chélation du  $\text{O}_4$  par le proton issu de l'acide de Brønsted (cf Schéma 28 p.60). L'orange de méthyle, aussi nommé hélianthine, permet de contrôler le  $\text{pH}$  du milieu en virant à  $\text{pH} \sim 3/4$ . La réaction mène à unité galactosyle **30a** avec 62% de rendement.

Ces conditions d'ouverture réductrice sont appliquées à l'allyl 4,6-O-benzylidènegalactopyranoside **41**. Curieusement, la formation de l'allylgalactopyranoside **30b** n'est pas observée et seul un mélange complexe de produits de dégradation est obtenu. L'hypothèse émise est que la double liaison de l'allyle n'est pas compatible avec les conditions précédentes. La double liaison pourrait être sensible à la présence d'une quantité importante d'acide.

Les conditions ont donc été revues en diminuant les nombres d'équivalents d'acide et en supprimant l'orange de méthyle dont la fonction acide sulfonique pourrait activer la double liaison et perturber la réaction. De plus, un desséchant a été ajouté dans le milieu afin d'exclure tout risque d'hydrolyse de l'acétal. (Schéma 32).

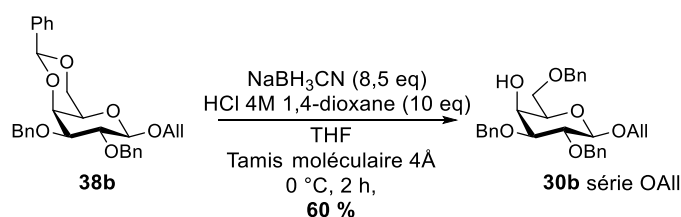


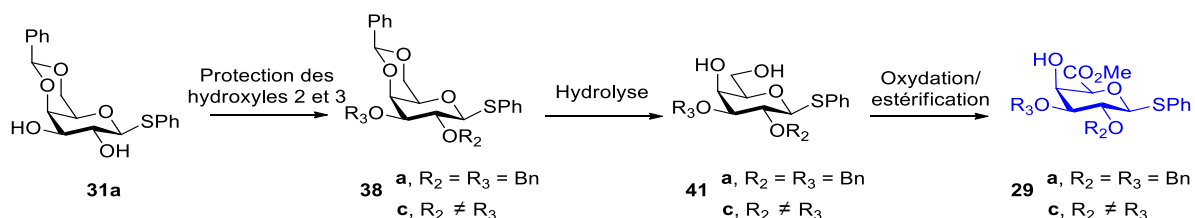
Schéma 32 : Synthèse de l'unité galactosyle **30** en série OAll.

Le nombre d'équivalents de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  est diminué de 10 à 7,8 et celui d' $\text{HCl}$  de 27 à 10. Dans ces conditions, l'unité allylgalactopyranoside **30b** est isolée avec un rendement de 60%

Les deux unités galactosyles **30** série -SPh et série -OAll ont été préparées en 5 étapes avec des rendements globaux respectifs de 51% et 52%. La synthèse de l'unité **GaIA** fera l'objet de la prochaine partie.

## 5 Synthèse de l'unité acide galacturonique GalA 29

L'unité GalA sera obtenue en trois étapes à partir de l'intermédiaire commun **31a** (Schéma 33) : protection des hydroxyles 2 et 3, hydrolyse de l'acétal, oxydation/estérification de l'hydroxyle primaire. L'unité GalA possèdera en anomérique un groupement -SPh stable mais aussi activable en présence du promoteur adéquat lors d'un couplage glycosidique.



*Schéma 33 : Stratégie de synthèse de l'unité GalA*

Les hydroxyles 2 et 3 peuvent être protégés de la même façon. Ainsi, des standards analytiques non sulfatés pourront être préparés. Dans cette optique, l'unité GalA **29A** pourra être obtenue à partir du thiophénylgalactopyranoside benzylés **38a** déjà préparé lors de la synthèse de l'unité Gal **30a** en série \*SPh (cf paragraphe 4 p. 52).

La préparation du trisaccharide uniquement sulfaté en O<sub>2</sub> sur le GalA nécessite que l'unité GalA soit fonctionnalisée différemment sur ses hydroxyles 2 et 3. Lors de la synthèse de l'unité GalA **29c** à partir de l'intermédiaire commun **31a**, il faudra jouer sur la différence de réactivité qui existe entre les hydroxyles 2 et 3 pour les protéger différemment.

Finalement, deux unités GalA seront préparées qui ne varieront que par la nature des groupes protecteurs en 2 et en 3. La première sera l'acide galacturonique **29a** dibenzylé en 2 et 3 et la seconde sera l'acide galacturonique **29c** fonctionnalisé différemment sur les hydroxyles 2 et 3. La synthèse des diols 4,6 **41a** et **41c**, substrats précurseurs des acides galacturoniques **29a** et **29c**, sera détaillée dans le paragraphe suivant.

### 5.1 Synthèse des substrats galactosyles devant subir l'étape d'oxydation à partir de l'intermédiaire commun 31a

La première étape est la protection du diol 2,3 de l'intermédiaire commun **31**. La synthèse du dérivé dibenzylé **38a** a déjà été présentée dans le paragraphe 4 p. 52.

Le thiophénylgalactopyranoside **38c** doit posséder des groupements protecteurs différents sur ses hydroxyles 2 et 3. Les acétals stanniques permettent de jouer sur la différence de réactivité qui

existe entre deux hydroxyles.<sup>199,200</sup> Formés intermédiairement, ils permettent la *O*-alkylation de l'hydroxyle le plus réactif en présence d'un électrophile. Dans le cas d'un hydroxyle axial et d'un équatorial, l'hydroxyle équatorial, plus réactif, est majoritairement protégé. Dans le cas de deux hydroxyles équatoriaux, si l'un a, sur le carbone voisin, un groupement -OR axial alors sa réactivité est légèrement supérieure et il sera majoritairement protégé.<sup>199</sup> Dans le cas du 4,6-*O*-benzylidènegalactopyranoside **31a**, l'hydroxyle 3, ayant le groupe voisin "O<sub>4</sub>-acétal" en axial, sera préférentiellement alkylé. (Schéma 34).

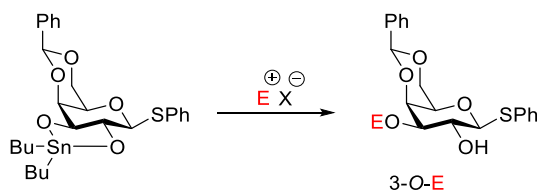


Schéma 34 : *O*-alkylation régiosélective de l'acétal stannique.

Sur l'intermédiaire commun 4,6-*O*-benzylidènegalactopyranoside **31a**, l'hydroxyle 3 sera protégé sélectivement en éther de benzyle en passant par un acétal stannique et un groupement *p*-méthoxybenzyle sera introduit sur l'hydroxyle 2 (Schéma 35).

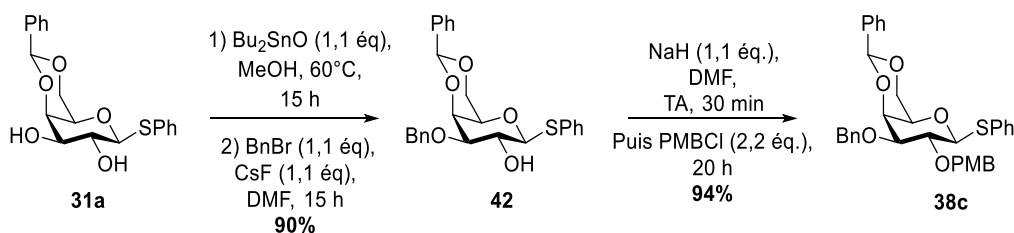


Schéma 35 : Monobenzylation sélective de l'intermédiaire commun **31a** en passant par l'acétal stannique puis insertion du *p*-méthoxybenzyle sur l'hydroxyle 2

Le diol 2,3 **31a** est fonctionnalisé en acétal stannique en présence de l'oxyde de dibutylétain dans le méthanol. Le suivi de la réaction n'est pas simple sur plaque CCM car les acétals stanniques s'hydrolysent en milieu acide. La réaction a donc été laissée sous agitation pendant 15 h pour s'assurer de la formation de l'acétal. Après évaporation, le brut réactionnel est directement introduit en condition de benzoylation sans purification intermédiaire afin d'éviter l'hydrolyse de l'acétal formé sur gel de silice. L'oxygène en 3 est protégé en présence de bromure de benzyle, de fluorure de césium dans le *N,N*-diméthylformamide. Lors du traitement, l'hydrolyse du milieu réactionnel induit la précipitation du produit de benzoylation **42**, qui est isolé par filtration avec un rendement 90%. Ensuite, l'hydroxyle 2 du dérivé monobenzylé **42** est protégé sous forme d'éther de *p*-méthoxybenzyle en présence d'hydrure de sodium et de chlorure de *p*-méthoxybenzyle dans le *N,N*-diméthylformamide.

Le produit **38c** précipite également lors du traitement aqueux et il est isolé avec un rendement de 94% et directement introduit dans la réaction suivante sans purification.

La dernière étape consiste à hydrolyser les acétals **38a** et **38c** dans une solution aqueuse d'acide acétique pour conduire aux diols 4,6 attendus. (Schéma 36).

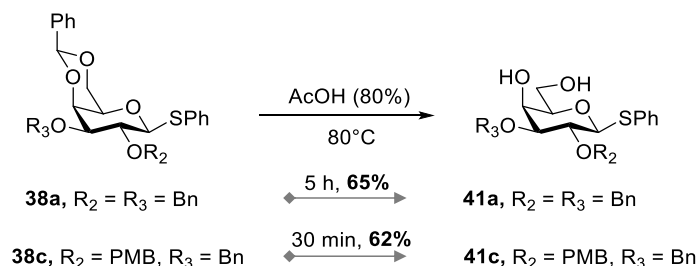


Schéma 36 : Hydrolyse de l'acétale 4,6-O-benzylidène.

L'hydrolyse de l'acétal **38a** demande un temps de réaction à 80°C de 5 h alors que seulement 30 min sont nécessaires pour hydrolyser **38c**. Dans ces conditions, les diols 4,6 **41a** et **41c** sont isolés avec des rendements respectifs de 65% et 62% après purification sur gel de silice.

Les deux substrats précurseurs de l'étape d'oxydation sont maintenant entre nos mains. A partir de l'intermédiaire commun **31a**, le galactosyle dibenzylé **41a** a été préparé avec un rendement global 57% sur 2 étapes, et le galactosyle **41c** a été obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 53%. L'étape suivante sera l'oxydation de l'hydroxyle primaire des diols précurseurs. Avant de détailler cette étape, une petite introduction présentera les méthodes d'oxydation des hydroxyles primaires en acides carboxyliques.

## 5.2 Rappel sur les méthodes d'oxydation

Les conditions d'oxydation d'un hydroxyle primaire en acide carboxylique classiquement utilisées en chimie organique sont applicables en glycochimie. La difficulté est de pouvoir être sélectif de l'hydroxyle primaire à oxyder en présence de groupement fonctionnels sensibles comme un hydroxyle primaire, un atome de soufre ou une liaison glycosidique.

L'hydroxyle primaire est directement oxydable en acide carboxylique en présence de dérivés du chrome tels que le réactif de Jones<sup>201</sup> ou de Collins (PDC) ainsi qu'en présence de TEMPO/diacétate d'iodobenzène (BAIB)<sup>202</sup> ou de TEMPO/NaOCl<sup>203</sup> (Schéma 37).



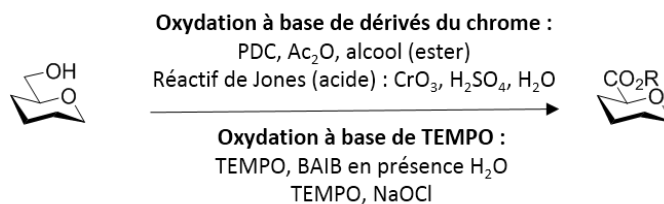


Schéma 37 : Méthodes d'oxydations directes d'un hydroxyle primaire en acide carboxylique.

Le TEMPO présente l'avantage d'oxyder sélectivement un hydroxyle primaire par rapport à un hydroxyle secondaire.<sup>204</sup> Les conditions PDC, Ac<sub>2</sub>O, alcool ont la particularité de générer directement l'ester correspondant à l'alcool (*le réactif*) mis en réaction.<sup>205,206</sup> Par exemple, si le méthanol est utilisé, l'ester méthylique sera formé.

Dans le cas d'un di- ou oligosaccharide, les conditions d'oxydations directes de l'hydroxyle primaire en acide carboxyle sont parfois trop dures pour la ou les liaison(s) glycosidique(s) présente(s). Auquel cas, une oxydation douce et séquentielle (alcool primaire en aldéhyde puis en acide carboxylique) du di- ou de l'oligosaccharide en acide uronique correspondant pourra être préférée (Schéma 38).

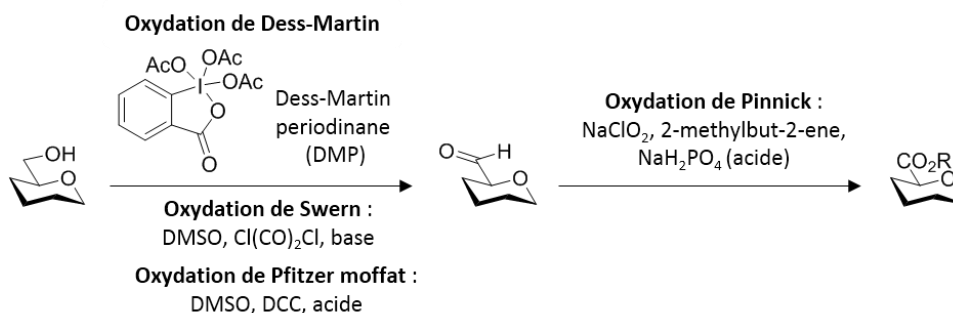


Schéma 38 : Méthodes d'oxydations séquentielles d'un hydroxyle primaire en acide carboxylique en passage par l'aldéhyde.

Des conditions douces à l'instar des oxydations de Swern<sup>207</sup>, Dess-Martin<sup>208</sup> et Pfitzner-Moffat<sup>209</sup> permettent de limiter les réactions secondaires vraisemblablement obtenues avec une oxydation forte à l'image de l'oxydation de Jones. L'aldéhyde formé est généralement converti en acide carboxylique dans les conditions d'oxydation de Pinnick<sup>210</sup>.

En glycochimie, plusieurs exemples de la littérature illustrent l'oxydation sélective de l'hydroxyle primaire en présence de TEMPO/BAIB sur des glycosyles présentant des hydroxyles secondaires libres et/ou des groupements de type thioéther.<sup>211-214</sup> Ces conditions sont les plus adaptées à nos substrats. Nos substrats clés à oxyder (cf Schéma 33 p.64) possèdent un hydroxyle secondaire libre et un groupe thioéther, tous deux susceptibles de s'oxyder. Afin de limiter les difficultés de mise au point de l'oxydation, un substrat modèle le 2,3,4-tri-O-

benzylthiophénylgalactopyranoside **41d** a été envisagé afin de tester les conditions d'oxydation/estérification. La fonction thioéther a volontairement été gardée en compétition avec l'hydroxyle primaire afin de s'assurer de sa compatibilité/ou non avec les conditions d'oxydation. Le substrat modèle **41d** sera facilement préparé en une seule étape par l'ouverture réductrice régiosélective de l'acétal du dérivé dibenzylé **38a** (Schéma 39).

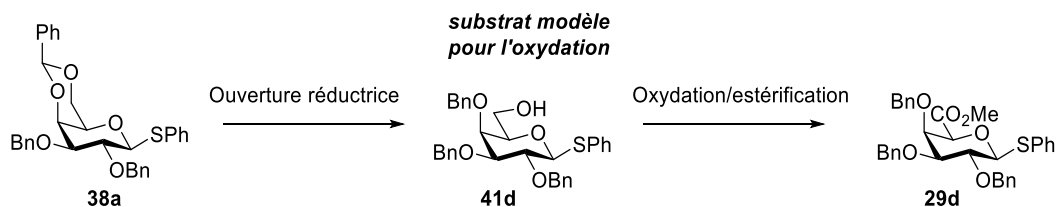


Schéma 39 : Substrat modèle pour l'étape d'oxydation.

L'unité GalA **29d** obtenue sera par ailleurs un glycosyle donneur intéressant pour nos couplages glycosidiques.

La synthèse du substrat modèle et les essais d'oxydation seront présentés dans le prochain paragraphe.

### 5.3 Synthèse du substrat modèle et oxydation

Lors de la première étape, qui est l'ouverture réductrice du 4,6-*O*-benzylidène, le couple acide de Lewis/hydrure est à choisir en fonction de la régiosélectivité souhaitée (cf paragraphe 4.2.1 p. 58). L'ouverture réductrice de l'acétal **38a** a lieu en présence de triflate de cuivre II et du complexe BH<sub>3</sub>.THF en solution dans le THF (cf Figure 17, entrée 3 p.59).<sup>215</sup> Après purification, le substrat modèle **41d** est isolé avec un rendement de 83% (Schéma 40).

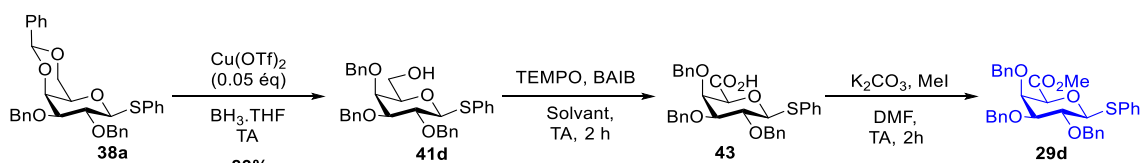


Schéma 40 : Synthèse de l'ester tribenzyle **29d**.

Les essais d'oxydation/estérification du substrat modèle **41d** sont regroupés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Essais d'optimisation du substrat modèle **41d**.

Essai	Oxydation (eq.) (2,5 eq. BAIB, 0,2 eq. TEMPO)			Estérification (eq.) (eq., eq., DMF)			Rdts Isolé (oxydation/ estérification)
	AcOH	Solvant	Rdt isolé ( <b>43</b> )	MeI	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Rdt isolé ( <b>29d</b> )	
1	---	DCM/H <sub>2</sub> O	42%			---	---
2	---	---	---	2,5	5	63%	26%
3	---	DCM/H <sub>2</sub> O/tBuOH	---	2,5	5	---	38%
4	2	DCM/H <sub>2</sub> O/tBuOH	50%			---	
5	<b>2</b>	<b>DCM/H<sub>2</sub>O/tBuOH</b>	---	<b>2,5</b>	<b>5</b>	---	<b>57%</b>
6	2	DCM/H <sub>2</sub> O/ACN	---	2,5	5	---	29%

En glycochimie, les réactions d'oxydation de l'hydroxyle primaire en acide carboxylique avec le couple BAIB/TEMPO ont généralement lieu dans les conditions suivantes : BAIB (2,5 eq), TEMPO (0,2 eq) dans un mélange dichlorométhane/eau au ratio 2 : 1.<sup>211-213,216</sup> Appliquées au substrat modèle **41d**, ces conditions ont permis d'isoler l'acide **43** attendu avec un rendement de 42% après purification sur gel de silice (Tableau 4, entrée 1). L'acide **43** est estérifié en présence d'iodure de méthane et de carbonate de potassium dans le DMF avec un rendement correct de 63% (Tableau 4, entrée 2). L'ester tribenzyle **29d** est donc obtenu avec un rendement de 28% sur les étapes d'oxydation et d'estérification. Si le rendement obtenu lors de l'étape d'estérification est satisfaisant, les 42% de l'étape d'oxydation peuvent être améliorés.

Les conditions de solvant DCM/eau (2 : 1) utilisées induisent un milieu biphasique pouvant être défavorable à la réactivité. Afin d'améliorer l'homogénéité du milieu, le terbutanol est ajouté au mélange précédent dans les proportions suivantes : DCM/H<sub>2</sub>O/tBuOH 1 : 1 : 0,5 (Tableau 4, entrée 3).<sup>217</sup> Il a également été choisi dans cet essai de ne pas purifier l'acide et d'effectuer l'estérification sur le brut réactionnel. L'ester tribenzylé **29d** est alors obtenu avec 38% de rendement qui offre donc une amélioration de 10% comparativement au rendement combiné de 26% obtenu précédemment (entrées 1 et 2). En deuxième optimisation, deux équivalents d'acide acétique sont ajoutés pour faciliter l'initiation de la réaction d'oxydation en permettant la catalyse de la dismutation du TEMPO. Afin de juger de l'efficacité de cette modification, l'acide a été purifié intermédiairement et le rendement obtenu est amélioré de 42 à 50% (entrée 4). Lorsque ces mêmes conditions sont appliquées sans purification intermédiaire de l'acide (entrée 5), le rendement de l'ester tribenzyle **29d** est optimisé de 38% à 57%. Dans l'idée d'améliorer davantage l'homogénéité du milieu le terbutanol a été remplacé par l'acétonitrile mais cette modification entraîne une chute du rendement (de 57% à 29% - entrée 6).

En conclusion, l'étape d'oxydation est améliorée par l'addition de terbutanol et d'acide acétique. Compte tenu des difficultés de purification intrinsèques "liées" aux acides carboxyliques, il

semble plus judicieux de ne pas purifier l'acide carboxylique avant l'étape d'estérification, d'autant plus que les rendements isolés de l'ester **29d** sont plus faibles lorsque l'acide est purifié. Les conditions d'oxydation optimales sont donc en présence de BAIB (2,5 éq.), TEMPO (0,2 éq.), AcOH (2 éq.) dans un mélange DCM/H<sub>2</sub>O/tBuOH au ratio 1 : 1 : 0.5 à température ambiante pendant 2 h. L'estérification a lieu en présence d'iodure de méthyle (2,5 éq.), et de carbonate de potassium (5,0 éq.) dans le DMF, à température ambiante pendant 1 h. Ces conditions ont permis d'obtenir l'ester tribenzyle **29d** avec un rendement de 57%.

Ces conditions optimisées d'oxydation et d'estérification ont ensuite été appliquées aux diols 4,6 **41a** et **41c** (Schéma 41).

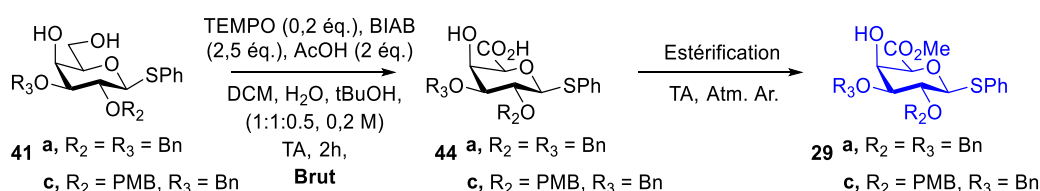


Schéma 41 : Synthèse des unités acides galacturoniques **29a** et **29c**.

A chaque essai d'oxydation, que ce soit sur **41a** ou **41c**, les bruts réactionnels, analysés par RMN, montrent une conversion totale, peu d'impuretés et la masse de brut obtenue est en accord avec les masses attendues. Les acides **44a** et **44c** ne sont donc pas purifiés avant l'étape d'estérification. Les optimisations réalisées sur l'étape d'estérification sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Essais d'estérification des acides **44a** et **44c**.

Entrée	Acide brut engagé	Agent de méthylation	Base	solvant	Temps	Rdts
1	<b>44a</b>	MeI (2.5 eq.)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5 eq.)	DMF	1 h	10% ( <b>29a</b> )
2	<b>44a</b>	Me <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,4 eq.)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 eq.)	Acétone	15 h	33% ( <b>29a</b> )
3	<b>44a</b>	CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> OMe (1,4 eq.)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 eq.)	Acétone	15 h	38% ( <b>29a</b> )
4	<b>44a</b>	TMSCHN <sub>2</sub> (6 eq.)	---	MeOH/THF	1 h	18% ( <b>29a</b> )
5	<b>44c</b>	CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> OMe (1,4 eq.)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2 eq.)	Acétone	15 h	42% ( <b>29c</b> )

L'acide **44a** intermédiairement obtenu est estérifié, dans les mêmes conditions que précédemment, en présence de MeI (2.5 éq.) et de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 éq.) avec un rendement très faible de 10%

(Tableau 5, entrée 1). Trois autres agents de méthylations ont été testés : le sulfate de diméthyle<sup>218</sup> (Tableau 5, entrée 2), le méthyle triflate (Tableau 5, entrée 3) et triméthylsilyldiazométhane<sup>219</sup> (Tableau 5, entrée 4). Le meilleur rendement est obtenu en présence de 1,4 éq. méthyle triflate et de 2 éq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans l'acétone à température ambiante pendant 15 h, conditions dans lesquelles l'ester **29a** est isolé avec 38% à partir du diol **41a**.

Ces nouvelles conditions ont été utilisées pour préparer le **GalA 29c**. Ce dernier a pu être isolé avec un rendement de 42% à partir du diol **41c** (Tableau 5, entrée 5).

En conclusion, les trois monomères **GalA 29** et deux monomères **Gal 30** ont été préparés (Figure 18).

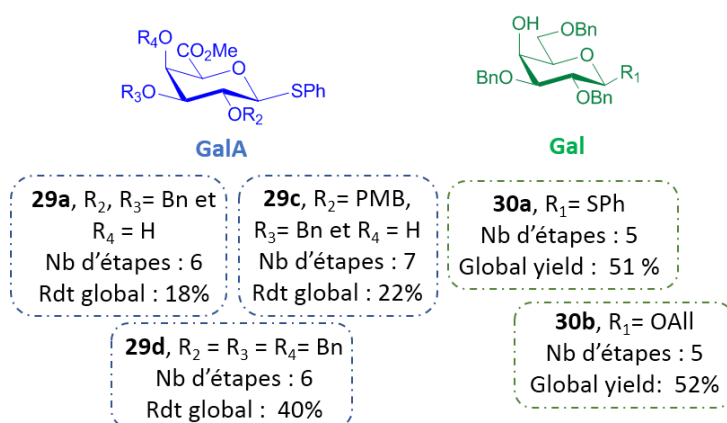
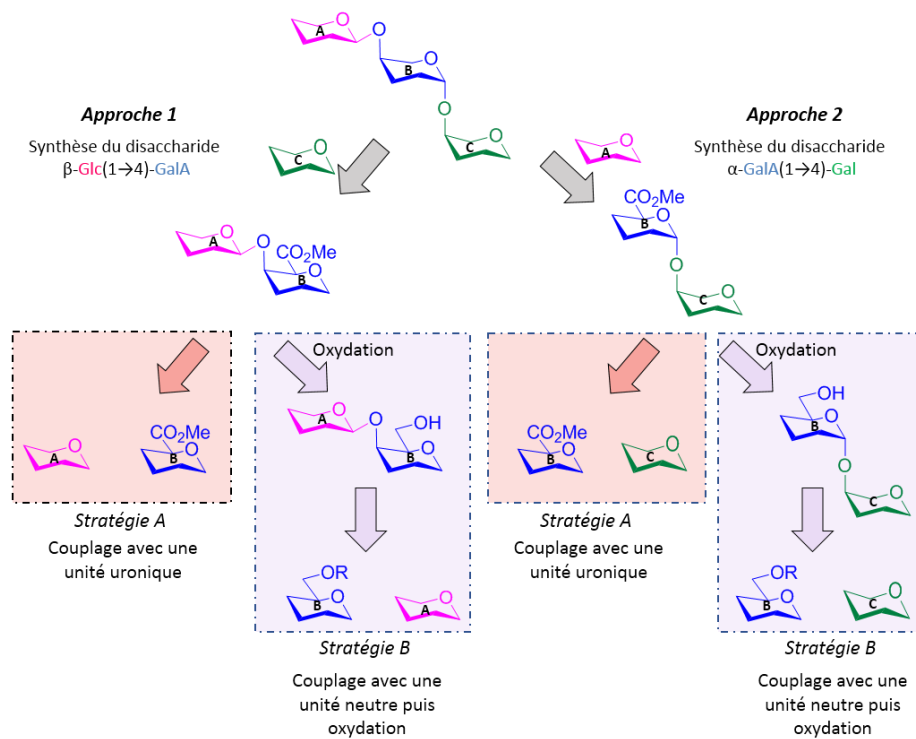


Figure 18 : Les monomères **GalA 28A** et **Gal 30** synthétisés.

L'unité **GalA 29a** dibenzylée est obtenue en 6 étapes avec un rendement global de 18% tandis que 7 étapes sont nécessaires pour synthétiser l'unité **GalA 29c** avec 21% de rendement global. Le **GalA 29c**, avec son jeu de protections différentes en 2 et 3, sera un substrat clé pour accéder au trisaccharide sulfaté. Une autre unité **GalA** a également été préparée. C'est l'unité tribenzylée **GalA 29d** qui sera utilisée comme partenaire modèle lors de l'optimisation des glycosylations impliquant des unités uroniques. L'unité **Gal** a été obtenue en série –SPh **30a** et –OAll **30b** avec des rendements globaux respectifs de 51% et 52% sur 5 étapes. Les réactions de glycosylations seront présentées dans la prochaine partie.

## 6 Couplage glycosidique

Pour synthétiser le trisaccharide (Rétrosynthèse 4) deux approches sont envisageables suivant quel disaccharide intermédiaire est tout d'abord synthétisé.



*Rétrosynthèse 4 : Voies rétrosynthétiques du trisaccharide ciblé en passant la synthèse du disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA ou du disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal. Deux stratégies possibles pour la synthèse des disaccharides : couplage direct avec une unité uronique (Stratégie A) ou couplage avec une unité neutre puis oxydation (Stratégie B).*

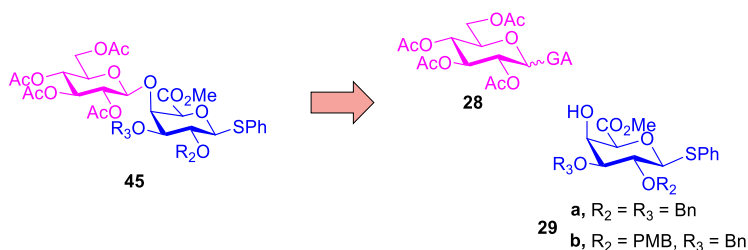
L'approche 1 passe par la synthèse du disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA tandis que l'approche 2 implique la préparation du disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal. Dans les deux cas, le disaccharide acide intermédiaire peut être obtenu suivant deux stratégies : soit le couplage glycosidique est directement effectué en présence d'un glycosyle uronique (Stratégie A : Couplage direct avec une unité uronique), soit le couplage est réalisé entre deux glycosyles neutres et l'étape d'oxydation est postérieure au couplage (Stratégie B : Couplage avec une unité neutre puis oxydation). La seconde stratégie nécessite plus d'étapes que la stratégie A mais elle sera une bonne alternative au cas où l'unité GalA est peu réactive. En effet, la présence de l'ester en C<sub>5</sub> de l'unité GalA diminue la réactivité du glycosyle, ce qui peut nuire à la performance de la glycosylation (cf paragraphe 2.5 p.47). La préparation de l'unité Glc 28 et des glycosyles neutres impliqués dans les couplages ainsi que les résultats obtenus lors des glycosylations seront développés dans les prochains paragraphes.

## 6.1 Synthèse du disaccharide $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA

La synthèse du disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA a été étudiée à travers les deux stratégies ; c'est-à-dire, le couplage direct avec l'unité uronique GalA (Rétrosynthèse 4, Stratégie A) et le couplage entre les glycosyles neutres suivi de l'étape d'oxydation (Rétrosynthèse 4, Stratégie B). Ces deux stratégies seront présentées dans deux parties distinctes.

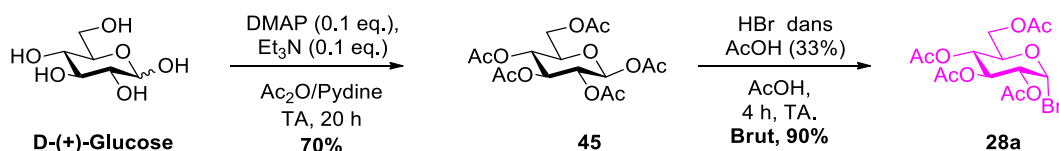
### 6.1.1 Stratégie A : le couplage direct avec l'unité uronique GalA 29

En suivant la stratégie A, le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA **45** sera obtenu après la glycosylation entre l'unité Glc **28** et l'unité GalA **29** (Rétrosynthèse 5).



*Rétrosynthèse 5 : Accès au disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA par le couplage direct avec l'unité GalA.*

Parmi les unités GalA synthétisées (cf paragraphe 5 p.64), les unités GalA **29a** et **29c** dont l'hydroxyle 4 est libre seront impliquées dans le couplage. La stratégie de synthèse de l'unité Glc a déjà été mentionnée (cf paragraphe 3 p.49). L'unité Glc étant d'anométrie  $\beta$  dans le disaccharide, un groupement participant est à introduire en C<sub>2</sub> pour assurer la stéréosélectivité 1,2-*trans* lors du couplage glycosidique. Un groupement de type acétate a été choisi et il sera introduit sur tous les hydroxyles du D-(+)-Glucose commerciale par peracétylation. Le groupement activant « Br » est préféré à l'acétate car il est connu pour être plus réactif. Le bromure de glucosyle **28a** est préparé en deux étapes à partir du D-(+)-Glucose commercial (Schéma 42).



*Schéma 42 : Synthèse du bromure de glucosyle **28a**.*

Le D-(+)-glucose commercial est peracétylé en présence de DMAP et de triéthylamine dans un mélange anhydride acétique/pyridine au ratio 1 : 2. Le glucopyranoside peracétylé **45** est recristallisé

dans le méthanol pour être isolé pur avec 70% de rendement. La bromation en position anomérique a lieu en présence d'une solution commerciale d'acide bromohydrique dans l'acide acétique avec 90% de rendement. Le bromure de glucosyle **28a** est jugé suffisamment pur pour être engagé dans l'étape de glycosylation sans purification intermédiaire.

Avec son hydroxyle 4 libre, l'unité **GalA 29** jouera le rôle d'accepteur de glycosyle (nucléophile). Néanmoins, cette unité est un substrat élaboré et précieux, obtenu avec un rendement global modeste (~20%/6 à 7 étapes). Le **GalA 29** est désactivé par son ester en C<sub>5</sub>, ce qui diminuera forcément la réactivité du couplage. C'est pourquoi l'unité **GalA 29** a été remplacée par l'unité **Gal 30a** qui a également son hydroxyle 4 libre. Cela permettra de s'assurer que la glycosylation entre l'unité bromure de glucosyle **28a** et un accepteur neutre de type thiophénylgalactopyranoside est possible. La synthèse de l'unité **Gal 30a** a déjà été présentée (cf paragraphe 4 p.49). L'unité **Gal 30a** a été préparée avec un rendement global correct de 51% sur 6 étapes à partir du β-D-galactose pentaacétate commercial sur une échelle supérieure à 10 g.

Les bromures de glycosyles sont classiquement activables en présence de sels d'argent ou de mercure (cf Schéma 12 p.41). Le couplage entre les deux partenaires **28a** et **30a** est tout d'abord testé en présence de sels d'argent.<sup>220</sup> Les deux partenaires **28a** et **30a** sont mis en solution dans le dichlorométhane à -50°C, en présence de tamis moléculaires. Le AgOTf est introduit à cette température, avant de laisser le milieu réactionnel remonter progressivement jusqu'à -5°C.

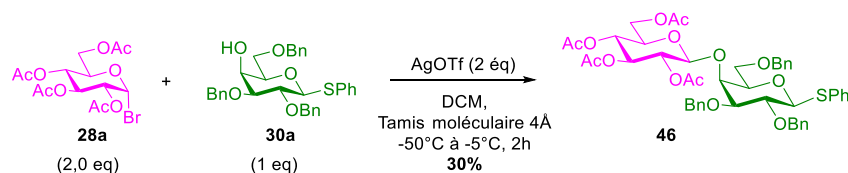


Schéma 43 : Couplage glycosidique modèle.

Après 2 h de réaction, le donneur n'est plus visible sur plaque CCM, mais plusieurs produits sont observés. Le milieu est neutralisé à -5°C et le disaccharide **46** attendu est isolé avec un rendement de 30% après purification. Un autre essai a été réalisé en présence de 2 équivalents Hg(CN)<sub>2</sub> mais aucune conversion n'a été observée malgré un temps de réaction plus long (18h).

Le couplage avec un donneur de glycosyle de type thiophénylgalactopyranoside et l'accepteur de glycosyle **28a** semble fonctionner même si le rendement est modeste. Avant d'optimiser les conditions, le couplage a été réalisé avec les partenaires **GalA 29a et 29c** afin de vérifier si l'unité uronique est suffisamment réactive avec le bromure de glucosyle **28a**.



Le bromure de glucosyle **28a** est mis en réaction avec l'accepteur de glycosyle GalA **29a** ou GalA **29c** en présence de AgOTf et de tamis moléculaire dans le dichlorométhane.

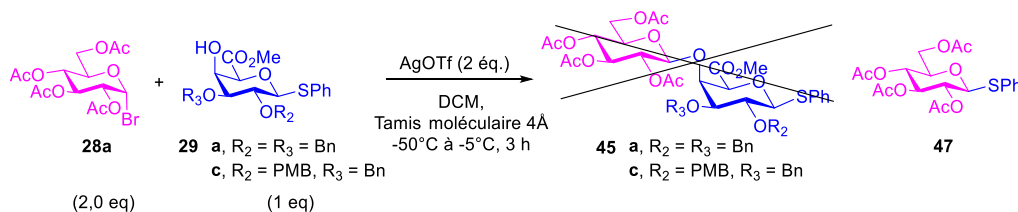


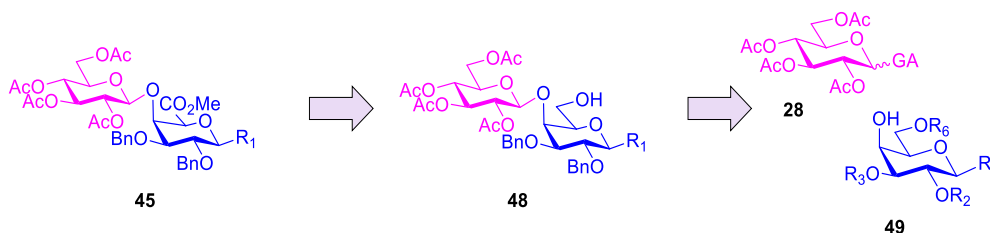
Schéma 44 : Couplage glycosidique entre le bromure de glucosyle **28a** et les unités GalA **29**.

Les disaccharides **45a** et **45c** attendus n'ont pas été obtenus. La formation de plusieurs produits a été observée lors du suivi CCM. Seul le thiophénylglucopyranoside **47** a été identifié dans les deux cas de couplages. Ce résultat peut être expliqué par la faible réactivité des esters **29a** et **29c** qui laisse le temps à des réactions secondaires d'avoir lieu. Le sous-produit **47** est le résultat d'un transfert d'aglycone. Ce type de sous-produit a été observé par Kihlberg lors d'un couplage entre un bromure de rhamnopyranosyle et un thiorhamnopyranoside.<sup>221</sup>

En conclusion, avoir un groupement activant « -SPh » et une fonction ester en C<sub>5</sub> de l'accepteur de glycosyle ne semble pas compatible avec un donneur de glycosyle de type bromure de glycosyle. Cette première stratégie a été rapidement abandonnée en faveur de la seconde qui implique le couplage d'unités galactosyles neutres suivi de l'étape d'oxydation (Rétrosynthèse 4, stratégie B).

### 6.1.2 Stratégie B: Glycosylation avec un analogue neutre de l'accepteur GalA

La rétrosynthèse illustrant la préparation du disaccharide β-Glc(1→4)-GalA **45** suivant la seconde stratégie est illustrée ci-dessous (Rétrosynthèse 6).



Rétrosynthèse 6 : Accès au disaccharide β-Glc(1→4)-GalA par couplage avec une unité neutre puis oxydation.

Le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA sera obtenu après l'oxydation/estérification du disaccharide **48**. Ce dernier proviendra du disaccharide protégé correspondant issu du couplage glycosidique entre l'unité Glc **28** et un galactosyle neutre **49**.

L'accepteur de glycosyle neutre devra respecter trois critères. Son hydroxyle 4 doit être libre afin d'être impliqué dans la glycosylation. Son hydroxyle primaire est à protéger par un groupement protecteur de façon orthogonale aux autres hydroxyles de sorte qu'il soit déprotégé sélectivement. Un groupement R<sub>1</sub> différent de -Sph est à envisager pour éviter les risques de transferts d'aglycone observés précédemment. L'allylgalactopyranoside **49** remplit tous ces critères. Il est facilement préparé en deux étapes à partir de l'allylgalactopyranoside benzylé **38b** (Schéma 45) dont la synthèse a déjà été décrite en 4 étapes avec un rendement global de 91% sur des quantités supérieures à 10 g (cf paragraphe 4 p.52).

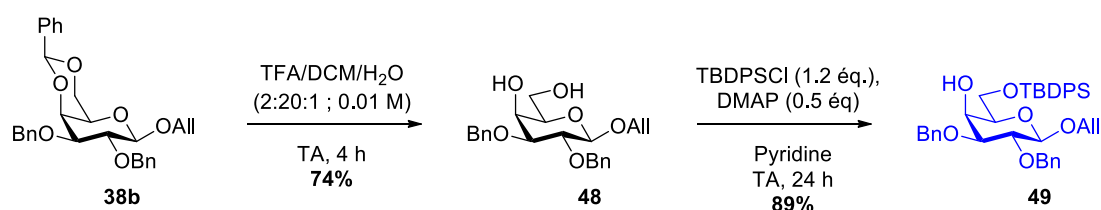


Schéma 45 : Synthèse de l'accepteur de glycosyle neutre **49**.

L'acétal **38b** est hydrolysé dans le mélange TFA/DCM/H<sub>2</sub>O au ratio 2 : 20 : 1. Le diol 4,6 **48** est isolé avec un rendement de 74% et son hydroxyle primaire est fonctionnalisé en éther silylé en présence du chlorure de terbutyldiphénylsilane et DMAP dans la pyridine avec un rendement de 89%.

Afin de limiter les risques de transfert d'aglycone, le bromure de glucosyle **28a** est remplacé par le dérivé trichloroacétimide **28b** obtenu en deux étapes à partir du glucose peracétylé **45** (Schéma 46).

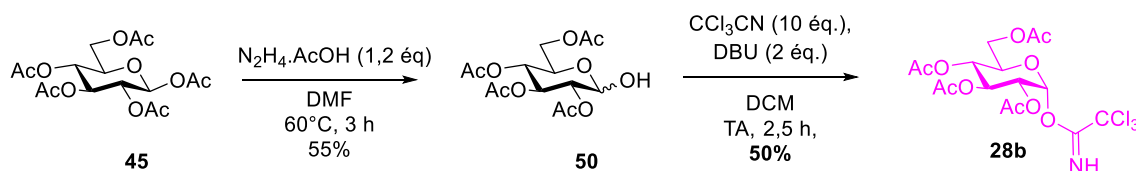


Schéma 46 : Préparation du donneur trichloroacétimide **28b**.

De nombreuses conditions existent pour libérer l'hydroxyle anomérique d'un glycosyle peracétylé comme en présence de chlorure de fer III<sup>222</sup>, de benzylamine<sup>223</sup>, d'imidazole<sup>224</sup> ou d'hydrazine acétate<sup>225</sup>. Un essai a été réalisé en présence de benzylamine.<sup>226</sup> Même si la réaction est

totale, le produit attendu **50** a toujours été isolé en mélange avec la benzylamine résiduelle. Finalement, le produit désacétylé **50** est préparé en présence d'hydrazine acétate dans le DMF avec un rendement de 55%.<sup>227</sup> Le groupement trichloroacétimide est introduit de façon stéréosélective sur l'hydroxyle libéré. La réaction est dite stéréosélective car en utilisant une base tel que  $K_2CO_3$ , le produit cinétique d'anomérie  $\beta$  est formé tandis que le produit thermodynamique d'anomérie  $\alpha$  est synthétisé en utilisant les bases DBU ou NaH.<sup>228</sup> La glycosylation suit généralement un mécanisme de type  $S_N2$  ou  $S_N2$ -like avec des donneurs de glycosyle de type trichloroacétimide. Le choix de l'anomère trichloroacétimide à former dépend donc de l'anomérie de la liaison glycosidique qui sera créé après le couplage. Ici, l'anomère  $\alpha$  **28b** est préparé même si la stéréochimie de la glycosylation est assurée par le groupement participant en C<sub>2</sub>. L'anomère  $\alpha$  **28b** est obtenu en présence de trichloroacétonitrile et de DBU dans le dichlorométhane avec un rendement de 50%. Ce rendement moyen est dû aux difficultés rencontrées lors de la purification.

Le donneur de glycosyle trichloroacétimide **28b** et l'accepteur de glycosyle **49** sont mis en réaction en présence du triflate de triméthylsilyle (TMSOTf) et de tamis moléculaire dans le dichlorométhane (Schéma 47).<sup>226</sup>

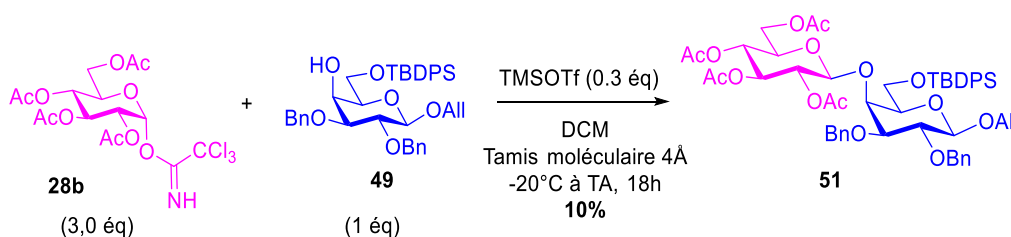


Schéma 47 : Préparation du disaccharide **51** avec le donneur trichloroacétimide **28b**.

TMSOTf doit être introduit à -20°C, et le milieu réactionnel est maintenu à cette température pendant 3 h puis il est remonté progressivement à température ambiante. Lors du suivi CCM, une très faible conversion est observée. A l'issue de cette réaction, le disaccharide attendu est isolé avec un très faible rendement de 10%. Le couplage est à optimiser afin d'améliorer le rendement du disaccharide **51**. Plutôt que de moduler les conditions d'acide de Lewis, nous avons préféré poursuivre l'étude avec le dérivé *N*-phényltrifluoroacétimide **28c** étant donné que le donneur de glycosyle trichloroacétimide **28b** est isolé avec un modeste rendement (50%).

