

# Thèse de Doctorat

Thibaut CHALOPIN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Matière, molécules et matériaux en Pays de la Loire, 3MPL  
Discipline : Chimie Organique  
Spécialité : Glycochimie  
Unité de recherche : CEISAM UMR 6230

Soutenue le 23 octobre 2015

## TazMans, des inhibiteurs synthétiques de l'adhésion d'*E.coli* pathogènes impliquées dans la maladie de Crohn

### JURY

Rapporteurs : **Laurence MULARD**, Chef de laboratoire, Institut Pasteur, Paris  
**Arnaud TATIBOUET**, Professeur des universités, Université d'Orléans

Examineurs : **Samir MESSAOUDI**, Chargé de recherche au CNRS, Université Paris Sud

Directeur de Thèse : **Sébastien GOUIN**, Chargé de recherche au CNRS, Université de Nantes

Co-directeur de Thèse : **David DENIAUD**, Professeur des universités, Université de Nantes



# *Remerciements*

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire CEISAM (UMR 6230) dans le groupe CORAIL, et mes remerciements vont en 1<sup>er</sup> lieu à M. Bruno BUJOLI, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité.

Je remercie également le professeur Arnaud TATIBOUET, et les docteurs Laurence MULARD et Samir MESSAOUDI pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Mes remerciements les plus vifs vont à mes encadrants de thèse, Sébastien GOUIN et David DENIAUD, pour la confiance et l'indépendance qu'ils m'ont accordées pendant ces trois années. Votre disponibilité, ainsi que le cadre de travail que vous avez réussi à créer au sein de cette équipe ont grandement contribué au plaisir que j'ai pris à réaliser cette thèse.

Je tiens également à remercier les collaborateurs, sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé, particulièrement les Dr Adeline SIVIGON et Nicolas BARNICH, qui m'ont accueilli chaleureusement au Laboratoire M2ISH à Clermont-Ferrand, pendant un total de trois semaines. Les nombreux éclaircissements apportés sur la maladie de Crohn m'ont été extrêmement profitables. Merci à Julie Bouckaert de l'université de Lille, et à l'équipe Biodiversité associée aux glycoconjugués, pour leur accueil au sein du laboratoire.

Merci bien évidemment aux membres de l'équipe pour les bons moments passés au laboratoire ou en dehors, ainsi que pour leur contribution et leurs idées. En particulier Dimitri ALVAREZ-DORTA, qui a également travaillé sur l'inhibition de FimH, et dont les connaissances ont été grandement profitables. Sami BRUMENT, qui a synthétisé les premiers TazMans en stage et nous a rejoint par la suite pour sa thèse. Mélina CAUDANT, qui a réalisé son stage de Master 2 au laboratoire, et a permis une avancée importante de ces travaux, ainsi qu'à Yoann BRISSONNET et Mathieu MEVEL pour leur compagnie et leurs conseils

Merci au personnel technique du Laboratoire, Virginie SYLVESTRE pour les expériences et conseils en RMN, Julie HEMEZ pour la spectrométrie de masse, et Isabelle-Mario LOUVET pour les conseils en plomberie (HPLC), pour leur bonne humeur et leur efficacité !

Merci aux membres du laboratoire en général, avec qui j'ai pu échanger au cours de ces trois ans et dont les compétences variées ont souvent fourni une première piste ou une idée pour mes propres projets.

Finalement, je tiens à remercier les amis et la famille qui m'ont soutenu au long de cette thèse et bien avant. En particulier merci à Tiphaine, qui m'a aidé à passer le cap des déceptions en début de thèse, et accompagné dans les succès plus tard.

## Liste des abréviations

<b>ACN :</b>	Acétonitrile
<b>AFM :</b>	Microscopie de force atomique
<b>AIEC :</b>	<i>Escherichia coli</i> adhérente invasive
<b>ATCC :</b>	American Type Culture Collection
<b>Benz :</b>	Benzène
<b>BSA :</b>	Albumine de sérum bovin
<b>CCM (TLC) :</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CD :</b>	Cyclodextrine
<b>CEACAMX :</b>	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule X
<b>CFU :</b>	Unité de formation de colonie
<b>C-HEGA :</b>	Cyclohexylbutanoyl- N-hydroxyéthyl-D-glucamide
<b>CI :</b>	Ionisation chimique
<b>DABCO :</b>	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
<b>DBU :</b>	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
<b>DCE :</b>	Dichloroéthane
<b>DCM :</b>	Dichlorométhane
<b>DEDL (ELSD) :</b>	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
<b>DLS :</b>	Diffusion dynamique de la lumière
<b>DMA-DMA :</b>	Diméthylacétamide-diméthylacétal
<b>DMAP :</b>	Diméthylaminopyridine
<b>DMF :</b>	Diméthylformamide

<b>DMF-DMA :</b>	<i>N,N</i> -Diméthylformamide-diméthylacétal
<b>DMSO :</b>	Diméthylsulfoxyde
<b><i>E. coli</i> :</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ei :</b>	Impact électronique
<b>ELISA :</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ESI :</b>	Ionisation par électrospray
<b>GlcNAc :</b>	<i>N</i> -acétylglucose
<b>GP :</b>	Protocole général
<b>HIA :</b>	Hémagglutination
<b>HM :</b>	Heptylmannoside
<b>HMBC :</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HMDS :</b>	Hexamethyldisilylazane
<b>HRMS:</b>	Spectrométrie de masse haute résolution
<b>HSA :</b>	Albumine de sérum humain
<b>hν :</b>	Irradiation lumineuse
<b>IBC :</b>	Colonies bactériennes intracellulaires
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Concentration inhibitrice médiane
<b>IL-X :</b>	Interleukine X
<b>ITC :</b>	Titration calorimétrique isothermale
<b>LB :</b>	Luria–Bertani
<b>MALDI:</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
<b>MBP :</b>	Mannose binding protein

<b>MC :</b>	Maladie de Crohn
<b>MeMan. :</b>	Méthyl-mannoside
<b>MOI :</b>	Multiplicité d'infection
<b>mP :</b>	Point de fusion
<b>MRB :</b>	Bactéries multi résistantes
<b>MS X Å :</b>	Tamis moléculaire X Å
<b>MS :</b>	Spectrométrie de masse
<b>mw :</b>	Irradiation micro-onde
<b>PBS :</b>	Tampon phosphate salin
<b>PE :</b>	Ether de pétrole
<b>PNP<math>\alpha</math>Man :</b>	<i>p</i> -Nitro- <i>o</i> -chlorophényl- $\alpha$ -mannoside
<b>Pyr. :</b>	Pyridine
<b>RMN (NMR) :</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>SAXS :</b>	Diffusion rayons X aux petits angles
<b>SPR :</b>	Résonance plasmonique de surface
<b>Ta (rt) :</b>	Température ambiante
<b>TazMan :</b>	Thiazolylmannoside
<b>TBAF :</b>	Fluorure de tetrabutylammonium
<b>TBAI :</b>	Iodure de tetrabutylammonium
<b>THF :</b>	Tetrahydrofurane
<b>TMB :</b>	3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine
<b>TMS :</b>	Triméthylsilyle

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor-alpha

## Table des matières

I.	Introduction .....	1
A.	Introduction générale – stratégie antiadhésive .....	2
1.	Antibiotiques, généralités .....	2
2.	Stratégie antiadhésive .....	5
B.	FimH .....	12
1.	FimH, la lectine .....	12
2.	Ligands synthétiques .....	17
C.	Projet de recherche .....	26
1.	Inhibition d' <i>E. coli</i> dans le cadre de la maladie de Crohn .....	26
2.	Inhibiteurs hétérocycliques .....	36
II.	Synthèse des inhibiteurs .....	47
A.	Synthèse des S- et O-glycosides .....	48
1.	Stratégie .....	48
2.	Synthèse des hétérocycles .....	48
3.	Synthèse du donneur mannosylé et glycosylation .....	52
4.	Conclusion .....	63
B.	Synthèse des C-glycosides .....	63
1.	Stratégie générale .....	63
2.	Préparation d'un allyle glycoside .....	64
3.	Préparation d'un thioamide .....	66
4.	Cyclisation et déprotection .....	71
5.	Conclusion .....	72
C.	Préparation des analogues homologués .....	73
1.	Liaison C-C .....	73
2.	Liaison C-X .....	75

3.	Liaison X-C.....	80
4.	Espaceur à trois atomes : O-C <sub>2</sub> .....	84
5.	Conclusion .....	85
III.	Évaluations biologiques .....	87
A.	Introduction .....	88
1.	Tests et solubilité.....	88
B.	Méthodes d'évaluation des composés. ....	88
1.	ELISA .....	88
2.	Hémagglutination .....	89
3.	Inhibition de l'adhésion sur les cellules épithéliales intestinales T84.....	91
4.	Biodisponibilité .....	93
C.	Résultats.....	93
1.	ELISA .....	94
2.	Hémagglutination .....	94
3.	Tests sur cellules intestinales .....	96
4.	Biodisponibilité .....	97
5.	Criblage de souche d' <i>E. coli</i> .....	98
D.	Discussion et perspectives .....	99
IV.	Composés hydrosolubles .....	103
A.	Stratégie.....	104
1.	Introduction.....	104
2.	Inclusion dans des cyclodextrines .....	104
A.	Introduction d'un groupement hydrosoluble.....	110
1.	Stratégie de synthèse générale .....	110
2.	Synthèse de l'acétylthiazole $\alpha$ -halogénée .....	111
3.	Chimie click.....	115

4.	Évaluation biologique .....	119
V.	Conclusion et perspectives .....	121
A.	Conclusion générale.....	122
B.	Perspectives .....	123
1.	MNTz2.....	123
2.	Structure cristallographique de MNTz2 .....	124
3.	Optimisation du recouvrement $\pi$ .....	125
4.	Obtention de structures multivalentes .....	126
5.	Optimisation de la voie de synthèse de MCNTzX.....	127
6.	Perspectives thérapeutiques.....	127
VI.	Experimental Part .....	129
A.	Material.....	130
B.	General procedures .....	132
C.	Synthesis protocols .....	136
D.	Biologic Part.....	205
1.	ELISA .....	205
2.	Hemagglutinations. ....	205
3.	Adhesion Assays of AIEC LF82 Strain on Intestinal cells.....	206
VII.	Bibliographie .....	207

## **I. Introduction**

## A. Introduction générale – stratégie antiadhésive

### 1. Antibiotiques, généralités

#### a) Découverte et développement

Les infections causées par les bactéries pathogènes sont classiquement traitées par des antibiotiques. Ils furent découverts en 1928 par Sir Alexander Fleming suite à une contamination accidentelle de cultures bactériennes par un champignon produisant de la pénicilline, le *Penicillium notatum*.

La découverte des antibiotiques a été une révolution médicale à partir des années 1930 et a entraîné une recherche intensive qui a ralenti dans les années 1970, on savait alors traiter une majorité des infections bactériennes.

Les antibiotiques possèdent différents modes d'actions et ciblent des mécanismes biosynthétiques présents uniquement chez les bactéries, ils sont sans effet sur les autres micro-organismes, champignons, virus etc.... Les mécanismes touchés sont souvent essentiels à la survie des bactéries et l'on peut par exemple citer la perturbation de la synthèse de la membrane bactérienne par les  $\beta$ -lactames, ou l'inhibition de la synthèse protéique par les aminosides. Chaque mécanisme diffère selon les espèces bactériennes et les antibiotiques possèdent ainsi une certaine sélectivité.

Les antibiotiques sont couramment utilisés de nos jours pour la santé humaine, ainsi que la médecine vétérinaire et l'agriculture, qui représentent près de 50% de leur utilisation.<sup>1</sup> Ils sont également toujours employés comme facteurs de croissance dans l'élevage des animaux. Cependant, cette application est désormais interdite en Europe et un programme d'arrêt progressif jusqu'en 2016 est mis en place aux Etats-Unis.

Du fait de leur efficacité comme antibactériens, on a souvent eu recours aux antibiotiques de manière abusive, ce qui a provoqué leur dispersion dans les écosystèmes avec des concentrations significatives dans les rivières, les nappes phréatiques et les sols.<sup>2</sup> Cette pollution est une cause de développement de souches dites résistantes qui mettent en place des processus pour contrer les antibiotiques. Il est également possible que les teneurs actuelles de contaminants antibiotiques puissent modifier l'équilibre des populations bactériennes dans les espaces naturels. Ces bactéries étant souvent à la base de la chaîne

alimentaire, les études les plus pessimistes prédisent des répercussions sur des populations animales ou végétales.

### *b) Développements de résistances*

Il existe naturellement des milliers de molécules antibiotiques, le plus souvent produites par d'autres organismes (champignons, bactéries etc...). L'élimination des microorganismes concurrents permet de défendre une niche écologique et de favoriser la survie et le développement de sa propre espèce. Comme contre-mesure les bactéries mettent en place différents modes de résistance.<sup>3</sup> On peut citer par exemple l'utilisation de  $\beta$ -lactamases qui modifient enzymatiquement les antibiotiques pour les rendre inactifs. D'autres bactéries utilisent des mécanismes secondaires, afin de compenser l'affaiblissement du premier par l'activité antibiotique. Enfin, il existe des procédés permettant à la bactérie de s'isoler des antibiotiques, comme la formation de biofilms imperméables aux antibiotiques ou encore le pompage actif de l'antibiotique en dehors de la bactérie.

Le développement de résistances est un processus naturel qui permet aux bactéries de se défendre contre des organismes produisant naturellement des antibiotiques. La vitesse de multiplication des bactéries leur permet de s'adapter en des temps record par des processus de mutation qui seront transmis de manière verticale à la génération suivante.

Cette vitesse d'adaptation est encore amplifiée par d'autres mécanismes qui permettent une transmission horizontale de gènes entre différentes espèces bactériennes.<sup>1,4</sup> Les trois mécanismes de transmissions les plus courants sont la transformation, la conjugaison et la transduction (Figure 1).

La transformation est l'inclusion de fragment d'ADN venant d'une autre bactérie dans l'ADN de la bactérie « hôte », la bactérie donneuse étant le plus souvent une cellule morte. La conjugaison est le transfert d'un plasmide (brin d'ADN circulaire), à travers un *pilus* temporaire (filament protéique creux, ancré dans la membrane cellulaire) formé entre deux bactéries. Enfin, la transduction est le transfert d'un fragment d'ADN via un vecteur, le plus souvent un virus.

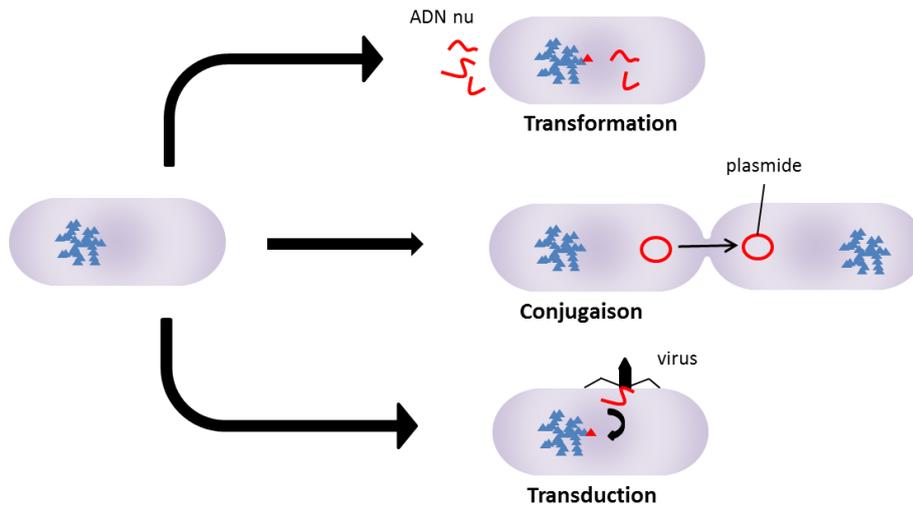


Figure 1 : Mécanismes de transmission de gènes horizontaux.

L'apparition des phénomènes de résistances aux antibiotiques a été très rapide. Dès le début des années 1940, 50% des souches de *staphylococcus aureus* n'étaient plus sensibles à la pénicilline. Ces phénomènes de résistance ont été longtemps compensés par l'apparition de nouvelles classes d'antibiotiques. De plus, la surconsommation d'antibiotiques a conduit à une sélection massive des bactéries résistantes et ce n'est que récemment que ce problème a été réellement pris en compte par les pouvoirs publics.<sup>4,5</sup>

On compte aujourd'hui 17 classes d'antibiotiques avec au moins un mécanisme de résistance identifié pour chacune d'entre elles. On assiste désormais au développement de souches multi-résistantes pour lesquelles les options thérapeutiques sont limitées. Ces souches sont principalement confinées dans les milieux hospitaliers, cependant de plus en plus d'infections par ces MRB (MultiResistant Bacteria) sont repérées en dehors.

Face à la prolifération des MRB, une recherche intensive doit être mise en place. On compte cependant un nombre de plus en plus faible de programmes de recherches destinés au développement de nouveaux antibiotiques.<sup>6</sup> Cette baisse d'activité peut être expliquée par le manque de rentabilité et la difficulté de mise sur le marché de nouveaux produits (Figure 2). On enregistre d'ailleurs une diminution des traitements disponibles depuis les années 2000 et la recherche actuelle laisse présager que peu d'antibiotiques seront acceptés pour une mise sur le marché dans les prochaines années.<sup>1,7</sup> Il est donc généralement reconnu que des traitements alternatifs basés sur des modes d'actions innovants sont indispensables.<sup>8</sup>

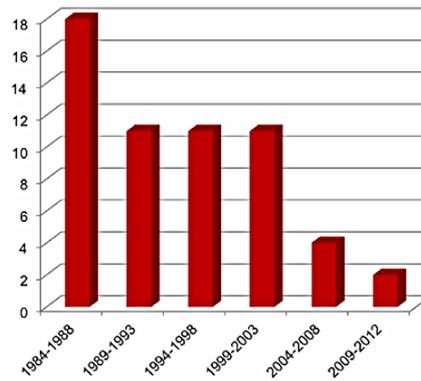


Figure 2 : Antibiotiques approuvés par la FDA par tranche de 4 ans.

## 2. Stratégie antiadhésive

### a) Processus infectieux

Parmi les voies innovantes en cours de développement, la stratégie antiadhésive est particulièrement séduisante. Afin de coloniser les cellules hôtes, les bactéries doivent dans un premier temps adhérer aux membranes cellulaires (Figure 3). La seconde phase du processus infectieux, à savoir l'internalisation, permet à la bactérie de s'installer dans la cellule et de s'y répliquer pour former des colonies bactériennes intracellulaires (IBCs).<sup>9,10</sup> Ces colonies mettent alors en place des stratégies permettant de se protéger des traitements antibactériens, telles que la formation de biofilms. Les IBC représentent un stock de bactéries qui ne sera pas atteint par les antibiotiques et pourra réenclencher le processus infectieux une fois le traitement terminé.<sup>11</sup> Ces colonies sont directement responsables des récurrences infectieuses et des infections chroniques.

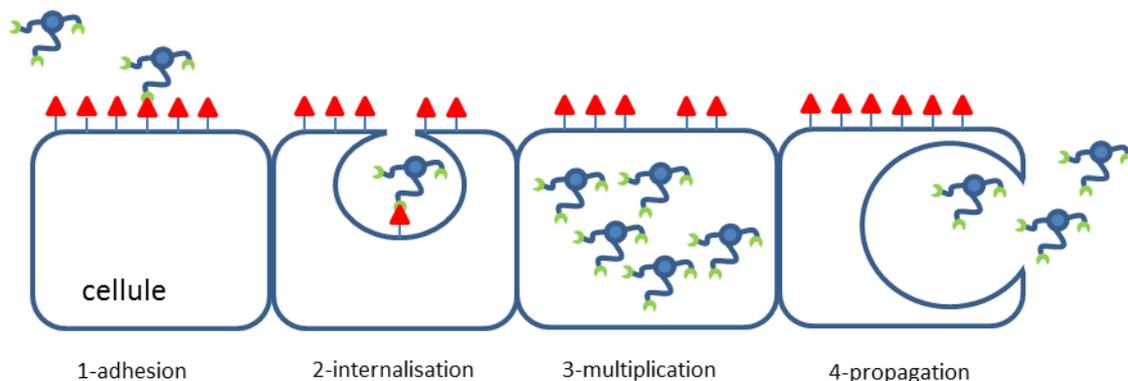
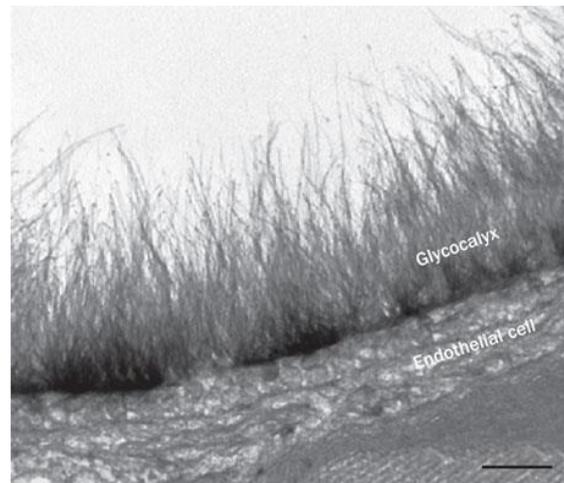


Figure 3 : Processus infectieux.

### ***b) Adhésion bactérienne***

L'adhésion bactérienne est due dans la majorité des cas, à une reconnaissance entre des protéines bactériennes et des hydrates de carbone présents sur la membrane des cellules infectées. Ces protéines sont appelées adhésines ou lectines et sont capables de reconnaître des séquences de sucres spécifiques. Cette spécificité qui explique le ciblage de différents tissus par différentes bactéries, est appelé tropisme tissulaire.

La membrane d'une cellule est tapissée d'oligosaccharides qui forment la glycocalice (Figure 4). Cette couche peut atteindre une épaisseur de  $0,5\mu\text{m}$  et confère un caractère hydrophile autour de la cellule. La glycocalice est constituée de glycolipides et de glycoprotéines qui permettent, entre autre, une communication entre l'intérieur de la cellule et son environnement par des mécanismes de reconnaissance.



**Figure 4: Glycocalice, observée au microscope électronique.<sup>12</sup>**

Les oligosaccharides sont porteurs d'informations extrêmement complexes connues comme le code des sucres par analogie au code génétique. L'alphabet de ce code est particulièrement riche puisque basé sur la structure très variable des oligosaccharides. La forme tridimensionnelle des polysaccharides peut différer en fonction de la nature des monosaccharides le composant et chacun de ces monosaccharides peut engager différents hydroxyles dans une liaison glycosidique. Cette liaison peut elle-même être de nature  $\alpha$  ou  $\beta$ . Les monosaccharides peuvent également posséder des formes (pyranose ou furanose) et des configurations différentes.

Le code des sucres est décrypté par des protéines particulières, les lectines qui sont capables de « comprendre » cette spécificité. Les lectines reconnaissent spécifiquement des enchainements oligosaccharidiques précis et permettent la communication cellulaire avec d'autres entités, protéines, bactéries, virus, etc.... Dans le cas des bactéries, la reconnaissance spécifique permet leur adhésion sur un type bien particulier de cellules d'un organisme. Elle peut également déclencher les processus d'internalisation de la bactérie dans la cellule *via* l'activation de voies de signalisation à travers la membrane cellulaire.

### c) Stratégie antiadhésive

Les phénomènes de reconnaissance sont essentiels dans de nombreux processus infectieux développés par les bactéries. Il serait donc intéressant de les bloquer, par l'utilisation de molécules synthétiques.<sup>13</sup> En jouant un rôle de leurre, les molécules permettraient de saturer des lectines bactériennes (Figure 5) et de réduire l'adhésion des bactéries sur les cellules, bloquant alors l'infection à son premier stade. Les bactéries, privées de leur potentiel infectieux, devraient être éliminées naturellement par l'organisme puisqu'elles ne seraient pas protégées à l'intérieur des cellules.

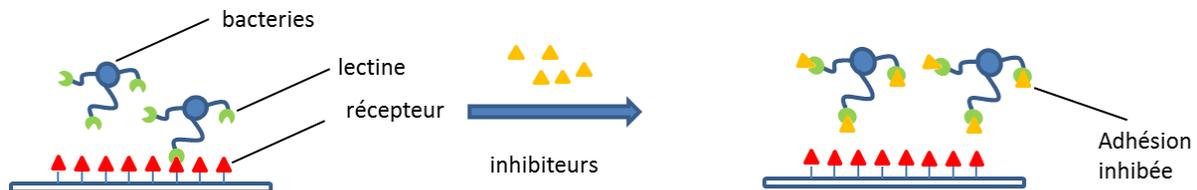
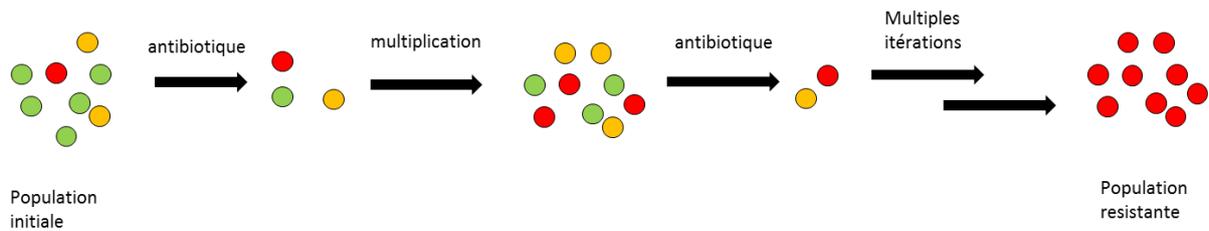


Figure 5 : Stratégie antiadhésive.

La stratégie antiadhésive présente l'avantage d'une sélectivité importante comparée à un traitement antibiotique. En effet, elle permet de cibler les bactéries possédant l'adhésine visée, sans interférer avec les autres micro-organismes. Le nombre réduit de bactéries touchées devrait ainsi limiter les espèces bactériennes susceptibles de développer des mécanismes de résistance.

Dans cette idée, les bactéries ne seraient pas détruites et garderaient la possibilité de se multiplier. Ce type de traitement ne devrait donc pas entraîner de pression sélective sur les souches ciblées (Figure 6) qui seront éliminées par le processus immunitaire naturel ou évacuées de l'organisme.



**Figure 6 : Evolution d'une population de bactérie sous pression de sélection vers une population résistante.**

Une sélection de bactéries résistantes par diffusion des composés antiadhésifs dans l'environnement ne devrait pas se produire pour les raisons expliquées ci-dessus. On peut cependant imaginer que l'adhésion résiduelle de bactéries sur les cellules formerait un processus de sélection en elle-même. Les mécanismes de résistances devraient alors être d'une autre nature que la modification du site de reconnaissance. En effet la perte d'affinité pour un inhibiteur mimant le ligand naturel impliquerait probablement une perte d'affinité pour le ligand naturel lui-même.

Ce type de traitement peut être utilisé seul mais a montré une meilleure efficacité en combinaison avec des antibiotiques.<sup>14</sup> En effet, Hultgren et coll. ont montré, dans le cadre d'un traitement des infections urinaires que la présence d'un antiadhésif lors d'un traitement antibiotique, permet de concentrer les bactéries dans la lumière de la vessie et de ce fait, d'exposer les bactéries résistantes à une dose plus forte d'antibiotiques.

Une utilisation prophylactique pourrait également se révéler intéressante, notamment dans le cas d'infections chroniques, en bloquant l'adhésion des bactéries issues des IBC, ce qui empêcherait ainsi la résurgence de l'infection.

#### ***d) Multivalence***

Les lectines sont souvent des protéines multimériques c'est à dire présentant plusieurs sites de reconnaissance ou exprimées en grand nombre à la surface des bactéries. La formation de multiples interactions ligand-récepteur, augmente l'avidité de la lectine pour son substrat naturel. La topologie de la lectine, ainsi que l'organisation des sucres à la surface des cellules, représentent alors des facteurs de sélectivité supplémentaire de la lectine pour son substrat.<sup>15,16</sup>

Les chimistes ont tenté de copier cette stratégie naturelle en greffant plusieurs inhibiteurs sur une même charpente, pour permettre un mimétisme plus important de la glycolalce. De

nombreuses plateformes ont été développées, basées sur des structures de valence plus ou moins contrôlées tels que les dendrimères, polymères ou nanoparticules.

L'utilisation de structures multivalentes permet dans certains cas une augmentation de l'affinité pour une lectine supérieure à la simple additivité de l'affinité de chaque monomère. Ce phénomène est appelé « effet cluster » ou « effet multivalent », et s'explique par plusieurs phénomènes que nous décrirons par la suite. On utilise habituellement un facteur  $\beta$  pour décrire l'effet multivalent. Celui-ci correspond au rapport entre l'IC<sub>50</sub> (ou le K<sub>d</sub>) de la molécule multivalente pondérée par sa valence (V) et celle du composé monovalent.

$$\beta = \text{IC}_{50\text{-multi}} / (V \times \text{IC}_{50\text{-mono}})$$

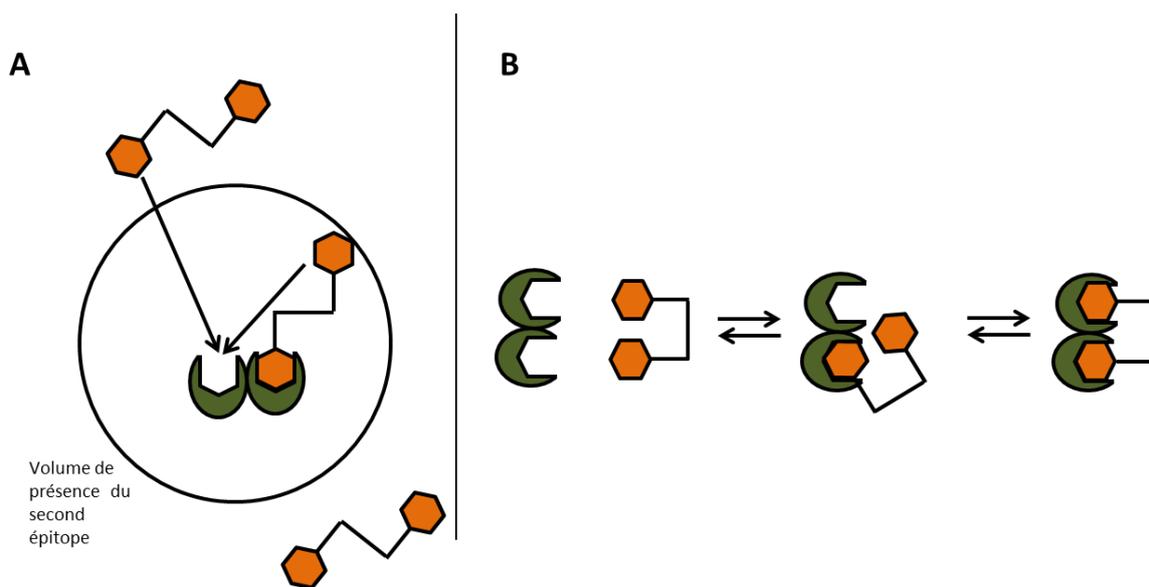
Afin d'obtenir un coefficient  $\beta$  représentatif, le composé monovalent choisi comme référence doit avoir la structure la plus proche possible de la charpente utilisée pour former le composé multivalent. En effet, en fonction de la protéine étudiée, un groupement susceptible de former une interaction supplémentaire peut améliorer drastiquement l'affinité sans pour autant qu'un effet multivalent en soit à l'origine.

L'effet cluster a été décrit pour la première fois par Lee *et coll.*,<sup>17</sup> à partir des MBP (Mannose Binding Protein) A et C. Ces deux protéines possèdent une structure très semblables (50% d'homologie) et se lient à la fois au GlcNAc (N-acétylglucose) et au mannose, avec des constantes d'affinité du même ordre de grandeur. L'étude a montré que l'utilisation de composés di- ou trivalents permettait une augmentation d'affinité d'un facteur de 12 à 20 uniquement pour la MBP-C. Cette sélectivité a pu être attribuée à la présence d'un sous-site de reconnaissance acceptant spécifiquement le mannose qui permet aux ligands multivalents disposant d'espacements suffisamment long (25Å) et flexibles, de former deux liaisons avec la MBP-C.

L'effet cluster a par la suite été largement étudié<sup>18,19,20</sup> et est régulièrement utilisé dans le cadre de la stratégie anti-adhésive.<sup>21</sup> De nombreuses structures ont été synthétisées et modifiées pour déterminer les différents facteurs influençant l'augmentation de l'affinité. Ces facteurs sont souvent fortement liés à la nature de l'adhésine elle-même<sup>19</sup> et plusieurs mécanismes sont envisageables pour expliquer le gain multivalent.

### (1) Effet chélate

Un ligand multivalent est susceptible de se lier de manière à former un pont entre deux sites actifs d'une protéine multimérique. L'augmentation de l'affinité est principalement expliquée par une baisse des coûts entropiques après la formation de la première liaison. En effet, il s'en suit une pré-organisation du second ligand avec une orientation plus favorable et ainsi un nombre réduit de rotations et translations nécessaires à l'établissement d'une seconde liaison. L'aspect cinétique est également à prendre en compte. En effet, une première association ligand multivalent/récepteur va restreindre le volume disponible pour une deuxième interaction avec un récepteur libre. Cette proximité implique une probabilité de rencontre plus grande et par conséquent une cinétique de liaison accrue. A l'inverse, lors de la rupture de l'une des interactions, le ligand sera alors recapturé plus rapidement, conduisant à une vitesse de désassociation du chélate beaucoup plus lente.