Le donneur de glycosyle *N*-phényltrifluoroacétimide **28c** est synthétisé en présence du chlorure de *N*-phényl trifluoroacétimidoyl et de  $K_2CO_3$  avec un très bon rendement de 89%.

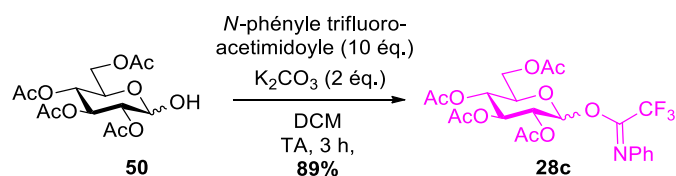


Schéma 48 : Préparation du donneur *N*-phényltrifluoroacétimide **28c**.

Un nouvel essai de synthèse du disaccharide **51** est réalisé avec le donneur *N*-phényltrifluoroacétimide **28b** dans les conditions précédentes (Schéma 49).

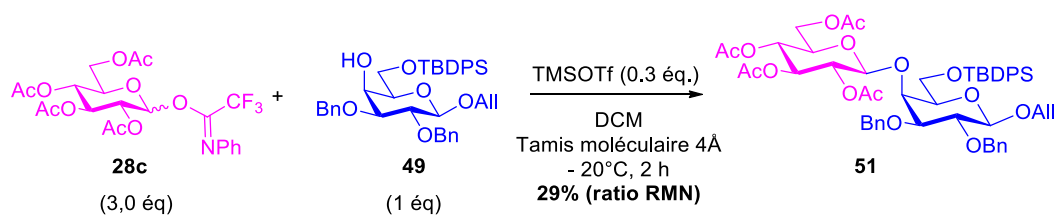


Schéma 49 : Préparation du disaccharide **51** avec le donneur *N*-phényltrifluoroacétimide **28c**.

Le donneur *N*-phényltrifluoroacétimide **28c** est mis en réaction en présence du triflate de triméthylsilyle (TMSOTf) et de tamis moléculaire dans dichlorométhane. Par rapport au couplage avec l'accepteur trichloroacétimide **28a**, une meilleure conversion est observée lors du suivi CCM. Toutefois, la conversion n'était toujours pas totale et le disaccharide attendu **51** a été isolé en mélange avec l'allylgalactopyranoside **49** avec un rendement de 35%, satisfaisant pour une première tentative. Des optimisations sont à prévoir pour améliorer de rendement et la purification du produit de couplage **51**.

Le mélange obtenu lors du couplage est introduit dans l'étape suivante afin de libérer l'hydroxyle primaire (Schéma 50).

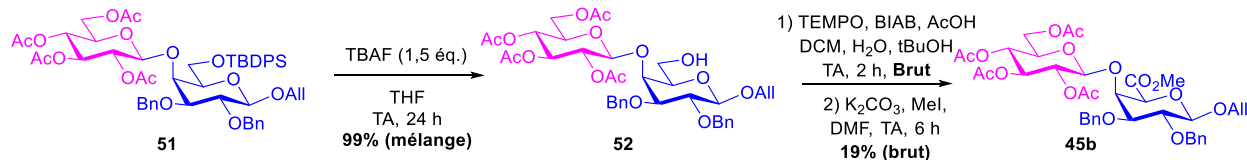


Schéma 50 : Libération et oxydation/estérification de l'hydroxyle primaire du disaccharide **51**.

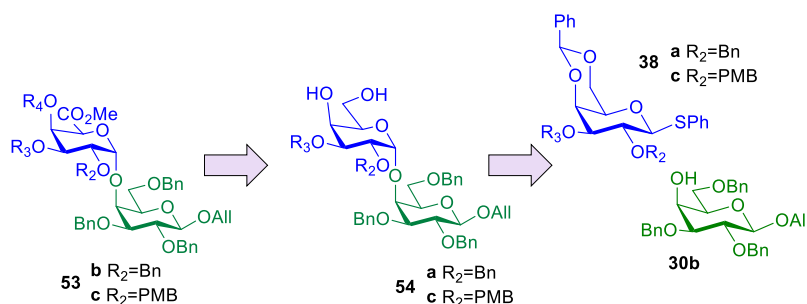
L'hydroxyle primaire est libéré en présence d'une solution de TBAF à 1 M dans le THF (Schéma 50). Après purification, le produit **52** est isolé en mélange avec un sous-produit issu de l'allylgalactopyranoside **49**. La dernière étape est l'oxydation/estérification de l'hydroxyle primaire. Cette étape est réalisée dans les conditions optimisées pour synthétiser l'ester tribenzyle **28d** (cf paragraphe 5.3 p.68). Le disaccharide **52** est oxydé en présence de BAIB (2,5 équivalents), TEMPO (0,2 équivalent) et

AcOH (2 éq) dans un mélange DCM/H<sub>2</sub>O/tBuOH au ratio 1 : 1 : 0,5 et l'estérification a lieu en présence d'iodure de méthyle (2,5 éq.) et de carbonate de potassium (5,0 éq.) dans le DMF. Le brut réactionnel du disaccharide final **45b** est isolé avec 19% de rendement. Le disaccharide **45b** n'a pas été purifié car une faible quantité a été isolée.

Pour le moment, la glycosylation avec un accepteur de glycosyle neutre, qui induit une étape d'oxydation postérieure au couplage, est la stratégie la plus prometteuse pour préparer le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA **45**. Peu d'essais ont pu être réalisés avec l'accepteur de glycosyle *N*-phényltrifluoroacétimide **28c**. Le couplage est à améliorer afin d'isoler le disaccharide **51** pur. Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre les essais de glycosylation direct avec l'unité GalA **29** afin d'isoler le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA **45** plus rapidement. Une fois le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA **45** isolé, le couplage avec l'unité Gal permettra d'avoir le trisaccharide ciblé. La seconde approche envisagée pour préparer le trisaccharide, consiste à synthétiser le disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal. La synthèse de ce disaccharide a aussi été étudiée à travers deux stratégies : le couplage direct avec l'unité uronique GalA (Rétrosynthèse 4, Stratégie A) et le couplage entre les glycosyles neutres suivi de l'étape d'oxydation (Rétrosynthèse 4, Stratégie B).

## 6.2 Synthèse du disaccharide $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal

Des tests de couplage glycosidique ont été réalisés avec l'unité GalA même si les résultats obtenus avec cette unité n'ont pas été concluant lors de la préparation du disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA **45**. Cependant, aucune conversion n'a été observée en suivant la stratégie de couplage direct avec cette unité lors des essais de synthèse du disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal. C'est pourquoi dans ce manuscrit nous nous sommes concentrés sur la seconde stratégie avec laquelle la glycosylation est réalisée avec des partenaires neutres (Rétrosynthèse 7).



Rétrosynthèse 7 : Accès au disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal par couplage avec une unité neutre puis oxydation.

Le disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal **53** pourra être isolé après l'oxydation/estérification de l'hydroxyle primaire du disaccharide **54**. Ce dernier sera issu de l'hydrolyse de l'acétal correspondant au produit de glycosylation entre le dérivé 4,6-*O*-benzylidène **38a** ( $R_2 = \text{Bn}$ ) ou **38c** ( $R_2 = \text{PMB}$ ) et l'unité Gal **30b** série -OAll. Les dérivés 4,6-*O*-benzylidène **38a** et **38c** ont été synthétisés précédemment avec des rendements globaux respectifs de 83% sur 4 étapes et de 74% sur 3 étapes (cf paragraphe 5.1 p.64).

Les tests de couplage glycosidique se sont appuyés sur trois exemples de la littérature présentant une bonne stéréosélectivité 1,2-*cis* (Schéma 51).

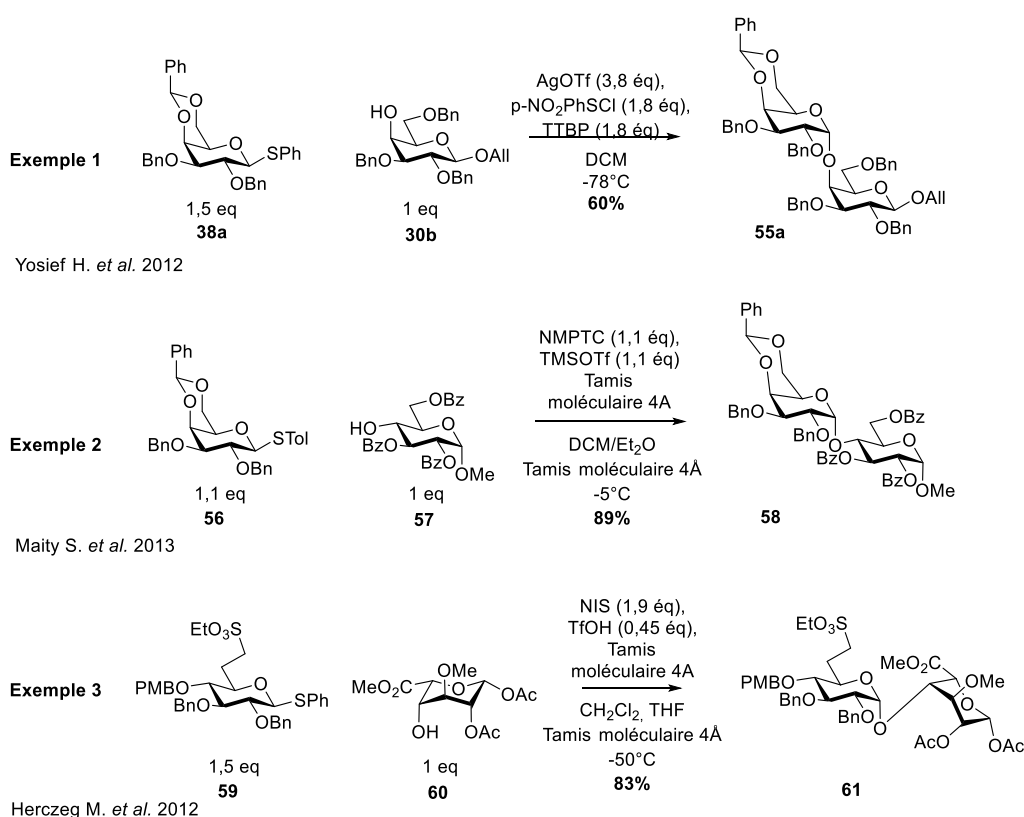


Schéma 51 : Exemple de couplage glycosidique en présence du couple NMPTC/TMSOTf.

Le premier exemple décrit la synthèse du disaccharide **55a** que nous devons préparer à partir des partenaires **38a** et **30b** (Schéma 51, exemple 1).<sup>229</sup> Les glycosyles **38a** et **30b** ont été solubilisés dans le dichlorométhane en présence de AgOTf, de chlorure de *p*-nitrobenzènesulfényle (*p*-NO<sub>2</sub>PhSCI) et de 2,4,6-tri-*t*-butylpyrimidine (TTBP). Le chlorure de *p*-nitrobenzènesulfényle et l'accepteur de glycosyle **30b** ont été introduits séparément en solution dans le dichlorométhane à -78°C et le milieu a été maintenu à cette température pendant 3 h. Le disaccharide attendu **55a** a été obtenu avec un rendement de 60%.

Le couple *N*-(*p*-Méthylphénylthio)- $\epsilon$ -caprolactame (NMPTC)/TMSOTf a été utilisé par Maity et son équipe dans le second exemple (Schéma 51, exemple 2).<sup>230,231</sup> Une méthodologie de couplage a été

réalisée en suivant une procédure générale. Selon le donneur de glycosyle utilisé, l'activation pouvait avoir lieu à  $-45^{\circ}\text{C}$ ,  $-5^{\circ}\text{C}$  ou à  $0^{\circ}\text{C}$ . Lors de la préparation du disaccharide **58**, les monomères thiogalactopyranoside **56** et glucosyle de méthyle **57** ont été solubilisés dans le dichlorométhane en présence de NMPTC et de tamis moléculaires à température ambiante. TMSOTf a été introduit à  $-5^{\circ}\text{C}$  et le milieu a été laissé revenir progressivement à température ambiante. Le disaccharide **58** a été isolé avec 89% de rendement. Le principal inconvénient de cette méthode est que le produit NMPTC n'est pas commercial. Il est donc à préparer au laboratoire.

Dans le dernier exemple, la synthèse du disaccharide **61** a été réalisée en utilisant le couple NIS/TfOH (Schéma 51, exemple 3).<sup>211</sup> Le donneur de glycosyle **59** et l'accepteur de glycosyle **60** ont été solubilisés dans le dichlorométhane en présence de tamis moléculaire. NIS en solution dans le THF et TfOH ont été introduits à  $-50^{\circ}\text{C}$ . Après 1 h de réaction à  $-20^{\circ}\text{C}$ , le disaccharide attendu **61** a été isolé avec un rendement de 83% par chromatographie sur gel de silice.

Ces trois conditions ont permis d'isoler le produit de couplage d'anométrie  $\alpha$  avec de bons voire d'excellents rendements. La stéréosélectivité 1,2-*cis* observée peut être expliquée par la présence de sels de triflate dans le milieu. Lorsqu'un thiogluco-pyranoside ou thiogalactopyranoside est activé par un sel de triflate, la formation du stéréoisomère de type « 1,2-*cis* » serait favorisée si le donneur de glycosyle ne possède pas de groupement participant en  $\text{C}_2$ .<sup>232</sup> A titre d'illustration, le mécanisme décrit sur le Schéma 52 explique la stéréosélectivité observée en présence du couple  $p\text{-NO}_2\text{PhSCI}/\text{AgOTf}$ .

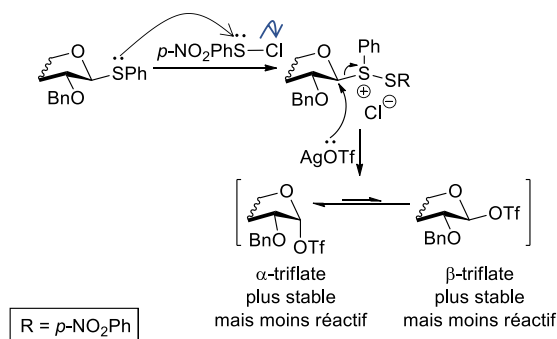


Schéma 52 : Activation d'un thioglycosyle en présence du couple  $\text{PhSCI}/\text{AgOTf}$ .

Lorsque le thioglycosyle attaque  $p\text{-NO}_2\text{PhSCI}$ , l'ion sulfonium formé fragilise la liaison anomérique. L'ion triflate peut ensuite attaquer le carbone anomérique. Un équilibre existe en solution entre l' $\alpha$ -triflate de glycosyle et le  $\beta$ -triflate de glycosyle. L'équilibre est fortement déplacé vers l' $\alpha$ -glycosyle triflate stabilisé par l'effet anomère. Le  $\beta$ -triflate de glycosyle, minoritaire, serait plus réactif et celui-ci serait attaqué préférentiellement par l'accepteur de glycosyle *via* de type  $\text{S}_{\text{N}}2$ . Le produit de couplage d'anométrie  $\alpha$  est donc majoritairement formé.

Les essais de couplage ont d'abord été réalisés avec le donneur de glycosyle 4,6-benzylidène **38a** ( $\text{R}_2 = \text{Bn}$ ) (Schéma 53).

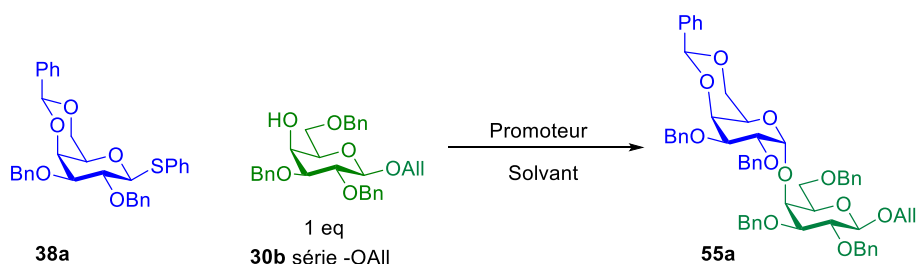


Schéma 53 : Synthèse du disaccharide **55a** avec le donneur de glycosyle 4,6-O-benzylidène **38a**.

Le Tableau 6 présente les trois essais réalisés en suivant les conditions développées par Yosief et Maity (Schéma 51, exemples 1 et 2).<sup>229,231</sup>

Tableau 6 : Les conditions opératoires utilisées lors des essais de synthèse du disaccharide **55a** avec le donneur 4,6-benzylidène **38a**.

Entrée	Donneur de glycosyle <b>38a</b>	Promoteur	Tamis moléculaire	Solvant	T	Temps	Rdts
1	1,5 éq	AgOTf (3,8 eq), <i>p</i> -NO <sub>2</sub> PhSCI (1,8 eq), TTBP (1,8 eq)	Non	DCM (0,02 M)	-78°C	18 h	10%
2	1,5 éq	AgOTf (3,8 eq), <i>p</i> -NO <sub>2</sub> PhSCI (1,8 eq), TTBP (1,8 eq)	Oui	DCM (0,08 M)	-80 à -60°C	3 h	47%
3	1,1 éq	NMPTC (1,1 eq), TMSOTf (1,1 eq)	Oui	DCM/ Et <sub>2</sub> O (0,08 M)	-45 à -10°C	3 h	44%

Le premier essai reprend les conditions opératoires décrites par Yosief et son équipe pour préparer le disaccharide **55a** (Tableau 6, entrée 1).<sup>229</sup> Ils avaient isolé le produit de couplage **55a** avec 60% de rendement (Schéma 51, exemple 1). Entre nos mains, le disaccharide **55a** a été isolé avec un rendement de 10%. Le second essai est réalisé en conditions plus concentrées (passage de 0,02 M à 0,08 M). Du tamis moléculaire 4 Å est ajouté pour piéger les traces d'humidité éventuelles et limiter l'hydrolyse du donneur de galactopyranoside. Après l'activation à -78°C, la température a fluctué entre -80 °C et -60 °C. Ces modifications ont permis d'isoler le disaccharide attendu **55a** avec un rendement de 47% (Tableau 6, entrée 2). Le dernier essai est effectué avec le couple NMPTC/TMSOTf (Schéma 51, exemple 2). Nous avons choisi d'activer le donneur de glycosyle **38a** à -45°C même si les donneurs de glycosyles de type 4,6-O-benzylidène ont été activés à -5°C dans la publication de Maity. Dans ces conditions, le disaccharide **55a** a été obtenu avec un rendement de 44% (Tableau 6, entrée 3). Ce rendement est équivalent à celui obtenu en présence du couple *p*-NO<sub>2</sub>PhSCI/AgOTf (Tableau 6, entrée 2).



La préparation du disaccharide **55c** a été étudiée avec le couple NIS/TfOH dans les conditions décrites par Herczeg (Schéma 51, exemple 3).

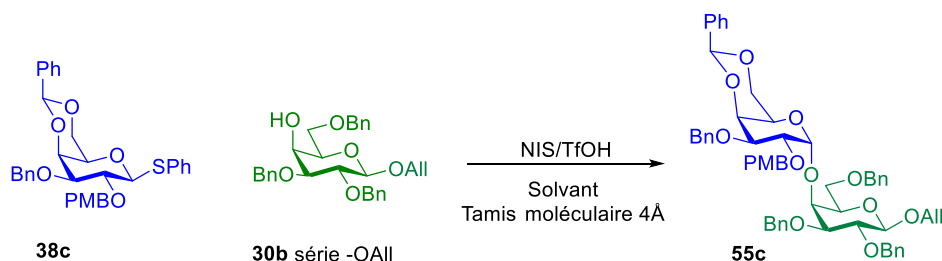


Schéma 54 : Synthèse du disaccharide **55c** avec le donneur 4,6-benzylidène **38c**.

Le premier essai prend les conditions décrites par Herczeg (Tableau 6, entrée 1).<sup>211</sup> Dans ces conditions, la formation de plusieurs produits est observée sur plaque CCM. La réaction est arrêtée après 2,5 h et seulement des traces du produit de couplage sont observées lors de l'analyse du brut réactionnel. La conversion est améliorée en doublant le nombre d'équivalent de TfOH mais le disaccharide **55c** est isolé en mélange avec l'allylgalactopyranoside **30b**. Une conversion totale est observée lorsque le donneur 4,6-benzylidène **38c** est mis en léger excès par rapport à l'accepteur allylgalactopyranoside **30b** (Tableau 7, entrée 3). Ce dernier essai est à renouveler afin de pouvoir isoler le disaccharide **55c** pur et de pouvoir estimer le rendement de la réaction.

Tableau 7 : Les conditions opératoires utilisées lors des essais de synthèse du disaccharide **54c** avec le donneur 4,6-benzylidène **38c**.

Entrée	38c	30b	Promoteur	Solvant	T	Temps	Rdts
1	1,5 éq.	1 éq.	NIS (1,9 eq), TfOH (0,45 eq)	DCM/THF (0,02 M)	- 60°C à -40°C	2,5 h	Traces
2	1,5 éq.	1 éq.	NIS (1,9 eq), TfOH (0,9 eq)	DCM/THF (0,02 M)	- 60°C à -40°C	2,5 h	Mélange <b>55c</b> et <b>30b</b>
3	1 éq	1,1 éq.	NIS (1,9 eq), TfOH (0,9 eq)	DCM/THF (0,03 M)	- 60°C à -40°C	0,5 h	<b>41%</b> (ratio RMN)

Comme pour le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA **45**, la stratégie de synthèse du disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal *via* la glycosylation avec des substrats neutres est prometteuse. Des conditions ont été développées afin d'avoir une conversion totale (excès de l'accepteur de glycosyle). Les problèmes de purification pourront sûrement être résolus en poursuivant nos essais dans ces conditions. Il serait intéressant de poursuivre nos essais de couplage direct avec l'unité GalA. Les conditions utilisées lors des couplages avec les donneurs de glycosyles **38a** et **38c** pourront être appliquées à l'unité GalA.

Dans l'introduction, deux trisaccharides ont été mentionnés : trisaccharide de la chaîne principale  $\rightarrow 4)$ - $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA2S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ , ainsi que le motif triacide uronique,  $\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -D-GlcAp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcAp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GalpA2S-(1 $\rightarrow$  (cf paragraphe 1 p.35). La préparation du trisaccharide de la chaîne principale a été privilégiée. L'unité GalA qui est au cœur de la stratégie de synthèse du trisaccharide de la chaîne principale, permet également d'avoir accès au trisaccharide uronique,  $\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -D-GlcAp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcAp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GalpA2S-(1 $\rightarrow$ , si l'unité diGlcA est synthétisée. C'est dans cette optique que nous avons également préparé cette unité diGlcA en parallèle du trisaccharide de la chaîne principale. La préparation de cette unité sera détaillée dans le prochain paragraphe.

## 7 Synthèse de l'unité diacide glucuronique diGlcA

L'unité diGlcA est envisagée par l'oxydation du D-(+)-cellobiose pour un gain d'étape et pour éviter des glycosylations entre deux unités acides glucuroniques et de limiter les étapes. Deux stratégies de synthèse ont été proposées (Schéma 55).

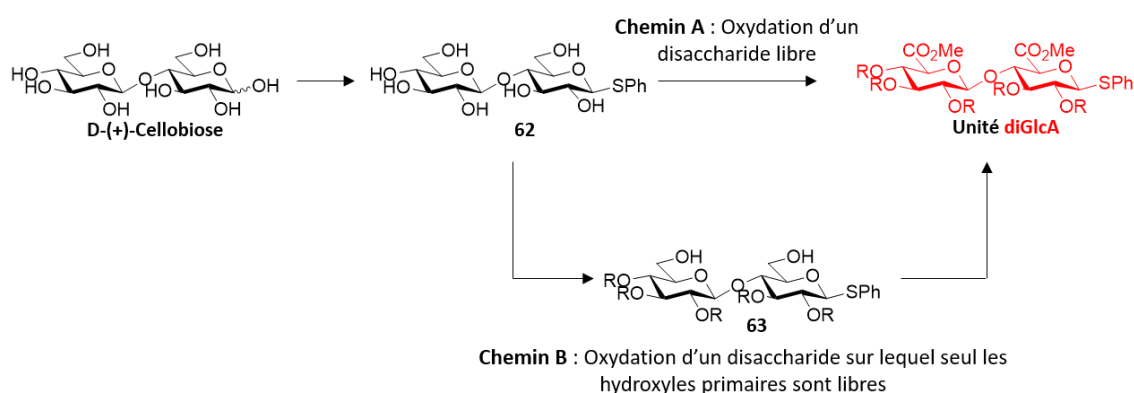


Schéma 55 : Stratégie de synthèse de l'unité diGlcA, chemin A : Oxydation d'un disaccharide libre ;  
Chemin B : Oxydation d'un disaccharide sur lequel seuls les OH primaires sont libres

Après la protection du carbone anomérique du D-(+)-cellobiose, deux options sont possibles : soit l'oxydation directe du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **62** (Schéma 55 : Chemin A) soit l'oxydation de son analogue protégé **63** dont seuls les hydroxyles primaires sont libres (Schéma 55 : Chemin B). Ces deux options seront présentées dans deux parties distinctes.

7.1 Oxydation directe du disaccharide déprotégé **62** suivant le chemin

## A

L'oxydation de disaccharides ou d'oligosaccharides déprotégés permet de préparer des unités acides plus rapidement sans nécessiter de jeu de protection/déprotection des hydroxyles primaires par rapport aux hydroxyles secondaires. Le TEMPO est souvent apprécié car il est sélectif des hydroxyles primaires.<sup>233</sup> Le suivi de la réaction d'oxydation et l'isolement du produit oxydé sont les deux étapes qui peuvent poser des difficultés. Toutefois, le développement de méthodes chromatographiques en phase inverse permettra de faciliter ces deux étapes. Les oxydations de deux disaccharides et d'un trisaccharide déprotégés sont illustrées sur le Schéma 56.

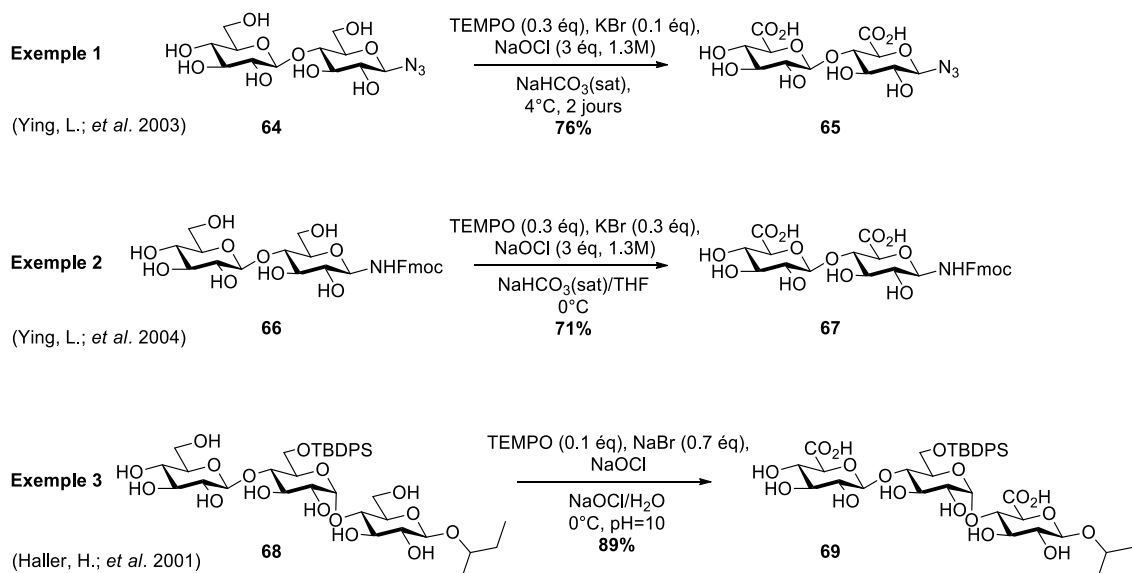


Schéma 56 : Trois exemples d'oxydation de déprotégés

Dans le premier exemple, le cellobiopyranosyle azide **64** a été oxydé en présence de TEMPO, d'hypochlorite de sodium (NaOCl) et de bromure de potassium dans une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium pendant 2 jours à 4°C avec un rendement de 76%.<sup>234</sup> Lors du traitement, l'acide formé a été isolé dans la phase aqueuse qui a ensuite été lyophilisée. Les sels ont été éliminés du lyophilisat par précipitation dans le méthanol, et l'acide **65** est purifié par chromatographie en phase liquide à haute pression en phase inverse. Le second exemple provient d'une publication des mêmes auteurs.<sup>235</sup> Le cellobiosyle amine **66** a été oxydé dans des conditions similaires avec 71% de rendement. Le THF a certainement été ajouté pour améliorer la solubilité du substrat **66**. Le traitement est simplifié car l'acide **67** a pu être isolé en phase organique. Dans le dernier exemple, les deux hydroxyles primaires du trisaccharide **68** sont oxydés en présence de TEMPO, NaOCl, NaOH, NaBr dans l'eau à pH=10 avec un rendement de 89%.<sup>236</sup> Le milieu réactionnel a été lyophilisé puis purifié par chromatographie en phase liquide à haute pression en phase inverse. Les auteurs précisent qu'aucun

sous-produit partiellement oxydé ou sur-oxydé n'a été isolé. Les trois acides ont été isolés avec de très bons rendements.

Suivant la voie A, notre substrat thiocellobiopyranoside **62** à oxyder possède un atome de soufre. L'oxydation du soufre est fortement probable en présence de NaOCl. Si les conditions sont mises au point pour permettre l'oxydation des deux hydroxyles et du thioéther en sulfoxyde ou en sulfone, l'oxydation du soufre n'est pas un problème majeur. En effet, les sulfoxydes<sup>237</sup> ou les sulfones<sup>238,239</sup>, au même titre que le thioéther, sont des groupes activant lors des couplages glycosidiques. L'oxydation du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **62** a donc été envisagée et sa synthèse a été effectuée en 4 étapes à partir du cellobiose D-(+)-cellobiose (Schéma 57).

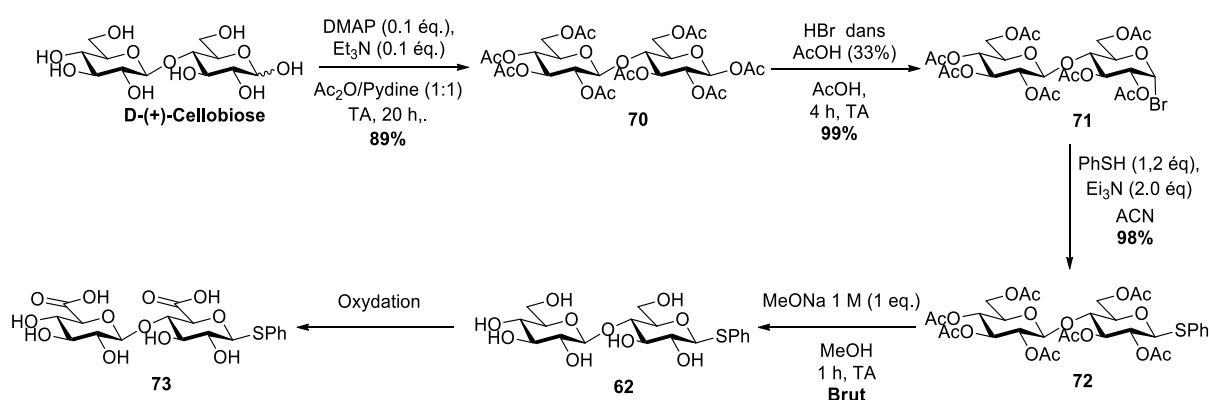


Schéma 57 : Préparation du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **62**.

Le D-(+)-cellobiose commercial est peracétylé en présence de DMAP, Et<sub>3</sub>N dans un mélange anhydride acétique/Pyridine au ratio 1 : 1. Le produit peracétylé **70** est isolé avec un rendement de 89% après recristallisation dans le méthanol. Son carbone anomérique est bromé en présence d'une solution commerciale d'HBr dans l'acide acétique avec un rendement de 99% sans purification. La S-glycosylation a lieu en présence de thiophénol et de triéthylamine dans l'acétonitrile. Le produit de couplage **72** est obtenu par précipitation dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane avec un rendement de 98%. Les hydroxyles acétylés sont libérés dans le méthanol en présence d'une solution de méthanolate de sodium 1 M.

L'oxydation a été réalisée en suivant les deux conditions proposées par Ying (Tableau 8).

Tableau 8 : Essais d'oxydation du phényle thiocellobiose déprotégé **62**.

Entrée	TEMPO	NaOCl 1,3 M	KBr	Solvant	T	Temps	Résultats
<b>1</b>	0,06 eq.	10 eq.	0.1 eq.	NaHCO <sub>3</sub> (sat)	0°C	3 jours	<b>Pas de conversion</b>
<b>2</b>	0,7 eq.	5,5 eq.	0,3 eq.	NaHCO <sub>3</sub> (sat), THF	0°C à TA	3 jours	<b>Oxydation du soufre</b>

Les premières conditions appliquées sont celles qui ont permis d'oxyder le cellobiosyle azide **64** (Schéma 56, exemple 1). Aucune conversion n'est observée malgré l'ajout de réactifs au cours de la réaction (Tableau 8, entrée 1). Lorsque les secondes conditions de Ying ont été utilisées, une faible conversion est observée sur plaque CCM. Le seul produit identifié dans le brut réactionnel par spectrométrie de masse est le produit **74** sur lequel le soufre est oxydé en sulfoxyde.

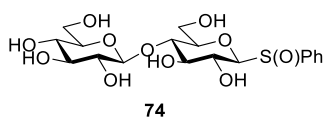


Figure 19 : Produit d'oxydation **74** formé

En parallèle, un essai d'oxydation du thiophénylglucopyranoside **76** a été réalisé afin de déterminer si la difficulté d'oxyder les hydroxyles primaires sur notre disaccharide **62** est dû à la compétition avec le soufre ou plus à une réactivité intrinsèque liée au disaccharide. Le thiophénylglucopyranoside **76** est préparé en 2 étapes à partir du glucose peracétylé **45** précédemment synthétisé (Schéma 58).

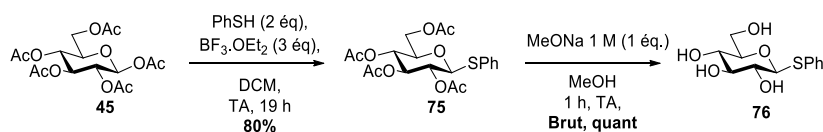


Schéma 58 : Schéma de synthèse du substrat modèle **76**.

Le thiophénylglactopyranoside acétylé **45** est préparé en présence de thiophénol et de BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> dans le dichlorométhane avec un rendement de 80%. Il est solubilisé dans le méthanol en présence d'une solution de méthanolate de sodium 1 M afin d'isoler le thiophénylglactopyranoside déprotégé **76** avec un rendement quantitatif. Le substrat modèle **76** est synthétisé avec un rendement global de 56% sur 3 étapes.

Un test d'oxydation du substrat modèle est réalisé dans les conditions décrites par Haller.<sup>236</sup> Le pH du milieu est ajusté à 10 à l'aide d'une solution de NaOH 1 M et d'une solution d'HCl 1 M. Malheureusement, le produit d'oxydation **77** n'a pas été obtenu. Seul le produit d'oxydation du soufre **78** est observé lors de l'analyse du brut réactionnel.

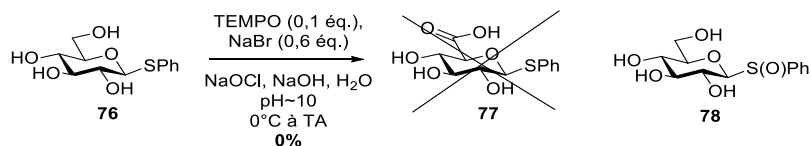


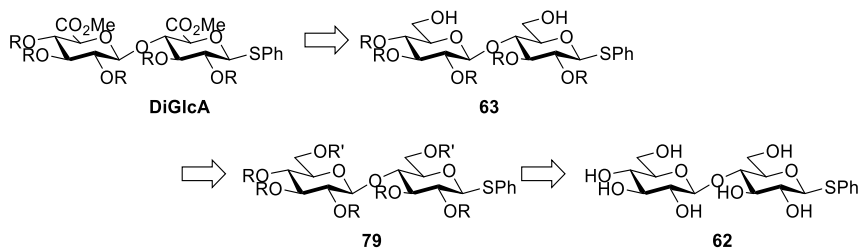
Schéma 59 : Essai d'oxydation du thiophénylglucopyranoside déprotégé **76**.

En conclusion, les différents tests réalisés pour oxyder directement le thiophénylcellobiopyranoside **62** et le thiophénylglucopyranoside **76** n'ont pas permis d'obtenir les unités uroniques souhaitées. Seul le soufre s'oxyde dans les conditions utilisées.

Afin de préparer l'unité **diGlcA**, le deuxième chemin impliquant l'oxydation d'un intermédiaire dont seuls les hydroxyles primaires sont libres a été étudié (chemin B).

## 7.2 trOxydation du disaccharide protégé **63** suivant le chemin B

En suivant le chemin B, la synthèse de l'unité **diGlcA** sera obtenue après oxydation/estérification des hydroxyles primaires du thiophénylcellobiopyranoside protégé **63**. Ce dernier proviendrait de la libération des hydroxyles primaires du thiophénylcellobiopyranoside **79** issu d'un jeu de protection orthogonal entre les hydroxyles primaires et secondaires du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **65**.



Rétrosynthèse 8 : Schéma rétrosynthétique de l'unité **diGlcA**

L'unité **diGlcA** est engagée dans une liaison glycosidique d'anométrie  $\beta$  avec le **GalA**. Afin d'assurer la stéréosélectivité 1,2-*trans* lors du couplage, un groupement de type acyle peut être introduit en C<sub>2</sub>. Dans cette optique, deux composés acétylés sur les hydroxyles secondaires ont été

préparés avec les groupements *t*-butyldiphénylsilyles (**79a**) ou trityles (**79b**) sur les hydroxyles primaires. Lors de la déprotection des hydroxyles primaires, seuls des produits de dégradation ont été obtenus. Il a donc été choisi de ne pas rentrer dans le détail de la synthèse de ces deux composés.

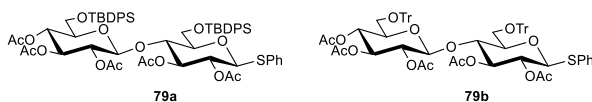


Figure 20 : Les composés **79a**,  $R' = \text{TBDPS}$  et  $R = \text{Ac}$ , et **79b**,  $R' = \text{Tr}$  et  $R = \text{Ac}$ .

La synthèse de l'unité **diGlcA** a été poursuivie en série benzyle. Le dérivé trityle **79a**, préparé en grande quantité, a servi de produit de départ. Il est préparé en une étape « one-pot » à partir du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **62** (Schéma 60).

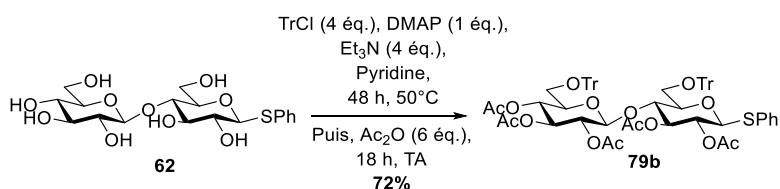


Schéma 60 : Préparation du didérivé trityle **79a**.

Le didérivé trityle est obtenu en présence de chlorure de trityle, de 4-diméthylaminopyridine, de triéthylamine et d'anhydride acétique dans la pyridine avec un rendement de 72%. Il a ensuite permis de préparer le thiophénylcellobiopyranoside benzylé **73** en 3 étapes (Schéma 61).

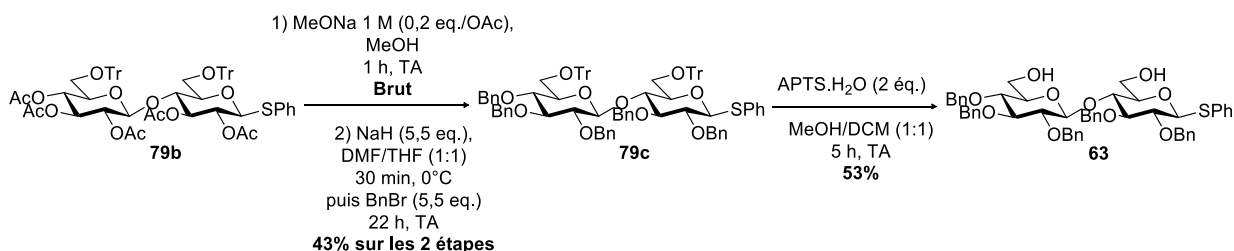


Schéma 61 : Accès au thiophénylcellobiopyranoside benzylé **66**.

Les hydroxyles secondaires sont libérés en présence d'une solution de méthanolate de sodium 1 M dans le méthanol, puis ils sont benzylés en présence d'hydrure de sodium et de bromure de benzyle dans un mélange DMF/THF avec un rendement de 43%. Le thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **63** est préparé en présence de d'APTS.H<sub>2</sub>O dans un mélange MeOH/DCM au ratio 1 : 1 avec 53% de rendement.

Les conditions d'oxydations envisagées pour oxyder le thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **63** sont celles développées lors de la synthèse des unités **GalA 29** (cf paragraphe 5.3 p.68).

Comme les galactoses et les glucoses n'ont pas la même réactivité, les conditions d'oxydation ont d'abord été appliquées au substrat modèle **80** préparé à partir du thiophénylglucopyranoside déprotégé **76** avec un rendement global de 41% sur 5 étapes (Schéma 62).

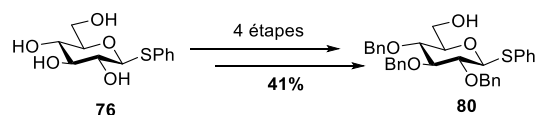
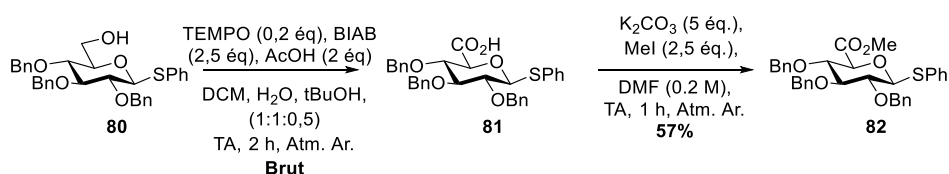


Schéma 62 : Synthèse du substrat modèle **80**.

Les conditions d'oxydation/estérification développées lors de la synthèse des esters **GalA 29** sont appliquées au substrat modèle thiophénylglucopyranoside **80** qui ne présente qu'une fonction hydroxyle primaire à oxyder (Schéma 63).

Tentative sur le monomère **80**



Tentative sur le dimère **63**

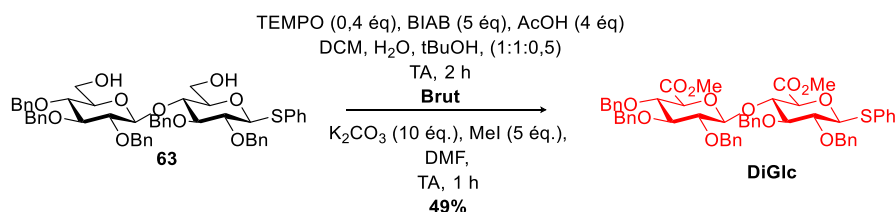


Schéma 63 : Application des conditions d'oxydation/estérification précédemment mise au point avec le thiophénylgalactopyranoside tribenzylé **41d** (cf paragraphe 5.3 p.68).

Le thiophénylglucopyranoside **80** est oxydé présence de BAIB (2,5 éq.), TEMPO (0,2 éq.) et AcOH (2 éq.) dans un mélange DCM/H<sub>2</sub>O/tBuOH au ratio 1 : 1 : 0.5. L'acide attendu **81** est mis en réaction en présence d'iodure de méthyle (2,5 éq.), et de carbonate de potassium (5,0 éq.) dans le DMF. Ces conditions ont permis d'obtenir l'ester **83** avec un rendement de 57% sur les deux étapes. Ces mêmes conditions ont été appliquées à l'analogue **63**. L'unité **diGlc** est isolée avec un rendement de 49%.

Pour conclure, deux stratégies avaient été envisagées pour préparer l'unité **diGlcA**. La première stratégie qui nécessitait l'oxydation du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **62** n'a pas fonctionné. Il semblerait que le soufre s'oxyde préférentiellement par rapport aux hydroxydes



secondaires en présence de TEMPO/NaOCl. Il serait intéressant d'appliquer ces conditions à un substrat qui ne possède pas d'atome de soufre en position anomérique afin de vérifier notre hypothèse. L'unité **diGlcA** a pu être préparée à partir du thiophénylcellobiopyranoside **63** avec 49% de rendement en utilisant les conditions d'oxydation précédemment développées (cf paragraphe 5.3 p.68). Nos conditions d'oxydation sont donc opérantes sur un disaccharide car elles nous ont également permis d'isoler le disaccharide  $\beta$ -**Glc(1→4)-GalA 45** (cf paragraphe 6.1.2 p.75). Le rendement global de cette unité est de 7% sur 8 étapes. Une voie de synthèse plus directe du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé benzylé **63** permettra d'améliorer ce rendement.

## 8 Conclusion

Dans cette partie de la thèse, l'objectif était de préparer des fragments oligosaccharidiques bien définis de l'unité répétitive de l'EPS natif par synthèse organique. Les données analytiques de ces fragments permettront de créer une banque de données utilisable pour aider à l'élucidation structurale des dérivés bioactifs de l'EPS natif.

Nous nous sommes concentrés sur la synthèse du trisaccharide de la chaîne principale avec l'unité **GalA** au cœur de la stratégie de synthèse. Les trois unités **Glc 28**, **GalA 29**, **Gal 30** ont été préparées.