**Figure 7 : Effet chélate A) la concentration effective en second épitope du ligand lié est plus importante à proximité du deuxième site de reconnaissance, comparé à un ligand divalent libre en solution. B) mécanisme d'association chélate.**

L'utilisation de cet effet chélate a permis de développer des ligands avec de très forts gains d'affinité. Le meilleur exemple est probablement la molécule décavalente STARFISH, développée par Kitov *et coll*,<sup>22</sup> qui a permis d'accroître l'affinité pour une toxine du choléra pentavalente d'un facteur de  $10^6$  par rapport au ligand monovalent.

### (2) Recapture statistique

Les effets cinétiques décrits précédemment peuvent également s'appliquer dans le cadre d'une protéine monovalente ou plus généralement, pour une interaction entre une protéine

et un inhibiteur de valence plus élevé. La formation d'une première liaison va rapprocher les autres ligands du récepteur protéique et ainsi augmenter localement la concentration en inhibiteur. La vitesse de recapture d'un nouveau ligand va ainsi s'en trouver accélérée et produire l'effet macroscopique d'une vitesse de désassociation faible. Ce mécanisme est aussi appelé effet de glissement (Figure 8), Brewer *et coll.* l'ont décrit comme prépondérants dans de nombreux effets multivalents.<sup>23,24</sup>

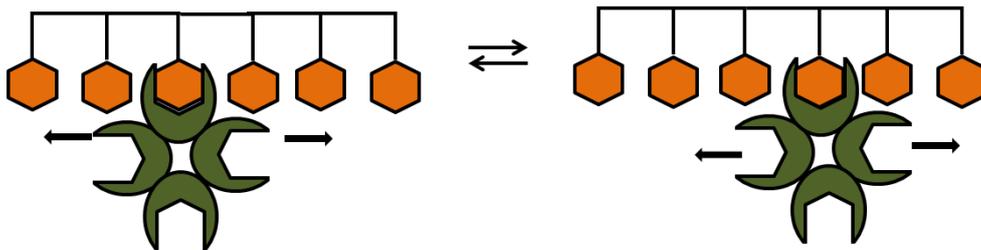


Figure 8 : Mécanisme de glissement.

### (3) Formation de réseaux

La formation de liaisons intermoléculaires adhésives/sucres est également envisageable de manière à construire des réseaux, dont la structure est dépendante de la protéine et de la plateforme employée. L'utilisation de structures divalentes peut conduire à la formation de réseaux linéaires, tandis que des composés à plus hautes valences peuvent mener à des structures bi- ou tridimensionnelles (Figure 9). La formation de tels réseaux entraîne une faible accessibilité des ligands compétiteurs aux sites de reconnaissance de la protéine.

L'augmentation du nombre de structures interconnectées est susceptible de provoquer la formation et la précipitation d'agrégats<sup>25</sup> ce qui déplace l'équilibre selon la loi d'action des masses et induit un effet multivalent.

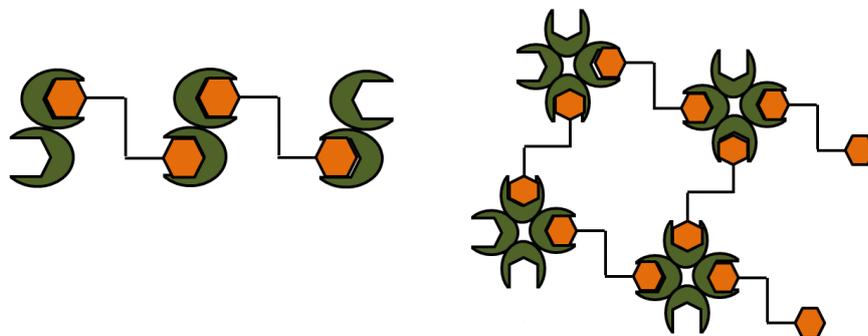


Figure 9 : Formation de réseaux linéaires, bis- ou tridimensionnels.

#### (4) Inconvénients

Les inconvénients majeurs des structures multivalentes en termes de potentiel thérapeutique sont leur haut poids moléculaire, ainsi que leur hydrophilie souvent très importante due à la présence de nombreux sucres en périphérie. Ces facteurs limitent la biodisponibilité des composés lors d'une administration par voie orale en défavorisant le passage des membranes intestinales. L'hydrophilie est également un facteur favorisant la clairance rénale des molécules présentes dans le sang.

### B. FimH

#### 1. FimH, la lectine

##### a) Une lectine présente sur les pili de type 1

Toutes les souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) possèdent le matériel génétique permettant l'expression de *pili* de type 1, aussi appelés *fimbriae* (Figure 10). Ces organites linéaires mesurent environ 1 $\mu$ m de long, pour 7nm de diamètre et sont composés de plusieurs centaines de protéines, les pilines. La structure principale est constituée de protéines FimA qui s'imbriquent les unes dans les autres pour former la structure tubulaire du *pilus*. À l'extrémité du *pilus*, se retrouvent les protéines FimF, FimG et FimH.

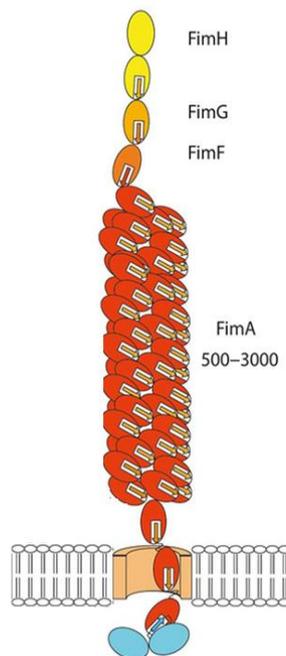


Figure 10 : Structure des *pili* de type 1.<sup>26</sup>

La protéine FimH fut isolée pour la première fois par l'équipe de Sharon<sup>27</sup> en 1978 et décrite comme adhérant aux cellules de levures ou aux cellules épithéliales, riches en mannose. Elle a par conséquent été désignée comme faisant partie de la classe des adhésines ou lectines qui sont des récepteurs spécifiques d'hydrates de carbones.

Un an après la découverte de la lectine, Sharon *et Coll* ont proposé d'inhiber l'adhésion bactérienne dans le cadre d'infections urinaires en utilisant des antagonistes de FimH. Ils ont montré dans un modèle murin qu'un traitement par le méthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside pouvait réduire significativement les symptômes et la population bactérienne dans la vessie.<sup>28</sup> En revanche, une application thérapeutique directe n'était pas envisageable car les auteurs utilisaient une dose très élevée de 18mg de composé par souris (poids compris entre 20 et 60g). Pour une utilisation clinique il sera bien évidemment nécessaire de développer des molécules efficaces à de plus faibles concentrations.

De nombreuses équipes se sont intéressées à la lectine FimH, dans le but d'améliorer les inhibiteurs existants. Leurs travaux ont permis d'obtenir une connaissance approfondie de sa structure, *via* des études cristallographiques et chemoinformatiques. Les mécanismes mis en jeu pour la reconnaissance du mannose par FimH tant au niveau des interactions fondamentales qu'au niveau multivalent, ont été déterminés grâce à la synthèse chimique de très nombreux inhibiteurs. Ces études sont le point de départ de la synthèse de ligands de plus en plus affins pour la protéine FimH.

### *b) Structure de la lectine*

FimH est une lectine particulièrement affine pour l' $\alpha$ -D-mannose, avec un  $K_d$  de 2,3  $\mu$ M, inhabituel pour un monosaccharide, ce qui s'explique par la formation d'un important système de liaison hydrogènes entre le sucre et la poche hydrophile de la lectine<sup>29</sup>.

#### (1) Site de reconnaissance du mannose

L'oxygène anomérique O1 est le seul à n'établir aucune liaison hydrogène avec la protéine. L'hydroxyle en position axiale O2 en forme deux, la première avec une molécule d'eau présente dans le site actif et la seconde avec l'amine terminale de la protéine. Celle-ci réalise également deux autres liaisons avec l'oxygène endocyclique O5, ainsi qu'avec l'hydroxyle primaire. Son oxygène O6 forme trois autres liaisons, avec l'Asn 46 et les asparagines Asp47 et Asp54 tandis que l'oxygène O4 est lié avec Asp54 et Asn135. Finalement, O3 établit deux

liaisons hydrogène, avec Gln133 et Asp 140 (Figure 11). Des interactions hydrophobes permettent également de stabiliser le site actif : Phe142 interagit avec la liaison C2-C3, alors que Phe1 est en contact avec d'autres acides aminés de la poche hydrophile, permettant de maintenir sa forme tridimensionnelle.

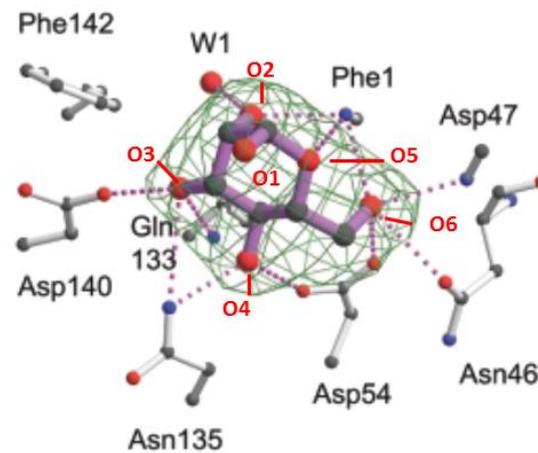


Figure 11 : Réseau de liaisons hydrogène. <sup>29</sup>

Cette densité d'interactions confère ainsi à FimH une sélectivité importante pour le mannose. En effet, les sucres qui possèdent des hydroxyles orientés différemment ne sont pas reconnus et l'affinité pour certains sucres avec une structure proche, tels le déoxymannose ou le fructo-pyranose est considérablement réduite (de 130 et 14 fois respectivement).<sup>30</sup>

La poche hydrophile permet l'organisation du solvant à l'intérieur du site actif de manière à reproduire les interactions du mannose, comme le suggère une structure cristallographique de la protéine libre (Figure 12).<sup>31</sup> La première structure cristallographique de FimH en association avec sa protéine chaperonne FimC<sup>32</sup> montre qu'une molécule de cyclohexylbutanoyl-N-hydroxyéthyl-D-glucamide (C-HEGA), un pseudo-sucre acyclique, s'organise de manière superposable au mannose dans le site actif.

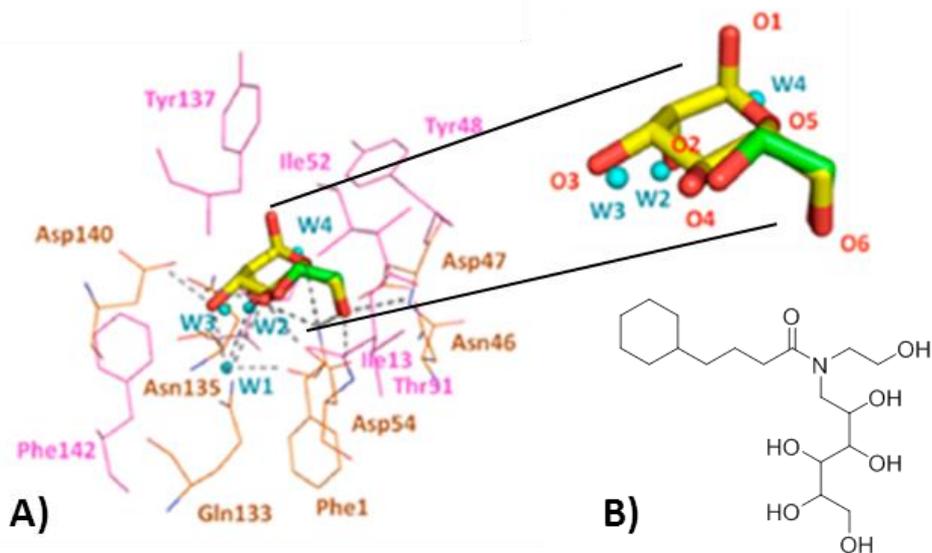


Figure 12 : A) Les molécules d'eau (bleu) et d'éthylène glycol (vert) miment la structure du D-mannose (jaune) B) la molécule de C-HEGA, prend la conformation du mannose une fois dans le site actif de FimH.<sup>31</sup>

Ces différents exemples illustrent l'importance du mannose pour la conception d'inhibiteurs de FimH. La modification de cette structure n'est donc pas une option envisageable pour augmenter l'affinité, ainsi les variations porteront sur l'aglycone qui interagit avec une cavité secondaire hydrophobe.

## (2) Interactions dans le site hydrophobe

Dès la découverte de FimH, le groupe de Sharon avait postulé la présence d'une cavité hydrophobe proche du site acceptant le mannose, ce qui permettait d'expliquer l'augmentation d'affinité de plusieurs ordres de grandeur en présence d'un noyau aromatique sur la position anomérique du mannose.<sup>33</sup>

Cette hypothèse a été confirmée lors de l'obtention des premières structures cristallographiques, avec la présence d'une barrière hydrophobe surplombant la poche dédiée au mannose. Cette barrière est constituée des isoleucines 13 et 52, de la phénylalanine 142 ainsi que des tyrosines 48 et 137.

La poche hydrophobe est destinée à accueillir la face apolaire  $\beta$  d'un second mannose lié au premier déjà contenu dans la poche principale en  $\alpha$ 1-3 (Figure 13). Son caractère fortement hydrophobe permet la mise en place d'interactions apolaires importantes avec les aglycones aliphatiques ou aromatiques de mannoses. Les résidus apolaires qui forment cette poche sont très peu mobiles, à l'exception de la Tyr48 qui a été cristallisée dans plusieurs

conformations, ainsi que dans une moindre mesure de la Tyr137.<sup>31</sup> Ces deux tyrosines sont essentielles dans l'établissement de l'interaction d'un ligand avec FimH. Elles sont communément appelée « tyrosine gate »

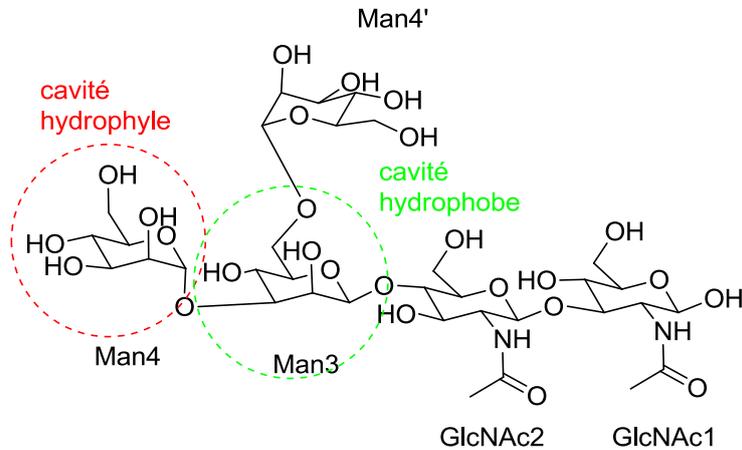


Figure 13 : Position de du substrat naturel (UTI<sup>634</sup>) dans le site actif de FimH.

Les tyrosines 48 et 137 adoptent trois conformations principales en fonction du ligand présent dans le site actif: ouverte, semi-ouverte et fermée, (Figure 14) offrant ainsi plusieurs possibilités d'interaction. Une étude de Wellens *et coll*<sup>31</sup> a montré que la partie aglycone des ligands se positionne préférentiellement entre les deux tyrosines. Elle induit, selon sa nature, des interactions préférentielles avec la tyrosine 48 fixant ainsi sa conformation ou au contraire, elle repousse les tyrosines, ce qui augmente la mobilité de la tyrosine 48.

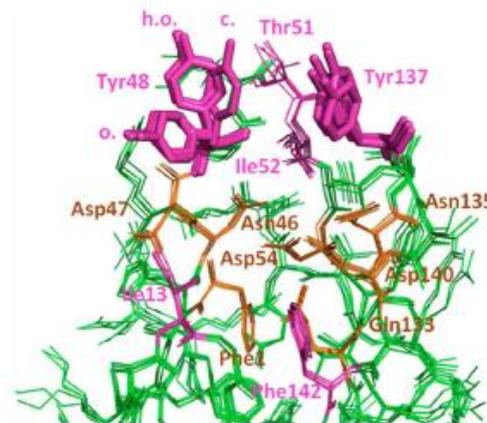


Figure 14 : Superposition de structures cristallographique montrant la mobilité du site actif de FimH avec la poche hydrophile en orange. On distingue les trois formes principales de la tyrosine gate en magenta : ouverte, semi-ouverte et fermée. Le reste de la structure reste majoritairement statique.<sup>31</sup>

### (3) Comportement multivalent

A une échelle macroscopique, FimH est une lectine monomérique, située à l'extrémité d'un long *pilus* flexible, il n'est donc pas cohérent d'imaginer former des interactions multivalentes de type chélate. Une approche de type recapture statistique ou d'interaction avec un sous-site de reconnaissance a donc tout d'abord été privilégiée.<sup>35</sup>

Cependant, une bactérie porte généralement plusieurs centaines de *pili* exprimant FimH, ce qui en fait globalement une structure multivalente susceptible de créer des réseaux et de favoriser la formation d'agrégats à l'échelle de la bactérie. L'agrégation d'*E. coli* a été observée pour la première fois avec des polymères de mannose,<sup>36</sup> puis des travaux du groupe ont montré que cet effet est également observable avec des ligands de faible valence.<sup>37,38</sup> Ces agrégats bactériens, qui se forment par interactions entre les *pili* de différentes bactéries, ont une capacité d'adhésion cellulaire réduite ce qui explique le meilleur pouvoir antiadhésif des ligands multivalents.

Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons aux différentes stratégies employées, monovalentes et multivalentes, pour la synthèse de molécules inhibitrices de FimH.

## 2. Ligands synthétiques

### a) Historique des ligands

#### (1) Monovalents

##### (a) Les premiers inhibiteurs

Les premiers inhibiteurs synthétiques de FimH furent testés par l'équipe de Sharon. La présence d'un cycle aromatique sur la position anomérique permet de diminuer considérablement l'agrégation de levures *Saccharomyces cerevisiae* par *E. coli*.<sup>33</sup> En effet ces levures possèdent de nombreux mannoses sur leur surface, ce qui permet la formation de réseaux avec les bactéries.

Lors d'un test cellulaire d'hémagglutination (HIA), une méthode de quantification basée sur la capacité des bactéries exprimant FimH d'agglutiner les cellules sanguines, le *p*-nitro-*o*-chlorophényl- $\alpha$ -mannoside (PNP $\alpha$ Man) et le 4-méthylumbelliferyl- $\alpha$ -mannoside, se sont montrés particulièrement puissants avec des activités inhibitrices respectivement 717 et 600 fois plus fortes que le méthylmannoside (MeMan).

Ces composés ont également été évalués dans un test de décrochage d'*E. coli* de cellules épithéliales de cochon d'Inde et ont montré des activités respectivement 470 et 1075 fois plus importantes que le MeMan (Schéma 1).

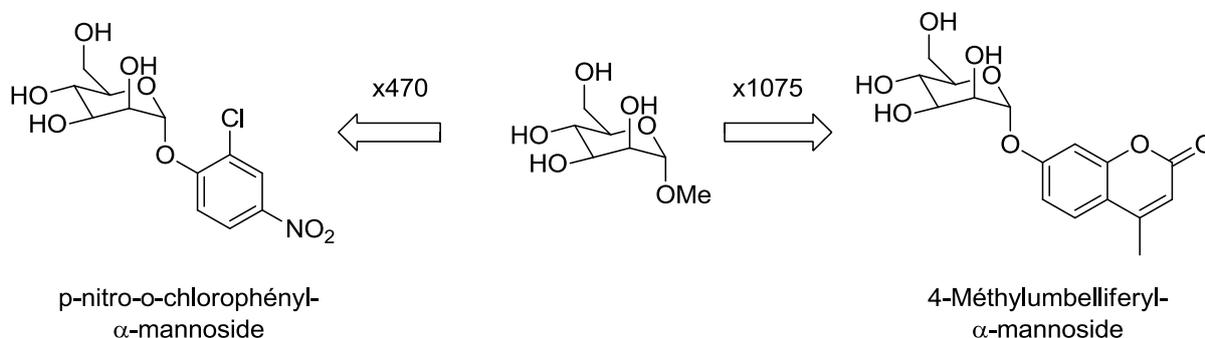


Schéma 1 : Amélioration de l'affinité des arylmannosides par rapport au méthylmannoside.

### (b) Les Alkylmannosides

L'utilisation des alkyles mannosides est issue d'une découverte fortuite après la résolution d'une structure cristallographique de FimH contaminée par le butylmannoside.<sup>30</sup> La molécule provenait du milieu de culture des bactéries produisant FimH et n'avait pas pu être éliminée par dialyse, ce qui laissait présager d'une interaction forte. Par la suite, il a été montré que la chaîne butyle mime la face hydrophobe du ligand naturel.<sup>34</sup>

Les mannosides avec une chaîne alkyle portant de 1 à 8 atomes de carbone ont été synthétisés et leur affinité mesurée par résonance plasmonique de surface (SPR). Le  $\Delta G$  diminue proportionnellement avec une augmentation de la longueur de la chaîne entre 1 et 7 atomes de carbone (Figure 15) puis augmente pour une chaîne à 8 carbones. Cela fait de l'heptylmannoside (HM), un inhibiteur nanomolaire de FimH (5nm par SPR) meilleur que les composés avec un groupement aromatique testés par l'équipe de Sharon.

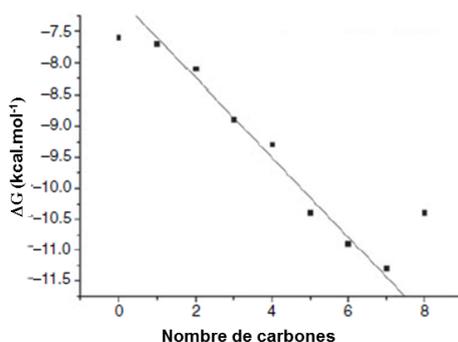


Figure 15 : Evolution de l'affinité pour FimH en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique.<sup>30</sup>

HM a été évalué sur la souche d'*E. coli* UTI89 issue de patients atteints d'infections urinaires.<sup>34</sup> Les auteurs ont pu mettre en évidence une inhibition de la formation du biofilm *in vitro* à une concentration en HM de 5mM. Sa capacité à inhiber l'adhésion bactérienne dans la vessie après injection locale par cathéter n'est également significative qu'à forte concentration (5mM). Cette faible activité laisse suspecter une dégradation ou une inactivation *in vivo*, probablement par une inclusion dans les membranes cellulaires, HM étant un détergent à haute concentration.

### (c) Les biphénylmannosides

Les résultats prometteurs obtenus par l'équipe de Sharon ont inspiré de nombreux groupes pour la synthèse de nouvelles générations d'antagonistes de FimH. Les équipes de Hultgren et Ernst ont travaillé sur des mannoses biphényliques,<sup>39,40</sup> capables d'interagir plus fortement avec la tyrosine gate, notamment par un recouvrement  $\pi$  avec la tyrosine 48.

Le second aromatique doit être placé en *para* du premier afin d'obtenir les meilleurs résultats en terme d'affinité. Sa substitution est essentielle pour l'affinité, si un accepteur de liaisons hydrogène est placé en *mé*ta il permet des interactions favorables avec un pont salin à l'extérieur de la Tyrosine Gate, entre l'arginine 98 et le glutamate 50. Le ligand se place alors à l'extérieur de la Tyrosine Gate, en conservant un recouvrement avec l'autre face de la tyrosine 48 (Figure 16).

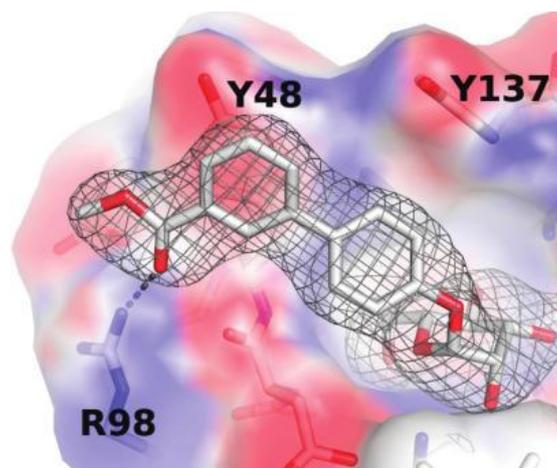


Figure 16 : Interaction d'un bisaryl mannoside avec la Tyr48 et le pont salin. <sup>39</sup>

L'introduction de deux groupements identiques en méta a permis d'accroître l'affinité du ligand par un facteur 3. Suite à une étude de l'équipe de Ernst, des groupements attracteurs,

comme le trifluorométhyle ont par la suite été ajoutés en position *ortho* du premier aromatique,<sup>41</sup> multipliant l'affinité par près de 50 (Figure 17).

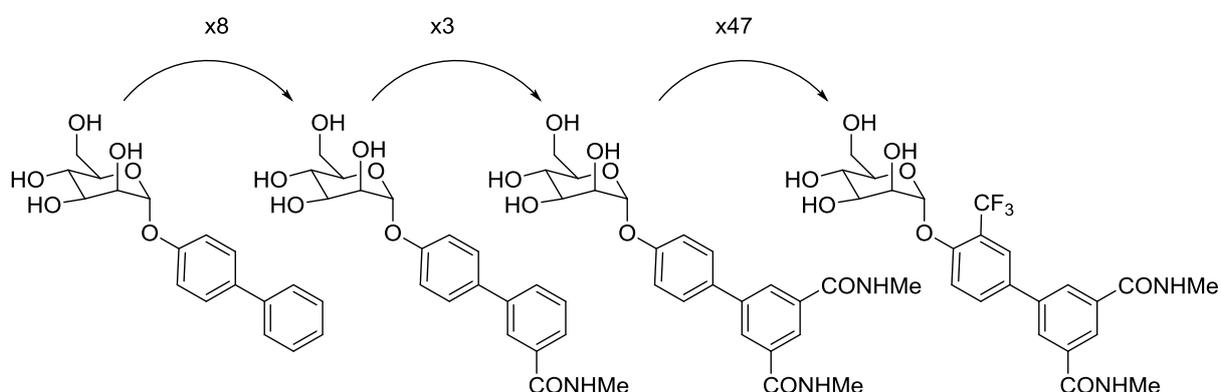


Figure 17 : Evolution des biphenyles et de leur affinité pour FimH.

Ce dernier biphenylmannoside s'est révélé efficace *in vivo* dans un modèle murin de cystite.<sup>14,42</sup> Les études ont montré une diminution des populations d'*E. coli* uropathogènes (UPEC) au niveau de la vessie après un traitement oral de 100mg/kg ou intrapéritonéal de 10mg/kg. Ce type de traitement antiadhésif a aussi démontré une efficacité lors d'une utilisation prophylactique, en diminuant la population bactérienne et en l'empêchant de rentrer dans les tissus. Un traitement à 50mg/kg a permis une diminution d'un facteur 1000 du nombre de bactéries restant dans la vessie de souris infectée par la souche uropathogène EC958. Les auteurs ont également montré *ex vivo*, après un traitement à la gentamycine inefficace sur les cellules internalisées que l'utilisation de ce composé empêche la pénétration des bactéries dans les cellules.

La synthèse des composés biphenyliques est relativement simple et facilement diversifiable (Schéma 2), ce qui est un atout important. Elle est basée sur une glycosylation du mannose peracétylé permettant d'introduire le 1<sup>er</sup> phényle qui pourra ensuite être couplé par réaction de Suzuki, avec un deuxième cycle aromatique. Finalement le sucre est déprotégé pour fournir l'inhibiteur désiré.

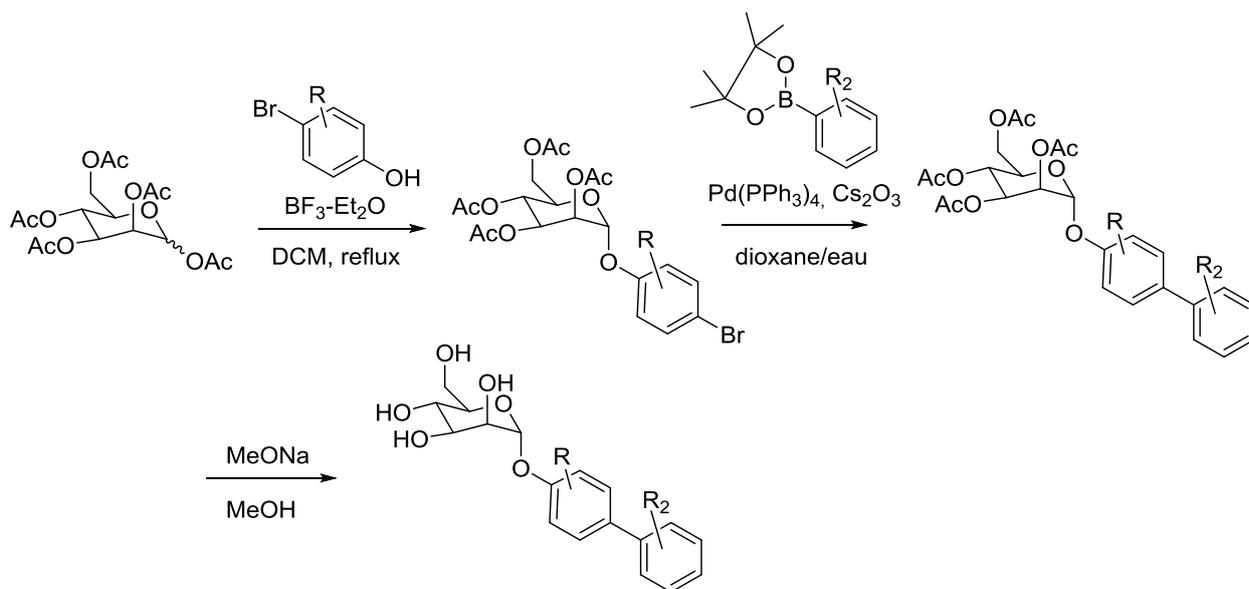


Schéma 2 : Stratégie de synthèse des biphénylmannosides.

Le point faible de ces composés reste leur faible solubilité en milieu aqueux, ce qui oblige à les utiliser en présence de DMSO. La liaison glycosidique est également clivable par les enzymes, ce qui réduit leur biodisponibilité.

## (2) Les inhibiteurs multivalents

Plutôt que d'améliorer l'affinité intrinsèque d'un ligand en maximisant les interactions au sein du site actif, une voie alternative pour augmenter l'affinité, est la synthèse d'inhibiteurs multivalents de FimH. Cette stratégie a été particulièrement explorée au cours des vingt dernières années, avec la synthèse d'un grand nombre de mannoses multivalents de structures et de valences très variées.<sup>15,43,44</sup>

### (a) Travaux de Lindhorst et coll.

La première évaluation de composés multivalents sur l'inhibition de FimH fut réalisée par l'équipe de Lindhorst en 1998.<sup>45</sup> Les structures développées sont basées sur l'obtention de mannoses isothiocyanates qui sont couplés sur une charpente chimique *via* la formation d'une thiourée.<sup>46</sup> De cette façon, le groupe a obtenu des ligands de valence 2, 3, 4, 6 et 8 qui ont été évalués par hémagglutination. Les meilleurs résultats ont été observés avec les composés di- et trivalents qui ont des coefficients  $\beta$  de l'ordre de 35 par rapport au MeMan. La même stratégie fut essayée sur un azamacrocycle et a conduit à un composé tétravalent possédant un facteur  $\beta$  de 195 (Figure 18).<sup>47</sup> Il faut toutefois noter que le calcul de ce gain

d'affinité multivalent  $\beta$ , déterminé par rapport au MeMan, ne prend pas en compte la présence des fonctions additionnelles thiourées qui peuvent également jouer un rôle dans l'interaction.

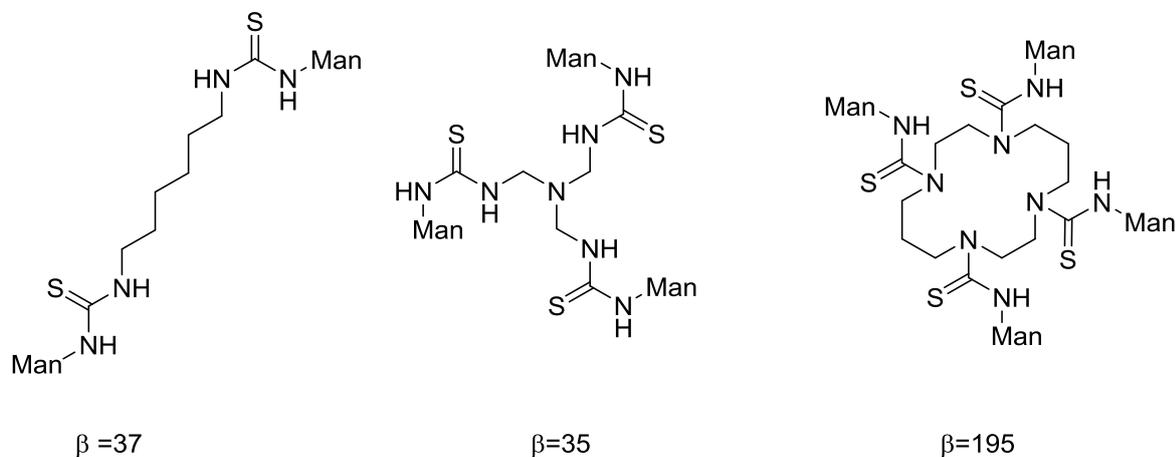


Figure 18 : Thiourées-mannosides divalent, trivalent et macrocyclique.