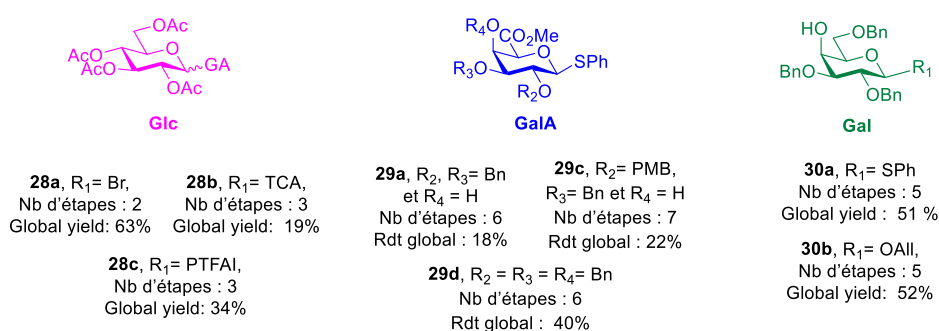


Figure 21 : Les différentes unités **Glc 28**, **GalA 29**, **Gal 30** préparées.

Des essais de couplages glycosidiques ont été réalisés avec les unités **Glc 28**, **GalA 29**, **Gal 30** afin de conduire au trisaccharide de la chaîne principale (Schéma 64). Deux stratégies avaient été envisagées. La première impliquait directement l'unité **GalA** dans le couplage (Schéma 64 : Stratégie A, **GalA** R<sub>5</sub>=CO<sub>2</sub>Me) tandis qu'un précurseur neutre de cette unité était utilisé dans la seconde stratégie (Schéma 64 : Stratégie B, **Gal** R<sub>5</sub>=CH<sub>2</sub>OR). Ce qui est ressorti de l'étude, c'est que la présence de l'ester en C<sub>5</sub> de l'unité **GalA** nuit à la réactivité de l'unité lors du couplage. Les disaccharides acides n'ont pas pu être isolés en suivant la première approche. Les essais de glycosylation avec des unités neutres sont

plus encourageants. Le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA ainsi qu'un précurseur du disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal ont pu être préparés.

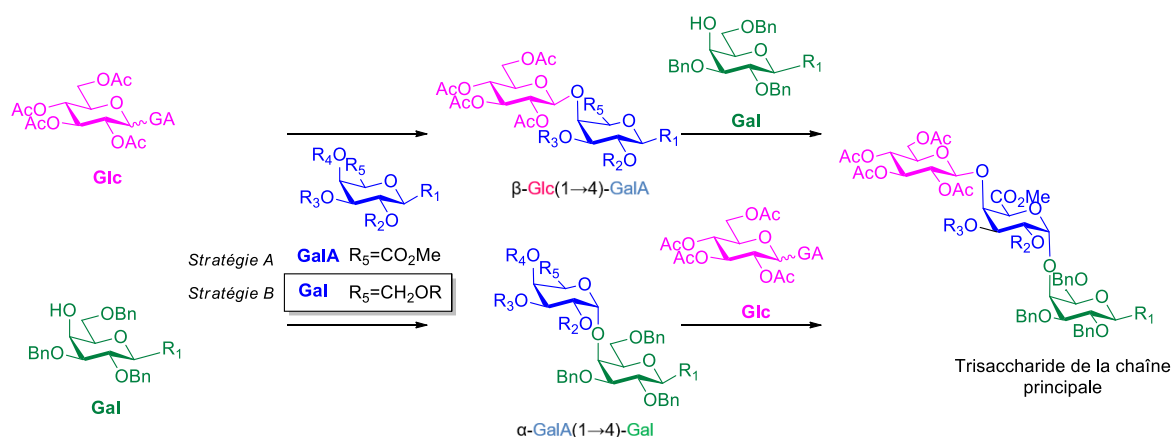


Schéma 64 : Schéma récapitulatif des stratégies A et B utilisées lors des couplages glycosidiques.

L'unité **diGlcA** a également été synthétisée en 8 étapes avec un rendement global de 7% (Schéma 65).

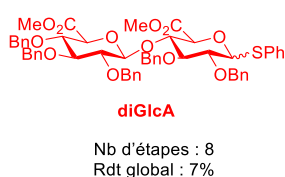


Schéma 65 : Unité diGlcA préparée.

Même si l'unité **GalA** n'a pas été réactive lors des glycosylations, sa préparation nous a permis de définir des conditions d'oxydation/estérification pour nos substrats. Ces conditions ont permis la synthèse des disaccharides **diGlcA** et  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA.

## Chapitre 3 : Dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif et de ses dérivés

### 1 Introduction

Actuellement, les dérivés bioactifs de l'EPS produit par *A. infernus*, de taille comprise entre 10 et 200 Kg/mol, sont obtenus par un procédé chimique. Ce procédé est réalisé en deux étapes : dépolymérisation radicalaire et sulfatation. La dépolymérisation radicalaire est efficace pour couper des liaisons osidiques, cependant la réaction de dépolymérisation peut être associée à une dégradation oxydative.<sup>4</sup> On peut aussi supposer pour les chaînes très ramifiées que les oses présents dans la chaîne latérale ne sont pas totalement conservés.

Le principal objectif de la thèse était d'obtenir des oligosaccharides plus homogènes en conservant la structure originale de l'EPS d'*Alteromonas infernus* pour faciliter l'analyse structurale des dérivés actuellement obtenus par voie chimique. Les enzymes sont des outils biotechnologiques dont la spécificité permet de remplacer un procédé chimique par un procédé plus spécifique, plus doux et plus respectueux de l'environnement pour la production de dérivés de bas poids moléculaire (Figure 22). Les enzymes présentent en effet plusieurs avantages. Elles sont stéréo- et régiosélectives, ne produisent pas de coproduit de dégradation, n'utilisent pas de solvant polluant ou difficile à traiter et le degré de dépolymérisation peut être contrôlé en jouant sur les paramètres cinétiques de la réaction. Ainsi, à la fois la production d'oligosaccharides bien définis mais aussi de dérivés bioactifs de nouvelle génération avec de bons rendements et une bonne reproductibilité peut être envisagée.

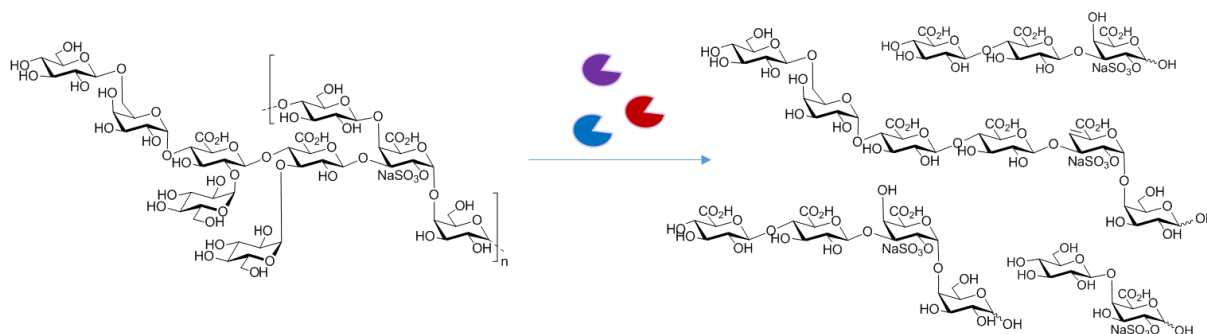


Figure 22 : Exemple de production de dérivés bas poids moléculaire par l'action d'enzymes.

Lors d'une étude précédente, des enzymes commerciales de type glycopyranoside hydrolase, polysaccharide lyase et protéase ont été incubées avec l'EPS natif mais aucune dépolymérisation n'a été observée.<sup>103</sup> Ces enzymes ont une spécificité de substrats trop importante pour interagir avec les liaisons glycosidiques de l'EPS natif. Toutefois, il a été montré que la bactérie *A. infernus* possède des

enzymes de dépolymérisation endogènes (intracellulaires) actives sur l'EPS natif qu'elle produit.<sup>103</sup> Des activités glycoside hydrolases, lyases et sulfatases ont été mises en évidence dans l'extrait protéique intracellulaire soluble (lysats) obtenu après une lyse cellulaire (Figure 23).

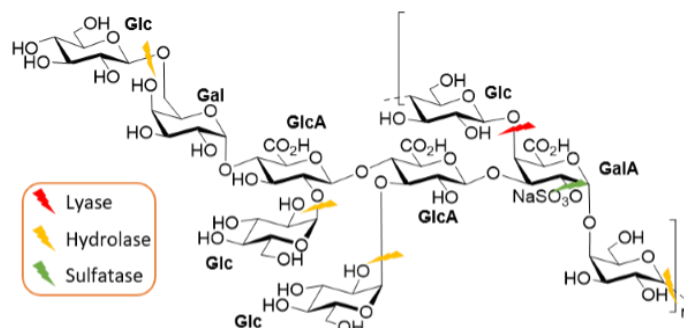


Figure 23 : Liaisons coupées par les activités enzymatiques hydrolases, lyases et sulfatases observées lors de la dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif avec l'extrait intracellulaire soluble (lysats) de la bactérie *A. infernus*.

Afin d'approfondir ces premiers résultats, des digestions enzymatiques ont été réalisées pour dépolymériser à la fois l'EPS natif et les dérivés bioactifs obtenus par voie chimique. Une première étude s'est focalisée sur la production des dérivés de bas poids moléculaire pour obtenir des GAG-mimétiques à partir de l'EPS natif. Quant à la deuxième étude, elle a consisté à dépolymériser par voie enzymatique deux dérivés obtenus par procédé chimique afin d'obtenir et caractériser des oligosaccharides pour constituer une librairie utile à l'analyse structurale fine.

## 2 Obtention de dérivés GAG-mimétiques à partir de l'EPS natif

Afin de préparer des dérivés GAG-mimétiques à partir de l'EPS natif, de nouvelles conditions de dépolymérisation enzymatique ont été étudiées.

### 2.1 Etude de la cinétique enzymatique de l'EPS natif

Cette étude cinétique préliminaire a été menée sur l'EPS natif de haut poids moléculaire (2 000 000 g/mol) en présence des extraits protéiques solubles ou lysats (L) et insolubles ou débris cellulaires (D). Ces extraits ont été obtenus après une lyse cellulaire réalisée sur le culot bactérien issu d'une culture d'*A. infernus* en Erlenmeyer (cf Annexe 3, Figure 37 p. 139). Afin de déterminer les meilleures conditions de dépolymérisation enzymatique, trois paramètres ont été étudiés : le surfactant ajouté lors de la préparation des extraits protéiques par sonication, le pH du milieu réactionnel et les conditions de culture d'*A. infernus*.

### 2.1.1 Choix du surfactant

Deux surfactants ont été choisis : le Triton X-100 et le Tween 20 (Figure 24). Ce sont des molécules non ioniques et fréquemment utilisées pour solubiliser des protéines membranaires sans affecter leur activité. Ils sont introduits lors de l'étape de lyse cellulaire.

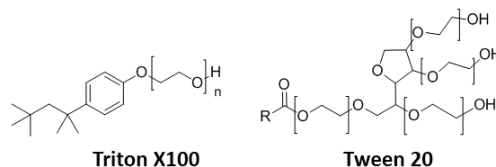


Figure 24 : Les surfactants Triton X-100 et Tween 20.

Les extraits protéiques, le lysat (L) et des débris cellulaires (D), ont été préparés dans le tampon Tris HCl à pH 8. Lors de leur préparation, quatre conditions de surfactants ont été étudiées : (I) sans surfactant, (II) avec le surfactant Tween 20, (III) avec le surfactant Triton X-100, (IV) avec les deux surfactants. Afin de mettre en évidence la dépolymérisation, les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 20% (Figure 25).

Dans les quatre conditions étudiées, lorsque l'EPS était incubé seul dans le milieu, sa dégradation n'était pas observée (Figure 25, EPS). Quand l'EPS natif était incubé avec le lysat (L) sans surfactant, des bandes isolées de faible intensité étaient observées (Figure 25-(I), L+EPS). Toutefois, la bande caractéristique de l'EPS natif restait présente en haut du gel après 142 h d'incubation. L'intensité de ces bandes était plus prononcée en présence de surfactant (Figure 25-(II), Figure 25-(III) et Figure 25-(IV), L+EPS). Ainsi l'extrait lysat (L) dépolymérise donc légèrement l'EPS natif et l'utilisation des surfactants permettrait de solubiliser une quantité d'enzymes plus importante car ce phénomène est légèrement accentué dans l'ordre suivant : Triton X-100 < Tween 20 < Triton X-100 + Tween 20. En présence de l'extrait débris cellulaires (D), ce sont les conditions de surfactants Tween 20 (II) et Triton X-100 + Tween 20 (IV) qui permettent d'augmenter la dépolymérisation de l'EPS natif (Figure 25-(II) et Figure 25-(IV), D+EPS). En effet, dans les conditions Tween 20 (II), après seulement 3 h, une large bande était observée en haut du gel ainsi que des bandes réparties régulièrement tout le long du gel (Figure 25-(II), D+EPS). Puis cette large bande disparaissait après 22 h d'incubation alors que des bandes en bas du gel, juste au-dessus des bandes observées avec les débris seuls, augmentaient en intensité jusqu'à 74 h pour diminuer à 142 h, temps d'incubation auquel une dépolymérisation presque totale était observée. En résumé, une dépolymérisation totale de l'EPS natif dans les conditions D+EPS est possible au-delà de 142 h. La dépolymérisation est légèrement plus faible dans les conditions D + Triton X-100 + Tween 20 car la bande caractéristique de l'EPS natif était toujours présente après 142 h bien qu'elle soit d'intensité plus faible (Figure 25-(IV), D+EPS). L'effet des surfactants sur la

dépolymérisation par les débris cellulaires montre que ces surfactants ont vraisemblablement un effet sur la conformation des chaînes polysaccharidiques, les rendant plus ou moins accessibles aux enzymes.

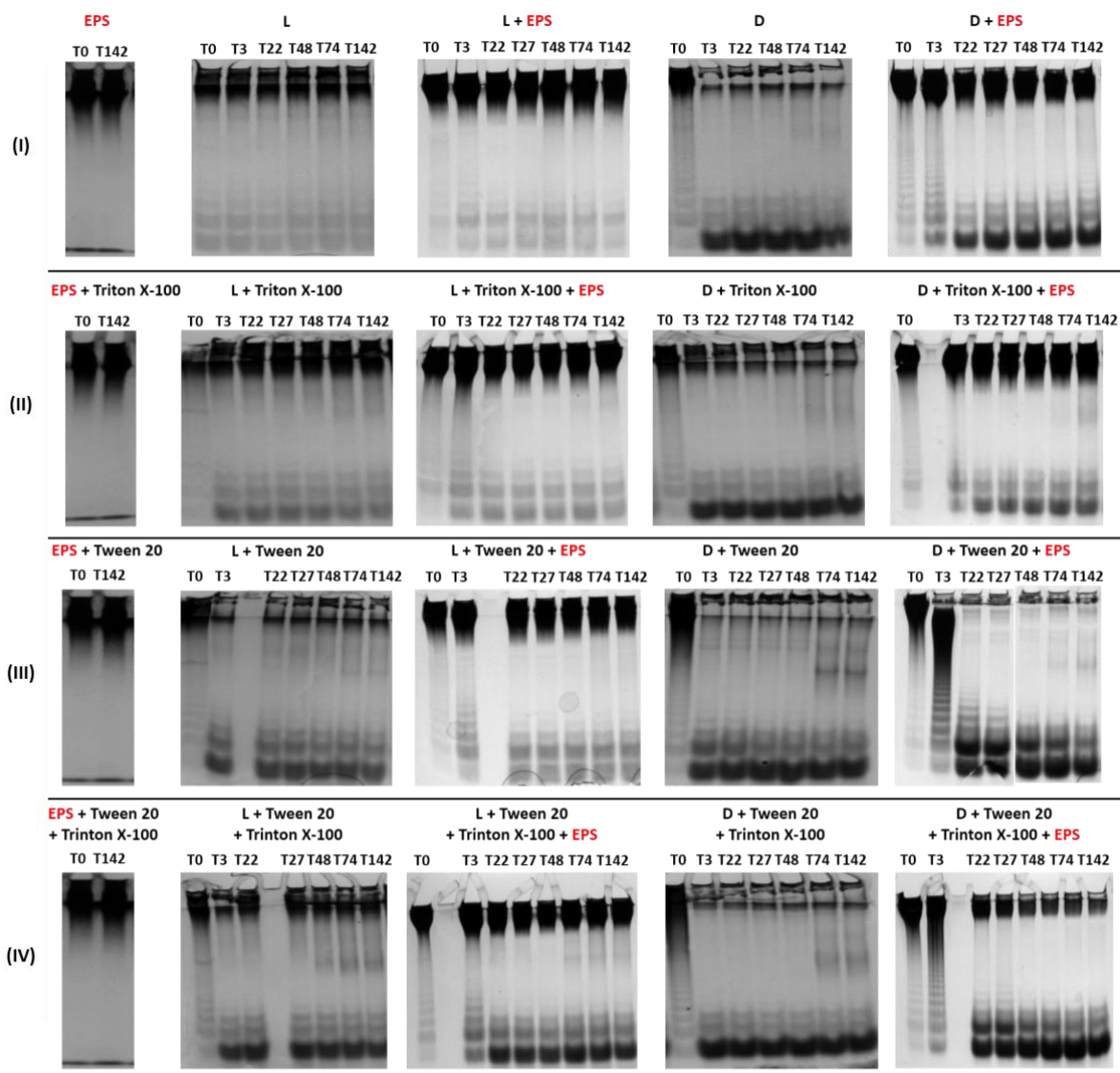


Figure 25 : Analyse en gel de polyacrylamide de l'évolution de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le lysat (L) et débris cellulaires (D) dans les conditions suivantes : sans surfactant (I), avec le Tween 20 (II), avec le Triton X-100 (III), avec le Triton X-100 et le Tween 20 (IV).

En tenant compte de l'ensemble des résultats, la dépolymérisation de l'EPS natif par les débris cellulaires préparés avec du Tween 20 s'avère la plus efficace. En revanche, l'utilisation de surfactants n'a pas permis de solubiliser la totalité des enzymes de dépolymérisation des membranes bactériennes, malgré la concentration en Tween 20 (8 mM) largement supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC, 0,042 mM).<sup>240</sup> Ces enzymes restent toujours associées aux membranes lysées. Cependant, la présence du surfactant pourrait permettre une meilleure accessibilité aux enzymes

et/ou stabiliser l'EPS dans une conformation favorable à la dépolymérisation par des interactions faibles de type liaison hydrogène entre l'EPS et le Tween 20.

### 2.1.2 Choix du pH

Afin de poursuivre l'optimisation de la cinétique enzymatique, le pH a été le deuxième paramètre étudié. Pour cela, le tampon Tris HCl à pH 8 a été comparé au tampon acétate pH 5,6 légèrement acide. Deux culots bactériens identiques ont été alors repris dans ces tampons en présence du Tween 20 précédemment choisi. Après extraction, le lysat L et les débris cellulaires D ont été incubés avec l'EPS natif pendant 54 h à 30°C. La dépolymérisation a été suivie sur gel de polyacrylamide à 20% (Figure 26).

Lorsque l'EPS natif était incubé avec les extraits protéiques dans le tampon Tris HCl pH 8, les extraits dépolymérisaient l'EPS natif comme précédemment avec une activité plus importante dans les débris cellulaires D que dans le lysat L (Figure 26). Par contre, aucune dépolymérisation n'était observée lorsque la réaction a lieu dans le tampon acétate pH 5,6. A ce pH, les extraits protéiques n'étaient plus actifs.

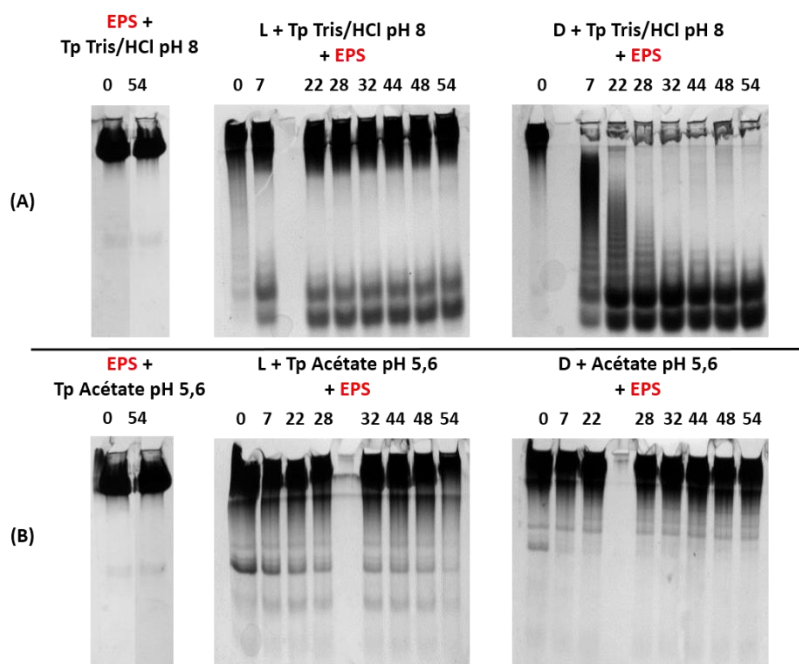


Figure 26 : Analyse en gel de polyacrylamide de l'évolution de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps par le lysat(L) et débris cellulaires (D) dans les conditions suivantes : tampon Tris HCl pH 8 (A) et tampon acétate pH 5,6 (B).

Le tampon Tris HCl pH 8 est donc un bon tampon pour observer une dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif.

Jusqu'à présent, les extraits protéiques D et L ont été produits à partir d'une culture d'*A. infernus* réalisée en milieu Zobell enrichi en glucose à 30 g/L, pendant 48h à 30°C. La tryptone a été

utilisée comme source d'azote. Au cours de ce travail de thèse, d'autres conditions de culture d'*A. infernus* ont été testées afin d'obtenir les extraits protéiques plus actifs pour dépolymériser l'EPS natif.

### 2.1.3 Optimisation de la production des extraits protéiques

Afin d'optimiser la production des extraits protéiques D et L à partir du culot bactérien d'*A. infernus*, trois paramètres de culture ont été étudiés : la source d'azote (peptone de blé ou peptone de caséine (tryptone)), la température (30°C et 37°C) et le temps (48 h et 72 h). A la fin de la culture, les extraits protéiques ont été préparés et incubés avec l'EPS natif à 30°C pendant 165 heures. La dépolymérisation enzymatique a été mise en évidence par électrophorèse en gels d'agarose 0,7% et en gel de polyacrylamide à 20% (Figure 27). Les milieux ont été supplémentés avec du glucose à 30 g/L ; une étude non publiée avait en effet montré qu'aucune dépolymérisation n'est obtenue si les extraits étaient préparés à partir d'une culture réalisée en milieu seul ou dans un milieu contenant le polysaccharide d'*A. infernus*. Nous avons d'abord vérifié que lorsque l'EPS était incubé seul, aucune dépolymérisation n'était observée (Figure 27, EPS). Lorsque les débris cellulaires provenaient d'une culture d'*A. infernus* réalisée avec de la tryptone, à 30°C et pendant 48 h (Figure 25, (1)-EPS+D), la diminution de la bande correspondant à l'EPS natif était observée sur le gel d'agarose après 4 h d'incubation (Figure 27A, (1)-EPS + D). A partir de 24 h d'incubation, seule une tache en bas de ce gel était visible. Sur gel de polyacrylamide, la bande caractéristique de l'EPS natif avait légèrement migré dans le gel et des bandes de faible intensité, isolées, régulières et distribuées dans tout le gel étaient observées après 4 h (Figure 27B, (1)-EPS + D). Au bout de 24 h, la bande correspondante à l'EPS natif avait disparu au profit de l'apparition de bandes correspondant à des dérivés avec un poids moléculaire inférieur. Une dépolymérisation totale était observée après 72 h.

Lorsque la croissance de la bactérie était réalisée sur peptone de blé, à 30°C, et pendant 48 h, une dépolymérisation partielle de l'EPS natif était donc observée en présence des débris cellulaires. En effet, à 0 h d'incubation la bande caractéristique de l'EPS était étalée sur le gel de polyacrylamide et des bandes apparaissaient dans le bas du gel (Figure 27B, (2)-EPS+D). Bien que la bande caractéristique de l'EPS natif diminuait en taille et en intensité sur les gels d'agarose et de polyacrylamide, elle était toujours présente après 165 h d'incubation (Figure 27, (2)-EPS+D). La bande caractéristique de l'EPS restait inchangée au cours du temps lorsque l'EPS était incubé avec les débris cellulaires issus de la même culture d'*A. infernus* à 37°C, 48 h (Figure 27, (3)-EPS+D), indiquant que l'EPS natif n'était pas dépolymérisé.



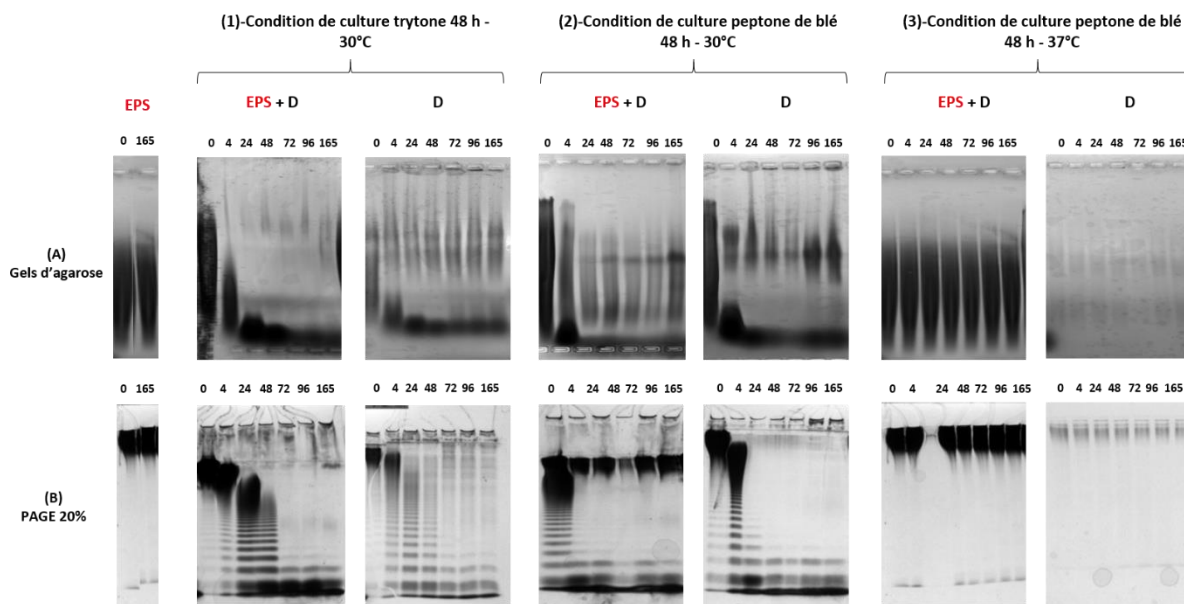


Figure 27 : Analyse électrophorétique, en gels d'agarose et de polyacrylamide, de l'évolution de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le lysat (L) et les débris cellulaires (D) produits dans les conditions de culture suivantes : tryptone/48 h/30°C (1), peptone de blé/48 h/30°C (2), peptone de blé/48 h/37°C (3).

Ces observations ont permis d'identifier les meilleures conditions de culture de la bactérie *A. infernus* pour l'obtention des enzymes de dépolymérisation, à savoir un milieu composé de tryptone à 30°C et pendant 48 h.

#### 2.1.4 Validation de la dépolymérisation enzymatique par HPSEC-MALS

Pour confirmer la dépolymérisation observée avec les extraits protéiques en présence du surfactant Tween 20 et dans le tampon Tris HCl pH 8, les échantillons prélevés ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique haute pression couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles (HPSEC-MALS) (Figure 28). Quand l'EPS natif était incubé avec le lysat L, un pic large, élué entre 6,5 et 8 min, était observé au début de l'incubation (0 h) (Figure 28-(I)). Ce pic large correspondait à la superposition des pics de l'EPS natif et de l'extrait L (Figure 28-(I) et (II)). Après 3 h d'incubation, un déplacement des populations de chaînes était observé avec une perte partielle des populations de haut poids moléculaire au temps d'élution 7 min (zone 1) au profit de l'apparition de population de bas poids moléculaire au temps d'élution 10 min (zone 3). L'augmentation du temps d'incubation (de 22 h à 74 h) conduisait seulement à un léger accroissement de cette population. En revanche, l'incubation de l'EPS natif avec l'extrait débris cellulaires D conduisait rapidement à la dépolymérisation de l'EPS natif après seulement 3 h (Figure 28-(III)). En effet, les populations de haut poids moléculaire avaient disparu après 3 h d'incubation (zone 1) et deux nouvelles populations de

tailles de chaînes inférieures étaient éluées (zone 2 et 3). La population de chaînes intermédiaires, élue entre 8 et 9 min (zone 2), n'était pas observée lorsque l'EPS natif est incubé avec le lysat L (Figure 28-(I)). Avec l'allongement du temps d'incubation avec les débris cellulaires, la population de chaînes de taille intermédiaire (zone 2) disparaissait et la population de bas poids moléculaire élue entre 9,5 et 10 min augmentait et devenait majoritaire en intensité (zone 3) (Figure 28-(III)). Mis à part le pic élué entre 9,5 min et 10 min correspondant à la population de bas poids moléculaire, seul le pic correspondant aux débris cellulaires, élué entre 7 et 8 min était encore visible sur le chromatogramme après 74 h d'incubation (Figure 28-(III)). Ce pic était clairement identifié sur le chromatogramme quand l'extrait D était incubé seul (Figure 28-(IV)) et donc il provient essentiellement de l'extrait protéique. En effet, les débris cellulaires constituent un mélange complexe de macromolécules provenant des cellules bactériennes contenant des lipides, des lipopolysaccharides, des glycoprotéines et des acides nucléiques. Ces résultats étaient en accord avec les observations sur gels de polyacrylamide (Figure 25B). Quant au pic présent au-delà de 10 min c'est-à-dire après le volume total de la colonne, il correspond bien aux sels et aux petites molécules (< 2 kDa) présents dans les échantillons.

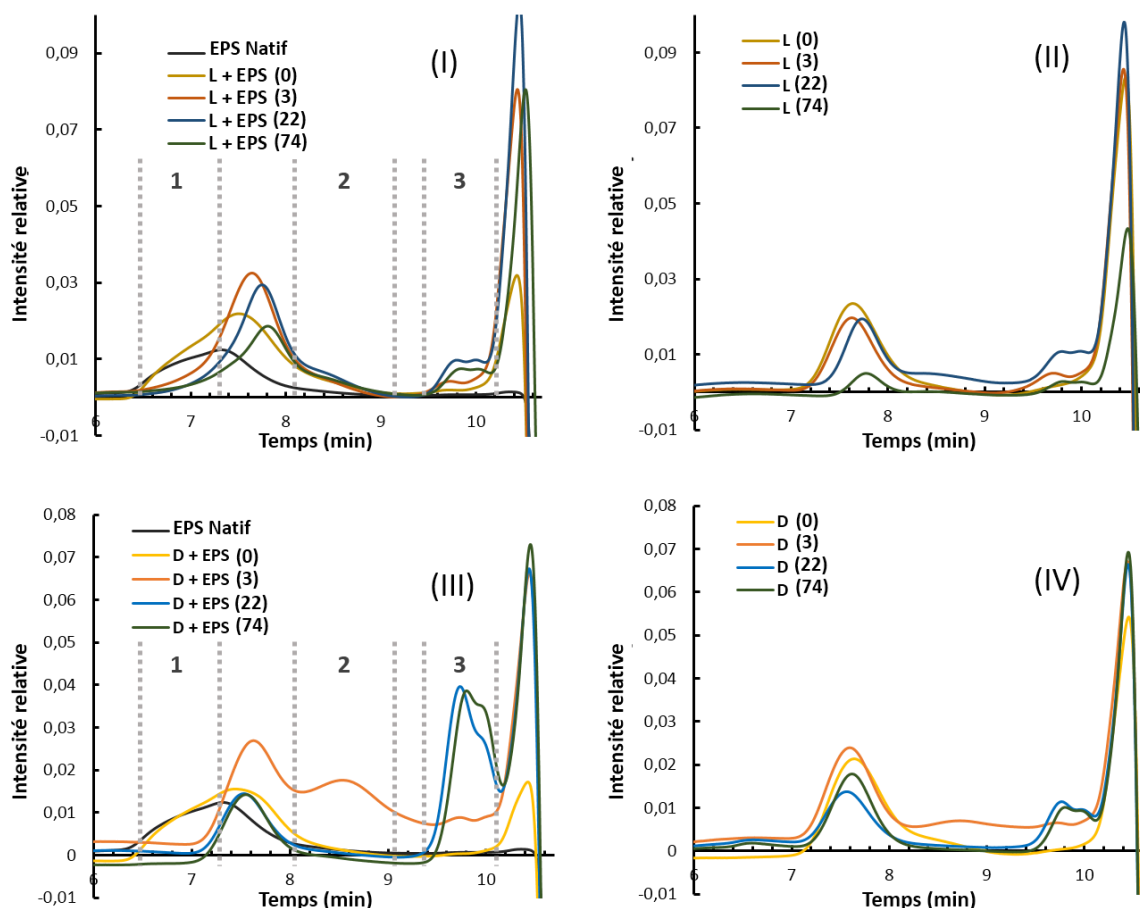


Figure 28 : Suivi par HPSEC-MALS (détecteur RI) de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le lysat (L) et les débris cellulaires (D) : L + EPS (I), L (II), D + EPS (III), D (IV).

Le profil d'élution HPSEC-MALS de quatre dérivés standards de l'EPS d'*A. infernus*, obtenus par voie de dépolymérisation radicalaire et de poids moléculaire respectivement de 4 000, 11 500, 20 000 et 230 000 g/mol, est présenté en Figure 29. Il est à noter qu'aucun pic n'est observé au-delà de 10 min car ces standards ont été purifiés et dessalés. Ce profil permet de calibrer la colonne pour déterminer approximativement la taille des différentes populations de chaînes produites lors de la dépolymérisation de l'EPS natif avec l'extrait D (Figure 28-(III)). Ainsi, après 3 h d'incubation, les chaînes éluées entre 8 et 9 min ont un poids moléculaire moyen proche de 200 000 g/mol (Figure 28-(III), zone 2) et à partir de 22 h d'incubation, les chaînes polysaccharidiques ont un poids moléculaire compris entre 4 000 et 15 000 g/mol (Figure 28-(III), zone 3).

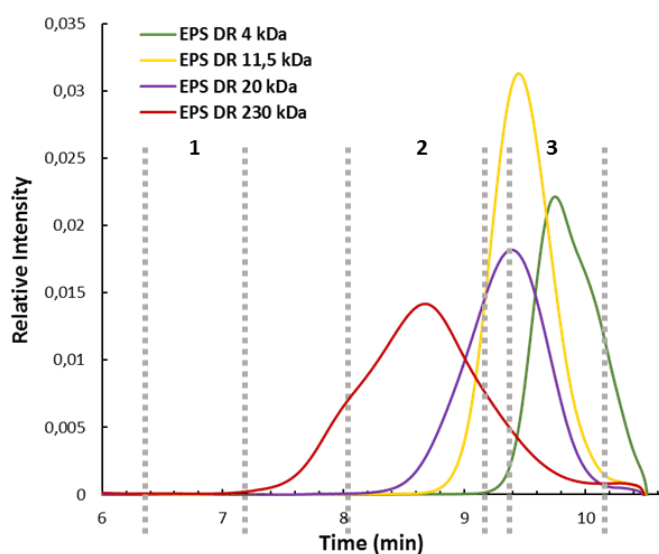


Figure 29 : Chromatogrammes HPSEC-MALS des dérivés standards dépolymérisés par voie chimique de l'EPS ayant des poids moléculaires de 4 000, 11 500, 20 000, et 230 000 g/mol.

L'étude cinétique a permis d'identifier quel extrait protéique était le plus efficace et de déterminer quelles conditions de culture d'*A. infernus* permettaient d'obtenir une activité optimale de l'extrait enzymatique. Ainsi, il a été montré dans cette étude que les débris cellulaires étaient les plus efficaces pour dépolymériser l'EPS natif et surtout en présence du tampon Tris HCl à pH 8 et du surfactant Tween 20. Les conditions de culture bactérienne requises pour préparer l'extrait protéique le plus actif sont : l'ajout de tryptone, une température de 30°C et un temps de culture de 48 h. En vue de développer un procédé biotechnologique pour l'obtention de dérivés d'EPS plus homogènes, la dépolymérisation enzymatique de l'EPS a ensuite été réalisée à plus grande échelle dans les conditions définies ci-dessus. Les résultats obtenus seront présentés dans le prochain paragraphe.

## 2.2 Dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif à plus grande échelle

Les conditions de dépolymérisation optimales définies précédemment ont été appliquées pour dépolymériser des quantités plus importantes d'EPS dans le but de pouvoir purifier et analyser les dérivés produits. L'analyse structurale des dérivés obtenus a été réalisée dans le but de déterminer quelles activités enzymatiques, présents dans les débris cellulaires, sont responsables de la dépolymérisation de l'EPS.

Pour cela, 60 mg d'EPS ont été dépolymérisés avec l'extrait D pendant 63 h, temps pour lequel la dépolymérisation de l'EPS n'est pas totale et des chaînes de tailles variables sont produites. Comme précédemment, un suivi analytique de la dépolymérisation a été fait par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 30A) et par HPSEC-MALS (Figure 30B) sur des prélèvements réalisés au cours de la réaction.

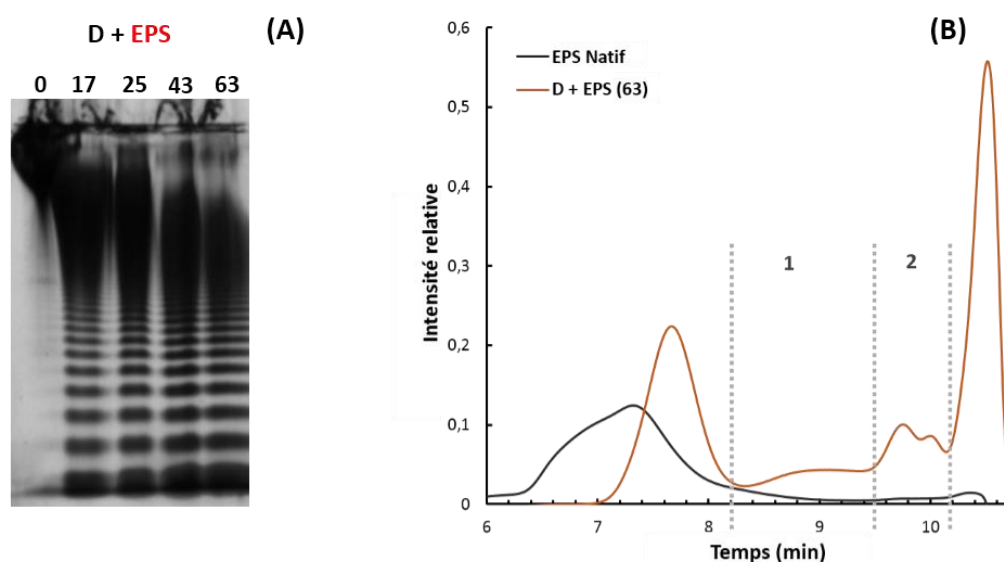


Figure 30 : Suivi analytique de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec les débris cellulaires par électrophorèse en gel de polyacrylamide 20% (A) et par HPSEC-MALS (détecteur RI) (B).

Après 63 h d'incubation, la bande caractéristique de l'EPS natif n'était plus observée en haut du gel, indiquant une perte des chaînes de très haut poids moléculaire ( $> 10^6$  g/mol) et la production de chaînes de tailles variables donnant des bandes réparties tout le long du gel ou en échelle (Figure 30A). En revanche, la dépolymérisation était nettement moins importante que celle obtenue à 48 h lors de l'étude de cinétique enzymatique (cf Figure 25-(III), EPS + Tween 20 + D, p.96).

Sur le chromatogramme HPSEC-MALS, après 63 h d'incubation, également observé sur les électrophorèses, les chaînes de très haut poids moléculaire de l'EPS natif avaient disparu (entre 6 et 7min) et deux nouvelles populations de chaînes polysaccharidiques éluées entre 8 et 10 min sont

visibles (Figure 30B, zones 1 et 2). Une première population de masse intermédiaire était observée aux temps d'éluion compris entre 8,2 et 9,4 min. La seconde population de bas à très bas poids moléculaire était éluée entre 9,4 et 10 min. Le profil d'éluion par HPSEC-MALS de l'EPS dépolymérisé confirmait donc les résultats observés sur gel de polyacrylamide.

Afin de purifier l'EPS dépolymérisé au bout de 63 h, une méthode de chromatographie préparative a été utilisée. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) a été réalisée avec la colonne Sephacryl® S100HR dont le domaine de fractionnement est compris entre 1 000 et 100 000 g/mol.

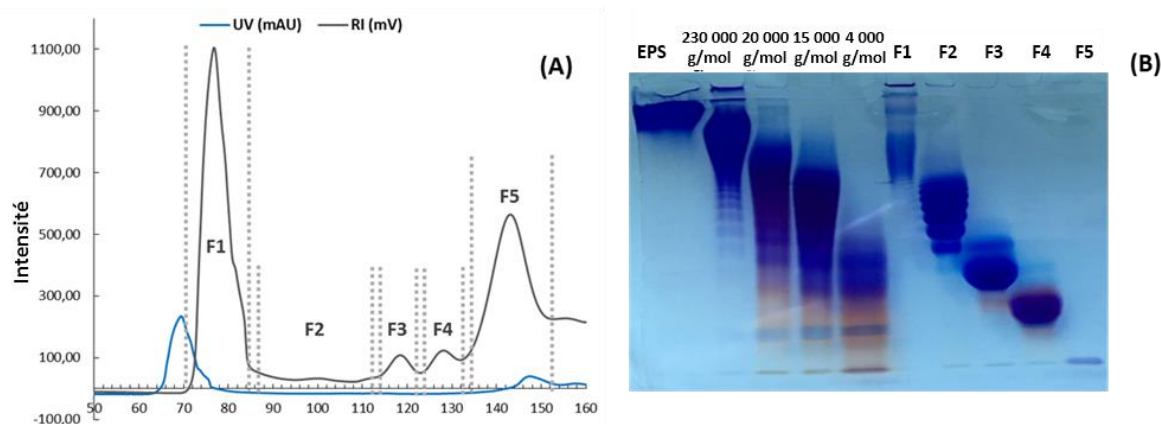


Figure 31 : Purification par chromatographie SEC de l'EPS natif dépolymérisé avec l'extrait débris cellulaires (D) pendant 63 h d'incubation. Les signaux UV et RI sont indiqués respectivement en bleu et en gris (A). Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide 20% de l'EPS natif, de quatre dérivés standards obtenus par voie chimique ayant des poids moléculaires de 230 000, 20 000, 11 500 et 4 000 g/mol, et des 5 fractions obtenues par fractionnement SEC (B).

Sur 50 mg d'EPS dépolymérisés, cinq fractions ont été obtenues après cinq cycles successifs (Figure 31). La méthode de fractionnement mise au point a montré une bonne reproductibilité car les profils des cinq chromatogrammes étaient similaires, ce qui a permis de regrouper les fractions. La majorité de l'EPS dépolymérisé a été retrouvé dans la fraction F1 (34,5 mg) et des quantités très faibles ont été obtenues dans les autres fractions F2 à F5 ( $\leq 3$  mg) (Tableau 9). Le profil obtenu par le détecteur UV, indiquait également la présence dans la fraction F1 d'autres macromolécules (glycoprotéines, lipides conjugués à des protéines, ADN...). Les fractions ont été analysées pour déterminer la pureté des fractions.

Tableau 9 : Les quantités des fractions isolées après la chromatographie d'exclusion stérique.

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5
Quantité (mg)	34,6	2,4	1,4	1,5	0,5

Les cinq fractions ont été analysées sur gel de polyacrylamide et comparées à l'EPS natif et aux dérivés standards d'EPS issus de la dépolymérisation radicalaire (Figure 31B). La fraction F1 contiendrait des dérivés polysaccharidiques de masse intermédiaire (230 000 g/mol) tandis que les fractions F2 à F4 correspondraient à des polysaccharides de plus faible poids moléculaire ayant des masses moyennes comprises entre 4 000 (F4) et 20 000 (F2) g/mol. La fraction F2 semble la plus hétérogène car plusieurs bandes sont visibles. Concernant la fraction F5, elle n'est pas nettement visible sur le gel. Seule une tache au niveau du front de migration est identifiable. Cela est principalement dû aux faibles quantités isolées dans la fraction F5 qui n'ont pas permis le dépôt d'une quantité suffisante sur le gel de polyacrylamide pour être détectable avec le colorant Stains All.

*Tableau 10 : Composition osidique (ratio molaire) et protéique (% en poids) des quatre fractions isolées après la chromatographie d'exclusion stérique ainsi que des débris cellulaires (D). (Nd : Non déterminé)*

	Composition osidique (ratio molaire)							Protéine (% en poids)
	Rha	Fuc	Man	Gal	Glc	GalA	GlcA	
<b>EPS A. infernus</b>	0,2	0,1	0,4	3,6	4,7	1,0	2,0	15,0
<b>F1</b>	1,0	0,4	0,5	0,3	1,0	0	1,6	3,1
<b>F2</b>	0	0	0	0,1	1,1	0	1,0	Nd
<b>F3</b>	0	0	0	1,0	1,6	0,2	1,0	Nd
<b>F4</b>	0	0	0	0,7	1,1	0,1	1,0	Nd
<b>Débris cellulaires (D)</b>	0,3	0,1	0	0	1,0	0	0	22,0

La composition osidique des fractions a aussi été déterminée à l'exception de la fraction F5 et comparée à la composition de l'EPS natif (Tableau 10). Les principaux monomères qui constituent l'EPS natif sont Gal, Glc, GalA et GlcA. Ces oses ont été identifiés dans toutes les fractions à l'exception du GalA, absent dans les fractions F1 et F2. En dehors des résidus typiquement retrouvés dans l'EPS natif, d'autres oses tels que le Rha et le Fuc sont présents dans la fraction F1. Ces résidus pourraient provenir de lipopolysaccharides membranaires co-extraits avec les protéines dans les débris cellulaires. Les oses Rha, Fuc et Glc sont en effet principalement détectés dans l'extrait débris cellulaires, ce qui confirme l'hypothèse de la présence des débris cellulaires dans la fraction F1.