Cette équipe a par la suite développé de nombreux dendrimères,<sup>48,49,50</sup> sans toutefois parvenir à égaler les gains d'affinité obtenus avec des composés aromatiques tels que le *p*-nitrophénylmannoside.

*(b) Travaux de René Roy et coll.*

Roy *et coll.* ont travaillé sur d'autres types de composés multivalents, comme les néoglycoprotéines.<sup>35</sup> Le greffage de résidus mannoses sur les amines d'albumine de sérum bovin ou humain (BSA ou HSA) a été réalisé au moyen de chaînes, de longueur et de structures variables. Certaines protéines hautement mannosylées ont montré des affinités intéressantes, particulièrement pour les composés de plus haute valence.

Des structures dendritiques basées sur des lysines ont également été étudiées sur l'inhibition de l'héماغlutination d'érythrocytes par *E. coli*. Une activité augmentée d'un facteur 20 a été observée entre le composé divalent de référence et celui portant 16 mannoses. (Figure 19). Afin d'expliquer l'augmentation d'affinité, les auteurs ont proposé que plusieurs FimH de différentes bactéries puissent se lier à un composé. Les auteurs estimaient alors qu'une certaine distance entre les épitopes du dendrimère, estimée à environ 20nm, était nécessaire pour permettre une agrégation des *pili*.

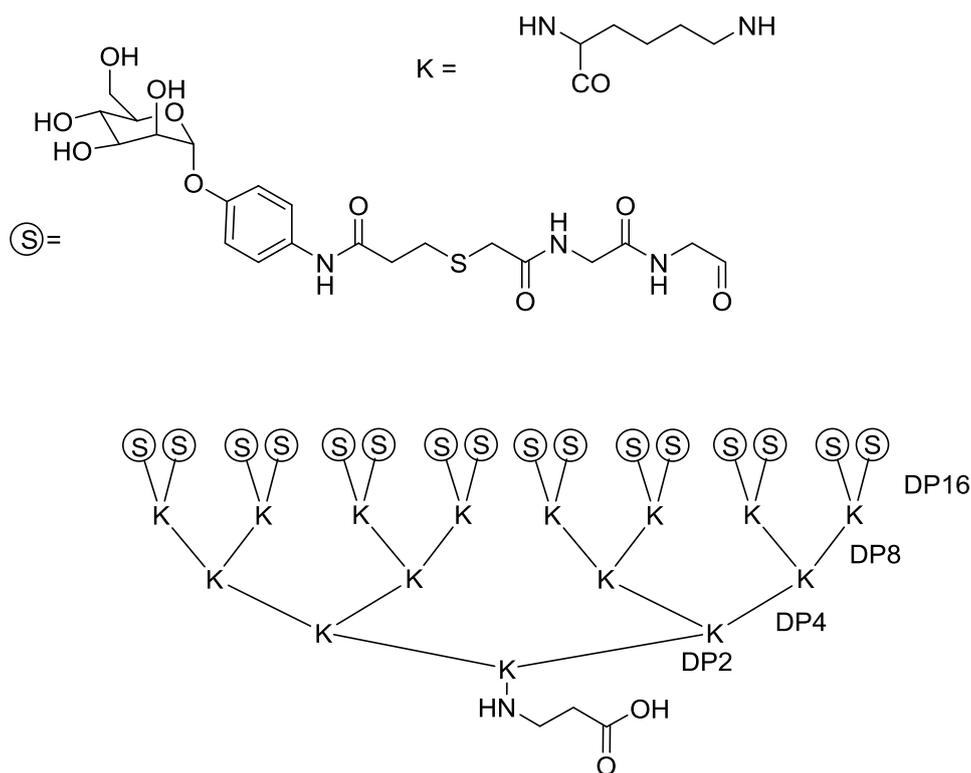


Figure 19 : Structures dendrimériques basées sur la lysine, avec des valences variant de 2 à 16.

Plus récemment, des structures glycodendrimériques, également basées sur la L-lysine, ont été obtenues par synthèse peptidique sur support solide.<sup>51</sup> Malgré une inhibition relativement faible ( $1\mu\text{M}$ ) lors des tests d'HIA, un effet multivalent important est obtenu, augmentant pour chaque génération de dendrimères.

Des composés plus petits ont été synthétisés notamment par Touaibia *et Coll* qui ont travaillé sur une série de ligands avec un cœur pentaérythritol<sup>52</sup> selon des méthodologies utilisant le couplage de Sonogashira et la réaction de Huisgen. Une structure tétravalente portant un phényle en position anomérique a permis d'atteindre une inhibition subnanomolaire par SPR, avec un coefficient  $\beta$  par rapport au  $\text{PNP}\alpha\text{Man}$  de 25 (Figure 20).

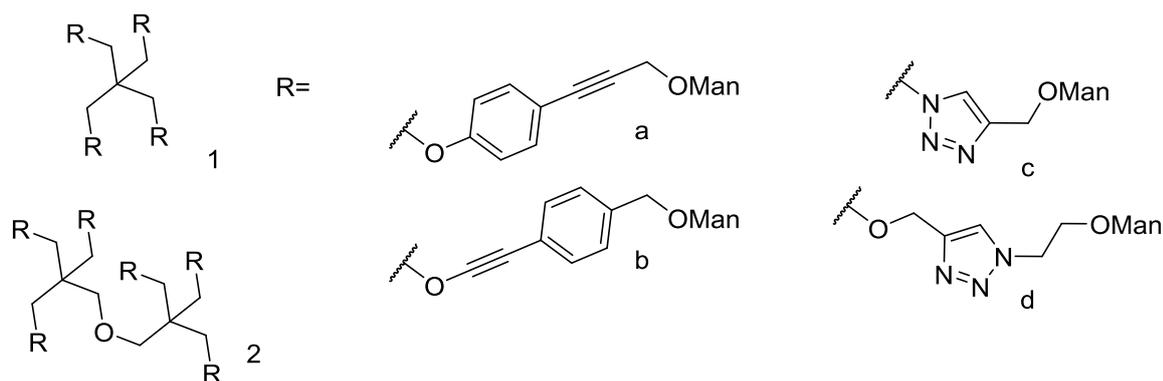
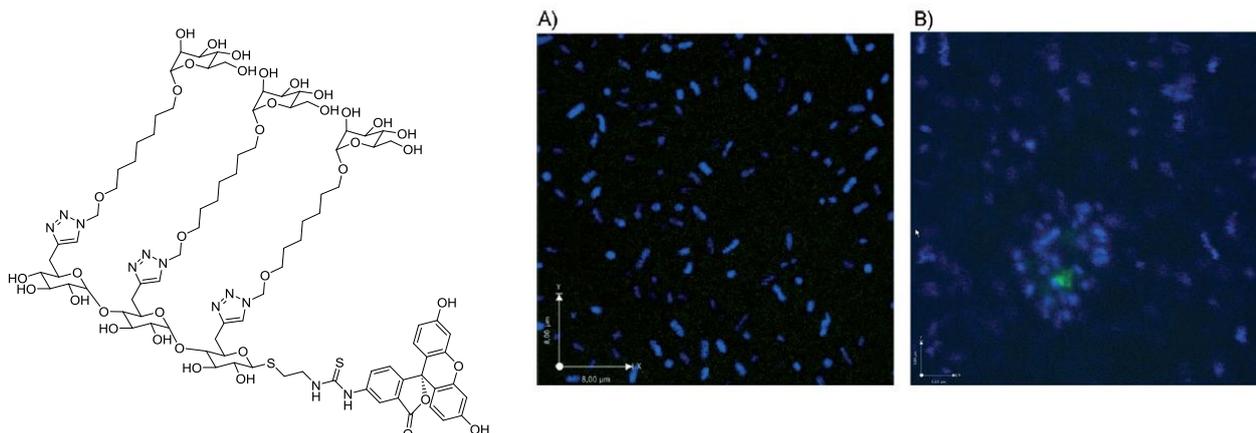


Figure 20 : Inhibiteurs multivalents à cœur pentaérythritol. Les composés 1c et 2c ont des titres d'héماغlutination respectivement 3 et 25 fois supérieurs au PNP- $\alpha$ -Man, mais inférieures à HM.

### (c) Travaux de notre équipe

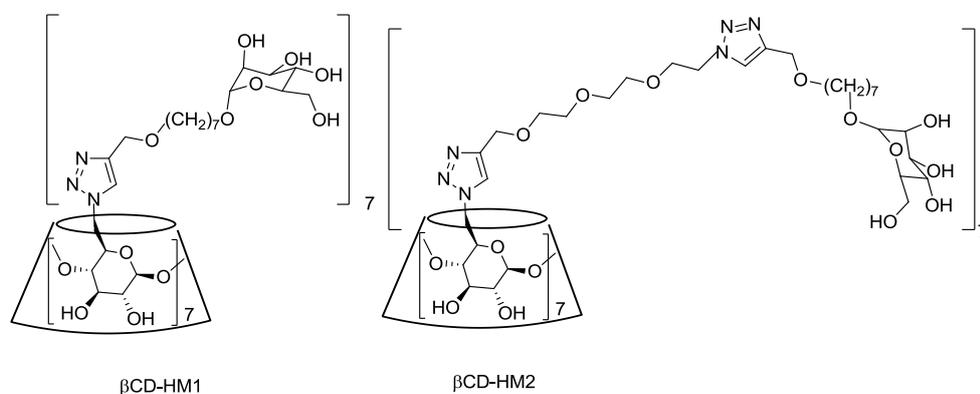
Notre équipe s'est quant à elle intéressée à l'utilisation de l'heptylmannoside afin de former de nouvelles structures multivalentes, tout en tirant parti de l'affinité nanomolaire de cet inhibiteur pour FimH. Les premières structures furent basées sur des cœurs de type pentaérythritol,<sup>53</sup> prolongées par des bras éthylène glycol, relié au ligand heptylmannoside. Ces composés ont montré une activité similaire à l'HM lors des tests d'HIA, cependant leur utilisation en tant qu'inhibiteur sur des cellules épithéliales de vessie humaine a montré un effet cluster intéressant avec un facteurs  $\beta$  supérieur à 64 pour le composé de plus haute valence par rapport à l'HM.

Un second type de plateforme, basé sur des  $\beta$ -1-4-oligoglucoses,<sup>37</sup> et fonctionnalisé en position 6 par des azotures a été préparé, afin de greffer l'HM par chimie click. Des structures de valence 1, 2, 3 et 7, cette dernière issue de l'ouverture d'une cyclodextrine, furent ainsi préparées. Les titres d'HIA ont montré des coefficients  $\beta$  de 4, 5 et 9 pour les composés de valence 2, 3 et 7. Les études par titration calorimétrique isothermale (ITC) ont révélé une coopérativité négative lors de l'interaction de la seconde protéine, probablement due à des répulsions stériques. De ce fait, l'augmentation de l'avidité ne peut venir que d'interactions d'une molécule avec de multiples *pili* des bactéries. Ceci a été prouvé par microscopie de fluorescence, après greffage d'un fluorophore en position anomérique où l'on observe bien l'agrégation des bactéries autour des composés (Figure 21).



**Figure 21 : Microscopie laser A) d'une solution d'UPEC marquées par un fluorophore (bleu) B) de cette même solution, en présence de l'heptylmannoside trivalent (ci-à gauche).marqué par un fluorophore (vert).**

Des analogues de ces composés avec un squelette cyclodextrine ont été préparés<sup>38</sup> (Figure 22) et ont également montré des affinités importantes pour FimH. Les ligands heptavalents sont capables de se lier à plusieurs FimH (3 ou 7 suivant la taille des bras espaceurs) ce qui a été prouvé par des expériences complémentaires d'ITC, de DLS et SAXS. Les inhibiteurs ont été testés sur la souche UTI89 *in vivo*, par introduction dans la vessie *via* un cathéter. Les composés heptavalents  $\beta$ CD-HM1et  $\beta$ CD-HM2 ont été capables de réduire les colonies bactériennes d'un facteur 10 à de très faibles doses (seulement 2 $\mu$ g par animal). En comparaison, les composés monovalents analogues de  $\beta$ CD-HM1et  $\beta$ CD-HM2 produisent le même effet mais à des doses cent fois plus importantes. Ces travaux rapportent donc le premier effet multivalent observé *in vivo* sur la décolonisation bactérienne. D'autre part, le marquage radioactif au technicium d'un analogue de  $\beta$ CD-HM1et  $\beta$ CD-HM2 a montré une distribution rapide et durable au niveau de la vessie après injection systémique. Ces résultats suggèrent une application potentielle des composés  $\beta$ CD-HM1et  $\beta$ CD-HM2 dans le traitement des infections urinaires.



**Figure 22 : Heptylmannosides multivalents, avec un cœur cyclodextrine.**

## C. Projet de recherche

La majorité des ligands synthétisés précédemment ont été conçus dans le but d'inhiber FimH dans le cadre d'infections urinaires. A la fin des années 1990, Darfeuille-Michaud et coll. ont montré l'implication de souches pathogènes d'*E. coli* dans la maladie de Crohn,<sup>54</sup> une maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

### 1. Inhibition d'*E. coli* dans le cadre de la maladie de Crohn

La maladie de Crohn (MC) fut décrite pour la première fois en 1769 par Morgani, puis par Antoni Lesniowski en 1903 qui reporta une inflammation du colon et des intestins. Elle fut finalement nommée *iletitis regionalis* ou *ileitis terminalis* en 1932 par Burrill Bernard Crohn et coll.<sup>55</sup> Cette appellation existe toujours, mais le terme commun est « maladie de Crohn » ou « Lesniowski-Crohn ».

Il s'agit d'une inflammation des parois digestives, pouvant s'étendre de la bouche à l'anus et se déclarant principalement entre 15 et 25 ans. La prévalence est comprise entre 8 et 240 personnes pour 100 000 en Europe, avec une incidence dans les pays occidentaux entre 6 et 15 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes.<sup>56</sup> Les symptômes sont des diarrhées sanglantes, douleurs abdominales, fièvre et fatigue persistante. Ces symptômes évoluent au rythme de la maladie, par poussées aiguës, suivies de phases de rémission. Les patients atteints de la MC ont également une plus forte propension à déclarer des cancers colorectaux.

Le caractère chronique, ainsi que la nature des symptômes en font une pathologie fortement invalidante, tant physiquement que socialement, dont les causes exactes sont toujours discutées. Il est néanmoins admis que l'association d'une prédisposition génétique, de facteurs environnementaux, tels que l'alimentation ou le tabagisme, ainsi que d'un désordre du microbiote intestinal sont à l'origine de la maladie. Nous allons nous intéresser principalement à ce dernier facteur.

#### a) Microbiote et système digestif

##### (1) Généralités

Le système digestif comporte environ 500 espèces bactériennes aérobies et anaérobies, ainsi que des champignons, protozoaires et virus. En temps normal, seulement 30 à 40

espèces composent 99% du nombre total de bactéries.<sup>57</sup> Le microbiote intestinal est composé d'environ 100 000 milliards de bactéries (Figure 23), soit dix fois plus que le nombre de nos cellules, pour une masse d'environ 1,5kg. Cet ensemble de micro-organismes est, depuis quelques années, de plus en plus étudié, notamment grâce aux avancées des techniques de séquençages et d'analyses métagénomiques (Human microbiom project). Le microbiote est maintenant considéré comme un « organe » à part entière et de nombreuses pathologies sont en lien avec son dérèglement.<sup>58</sup>

Le nombre de bactéries varie très fortement le long du tractus digestif, la population est très réduite dans l'estomac, le duodénum et dans le jéjunum, puis se densifie fortement dans l'iléum et dans le colon. Cette population est principalement répartie entre les *phyla Firmicutes* et *Bacteroidetes*. Les bactéries *Escherichia coli* ne représentent qu'une minorité du microbiote, inférieure à 0,1%.