L'analyse structurale des produits dépolymérisés par l'extrait protéique débris cellulaires D a été réalisée par spectrométrie de masse en collaboration avec la plateforme BIBS de l'INRA Nantes. Les fractions F2, F3, F4 et F5 ont été caractérisées par chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse (UHPLC-MS). Les structures hypothétiques ont été envisagées en accord avec la structure de l'unité répétitive de l'EPS et les structures élucidées lors des travaux antérieurs (Tableau 11).<sup>72,103</sup> La fraction F5 contiendrait un octasaccharide doublement sulfaté. Cette

structure contient une double liaison sur l'unité GalA en C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, ce qui peut être attribué à une activité enzymatique de type lyase dans les débris cellulaires. Les fractions F4, F3 et F2 contiennent respectivement un dimère, un trimère et un mélange de tétra-, penta et hexamère de l'octasaccharide décrit pour la fraction F5. D'autres espèces saccharidiques comprenant un nombre d'hexose inférieur ont également été identifiées. Ces espèces seraient issues de l'action d'une activité de type hydrolase dans les débris cellulaires.

Tableau 11 : Analyse par UHPLC-MS des fractions obtenues après la purification par chromatographie SEC de l'EPS natif dépolymérisé avec l'extrait débris cellulaires D. Les structures ont été schématisées en accord avec le « Symbol Nomenclature for Glycan » (SNFG).<sup>241</sup>

	Structure	Masse monoisotopique (théorique, Da)	Temps de rétention (min)	m/z	Adduit
F5		1498,27	2,73	748,13	[M-2H] <sup>2-</sup>
	Espèces supposées : A - (1 ⇒ 3 hexoses)	1336,22 ⇒ 1012,12	2,76 ⇒ 2,88	667,10 ⇒ 505,05	[M-2H] <sup>2-</sup>
F4		2996,55	7,00	1031,55	[M-4H+1IPR] <sup>3-</sup>
	Espèces supposées : B - (1 ⇒ 4 hexoses)	2834,5 ⇒ 2348,34	7,05 ⇒ 7,21	977,52 ⇒ 815,47	[M-4H+1IPR] <sup>3-</sup>
F3		4494,82	8,56	1173,26	[M-6H+2IPR] <sup>4+</sup>
	Espèces supposées : C - (1 ⇒ 5 hexoses)	4332,77 ⇒ 3684,56	8,59 ⇒ 8,84	1132,75 ⇒ 970,69	[M-6H+2IPR] <sup>4+</sup>
F2		5993,10	9,69	1598,38	[M-8H+4IPR] <sup>4+</sup>
	Espèces supposées : D - (1 ⇒ 5 hexoses)	5831,04 ⇒ 5182,83	9,69 ⇒ 9,79	1557,88 ⇒ 1395,82	[M-8H+4IPR] <sup>4+</sup>
F2		7491,37	10,27	1598,40	[M-10H+5IPR] <sup>5-</sup>
	Espèces supposées : E - (1 ⇒ 7 hexoses)	7329,32 ⇒ 6357,00	10,29 ⇒ 10,43	1565,98 ⇒ 1371,51	[M-10H+5IPR] <sup>5-</sup>

	8989,64	10,77	1598,40	[M-12H+6IPR] <sup>6-</sup>
Espèces supposées : F - (1 ⇒ 2 hexoses)	8827,59 ⇒ 8665,54	10,79 ⇒ 10,80	1571,39 ⇒ 1544,36	[M-12H+6IPR] <sup>6-</sup>

Pour confirmer les structures détectées en UHPLC-MS, l'oligosaccharide observé dans la fraction F5 a été étudié par Dissociation par Transfert de Charge d'hélium en tandem avec la spectrométrie de masse (He-CTD MS/MS)<sup>242</sup> en mode de ionisation négatif<sup>243</sup>. La structure complète de l'octasaccharide observé sur le spectre He-CTD MS/MS a été élucidée mis à part la liaison glycosidique (1,3 ou 1,4) entre les résidus Gal et GalA à la fin du fragment. Les informations MS/MS indiquent : (1) l'implication d'une lyase lors de la dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif car une insaturation est observée sur le résidu GalA (indiqué par le C<sub>4</sub>, <sup>0,2</sup>A<sub>4</sub>, Z<sub>3</sub> et Y<sub>3</sub>) ; (2) la présence d'un deuxième groupement sulfate en position C<sub>6</sub> du résidu Gal de la chaîne latérale (indiqué par les fragments intracycliques <sup>0,4</sup>X<sub>5</sub>'', <sup>3,5</sup>X<sub>5</sub> and <sup>1,5</sup>X<sub>5</sub>, selon la nomenclature de Domon et Costello.<sup>244</sup> Ce groupement sulfate remplace le résidu Glc, initialement présent sur la structure élucidée de l'unité répétitive de l'EPS.<sup>72</sup> Ce deuxième groupement sulfate devait exister dans l'EPS natif et il est possible que les deux variantes de l'unité répétitive coexistent. La première unité répétitive correspond au nonasaccharide et la seconde serait l'octasaccharide doublement sulfaté caractérisé lors de cette étude.



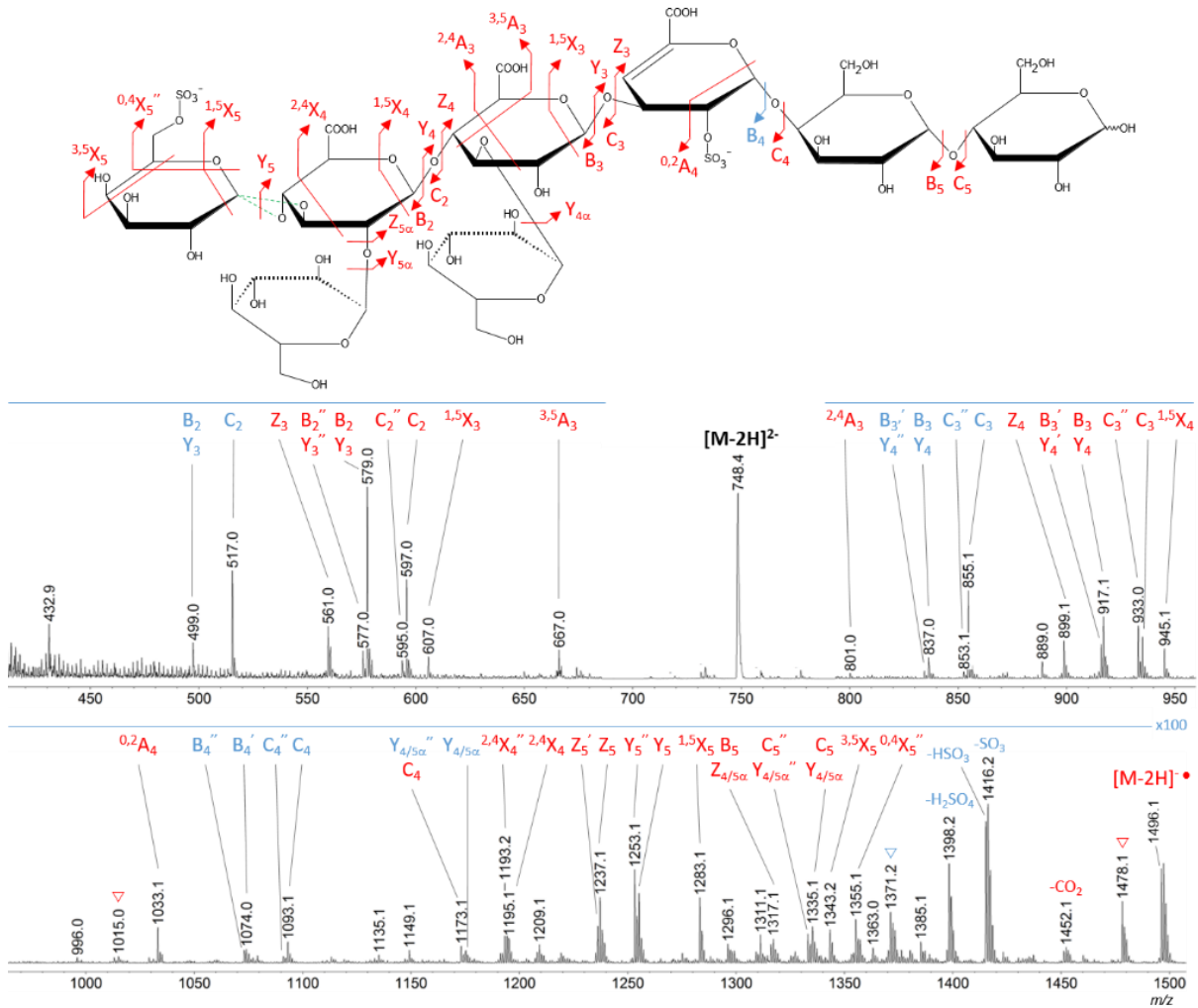


Figure 32 : Spectre MS/MS de la structure de l'octasaccharide isolé comme l'espèce  $[M-2H]^{2-}$  au rapport  $m/z$  748.4 en mode négatif. Le code couleur est le suivant : fragments sans perte de sulfate en rouge, fragments avec un sulfate en moins en bleu et la perte d'une molécule d'eau est symbolisée par un triangle.

Lors de l'étude cinétique, les débris cellulaires ont présenté une activité enzymatique significative sur l'EPS natif en présence du tampon Tris HCl et du surfactant Tween 20. Appliquées à des quantités plus importantes d'EPS, ces conditions ont permis de générer des populations de chaînes de poids moléculaires différents. L'analyse par spectrométrie de masse des fractions isolées a montré que l'activité lyase dans l'extrait débris cellulaires était responsable de la dépolymérisation de l'EPS natif. Si les résultats obtenus sur les activités enzymatiques sont en accord avec la précédente étude de Zykwincka *et al.*<sup>103</sup>, les enzymes actives ne sont pas retrouvées systématiquement dans le même extrait protéique. En effet, l'activité enzymatique avait principalement été identifiée dans le lysat. Cela suggère que l'étape de solubilisation d'enzymes pendant la lyse cellulaire n'est pas totalement maîtrisée et que l'activité enzymatique peut être présente soit dans le lysat (L) soit dans les débris cellulaires (D). Pour optimiser l'activité des enzymes de dépolymérisation d'*A. infernus*, deux nouveaux extraits ont été préparés afin d'améliorer à la fois la reproductibilité et le rendement de l'étape de dépolymérisation de l'EPS. Ces deux nouveaux extraits sont le mélange débris cellulaires et lysat (D+L)

et les cellules lysées (CL). Les résultats obtenus avec ces deux extraits sont présentés dans le paragraphe suivant.

### 2.3 Etude de l'activité enzymatique dans le mélange d'extraits cellulaires et les cellules lysées

Afin de tester l'effet du mélange des deux extraits cellulaires sur le procédé de dépolymérisation, deux nouveaux extraits protéiques ont été préparés : le mélange contenant les débris cellulaires et l'extrait intracellulaire (D+L), ainsi que les cellules lysées (CL). Le mélange (D+L) devrait combiner l'activité détectée dans les deux extraits protéiques testés préalablement de manière isolée. Quant aux cellules lysées obtenues directement après l'étape de lyse cellulaire (sans étape de centrifugation), elles auraient l'avantage de fournir un mélange enzymatique efficace pour la dépolymérisation de l'EPS à plus grande échelle. Ainsi pour valider tout d'abord l'obtention d'extraits ou de mélange enzymatique à une échelle pilote, une culture de la bactérie *A. infernus* a été réalisée en fermenteur (20 L). Le lysat (L), les débris cellulaires (D) et les cellules lysées (CL) ont été préparés à partir du culot bactérien issu de cette fermentation, en suivant le même protocole mis au point précédemment en culture en Erlenmeyer. L'EPS natif a ensuite été incubé à 30°C pendant 72 h avec le mélange contenant les débris cellulaires et lysat (D+L) ou les cellules lysées (CL). La dépolymérisation a été suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 27% (Figure 33).

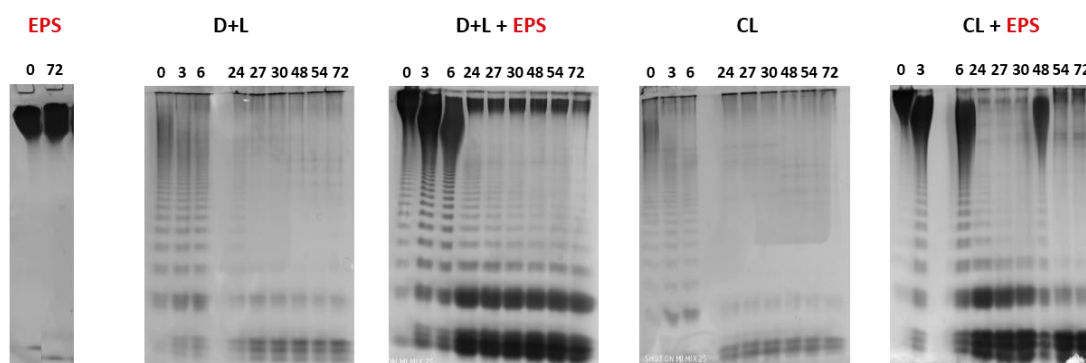


Figure 33 : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à 27% de la dépolymérisation de l'EPS natif au cours du temps avec le mélange débris cellulaires + lysat (D+L) ou les cellules lysées (CL) obtenus à partir de la culture d'*A. infernus* réalisée en fermenteur.

Les deux extraits étaient actifs sur l'EPS natif. Néanmoins, la bande caractéristique de l'EPS restait faiblement présente à la fin du temps d'incubation avec le mélange (D+L) tandis qu'elle avait

totallement disparu avec les cellules lysées. L'extrait contenant les cellules lysées montrait l'activité enzymatique de dépolymérisation la plus élevée.

En conclusion, la dépolymérisation de l'EPS natif est plus efficace avec les extraits protéiques obtenus à l'échelle pilote à partir d'une culture en fermenteur qu'avec ceux produits à partir d'une culture en Erlenmeyer. Parmi les extraits protéiques, l'extrait contenant les cellules lysées s'est avéré le plus actif pour dépolymériser l'EPS natif. De plus, sa préparation ne nécessite pas d'étape de centrifugation contrairement au mélange D+L, ce qui pourrait être utile pour un développement industriel.

Suite à ce travail sur l'EPS natif, la dépolymérisation enzymatique des dérivés GAG-mimétiques obtenus par voie chimique a été réalisée avec des cellules lysées afin d'obtenir des séquences oligosaccharidiques homogènes et mettre en évidence des modifications éventuelles induites par le procédé chimique. Les enzymes pourraient remplacer avantageusement l'hydrolyse acide généralement utilisée pour débiter l'analyse structurale des polysaccharides mais qui a pour inconvénient de produire des fragments hétérogènes en taille et de modifier certains motifs structuraux de l'unité répétitive (désulfatation, perte de monosaccharides...).

### **3 Dépolymérisation enzymatique des dérivés GAG-mimétiques obtenus par voie chimique**

Jusqu'à présent la dépolymérisation enzymatique a été étudiée uniquement sur l'EPS natif. Afin de développer une stratégie performante pour élucider la structure complexe des dérivés de l'EPS obtenus par voie chimique, les activités enzymatiques mises en évidence dans ce travail de thèse sont utilisées pour isoler des oligosaccharides homogènes conservant une structure presque intacte, pouvant être aisément caractérisés en spectrométrie de masse et RMN et ainsi faciliter l'identification des motifs structuraux par la constitution d'une librairie pour l'analyse structurale. Trois dérivés EPS ont été utilisés. Deux dérivés d'EPS dépolymérisés par voie radicalaire de 200 000 g/mol et 20 000 g/mol, ainsi qu'un EPS dépolymérisé par voie radicalaire de 20 000 g/mol et sursulfaté chimiquement ont été incubés en présence des cellules lysées (CL) d'*A. infernus* issues d'une production réalisée en Erlenmeyer. Le dérivé d'EPS à 200 000 g/mol naturellement faiblement sulfaté a été incubé à 30°C pendant 96 h. Les deux autres dérivés d'EPS à 20 000 g/mol (un naturellement faiblement sulfaté (10%) et un autre sur-sulfaté (40%)) ont été incubés à 30°C pendant 168 h. La dépolymérisation de ces dérivés a été suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 34).

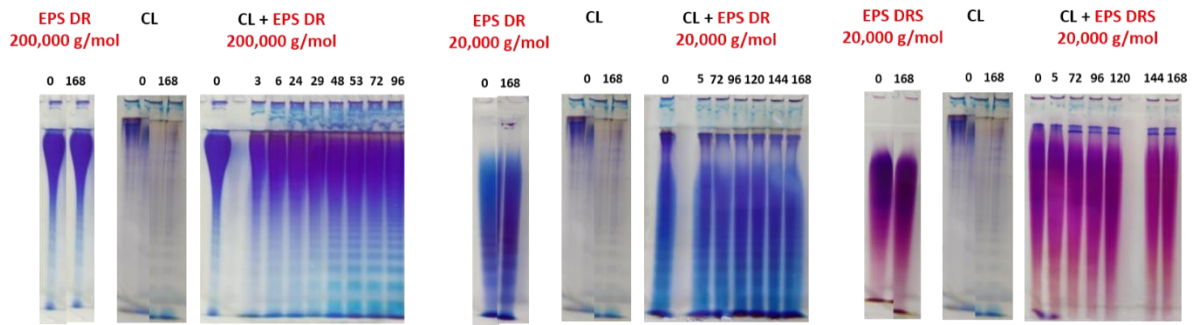


Figure 34 : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide de la dépolymérisation du dérivé d'EPS 200 000 g/mol faiblement sulfaté et des deux dérivés d'EPS 20 000 g/mol, respectivement faiblement et hautement sulfatés, au cours du temps avec les cellules lysées (CL).

En présence des cellules lysées, le dérivé d'EPS à 200 000 g/mol naturellement faiblement sulfaté est partiellement dépolymérisé. En revanche, aucune dépolymérisation n'est observée pour les deux dérivés d'EPS à 20 000 g/mol. Probablement, la taille des dérivés d'EPS (20 000 g/mol) mais aussi les modifications structurales apportées lors des étapes chimiques de dépolymérisation radicalaire (perte de résidus osidiques) et de sur-sulfatation (présence de groupements sulfates additionnels) ne permettent pas une bonne reconnaissance enzymes/substrats. Des travaux supplémentaires sont à réaliser sur le dérivé 200 000 g/mol pour optimiser sa dépolymérisation et obtenir des oligosaccharides avec un bon rendement. L'utilisation des cellules lysées issues de la fermentation pilote est à envisager.

## 4 Conclusion

L'objectif de cette partie de la thèse était de produire des oligosaccharides et des dérivés de bas poids moléculaire à partir de l'EPS GY785 natif de très haut poids moléculaire (2 000 000 g/mol) par dépolymérisation enzymatique. Actuellement, les dérivés bioactifs de l'EPS d'*A. infernus* sont préparés par dépolymérisation radicalaire. Ce procédé permet d'obtenir des dérivés homogènes en taille mais probablement hétérogènes en structure avec une perte possible des résidus osidiques de la chaîne latérale. Le développement d'un nouveau procédé biotechnologique de dépolymérisation en utilisant les enzymes produites par la bactérie *A. infernus* est à poursuivre pour produire des dérivés bioactifs plus homogènes et conservant la structure atypique de l'EPS natif, ces enzymes permettant de dépolymériser le polysaccharide par clivage spécifique des liaisons glycosidiques. La dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif avait déjà fait l'objet d'une étude.<sup>103</sup> Plusieurs enzymes commerciales avaient été testées sur l'EPS natif mais aucune d'entre elles n'a permis de dépolymériser l'EPS. Les seules enzymes capables d'agir sur l'EPS natif d'*A. infernus* sont des enzymes produites par cette même bactérie. Des activités lyase, hydrolase et sulfatase, avaient déjà été identifiées dans l'extrait intracellulaire (lysate) de la bactérie.

Lors de ce travail de thèse, deux études de dépolymérisation enzymatique ont été menées sur l'EPS natif et ses dérivés. Lors de la première étude, les meilleures conditions de cinétique enzymatique et de préparation des extraits protéiques, lysate (L) et débris cellulaires (D), ont été déterminées. La dépolymérisation enzymatique était optimale lorsque l'EPS natif était incubé avec les débris cellulaires à 30°C pendant au moins 22 h, en présence du Tween 20 dans le tampon Tris HCl à pH 8. Les débris cellulaires ont été isolés d'une culture d'*A. infernus* réalisée en milieu Zobell contenant de la tryptone et du glucose, et après un temps d'incubation de 48 h à 30°C. En suivant ce protocole, des dérivés ayant des poids moléculaires compris entre 4 000 et 230 000 g/mol ont été produits par dégradation enzymatique. Un fractionnement reproductible a été obtenu par chromatographie d'exclusion stérique pour purifier les dérivés produits. L'analyse des dérivés par spectrométrie de masse a permis d'identifier un nouveau motif de répétition octasaccharidique doublement sulfaté obtenu après l'action d'une lyase (Figure 35). En effet, la double liaison caractéristique résultant de l'action de cette enzyme a été identifiée en C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> du résidu GalA.

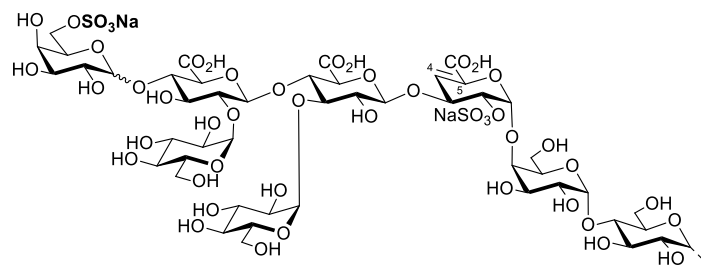


Figure 35 : Unité de répétition octasaccharidique et portant deux groupements sulfate observée en spectrométrie de masse.

Ce résultat laisse penser que deux motifs de répétition co-existeraient sur la molécule d'EPS d'*A. infernus* : le nonasaccharide sulfaté sur une seule position et l'octasaccharide doublement sulfaté.

Les extraits protéiques débris cellulaires et lysat utilisés en mélange (D+L) et les cellules lysées (CL) ont également été étudiés afin d'optimiser la dépolymérisation de l'EPS natif. L'extrait protéique contenant les cellules lysées s'est finalement avéré efficace pour dépolymériser l'EPS.

La seconde étude portait sur la dépolymérisation enzymatique des dérivés GAG-mimétiques de l'EPS afin d'étudier la structure fine de ces dérivés bioactifs. La dépolymérisation enzymatique de deux dérivés d'EPS de 200 000 g/mol et 20 000 g/mol faiblement sulfatés, et d'un EPS de 20 000 g/mol hautement sulfaté a été étudiée avec les cellules lysées. Cet extrait n'a pas permis de dépolymériser les dérivés de 20 000 g/mol. Ces dérivés sont probablement trop modifiés pour être reconnus par les enzymes. Le dérivé de 200 000 g/mol a pu être dépolymérisé partiellement par les cellules lysées ce qui suggère que les modifications structurales sont moins importantes et n'empêchent pas la reconnaissance enzyme/substrat.

Par ailleurs, la raison de la présence dans la bactérie *A. infernus* d'enzymes capables de dépolymériser son propre EPS n'est pas claire. En effet, le laboratoire EM<sup>3</sup>B a montré que cette bactérie n'était pas capable d'utiliser l'EPS qu'elle produit pour sa croissance. De plus, l'activité enzymatique n'est détectée que lorsque la bactérie croît dans des conditions favorables à la production de l'EPS, notamment dans un milieu de culture très riche en glucose (30 g/l). Cette activité associée aux membranes serait donc liée à la production de l'EPS par la bactérie. Ainsi, ces enzymes pourraient lutter contre une accumulation intracellulaire de l'EPS.

## Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse a fait l'objet d'une collaboration entre les laboratoires EM<sup>3</sup>B et CEISAM dans le cadre du réseau interrégional Bretagne-Pays de la Loire "GlycoOuest". L'objectif de la thèse était de développer une stratégie pour élucider la structure fine des dérivés bioactifs de l'EPS *A. infernus*. Actuellement, les dérivés GAG-mimétiques de l'EPS sont obtenus par dépolymérisation radicalaire. Or, ce procédé chimique peut modifier la structure des dérivés avec notamment la perte de certains oses sur la chaîne latérale. Par conséquent, nous avons souhaité préparer des oligosaccharides constitutifs de l'unité répétitive de l'EPS soit par synthèse organique soit par dépolymérisation enzymatique. Ces oligosaccharides une fois bien caractérisés faciliteront l'analyse structurale des dérivés GAG-mimétiques.

Nous souhaitons constituer une base de données analytique de fragments constitutifs de l'unité répétitive. La synthèse organique a été choisie afin de préparer des dérivés bien définis et purs. Nous nous sommes intéressés à des fragments présents dans le pentasaccharide central de l'unité répétitive. L'objectif était de préparer le trisaccharide de la chaîne principale. Ainsi, les trois unités **Glc**, **GalA** et **Gal** ont été préparées (Schéma 66). L'unité **Glc** a été synthétisée par peracétylation du D-(+)-glucose suivie de l'insertion du GA en position anomérique. En suivant cette méthode, le bromure de glucopyranosyle **28a** et les dérivés trichloroacétimidate **28b** et *N*-phényltrifluoroacétimidate **28c** ont été obtenus. Les groupements acétates ont été choisis pour s'assurer de la stéréosélectivité 1,2-*trans* lors du couplage glycosidique. Les unités **GalA** et **Gal** sont issues de l'intermédiaire commun 4,6-*O*-benzylidène **31** préparé à partir du D-(+)-galactose. L'unité **Gal** a été préparée en série -SPh et -OAll. L'unité **GalA** a été préparée en série -SPh car ce groupement est un groupement activant. Nous avons fait le choix de préparer l'unité **Gal** en série -OAll pour optimiser les conditions réactionnelles des couplages glycosidiques sans être gênés par un risque d'homocouplage.

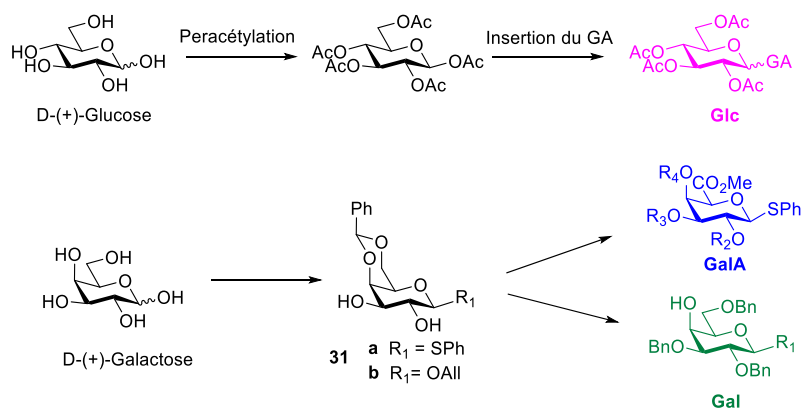


Schéma 66 : Préparation des unités **Glc**, **GalA** et **Gal**.

La synthèse du trisaccharide de la chaîne principale a été envisagée à partir du disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA ou du disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal (Schéma 67). La synthèse de ces deux disaccharides a été étudiée en suivant deux stratégies : couplage direct avec l'unité GalA ou couplage avec un analogue neutre de cette unité suivi de l'étape d'oxydation. Finalement, la seconde stratégie nous a permis d'isoler le disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA et un précurseur neutre de  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal.

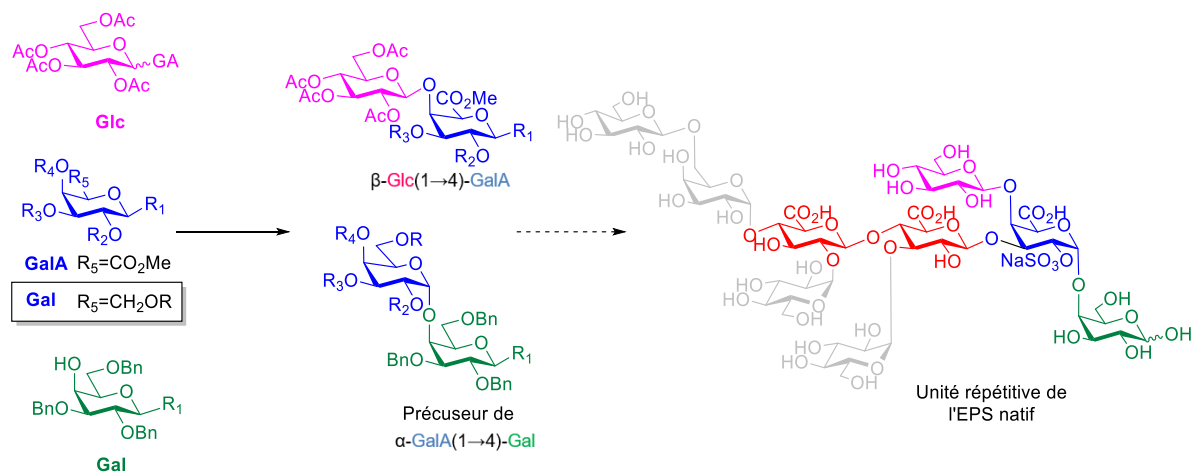


Schéma 67 : Schéma bilan des unités préparées durant la thèse.

En parallèle l'unité diacide glucuronique diGlcA a également été préparée. Sa synthèse avait été étudiée par l'oxydation de thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **62** et de son analogue protégé **63** (Schéma 68).

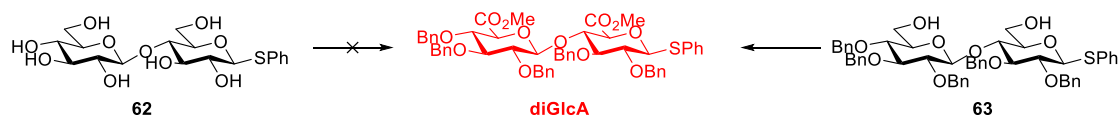


Schéma 68 : Bilan sur la préparation de l'unité diGlcA.

Lors des essais d'oxydation du thiophénylcellobiopyranoside déprotégé **62**, seul le produit d'oxydation du soufre a été isolé. La seconde stratégie a été concluante, notamment grâce aux conditions d'oxydation/estérification optimisées lors de la préparation l'unité GalA. Ces conditions d'oxydation/estérification nous ont également été utiles lors de la préparation du disaccharide  $\beta$ -Glc(1 $\rightarrow$ 4)-GalA.

La synthèse du trisaccharide de la chaîne principale reste à terminer. Il serait intéressant, en particulier, de continuer à développer les conditions de glycosylation avec l'unité GalA afin d'aboutir plus rapidement au trisaccharide ciblé. La préparation du disaccharide  $\alpha$ -GalA(1 $\rightarrow$ 4)-Gal serait également à étudier avec l'unité Gal en série -SPh comme accepteur de glycosyle. Cela permettrait



d'avoir une synthèse plus rapide comme les unités **GalA** et **Gal** en série -SPh possèdent le même intermédiaire commun. Une fois les conditions de couplage glycosidique optimisées, la préparation du trisaccharide triacide  $\beta$ -**diGlcA**(1 $\rightarrow$ 3)-**GalA** pourra aussi être envisagée. Ce motif trisaccharide, assez atypique, serait une référence analytique intéressante car il est conservé lors de la dépolymérisation enzymatique. Avant d'envisager le couplage vers les trisaccharides, la déprotection des deux disaccharides **diGlcA** et  $\beta$ -**Glc**(1 $\rightarrow$ 4)-**GalA** donnerait accès aux deux premières références analytiques de la base de données envisagée.

A propos de l'unité **diGlcA**, les essais d'oxydation du cellobiose déprotégé serait à poursuivre. Toutefois, un autre groupement protecteur de la position anomérique devra être introduit. Le groupement *O*-Allyle pourrait être choisi, d'autant plus que nous avons déjà étudié son introduction lors de la préparation de l'unité **Gal 30** en série -OAll.

Dans la seconde partie de cette étude, des oligosaccharides mais aussi des dérivés de bas poids moléculaire ont été préparés par dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif. Nous avons approfondi des travaux précédemment menés au sein du laboratoire EM<sup>3</sup>B. Des enzymes de dépolymérisation enzymatiques avaient été détectées dans les extraits solubles (lysats) de la bactérie *A. infernus*. Lors des travaux actuels, l'activité enzymatique a principalement été identifiée dans les extraits insolubles (débris cellulaires). En incubant l'EPS natif avec les débris cellulaires, différentes tailles de chaînes saccharidiques ont pu être isolées. La dépolymérisation observée est principalement due à une activité lyase. Les produits issus de cette dépolymérisation ont été fractionnés. Un octasaccharide doublement sulfaté a été caractérisé par spectrométrie de masse dans une des fractions (Figure 36). Cet octasaccharide correspond à l'unité répétitive décrite par Roger O. en 2004. Cependant le galactose de la chaîne latérale est substitué par un groupement sulfate en C<sub>6</sub> au lieu d'un glucose. Le nonasaccharide monosulfaté avec un glucose porté par le galactose de la chaîne latérale (R=Glc) et l'octasaccharide doublement sulfaté avec un groupement sulfate porté par ce même galactose (R=SO<sub>3</sub>Na) coexisteraient dans l'EPS.

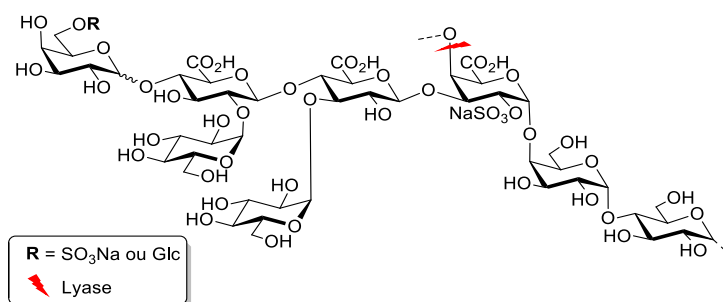


Figure 36 : Structure de l'unité répétitive de l'EPS d'*A. infernus* présente sous les deux formes nonasaccharide et octasaccharide.

Une autre préparation d'extrait protéique a été étudiée au cours des travaux de thèse. Ce sont les cellules lysées de la bactérie d'*A. infernus*. Cet extrait s'est montré efficace pour dépolymériser l'EPS natif. De plus sa préparation est plus simple et moins coûteuse. Cette préparation serait plus facile à utiliser lors de la mise au point d'un procédé biotechnologique pour obtenir des dérivés d'EPS dépolymérisés par voie enzymatique. Ainsi, la dépolymérisation enzymatique de l'EPS et de ces dérivés est à approfondir avec les cellules lysées. Il serait nécessaire à l'avenir d'isoler et de caractériser les dérivés produits, notamment grâce aux données structurales obtenues au cours de cette étude.

La purification des enzymes est également à envisager pour améliorer le procédé de dégradation enzymatique. Cependant, leur extraction des débris membranaires devrait être optimisée pour les solubiliser. Actuellement, le laboratoire envisage de cloner et d'exprimer les gènes codant pour ces enzymes. Le génome de la bactérie *A. infernus* est en effet séquencé et les gènes candidats pourraient, dans un premier temps, être identifiés *in silico*.

Ce travail de thèse ouvre la voie vers l'utilisation des enzymes produites par *A. infernus* pour obtenir des dérivés d'EPS GAG-mimétiques de nouvelle génération plus homogènes et mieux caractérisés. Evidemment, l'activité biologique de ces dérivés de nouvelle génération sera à étudier pour comparer les deux procédés de dépolymérisation chimique et enzymatique.

## Bibliographie

- (1) Ullrich, M. S. *Bacterial Polysaccharides - Current Innovations and Future Trends*; Caister Academic Press, 2009. <https://doi.org/10.13140/2.1.1992.0321>.
- (2) Leung, M. Y. K.; Liu, C.; Koon, J. C. M.; Fung, K. P. Polysaccharide Biological Response Modifiers. *Immunol. Lett.* **2006**, *105* (2), 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.01.009>.
- (3) Roberts, I. S. The Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide Production in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50* (1), 285–315. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.285>.
- (4) Le Costaouëc, T. Elucidation Structurale et Modifications d'un Exopolysaccharide Bactérien d'origine Hydrothermale, Université de Brest, 2010.
- (5) Öner, E. T. Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass. In *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*; Fang, Z., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 35–56. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-32735-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32735-3_2).
- (6) Delbarre-Ladrat, C.; Siquin, C.; Lebellenger, L.; Zykwinska, A.; Collic-Jouault, S. Exopolysaccharides Produced by Marine Bacteria and Their Applications as Glycosaminoglycan-like Molecules. *Front. Chem.* **2014**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00085>.
- (7) Freitas, F.; Alves, V. D.; Reis, M. A. M. Advances in Bacterial Exopolysaccharides: From Production to Biotechnological Applications. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>.
- (8) Galindo, E.; Peña, C.; Núñez, C.; Segura, D.; Espín, G. Molecular and Bioengineering Strategies to Improve Alginate and Polydihydroxyalkanoate Production by *Azotobacter Vinelandii*. *Microb. Cell Factories* **2007**, *6* (1), 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>.
- (9) Cimini, D.; Rosa, M. D.; Schiraldi, C. Production of Glucuronic Acid-Based Polysaccharides by Microbial Fermentation for Biomedical Applications. *Biotechnol. J.* **2012**, *7* (2), 237–250. <https://doi.org/10.1002/biot.201100242>.
- (10) Prajapati, V. D.; Jani, G. K.; Zala, B. S.; Khutliwala, T. A. An Insight into the Emerging Exopolysaccharide Gellan Gum as a Novel Polymer. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93* (2), 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.030>.
- (11) Shungu, D.; Valiant, M.; Tutlane, V.; Weinberg, E.; Weissberger, B.; Koupal, L.; Gadebusch, H.; Stapley, E. GELRITE as an Agar Substitute in Bacteriological Media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46* (4), 840.
- (12) Praillet, C.; Grimaud, J.; Lortat-Jacob, H. Les protéoglycanes. (II) Rôles en pathologie. *médecine/sciences* **1998**, *14* (4), 421. <https://doi.org/10.4267/10608/1057>.
- (13) Praillet, C.; Grimaud, J.; Lortat-Jacob, H. Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques? *médecine/sciences* **1998**, *14* (4), 412. <https://doi.org/10.4267/10608/1056>.
- (14) Gandhi, N. S.; Mancera, R. L. The Structure of Glycosaminoglycans and Their Interactions with Proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72* (6), 455–482. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x>.
- (15) Capila, I.; Linhardt, R. J. Heparin–Protein Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (3), 390–412. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020201\)41:3<390::AID-ANIE390>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020201)41:3<390::AID-ANIE390>3.0.CO;2-B).
- (16) Mulloy, B.; Linhardt, R. J. Order out of Complexity – Protein Structures That Interact with Heparin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11* (5), 623–628. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00257-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00257-8).
- (17) Linhardt, R. J. 2003 Claude S. Hudson Award Address in Carbohydrate Chemistry. Heparin: Structure and Activity. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (13), 2551–2564. <https://doi.org/10.1021/jm030176m>.
- (18) Guerrini, M.; Beccati, D.; Shriver, Z.; Naggi, A.; Viswanathan, K.; Bisio, A.; Capila, I.; Lansing, J. C.; Guglieri, S.; Fraser, B.; et al. Oversulfated Chondroitin Sulfate Is a Contaminant in Heparin Associated with Adverse Clinical Events. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (6), 669–675. <https://doi.org/10.1038/nbt1407>.

- (19) Meuleman, D. G.; Hobbelen, P. M. J.; van Dedem, G.; Moelker, H. C. T. A Novel Anti-Thrombotic Heparinoid (ORG 10172) Devoid of Bleeding Inducing Capacity: A Survey of Its Pharmacological Properties in Experimental Animal Models. *Thromb. Res.* **1982**, *27* (3), 353–363. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(82\)90082-2](https://doi.org/10.1016/0049-3848(82)90082-2).
- (20) A Current View on Inflammation. *Nat. Immunol.* **2017**, *18* (8), 825. <https://doi.org/10.1038/ni.3798>.
- (21) Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. *Oncotarget* **2018**, *9* (6), 7204. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.
- (22) Morla, S. Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (8), 1963. <https://doi.org/10.3390/ijms20081963>.
- (23) Tyrrell, D. J.; Horne, A. P.; Holme, K. R.; Preuss, J. M.; Page, C. P. Heparin in Inflammation: Potential Therapeutic Applications beyond Anticoagulation. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* **1999**, *46*, 151–208.
- (24) Gavina, M.; Luciani, A.; Vilella, V. R.; Esposito, S.; Ferrari, E.; Bressani, I.; Casale, A.; Bruscia, E. M.; Maiuri, L.; Raia, V. Nebulized Hyaluronan Ameliorates Lung Inflammation in Cystic Fibrosis Mice. *Pediatr. Pulmonol.* **2013**, *48* (8), 761–771. <https://doi.org/10.1002/ppul.22637>.
- (25) Ruppert, S. M.; Hawn, T. R.; Arrigoni, A.; Wight, T. N.; Bollyky, P. L. Tissue Integrity Signals Communicated by High-Molecular Weight Hyaluronan and the Resolution of Inflammation. *Immunol. Res.* **2014**, *58* (2), 186–192. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8495-2>.
- (26) Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018 - pr263\_F.pdf [https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263\\_F.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_F.pdf) (accessed Aug 27, 2019).
- (27) Köwitsch, A.; Zhou, G.; Groth, T. Medical Application of Glycosaminoglycans: A Review. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12* (1), e23–e41. <https://doi.org/10.1002/term.2398>.
- (28) Vlodavsky, I.; Ilan, N.; Naggi, A.; Casu, B. Heparanase: Structure, Biological Functions, and Inhibition by Heparin-Derived Mimetics of Heparan Sulfate. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13* (20), 2057–2073. <https://doi.org/10.2174/138161207781039742>.
- (29) Letourneur, D.; Bordenave, L. Ingénierie tissulaire - Une approche multidisciplinaire. *médecine/sciences* **2017**, *33* (1), 46–51. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301008>.
- (30) Nagira, T.; Nagahata-Ishiguro, M.; Tsuchiya, T. Effects of Sulfated Hyaluronan on Keratinocyte Differentiation and Wnt and Notch Gene Expression. *Biomaterials* **2007**, *28* (5), 844–850. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.041>.
- (31) Macdonald, M. L.; Rodriguez, N. M.; Shah, N. J.; Hammond, P. T. Characterization of Tunable FGF-2 Releasing Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (8), 2053–2059. <https://doi.org/10.1021/bm100413w>.
- (32) Ren, X.; Weisgerber, D. W.; Bischoff, D.; Lewis, M. S.; Reid, R. R.; He, T.-C.; Yamaguchi, D. T.; Miller, T. A.; Harley, B. A. C.; Lee, J. C. Nanoparticulate Mineralized Collagen Scaffolds and BMP-9 Induce a Long-Term Bone Cartilage Construct in Human Mesenchymal Stem Cells. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (14), 1821–1830. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600187>.
- (33) Kovensky, J.; Grand, E.; Uhrig, M. L. Applications of Glycosaminoglycans in the Medical, Veterinary, Pharmaceutical, and Cosmetic Fields. In *Industrial Applications of Renewable Biomass Products: Past, Present and Future*; Goyanes, S. N., D'Accorso, N. B., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 135–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-61288-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-61288-1_5).
- (34) Kim, M.; Erickson, I. E.; Choudhury, M.; Pleshko, N.; Mauck, R. L. Transient Exposure to TGF-β3 Improves the Functional Chondrogenesis of MSC-Laden Hyaluronic Acid Hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2012**, *11*, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.03.006>.
- (35) Valcarcel, J.; Novoa-Carballal, R.; Pérez-Martín, R. I.; Reis, R. L.; Vázquez, J. A. Glycosaminoglycans from Marine Sources as Therapeutic Agents. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35* (6), 711–725. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.008>.
- (36) Vázquez, J.; Rodríguez-Amado, I.; Montemayor, M.; Fraguas, J.; González, M.; Murado, M. Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste

- Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes: A Review. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (12), 747–774. <https://doi.org/10.3390/md11030747>.
- (37) Waard, P. de; Vliegenthart, J. F.; Harada, T.; Sugahara, K. Structural Studies on Sulfated Oligosaccharides Derived from the Carbohydrate-Protein Linkage Region of Chondroitin 6-Sulfate Proteoglycans of Shark Cartilage. II. Seven Compounds Containing 2 or 3 Sulfate Residues. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (9), 6036–6043.
- (38) Jo, J.-H.; Do, J.-R.; Kim, Y.-M.; Kim, D.-S.; Lee, T.-K.; Kim, S.-B.; Cho, S.-M.; Kang, S.-N.; Park, D. C. Optimization of Shark (*Squatina*) Oculata Cartilage Hydrolysis for the Preparation of Chondroitin Sulfate. 5.
- (39) Alonso, A. A.; Antelo, L. T.; Otero-Muras, I.; Pérez-Gálvez, R. Contributing to Fisheries Sustainability by Making the Best Possible Use of Their Resources: The BEFAIR Initiative. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21* (11), 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.011>.
- (40) Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar. Drugs* **2011**, *9* (2), 196–223. <https://doi.org/10.3390/md9020196>.
- (41) Lahaye, M.; Robic, A. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (6), 1765–1774. <https://doi.org/10.1021/bm061185q>.
- (42) Kidgell, J. T.; Magnusson, M.; de Nys, R.; Glasson, C. R. K. Ulvan: A Systematic Review of Extraction, Composition and Function. *Algal Res.* **2019**, *39*, 101422. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101422>.
- (43) Sinquin, C.; Collic-Jouault, S. Les polysaccharides marins et leurs applications dans le domaine de la santé. 20.
- (44) Deniaud-Bouët, E.; Hardouin, K.; Potin, P.; Kloareg, B.; Hervé, C. A Review about Brown Algal Cell Walls and Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides: Cell Wall Context, Biomedical Properties and Key Research Challenges. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *175*, 395–408. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.082>.
- (45) Bouissil, S.; Pierre, G.; Alaoui-Talibi, Z. E.; Michaud, P.; El Modafar, C.; Delattre, C. Applications of Algal Polysaccharides and Derivatives in Therapeutic and Agricultural Fields. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25* (11), 1187–1199. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190425162729>.
- (46) Fitton, J.; Irhimeh, M.; Falk, N. Macroalgal Fucoïdan Extracts: A New Opportunity for Marine Cosmetics. *Cosmet Toilett* **2007**, *122*, 55–64.
- (47) Sialve, B.; Steyer, J.-P. Les Microalgues, Promesses et Défis. *Innov. Agron.* **2013**, *26*, 25–39.
- (48) Delattre, C.; Pierre, G.; Laroche, C.; Michaud, P. Production, Extraction and Characterization of Microalgal and Cyanobacterial Exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34* (7), 1159–1179. <https://doi.org/10.1016/j.deangel>.
- (49) Raposo, M. F. de J.; Morais, R. M. S. C. de; Morais, A. M. M. B. de. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (1), 233. <https://doi.org/10.3390/md11010233>.
- (50) Raposo, M.; de Morais, R.; Bernardo de Morais, A. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (12), 233–252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>.
- (51) Badri, A.; Williams, A.; Linhardt, R. J.; Koffas, M. A. The Road to Animal-Free Glycosaminoglycan Production: Current Efforts and Bottlenecks. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.018>.
- (52) DeAngelis, P. L.; Gunay, N. S.; Toida, T.; Mao, W.; Linhardt, R. J. Identification of the Capsular Polysaccharides of Type D and F *Pasteurella Multocida* as Unmodified Heparin and Chondroitin, Respectively. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337* (17), 1547–1552. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00219-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00219-7).
- (53) Vann, W. F.; Schmidt, M. A.; Jann, B.; Jann, K. The Structure of the Capsular Polysaccharide (K5 Antigenn) of Urinary-Tract-Infective *Escherichia Coli* O10:K5:H4. *Eur. J. Biochem.* **1981**, *116* (2), 359–364. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05343.x>.