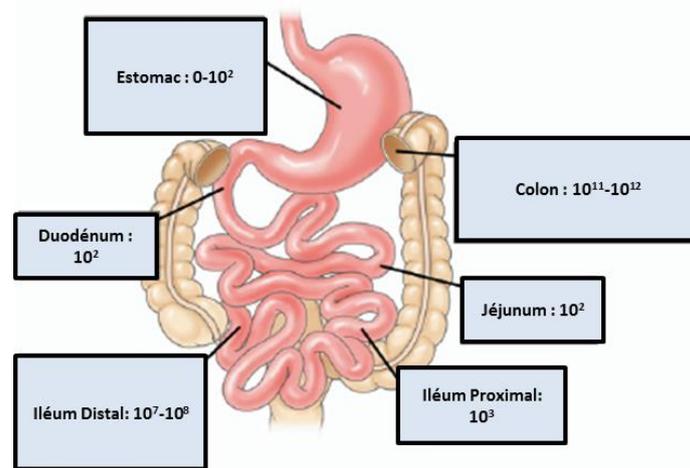


Figure 23 : Concentration de bactéries dans les différentes parties du système digestif.<sup>57</sup>

Le microbiote est un écosystème dont l'équilibre permet le bon fonctionnement de l'organisme. Il a été montré, par exemple, qu'une population trop importante de *Firmicutes*, tenant un rôle important dans la digestion,<sup>59</sup> est un facteur commun dans de nombreux cas d'obésité. En effet, ce déséquilibre (ou dysbiose) entraîne une absorption exacerbée des nutriments. Des dysbioses ont également été mises en causes dans de nombreuses pathologies, tels que le diabète,<sup>60</sup> les allergies,<sup>61</sup> ou l'autisme.<sup>62</sup>

## (2) Liens avec le système immunitaire intestinal

Une composition adaptée de bactéries intestinales permet de favoriser les défenses immunitaires muqueuses qui empêchent l'accès des bactéries à la surface de la paroi intestinale. Ce mucus est essentiellement formé de glycoprotéines de masses molaires élevées, concentrant des peptides antibactériens à large spectre.

Le microbiote intestinal est composé par de nombreuses espèces bactériennes essentielles aux mécanismes intestinaux. Une réponse immunitaire dite « tolérante » est mise en place afin de ne pas cibler les antigènes inoffensifs ou nécessaires. Il a pu être montré que le changement de composition du microbiote intestinal a une influence sur l'homéostasie immunitaire intestinale, même en l'absence de bactéries pathogènes.

Dans le cas de la maladie de Crohn, chez des personnes génétiquement prédisposées, le système immunitaire perd cette tolérance, suite à un déséquilibre,<sup>63</sup> et réagit de manière exacerbée contre les nutriments et le microbiote intestinale, accentuant ainsi la dysbiose. L'augmentation de la quantité d'antigènes reconnus provoque une hausse des molécules pro-inflammatoires par rapport aux molécules anti-inflammatoires, alors que les agents immunitaires : macrophages, cellules dendritiques et cellules-T deviennent hyper-présents dans la muqueuse intestinale. Cette réponse immunitaire disproportionnée occasionne des dommages à la muqueuse entraînant la formation de lésions et mettant en péril l'intégrité de la barrière intestinale.

Le rôle prépondérant du microbiote dans la maladie de Crohn a pu être mis en évidence par différentes études. D'une part, les patients soumis à des antibiotiques ont montré une amélioration générale de leur état de santé même si à long terme un tel traitement n'est pas envisageable.<sup>64</sup> d'autre part, des études ont également été réalisées chez des souris utilisées comme modèle de la MC, déficientes pour la cytokine anti-inflammatoire IL-10, et donc plus sujettes aux inflammations. Alors que les souris mutantes élevées en condition normale développent des symptômes de colite assimilables à la MC, celles élevées en condition stérile n'ont jamais présenté de signes de colite.<sup>65,57</sup>

## (3) Les traitements actuels de la maladie

C'est le dérèglement du système inflammatoire qui est principalement ciblé par les traitements existants, notamment par l'administration d'anti-inflammatoires, de corticoïdes

ou encore d'anticorps dirigés contre la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , (Tumor Necrosis Factor-alpha). Trois anticorps anti-TNF- $\alpha$  sont actuellement sur le marché dans le cadre de la MC : adalimumab (Humira®) de AbbVie Inc., infliximab (Remicade®) produit par Johnson & Johnson et certolizumab pegol (Cimzia®) du Groupe UCB.<sup>66</sup>

Des études ont montré que 60% des patients traités par Humira répondaient positivement à ce type de traitement mais que 25% seulement d'entre eux étaient toujours en rémission après 1 an. Ces traitements sont généralement bien tolérés, mais l'affaiblissement de la réponse immunitaire peut entraîner des risques d'infection par des pathogènes opportunistes.<sup>57,67</sup>

Le nombre d'interventions chirurgicales a été considérablement diminué avec l'utilisation des nouveaux traitements et les évolutions technologiques, notamment des techniques de coloscopie qui permettent un diagnostic plus rapide. Cependant, 90% des patients atteints de la maladie de Crohn devront se faire opérer au cours de leur vie, principalement dans le cadre de résections de l'intestin grêle. Les interventions chirurgicales sont heureusement de moins en moins invasives et les fragments d'intestins prélevés sont réduits au minimum, permettant une rémission et une reprise des fonctions digestives plus rapides.

Des thérapies antibiotiques ont également induit des améliorations de l'état général des patients. Le métronidazol<sup>64</sup> et la ciprofloxacine<sup>68</sup> ont notamment réduit significativement les symptômes dans des cohortes de patients. Ce type de traitement risque cependant d'accentuer le déséquilibre du microbiote puisque ces antibiotiques sont très peu sélectifs. Ils sont généralement utilisés après résections afin de limiter les risques de récurrence.<sup>69</sup>

### ***a) Adherent Invasive E. coli***

#### **(1) Présence d'AIEC chez les patients**

L'équipe du Professeur Darfeuille-Michaud a mis en évidence une présence anormale de bactéries *E. coli* associées à la muqueuse iléale chez des patients atteints de la maladie de Crohn.<sup>54</sup> Ces bactéries disposent de mécanismes de virulence différents de ceux répertoriés jusqu'alors pour des bactéries intestinales,<sup>70</sup> à savoir la capacité de s'adhérer et d'envahir les cellules intestinales. Pour cette raison, elles ont été nommées AIEC (Adherent Invasive *E. coli*). Ces bactéries expriment des *pili* de type 1 et leur mécanisme d'adhésion aux cellules

est dépendant d'une interaction avec le mannose. En effet, une bactérie délétée pour le gène *fimH* n'est plus capable d'adhérer aux cellules et une concentration de 2% de mannose dans le milieu de culture inhibe également l'adhésion de ces souches d'*E. coli* de 97.8%.<sup>71</sup>

Plusieurs équipes ont confirmé la présence de ces bactéries chez les patients atteints de la MC.<sup>72,73</sup> Les bactéries AIEC ont été retrouvées associées aux cellules épithéliales iléales chez 36 à 50% des patients, contre 6% des sujets contrôles.<sup>74</sup> Ces souches sont également présentes chez des individus sains, mais non associées aux muqueuses. Ces bactéries sont décrites comme des souches commensales ou pathogènes opportunistes ayant évolué pour occuper une niche et déclencher la pathologie.<sup>75</sup> La souche LF82, isolée d'une biopsie iléale d'un patient atteint de la MC est utilisée comme souche AIEC de référence.

### (2) Réplication des AIEC dans les macrophages

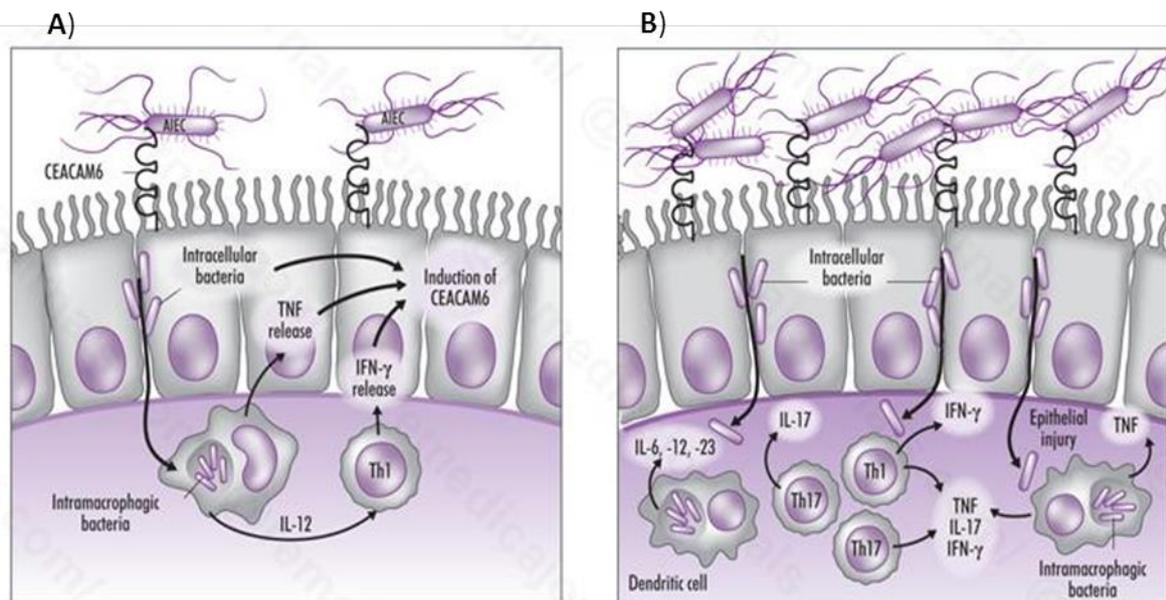
Les bactéries AIEC ont également la particularité de pouvoir se répliquer à l'intérieur des macrophages,<sup>76</sup> sans provoquer la mort cellulaire de ceux-ci. Les phagosomes qui entourent les bactéries phagocytés, fusionnent pour former une grande vacuole où les AIEC peuvent se multiplier. De plus les AIEC induisent une forte production de TNF- $\alpha$ , une substance pro-inflammatoire. Ceci va déclencher une réponse immunitaire, générant la production d'interleukines (Figure 24), ce qui va accentuer la destruction de la barrière intestinale.<sup>77</sup> La dégradation de l'épithélium intestinal et des muqueuses peut alors faciliter le passage des bactéries et entretenir le processus inflammatoire. La production de TNF- $\alpha$  semble également être nécessaire pour favoriser la réplication des bactéries au sein du macrophage, entraînant ainsi une auto-amplification de la capacité des bactéries à se multiplier.<sup>78</sup> L'accumulation des macrophages infectés, peut conduire à la formation de granulomes (agrégats de cellules immunitaires et d'antigènes que l'organisme n'arrive pas à éliminer), caractéristiques de la MC.

### (3) Adhésion des AIEC sur les récepteurs CEACAM6

Afin de pouvoir envahir les cellules épithéliales intestinales, les AIEC doivent adhérer à la surface des cellules. Les récepteurs mannosylés ont donc constitué une cible d'étude privilégiée.<sup>79</sup> En particulier, les récepteurs CEACAM5 et CEACAM6 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) sont surexprimés chez les patients atteints de la MC. Les essais d'adhésion bactérienne *in vitro* en présence d'anticorps anti-CEACAM6 ont

montré une importante diminution du nombre de bactéries AIEC LF82 associées aux entérocytes de patients. Ces études désignent CEACAM6 comme un récepteur particulièrement important pour l'adhésion cellulaire des AIEC. La surexpression de CEACAM6 peut être favorisée par la présence de TNF- $\alpha$ , les AIEC sont donc capable de favoriser leur propre colonisation, *via* leur multiplication dans les macrophages.

Des souris transgéniques CEABAC10, exprimant la glycoprotéine humaine CEACAM6 ont été infectées par la souche AIEC de référence LF82.<sup>80</sup> Elles ont développé des symptômes de colite avec des saignements rectaux, diarrhées, pertes de poids et ont montré un taux de survie de 20% après 7 jours. Les marqueurs de l'inflammation (IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-17) ont augmenté, alors que les taux de composés anti-inflammatoires (IL-10) ont diminué. Les souris sauvages qui n'expriment pas le récepteur CEACAM6 n'ont pas présenté ces symptômes inflammatoires lors de l'infection par les AIEC.



**Figure 24 : A) Mécanisme d'infection dans le cadre de la MC : les AIEC s'adhèrent sur les récepteurs CEACAM6 et affaiblissent la paroi intestinale puis s'infilrent et atteignent les macrophages. B) Ceux-ci produisent du TNF- $\alpha$ , ce qui accroît l'expression de CEACAM6 et enclenche la réponse immunitaire. La production de TNF- $\alpha$  est accentuée ce qui amplifie l'adhésion bactérienne.<sup>79</sup>**

L'addition d'anticorps anti-CEACAM6 par voie intra-péritonéale chez les souris infectées a permis de réduire la colonisation intestinale de manière claire,<sup>80</sup> confirmant l'implication de cette protéine dans le processus infectieux. L'administration de souches non AIEC ou de mutants n'exprimant pas de *pili* de type 1 n'ont pas provoqué d'infection dans ce modèle.

L'inhibition de FimH par le biais d'une stratégie antiadhésive est donc prometteuse afin de limiter la colonisation de l'intestin par les AIEC.

#### (4) AIEC : variantes de FimH

FimH est composée de deux domaines, la partie piline et la partie lectine qui lui permettent d'adopter deux conformations différentes. En effet, ces deux domaines peuvent être sous forme compressée, conduisant à un relâchement du site actif qui est alors relativement peu affiné pour le substrat.<sup>81</sup> En revanche, soumise à un flux de liquide ou après s'être liée à un récepteur mannosylé, l'adhésine FimH est soumise à des forces de cisaillement qui lui permettent d'étendre les parties lectine et piline, pour donner une nouvelle conformation au site actif beaucoup plus affinée pour le mannose. Ce type de phénomène est dit « catch-bond ».

La conformation la moins active est générée par l'interaction avec la partie N-terminale de FimG, dont l'extrémité est incluse dans le domaine FimH pilin qui vient contraindre le site actif de FimH. En effet, la lectine FimH purifiée, donc sans FimG présente la conformation allongée la plus active, avec ou sans ligand dans le site actif. Il existe également des souches d'*E. coli*, présentant des mutations dans la séquence de FimH qui permettent le maintien constant de la conformation la plus active. Cependant, la conservation des deux formes a été en général favorisée lors de l'évolution, ce qui indique un bénéfice pour la bactérie. Thomas *et Coll.* ont pu montrer que les interactions avec des inhibiteurs solubles ne sont pas soumises aux forces de cisaillement. Elles ont donc une durée de vie plus courte que les interactions avec une surface sous un flux.<sup>82</sup>

Une étude de Bouckaert *et Coll.*<sup>83</sup> a montré que la souche AIEC LF82 possède une version de FimH ne permettant pas d'effet « catch-bond » et qu'elle est donc toujours dans une conformation optimale pour l'interaction avec le mannose. Cette conformation est due à une mutation au niveau de la partie centrale, entre la partie piline et la partie lectine de FimH qui bloque la mobilité de la partie lectine. De ce fait, des études d'inhibition d'AIEC ne devraient pas causer de biais trop important lors de l'évaluation des composés, par rapport à l'utilisation de FimH sous forme purifiée.

## (5) Traitements alternatifs aux mannosides synthétiques ciblant spécifiquement FimH

L'utilisation de mannosides synthétiques antagonistes de FimH n'est pas la seule stratégie à avoir été envisagée pour l'inhibition de l'adhésion bactérienne. Les *pili* peuvent notamment être ciblés par des pilicides, des molécules ciblant spécifiquement les protéines chaperonnes permettant leur croissance. Almqvist *et Coll.* ont développé une famille de 2-pyridone bicycliques,<sup>84,85</sup> capables de se fixer sur la partie N-terminale de FimC, la protéine chaperonne permettant la formation des pili de type1. Des images AFM ont montré que les bactéries uropathogènes UTI89 et NU14, traitées par ces composés n'expriment pas de pili, ce qui les empêche d'adhérer aux cellules ou de former des biofilms.

Des stratégies de vaccination ont également été mises en place dans le cadre des infections urinaires. L'injection intramusculaire de versions tronquées de FimH ou de complexe FimH/protéine chaperonne a permis la production accrue d'anticorps anti-FimH chez un modèle de primate. Les singes vaccinés et ensuite infectés par la bactérie uropathogène NU14 ont pu être totalement protégés de l'infection.<sup>86</sup> Des expériences similaires sur des souris ont démontré que cette protection est efficace sur d'autres souches d'*E. coli* uropathogènes, puisque FimH est une protéine suffisamment conservée.<sup>87</sup>

L'équipe de Sokurenko a récemment décrit un nouveau mécanisme d'inhibition de la protéine FimH par des anticorps parastériques.<sup>88</sup> Contrairement aux mannosides synthétiques qui sont des compétiteurs orthostériques occupant la même place que le ligand naturel dans le site actif ou aux inhibiteurs allostériques qui sont non compétitifs et se lient en dehors du site de reconnaissance, les inhibiteurs parastériques se fixent au niveau du site actif, même en présence d'un ligand, et changent sa conformation. L'anticorps mAb926 est capable de former une interaction non compétitive avec le mannose, en basculant la conformation de la poche à mannose vers sa version relâchée, de faible affinité.