- (54) Barreteau, H.; Richard, E.; Drouillard, S.; Samain, E.; Priem, B. Production of Intracellular Heparosan and Derived Oligosaccharides by Lyase Expression in Metabolically Engineered E. Coli K-12. *Carbohydr. Res.* **2012**, *360*, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.013>.
- (55) Jin, P.; Zhang, L.; Yuan, P.; Kang, Z.; Du, G.; Chen, J. Efficient Biosynthesis of Polysaccharides Chondroitin and Heparosan by Metabolically Engineered Bacillus Subtilis. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *140*, 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.065>.
- (56) Wang, Z.; Ly, M.; Zhang, F.; Zhong, W.; Suen, A.; Hickey, A. M.; Dordick, J. S.; Linhardt, R. J. E. Coli K5 Fermentation and the Preparation of Heparosan, a Bioengineered Heparin Precursor. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107* (6), 964–973. <https://doi.org/10.1002/bit.22898>.
- (57) Rodriguez, M.-L.; Jann, B.; Jann, K. Structure and Serological Characteristics of the Capsular K4 Antigen of Escherichia Coli O5:K4:H4, a Fructose-Containing Polysaccharide with a Chondroitin Backbone. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *177* (1), 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14351.x-i2>.
- (58) He, W.; Fu, L.; Li, G.; Andrew Jones, J.; Linhardt, R. J.; Koffas, M. Production of Chondroitin in Metabolically Engineered E. Coli. *Metab. Eng.* **2015**, *27*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.11.003>.
- (59) Armstrong, D. C.; Cooney, M. J.; Johns, M. R. Growth and Amino Acid Requirements of Hyaluronic-Acid-Producing Streptococcus Zooepidemicus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47* (3), 309–312. <https://doi.org/10.1007/s002530050932>.
- (60) DeAngelis, P. L.; Jing, W.; Drake, R. R.; Achyuthan, A. M. Identification and Molecular Cloning of a Unique Hyaluronan Synthase from Pasteurella Multocida. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (14), 8454–8458. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.8454>.
- (61) Jin, P.; Kang, Z.; Yuan, P.; Du, G.; Chen, J. Production of Specific-Molecular-Weight Hyaluronan by Metabolically Engineered Bacillus Subtilis 168. *Metab. Eng.* **2016**, *35*, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.01.008>.
- (62) Jia, Y.; Zhu, J.; Chen, X.; Tang, D.; Su, D.; Yao, W.; Gao, X. Metabolic Engineering of Bacillus Subtilis for the Efficient Biosynthesis of Uniform Hyaluronic Acid with Controlled Molecular Weights. *Bioresour. Technol.* **2013**, *132*, 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150>.
- (63) Chien, L.-J.; Lee, C.-K. Hyaluronic Acid Production by Recombinant Lactococcus Lactis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77* (2), 339–346. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1153-z>.
- (64) Jeong, E.; Shim, W. Y.; Kim, J. H. Metabolic Engineering of Pichia Pastoris for Production of Hyaluronic Acid with High Molecular Weight. *J. Biotechnol.* **2014**, *185*, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.018>.
- (65) Bozzi, L.; Milas, M.; Rinaudo, M. Characterization and Solution Properties of a New Exopolysaccharide Excreted by the Bacterium Alteromonas Sp. Strain 1644. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *18* (1), 9–17. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)01038-6](https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)01038-6).
- (66) Dubreucq, G.; Domon, B.; Fournet, B. Structure Determination of a Novel Uronic Acid Residue Isolated from the Exopolysaccharide Produced by a Bacterium Originating from Deep Sea Hydrothermal Vents. *Carbohydr. Res.* **1996**, *290* (2), 175–181. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00155-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00155-3).
- (67) Rougeaux, H.; Guezennec, J.; Carlson, R. W.; Kervarec, N.; Pichon, R.; Talaga, P. Structural Determination of the Exopolysaccharide of Pseudoalteromonas Strain HYD 721 Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Carbohydr. Res.* **1999**, *315* (3), 273–285. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00019-1).
- (68) Le Costaouëc, T.; Cérantola, S.; Ropartz, D.; Ratiskol, J.; Siquin, C.; Collic-Jouault, S.; Boisset, C. Structural Data on a Bacterial Exopolysaccharide Produced by a Deep-Sea Alteromonas Macleodii Strain. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.059>.
- (69) Rougeaux, H.; Talaga, P.; Carlson, R. W.; Guezennec, J. Structural Studies of an Exopolysaccharide Produced by Alteromonas Macleodii Subsp. Fijiensis Originating from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Carbohydr. Res.* **1998**, *312* (1), 53–59. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)10061-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)10061-1).
- (70) Rougeaux, H.; Kervarec, N.; Pichon, R.; Guezennec, J. Structure of the Exopolysaccharide of Vibrio Diabolicus Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Carbohydr. Res.* **1999**, *322* (1), 40–45. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00214-1).

- (71) Raguénès, G. h. c.; Peres, A.; Ruimy, R.; Pignet, P.; Christen, R.; Loaec, M.; Rougeaux, H.; Barbier, G.; Guezennec, J. g. *Alteromonas Infernus* Sp. Nov., a New Polysaccharide-Producing Bacterium Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *J. Appl. Microbiol.* **1997**, *82* (4), 422–430. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00125.x>.
- (72) Roger, O.; Kervarec, N.; Ratiskol, J.; Collicec-Jouault, S.; Chevlot, L. Structural Studies of the Main Exopolysaccharide Produced by the Deep-Sea Bacterium *Alteromonas Infernus*. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339* (14), 2371–2380. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.07.021>.
- (73) Zanchetta, P.; Lagarde, N.; Guezennec, J. Systemic Effects on Bone Healing of a New Hyaluronic Acid-Like Bacterial Exopolysaccharide. *Calcif. Tissue Int.* **2003**, *73* (3), 232–236. <https://doi.org/10.1007/s00223-002-2081-7>.
- (74) Senni, K.; Gueniche, F.; Changotade, S.; Septier, D.; Sinquin, C.; Ratiskol, J.; Lutowski, D.; Godeau, G.; Guezennec, J.; Collicec-Jouault, S. Unusual Glycosaminoglycans from a Deep Sea Hydrothermal Bacterium Improve Fibrillar Collagen Structuring and Fibroblast Activities in Engineered Connective Tissues. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (4), 1351–1369. <https://doi.org/10.3390/md11041351>.
- (75) Rederstorff, E.; Rethore, G.; Weiss, P.; Sourice, S.; Beck-Cormier, S.; Mathieu, E.; Maillason, M.; Jacques, Y.; Collicec-Jouault, S.; Fellah, B. H.; et al. Enriching a Cellulose Hydrogel with a Biologically Active Marine Exopolysaccharide for Cell-Based Cartilage Engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *11* (4), 1152–1164. <https://doi.org/10.1002/term.2018>.
- (76) Christensen, B. E.; Smidsroed, O.; Elgsaeter, A.; Stokke, B. T. Depolymerization of Double-Stranded Xanthan by Acid Hydrolysis: Characterization of Partially Degraded Double Strands and Single-Stranded Oligomers Released from the Ordered Structures. *Macromolecules* **1993**, *26* (22), 6111–6120. <https://doi.org/10.1021/ma00074a037>.
- (77) Worawattanamateekul, W.; Okutani, K. Isolation and Characterization of a Sulfated Polysaccharide Produced by a Marine Bacterium. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* **1992**, *58* (9), 1729–1733. <https://doi.org/10.2331/suisan.58.1729>.
- (78) Calsteren, M.-R. V.; Pau-Roblot, C.; Bégin, A.; Roy, D. Structure Determination of the Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus Rhamnosus* Strains RW-9595M and R. *Biochem. J.* **2002**, *363* (Pt 1), 7. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630007>.
- (79) Rota, C.; Liverani, L.; Spelta, F.; Mascellani, G.; Tomasi, A.; Iannone, A.; Vismara, E. Free Radical Generation during Chemical Depolymerization of Heparin. *Anal. Biochem.* **2005**, *344* (2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.043>.
- (80) Nardella, A.; Chaubet, F.; Boisson-Vidal, C.; Blondin, C.; Durand, P.; Jozefonvicz, J. Anticoagulant Low Molecular Weight Fucans Produced by Radical Process and Ion Exchange Chromatography of High Molecular Weight Fucans Extracted from the Brown Seaweed *Ascophyllum Nodosum*. *Carbohydr. Res.* **1996**, *289*, 201–208. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00110-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00110-3).
- (81) Yang, Z.; Li, J.-P.; Guan, H. Preparation and Characterization of Oligomannuronates from Alginate Degraded by Hydrogen Peroxide. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *58* (2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.022>.
- (82) Ovalle, R.; Soll, C. E.; Lim, F.; Flanagan, C.; Rotunda, T.; Lipke, P. N. Systematic Analysis of Oxidative Degradation of Polysaccharides Using PAGE and HPLC–MS. *Carbohydr. Res.* **2001**, *330* (1), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00262-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00262-7).
- (83) Collicec Jouault, S.; Chevlot, L.; Helley, D.; Ratiskol, J.; Bros, A.; Sinquin, C.; Roger, O.; Fischer, A.-M. Characterization, Chemical Modifications and in Vitro Anticoagulant Properties of an Exopolysaccharide Produced by *Alteromonas Infernus*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2001**, *1528* (2), 141–151. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00185-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00185-4).
- (84) Hamilton, J. K.; Smith, F. Reduction of the Products of Periodate Oxidation of Carbohydrates. II. A New Method for the End-Group Assay of Amylopectin. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (22), 5907–5909. <https://doi.org/10.1021/ja01603a052>.
- (85) Mort, A. J.; Bauer, W. D. Application of Two New Methods for Cleavage of Polysaccharides into Specific Oligosaccharide Fragments. Structure of the Capsular and Extracellular Polysaccharides of *Rhizobium Japonicum* That Bind Soybean Lectin. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257* (4), 1870–1875.

- (86) Johansson, A.; Widmalm, G.; Jansson, P.-E.; Wilkinson, S. G. Structure of an Acidic Microcapsular Glycan from the Reference Strain (C.D.C. 866-57) for *Serratia Marcescens* Serogroup O1. *Carbohydr. Res.* **1995**, *270* (2), 191–199. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00024-N](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00024-N).
- (87) Szu, S. C.; Zon, G.; Schneerson, R.; Robbins, J. B. Ultrasonic Irradiation of Bacterial Polysaccharides. Characterization of the Depolymerized Products and Some Applications of the Process. *Carbohydr. Res.* **1986**, *152*, 7–20. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90283-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90283-0).
- (88) Kubo, K.; Nakamura, T.; Takagaki, K.; Yoshida, Y.; Endo, M. Depolymerization of Hyaluronan by Sonication. *Glycoconj. J.* **1993**, *10* (6), 435–439. <https://doi.org/10.1007/BF00737963>.
- (89) El-Sawy, N. M.; Abd El-Rehim, H. A.; Elbarbary, A. M.; Hegazy, E.-S. A. Radiation-Induced Degradation of Chitosan for Possible Use as a Growth Promoter in Agricultural Purposes. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (3), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.002>.
- (90) Pawlowski, A.; Svenson, S. B. Electron Beam Fragmentation of Bacterial Polysaccharides as a Method of Producing Oligosaccharides for the Preparation of Conjugate Vaccines. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *174* (2), 255–263. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13577.x>.
- (91) Czechowska-Biskup, R.; Rokita, B.; Lotfy, S.; Ulanski, P.; Rosiak, J. M. Degradation of Chitosan and Starch by 360-KHz Ultrasound. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *60* (2), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.001>.
- (92) CAZy - Home <http://www.cazy.org/> (accessed Jul 11, 2019).
- (93) Levasseur, A.; Drula, E.; Lombard, V.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. Expansion of the Enzymatic Repertoire of the CAZy Database to Integrate Auxiliary Redox Enzymes. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6* (1), 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>.
- (94) Stone, B. A.; Svensson, B.; Collins, M. E.; Rastall, R. A. Polysaccharide Degradation. In *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*; Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K., Thiem, J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 2325–2375. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-30429-6\\_60](https://doi.org/10.1007/978-3-540-30429-6_60).
- (95) Lombard, V.; Bernard, T.; Rancurel, C.; Brumer, H.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. A Hierarchical Classification of Polysaccharide Lyases for Glycogenomics. *Biochem. J.* **2010**, *432* (3), 437–444. <https://doi.org/10.1042/BJ20101185>.
- (96) Yu, S.; Bojsen, K.; Svensson, B.; Marcussen, J.  $\alpha$ -1,4-Glucan Lyases Producing 1,5-Anhydro-d-Fructose from Starch and Glycogen Have Sequence Similarity to  $\alpha$ -Glucosidases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1999**, *1433* (1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00152-1).
- (97) Michaud, P.; Costa, A. D.; Courtois, B.; Courtois, J. Polysaccharide Lyases: Recent Developments as Biotechnological Tools. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2003**, *23* (4), 233–266. <https://doi.org/10.1080/07388550390447043>.
- (98) Lahaye, M.; Brunel, M.; Bonnin, E. Fine Chemical Structure Analysis of Oligosaccharides Produced by an Ulvan-Lyase Degradation of the Water-Soluble Cell-Wall Polysaccharides from *Ulva* Sp. (Ulvales, Chlorophyta). *Carbohydr. Res.* **1997**, *304* (3), 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00270-X).
- (99) Collén, P. N.; Sassi, J.-F.; Rogniaux, H.; Marfaing, H.; Helbert, W. Ulvan Lyases Isolated from the Flavobacteria *Persicivirga Ulvanivorans* Are the First Members of a New Polysaccharide Lyase Family. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (49), 42063–42071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271825>.
- (100) Reisky, L.; Préchoux, A.; Zühlke, M.-K.; Bäumgen, M.; Robb, C. S.; Gerlach, N.; Roret, T.; Stanetty, C.; Larocque, R.; Michel, G.; et al. A Marine Bacterial Enzymatic Cascade Degrades the Algal Polysaccharide Ulvan. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15* (8), 803–812. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0311-9>.
- (101) Michel, G.; Nyval-Collen, P.; Barbeyron, T.; Czejek, M.; Helbert, W. Bioconversion of Red Seaweed Galactans: A Focus on Bacterial Agarases and Carrageenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71* (1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0377-7>.
- (102) Guibet, M.; Colin, S.; Barbeyron, T.; Genicot, S.; Kloareg, B.; Michel, G.; Helbert, W. Degradation of  $\lambda$ -Carrageenan by *Pseudoalteromonas Carrageenovora*  $\lambda$ -Carrageenase: A New Family of Glycoside Hydrolases Unrelated to  $\kappa$ - and  $\iota$ -Carrageenases. *Biochem. J.* **2007**, *404* (Pt 1), 105. <https://doi.org/10.1042/bj20061359>.



- (103) Zykwinska, A.; Berre, L. T.-L.; Sinquin, C.; Ropartz, D.; Rogniaux, H.; Collic-Jouault, S.; Delbarre-Ladrat, C. Enzymatic Depolymerization of the GY785 Exopolysaccharide Produced by the Deep-Sea Hydrothermal Bacterium *Alteromonas Infernus*: Structural Study and Enzyme Activity Assessment. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *188*, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.086>.
- (104) Lelchat, F.; Cozien, J.; Le Costaouec, T.; Brandilly, C.; Schmitt, S.; Baudoux, A.-C.; Collic-Jouault, S.; Boisset, C. Exopolysaccharide Biosynthesis and Biodegradation by a Marine Hydrothermal *Alteromonas* Sp. Strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (6), 2637–2647. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6075-y>.
- (105) Li, S.; Xiong, Q.; Lai, X.; Li, X.; Wan, M.; Zhang, J.; Yan, Y.; Cao, M.; Lu, L.; Guan, J.; et al. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities: Molecular Modification of Polysaccharides.... *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (2), 237–250. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12161>.
- (106) Handley, P. N.; Carroll, A.; Ferro, V. New Structural Insights into the Oligosaccharide Phosphate Fraction of *Pichia* ( *Hansenula* ) *Holstii* NRRL Y2448 Phosphomannan. *Carbohydr. Res.* **2017**, *446–447*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.05.008>.
- (107) Sims, I. M.; Carnachan, S. M.; Bell, T. J.; Hinkley, S. F. R. Methylation Analysis of Polysaccharides: Technical Advice. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *188*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.075>.
- (108) Chopin, N.; Guillory, X.; Weiss, P.; Le Bideau, J.; Collic-Jouault, S. Design Polysaccharides of Marine Origin: Chemical Modifications to Reach Advanced Versatile Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18* (7), 867–895. <https://doi.org/10.2174/138527281807140515152334>.
- (109) Bedini, E.; Laezza, A.; Parrilli, M.; Iadonisi, A. A Review of Chemical Methods for the Selective Sulfation and Desulfation of Polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *174*, 1224–1239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.017>.
- (110) Whistler, R. L.; Spencer, W. W. Preparation and Properties of Several Polysaccharide Sulfates. *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *95* (1), 36–41. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90105-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90105-9).
- (111) Wolfrom, M. L.; Han, T. M. S. The Sulfonation of Chitosan<sup>1,2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (7), 1764–1766. <https://doi.org/10.1021/ja01516a061>.
- (112) Papy-Garcia, D.; Barbier-Chassefière, V.; Rouet, V.; Kerros, M.-E.; Klochendler, C.; Tournaire, M.-C.; Barritault, D.; Caruelle, J.-P.; Petit, E. Nondegradative Sulfation of Polysaccharides. Synthesis and Structure Characterization of Biologically Active Heparan Sulfate Mimetics. *Macromolecules* **2005**, *38* (11), 4647–4654. <https://doi.org/10.1021/ma048485p>.
- (113) Zeng, K.; Groth, T.; Zhang, K. Recent Advances in Artificially Sulfated Polysaccharides for Applications in Cell Growth and Differentiation, Drug Delivery, and Tissue Engineering. *ChemBioChem* **2019**, *20* (6), 737–746. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800569>.
- (114) Schwartz-Albiez, R.; Adams, Y.; von der Lieth, C.-W.; Mischnick, P.; Andrews, K. T.; Kirschfink, M. Regioselectively Modified Sulfated Cellulose as Prospective Drug for Treatment of Malaria Tropica. *Glycoconj. J.* **2007**, *24* (1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s10719-006-9012-1>.
- (115) Courtois, A.; Berthou, C.; Guézennec, J.; Boisset, C.; Bordron, A. Exopolysaccharides Isolated from Hydrothermal Vent Bacteria Can Modulate the Complement System. *PLOS ONE* **2014**, *9* (4), e94965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094965>.
- (116) Dragon-Durey, M.-A.; Cesbron, J. Y.; Chevalier, A.; Drouet, C.; Uring-Lambert, B. Le système du Complément [http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02\\_files/page82-10.-complement.pdf](http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-10.-complement.pdf) (accessed Jul 8, 2019).
- (117) Heymann, D.; Ruiz-Velasco, C.; Chesneau, J.; Ratiskol, J.; Sinquin, C.; Collic-Jouault, S. Anti-Metastatic Properties of a Marine Bacterial Exopolysaccharide-Based Derivative Designed to Mimic Glycosaminoglycans. *Molecules* **2016**, *21* (3), 309. <https://doi.org/10.3390/molecules21030309>.
- (118) Merceron, C.; Portron, S.; Vignes-Colombeix, C.; Rederstorff, E.; Masson, M.; Lesoeur, J.; Sourice, S.; Sinquin, C.; Collic-Jouault, S.; Weiss, P.; et al. Pharmacological Modulation of Human Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis by a Chemically Oversulfated Polysaccharide of Marine

- Origin: Potential Application to Cartilage Regenerative Medicine. *STEM CELLS* **2012**, *30* (3), 471–480. <https://doi.org/10.1002/stem.1686>.
- (119) Paul, P.; Suwan, J.; Liu, J.; Dordick, J. S.; Linhardt, R. J. Recent Advances in Sulfotransferase Enzyme Activity Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (6), 1491. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5944-4>.
- (120) Burkart, M. D.; Izumi, M.; Chapman, E.; Lin, C.-H.; Wong, C.-H. Regeneration of PAPS for the Enzymatic Synthesis of Sulfated Oligosaccharides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (18), 5565–5574. <https://doi.org/10.1021/jo000266o>.
- (121) An, C.; Zhao, L.; Wei, Z.; Zhou, X. Chemoenzymatic Synthesis of 3'-Phosphoadenosine-5'-Phosphosulfate Coupling with an ATP Regeneration System. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101* (20), 7535–7544. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8511-2>.
- (122) Zhou, Z.; Li, Q.; Huang, H.; Wang, H.; Wang, Y.; Du, G.; Chen, J.; Kang, Z. A Microbial–Enzymatic Strategy for Producing Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115* (6), 1561–1570. <https://doi.org/10.1002/bit.26577>.
- (123) Kuberan, B.; Lech, M. Z.; Beeler, D. L.; Wu, Z. L.; Rosenberg, R. D. Enzymatic Synthesis of Antithrombin III–Binding Heparan Sulfate Pentasaccharide. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (11), 1343. <https://doi.org/10.1038/nbt885>.
- (124) Vibert, A.; Lopin-Bon, C.; Jacquinet, J.-C. From Polymer to Size-Defined Oligomers: A Step Economy Process for the Efficient and Stereocontrolled Construction of Chondroitin Oligosaccharides and Biotinylated Conjugates Thereof: Part 1. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9561–9578. <https://doi.org/10.1002/chem.200900740>.
- (125) Driguez, P.-A.; Potier, P.; Trouilleux, P. Synthetic Oligosaccharides as Active Pharmaceutical Ingredients: Lessons Learned from the Full Synthesis of One Heparin Derivative on a Large Scale. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (8), 980–989. <https://doi.org/10.1039/C4NP00012A>.
- (126) Petitou, M.; Boeckel, C. A. A. van. A Synthetic Antithrombin III Binding Pentasaccharide Is Now a Drug! What Comes Next? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (24), 3118–3133. <https://doi.org/10.1002/anie.200300640>.
- (127) Sinaÿ, P.; Jacquinet, J.-C.; Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Lederman, I.; Choay, J.; Torri, G. Total Synthesis of a Heparin Pentasaccharide Fragment Having High Affinity for Antithrombin III. *Carbohydr. Res.* **1984**, *132* (2), C5–C9. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85236-2](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85236-2).
- (128) Zhang, X.; Pagadala, V.; Jester, H. M.; Lim, A. M.; Pham, T. Q.; Goulas, A. M. P.; Liu, J.; Linhardt, R. J. Chemoenzymatic Synthesis of Heparan Sulfate and Heparin Oligosaccharides and NMR Analysis: Paving the Way to a Diverse Library for Glycobiologists. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (12), 7932–7940. <https://doi.org/10.1039/C7SC03541A>.
- (129) Xu, Y.; Masuko, S.; Takiëddin, M.; Xu, H.; Liu, R.; Jing, J.; Mousa, S. A.; Linhardt, R. J.; Liu, J. Chemoenzymatic Synthesis of Homogeneous Ultralow Molecular Weight Heparins. *Science* **2011**, *334* (6055), 498–501. <https://doi.org/10.1126/science.1207478>.
- (130) Roger, O. Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction.
- (131) Levy, D. E.; Fügedi, P. *The Organic Chemistry of Sugars*; CRC Press, 2005. <https://doi.org/10.1201/9781420027952>.
- (132) *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*; Demchenko, A. V., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008.
- (133) Ishiwata, A.; Lee, Y. J.; Ito, Y. Recent Advances in Stereoselective Glycosylation through Intramolecular Aglycon Delivery. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (16), 3596–3608. <https://doi.org/10.1039/C004281A>.
- (134) Ishiwata, A.; Ito, Y. Intramolecular Aglycon Delivery toward 1,2- Cis Selective Glycosylation. In *Selective Glycosylations: Synthetic Methods and Catalysts*; Bennett, C. S., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2017; pp 79–96. <https://doi.org/10.1002/9783527696239.ch4>.
- (135) Cumpstey, I. Intramolecular Aglycon Delivery. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (10), 1553–1573. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.04.031>.

- (136) Mannino, M. P.; Yasomane, J. P.; Demchenko, A. V. Investigation of the H-Bond-Mediated Aglycone Delivery Reaction in Application to the Synthesis of  $\beta$ -Glucosides. *Carbohydr. Res.* **2018**, *470*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.09.003>.
- (137) Jung, K.-H.; Müller, M.; Schmidt, R. R. Intramolecular O-Glycoside Bond Formation. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (12), 4423–4442. <https://doi.org/10.1021/cr990307k>.
- (138) Cox, D. J.; Fairbanks, A. J. Stereoselective Synthesis of  $\alpha$ -Glucosides by Neighbouring Group Participation via an Intermediate Thiophenium Ion. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20* (6), 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.02.018>.
- (139) Pistorio, S. G.; Yasomane, J. P.; Demchenko, A. V. Hydrogen-Bond-Mediated Aglycone Delivery: Focus on  $\beta$ -Mannosylation. *Org. Lett.* **2014**, *16* (3), 716–719. <https://doi.org/10.1021/ol403396j>.
- (140) Yasomane, J. P.; Demchenko, A. V. Hydrogen-Bond-Mediated Aglycone Delivery (HAD): A Highly Stereoselective Synthesis of 1,2-cis  $\alpha$ -D-Glucosides from Common Glycosyl Donors in the Presence of Bromine <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.201406589> (accessed Jul 22, 2019). <https://doi.org/10.1002/chem.201406589>.
- (141) Das, R.; Mukhopadhyay, B. Chemical O-Glycosylations: An Overview. *ChemistryOpen* **2016**, *5* (5), 401–433. <https://doi.org/10.1002/open.201600043>.
- (142) Ranade, S. C.; Demchenko, A. V. Mechanism of Chemical Glycosylation: Focus on the Mode of Activation and Departure of Anomeric Leaving Groups. *J. Carbohydr. Chem.* **2013**, *32* (1), 1–43. <https://doi.org/10.1080/07328303.2012.749264>.
- (143) Fischer, E. Ueber Die Glucoside Der Alkohole. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26* (3), 2400–2412. <https://doi.org/10.1002/cber.18930260327>.
- (144) Mukaiyama, T.; Matsubara, K.; Hora, M. An Efficient Glycosylation Reaction of 1-Hydroxy Sugars with Various Nucleophiles Using A Catalytic Amount of Activator and Hexamethyldisiloxane. *Synthesis* **1994**, *1994* (12), 1368–1373. <https://doi.org/10.1055/s-1994-25695>.
- (145) Yamada, H.; Hayashi, T. A Substrate-Unspecified Glycosylation Reaction Promoted by Copper(II) Trifluoromethanesulfonate in Benzotrifluoride. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337* (7), 581–585. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00029-0).
- (146) Koenigs, W.; Knorr, E. Ueber Einige Derivate Des Traubenzuckers Und Der Galactose. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34* (1), 957–981. <https://doi.org/10.1002/cber.190103401162>.
- (147) Fischer, E.; Armstrong, E. F. Ueber Die Isomeren Acetohalogen-Derivate Des Traubenzuckers Und Die Synthese Der Glucoside1. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34* (2), 2885–2900. <https://doi.org/10.1002/cber.190103402251>.
- (148) Igarashi, K. The Koenigs-Knorr Reaction\*\*Throughout This Chapter, the Terms Glycose, Glycosyl, Glycoside, Glycofuranoside, Glycopyranoside, and Glycoseptanoside Refer to Aldoses and the Corresponding Derivatives Thereof. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Stuart Tipson, R., Horton, D., Eds.; Academic Press, 1977; Vol. 34, pp 243–283. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60326-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60326-1).
- (149) Zemplén, G.; Gerecs, A. Einwirkung von Quecksilbersalzen Auf Aceto-Halogenzucker, IV. Mitteil.: Direkte Darstellung Der Alkylbioside Der  $\alpha$ -Reihe. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1930**, *63* (10), 2720–2729. <https://doi.org/10.1002/cber.19300631008>.
- (150) Gervay, J.; Nguyen, T. N.; Hadd, M. J. Mechanistic Studies on the Stereoselective Formation of Glycosyl Iodides: First Characterization of  $\beta$ -d-Glycosyl Iodides. *Carbohydr. Res.* **1997**, *300* (2), 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)00321-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)00321-7).
- (151) Mild Synthesis of Protected  $\alpha$ -D-Glycosyl Iodides - Caputo - 1999 - European Journal of Organic Chemistry - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28sici%291099-0690%281999%291999%3A11%3C3147%3A%3Aaid-ejoc3147%3E3.0.co%3B2-i> (accessed May 29, 2019).
- (152) Mukaiyama, T.; Murai, Y.; Shoda, S. An Efficient Method for Glycosylation of Hydroxy Compounds Using Glucopyranosyl Fluoride. *Chem. Lett.* **1981**, *10* (3), 431–432. <https://doi.org/10.1246/cl.1981.431>.

- (153) Ferrier, R. J.; Hay, R. W.; Vethaviasar, N. ]A Potentially Versatile Synthesis of Glycosides. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27* (1), 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82424-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82424-6).
- (154) Fügedi, P.; Garegg, P. J. A Novel Promoter for the Efficient Construction of 1,2-Trans Linkages in Glycoside Synthesis, Using Thioglycosides as Glycosyl Donors. *Carbohydr. Res.* **1986**, *149* (1), C9–C12. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90385-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90385-9).
- (155) Andersson, F.; Fügedi, P.; Garegg, P. J.; Nashed, M. Synthesis of 1,2-Cis-Linked Glycosides Using Dimethyl(Methylthio) Sulfonium Triplate as Promoter and Thioglycosides as Glycosyl Donors. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (33), 3919–3922. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)83917-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)83917-9).
- (156) Crich, D.; Smith, M. 1-Benzenesulfinyl Piperidine/Trifluoromethanesulfonic Anhydride: A Potent Combination of Shelf-Stable Reagents for the Low-Temperature Conversion of Thioglycosides to Glycosyl Triflates and for the Formation of Diverse Glycosidic Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (37), 9015–9020. <https://doi.org/10.1021/ja0111481>.
- (157) Mydock, L. K.; Kamat, M. N.; Demchenko, A. V. Direct Synthesis of Diastereomerically Pure Glycosyl Sulfonium Salts. *Org. Lett.* **2011**, *13* (11), 2928–2931. <https://doi.org/10.1021/ol2009818>.
- (158) Schmidt, R. R.; Michel, J. Facile Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -O-Glycosyl Imidates; Preparation of Glycosides and Disaccharides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19* (9), 731–732. <https://doi.org/10.1002/anie.198007311>.
- (159) Zimmermann, P.; Sommer, R.; Bär, T.; Schmidt, R. R. Azidosphingosine Glycosylation in Glycosphingolipid Synthesis. *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7* (2), 435–452. <https://doi.org/10.1080/07328308808058935>.
- (160) Li, Y.; Mo, H.; Lian, G.; Yu, B. Revisit of the Phenol O-Glycosylation with Glycosyl Imidates, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> Is a Better Catalyst than TMSOTf. *Carbohydr. Res.* **2012**, *363*, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.025>.
- (161) Schaubach, R.; Hemberger, J.; Kinzy, W. Tumor-Associated Antigen Synthesis Synthesis of the Gal- $\alpha$ -(1→3)-Gal- $\beta$ -(1→4)-GlcNAc Epitope a Specific Determinant for Metastatic Progression? *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *1991* (7), 607–614. <https://doi.org/10.1002/jlac.1991199101113>.
- (162) Robina, I.; López-Barba, E.; Fuentes, J. Fatty Acylamino-Trisaccharides. Synthesis and Some Stereochemical Properties. *Tetrahedron* **1996**, *52* (32), 10771–10784. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00599-6](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00599-6).
- (163) Mattson, A. L.; Michel, A. K.; Cloninger, M. J. Using In(III) as a Promoter for Glycosylation. *Carbohydr. Res.* **2012**, *347* (1), 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.016>.
- (164) Adinolfi, M.; Barone, G.; Guariniello, L.; Iadonisi, A. Efficient Activation of Armed Glycosyl Trichloroacetimidates with Sm(OTf)<sub>3</sub> in the Stereoselective Glycosidation of Saccharidic Acceptors. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (46), 9005–9008. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01622-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01622-1).
- (165) Adinolfi, M.; Barone, G.; Iadonisi, A.; Mangoni, L.; Schiattarella, M. Activation of Disarmed 2-O-Alkoxy-carbonylated Glycosyl Trichloroacetimidates with Lanthanide Triflates: An Efficient Approach for the Synthesis of 1,2-Trans Glycosides. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (34), 5967–5969. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01158-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01158-3).
- (166) Tian, Q.; Zhang, S.; Yu, Q.; He, M.-B.; Yang, J.-S. Amberlyst 15 as a Mild and Effective Activator for the Glycosylation with Disarmed Glycosyl Trichloroacetimidate Donors. *Tetrahedron* **2007**, *63* (10), 2142–2147. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.12.091>.
- (167) Yu, B.; Tao, H. Glycosyl Trifluoroacetimidates. Part 1: Preparation and Application as New Glycosyl Donors. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (12), 2405–2407. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00157-5).
- (168) Yu, B.; Sun, J. Glycosylation with Glycosyl N -Phenyltrifluoroacetimidates ( PTFAI ) and a Perspective of the Future Development of New Glycosylation Methods. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (26), 4668–4679. <https://doi.org/10.1039/C0CC00563K>.
- (169) Bohé, L.; Crich, D. A Propos of Glycosyl Cations and the Mechanism of Chemical Glycosylation; the Current State of the Art. *Carbohydr. Res.* **2015**, *403*, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.020>.

- (170) Miljković, M. Anomeric Effect. In *Carbohydrates: Synthesis, Mechanisms, and Stereoelectronic Effects*; Miljkovic, M., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2009; pp 57–93. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92265-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92265-2_3).
- (171) Satoh, H.; Hansen, H. S.; Manabe, S.; van Gunsteren, W. F.; Hünenberger, P. H. Theoretical Investigation of Solvent Effects on Glycosylation Reactions: Stereoselectivity Controlled by Preferential Conformations of the Intermediate Oxacarbenium-Counterion Complex. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (6), 1783–1797. <https://doi.org/10.1021/ct1001347>.
- (172) Fraser-Reid, B.; López, J. C. Armed–Disarmed Effects in Carbohydrate Chemistry: History, Synthetic and Mechanistic Studies. In *Reactivity Tuning in Oligosaccharide Assembly*; Fraser-Reid, B., Cristóbal López, J., Eds.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 1–29. [https://doi.org/10.1007/128\\_2010\\_105](https://doi.org/10.1007/128_2010_105).
- (173) Paulsen, H. Advances in Selective Chemical Syntheses of Complex Oligosaccharides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21* (3), 155–173. <https://doi.org/10.1002/anie.198201553>.
- (174) Mootoo, D. R.; Konradsson, Peter.; Udodong, Uko.; Fraser-Reid, Bert. Armed and Disarmed N-Pentenyl Glycosides in Saccharide Couplings Leading to Oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (16), 5583–5584. <https://doi.org/10.1021/ja00224a060>.
- (175) Fraser-Reid, B.; Wu, Z.; Andrews, C. W.; Skowronski, E.; Bowen, J. P. Torsional Effects in Glycoside Reactivity: Saccharide Couplings Mediated by Acetal Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (4), 1434–1435. <https://doi.org/10.1021/ja00004a066>.
- (176) Bos, L. J. van den; Codée, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; Dinkelaar, J.; Overkleeft, H. S.; Marel, G. A. van der. Uronic Acids in Oligosaccharide Synthesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007* (24), 3963–3976. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700101>.
- (177) Nilsson, M.; Svahn, C.-M.; Westman, J. Synthesis of the Methyl Glycosides of a Tri- and a Tetra-Saccharide Related to Heparin and Heparan Sulphate. *Carbohydr. Res.* **1993**, *246* (1), 161–172. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84030-A](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84030-A).
- (178) Chiba, T.; Sinaÿ, P. Application of a Radical Reaction to the Synthesis of L-Iduronic Acid Derivatives from d-Glucuronic Acid Analogues. *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90357-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90357-4).
- (179) Zhao, T.; Xing, J.; Dong, Z.; Tang, Y.; Pu, W. Synthesis of Polyacrylamide with Superb Salt-Thickening Performance. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2015**, *54* (43), 10568–10574. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b02718>.
- (180) Otey, F. H.; Westhoff, R. P.; Mehlretter, C. L. Allyl Glucosides-Preparation and Chromatographic Separation of Anomeric Mixture. *Prod. RD* **1972**, *11* (1), 70–73. <https://doi.org/10.1021/i360041a012>.
- (181) Ferrier, R. J.; Furneaux, R. H. Synthesis of 1,2-Trans-Related 1-Thioglycoside Esters. *Carbohydr. Res.* **1976**, *52* (1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85946-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85946-7).
- (182) Rommel, M.; Ernst, A.; Koert, U. Synthetic Routes to Three Novel Scaffolds for Potential Glycosidase Inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007* (26), 4408–4430. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700333>.
- (183) Hall, D. M. A Practical Synthesis of Methyl 4-6-O-Benzylidene- $\alpha$ - and - $\beta$ -d-Glucopyranoside. *Carbohydr. Res.* **1980**, *86* (1), 158–160. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84593-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84593-0).
- (184) Evans, M. E. Methyl 4,6-O-Benzylidene- $\alpha$ - and - $\beta$ -d-Glucosides. *Carbohydr. Res.* **1972**, *21* (3), 473–475. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84931-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84931-9).
- (185) Ellervik, U.; Grundberg, H.; Magnusson, G. Synthesis of Lactam and Acetamido Analogues of Sialyl Lewis x Tetrasaccharide and Lewis x Trisaccharide. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (25), 9323–9338. <https://doi.org/10.1021/jo981204p>.
- (186) Ellervik, U.; Magnusson, G. A High Yielding Chemical Synthesis of Sialyl Lewis x Tetrasaccharide and Lewis x Trisaccharide; Examples of Regio- and Stereodifferentiated Glycosylations. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (25), 9314–9322. <https://doi.org/10.1021/jo981203x>.
- (187) Chida, N.; Ohtsuka, M.; Nakazawa, K.; Ogawa, S. Total Synthesis of Antibiotic Hygromycin A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (9), 2976–2983. <https://doi.org/10.1021/jo00009a009>.
- (188) Hu, Y.; Yu, K.; Shi, L.-L.; Liu, L.; Sui, J.-J.; Liu, D.-Y.; Xiong, B.; Sun, J.-S. *O*-(*p*-Methoxyphenylethynyl)Phenyl Glycosides: Versatile New Glycosylation Donors for the Highly

- Efficient Construction of Glycosidic Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (36), 12736–12744. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07020>.
- (189) Xiao, M.; Wu, W.; Wei, L.; Jin, X.; Yao, X.; Xie, Z. Total Synthesis of (–)-Isatisine A via a Biomimetic Benzilic Acid Rearrangement. *Tetrahedron* **2015**, *71* (22), 3705–3714. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.09.028>.
- (190) Whitfield, D. M.; Ruzicka, C. J.; Carver, J. P.; Krepinsky, J. J. Garegg. *Can. J. Chem.* **1987**, *65* (4), 693–703. <https://doi.org/10.1139/v87-118>.
- (191) Ohlin, M.; Johnsson, R.; Ellervik, U. Regioselective Reductive Openings of 4,6-Benzylidene Acetals: Synthetic and Mechanistic Aspects. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346* (12), 1358–1370. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.032>.
- (192) Bhattacharjee, S. S.; Gorin, P. A. J. Hydrogenolysis of Carbohydrate Acetals, Ketals, and Cyclic Orthoesters with Lithium Aluminium Hydride – Aluminium Trichloride. *Can. J. Chem.* **1969**, *47* (7), 1195–1206. <https://doi.org/10.1139/v69-194>.
- (193) Lipták, A.; Jodál, I.; Nánási, P. Stereoselective Ring-Cleavage of 3-O-Benzyl- and 2,3-Di-O-Benzyl-4,6-O-Benzylidenehexopyranoside Derivatives with the  $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$  Reagent. *Carbohydr. Res.* **1975**, *44* (1), 1–11. <https://doi.org/ek>.
- (194) Garegg, P. J.; Hultberg, H. A Novel, Reductive Ring-Opening of Carbohydrate Benzylidene Acetals, with Unusual Regioselectivity. *Carbohydr. Res.* **1981**, *93* (1), C10–C11. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80766-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80766-1).
- (195) J. Garegg, P.; Hultberg, H.; Wallin, S. A Novel, Reductive Ring-Opening of Carbohydrate Benzylidene Acetals. *Carbohydr. Res.* **1982**, *108* (1), 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81894-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81894-7).
- (196) Ek, M.; Garegg, P. J.; Hultberg, H.; Oscarson, S. Reductive Ring Openings of Carbohydrate Benzylidene Acetals Using Borane-Trimethylamine and Aluminium Chloride. Regioselectivity and Solvent Dependence. *J. Carbohydr. Chem.* **1983**, *2* (3), 305–311. <https://doi.org/10.1080/07328308308057876>.
- (197) Johnsson, R.; Olsson, D.; Ellervik, U. Reductive Openings of Acetals: Explanation of Regioselectivity in Borane Reductions by Mechanistic Studies. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (14), 5226–5232. <https://doi.org/10.1021/jo800396g>.
- (198) Xia, C.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Chen, W.; Nadas, J.; Severin, R.; Woodward, R.; Wang, B.; Wang, X.; Kronenberg, M.; et al. The Roles of 3' and 4' Hydroxy Groups in  $\alpha$ -Galactosylceramide Stimulation of Invariant Natural Killer T Cells. *ChemMedChem* **2009**, *4* (11), 1810–1815. <https://doi.org/garegg>.
- (199) Bruce Grindley, T. Applications of Tin-Containing Intermediates to Carbohydrate Chemistry. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Horton, D., Ed.; Academic Press, 1998; Vol. 53, pp 17–142. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60043-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60043-8).
- (200) Hanessian, S. *Preparative Carbohydrate Chemistry*; CRC Press, 1997. <https://doi.org/10.1201/9781482273588>.
- (201) Kováč, P. Synthesis and Reactions of Uronic Acid Derivatives: Part I. Unambiguous Synthesis of Methyl (Methyl  $\alpha$ -d-Glucopyranosid)Uronate 2-, 3-, 4-, 2,3-DI-, 2,4-DI-, and 3,4-DI-Methyl Ethers. *Carbohydr. Res.* **1973**, *31* (2), 323–330. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)86196-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86196-0).
- (202) Epp, J. B.; Widlanski, T. S. Facile Preparation of Nucleoside-5'-Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (1), 293–295. <https://doi.org/10.1021/jo981316g>.
- (203) Lucio Anelli, P.; Biffi, C.; Montanari, F.; Quici, S. Fast and Selective Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes or to Carboxylic Acids and of Secondary Alcohols to Ketones Mediated by Oxoammonium Salts under Two-Phase Conditions. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (12), 2559–2562. <https://doi.org/10.1021/jo00388a038>.
- (204) Nooy, A. E. J. de; Besemer, A. C.; Bekkum, H. van. On the Use of Stable Organic Nitroxyl Radicals for the Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Synthesis* **1996**, *1996* (10), 1153–1176. <https://doi.org/10.1055/s-1996-4369>.
- (205) Corey, E. J.; Samuelsson, B. One-Step Conversion of Primary Alcohols in the Carbohydrate Series to the Corresponding Carboxylic Tert-Butyl Esters. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (24), 4735–4735. <https://doi.org/10.1021/jo00198a034>.

- (206) Ichikawa, S.; Shuto, S.; Matsuda, A. The First Synthesis of Herbicidin B. Stereoselective Construction of the Tricyclic Undecose Moiety by a Conformational Restriction Strategy Using Steric Repulsion between Adjacent Bulky Silyl Protecting Groups on a Pyranose Ring. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (44), 10270–10280. <https://doi.org/10.1021/ja992608h>.
- (207) Omura, K.; Swern, D. Oxidation of Alcohols by “Activated” Dimethyl Sulfoxide. a Preparative, Steric and Mechanistic Study. *Tetrahedron* **1978**, *34* (11), 1651–1660. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(78\)80197-5](https://doi.org/10.1016/0040-4020(78)80197-5).
- (208) Dess, D. B.; Martin, J. C. A Useful 12-I-5 Triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-I-5 Species. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (19), 7277–7287. <https://doi.org/10.1021/ja00019a027>.
- (209) Pfitzner, K. E.; Moffatt, J. G. Sulfoxide-Carbodiimide Reactions. I. A Facile Oxidation of Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (24), 5661–5670. <https://doi.org/10.1021/ja00952a026>.
- (210) Lindgren, B. O.; Nilsson, T. PREPARATION OF CARBOXYLIC ACIDS FROM ALDEHYDES (INCLUDING HYDROXYLATED BENZALDEHYDES) BY OXIDATION WITH CHLORITE. *ChemInform* **1973**, *4*. <https://doi.org/10.1002/chin.197335159>.
- (211) Herczeg, M.; Lázár, L.; Bereczky, Z.; Kövér, K. E.; Timári, I.; Kappelmayer, J.; Lipták, A.; Antus, S.; Borbás, A. Synthesis and Anticoagulant Activity of Bioisosteric Sulfonic-Acid Analogues of the Antithrombin-Binding Pentasaccharide Domain of Heparin. *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18* (34), 10643–10652. <https://doi.org/10.1002/chem.201201041>.
- (212) Dinkelaar, J.; van den Bos, L. J.; Hogendorf, W. F. J.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; Codée, J. D. C.; van der Marel, G. A. Stereoselective Synthesis of L-Guluronic Acid Alginates. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14* (30), 9400–9411. <https://doi.org/10.1002/chem.200800960>.
- (213) van den Bos, L. J.; Codée, J. D.; van der Toorn, J. C.; Boltje, T. J.; van Boom, J. H.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. Thioglycuronides: Synthesis and Application in the Assembly of Acidic Oligosaccharides. *Org. Lett.* **2004**, *6* (13), 2165–2168.
- (214) Xu, R.; Jiang, Z.-H. Synthesis of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Oligo-d-Mannuronic Acid Neoglycolipids. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.007>.
- (215) Shie, C.-R.; Tzeng, Z.-H.; Kulkarni, S. S.; Uang, B.-J.; Hsu, C.-Y.; Hung, S.-C. Cu(OTf)<sub>2</sub> as an Efficient and Dual-Purpose Catalyst in the Regioselective Reductive Ring Opening of Benzylidene Acetals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (11), 1665–1668. <https://doi.org/10.1002/anie.200462172>.
- (216) van den Bos, L. J.; Litjens, R. E. J. N.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. Preparation of 1-Thio Uronic Acid Lactones and Their Use in Oligosaccharide Synthesis. *Org. Lett.* **2005**, *7* (10), 2007–2010. <https://doi.org/10.1021/ol050491y>.
- (217) Codée, J. D. C.; van den Bos, L. J.; de Jong, A.-R.; Dinkelaar, J.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. The Stereodirecting Effect of the Glycosyl C5-Carboxylate Ester: Stereoselective Synthesis of  $\beta$ -Mannuronic Acid Alginates. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (1), 38–47. <https://doi.org/10.1021/jo8020192>.
- (218) Dai, X.; Liu, W.; Zhou, Q.; Cheng, C.; Yang, C.; Wang, S.; Zhang, M.; Tang, P.; Song, H.; Zhang, D.; et al. Formal Synthesis of Anticoagulant Drug Fondaparinux Sodium. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (1), 162–184. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02468>.
- (219) Clausen, M. H.; Madsen, R. Synthesis of Hexasaccharide Fragments of Pectin. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9* (16), 3821–3832. <https://doi.org/10.1002/chem.200204636>.
- (220) Emmadi, M.; Kulkarni, S. S. Total Synthesis of the Bacillosamine Containing  $\alpha$ -l-Serine Linked Trisaccharide of Neisseria Meningitidis. *Carbohydr. Res.* **2014**, *399*, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.04.011>.
- (221) Kihlberg, J.; Eichler, E.; Bundle, D. R. The Design and Synthesis of Antibody Binding Site Probes: Three Pentasaccharide Analogues of the Brucella A Antigen Prepared by Activation in Situ of Thioglycosides with Bromine. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211* (1), 59–75. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)84146-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)84146-6).
- (222) Wei, G.; Zhang, L.; Cai, C.; Cheng, S.; Du, Y. Selective Cleavage of Sugar Anomeric O-Acyl Groups Using FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (38), 5488–5491. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.07.035>.

- (223) Sim, M. M.; Kondo, H.; Wong, C. H. Synthesis of Dibenzyl Glycosyl Phosphites Using Dibenzyl N,N-Diethylphosphoramidite as Phosphitylating Reagent: An Effective Route to Glycosyl Phosphates, Nucleotides, and Glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (6), 2260–2267. <https://doi.org/10.1021/ja00059a023>.
- (224) Li, Y.-X.; Li, Y.-W.; Zhai, W.; Guan, H.-S. An Alternative Method for Anomeric Deacetylation of Per-Acetylated Carbohydrates. *Chin. J. Chem.* **2004**, *22* (1), 117–118. <https://doi.org/10.1002/cjoc.20040220125>.
- (225) Excoffier, G.; Gagnaire, D.; Utile, J.-P. Coupure Sélective Par l'hydrazine Des Groupements Acétyles Anomères de Résidus Glycosyles Acétylés. *Carbohydr. Res.* **1975**, *39* (2), 368–373. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)86150-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86150-9).
- (226) Milhomme, O.; Dhénin, S. G. Y.; Djedaïni-Pilard, F.; Moreau, V.; Grandjean, C. Synthetic Studies toward the Anthrax Tetrasaccharide: Alternative Synthesis of This Antigen. *Carbohydr. Res.* **2012**, *356*, 115–131. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.01.007>.
- (227) Cheng, H.; Cao, X.; Xian, M.; Fang, L.; Cai, T. B.; Ji, J. J.; Tunac, J. B.; Sun, D.; Wang, P. G. Synthesis and Enzyme-Specific Activation of Carbohydrate–Geldanamycin Conjugates with Potent Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (2), 645–652. <https://doi.org/10.1021/jm049693a>.
- (228) Schmidt, R. R.; Michel, J. Direct O-Glycosyl Trichloroacetimidate Formation, Nucleophilicity of the Anomeric Oxygen Atom. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* (8), 821–824. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)80036-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)80036-8).
- (229) Yosief, H. O.; Weiss, A. A.; Iyer, S. S. Capture of Uropathogenic *E. Coli* by Using Synthetic Glycan Ligands Specific for the Pap-Pilus. *ChemBioChem* **2013**, *14* (2), 251–259. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200582>.
- (230) Maity, S. K.; Ghosh, R. LAetteTr Hree-Component, One-Pot, Sequential Synthesis of a Common Tetrasac- Charide Block Related to the Lipopolysaccharide of the Escherichia Coli O9, Klebsiella Pneumonia O3, and Hafnia Alvei PCM 1223. *Synlett* **2012**, *23*, 1919–1922.
- (231) Maity, S. K.; Basu, N.; Ghosh, R. Efficient Activation of Thioglycosides with N-(p-Methylphenylthio)-ε-Caprolactam-TMSOTf. *Carbohydr. Res.* **2012**, *354*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.024>.
- (232) Crich, D.; Cai, W. Chemistry of 4,6-O-Benzylidene-d-Glycopyranosyl Triflates: Contrasting Behavior between the Gluco and Manno Series. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (13), 4926–4930. <https://doi.org/10.1021/jo990243d>.
- (233) de Nooy, A. E. J.; Besemer, A. C.; van Bekkum, H. Highly Selective Nitroxyl Radical-Mediated Oxidation of Primary Alcohol Groups in Water-Soluble Glucans. *Carbohydr. Res.* **1995**, *269* (1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00343-E](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00343-E).
- (234) Ying, L.; Gervay-Hague, J. General Methods for the Synthesis of Glycopyranosyluronic Acid Azides. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338* (9), 835–841. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00042-9).
- (235) Ying, L.; Gervay-Hague, J. Synthesis of N-(Fluoren-9-Yl-methoxycarbonyl)Glycopyranosylamine Uronic Acids. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339* (2), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.018>.
- (236) Haller, M.; Boons, G.-J. Towards a Modular Approach for Heparin Synthesis. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2001**, No. 8, 814–822. <https://doi.org/10.1039/B009845K>.
- (237) Kahne, D.; Walker, S.; Cheng, Y.; Van Engen, D. Glycosylation of Unreactive Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (17), 6881–6882. <https://doi.org/10.1021/ja00199a081>.
- (238) Xolin, A.; Losa, R.; Kaid, A.; Tresse, C.; Beau, J.-M.; Boyer, F.-D.; Norsikian, S. Stereocontrolled Glycoside Synthesis by Activation of Glycosyl Sulfone Donors with Scandium(III) Triflate. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (2), 325–335. <https://doi.org/10.1039/C7OB02792C>.
- (239) Schüler, P.; Fischer, S. N.; Marsch, M.; Oberthür, M. Efficient α-Mannosylation of Phenols: The Role of Carbamates as Scavengers for Activated Glycosyl Donors. *Synthesis* **2013**, *45* (01), 27–39. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1316820>.
- (240) Patist, A.; Bhagwat, S. S.; Penfield, K. W.; Aikens, P.; Shah, D. O. On the Measurement of Critical Micelle Concentrations of Pure and Technical-Grade Nonionic Surfactants. *J. Surfactants Deterg.* **2000**, *3* (1), 53–58. <https://doi.org/10.1007/s11743-000-0113-4>.



- (241) Varki, A.; Cummings, R. D.; Aebi, M.; Packer, N. H.; Seeberger, P. H.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G.; Darvill, A.; Kinoshita, T.; et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology* **2015**, *25* (12), 1323–1324. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv091>.
- (242) Hoffmann, W. D.; Jackson, G. P. Charge Transfer Dissociation (CTD) Mass Spectrometry of Peptide Cations Using Kiloelectronvolt Helium Cations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25* (11), 1939–1943. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0989-6>.
- (243) Ropartz, D.; Li, P.; Jackson, G. P.; Rogniaux, H. Negative Polarity Helium Charge Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry: Radical-Initiated Fragmentation of Complex Polysulfated Anions. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (7), 3824–3828. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00473>.
- (244) Domon, B.; Costello, C. E. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **1988**, *5* (4), 397–409. <https://doi.org/10.1007/BF01049915>.
- (245) Collicec Jouault, S.; Sinquin, C.; Zykwincka, A.; Delbarre-Ladrat, C. Marine Biodiversity as a New Source of Promising Polysaccharides: Innovative Polysaccharides Emerging from the Marine Biodiversity. In *Enzymatic Technologies for Marine Polysaccharides*; CRC Press, 2019; p 22.
- (246) Lee, H. G.; Cowman, M. K. An Agarose Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular Weight Distribution. *Anal. Biochem.* **1994**, *219* (2), 278–287. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1267>.
- (247) Kamerling, J. P.; Gerwig, G. J.; Vliegthart, J. F. G.; Clamp, J. R. Characterization by Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Proton-Magnetic-Resonance Spectroscopy of Pertrimethylsilyl Methyl Glycosides Obtained in the Methanolysis of Glycoproteins and Glycopeptides. *Biochem. J.* **1975**, *151* (3), 491–495. <https://doi.org/10.1042/bj1510491>.
- (248) Montreuil, J.; Bouquelet, S.; Debray, H.; Fournet, B.; Spik, G.; Strecker, G. A Practical Approach. *Glycoptoteins Carbohydr. Anal.* **1986**, 143–204.
- (249) Niedermeyer, T. H. J.; Strohm, M. MMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra. *PLOS ONE* **2012**, *7* (9), e44913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044913>.
- (250) Dangerfield, E. M.; Cheng, J. M. H.; Knight, D. A.; Weinkove, R.; Dunbar, P. R.; Hermans, I. F.; Timmer, M. S. M.; Stocker, B. L. Species-Specific Activity of Glycolipid Ligands for Invariant NKT Cells. *ChemBioChem* **2012**, *13* (9), 1349–1356. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200095>.
- (251) Faltin, F.; Fehring, V.; Miethchen, R. Chiral Crown Ethers Based on Galactopyranosides. *Synthesis* **2002**, *2002* (13), 1851–1856. <https://doi.org/10.1055/s-2002-33916>.
- (252) Kurimoto, K.; Yamamura, H.; Miyagawa, A. Chemical Approach for the Syntheses of GM4 Isomers with Sialic Acid to Non-Natural Linkage Positions on Galactose. *Carbohydr. Res.* **2015**, *401*, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.10.018>.
- (253) Mandal, P. K.; Misra, A. K. Synthesis of Oligosaccharides Corresponding to the Polysaccharides of *Lactobacillus* and *Thermophilus* Strains. *Synthesis* **2007**, *2007* (17), 2660–2666. <https://doi.org/10.1055/s-2007-983836>.
- (254) Dinkelaar, J.; de Jong, A. R.; van Meer, R.; Somers, M.; Lodder, G.; Overkleeft, H. S.; Codée, J. D. C.; van der Marel, G. A. Stereodirecting Effect of the Pyranosyl C-5 Substituent in Glycosylation Reactions. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (14), 4982–4991. <https://doi.org/10.1021/jo900662v>.
- (255) Mende, M.; Nieger, M.; Bräse, S. Chemical Synthesis of Modified Hyaluronic Acid Disaccharides. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (50), 12283–12296. <https://doi.org/10.1002/chem.201701238>.
- (256) Kitowski, A.; Jiménez-Moreno, E.; Salvadó, M.; Mestre, J.; Castillón, S.; Jiménez-Osés, G.; Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. Oxidative Activation of C–S Bonds with an Electropositive Nitrogen Promoter Enables Orthogonal Glycosylation of Alkyl over Phenyl Thioglycosides. *Org. Lett.* **2017**, *19* (19), 5490–5493. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02886>.
- (257) Yuan, X.; Cheng, S.; Shi, Y.; Xue, W. Photocatalytic Synthesis of Glycosyl Bromides. *Synthesis* **2014**, *46* (03), 331–335. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340493>.

- (258) Jadhav, V.; Pedersen, C. M.; Bols, M. A Study of Anhydrocelluloses – Is a Cellulose Structure with Residues in a <sup>1</sup>C<sub>4</sub>-Conformation More Prone to Hydrolysis? *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (21), 7525–7534. <https://doi.org/10.1039/C1OB06085F>.

## Annexes

## Annexe 1

Tableau 12 : Les caractéristiques structurales principales des PS issus de microalgues et des cyanobactéries. Bacillariophyte (Ba), Charophyte (Cha), Chlorophyte (Ch) et Cyanobactéries (Cy) (adapté de C. Delattre et al., 2016).<sup>48</sup>

Microalgues	Type de PS	Composition osidique	Substituants
<i>Amphora rostrata</i> (Ba)	EPS	Rha, <b>Fuc</b> , Xyl, Man, Gal, Glc, uronic acids	Protéine, pyruvate, sulfate
<i>Amphora holsatica</i> (Ba)		Ara, Rha, Fuc, <b>Xyl</b> , <b>Glc</b> , uronic acids	
<i>Coscinodiscus nobilis</i> (Ba)	EPS	Rha, Xyl, Man, Gal, Glc, GlcA	Sulfate
<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ba)		Rha, <b>Xyl</b> , Man, Gal, Glc, uronic acids	Protéine
<i>Cylindrotheca fusiformis</i> (Ba)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Xyl, Man, <b>Gal</b> , Glc, uronic acids	Sulfate
<i>Melossira nummuloides</i> (Ba)	EPS	Ara, <b>Fuc</b> , Xyl, Gal, <b>Glc</b> , uronic acids	
<i>Navicula salinarum</i> (Ba)	EPS	Rha, Xyl, Man, Gal, <b>Glc</b> , uronic acids	Protéine, sulfate
<i>Navicula directa</i> (Ba)	EPS	Ara, Rha, <b>Fuc</b> , Xyl, Gal, Glc, uronic acids	
<i>Navicula subinflata</i> (Ba)	EPS	Man, Gal, <b>Glc</b> , uronic acids, hexosamines, O-Me-pentoses	Protéine, sulfate
<i>Thalassiosira</i> sp. (Ba)	RPS	Rha, Fuc, Xyl, <b>Man</b> , Gal, Glc, GalA, GlcA, GalNAc, GlcNAc	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632 (Ba) ovoid morphotype	EPS	<b>Ara</b> , Rha, Fuc, Rib, Xyl, Man, Gal, Glc, Ino, 3,4-O-Me-Gal	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632 (Ba) fusiform morphotype	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, Xyl, <b>Man</b> , Gal, <b>Glc</b> , Ino, 4-O-Me-Man	
<i>Botryococcus braunii</i> (Ch)	EPS	Ara, Rha, Fuc, <b>Gal</b> , uronic acids, 3-O-Me-Fuc,	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Ch)	EPS	Ara, Rha, Rib, Xyl, Gal, Glc, GalA	Pyruvate
<i>Chlamydomonas Mexicana</i> (Ch)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, Xyl, Man, Gal, <b>Glc</b> , uronic acids	
<i>Chlamydomonas sajabo</i> (Ch)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, Xyl, Man, <b>Gal</b> , Glc, uronic acids	
<i>hlorella pyrenoidosa</i> Chick S-39 (Ch)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, Xyl, Gal	

<i>Desmococcus olivaceus</i> (Ch)	EPS	Ara, Rha, Xyl, Man, <b>Gal</b> , Glc, GalA, GlcA	
<i>Desmococcus olivaceus</i> (Ch)	EPS	Ara, Rha, Xyl, Man, <b>Gal</b> , Glc, 2-O-Me-Glc	Protéine
<i>Dunaliella salina</i> (Ch)	EPS	Xyl, Gal, Glc, <b>Fru (fructose)</b>	
<i>Cosmarium</i> sp. 1 (Cha)	EPS	Ara, Rha, <b>Fuc</b> , Rib, Xyl, Man, Glc, Gal, uronic acids	Sulfate
<i>Cosmarium</i> sp. 2 (Cha)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, Xyl, Man, <b>Glc</b> , Gal	
<i>Netrium digitus</i> (Cha)	EPS	Ara, Rha, <b>Fuc</b> , Rib, Xyl, Man, Glc, Gal, uronic acids	Sulfate
<i>Netrium oblongum</i> (Cha)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, Xyl, Man, Glc, <b>Gal</b> , uronic acids	Sulfate
<i>Netrium interruptum</i> (Cha)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, <b>Xyl</b> , Man, Glc, Gal, uronic acids	Sulfate
<i>Netrium interruptum</i> UTEX 2509 (Cha)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, Xyl, Man, Glc, <b>Gal</b>	
<i>Penium cylindrus</i> (Cha)	EPS	Ara, Rha, <b>Fuc</b> , Rib, Xyl, Man, Glc, Gal, uronic acids	
<i>Penium spirostriolatum</i> (Cha)	EPS	<b>Ara</b> , Rha, Fuc, Rib, Xyl, Man, Glc, Gal, uronic acids	Sulfate
<i>Pleurotaenium trabecula</i> (Cha)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Rib, <b>Xyl</b> , Man, Glc, Gal, uronic acids	Sulfate
<i>Tetmemorus brebissonii</i> (Cha)	EPS	Ara, Rha, <b>Fuc</b> , Rib, Xyl, Man, Glc, Gal, uronic acids	Sulfate
<i>Arthrospira platensis</i> (Cy)	EPS	Ara, Rha, Fuc, Xyl, Man, <b>Gal</b> , Glc, GalA, GlcA	Protéine
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142 (Cy)	EPS	Rib, Xyl, <b>Glc</b>	Protéine
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142 (Cy)	EPS	2-C-Me-Glc, Ido-2-C-carboxylic acid, 2-deoxy-Ido	Sulfate
<i>Cyanospira capsulate</i> (Cy)	EPS	Ara, Fuc, Man, Glc, GalA	Lactate
<i>Mastigocladus laminosus</i> (Cy)	CPS	Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc, <b>GlcA</b> , GalA	
<i>Microcoleus vaginatus</i> (Cy)	CPS	Rha, Xyl, Man, Gal, <b>Glc</b> , GalA	Protéine
<i>Microcoleus vaginatus</i> (Cy)	EPS	Ara, Rha, 2-O-methyl-Rha, Fuc, Xyl, <b>Man</b> , Gal, Glc, GalA, GlcA, N-acetyl-GlcN	
<i>Microcoleus vaginatus</i> (Cy)	EPS	Ara, Rha, 2-O-methyl-Rha, Fuc, Xyl, <b>Man</b> , Gal, Glc, GalA, GlcA, N-acetyl-GlcN	Protéine
<i>Nostoc</i> sp. (Cy)	CPS	Rha, Man, Gal, <b>Glc</b> , GalA, GlcA	Protéine
<i>Nostoc</i> sp. (Cy)	EPS	Rha, Xyl, Man, Gal, <b>Glc</b> , 2-O-Methyl-Glc	
<i>Nostoc</i> sp. (Cy)	EPS	Rha, Xyl, Man, Gal, <b>Glc</b> , 2-O-Methyl-Glc	Protéine

<b><i>Nostoc</i> sp. (Cy)</b>	EPS	Xyl, <b>Man</b>	Protéine
<b><i>Nostoc carneum</i> (Cy)</b>	EPS	Xyl, <b>Man</b>	Protéine
<b><i>Nostoc commune</i> (Cy)</b>	EPS	<b>Xyl</b> , Man, Gal, <b>Glc</b> , GlcA, acie uronique non identifié	
<b><i>Nostoc insulare</i> 54.79 (Cy)</b>	EPS	<b>Glc</b> , GlcA, 3-O-Me-Ara	Peptide
<b><i>Nostoc verrucosum</i> (Cy)</b>	EPS	Xyl, <b>Man</b> , <b>Glc</b> , GlcA	
<b><i>Oscillaria</i> sp. (Cy)</b>	EPS	Protéine	Protéine
<b><i>Phormidium tenue</i> (Cy)</b>	EPS	<b>Ara</b> , Rha, Man, Gal, Glc, GalA, GlcA, N-acetyl-GlcN	
<b><i>Phormidium tenue</i> (Cy)</b>	EPS	<b>Ara</b> , Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc, N-acetyl-GlcN	Protéine
<b><i>Scytonema javanicum</i> (Cy)</b>	EPS	Ara, Rha, Xyl, Man, Gal, <b>Glc</b>	
<b><i>Scytonema javanicum</i> (Cy)</b>	EPS	Ara, Rha, 2-O-methyl-Rha, Xyl, Man, Gal, <b>Glc</b>	

## Annexe 2

Tableau 13 : Exemples de bactéries et des EPS qu'elles produisent. Ara : arabinose, Fru : Fructose, Gro: Glycerophosphate, S ou SO<sub>3</sub> : sulfate, t-: terminal (adapté de Collic-Jouault et al., 2019).<sup>245</sup>

Microorganisme	Origine	Composition osidique	Substituant
<b><i>Alteromonas infernus</i></b>	Population animale, Bassin de Guaymas, Golfe de Californie	Glc, Gal, Glc, GalA	Sulfate
<b><i>Alteromonas macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i></b>	Source hydrothermale, Bassin Nord Fidjien	Glc, Gal, GlcA, GalA, Man	
<b><i>Alteromonas macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> biovar <i>deepsane</i></b>	Source hydrothermale, Ride du Pacifique Est	Polysaccharide sulfaté, unité répétitive avec 16-18 monosaccharides (7 différents)	Sulfate
<b><i>Alteromonas</i> sp. Strain 1644</b>	Polychète, Ride du Pacifique Est	Glc, Gal, GlcA, GalA	
<b><i>Bacillus licheniformis</i></b>	Source hydrothermale littorale, Ile Vulcano, Italie	Man, Glc	
<b><i>Bacillus thermoantarcticus</i></b>	Ile Ischia, Italie	2 EPS sulfatés : EPS1 : Man et Glc EPS2 : Man	Sulfate, pyruvate
<b><i>Bacillus thermodenitrificans</i></b>	Source hydrothermale littorale, Ile Vulcano, Italie	2 EPS avec acide uronique et sulfate	Sulfate
<b><i>Geobacillus tepidamans</i> V264</b>	Geyser, Bulgarie	Glc, Gal, Fuc, Fru	
<b><i>Geobacillus</i> sp.</b>	Ile Ischia, Italie	EPS 1 : Man, Glc, Gal EPS 2 : Man, Glc, Gal EPS 3 : Gal, Man, GlcN, Ara	
<b><i>Geobacillus</i> sp. 4001</b>	Source hydrothermale littorale, Ile Vulcano, Italie	Man, Glc, Gal, ManN (mannosamine)	
<b><i>Geobacillus</i> sp. 4004</b>	Source hydrothermale littorale, Ile Ischia, Italie	Gal/Man/GlcN/Ara (1.0/0.8/0.4/0.2)	

<i>Hahella chejuensis</i>	Sédiment, Ile Cheju, Corée	Glc, Gal, Rib, Xyl	
<i>Halomonas sp. AAD6</i>		Fru	
<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	Sédiments de lac sale, Cape Russell, Antarctique	Glc, Fru, GlcN, GalN	
<i>Halomonas almeriensis</i>		Man/Glc et traces de Rha	
<i>Halomonas anticariensis</i>	Marais d'eau salée, Malaga, Espagne	Glc, Man, GalA	
<i>Halomonas maura</i>		Man, Gal, Glc	
<i>Halomonas ventosae</i>	Marais d'eau salée, Malaga, Espagne	Glc, Man, Gal	
<i>Iodomarina fontislapidosi</i>	Eau salée, Espagne	Glc, Man, Gal	
<i>Iodomarina ramblicola</i>	Eau salée, Espagne	Glc, Man, Gal	
<i>Olleya marilimosa CAM030</i>	Océan du Sud	Man, GlcA, GalNAc, Glc, GlcNAc, Ara, Gal, GalA, Xyl, Rha	
<i>Paracoccus zeaxantificiens subsp. payriae</i>	Tapis bactérien, Polynésie Française		Sulfate
<i>Pseudoalteromonas marinoglutinosa KMM232</i>		Man, Rha	Sulfate
<i>Pseudoalteromonas sp. HYD721</i>	Ride du Pacifique Est	Glc, Gal, GlcA, Man, Rha	Sulfate
<i>Pseudoalteromonas ruthenica SBT033</i>	Côte, Inde	Man, Glc, Gal, Xyl, acides uroniques	
<i>Pseudoalteromonas sp. strain CAM025</i>	Océan du Sud	Glc, GalA, Rha, Gal	Sulfate, acétate
<i>Pseudoalteromonas sp. strain CAM036</i>	Océan du Sud	GalA, Glc, Man, GalNAc, Ara	acétate, succinyle, sulfate
<i>Pseudoalteromonas sp. strain SM9913</i>	Sédiment profond, mer Jaune, Chine	Glc, Ara, Glc, Gal, Xyl, Glc, Glc	
<i>Shewanella colwelliana</i>	Huître		
<i>Thermotoga maritima</i>		Glc, Rib, Man	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Salissures marines, Bengal	Glc, AraN, RibN (ribosamine), Xyl	

<b><i>Vibrio diabolicus</i></b>	Source hydrothermale, Ride du Pacifique Est	GlcNAc, GlcA, GalNAc	
<b><i>Vibrio furnissii</i></b>	Côte, Inde	Glc, Gal, acides uroniques	
<b><i>Vibrio harveyi</i></b>		Sucres neutres, acides uroniques,	Sulfate
<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b>	Biofilm marin naturel	Glc, Gal, Ara, Man, acides uroniques	



## Annexe 3

**❖ Generality****Chemicals and solvents**

All reagents were purchased from various commercial suppliers (Sigma Aldrich®, Fluka®, Alfa Aesar®, Acros® or Carbosynth®) and stored according to the detailed specifications. The following solvents and reagents were freshly distilled under argon just before their use: DCM, MeCN, MeOH and Et<sub>3</sub>N over anhydrous calcium hydride; THF and Et<sub>2</sub>O on sodium and benzophenone. DMF and pyridine were purchased anhydrous from Sigma Aldrich®.

**Reactions and purifications**

All reactions were performed under anhydrous conditions and positive argon pressure. Glassware was flame under vacuum or under argon flow for several minutes.

Chemical reactions were monitoring by TLC on Merck 60F254 silica gel plates. Revelation was performed under UV light (254 nm) or by dipping in a cerium molybdate solution and subsequent heating.

Combi-Flash chromatographies were performed with a Reveleris® X2 flash chromatography system with appropriate columns of 40 µm particle size and UV / ELSD detectors. The mobile phases are reported in relative composition. Column chromatographies were performed with Macherey-Nagel silica of 40 µm – 63 µm particle size.

**Mass spectrometry**

Low resolution and high resolution mass spectrometry (MS) was recorded on a Xevo G2-XS Qtof spectrometer coupled with a Acquity H-Class LC apparatus. For HRMS, a tolerance of 5 ppm was applied to discriminate the difference between calculated and experimental values.

**NMR**

NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer fitted with a BBO probe carefully tuned to the recording frequency of 300.13 MHz (for <sup>1</sup>H) and 75.48 MHz (for <sup>13</sup>C), on a Bruker Avance 400 spectrometer fitted with BBFO probe carefully tuned to the recording frequency of 400.16 MHz (for <sup>1</sup>H), 100.62 MHz (for <sup>13</sup>C).

Chemical shifts (δ) are given in ppm and coupling constants (*J*) are reported in Hz and the multiplicity of signals is noted as following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quin = quintet, m = multiplet, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets, td = triplet of doublets, br = broad signal.

**Specific rotation**

Specific rotations ( $[\alpha]_D^{20}$ ) were obtained on a Perkin-Elmer 341 polarimeter, in a 100 mm cell, under a sodium lamp radiation at 20 °C. Results are expressed with the appropriate concentration (g.100 mL<sup>-1</sup>) in the indicated solvent.

**Electrophoresis on agarose and polyacrylamide gels**

Agarose gel (0.7% w/v) was prepared in TAE buffer (40 mM Tris-acetate and 1 mM EDTA, pH 8.3). 20  $\mu$ L of samples in native electrophoresis buffer (Bio-Rad) were loaded on gel wells and electrophoresis was run in TAE buffer for 2 h in a refrigerated Maxi cuve (20 cm $\times$ 20 cm, Fisher Bioblock Scientific). Gels were fixed for 4 h in 25% (v/v) isopropanol and then colored overnight in the dark by Stains All (3,3'-Diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbocyanine) solution at 0.005% prepared as follows: 5 mL of a mother 0.1% Stains All solution in dimethylformamide (w/v); 5 mL of 300mM Tris-HCl pH 8.8; 5 mL of dimethylformamide; 25 mL of isopropanol; 60 mL of H<sub>2</sub>O.<sup>246</sup> Gels were then destained for 3 h under natural light.

Polyacrylamide separating gel (20 or 27% final) prepared from Acrylamide/Bis-acrylamide 37.5/1 40% solution) was prepared in 1.5 M Tris HCl buffer at pH 8.8 containing ammonium persulfate (0.05% w/v) and tetramethylethylenediamine (TEMED). Polyacrylamide stacking gel (5%) was prepared in 0.5 M Tris HCl at pH 6.8, ammonium persulfate (10% w/v) and TEMED. 15  $\mu$ L of samples prepared in loading buffer (0.5 M Tris HCl pH 6.8, glycerol, 0.5 M EDTA, 0.5% w/v bromophenol) was then loaded on polymerized acrylamide gels. Electrophoresis was conducted at 150 V. Gels were fixed and coloured overnight in the dark by Stains All (0.005%). Gels were then destained with water for 5 h under natural light.

### High-pressure size-exclusion chromatography (HPSEC)

HPSEC coupled with a multiangle light scattering (MALS) (Dawn Heleos-II, Wyatt Technology) and a differential refractive index (RI) (Optilab Wyatt technology) detectors allows to evaluate the depolymerisation. HPSEC system was composed of an HPLC system Prominence Shimadzu, a PL aquagel-OH mixed, 8  $\mu$ m (Varian) guard column (U7.5mm $\times$ L 50 mm), and a PL aquagel-OH mixed (Varian) separation column. The eluent was 0.1 M ammonium acetate with 0.03% NaN<sub>3</sub>. Samples supernatants from enzymatic depolymerizations were diluted to 0.4 mg/mL EPS, filtered (Thermo Scientific Chromacol, 0.45  $\mu$ m 100/PK) and injected. BSA (Sigma) at 2 mg/g in eluent buffer was the internal standard.

### Monosaccharide composition analysis

Monosaccharide composition was determined according to Kamerling et al. [<sup>247</sup>] method, modified by Montreuil et al. [<sup>248</sup>]. Samples were hydrolyzed for 4 h at 100 °C by 3M MeOH/HCl with myo-inositol used as internal standard. After re-N-acetylation with acetic anhydride overnight at room temperature, the methyl glycosides were converted into their corresponding trimethylsilyl derivatives using *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane (BSTFA:TMCS) 99:1 (Merck). Separation and quantification of the per-*O*-trimethylsilyl methyl glycosides were performed by gas chromatography (GC-FID, Agilent Technologies 6890N).

### UHPLC-MS

Ion pairing-reversed phase chromatography separations were run on an ultra-high-performance liquid chromatography system (UHPLC, Acquity H-Class<sup>®</sup> Waters, Manchester, UK), equipped with a BEH C18 column (100 mm  $\times$  2.1 mm, packed with 1.7  $\mu$ m porosity particles) (Waters, Manchester, UK). The flow rate was of 0.150 mL min<sup>-1</sup> and column was heated at 30 °C. A ternary gradient was used (A, pure water; B, pure acetonitrile; and C, 20 mM hexylammonium dissolved in water, and pH value adjusted to 6 by addition of acetic acid), from 16.6% to 35% of solvent B in 10 min, then up to 63.4% at 20 min and maintained at 73.4% for 4.5 min. Percentage of solvent C was kept constant at 25%.

MS measurements were done through a direct coupling with a Synapt G2Si high-definition mass spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK) on a mass range of 300–2000  $m/z$ . The instrument was operated in a negative ionization mode in the so-called sensitivity mode, with an ESI capillary voltage of 2.5 kV and a sampling cone voltage of 50 V. Data acquisition was carried out using MassLynx software (V4.1).

### **He-CTD-MS/MS**

The sample was analyzed with the use of a modified AmaZon 3D ion trap (Bruker Daltonics).<sup>243</sup> The sample was infused at a flow rate of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The mass spectrometer operated in negative polarity, with an ESI capillary voltage of 3.5 kV. Raw data were processed with mMass 5.3.0.<sup>249</sup>

## ❖ Procedure for enzymatic depolymerisation

### Production of the native EPS

Production of the GY785 EPS by *A. infernus* and its purification were previously described.<sup>71</sup> Here, GY785 EPS production was performed at 25 °C pH 7.4 in a 30 L fermenter (Techfors 30 L INFORS, Switzerland).

20 L of Zobell medium, containing 5 g/L of tryptone, 1 g/L of yeast extract, and 33.3 g/L of aquarium salts were introduced in the fermenter and 2 L of cell suspension inoculum were then added. For EPS biosynthesis, 30 g/L of glucose was added at the beginning of the batch. At the end of the fermentation process (48 h), the EPS excreted in its soluble form and remaining in the culture medium was separated from bacterial cells by a centrifugation step. The supernatant was then ultrafiltrated on a 100 kDa cut-off membrane and freeze-dried.

### Protein extract preparation

To prepare *A. infernus* protein extracts, five deflector flasks of 100 mL Zobell medium 2 times concentrated containing 8 g/L of tryptone, 2 g/L of yeast extract, and 66.6 g/L of aquarium salts and five flasks with 100 mL of glucose solution at 60 g/L were prepared. All flasks were autoclaved. Each glucose flask was added in each deflector flasks. After that, 4 mL of cell suspension inoculum was added to each medium and the cells were incubated under agitation at 30 °C for 48 h (175 rpm). After centrifugation of the culture at 10,000 g for 40 min at 10 °C, the supernatant was not conserved. To protect osmotic bacterial cells integrity, the pellet was suspended in 10 mM Tris HCl buffer at pH 8 containing 20 g/L NaCl and centrifuged at 10,000 g for 30 min at 10 °C. The bacterial pellet was suspended in 80 mL of 50 mM Tris HCl buffer at pH 8 with protease inhibitors (cOmplete EDTA-free, Roche) and surfactant (Tween 20, Triton X-100 or Tween 20 + Triton X-100) (Sigma). Cell lysis was performed in an ice bath by sonication of 8 mL aliquots during 7 cycles of 1 min with 1 min pause. A first part of the crude cellular extract was isolated and constituted lysed cells (CL). From the rest of the crude cellular extract, soluble lysate (L) was isolated by centrifugation (10,000 g, 15 min, 10°C) from the insoluble pellet containing cell debris (D), which was re-suspended in 8 mL of buffer solution with protease inhibitors and Tween 20. All the steps of the protein extract preparation are presented on Figure 16.

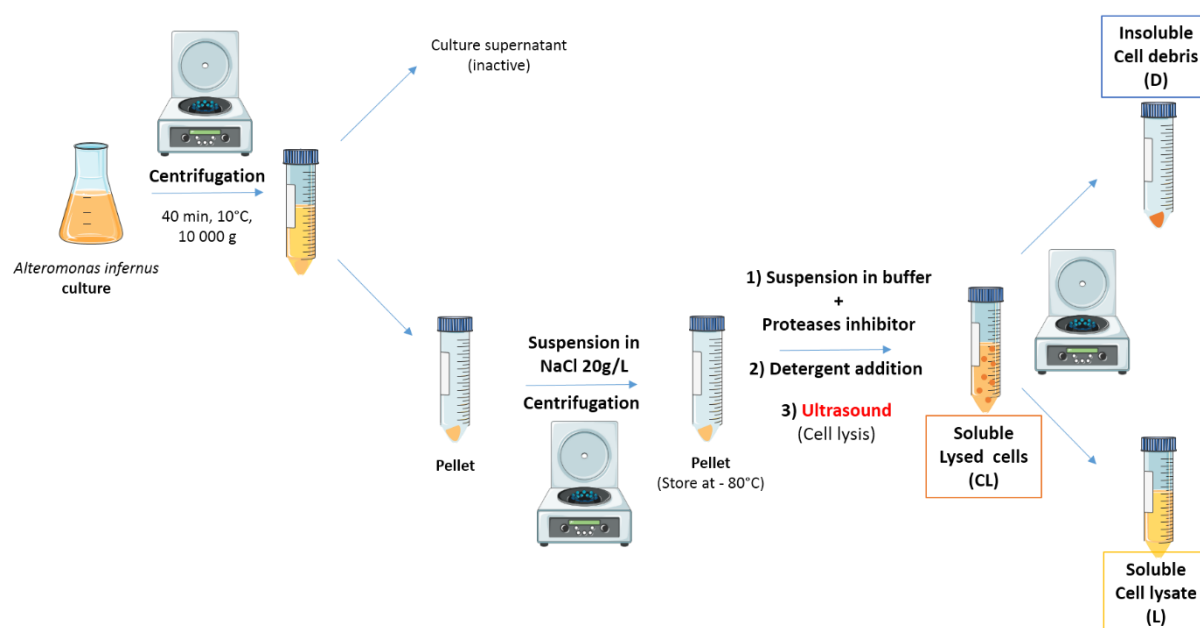


Figure 37. Protein extract preparation from *A. infernus* culture.

### Enzymatic extract production from *A. infernus* cultivated by fermentation in bioreactor

The production of protein extracts from *A. infernus* culture was also performed at 30 °C pH 7.2 in a 30 L fermenter (Techfors 30 L INFORS, Switzerland). 20 L of Zobell medium, containing 10 g/L of tryptone, 5 g/L of yeast extract, 20 g/L of NaCl, 3 g/L of MgSO<sub>4</sub> and 20 mg/L of FeSO<sub>4</sub> were introduced in the fermenter and 2 L of cell suspension inoculum were then added. After that, 30 g/L of glucose was added as carbon source at the beginning of the fermentation. The pH was regulated with NaOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and the glucose consumption as well as optic density were monitoring during the reaction. After 50 h, all glucose was consumed. The reaction was stopped and 0.4 g/L of NaN<sub>3</sub> was added to avoid microorganism production. Then, cellular extracts were isolated as described in the paragraph 0

### Enzymatic kinetics

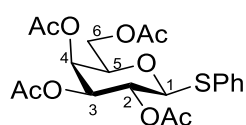
To produce oligosaccharides, one volume of GY785 EPS solution at 4 mg/mL in buffer (50 mM Tris HCl, pH 8, 0.02% NaN<sub>3</sub>) was incubated with one volume of lysate (L), cell debris (D) or lysed cells (CL) under agitation (150 rpm) at 30°C. Samples were removed at regular time interval, heated at 100°C during 7 min, centrifuged at 10,000 g for 15 min at room temperature. Supernatants were kept at -20°C until analysis.

### Purification of oligosaccharides by chromatography

Samples were filtered (0.45 µm) and fractionated on a Sephacryl® S-100-HR XK16/100 column at a flow rate of 1 mL/min with 0.1 M ammonium bicarbonate as eluent buffer. All fractions were freeze-dried and conserved at room temperature until analysis.

## ❖ Procedure for chemical synthesis and characterization

### Phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (40a)



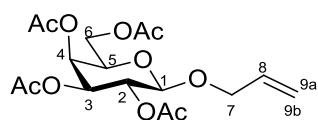
Aspect: White powder  
Yield: 96%  
Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>S  
Molecular Weight: 440.46 g.mol<sup>-1</sup>

The  $\beta$ -D-galactose peracetate (20 g, 51.2 mmol, 1.0 eq.) was diluted in DCM (50 mL) at 0°C under argon flow. Then thiophenol (5.64 mL, 55.3 mmol, 1.08 eq.) and BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (4 mL, 49.2 mmol, 0.96 eq.) were added dropwise and the reaction mixture was stirred at r.t. during 18 hours. After completion, the solution was diluted in DCM and water. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM. Then, the organic layer was washed with water, NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq. 3x), NaOH (1M), brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The crude residue was diluted in EtOAc and precipitated in cold cyclohexane at 0°C. The precipitate was filtrated and washed with cold cyclohexane. After drying, the expected compound **40a** was obtained as a white powder with 96% yield (21.4 g).

Analyses were in good agreement with those published.<sup>250</sup>

R<sub>f</sub> (7:3, PE/ EtOAc) = 0.3; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.55–7.47 (m, 2H, Har), 7.36–7.28 (m, 3H, Har), 5.43 (dd, *J* = 1.0 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1H, H4), 5.24 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H2), 5.06 (dd, *J* = 3.4, 10.0 Hz, 1H, H3), 4.72 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H1), 4.18 (dd, *J* = 7.1, 11.4 Hz, 1H, H6a), 4.11 (dd, *J* = 6.2, 11.4 Hz, 1H, H6b), 3.94 (td, *J* = 1.1, 6.6 Hz, 1H, H5), 2.12 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.5 (CO, Ac), 170.3 (CO, Ac), 170.2 (CO, Ac), 169.6 (CO, Ac), 132.7 (Car), 132.6 (Car), 133.4 (Car), 129.2 (Car), 129.0 (Car), 128.3 (Car), 86.8 (C1), 74.5 (C5), 72.1 (C3), 67.4 (C4), 67.3 (C2), 61.8 (C6), 21.0 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.8 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.8 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.7 (CH<sub>3</sub>, Ac); HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calcd. for [C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>S+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 458.1485, found: 458.1485.

### *O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (40b)



Aspect: Colorless oil  
Yield: quantitative (crude)  
Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>  
Molecular Weight: 388,37

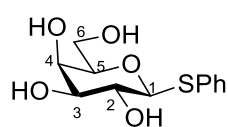
The  $\beta$ -D-galactose pentaacetate (8.0 g, 20.5 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in freshly distilled DCM (125 mL) and allyl alcohol (5.6 mL, 82.0 mmol, 4.0 eq.) with a stream of Ar. Mixture was cooled to 0 °C and BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (5.1 mL, 41.0 mmol, 2.0 eq.) was added dropwise and mixture was left under stirring for 1 hour at 0 °C before being gradually warmed to room temperature.

After 15 hours, the solution was poured into ice-cold water, the layers were separated and aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were washed with H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.) and H<sub>2</sub>O, dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvents were removed under vacuum to afford **40b** (7.9 g, quantitative) as a colorless oil. The crude was directly used in the next step.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>182</sup>

**R<sub>f</sub>** (6:4, PE/ EtOAc) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 5.83 (dddd, *J* = 4.9, 6.1, 10.5, 17.3 Hz, 1H, H8), 5.37 (dd, *J* = 1,2, 3.5 Hz, 1H, H4), 5.30-5.17 (m, 2H, H9), 5.22 (dd, *J* = 8.0, 10.4 Hz, 1H, H2), 5.01 (dd, *J* = 3.5, 10.4 Hz, 1H, H3), 4.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H1), 4.35 (ddt, *J* = 1.7, 6.1, 12.8 Hz, 1H, H7), 4.17 (dd, *J* = 6.7, 11.3 Hz, 1H, H6), 4.15-4.06 (m, 2H, H6 and H7), 3.89 (td, *J* = 1.2, 6.7 Hz, 1H, H5), 2.14 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 170.8 (CO, Ac), 170.6 (CO, Ac), 170.5 (CO, Ac), 169.8 (CO, Ac), 133.7 (C8), 117.9 (C9), 100.5 (C1), 71.3 (C3), 71.0 (C5), 70.4 (C7), 69.2 (C2), 67.4 (C4), 61.7 (C6), 21.1 (CH<sub>3</sub>, Ac), 21.0 (CH<sub>3</sub>, Ac), 21.0 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.9 (CH<sub>3</sub>, Ac); **HRMS (ESI)**: *m/z* calculated for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 411.1267 found 411.1262.

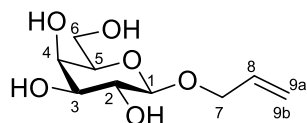
### Phenyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (39a)



Aspect: White powder  
Yield: Quantitative  
Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>S  
Molecular Weight: 272.32 g.mol<sup>-1</sup>

A freshly prepared 1M solution of MeONa in MeOH (11.2 mL, 11.2 mmol, 1.0 eq.) was added to a solution of phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-galactopyranoside **40a** (4.95 g, 11.2 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (56 mL) at r.t. under argon flow. The reaction mixture was stirred at r.t. during 1 hours. After completion, Amberliste® IR120 was added to neutralize the solution (pH~7) and the mixture was filtrated. Then, the filtrate was evaporated and dried overnight under reduce pressure to obtain the expected compound **39a** as a white powder with a quantitative yield (3.0 g).

**R<sub>f</sub>** (9:1, DCM/MeOH) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ 7.47-7.41 (m, 2H, Har), 7.33-7.26 (m, 2H, Har), 7.23-7.16 (m, 2H, Har), 5.14 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, OH), 4.88 (m, 1H, OH), 4.63 (m, 1H, OH), 4.58 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H1), 4.48 (m, 1H, OH), 3.70 (m, 1H, H4), 3.57-3.38 (m, 5H, H2, H3, H5 and H6); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**: δ 135.6-126.1 (Car), 87.7 (C1), 79.2 (C5), 74.7 (C3), 69.2 (C2), 68.3 (C4), 60.6 (C6); **HRMS (ESI)**: *m/z* calcd. for [C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>S+Na]<sup>+</sup>: 295.0611, found: 295.0613.