(6) Preuve de concept sur la maladie de Crohn avec des analogues heptylmannosides

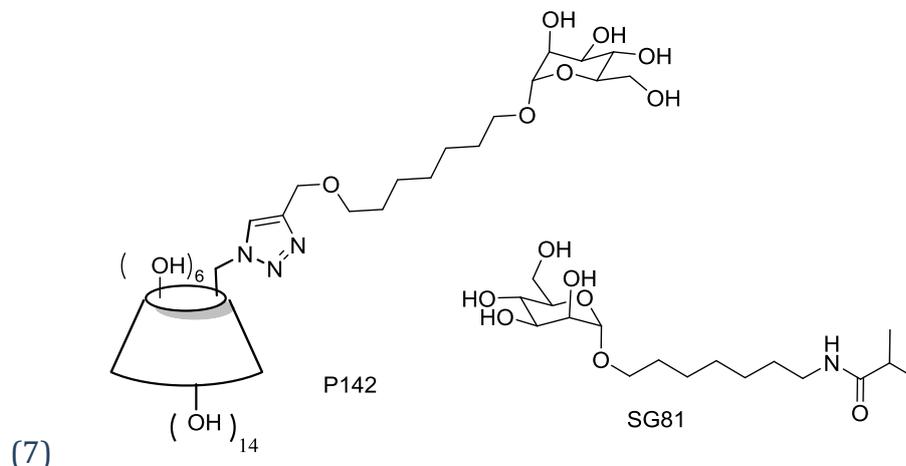


Figure 25 : P142 et SG81 sont les composés lead de la famille des heptylmannosides modifiés.

Notre équipe a mis au point des composés basés sur l'heptylmannoside<sup>89</sup> pour l'inhibition de l'adhésion des AIEC sur les cellules intestinales. HM possède un Kd de 7nM pour FimH, mesuré par ITC, cependant son activité antiadhésive lors de test *in vivo* s'est avérée faible dans un modèle de cystite et requiert des concentrations millimolaires. Ces résultats peuvent s'expliquer par le caractère tensio-actif d'HM facilitant son inclusion dans les membranes cellulaires. Les analogues d'HM préparés comportent des substituants au bout de la chaîne carbonée, afin de limiter les propriétés tensio-actives. Les tests *in vitro* ont montré une activité des composés comparables à celle de l'HM.

Les composés SG81 et P142 (Figure 25) ont été administrés à des souris transgéniques CEABAC10, exprimant la famille de gènes humains CEACAM. La flore intestinale des animaux a été réduite au moyen de streptomycine, 24h avant l'administration par voie orale des bactéries AIEC LF82 afin de faciliter la colonisation. Ensuite, l'administration des inhibiteurs par voie orale à la dose de 10mg/kg a réduit considérablement la quantité d'AIEC détectés dans les fèces et a éliminé presque entièrement LF82 du système intestinal (Figure 26 A). De manière intéressante, l'élimination des bactéries a pu être associée à une disparition des symptômes de la maladie de Crohn dans les trois jours (Figure 26 B).

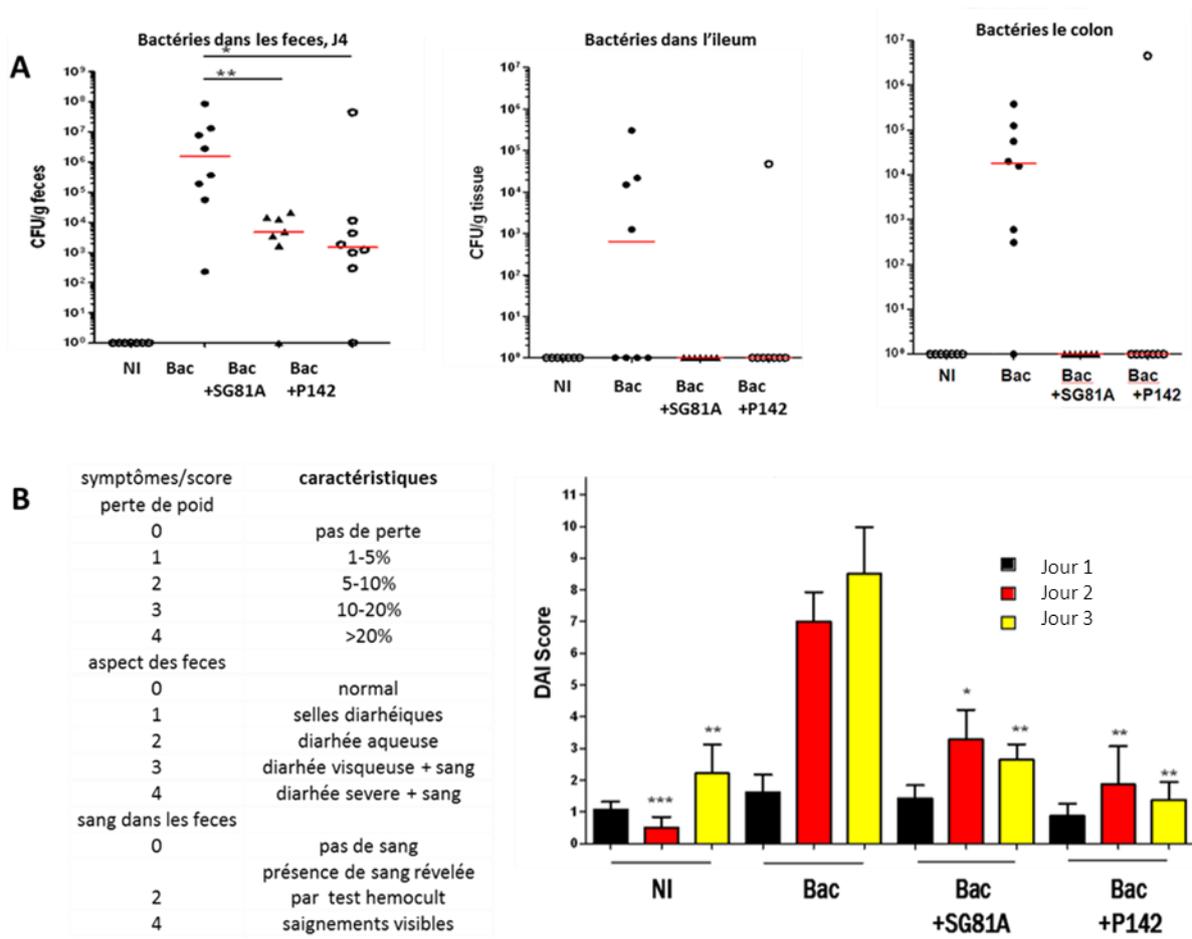


Figure 26: A) Population bactérienne dans les fèces ou les intestins après inoculation de  $3 \times 10^9$  CFU LF82 et traitement par 10mg/kg de SG81 et P142. B) tableau des valeurs de score par symptôme, symptômes observés 1, 3 et 4 jours après le traitement des souris par SG81 et P142, le score correspond à la somme des valeurs du tableau. NI correspond à un lot de souris non infectées, alors que Bac correspond aux souris infectées par la souche LF82.

Cette étude suggère pour la première fois que la stratégie antiadhésive par inhibition des *pili* de type 1 pourrait être efficace dans le traitement de la maladie de Crohn.<sup>66,90</sup>

Cependant ces composés passent partiellement les barrières intestinales et sont donc retrouvés dans le sang. En effet, une étude de biodisponibilité a été menée par la société ADME-EUROFINS, dont les protocoles seront décrits plus tard dans cette thèse. Les molécules testées, SG81 et son analogue C-glycoside, sont passés dans la circulation sanguine avec des taux de 15,7 et 25,4%. Si une biodisponibilité orale importante est généralement requise pour le développement d'un candidat médicament, dans le cas présent il est important que les molécules restent confinées au niveau de l'intestin pour éviter des effets secondaires possibles lors de l'interaction avec des lectines à mannose endogènes.

## 2. Inhibiteurs hétérocycliques

Notre équipe a également développé une méthodologie conduisant de manière rapide à des *N*-mannosides hétérocycliques,<sup>91-96</sup> *via* des réactions d'addition-cyclisation. Le but de ce travail était d'obtenir des composés pouvant interagir avec la « tyrosine gate », de manière similaire aux biphénylmannosides. La présence d'hétéroatomes au sein du cycle devait permettre d'accroître l'hydrosolubilité, nécessaire pour des applications dans des systèmes biologiques et qui a fortement limité l'application des biphénylmannosides.

### *a) Travaux antérieurs de l'équipe*

#### (1) Synthèse des premiers TazMans

Un dérivé mannosylé comportant un aminothiazole en position anomérique a d'abord été préparé.<sup>97</sup> Pour cela, la position anomérique du mannose peracétylé est activée par introduction d'un chlore qui est substitué par un groupement isothiocyanate par réaction à 110°C dans le DMF avec le thiocyanate de potassium (Schéma 3). La condensation d'ammoniac gazeux permet de former un intermédiaire thiourée. Le thiazole peut ensuite être formé par l'addition de diméthylformamide-diméthylacétal (DMF-DMA), forme activée du DMF, puis par ajout de chloro-acétone. Cela permet une réaction d'addition cyclisation pour conduire à un dihydrothiazole, puis au thiazole par perte spontanée de diméthylamine et aromatisation. Une déprotection des hydroxyles du sucre par une quantité catalytique de méthanolate de sodium est ensuite réalisée et conduit à l'obtention du produit **a** sous forme d'un mélange des deux anomères.

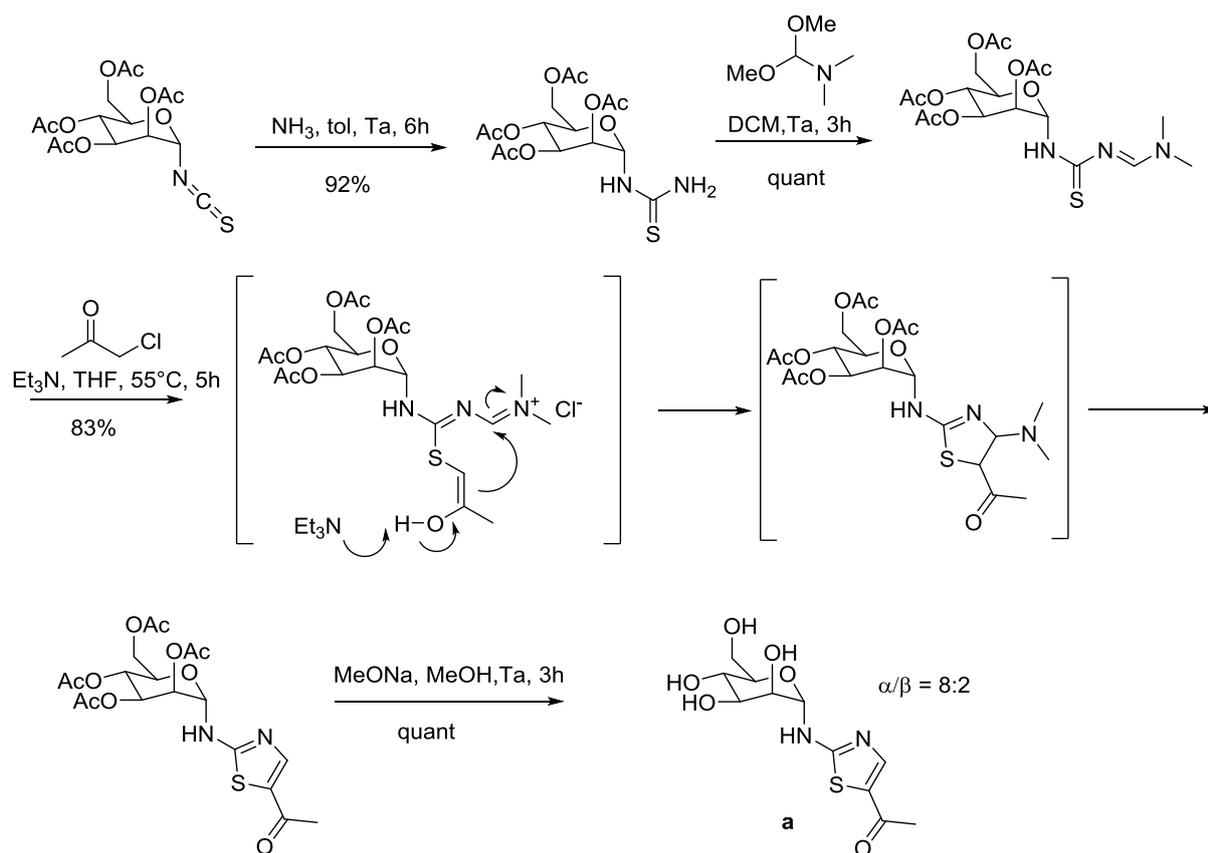


Schéma 3 : Synthèse du thiazolymannoside a.

## (2) Résultats et diversification

Ce premier dérivé thiazolymannoside **a** s'est révélé être un antiadhésif puissant, à l'activité proche de celle de l'heptylmannoside. La résolution d'une structure cristallographique par Julie Bouckaert avec qui nous collaborons, de l'inhibiteur **a** dans le site actif de FimH (Figure 27) a permis un design plus rationnel de nouveaux composés (composés de première génération). La structure cristallographique montre une interaction limitée avec la Tyrosine Gate et laisse présumer que le remplacement du méthyle en  $\alpha$  de la cétone par un groupement conjugué pourrait permettre un recouvrement plus efficace avec la tyrosine 48.

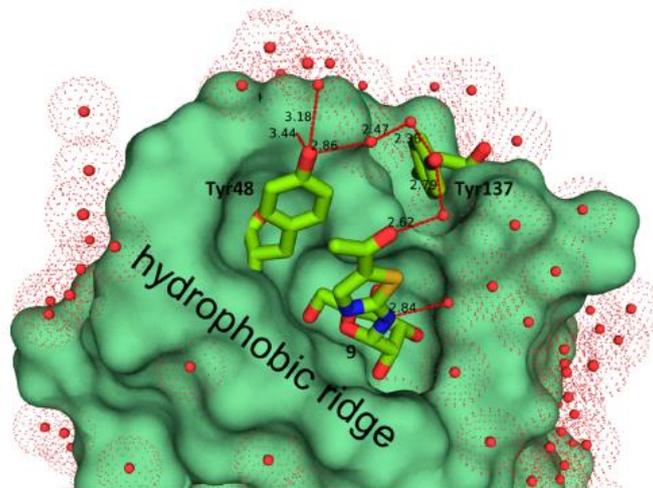


Figure 27 : Structure cristallographique du thiazolymannoside a dans le site actif de FimH.

La voie de synthèse choisie permet une modulation de cette position, en changeant la nature de la cétone  $\alpha$ -halogénée utilisée. Onze composés de première génération ont ainsi été préparés par cette méthodologie d'addition/cyclisation. Cette famille d'inhibiteurs de FimH a été nommée « TazMan » pour ThiazolylMannosides.

Le potentiel d'inhibition des TazMans de première génération a été étudié, par HIA, par ELISA et par un test cellulaire qui quantifie l'inhibition de l'adhésion des AIEC sur les cellules intestinales (Figure 28 A). Tous les composés de cette famille ont un pouvoir inhibiteur supérieur à HM. En effet ce dernier ne présente aucune activité antiadhésive dans le test cellulaire à la dose de  $1\mu\text{M}$ . Le composé **k** possède la meilleure activité antiadhésive, avec 80% d'inhibition dans ces mêmes conditions. Une étude de l'inhibition de l'adhésion en fonction de la concentration a montré une activité de **k** 100 fois plus importante qu'avec HM et 10 000 fois plus importante qu'avec l' $\alpha$ -D-mannose (Figure 28 B).<sup>97</sup>

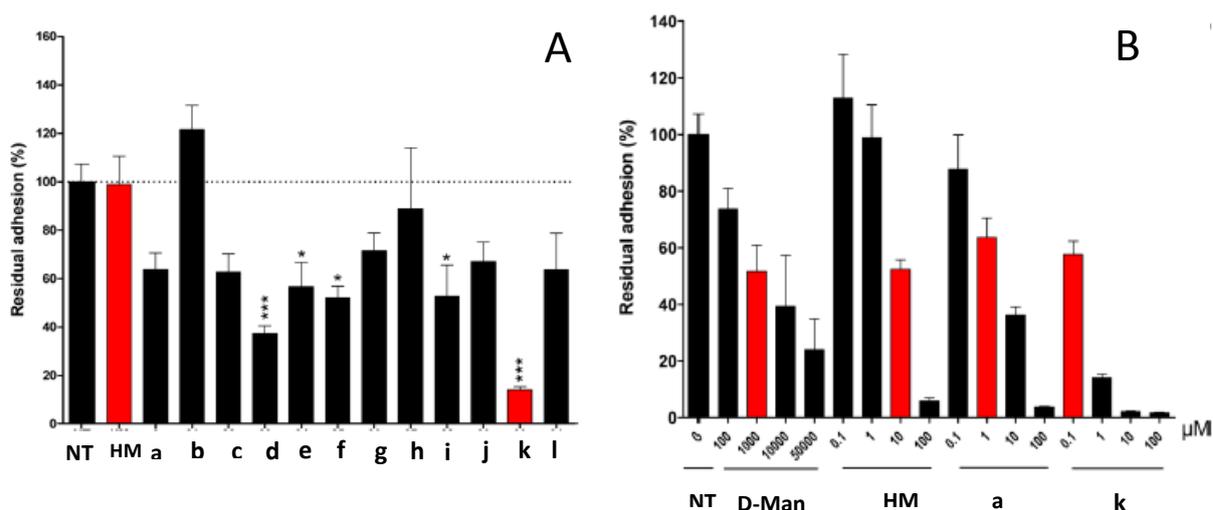
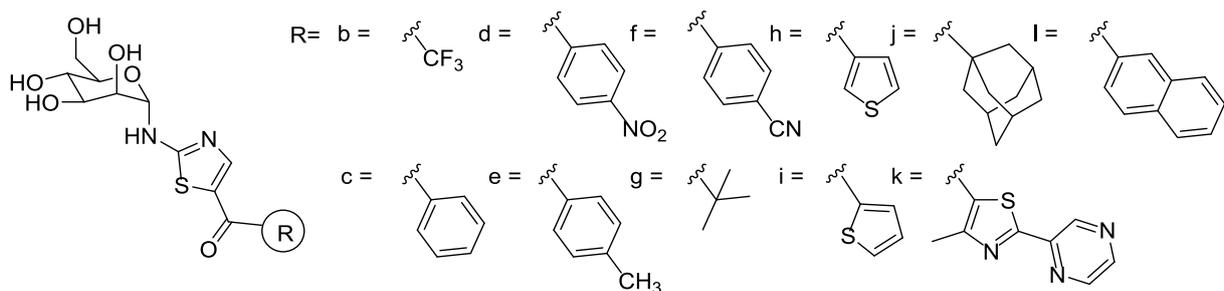


Figure 28 : A) Comparaison du pouvoir antiadhésif de HM et des TazMans (a-l) à la dose de 1 μM sur l'adhésion des AIEC (souche LF82) sur les cellules intestinales T84. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'adhésion résiduelle par rapport au lot non traité B) inhibition de l'adhésion des souches LF82 sur les cellules T84, en fonction de la concentration en inhibiteurs, pour les composés a, k, D-Man et HM. NT correspond aux cellules non traitées par les TazMans.