**O-Allyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (39b)**

Aspect: White solid

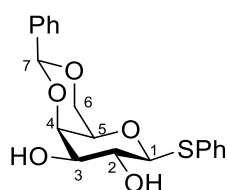
Yield: crude

Chemical Formula:  $C_9H_{16}O_6$ Molecular Weight: 220.22  $g \cdot mol^{-1}$ 

The crude of  $\beta$ -D-allyl galactoside tetraacetate **40b** (4.9 g, 12.8 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in freshly dried MeOH (50 mL) and treated with MeONa (1.0 M in MeOH, 0.6 mL, 0,05 eq.) with a stream of Ar. After stirring at room temperature for 15 hours, mixture was neutralized with ion exchange resin Amberliste® IR120 which was previously activated by washing with HCl 1.0 M, H<sub>2</sub>O, MeOH and Et<sub>2</sub>O (3 x 15-20 mL of each). The resin was filtered off and solvent was evaporated to afford **39b** (2.8 g) as a white solid which was not purified.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>182</sup>

**R<sub>f</sub>** (8:2, DCM/MeOH) = 0,29; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD):**  $\delta$  5.93 (dddd,  $J = 17.3, 10.4, 6.1, 5.2$  Hz, 1H, H8), 5.33 (ddd,  $J = 17.3, 3.0, 1.5$  Hz, 1H, H9b), 5.15 (ddd,  $J = 10.4, 3.0, 1.5$  Hz, 1H, H9a), 4.37 (ddt,  $J = 12.9, 5.2, 1.5$  Hz, 1H, H7), 4.26 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H1), 4.14 (ddt,  $J = 12.9, 6.1, 1.4$  Hz, 1H, H7), 3.83 (dd,  $J = 3.4, 0.9$  Hz, 1H, H4), 3.80-3.68 (m, 2H, H6), 3.54 (dd,  $J = 9.8, 7.6$  Hz, 1H, H2), 3.45 (dd,  $J = 9.8, 3.4$  Hz, 1H, H3), 3.49 (m, 1H, H5); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD):**  $\delta$  135.9 (C8), 117.5 (C9), 104.1 (C1), 76.8 (C5), 75.1 (C3), 72.6 (C2), 71.1 (C7), 70.4 (C4), 62.6 (C6); **HRMS (ESI):** m/z calculated for  $C_9H_{16}O_6+Na]^+$ : 243.0845 found 243.0837.

**Phenyl 4,6-O-benzylidene-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (31a)**

Aspect: White powder

Yield: 93%

Chemical Formula:  $C_{19}H_{20}O_5S$ Molecular Weight: 360.42  $g \cdot mol^{-1}$ 

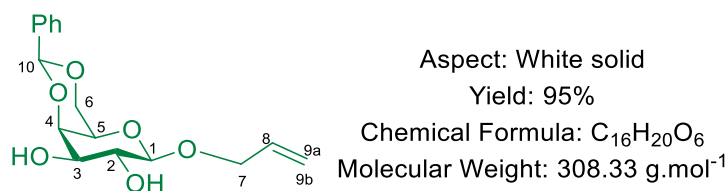
Phenyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside **40a** (3 g, 11 mmol, 1.0 eq.) and CSA (115 mg, 0.5 mmol, 0.045 eq.) were suspended in freshly distilled ACN (45 mL). After addition of benzaldehyde dimethyl acetal (3 mL, 20 mmol, 1.8 eq.) the solution became homogenous. The reaction mixture was stirred at r.t. during 2 hours under argon flow. After completion, Et<sub>3</sub>N was added to quench the reaction and the solution was concentrated. The crude was recrystallized in MeOH (15 mL). After filtration, the precipitate was washed with cold MeOH and dried under reduce pressure to obtain the expected compound **31a** (3.7 g, 93%) as a white powder.

**R<sub>f</sub>** (8:2, DCM/ EtOAc) = 0.2; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  7.58-7.52 (m, 2H, Har), 7.46-7.35 (m, 5H, Har), 7.30-7.22 (m, 3H, Har), 5.56 (s, 1H, H7), 5.15 (br. s, 1H, OH), 5.02 (br. s, 1H, OH),



4.67 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H1), 4.14 (br. d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H4), 4.07 (dd,  $J = 1.4, 12.1$  Hz, 1H, H6a), 4.02 (dd,  $J = 1.6, 12.3$  Hz, 1H, H6b), 3.64 (br. s, 1H, H5), 3.58 – 3.47 (m, 2H, H2 et H3);  **$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  138.6 (Cq.ar), 133.9 (Cq.ar), 130.5-26.5 (CHar), 99.8 (C7), 86.6 (C1), 76.1 (C4), 73.2 (C2), 69.4 (C5), 68.8 (C6), 68.0 (C3); **HRMS(ESI):**  $m/z$  calcd. for  $[\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{S}+\text{Na}]^+$ : 383.0929, found: 383.0925.

### O-Allyl 4,6-O-Benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside (31b)

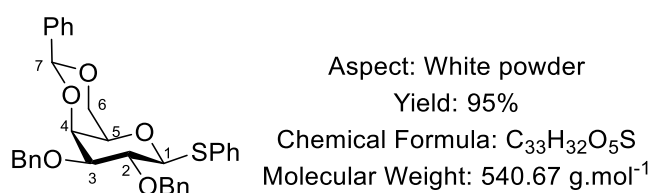


The compound **39b** (8.5 g, 38.6 mmol, 1.0 eq.) was suspended in freshly distilled ACN (150 mL) with a stream of Ar. Benzaldehyde dimethyl acetal (10.5 mL, 70.2 mmol, 1.82 eq.) and CSA (404 mg, 1.7 mmol, 0.045 eq.) were then added that allowed slow dissolution of the substrate. After stirring for 1 hour at room temperature, the reaction was quenched by addition of  $\text{Et}_3\text{N}$  (3 mL), and solvents were removed under vacuum. The solid residue was recrystallized in MeOH (35 mL) to give the desired galactoside **31b** (11.2 g, 95 %) as a white solid.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>182</sup>

**R<sub>f</sub>** (9:1, DCM/MeOH) = 0.54;  **$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta_{\text{H}}$  7.54-7.47 (m, 2H, Har), 7.40-4.33 (m, 3H, Har), 5.96 (dddd,  $J = 4.5, 6.1, 10.6, 17.2$  Hz, 1H, H8), 5.56 (s, 1H, H10), 5.34 (ddd,  $J = 1.5, 2.9, 17.2$  Hz, 1H, H9b), 5.23 (ddd,  $J = 1.5, 2.9, 10.6$  Hz, 1H, H9a), 4.44 (ddt,  $J = 4.5, 5.6, 12.8$  Hz, 1H, H7), 4.34 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H1), 4.34 (dd,  $J = 1.9, 12.5$  Hz, 1H, H6), 4.22 (dd,  $J = 1.1, 3.8$  Hz, 1H, H4), 4.14 (ddt,  $J = 1.5, 6.1, 12.8$  Hz, 1H, H7), 4.09 (dd,  $J = 1.9, 12.5$  Hz, 1H, H6), 3.79 (dd,  $J = 7.7, 9.6$  Hz, 1H, H2), 3.69 (dd,  $J = 3.8, 9.6$  Hz, Hz, 1H, H3), 3.48 (s, 1H, H5);  **$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta_{\text{C}}$  137.7 (Cqar), 134.0 (C8), 129.3-126.6 (Car), 118.1 (C9), 101.8 (C1), 101.6 (C10) 75.5 (C4), 72.9 (C3), 71.9 (C2), 70.3 (C7), 69.3 (C6), 66.8 (C5); **HRMS (ESI):**  $m/z$  calculated for  $[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_6+\text{Na}]^+$ : 331.1158 found 331.1149.

### Phenyl 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (38a)

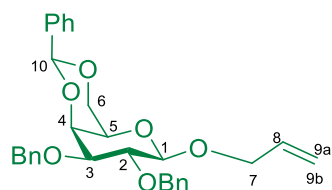


To a solution of the crude phenyl 4,6-*O*-benzylidene-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside **40a** (6.9 g, 20.3 mmol, 1.0 eq.) in THF/DMF (100 mL, 1:1) was added NaH (60% in oil) (1.8 g, 44.7 mmol, 2.2 eq.) at 0°C under argon flow. After 30 min, BnBr (5.3 mL, 44.7 mmol, 2.2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at r.t. during 18 hours. After completion, 20 mL of water were added to quench the reaction. The precipitate formed was isolated by filtration and dried over reduce pressure to obtain the expected compound **38a** (10.4 g, 95%) as a white powder.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>250</sup>

**R<sub>f</sub>** (8:2, EP/ EtOAc) = 0.6; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  7.73-7.68 (m, 2H, Har), 7.57-7.50 (m, 2H, Har), 7.45-7.16 (m, 16H, Har), 5.50 (s, 1H, H7), 4.77-4.67 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.62 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 1H, H1), 4.38 (dd,  $J$  = 1.6, 12.5 Hz, 1H, H6a), 4.17 (dd,  $J$  = 0.7, 3.4 Hz, 1H, H4), 4.00 (dd,  $J$  = 1.6, 12.5 Hz, 1H, H6b), 3.91 (t,  $J$  = 9.3 Hz, 1H, H2), 3.64 (dd,  $J$  = 3.4, 9.3 Hz, 1H, H3), 3.41 (br. s, 1H, H5); **<sup>13</sup>C NMR (100.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  138.7 (Cq.ar), 138.3 (Cq.ar), 137.1 (Cq.ar), 133.0-126.7 (CHar), 101.5 (C7), 86.8 (C1), 81.6 (C3), 75.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.6 (C2), 73.9 (C4), 71.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 70.0 (C5), 69.6 (C6), **HRMS (ESI)**:  $m/z$  calcd. for [C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>S+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 558.2328, found: 558.2328.

### **O-Allyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-Benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside (38b)**



Aspect: White solid  
Yield: Quantitative  
Chemical Formula: C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>  
Molecular Weight: 488.58 g.mol<sup>-1</sup>

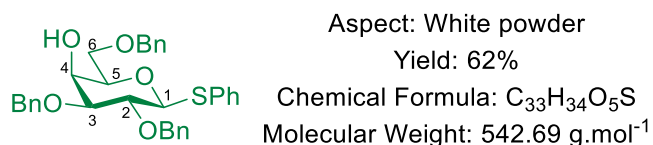
The compound **31b** (0.7 g, 2.3 mmol, 1 eq) was dissolved in freshly distilled THF (6 mL) and anhydrous DMF (6 mL) with a stream of Ar. Sodium hydride (60 % in mineral oil, 0.2 g, 5.0 mmol, 2.2 eq.) was then added at 0 °C. After stirring for 40 min at 0 °C, benzyl bromide (0.6 mL, 5.0 mmol, 2.2 eq.) was added to the mixture which was stirred and gradually warmed to room temperature. After stirring for 24 hours, reaction is carefully quenched with ice cold water. Layers were separated and aqueous layer was extracted with DCM (5 mL). The combined organic layers were washed with H<sub>2</sub>O (5 mL) and brine (2x 5 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to afford the expected compound **38b** (1.15 g, quantitative) as a white solid which was not purified.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>182</sup>

**R<sub>f</sub>** (84:16, PE/ EtOAc) = 0.11; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$ <sub>H</sub> 7.58-7.53 (m, 2H, Har), 7.41-7.23 (m, 13H, Har), 5.96 (dddd,  $J$  = 17.2, 10.6, 6.1, 4.8 Hz, 1H, H8), 5.50 (s, 1H, H10), 5.33 (ddd,  $J$  = 17.2, 2.9, 1.5 Hz, 1H, H9b), 5.21 (ddd,  $J$  = 10.6, 2.9, 1.1 Hz, 1H, H9a), 4.96 (AB syst. d,  $J$  = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72 (AB syst. d,  $J$  = 10.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.47 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H1), 4.45 (ddt,

$J = 12.9, 4.8, 1.5$  Hz, 1H, H7), 4.33 (dd,  $J = 12.3, 1.6$  Hz, 1H, H6), 4.17 (ddt, 12.9, 6.1, 1.5 Hz, 1H, H7), 4.12 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H, H4), 4.05 (dd,  $J = 12.3, 1.8$  Hz, 1H, H6), 3.90 (dd,  $J = 9.6, 7.8$  Hz, 1H, H2), 3.58 (dd,  $J = 9.6, 3.8$  Hz, 1H, H3), 3.32 (br. d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H5);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  139.1, 138.7, 138.1 (Cq,ar), 134.4-126.7 (CHar), 117.3 (C9), 102.8 (C1), 101.5 (C10), 79.4 (C3), 78.6 (C2), 75.5 (C11), 74.2 (C4), 72.2 (C11), 70.3 (C7), 69.4 (C6), 66.6 (C5); **HRMS (ESI +)**:  $m/z$  calculated for  $[\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_6+\text{Na}]^+$ : 511.2097 found 520.2095.

### Phenyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (30a)

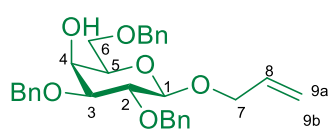


To a solution of phenyl 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside **38a** (1 g, 1.8 mmol, 1.0 eq.) in THF (50 mL) was added  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (1.5 g, 18 mmol, 10.0 eq.), and methyl orange indicator at 0 °C with a stream of Ar. After 30 min, a solution of HCl in 1,4-dioxane 4N (12 mL, 48 mmol, 26.7 eq.) was added to the reaction mixture until the solution turned pink, and the reaction was then allowed to proceed under stirring at r.t. for 4 hours. After completion, the reaction mixture was filtered over a pad of Celite® and washed several times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and the combined filtrates were concentrated. The oily residue was dissolved in DCM and washed with  $\text{NaHCO}_3$  (satd. aq.), and the aqueous layers were extracted another time with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic phases were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (InterChim®; solid phase: 80g, 50  $\mu\text{m}$  STD; mobile phase: EP/ EtOAc: 100% to 6/4). The pure fractions were combined and concentrated to obtain the expected compound **30a** (605 mg, 62%) as a white powder.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>251</sup>

**Rf**: (8:2, EP/ EtOAc)= 0.7;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.61-7.54 (m, 2H, Har), 7.44-4.21 (m, 18H, Har), 4.83 (AB syst. d,  $J = 10.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.75 (AB syst. d,  $J = 10.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.73 (AB syst. d,  $J = 11.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.68 (AB syst. d,  $J = 11.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.63 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H, H1), 4.57 (br s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.10 (br. d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H4), 3.88–3.70 (m, 3H, H2, H-6a, H6b), 3.63–3.54 (m, 2H, H3 and H5);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  138.2 (Cq,ar), 137.9 (Cq,ar), 137.7 (Cq,ar), 133.9 (Cq,ar), 131.7–127.5 (CHar), 87.7 (C1), 82.5 (C2), 77.0 (C3, C5), 75.7, 73.7, 72.2, 69.5 (C6, 3  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 66.9 (C4); **HRMS (ESI)**: ( $m/z$ ) calcd for  $[\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{S}+\text{Na}]^+$ : 565.2025, found 565.2028.

### *O*-Allyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (30b)



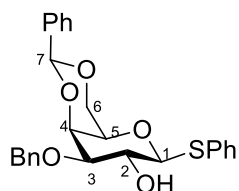
Aspect: Colorless oil  
 Yield: 60%  
 Chemical Formula:  $C_{30}H_{34}O_6$   
 Molecular Weight:  $490.60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

In a dried round bottom flask containing activated molecular sieves  $4\text{\AA}$  (2.0 g) and under gentle argon flow was dissolved **38b** (0.2 g, 0.4 mmol, 1.0 eq.), in freshly distilled THF (4.0 mL).  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (0.2 g, 3.5 mmol, 8.5 eq.) was then added and mixture was stirred at room temperature for 1 hour. At  $0^\circ\text{C}$ , HCl 4 M in 1,4-dioxane (1 mL, 10.0 eq.) was then added dropwise (15 min addition) until the evolution of gas ceased. After stirring at  $0^\circ\text{C}$  for 2 hours, the reaction mixture was diluted with toluene, filtered through celite, washed with  $\text{NaHCO}_3$  (satd. aq.). The aqueous layer was extracted with toluene. The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (78:22, PE/ EtOAc) to afford **30b** as a colorless oil (0.12 g, 60 %).

Analyses were in good agreement with those published.<sup>252</sup>

$R_f$  (7:3, PE/ EtOAc) = 0.33;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.36-7.28 (m, 15H, Har), 5.95 (dddd,  $J = 17.2, 10.6, 6.1, 4.5 \text{ Hz}$ , 1H, H8), 5.35 (ddd,  $J = 17.2, 3.0, 1.6 \text{ Hz}$ , 1H, H9b), 5.19 (ddd,  $J = 10.4, 2.6, 1.1, 1 \text{ Hz}$ , H9a), 4.93 (AB syst. d,  $J = 10.7 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.74 (AB syst. d,  $J = 10,7 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.72 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.59 (s, 2H, H10), 4.43 (ddt,  $J = 12.9, 5.2, 1.4 \text{ Hz}$ , 1H, H7), 4.41 (d,  $J = 7.7 \text{ Hz}$ , 1H, H1), 4.14 (ddt,  $J = 13.6, 6.1, 1.6 \text{ Hz}$ , 1H, H7), 4.02 (br. t, 1H, H4), 3.82-3.71 (m, 2H, H-6), 3.67 (dd,  $J = 9.6, 7.7 \text{ Hz}$ , 1H, H2), 3.55 (t,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ , 1H, H5), 3.49 (dd,  $J = 9.6, 3.4 \text{ Hz}$ , 1H, H3), 2.50 (br. s, 1H, OH4);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.7 (Cq,ar), 138.1, 138.0 (CHar), 117.3 (C9), 102.8 (C1) 80.7 (C3), 79.0 (C2), 75.4 (C12), 73.8 (C10), 73.3 (C5), 72.5 (C11), 70.2 (C7), 69.3 (C6), 67.0 (C4).

### Phenyl-3-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (**42**)



Aspect: white powder  
 Yield: crude  
 Chemical Formula:  $C_{26}H_{26}O_5S$   
 Molecular Weight:  $450.55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

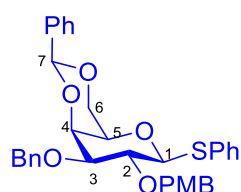
The compound **31a** (5 g, 13.9 mmol, 1.0 eq.) was suspended in MeOH (90 mL). The reaction mixture was stirred at  $65^\circ\text{C}$  (methanol reflux). Then,  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  (3.8 g, 15.2 mmol, 1.1 eq.) was added and the reaction mixture was reflux during 15 hours. The mixture was evaporated under reduce pressure. After that, CsF (2.3 g, 15.2 mmol, 1.1 eq.) was added to the crude and the mixture was dried under vacuum during 1 hour. The mixture was suspended in DMF (70 mL), and BnBr (3.8 mL, 15.2 mmol, 1.1 eq.) was added. The solution was stirred at r.t. during 48 hours. After completion, the mixture was filtrated over a pad of Celite® and to eliminate

the excess of CsF, NH<sub>4</sub>Cl (satd. aq.) was added. Surprisingly, a precipitate appears. This precipitate was filtrated to obtain the crude product **42**.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>253</sup>

**R<sub>f</sub>** (6:4, Cyclohexane/EtOAc) = 0.5; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 7.73-7.69 (m, 2H, Har), 7.46-7.19 (m, 13H, Har), 5.43 (s, 1H, H7), 4.72 (AB syst. q, *J* = 12.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.52 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H1), 4.35 (dd, *J* = 12.4, 1.7 Hz, 1H, H6a), 4.14 (dd, *J* = 3.6, 1.1 Hz, 1H, H4), 4.03-3.90 (m, 2H, H2 and H6b) 3.51 (dd, *J* = 9.3, 3.4 Hz, 1H, H3), 3.47-3.44 (m, 1H, H5), 2.53 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, OH).

### Phenyl-2-*O*-paramethoxybenzyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-1-thio-β-D-galactopyranoside (**38c**)



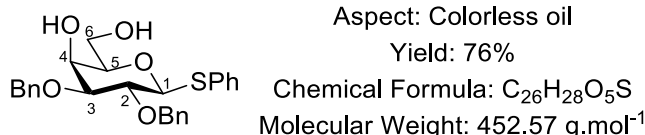
Aspect: white powder  
Yield: 85% (over two step)  
Chemical Formula: C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>S  
Molecular Weight: 570.70 g.mol<sup>-1</sup>

To a solution of compound **42** (7 g, 15.6 mmol, 1.0 eq.) in DMF (80 mL) was added NaH (60% in oil) (685 mg, 17.1 mmol, 1.1 eq.) at 0°C. After 30 min, PMBCl (2.3 mL, 1.9 mmol, 1.1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at r.t. during 20 hours. After completion, water was added to quench the reaction. The formed precipitate was filtrated. To eliminate water, the compound was solubilized in DCM and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solution was concentrated under reduced pressure to obtain the crude compound **38c** (6.7 g, 85% over two steps) as a white powder.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>253</sup>

**R<sub>f</sub>**: (7:3, PE/ EtOAc) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 7.76–7.65 (m, 2H, Har), 7.58–7.48 (m, 2H, Har), 7.46–7.12 (m, 14H, Har), 6.93–6.82 (m, 2H, Har), 5.50 (s, 1 H, H7), 4.72 (AB syst. q, *J* = 12.3 Hz, 2H, 4-MeOPhCH<sub>2</sub>), 4.63 (br. s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.60 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H1), 4.37 (dd, *J* = 12.5, 1.4 Hz, 1H, H6a), 4.15 (br. d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, H4), 3.99 (dd, *J* = 12.2, 1.4 Hz, 1 H, H6b), 3.90 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H2), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.60 (dd, *J* = 9.2, 3.4 Hz, 1H, H3), 3.44-3.39 (m, 1H, H5); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 159.4 (C-OMe), 138.3 (Cq.ar), 138.0 (Cq.ar), 132.8 (CHar), 130.8-126.8 (CHar), 113.9 (CHar), 101.5 (CHPh), 86.7 (C1), 81.5 (C3), 75.3 (CH<sub>2</sub>Ph and C2), 73.9 (C4), 72.0 (C5), 70.0 (C6), 69.6 (C6), 55.5 (OCH<sub>3</sub>); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for [C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub>S+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 588.2420, found 588.2420.

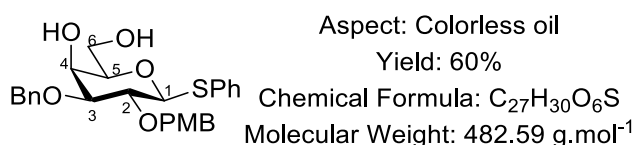
### Phenyl 2,3-di-*O*-benzyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**41a**)



The compound **38a** (2 g, 3.6 mmol, 1.0 eq.) was suspended in AcOH 80%<sub>aq</sub> (80 mL) and the mixture was stirred at 80°C during 5 hours. After completion, the reaction mixture was diluted in EtOAc and the organic layer was washed with water, NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.) and water. The aqueous layer was extracted with EtOAc. Then, the organic layers were combined to be wash again with NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.) and dried over MgSO<sub>4</sub>. After concentration, the residue was purified by flash chromatography: (InterChim®; Solid phase: 80g, 50µm STD; Mobile phase: PE/ EtOAc: 6/4 to 3/7) to obtain the expected compound **41a** (1.3 g, 76%) as a colorless oil.

**R<sub>f</sub>** (6: 4, EP/ EtOAc) = 0.1; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.59-7.51 (m, 2H, Har), 7.45-7.22 (m, 13H, Har), 4.84 (AB syst. d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (AB syst. d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.71 (s, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H1), 4.05 (br. d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H5), 3.98 (dd, *J* = 6.9, 11.7 Hz, 1H, H6), 3.85-3.73 (m, 1H, H6), 3.76 (dd, *J* = 8.9, 9.6, 1H, H2), 3.59 (dd, *J* = 3.3, 8.9 Hz, 1H, H3), 3.50 (dd, *J* = 4.6, 6.4 Hz, 1H, H5), 2.61 (br s, 1H, OH), 2.12 (br s, 1H, OH).

### Phenyl 2-*O*-(paramethoxybenzyl)-3-benzyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**41c**)

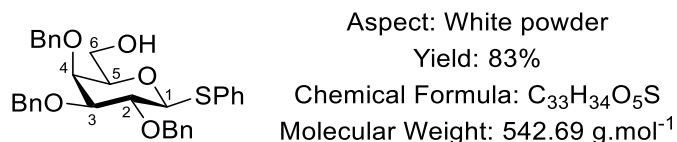


The compound **38c** (0.5 g, 0.83 mmol, 1.0 eq.) was suspended in AcOH 80%<sub>aq</sub> (4.4 mL) and the insoluble mixture was stirred at 80°C such as the mixture became soluble (~30 min). After completion, the solution was diluted with water and EtOAc was added. The layers were separated and the organic layer was washed with water. The aqueous layers were combined and extracted with EtOAc. After that, the organic layers were washed with NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.). Then, the organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to obtain the crude product. The residue was purified by flash chromatography (InterChim®; Solide phase: 40 g 50 µm; Liquid phase: Cyclohexane/ EtOAc 6/4 to 4/6) to obtain the compound **41c** (250 mg, 62%) as a colorless oil.

**R<sub>f</sub>** (6: 4, PE/ EtOAc) = 0.1; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 7.58–7.52 (m, 2H, Har), 7.37–7.24 (m, 11H, Har), 6.91–6.84 (m, 2H, Har), 4.80–4.66 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph and 4-MeOPhCH<sub>2</sub>) 4.64 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H1), 4.05 (dd, *J* = 3.3, 1.0 Hz, 1H, H4), 3.98 (dd, *J* = 11.9, 6.8 Hz, 1H, H6a), 3.84–3.70 (m,

5H, OCH<sub>3</sub>, H-2 and H6b), 3.57 (dd,  $J = 8.7, 3.4$  Hz, 1H, H3), 3.48 (ddd,  $J = 6.8, 4.2, 1.0$  Hz, 1H, H5); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  159.5 (C-OMe), 137.7 (Cq.ar), 133.9 (Cq.ar), 132.6 (Cq.ar), 131.8 (CHar), 130.4 (CHar), 130.1 (CHar), 129.5-127.3 (CHar), 113.9 (CHar), 87.7 (C1), 82.6 (C3), 78.2 (C5), 76.9 (C2), 75.5 (CH<sub>2</sub>Ph), 72.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 67.5 (C4), 62.8 (C6), 55.4 (OCH<sub>3</sub>).

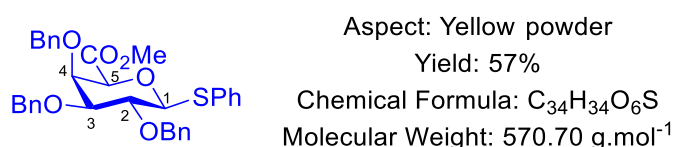
### Phenyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (41d)



To a solution of borane/tetrahydrofuran (1 M in THF, 2.8 mL, 28.8 mmol, 52.0 eq.) was added phenyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside **38a** (300 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq.) at room temperature under argon flow. The mixture was stirred for 10 min, and freshly dried (under reduce pressure during 24h) copper(II) triflate (10 mg, 0.03 mmol, 0.05 eq.) was added. After stirring for 18 hours, the mixture was cooled to 0°C, and the reaction was quenched with triethylamine and methanol. The resulting mixture was concentrated under reduced pressure followed by coevaporation with methanol three times to obtain a dark mixture. The crude was purified by flash chromatography (InterChim®; Solid phase: 40 g, 50  $\mu$ m STD; Mobile phase: PE/EtOAc: 100% to 7/3) to obtain the expected compound **41d** (167 mg, 83%) as a white powder.

R<sub>f</sub> (6:4, PE/EtOAc) = 0.3;  $[\alpha]_D^{20}$ : -83.0 ( $c$  1, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.58-7.52 (m, 2H, Har), 7.42-7.20 (m, 18H, Har), 4.98 (AB syst. d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 (AB syst. d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.76 (AB syst. d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.67 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H1), 4.64 (AB syst. d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.96 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H2), 3.88-3.80 (m, 2H, H4 and H6a), 3.62 (dd, 1H,  $J = 2.8, 9.6$  Hz, H3), 3.56-3.42 (m, 2H, H-5, H6b); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  138.4 (Car), 138.3 (Cq.ar), 138.25 (Cq.ar), 134.0 (Cq.ar), 131.7 (CHar), 129.0-127.3 (Car), 87.9 (C1), 84.4 (C3), 78.9 (C5), 77.4 (C2), 75.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 74.3 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.4 (C4), 73.2 (CH<sub>2</sub>Ph), 62.4 (C6); HRMS (ESI): (m/z) calcd for [C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>S+Na]<sup>+</sup>: 565.2025, found 565.2023.

### Methyl (phenyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosyluronate) (29d)



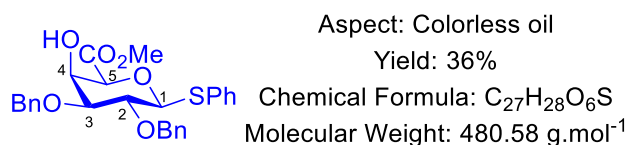
TEMPO (12.5 mg, 0.08 mmol, 0.2 eq.), BAIB (322 mg, 1 mmol, 2.5 eq.) and AcOH (35  $\mu$ L, 0.6 mmol, 2.0 eq.) were added to a solution of **41d** (0.2 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq.) in DCM (0.6 mL), H<sub>2</sub>O (0.6 mL) and tBuOH (0.3 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. with argon flow during 2 hours. After completion, the reaction mixture was quenched by the addition of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (10 mL, 10%<sub>w/w</sub> in H<sub>2</sub>O). The aqueous layer was extracted with EtOAc and combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to obtain the crude acid.

The crude acid was esterified with MeI (277 mg, 2 mmol, 2.5 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (62  $\mu$ L, 1 mmol, 5 eq.) in DMF (1.7 mL) during 1 hour. After completion, the reaction mixture was quenched by the addition of water. The aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O. Then, the combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography (InterChim®; Solid phase: 12 g, 50  $\mu$ m STD; Mobile phase: PE/EtOAc: 9/1 to 8/2) to obtain the expected compound **29d** (120 mg, 57%) as a yellow powder.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>254</sup>

R<sub>f</sub> (8:2, EP/EtOAc) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.68-7.61 (m, 2H, Har), 7.43-7.16 (m, 18H, Har), 4.91 (AB syst. d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 (AB syst. d, *J* = 10.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.68-4.79 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.63 (AB syst. d, *J* = 11.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.60 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H1), 4.32 (dd, *J* = 1.2, 2.7 Hz, 1H, H4), 4.05 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H5), 3.94 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H2), 3.70 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.65 (dd, 1H, *J* = 2.8, 9.4 Hz, H3); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  168.5 (C=O, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 138.3 (Cq.ar), 138.2 (Cq.ar), 137.9 (Cq.ar), 133.5 (Car), 132.4 (CHar), 127.5-128.8 (CHar), 87.8 (C1), 83.3 (C3), 77.2 (C5), 76.6 (C2), 75.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.0 (C4), 74.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 72.8 (CH<sub>2</sub>Ph), 52.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for [C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub>S+NH<sub>4</sub>OH]<sup>+</sup>: 588.2420, found 588.2421.

### Methyl (phenyl 2,3-di-O-benzyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid) uronate (**29a**)



TEMPO (14 mg, 0.09 mmol, 0.2 eq.), BAIB (356 mg, 1.1 mmol, 2.5 eq.) and AcOH (50  $\mu$ L, 0.88 mmol, 2.0 eq.) were added to a solution of phenyl 2,3-di-O-benzyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside **41a** (200 mg, 0.44 mmol, 1.0 eq.) in DCM (1 mL), H<sub>2</sub>O (1 mL) and tBuOH (0.5 mL) with a stream of Ar. The reaction mixture was stirring at r.t. during 4 hours. After completion, the reaction mixture was quenched by the addition of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 mL, 10%<sub>w/w</sub> in H<sub>2</sub>O). The mixture was then extracted with EtOAc and the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated to obtain the crude acid.

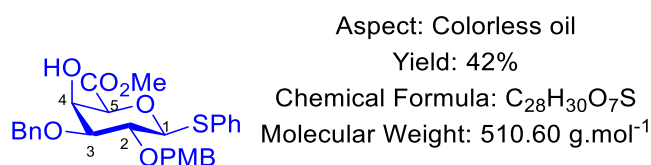


The crude acid was dried under reduce pressure over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Then, the acid residue was esterified. The crude was solubilized in acetone (2.5 mL). Then, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (122 mg, 0.88 mmol, 2 eq.) was added and the reaction was stirred at r.t. during 10 min. After that, methyl triflate (70 µL, 0.62 mmol, 1.4 eq.) was added and the reaction was stirred at r.t. during 15 hours. After completion, NH<sub>4</sub>Cl (satd. aq.) was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc. Then, the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography (InterChim®; Solid phase: 12 g, 50 µm STD; Mobile phase: PE/EtOAc: 9/1 to 6/4) to obtain the expected compound **29a** (80 mg, 36%) as a colorless oil.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>213</sup>

**R<sub>f</sub>**: (6:4, PE/EtOAc) = 0.7; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 7.68-7.58 (m, 2H, Har), 7.45-7.27 (m, 13H, Har), 4.88-4.65 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.59 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H1), 4.40 (td, *J* = 1.3, 3.0, 5.9 Hz, 1H, H4), 4.07 (br. t, *J* = 1.3 Hz, 1H, H5), 3.84 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.74 (br. t, *J* = 9.2 Hz, 1H, H2), 3.63 (dd, *J* = 3.2, 8.8 Hz, 1H, H3), 2.46 (dd, *J* = 1.3, 3.2 Hz, 1H, OH); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for [C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>S+Na]<sup>+</sup> 503.1504, found 503.1506.

### Methyl (phenyl 2-*O*-paramethoxybenzyl-3-*O*-benzyl-1-thio-β-D-galactopyranosyluronate) (**29c**)

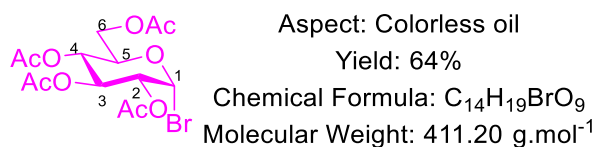


TEMPO (16 mg, 0.2 eq.), BAIB (418 mg, 2.5 eq.) and AcOH (60 µL, 2.0 eq.) were added to a solution of compound **41c** (250 mg, 0.52 mmol, 1.0 eq.) in DCM (1 mL), H<sub>2</sub>O (1 mL) and tBuOH (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. during 2.5 hours. After completion, the reaction mixture was quenched by the addition of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 mL, 10%<sub>w/w</sub> in H<sub>2</sub>O). The aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to obtain the crude acid. The crude acid was dried under reduce pressure over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

After that, the crude acid was esterified. The crude was solubilized in acetone (3 mL). Then, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (144 mg, 2.0 eq.) was added and the reaction was stirred at r.t. during 10 min. After that, methyl triflate (82 µL, 1.4 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at r.t. during 5 hours. After completion, NH<sub>4</sub>Cl (satd. aq.) was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc. Then, the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography (InterChim®; Solide phase: 12 g 50 µm; Liquid phase: Cyclohexane/EtOAc 9/1 to 6/4) to obtain the compound **29c** (110 mg, 42%) as a colorless oil.

$R_f$  (6:4, cyclohexane/EtOAc) = 0.5;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.67 – 7.61 (m, 2H, Har), 7.34 – 7.24 (m, 11H, Har), 6.91 – 6.84 (m, 2H, Har), 4.81 – 4.63 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  and 4-MeOPh $\text{CH}_2$ ), 4.57 (d, 1H,  $J = 9.6$  Hz, H1), 4.41 – 4.36 (m, 1H, H4), 4.07 – 4.07 (m, 1H, H5), 3.83 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.81 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.78 – 7.69 (m, 1H, H2), 3.61 (dd,  $J = 3.2$  Hz,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H3), 2.45 (dd,  $J = 1.3$  Hz,  $J = 2.9$  Hz, 1H, OH);  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168.4 (C=O,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 159.6 (C-OMe), 137.5 (Cq.ar), 132.9 (Cq.ar), 130.6–127.3 (CHar), 114.0 (CHar), 88.0 (C1), 81.9 (C3), 77.0 (C5), 76.2 (C2), 75.6 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.4 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 68.0 (C4), 55.4 ( $\text{CH}_3$ ), 52.8 ( $\text{CH}_3$ ); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for  $[\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{NO}_7\text{S}+\text{Na}]^+$ : 533.1610, found 533.1617.

### 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromide (**28a**)

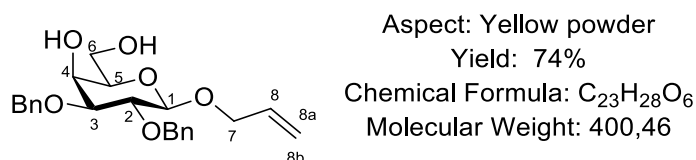


Peracetylglucoside (0.5 g, 1.2 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in AcOH (4 mL) and a commercially available solution of HBr AcOH (4 mL, 5.9 M, 33% in AcOH) was added at 0°C with a stream of Ar. The brown solution was stirred at room temperature during 3 hours. After completion, cold water was added and the aqueous layer was extracted with DCM. Then, the organic layer was washed with  $\text{NaHCO}_3$  (satd. aq.), water and brine. The organic layer was then dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated to obtain the crude compound. The residue was purified by flash chromatography (InterChim®; Solid phase: 25g, 50 $\mu\text{m}$  STD; Mobile phase: PE/EtOAc: 9/1 to 6/4) to obtain the expected glucosyle bromide **28a** (315 mg, 64%) as a colorless oil.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>255</sup>

$R_f$ : (6:4, PE/EtOAc) = 0.7;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.61 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H1), 5.56 (t,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H3), 5.16 (tt,  $J = 2.5, 9.9$  Hz, 1H, H4), 4.84 (dd,  $J = 4.0, 9.9$  Hz, 1H, H2), 4.36–4.26 (m, 2H, H5, H6a), 4.17–4.09 (m, 1H, H6b), 2.10 (s, 3H, OAc- $\text{CH}_3$ ), 2.09 (s, 3H, OAc- $\text{CH}_3$ ), 2.05 (s, 3H, OAc- $\text{CH}_3$ ), 2.03 (s, 3H, OAc- $\text{CH}_3$ ); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for  $[\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{Br}+\text{Na}]^+$  433.0110, found 433.0107.

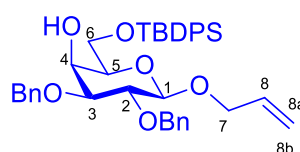
### *O*-Allyl-2,3-di-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (**48**)



To a solution of **38b** (0.3 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq.) in DCM (48 mL) and water (2.1 mL) was added drop by drop trifluoroacetic acid (4.4 mL) at 0°C with a stream of Ar. The reaction mixture was stirred during 4 hours at r.t. After completion, water was added to quench the reaction and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with water, NaCl (satd. aq.), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by flash chromatography: (InterChim®; Solid phase: 80g, 50µm STD; Mobile phase: Cyclohexane/EtOAc: 7/3 to 0/100) to obtain the expected compound **48** (0.18 g, 74%) as a yellow powder.

**R<sub>f</sub>**: (6: 4, Cyclohexane /EtOAc) = 0.5; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.40-7.22 (m, 10H, Har), 6.04-5.87 (m, 1H, H8), 5.40-5.28 (m, 1H, H9b), 5.23-5.16 (m, 1H, H9a), 4.93 (AB syst. d, 1H, *J* = 10.8, CH<sub>2</sub>Ph), 4.78-4.66 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.48-4.37 (m, 2H, H1 and H7a), 4.22-4.11 (m, 1H, H7), 4.01-3.91 (m, 2H, H4 and H6), 3.86-3.75 (m, 1H, H6), 3.68 (br. t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H2), 3.51 (dd, 1H, *J* = 3.4, 9.3 Hz, H3), 3.45 (br. t, 1H, *J* = 5.9 Hz, H5); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for [C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>+Na]<sup>+</sup>: 423.1784, found 423.1788.

### O-Allyl 2,3-di-O-benzyl-6-O-*tert*butyldiphenylsilyl-β-D-galactopyranoside (**49**)



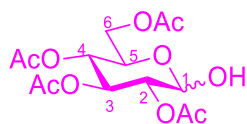
Aspect: colorless oil  
Yield: 89%  
Chemical Formula: C<sub>39</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>Si  
Molecular Weight: 638,86

To a solution of **compound 48** (600 mg, 1.5 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (10 mL) was added TBDPSCI (0.47 mL, 1.8 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (92 mg, 0.75 mmol, 0.5 eq.) at 0°C with a stream of Ar. The reaction was stirred at r.t. during 24 hours. After completion, water was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc. After that, the organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by silica-gel column chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc: 100/0 to 8/2) to afford **49** (857 mg, 89%) as an colorless oil.

**R<sub>f</sub>**: (6: 4, PE/EtOAc) = 0.6; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.66-7.58 (m, 4H, Har) 7.39-7.18 (m, 16H, Har), 5.95-5.82 (m, 1H, H8), 5.26 (dq, *J* = 1.6, 15.6 Hz, 1H, H9), 5.12 (dq, *J* = 1.4, 10.5 Hz, 1H, H9), 4.87 (AB syst. d, *J* = 11.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.72-4.63 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.32 (ddt, *J* = 1.7, 5.3, 13.0 Hz, 1H, H7), 4.31 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 4.05 (ddt, *J* = 1.3, 6.0, 13.0 Hz, 1H, H7), 3.97 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H4), 3.90 (dd, *J* = 6.4, 10.3 Hz, 1H, H6), 3.83 (dd, *J* = 5.8, 10.3 Hz, 1H, H6), 3.64 (dd, *J* = 7.9, 9.5 Hz, 1H, H2), 3.40 (dd, *J* = 3.4, 9.4 Hz, 1H, H3), 3.55 (br. t, *J* = 6.1 Hz, 1H, H5), 1.00 (s, 9H, *t*Bu); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 138.5 (Cq.ar), 138.0 (Cq.ar), 135.8 (C8), 135.7, 133.9, 131.7 (CHar), 129.0-127.3 (CHar), 117.3 (C9), 88.0 (C1), 82.7 (C3), 78.1 (C5), 77.2

(C2), 75.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 72.2 (CH<sub>2</sub>Ph), 67.1 (C4), 63.7 (C6), 27.0 (Cq, *t*Bu), 19.3 (CH<sub>3</sub>, *t*Bu); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for [C<sub>39</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>Si+Na]<sup>+</sup>: 661.2961, found 661.2964.

### 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose (**50**)

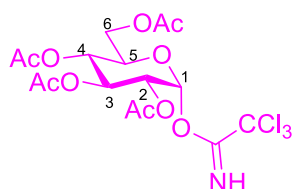


Aspect: Yellow oil  
Yield: 55%  
Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>  
Molecular Weight: 348,30

The peracetylated glucosyl (5 g, 12.8 mmol, 1.0 eq.) was solubilized in DMF (16 mL) and the reaction mixture was heated at 60°C with a stream of Ar. Then, hydrazine acetate (1.42 g, 15.4 mmol, 1.2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at 60°C during 3 hours. After completion, the mixture was diluted in EtOAc, washed with aqueous 5% NaCl solution and water. The aqueous layer were extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layers were washed with NaCl (satd. aq.), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by flash chromatography: (InterChim®; Solid phase: 40g, 50µm STD; Mobile phase: Cyclohexane/EtOAc: 8/2 to 6/4) to obtain the expected compound **50** (2.4 g, 55%) as a yellow oil.

**R<sub>f</sub>**: (7: 3, Cyclohexane/EtOAc) = 0.4; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 5.54 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H, H3α), 5.57 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H, H1α), 5.54 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H3β), 5.14-5.03 (m, 2H, H4α and H4β), 4.94-4.85 (m, 2H, H2α and H2β), 4.74 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1β), 4.30-4.08 (m, 5H, H-5α, H6α and H6β), 4.30-4.08 (m, 5H, H5β), 3.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, OHβ), 2.09 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>).

### 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranosyl trichloroacétimide (**28b**)



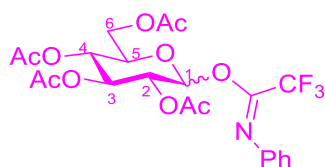
Aspect:  
Yield: 50%  
Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>10</sub>  
Molecular Weight: 492,69

The compound **50** (300 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) was solubilized in freshly distilled DCM (12 mL) at r.t. with a stream of Ar. Then, DBU (0.16 µL, 0.11 mmol, 0.13 eq.) and TCA (0.26 mL, 2.58 mmol 3 eq.) were added. The solution was stirred at rt and the reaction was monitoring by TLC. After completion, the mixture was filtrated and the filtrate was diluted in NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.) and DCM (5 mL). Layers was separated and the aqueous layer was extracted with DCM. Organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was

purified by flash chromatography: (Grace®; Solid phase: 12 g, 40 µm STD; Mobile phase: Cyclohexane/EtOAc: 9/1 to 6/4) to obtain the expected compound **28b** (210 mg, 50%) as a yellow oil.

**R<sub>f</sub>**: (6: 4, Cyclohexane/EtOAc) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.69 (s, 1H, NH), 6.56 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H1), 5.14 (br. t, *J* = 10.1 Hz, 1H, H3), 5.18 (t, *J* = 9.7 Hz, 2H, H4), 5.13 (dd, *J* = 3.7, 10.2 Hz, 1H, H2) 4.31-4.16 (m, 2H, H5 and H6a), 4.13 (dd, *J* = 1.9, 12.1 Hz, 1H, H6b), 2.08 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170.7 (CO, Ac), 170.2 (CO, Ac), 170.0 (CO, Ac), 169.6 (CO, Ac), 160.9 (CN), 93.0 (C1), 70.1 (C5), 70.0 (C3), 69.9 (C4), 67.9 (C2), 61.5 (C6), 27.1 (CCl<sub>3</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.7 (CH<sub>3</sub>, Ac).

### ***N*-Phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*D*-glucopyrasyl trifluoroacetimidate (28c)**

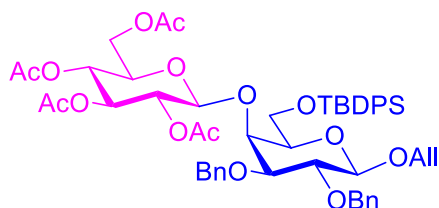


Aspect:  
Yield: 89%  
Chemical Formula: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>10</sub>  
Molecular Weight: 519,42

To a solution of **50** (0.55 g, 1.6 mmol, 1.0 eq.) in freshly distilled DCM (7.5 mL) was added dried K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.44 mg, 3.2 mmol, 2.0 eq.) and *N*-phenyl trifluoroacétimidoyl (0.84 mL, 3.2 mmol, 2.0 eq.) at r.t. with a stream of Ar. The reaction mixture was stirred overnight. After completion, the mixture was filtrated and concentrated. The residue was purified by flash chromatography: (interchim®; Solid phase: 40 g, 50 µm STD; Mobile phase: Cyclohexane/EtOAc: 8/2 to 6/4) to obtain the expected compound **28c** (726 mg, 89%) as a colorless oil.

**R<sub>f</sub>**: (6: 4, Cyclohexane/EtOAc) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.37-7.21 (m, 5H, Har), 5.53 (t, 1H, *J* = 10.1 Hz, H3α), 5.44 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz, H1α), 5.22 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz, H3β), 5.11-5.02 (m, 2H, H4α and H4β), 4.92-4.84 (m, 2H, H2α and H2β), 4.74 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H1β), 4.35-4.05 (m, 5H, H-5α, H6α and H6β), 3.77-3.68 (m, 1H, H5β), 2.07 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171.0 (CO, Ac), 170.3 (CO, Ac), 169.7 (CO, Ac), 169.6 (CO, Ac), 138.1 (Cq.ar), 128.9 (CHar), 127.9 (CHar), 127.7 (CHar), 95.7, 90.3 (C1α), 73.4, 72.6, 72.1, 71.2 (C2α), 70.0 (C3α), 68.7 (C4α), 67.2 (C5α), 62.1 (C6α), 43.9, 25.4, 23.3 (CF<sub>3</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>, Ac).

**O-Allyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-O-benzyl-6-O-tertbutyldiphenylsilyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (51)**

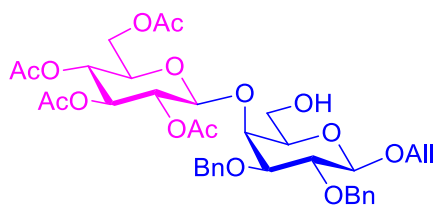


Aspect: Colorless product  
Yield: 35%  
Chemical Formula: C<sub>53</sub>H<sub>64</sub>O<sub>15</sub>Si  
Molecular Weight: 969,15

Donor **28c** (1.90 g, 3.66 mmol, 3.0 eq.) and acceptor **49** (0.78 g, 1.22 mmol, 1.0 eq.) glycosyls were co-evaporated with freshly distilled toluene and dried under reduce pressure. Then, they are solubilized in anhydrous DCM (80 mL) and the solution were added to activate MS 4 Å with a stream of Ar. The reaction was stirred during 30 min at room temperature. The temperature was lowered to -20°C before TMSOTf (67  $\mu$ L, 0.37 mmol, 0.3 eq.) addition. After 2 hours, the reaction was quenched with Et<sub>3</sub>N at -10°C. The mixture was filtrated over a pad of Celite®, washed with DCM and the filtrate was concentrated. The crude was purified by flash chromatography (Grace®: Solid phase: 25 g, 50  $\mu$ m STD, Liquid phase: Cyclohexane/EtOAc: 98/2 to 7/3) to obtain the compound **51** as a white powder along with traces of remaining acceptor glycosyl **49** (408 mg, 35%).

R<sub>f</sub> (7:3, Cyclohexane/EtOAc) = 0.3 **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  7.62-7.47 (m, 4H, Har), 7.35-7.12(m, 16H, Har), 5.99-5.384 (m, 1H, H-8), 5.33-5.24 (m, 1H, H9), 5.22-5.24 (m, 2H, H9 and H3'), 4.98 (t, *J* = 9.6, 1H, H2'), 4.84-4.87 (m, 3H, H1' and CH<sub>2</sub>Ph), 4.79, 4.66 (AB syst. d, *J* = 11.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.41-4.31 (m, 1H, H7), 4.32 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H1), 4.14-3.96 (m, 3H, H7, H-6a' and H4), 3.90-3.79 (m, 3H, H6b' and H6), 3.58 (dd, *J* = 7.4, 9.8 Hz, 1H, H2), 3.50 (m, 2H, H5' and H3), 3.33 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H5), 2.03 (s, 6H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.89 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.85 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.03 (s, 9H, *t*Bu); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  170.7, 170.5, 169.5, 169.4, 138.8, 138.4, 135.7, 135.6, 134.4, 133.8, 133.7, 129.8, 128.6, 128.5, 128.2, 127.8, 127.7, 117.3 (C9), 102.7 (C1), 100.6 (C1'), 81.9 (C3), 79.5 (C2), 75.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.0 (C5), 73.6 (CH<sub>2</sub>Ph and C4), 72.9 (C3'), 71.7 (C4'), 71.7 (C5'), 70.0 (C7), 68.6 (C2'), 63.3 (C6), 62.0 (C6'), 27.0 (Cq, *t*Bu), 20.8 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.7 (CH<sub>3</sub>, Ac), 19.3 (CH<sub>3</sub>, *t*Bu); **HRMS (ESI)**: *m/z* calculated for [C<sub>53</sub>H<sub>64</sub>O<sub>15</sub>Si+Na]<sup>+</sup>: 991.3912 found 991.3898.

**O-Allyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (52)**

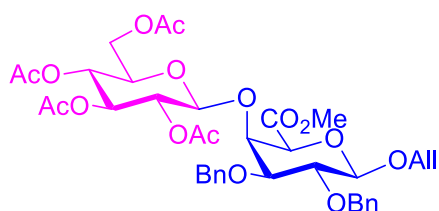


Aspect: Colorless oil  
Yield: 99%  
Chemical Formula: C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>O<sub>15</sub>  
Molecular Weight: 730.76 g.mol<sup>-1</sup>

To a solution of **51** (70 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) diluted in freshly distilled THF (5 mL) was added TBAF (0.1 mL, 1.5 eq., 1M in THF) at 0°C with a stream of Ar. The reaction mixture was stirred at r.t. during 27 hours. After completion, NH<sub>4</sub>Cl (satd. aq.) was added to quench the reaction and the aqueous layer was extracted with EtOAc. Then, organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (Grace®; Solid phase: 4g, 40µm; Mobile phase: Cyclohexane/EtOAc: 7/3 to 0/100) to obtain the expected compound **52** with impurities (50 mg, 99%) as a colorless oil.

R<sub>f</sub> (7:3, Cyclohexane/EtOAc) = 0.1; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.41-7.24 (m, 4H, Har), 6.00-5.84 (m, 1H, H8), 5.36-5.12 (m, 3H, H9 and H3), 5.07-4.57 (m, 7H, 4CH<sub>2</sub>Ph, H2', H4' and H1') 4.44-4.28 (m, 3H, H7a, H6a' and H1), 4.17-3.92 (m, 3H, H7b, H6b' and H4), 3.86-3.37 (m, 6H, H6, H5', H2, H3 and H5), 2.08 (s, 6H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.85 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.5 (CO, Ac), 170.2 (CO, Ac), 169.4 (CO, Ac), 169.2 (CO, Ac), 138.6 (Cq.ar), 138.2 (Cq.ar), 134.1 (C8), 128.6-127.7 (CHar), 117.2 (C9), 102.8 (C1), 102.2 (C1'), 81.0 (C3), 79.7 (C2), 75.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 74.9 (C4), 73.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 73.4 (C5), 72.6 (C3'), 71.9 (C5'), 71.3 (C2'), 70.3 (C7), 68.8 (C4'), 62.2 (C6), 59.6 (C6'), 20.6 (CH<sub>3</sub>, Ac); HRMS (ESI): m/z calculated for [C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>O<sub>15</sub>+Na]<sup>+</sup>: 753.2734 found 753.2731.

**O-Allyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranoside)(1→4)(Methyl (2,3-di-O-benzyl-β-D-galactopyranosid) uronate) (52)**

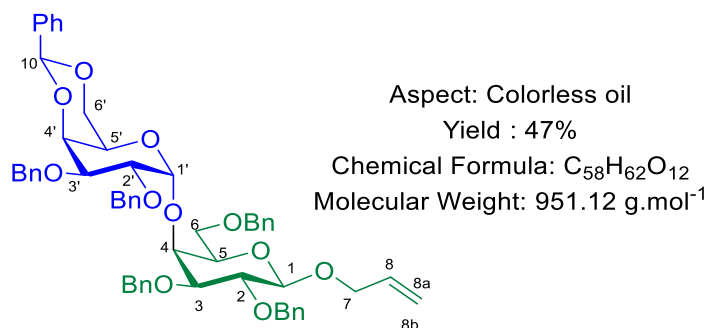


Aspect: Colorless oil  
Yield: crude  
Chemical Formula: C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>O<sub>16</sub>  
Molecular Weight: 758,76

TEMPO (2 mg, 0.014 mmol, 0.2 eq.), BAIB (58 mg, 0.18 mmol, 2.5 eq.) and AcOH (8 µL, 0.14 mmol, 2.0 eq.) were added to a solution of **52** (50 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) in DCM (1.2 mL), H<sub>2</sub>O (1.2 mL) and tBuOH (0.6 mL). The reaction mixture was stirring at r.t. during 2 hours. After completion, the reaction mixture was quenched by the addition of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 mL, 10% in H<sub>2</sub>O). The mixture was then extracted four times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and concentrated to obtain the crude compound. The residue was esterified with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mg, 0.36 mmol, 5 eq), MeI (12 µL, 0.18 mmol, 2.5 eq.), in DMF (0.3 mL) during 6 hours. After completion, water was added at 0°C and the organic layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (4 times). Then, the organic layer was washed 4 times with brine to removed DMF, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure to obtain the crude compound. The residue was not purified.

R<sub>f</sub> (6: 4, Cyclohexane/EtOAc) = 0.2; HRMS (ESI): m/z calculated for [C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>O<sub>15</sub>+Na]<sup>+</sup>: 753.2734 found 753.

***O*-Allyl-(2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (55a)**

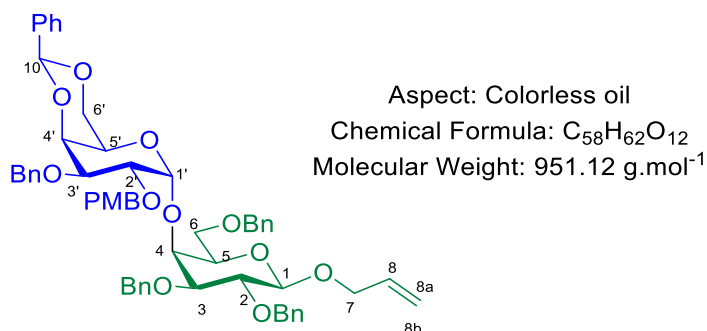


In a dried 50 mL round bottom flask protected from light containing activated molecular sieves 4Å, were introduced 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- $\beta$ -D-thiophenylgalactopyranoside (497 g, 0.92 mmol, 1.5 eq), tri-*tert*-butylpyrimidine (273 mg, 1.10 mmol, 1.8 eq) and silver triflate (599 mg, 2.33 mmol, 3.8 eq). After drying for 10 min under vacuum, solids were solubilized in freshly distilled DCM (4 mL) and mixture was left stirred for 15 min. Then, a solution of *p*-NO<sub>2</sub>PhSCl (209 mg, 1.10 mmol, 1.8 eq) in DCM (1 mL) was added dropwise, at -78 °C, followed by a solution of *O*-allyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (300 mg, 0.61 mmol, 1 eq) in DCM (3 mL), added dropwise too. After stirring at -78 °C for 3 h, reaction was quenched at -78 °C with a satd. solution of NaHCO<sub>3</sub> (1.5 mL) before gradually being warmed to room temperature. Mixture was diluted with DCM (15 mL) and solids were filtered off through a celite pad which was thoroughly washed with DCM (30 mL). Solvents were removed under vacuum and the yellow residue was purified by column chromatography using PE/EtOAc (gradient from 100:0 to 70:30) to afford **5** (256 mg, 47 %) as a colorless solid.

**R<sub>f</sub>** (7:3, PE/EtOAc) = 0.45; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  7.45-7.15 (m, 30H, CH<sub>ar</sub>), 6.01 (dddd,  $J$  = 17.2, 10.6, 6.1, 4.5 Hz, 1H, H8), 5.39 (ddd,  $J$  = 17.2, 3.0, 1.6 Hz, 1H, H9b), 5.36 (s, 1H, H10), 5.19 (ddd,  $J$  = 10.4, 2.6, 1.1, 1H, H9a), 5.03 (d,  $J$  = 2.46 Hz, 1H, H1'), 4.95-4.63 (m, 10H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.43 (ddt,  $J$  = 12.9, 5.2, 1.4 Hz, 1H, H7), 4.38 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H1), 4.22 (AB syst. d,  $J$  = 11.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.20 (AB syst. d,  $J$  = 11.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.14 (ddt,  $J$  = 13.6, 6.1, 1.6 Hz, 1H, H7), 4.15-4.09 (m, 4H, H-4 H2' H3' H4'), 4.08-3.98 (m, 3H, H5 H6'), 3.66 (dd,  $J$  = 9.9, 7.7 Hz, 1H, H2), 3.62 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H, H6a), 3.52 (m, 1H, H5), 3.46 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H, H6b), 3.41 (dd,  $J$  = 9.9, 3.0 Hz, 1H, H3); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  139.4-137.9 (C<sub>q,ar</sub>), 134.3 (C8), 129.5-125.4 (CH<sub>ar</sub>), 117.3 (C9), 103.2 (C1), 100.4 (C1', C10), 80.8 (C3), 78.3 (C2), 76.2, 75.6, 74.5, 73.9 (C2', C3', C4', C4), 74.9, 73.1, 72.3, 71.7 (CH<sub>2</sub>Ph), 70.3 (C7), 69.4 (C6), 67.6 (C6', C5), 62.9 (C5); **HRMS (ESI)**:  $m/z$  calculated for [C<sub>57</sub>H<sub>60</sub>O<sub>11</sub>+Na]<sup>+</sup>: 943.4033 found 943.4011.

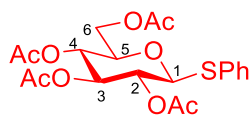


**O-Allyl-(2-O-paramethoxybenzyl-3-O-benzyl-4,6-O-benzylidène- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (55c)**



Donor **38c** and acceptor **30b** glycosyls were dried overnight under reduce pressure with P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. In a brown flask, activated MS 4 Å and **38c** (175 mg, 0.31 mmol, 1.5 eq.) were dried under reduce pressure for 50 min. Then, the mixture was solubilized in DCM (8 mL) and **30b** (100 mg, 0.2 mmol, 1 eq) in DCM (2 mL) was added. The solution was stirred at r.t. during 1 hour. The temperature was lowered to -60°C. After 15 min, NIS (87 mg, 0.36 mmol, 1.9 eq. in THF (0.5 mL) and TfOH (16 µL, 0.18 mmol, 0.9 eq) were added and the temperature was gradually increase up to -10°C. After 5h, the reaction was quenched by addition of Et<sub>3</sub>N (0.25 µL). The mixture was filtrated over a pad of celite® and washed with DCM. The filtrate was washed with Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10% aq.), water and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (Grace®: Solide phase: 24 g, 40 µm, Liquid phase: Cyclohexane/EtOAc: 100/0, to 7/3). The expected compound **55c** was obtained in mixture with acceptor glycosyl **30b** (180 mg).

R<sub>f</sub> (7:3, PE/EtOAc) = 0.5; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.58-7.15 (m, 27H, H<sub>ar</sub>), 6.84-6.73 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.08-5.91 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 5.43-5.30 (m, 2H, H<sub>9b</sub> and CHPh), 5.28-5.17 (m, 1H, H<sub>9a</sub>), 5.07 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>), 4.99-4.59 (m, 10H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.40 (d, J =, 1H, H<sub>1</sub>), 4.32 (d, J = 12.2 Hz, 1H, H<sub>7a</sub>), 4.23 (d, J = 11.4 Hz, 1H, H<sub>7b</sub>), 4.20-3.94 (m, 7H, H<sub>4</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5</sub> and H<sub>6'</sub>), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.69-3.34 (m, 5H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 159.0 (C-OMe), 139.0 (C<sub>qar</sub>), 138.7 (C<sub>qar</sub>), 138.4 (C<sub>qar</sub>), 138.2 (C<sub>qar</sub>), 134.4 (C<sub>qar</sub>), 139.4-137.9 (C<sub>qar</sub>), 134.3 (C<sub>8</sub>), 129.8-126.5 (CH<sub>ar</sub>), 117.3 (C<sub>9</sub>), 113.7 103.2 (C<sub>1</sub>), 101.1 (C<sub>1'</sub>), 100.9 (C<sub>10</sub>), 80.9 (C<sub>3</sub>), 78.4 (C<sub>2</sub>), 76.3, 75.4, 74.9, 74.7 (C<sub>2'</sub>, C<sub>3'</sub>, C<sub>4'</sub>, C<sub>4</sub>), 74.3, 73.7, 73.3, 71.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 70.5 (C<sub>7</sub>), 69.4 (C<sub>6</sub>), 67.7 (C<sub>6'</sub>, C<sub>5</sub>), 63.0 (C<sub>5</sub>), 29.8 (OCH<sub>3</sub>); HRMS (ESI): m/z calculated for [C<sub>58</sub>H<sub>62</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup>: 973.4139 found 943.4146.

**Phenyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside (75)**

Aspect: White powder

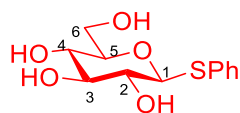
Yield: 80%

Chemical Formula: C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>S  
Molecular Weight: 440.46 g.mol<sup>-1</sup>

Analyses were in good agreement with those published.<sup>256</sup>

β-D-galactose peracetate (1 g, 2.6 mmol, 1.0 eq.) was diluted in DCM (5 mL). Then thiophenol (0.530 mL, 5.6 mmol, 2.0 eq.) and BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (0.63 mL, 7.8 mmol, 3.0 eq.) were added dropwise at 0°C with a stream of Ar. After that, the reaction mixture was stirred at r.t. during 19 hours. After completion, the solution was diluted in DCM and water. The layers were separated and the organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.), NaOH (1 M), brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was diluted in EtOAc and precipitate by cyclohexane addition. After filtration, the expected compound **75** was obtained (880 mg, 80%) as a white powder.

R<sub>f</sub> (7:3, PE/ EtOAc) = 0.3: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.53-7.45 (m, 2H, Har), 7.3-7.28 (m, 3H, Har), 5.22 (t, *J* = 9.3 Hz, 2H, H3), 5.09-4.92 (m, 2H, H2 and H4), 4.70 (d, *J* = 9.8 Hz, 2H, H1), 4.28-4.14 (m, 2H, H6a and H6b), 3.76-3.68 (m, 1H, H5).

**Phenyl 1-thio-β-D-glucopyranoside (76)**

Aspect: White powder

Yield: Quantitative (crude)

Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>S  
Molecular Weight: 272.32 g.mol<sup>-1</sup>

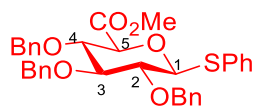
A freshly prepared 1 M solution of MeONa in MeOH (, 3.9 mL, 3.9 mmol, 1.0 eq.) was added to a solution of compound **75** (1.7 g, 3.9 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (20 mL) and the reaction mixture was stirred at r.t. during 1 hour with a stream of Ar. After completion, Amberlist® IR120 was added to neutralize the solution (pH~7) and the mixture was filtrated. Then, the filtrate was evaporated and dried under vacuum (under P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) to obtain compound **76** (1.1 g, quant.) as a white powder.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>255</sup>

R<sub>f</sub>: (9:1, DCM/MeOH) = 0.3 ; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.49-7.72 (m, 2H, Har), 7.33-7.26 (m, 2H, Har), 7.26-7.18 (m, 1H, Har), 5.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, HO), 5.09 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, HO), 4.98 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, HO), 4.61 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H1), 4.56 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, HO), 3.69 (ddd, *J* = 1.7, 5.3, 12.0 Hz, 1H, H6a), 3.50-3.38 (m, 1H, H6b), 3.27-3.00 (m, 2H, H4 and H5), 3.27-3.00

(m, 2H, H2 and H3);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135.1 (Cq.ar), 129.5 (Car), 128.8 (Car), 136.3 (Car), 87.1 (C1), 81.0 (C), 78.2 (C), 72.4 (C2), 69.8 (C3), 61.0 (C6).

### Methyl (phenyl 2,3,4-tri-O-benzyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate) (**82**)



Aspect: White powder

Yield: 57%

Chemical Formula:  $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{S}$

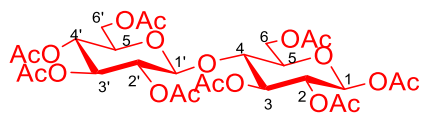
Molecular Weight:  $570.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

TEMPO (15 mg, 0.096 mmol, 0.2 eq), BAIB (386 mg, 1.2 mmol, 2.5 eq.) and AcOH (55  $\mu\text{L}$ , 0.96 mmol, 2.0 eq.) were added to a solution of **80** (260 mg, 0.48 mmol, 1.0 eq.) in DCM (1 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL) and tBuOH (0.5 mL). The reaction mixture was stirring at r.t. during 2 hours. After completion, the reaction mixture was quenched by the addition of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (10 mL, 10%<sub>w/w</sub> in  $\text{H}_2\text{O}$ ). The mixture was then extracted four times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered and concentrated to obtain the crude acide. The residue was esterified with  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (332 mg, 2.4 mmol, 5 eq) and MeI (75  $\mu\text{L}$ , 1.2 mmol, 2.5 eq.), in DMF (2.5 mL) during 1 hour. After completion, water was added at  $0^\circ\text{C}$  and the aqueous layer was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (4 times). Then, the organic layer was washed 4 times with brine to removed DMF, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduce pressure to obtain the crude compound. The residue was purified by flash chromatography (InterChim®; Solid phase: 12 g, 50  $\mu\text{m}$  STD; Mobile phase: PE/EtOAc: 9/1 to 6/4) to obtain the expected compound **82** (155 mg, 57%) as a yellow powder.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>254</sup>

**R<sub>f</sub>**: (8:2, PE/EtOAc) = 0.3;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.60-7.50 (m, 2H, Har), 7.41-7.19 (m, 18H, Har), 4.91-4.81 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.78 (AB syst. d,  $J = 10.9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.75 (AB syst. d,  $J = 10.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.68 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, H1), 4.60 (AB syst. d,  $J = 10.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.92 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, H5), 3.83 (br. t,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H4), 3.73 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.70 (br. d, 1H,  $J = 8.7$  Hz, H3), 3.52 (dd, 1H,  $J = 8.7, 9.7$  Hz, H2);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  168.8 (C=O,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 138.3 (Cq.ar), 138.0 (Cq.ar), 137.9 (Cq.ar), 133.3 (Cq.ar), 132.3 (CHar), 129.2 (CHar), 128.6-127.8 (CHar), 88.5 (C1), 86.0 (C3), 80.5 (C2), 79.4 (C4), 78.1 (C5), 76.0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 75.6 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 75.2, 52.6 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for  $[\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{SNa}+\text{Na}]^+$ : 593.1947, found 593.1978.

### Octa-*O*-acetyl- $\beta$ -cellobiopyranoside (70)



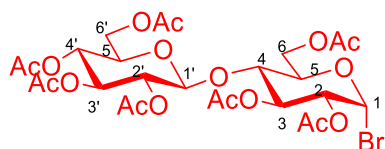
Aspect: White powder  
Yield: 89%  
Chemical Formula: C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub>  
Molecular Weight: 678.59 g.mol<sup>-1</sup>

D-(+)-Cellobiose (10 g, 29.2 mmol, 1.0 eq.) was diluted in Ac<sub>2</sub>O (28 mL) at r.t. under argon flow. The solution was cooled at 0°C before addition of Pyridine (36 mL), DMAP (360 mg, 2.9 mmol, 0.1 eq.) and Et<sub>3</sub>N (400  $\mu$ L, 2.9 mmol, 0.1 eq.). The reaction mixture was stirred at r.t. during 20h. After completion, the solution was diluted in DCM and ice was added. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM. Then, combined organic layers were washed with NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.), water, CuSO<sub>4</sub> (satd. aq.), water and brine. Then, the organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and solvents were removed under reduce pressure. The crude was recrystallized in MeOH to obtain compound **70** (17.7 g, 89%) as a white powder.

Analyses were in good agreement with those published.

**R<sub>f</sub>** (5:5, PE/ EtOAc) = 0.5; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  5.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H1), 5.22 (br. t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H3), 5.12 (br. t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H3'), 5.10 - 5.00 (m, 2H, H2 and H4'), 4.92 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H2'), 4.50 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H7), 4.48 (dd, *J* = 2.2, 12.3 Hz, 1H, H6a), 4.36 (dd, *J* = 4.4, 12.3 Hz, 1H, H6a'), 4.11 (dd, *J* = 4.4, 12.2 Hz, 1H, H6b), 4.04 (dd, *J* = 2.2 Hz and *J* = 12.3 Hz, 1H, H6b'), 3.82 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H4), 3.77 – 3.71 (m, 1H, H5), 3.67 – 3.71 (m, 1 H, H5'), 2.12 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 6H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 9H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.00 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  170.6 (CO, Ac), 170.4 (CO, Ac), 170.3 (CO, Ac), 169.8 (CO, Ac), 169.6 (CO, Ac), 169.1 (CO, Ac), 168.9 (CO, Ac), 100.6 (C1'), 91.6 (C1), 76.01 (C4), 75.9 (C5), 73.71 (C5'), 72.9 (C3), 72.0 (C3'), 71.6 (C5'), 70.5 (C2'), 67.9 (C2), 61.3 (C6 and H6'), 20.93 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.91 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.75 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.68 (CH<sub>3</sub>, Ac); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub>S+ Na]<sup>+</sup>: 701.1899, found 701.1897.

### Hepta-*O*-acetyl- $\beta$ -D-cellobiopyranosyl bromide (71)



Aspect: Brown powder  
Yield: 90%  
Chemical Formula: C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>BrO<sub>17</sub>  
Molecular Weight: 699.45 g.mol<sup>-1</sup>

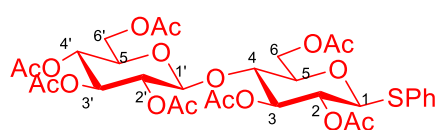
Cellobiose octaacetate (5 g, 7.4 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in AcOH (25 mL) and a commercially available solution of HBr AcOH (25 mL, 5.9 M, 33% in AcOH) was added at 0°C under argon flow. The brown solution was stirred under Ar atmosphere for 4 hours, after which it was poured over ice and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic

layer was washed NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.), water and brine. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to provide the anomeric bromide **36** (4.7 g, 90%) as a white/brown solid.

Analyses were in good agreement with those published.<sup>257</sup>

**R<sub>f</sub>** (5:5, PE/ EtOAc) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 6.52 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H1), 5.53 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H3), 5.18 - 5.03 (m, 2H, H3' et H4'), 4.93 (dd, *J* = 8.0, 9.2 Hz, 1H, H2'), 4.76 (dd, *J* = 4.6, 10.0 Hz, 1H, H2), 4.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1'), 4.53 - 4.49 (m, 1H, H6a), 4.35 (dd, *J* = 4.50, 12.5 Hz, 1H, H6a'), 4.22 - 4.14 (m, 2H, H6b and H5), 4.05 (dd, *J* = 2.31, 12.5 Hz, 1H, H6b'), 3.83 (t, *J* = 9.8 Hz, 1H, H4), 4.05 (dq, *J* = 2.3, 9.8 Hz, 1H, H5'), 2.14 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.09 (s, 6H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 6H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 170.6 (CO, Ac), 170.4 (CO, Ac), 170.2 (CO, Ac), 170.1 (CO, Ac), 169.4 (CO, Ac), 169.1 (CO, Ac), 100.6 (C1'), 86.6 (C1), 75.4 (C4), 73.1 (C3), 73.0 (C5), 72.2 (C5') 71.8 (C2'); 70.9 (C2); 69.61 (C3); 67.99 (C4'); 61.72 (C6'), 61.11 (C6), 20.99 - 20.55 (CH<sub>3</sub>, Ac).

### Phenyl Hepta-*O*-acetyl-β-*D*-thiocellobiopyranoside (**72**)



Aspect: Brown powder  
Yield: 92%  
Chemical Formula: C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>O<sub>17</sub>S  
Molecular Weight: 728.72 g.mol<sup>-1</sup>

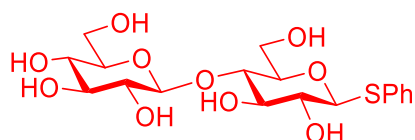
Analyses were in good agreement with those published.<sup>258</sup>

Compound **71** (4.7 g, 6.7 mmol, 1.0 eq.) was diluted in ACN (20 mL) under argon flow. Then, Et<sub>3</sub>N (1.8 mL, 13.4 mmol, 2.0 eq.) and thiophenol (0.8 mL, 8.0 mmol, 1.2 eq.) were added at r.t. and the solution was stirred during 19 hours. After completion, water was added and the layers were separated. Then, organic layer was washed with NaOH 1M, water and brine. Solvents were removed under vacuum. The crude was diluted in EtOAc and was precipitated by cyclohexane addition. After filtration, 4.7 g of the compound **72** (92%) was obtained as a brown powder.

**R<sub>f</sub>** (6:4, PE/ EtOAc) = 0.5, **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 7.48-7.42 (m, 2H, Har), 7.31-7.26 (m, 3H, Har), 5.18 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H3'), 5.12 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H3), 5.04 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H4), 4.91 (dd, *J* = 1.9 Hz, *J* = 9.3 Hz, 1H, H2), 4.85 (dd, *J* = 4.0, 9.3 Hz, 1H, H2'), 4.65 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H1'), 4.55 (dd, *J* = 1.9, 11.9 Hz, 1H, H6a), 4.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1), 4.35 (dd, *J* = 4.5, 12.4 Hz, 1H, H6a'), 4.09 (dd, *J* = 5.6, 12.0 Hz, 1H, H6b), 3.71 (t, *J* = 9.8, 1H, H4'), 3.68-3.58 (m, 1H, H5 et H5'), 2.09 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.07 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 2.01 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.99 (s, 6H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 171.3 (CO, Ac), 170.7 (CO, Ac), 170.6 (CO, Ac), 169.6 (CO, Ac), 133.2 (CHar), 131.9 (Cq.ar), 128.9-128.4 (CHar), 100.8 (C1'), 85.7 (C1), 76.5 (C4'), 73.7 (C3'), 73.0 (C3), 72.1 (C5 and C5'), 71.8 (C2), 70.3 (C2'),

67.9 (C4), 62.1 (C6'), 61.7 (C6), 23.4 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.9 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.8 (CH<sub>3</sub>, Ac), 20.8 (CH<sub>3</sub>, Ac);  
**HRMS (ESI):** (m/z) calcd for [C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>O<sub>17</sub>S+Na]<sup>+</sup>: 751.1878, found 751.1887.

### Phenyl thiocellobiopyranoside (**62**)



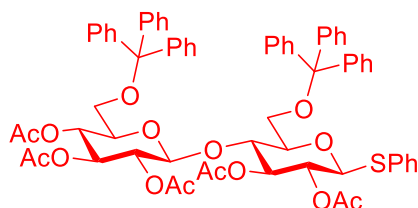
Aspect: Brown powder  
 Yield: Quantitative  
 Chemical Formula: C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>S  
 Molecular Weight: 434.46 g.mol<sup>-1</sup>

A freshly prepared 1 M solution of MeONa in MeOH (5.1 mL, 5.1 mmol, 1 M, 1.0 eq.) was added to a solution of compound **72** (3.7 g, 5.1 mmol, 1eq.) in MeOH (26 mL) at r.t. under argon flow. The reaction mixture was stirred at r.t. during 4 hours. Amberliste® IR120 was added to neutralize the solution (pH~6) and the mixture was filtrated. Then, the filtrate was evaporated to obtain **62** as a brown, oil (2.7 g, qt).

Analyses were in good agreement with those published.<sup>258</sup>

**Rf:** (9:1, DCM/MeOH) = 0.2; **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):** δ 7.66–7.21 (m, 5H, Har), 4.68 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H1), 4.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H1'), 4.00–3.88 (m, 3H, H-6a, H6a', H6b'), 3.72 (dd, *J* = 5.6, 11.9 Hz, 1H, H6b), 3.64–3.53 (m, 2H, H3, H4'), 3.49–3.44 (m, 1H, H5'), 3.43–3.28 (m, 4H, H2, H4, H3', H5), 3.25 (dd, *J* = 7.9, 9.1 Hz, 1H, H2'); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 134.9, 133.0, 129.9, 128.5 (C6H5), 104.5 (C1'), 89.2 (C-1), 80.6 (C2), 80.3 (C2'), 78.1 (C3), 78.0 (C3'), 77.9 (C4), 74.9 (C4'), 73.6 (C5), 71.4 (C5') 62.5 (C6), 62.0, (C6').

### Phenyl 2,3,2',3',4'-penta-*O*-acetyl-6,6'-di-*O*-trityl-β-*D*-thiocellobiopyranoside (**79b**)



Aspect: Yellow powder  
 Yield: 57%  
 Chemical Formula: C<sub>66</sub>H<sub>64</sub>O<sub>15</sub>S  
 Molecular Weight: 1129.28 g.mol<sup>-1</sup>

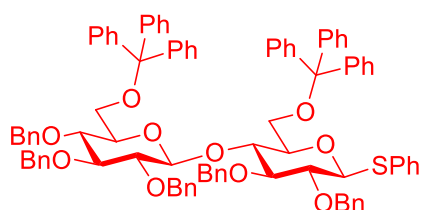
The compound **62** was dried by co-evaporated with anhydrous pyridine (2x 5 mL) and TrCl (1.3 g, 4.6 mmol, 4.0 eq.) was dry under reduced pressure.

The compound **62** (500 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq.) and dry TrCl were dissolved in pyridine (12 mL). Then, DMAP (147 mg, 1.2 mmol, 1.0 eq.) and Et<sub>3</sub>N (670 μL, 4.6 mmol, 4.0 eq.) were added at 0°C. The reaction was stirred at 50°C during 48h. After completion, Ac<sub>2</sub>O (0.640 mL, 7.2 mmol, 6 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at r.t. during 48h. After completion, water was added and the aqueous layer was extracted with DCM. The organic layers were combined, washed with NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.), water, CuSO<sub>4</sub> (satd. aq.), EDTA (1M aq.) and brine.

Then, the organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and solvents were removed under vacuum. The residue was purified by flash chromatography (InterChim<sup>®</sup>: solid phase: 80 g, 50  $\mu\text{m}$  STD, mobile phase: PE/EtOAc: 100/0 to 6/4) to obtain the compound **41** (570 mg, 57%) as a yellow powder.

**R<sub>f</sub>**: (8:2, PE/EtOAc) = 0.3;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -24.5 (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta$  7.65-7.60 (m, 2H, Har), 7.51-7.37 (m, 13H, Har), 7.34-7.15 (m, 25H, Har), 5.24-2.18 (m, 2H, H2'), 4.99 (br. t, 1H,  $J$  = 9.6 Hz, H4), 4.81-4.73 (m, 2H, H1' and H3), 4.25 (d, 1H,  $J$  = 7.9 Hz, H1), 3.79 (dd, 1H,  $J$  = 1.5, 10.6 Hz, H6a'), 3.50-3.43 (m, 2H, H6a and H5'), 3.13-3.07 (m, 2H, H5 and H6b'), 2.98 (dd, 2H,  $J$  = 4.7, 10.7 Hz, H6b), 2.09 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.92 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.77 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.69 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>), 1.63 (s, 3H, OAc-CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta$  170.6 (CO, Ac), 170.3 (CO, Ac), 169.6 (CO, Ac), 169.1 (CO, Ac), 168.8 (CO, Ac), 143.5 (Cq.ar), 133.2 (Cq.ar), 132.4 (Cq.ar), 129.1-127.4 (CHar), 98.7 (C1'), 87.0 (C1), 86.6, 78.6 (C4'), 73.2 (C5), 72.3 (C3'), 71.9 (C2), 70.5 (C2'), 68.8 (C4), 61.6 (C6'), 60.9 (C6), 60.5, 21.4-20.4 (CH<sub>3</sub>, Ac); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for  $[\text{C}_{66}\text{H}_{64}\text{O}_{15}\text{S}+\text{Na}]^+$ : 1151.3864, found 1151.3864.

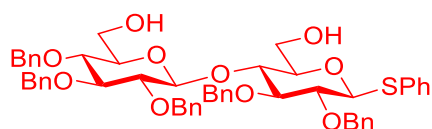
### Phenyl 2,3,2',3',4'-penta-*O*-benzyl-6,6'-di-*O*-trityl- $\beta$ -D-thiocellobiopyranoside (**79c**)



Aspect: White powder  
Yield: 43%  
Chemical Formula:  $\text{C}_{91}\text{H}_{84}\text{O}_{10}\text{S}$   
Molecular Weight: 1369.72 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **79b** was desacetylated as described for the compound **62**. NaH (60% in oil) (375 mg, 9.4 mmol, 5.5 eq.) was added at 0°C to a solution of the crude (1.6 g, 1.7 mmol, 1.0 eq.) in THF (4.3 mL) and DMF (4.3 mL). The reaction mixture was stirred at 0°C during 30 min and BnBr (1.1 mL, 9.4 mmol, 5.5 eq.) was added. Then, the reaction was stirred at r.t. during 22 hours. After completion, water was added to quench the reaction and the aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O. Then, the organic layer was washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and the solvents were removed under reduce pressure. The crude was purified by flash chromatography (InterChim<sup>®</sup>: Solide phase: 12 g, 50  $\mu\text{m}$  STD, Liquid phase: PE/EtOAc: 100/0 to 8/2) to obtain the compound **42** (990 mg, 43%) as a white powder.

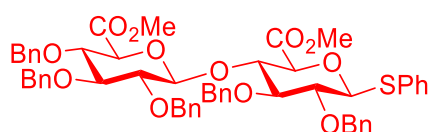
**R<sub>f</sub>**: (9:1, PE/EtOAc) = 0.2;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : -18.8 (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ); **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta$  7.72-7.64 (m, 2H, Har), 7.63-7.54 (m, 6H, Har), 7.50-7.43 (m, 7H, Har), 7.37-6.98 (m, 48H, Har), 6.90-6.83 (m, 2H, Har), 5.15-4.48 (m, 11H), 4.37-4.27 (m, 2H), 3.83 (br. t,  $J$  = 9.2 Hz, 1H), 3.78-3.59 (m, 4H), 3.35-3.11 (m, 5H), 3.05 (br. d,  $J$  = 9.7 Hz); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**:  $\delta$  143.9, 143.7, 139.1; 138.9, 138.7, 138.3, 138.2; 134.3; 132.0, 129.6-126.7, 100.9, 87.7, 86.5, 86.4, 84.4, 83.4, 80.5, 78.7, 77, 9, 77.4, 75.8, 75.6, 75.3, 75.0, 74.3, 73.4, 62.1, 61.5, 60.5; **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for  $[\text{C}_{91}\text{H}_{84}\text{O}_{10}\text{S}+\text{Na}]^+$ : 1391.5683, found 1391.5667.

**Phenyl 2,3,2',3',4'-penta-O-benzyl-6,6'-di-O-trityl-β-D-thiocellobiopyranoside (63)**

Aspect:  
Yield: 43%  
Chemical Formula: C<sub>55</sub>H<sub>56</sub>O<sub>12</sub>S  
Molecular Weight: 941.09 g.mol<sup>-1</sup>

APTS.H<sub>2</sub>O (57 mg, 0.3 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of **79b** (200 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:1, 3 mL) at r.t. The reaction was stirred at r.t. during 5 hours. After completion, the reaction was quenched with NaHCO<sub>3</sub> (satd. aq.). The organic layer was extracted with DCM, washed with brine and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (InterChim®: Solide phase: 12 g, 50 μm STD, Liquid phase: PE/EtOAc: 9/1 to 6/4) to obtain the compound **63** (70mg, 53%) as a yellow powder.

R<sub>f</sub>: (6:4, PE/EtOAc) = 0.5; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -0.4 (c 1, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.50-7.43 (m, 2H, Har), 7.36-7.18 (m, 28H, Har), 5.00-4.70 (m, 9H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.66 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H1), 4.56 (AB syst. d, 1H, J = 11.0 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.48 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H1'), 3.87-3.76 (m, 3H, H4', H6'), 3.67-3.53 (m, 3H, H3', H5 and H4), 3.47-3.20 (m, 6H, H2, H2', H6, H5' and H3); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 139.0, 138.6, 138.2, 138.1, 133.5, 132.2, 129.2, 128.8-127.6, 127.2, 102.9, 87.7, 84.9 (C4'), 84.7, 82.9 (C2), 80.6, 79.6 (C2'), 78.1, 75.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.5 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.0 (C5'), 62.0 (C6), 61.2 (C6); HRMS (ESI): (m/z) calcd for [C<sub>53</sub>H<sub>56</sub>O<sub>10</sub>S+Na]<sup>+</sup>: 907.3492, found 907.3475.

**Methyl (phenyl 2,3,2',3',4'-penta-O-benzyl-1-thio-β-D- thiocellobiopyranoside.(DiGlc)**

Aspect: Yellow oil  
Yield: 49%  
Chemical Formula: C<sub>53</sub>H<sub>56</sub>O<sub>10</sub>S  
Molecular Weight: 885.07 g.mol<sup>-1</sup>

TEMPO (8 mg, 0.05 mmol, 0.4 eq.), BAIB (210 mg, 0.65 mmol, 5.0 eq.) and AcOH (30 μL, 0.52 mmol, 4.0 eq.) were added to a solution of compound **43** (115 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq.) in DCM (0.4 mL), H<sub>2</sub>O (0.4 mL) and tBuOH (0.2 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. during 2 hours. After completion, the reaction mixture was quenched with Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 mL, 10%<sub>w/w</sub> aq). The aqueous layer was with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. Then, the crude was esterified with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (180 mg, 1.3 mmol, 10.0 eq.), MeI (40 μL, 0.65 mmol, 5.0 eq.) in DMF (0.7 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. during 1 hour. After completion, water was added at 0°C and the aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O. Then, the organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography (InterChim®: solid phase: 4 g, 50 μm STD, mobile phase: PE/EtOAc: 9/1 to 6/4) to obtain the compound **45** (60 mg, 49%) as a yellow oil.



**R<sub>f</sub>**: (8:2, PE/EtOAc) = 0.3; **<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 7.56-7.47 (m, 2H, Har), 7.40-7.17 (m, 27H, Har), 5.05 (AB syst. d, 2H, *J* = Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.91-4.50 (m, 12H, CH<sub>2</sub>Ph, H1 and H1'), 4.21 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-4), 3.94-3.79 (m, 3H, H5, H4' and H5'), 3.71-3.34 (m, 10H, H3, H3', CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H2 and H2'); **<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ 168.7 (C=O, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 133.0 (Cq.ar), 132.3 (Cq.ar), 129.0 (CHar), 128.3-127.6 (CHar), 102.7 (C1'), 88.2 (C1), 84.0 (C3), 83.9 (C2'), 81.8 (C2), 77.9 (C5'), 77.2 (C5), 75.7 (C4) (CH<sub>2</sub>Ph), 75.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 75.0 (CH<sub>2</sub>Ph), 74.5 (C4'), 52.7 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 52.3 (CH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **HRMS (ESI)**: (m/z) calcd for [C<sub>55</sub>H<sub>56</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup>: 963.3390, found 963.3385.

**Titre :** Dérivés de l'exopolysaccharide d'*Alteromonas infernus*, mimétiques de glycosaminoglycanes, et développement d'une stratégie pour leur analyse structurale

**Mots clés :** Bactérie marine, exopolysaccharides, dépolymérisation enzymatique, synthèse organique.

**Résumé :** Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique, les bactéries marines représentent une source considérable de molécules innovantes. L'EPS bactérien, produit par la bactérie *Alteromonas infernus* est un hétéropolysaccharide anionique de haut poids moléculaire et dont la chaîne osidique est ramifiée. Cette macromolécule et ses dérivés de bas poids moléculaire (obtenus *via* un procédé chimique) possèdent des propriétés glycosaminoglycanes-mimétiques telles que des activités anti-coagulantes, anti-métastatiques ou favorisant la différenciation cellulaire.

Afin d'identifier les motifs moléculaires impliqués dans l'activité biologique et de faciliter l'analyse structurale des dérivés bioactifs (~20 000 g/mol), la préparation de fragments de l'EPS a été entreprise d'une part par synthèse organique et d'autre part par dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif.

La première partie de la thèse est consacrée à la synthèse organique d'une partie de l'unité répétitive de l'EPS. Les voies de synthèse des donneurs et accepteurs de glycosyles ont été mises au point et deux disaccharides protégés ont été obtenus.

Le second volet de la thèse a consisté à préparer des oligosaccharides ainsi que des dérivés de bas poids moléculaires par dépolymérisation enzymatique de l'EPS natif. Une nouvelle génération de dérivés de bas poids moléculaire de l'unité répétitive a été préparée et un nouvel octasaccharide doublement sulfaté a pu être caractérisé par spectrométrie de masse.

**Title:** Exopolysaccharide derivatives from *Alteromonas infernus*, mimetic of glycosaminoglycans and innovative concepts for their structural elucidation

**Keywords:** Marine bacteria, exopolysaccharides, enzymatic depolymerisation, organic synthesis.

**Abstract:** In search of new bioactive compounds, marine bacteria constitute a considerable source of innovative molecules. The bacterial exopolysaccharide (EPS), produced by the deep-sea hydrothermal vent strain *Alteromonas infernus*, is a high molecular weight, highly branched and anionic heteropolysaccharide with a nonasaccharide repeating unit. This macromolecule and its low-molecular-weight derivatives obtained through a chemical process have previously displayed interesting GAG-like properties such as anti-metastatic and anti-coagulant (heparin-like) ones; they can also improve stem cell differentiation.

To investigate the molecular bases of the biological activity and to facilitate the structural analysis of the bioactive derivatives (~20 000 g/mol), fragments of the native EPS molecule have

been prepared by organic synthesis and enzymatic depolymerisation.

The first part of this thesis is dedicated to the synthesis of the disaccharides composing the repeating unit of the EPS. The synthetic pathways to acceptor and donor glycosyls have been developed and two protected disaccharides have been synthesized.

The second part is devoted to the preparation of oligosaccharides and low molecular weight derivatives by enzymatic depolymerization of the native EPS. A new generation of low molecular weight derivatives has been produced and a new bisulfated octasaccharide has been characterized by mass spectrometry.