### *b) Limites de la première génération de TazMans et objectifs de la thèse*

A notre connaissance, le composé **k** est à ce jour l'inhibiteur de FimH le plus efficace décrit dans la littérature. Cependant la famille des TazMans de première génération doit être modifiée afin de résoudre des problèmes structuraux limitant leur potentiel d'application. Nous voulons tout d'abord améliorer la stabilité des composés, puis dans un second temps améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques.

#### (1) Stabilité

Le problème majeur de cette famille est une isomérisation partielle en milieu acide ou basique des composés qui conduit à la formation d'un mélange d'α et de β-mannosides, ces derniers n'étant pas reconnus dans le site actif de FimH. Afin d'avoir une disponibilité importante au niveau des intestins, les composés doivent être stables dans le tractus digestif et notamment au niveau de l'estomac qui possède un pH acide, généralement proche de 2.

J'ai effectué un suivi RMN du composé méthylé **a** dans une solution hydrochlorhydrique ajustée à pH=2. Des prélèvements réalisés à intervalles de temps réguliers, à partir d'un mélange d'anomères équimolaire ont montré une transformation de plus de 50% du composé  $\alpha$  en  $\beta$ -mannoside après 4h et 75% au bout de 8h qui est la limite haute du temps de résidence du bol alimentaire dans l'estomac.<sup>98</sup> Afin d'estimer l'évolution possible du mélange anomérique dans les conditions intestinales à pH=9, les échantillons isomérisés ont ensuite été placés en milieu basique, mais ces nouvelles conditions n'ont pas favorisé l'augmentation de la proportion d'anomère  $\alpha$ .

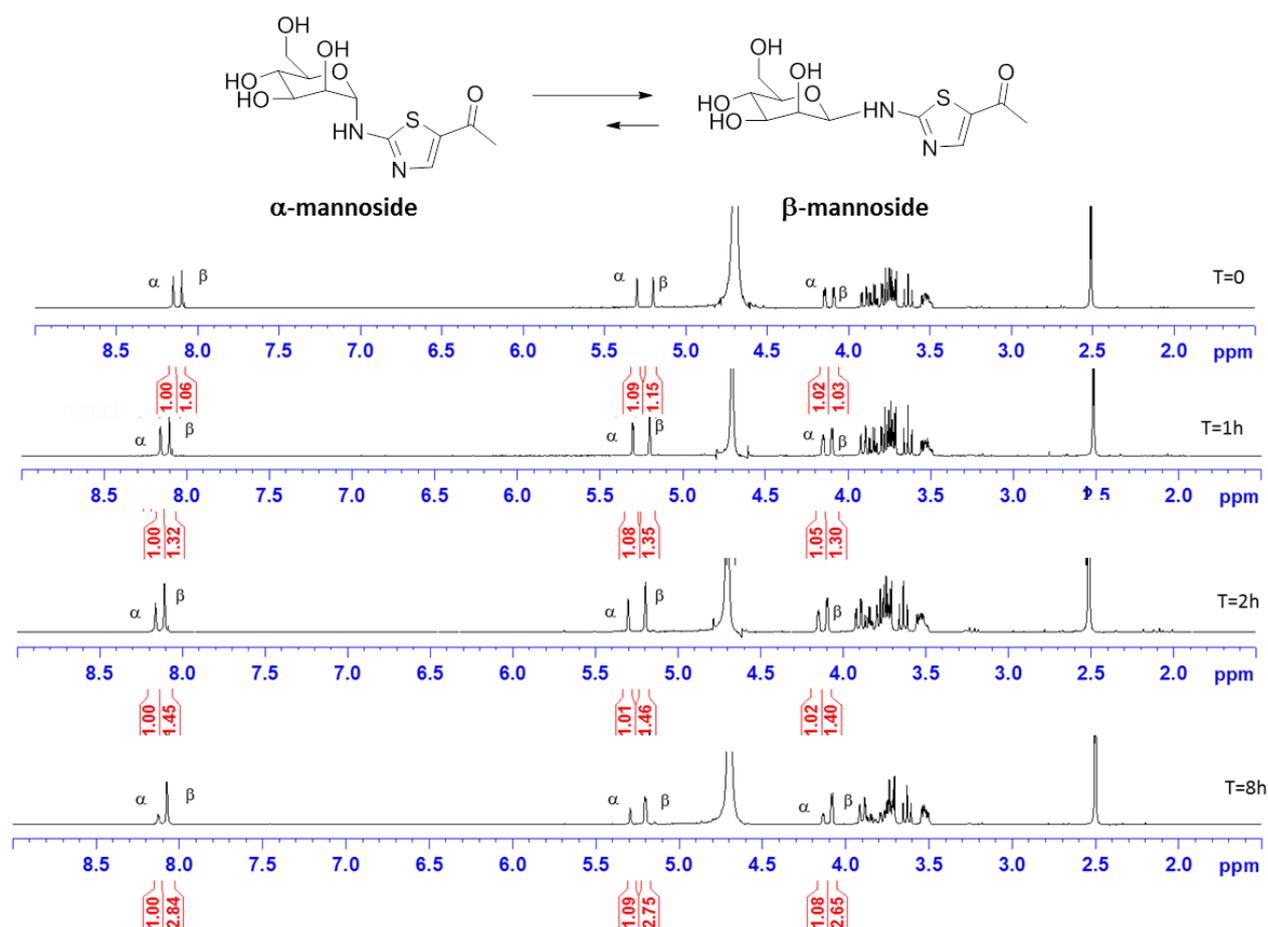


Figure 29 : Etude de l'isomérisation du composé **a** à pH=2. Une augmentation de la proportion d'isomère  $\beta$  est obtenue.

Le manque de stabilité des *N*-glycosides a déjà été rapporté dans la littérature.<sup>99</sup> Il s'explique par un mécanisme d'ouverture/fermeture du cycle lors de la formation de l'ion iminium. Cet équilibre favorise la formation du  $\beta$ -mannoside plus stable, avec la partie aglycone en position équatoriale. Une solution possible pour éviter l'anomérisation consiste à acyler l'atome d'azote afin de délocaliser le doublet non liant et de limiter l'ouverture du cycle.

Dans notre cas cette stratégie s'est avérée inadaptée. En effet lors d'une acétylation de l'amine, nous avons observé un changement de la conformation  ${}^4C_1$  du mannose en conformation  ${}^1C_4$  inactive. Nous supposons que l'acétyle provoque le changement de conformation afin de disposer le groupement le plus encombrant en position équatoriale.

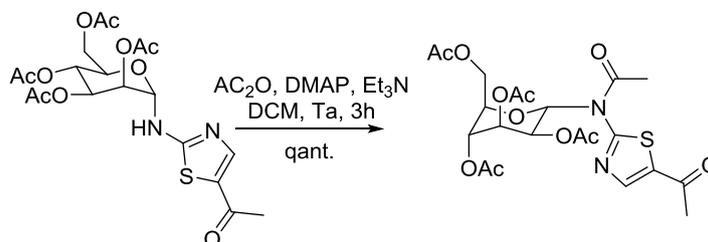


Schéma 4 : Obtention d'une conformation  ${}^1C_4$  lors de l'acétylation de l'azote.

Une autre possibilité pour bloquer le phénomène d'anomérisation, est le remplacement de l'atome d'azote par un atome de soufre, d'oxygène ou encore par un méthylène. Les *O*-, *S*- et *C*-glycosides sont en effet relativement stables aux différents pH physiologiques (variant de 2 à 10 environ).

## (2) Amélioration de l'activité

Afin d'augmenter l'affinité des TazMans pour FimH, il est possible de faire varier le substituant conjugué à la cétone, comme lors de la première diversification (Figure 28). Cependant cette stratégie implique l'addition de groupements hydrophobes qui feront diminuer l'hydrosolubilité des molécules.

L'approche que nous avons envisagée consiste à modifier l'espaceur entre le mannose et le thiazole afin de rapprocher cet hétérocycle de la tyrosine 48 et d'obtenir ainsi un meilleur recouvrement  $\pi$  (Figure 30). Cette modification devrait permettre de conserver un faible poids moléculaire et une bonne hydrosolubilité. Différentes combinaisons d'atomes peuvent être testées afin de maximiser les interactions avec la protéine, notamment en reproduisant la liaison hydrogène entre l'atome d'azote anomérique et une molécule d'eau présente à l'entrée de la poche à mannose (Figure 27).

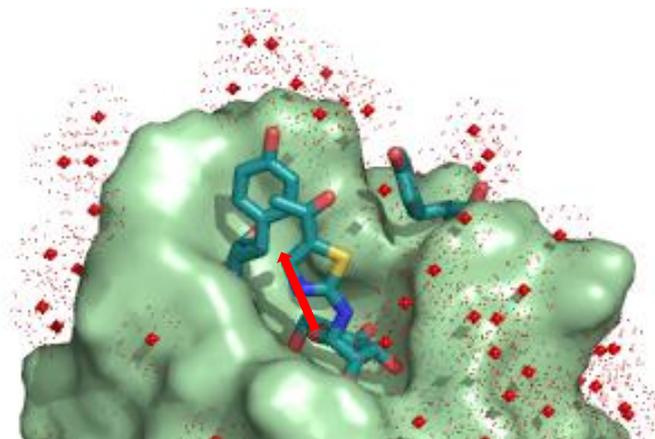


Figure 30 : Déplacement possible du thiazole par modification de la position anomérique.

### (3) Solubilité

Le dérivé méthylé **a** est parfaitement soluble dans l'eau ( $> 100\text{mg.mL}^{-1}$ ), cependant l'ajout de cycles aromatiques sur la partie aglycone, comme la thiazolylpyrazine dans le cas du composé **k**, augmente l'hydrophobicité de manière importante, diminuant l'hydrosolubilité (moins de  $1\text{mg.mL}^{-1}$ ). Les TazMans doivent présenter un minimum de solubilité dans l'eau pour être évalués de façon simple, sans ajout de DMSO, lors des tests *in vivo*.

Nous avons envisagé deux solutions à ce problème, la première consiste en l'encapsulation des composés insolubles au sein d'une cyclodextrine. Ces polysaccharides macrocycliques sont en effet bien connus pour accueillir des résidus hydrophobes et augmenter leur hydrosolubilité apparente.

La seconde stratégie réside en l'introduction d'un groupement hydrophile sur la partie aglycone du composé **k** qui se retrouve en dehors du site actif. Nous allons pour ce faire devoir ajouter une fonction d'ancrage. La pyrazine terminale étant difficile à fonctionnaliser de manière spécifique, nous avons décidé de la remplacer par un triazole. Ce cycle azoté est facilement accessible selon une réaction 1,3 dipolaire de Huisgen et permet d'incorporer des motifs hydrosolubilisants.

### (4) Biodisponibilité

Notre premier objectif sera de cibler les bactéries intestinales plutôt que les bactéries uropathogènes. Cela signifie que le candidat potentiel ne doit pas traverser les membranes intestinales et atteindre la circulation sanguine pour exercer son activité thérapeutique. Au contraire, moins les composés passeront dans le système circulatoire, plus la concentration

intestinale sera importante et moins il y aura d'interactions non spécifiques susceptibles de provoquer des effets secondaires.

Les composés passant la barrière intestinale sont généralement hydrophobes et de taille réduite. Les molécules ne répondant pas à ces critères peuvent alors être prises en charge par un système de transport dédié ou plus généralement rester dans le tractus digestif avant d'être éliminées. L'élaboration d'une molécule sous forme de sel au pH physiologique pourra être utilisée dans notre cas pour générer des TazMans hydrophiles.

La formation de molécules multivalentes pourrait apporter un double avantage. En effet, leur taille et leur hydrophilie en font des composés peu assimilables par le système digestif et un gain d'affinité pourrait être obtenu par formation d'interactions multivalentes avec les bactéries.

## (5) Notations

Une notation a été mise en place afin de faciliter l'appellation des composés préparés en fonction des groupes protecteurs (Ac pour acétyle, Bn pour benzyle), du sucre (M pour mannose), du lien entre le sucre et l'hétérocycle (N, O, S ou C) et finalement du substituant en  $\alpha$  du carbonyle. Face à la diversité de substituants possibles en position  $\alpha$  de la cétone, nous avons donné des indices arbitraires aux composés préparés (exemples Figure 31).

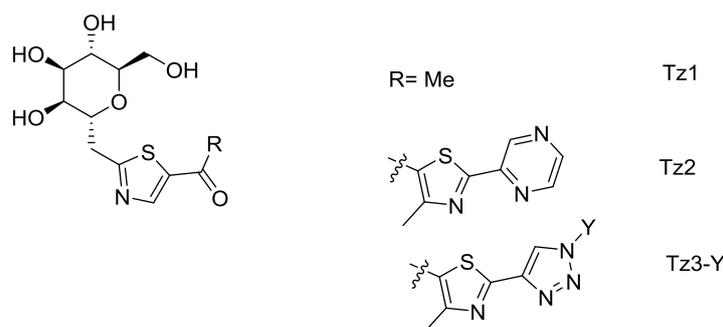


Figure 31 : Indices correspondant aux substituants R les plus utilisés.

L'acronyme de la structure suit donc l'ordre suivant : groupe protecteur des hydroxyles/sucre/liens/hétérocycle. En l'absence de groupement protecteur, aucune notation n'est indiquée. Par exemple, les C-glycosides protégés par des acétyles seront nommés **AcMCTz1** et **AcMCTz2**, alors que les TazMans de première génération sont notés **MNTz1** et **MNTz2** (Figure 32).

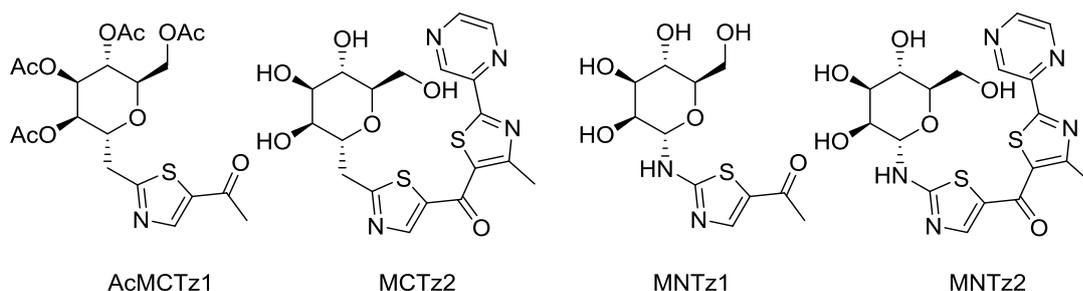


Figure 32 : Exemples d'appellation de différents TazMans.

## (6) Composés cibles

Nous avons dans un premier temps travaillé sur le lien entre le sucre et l'hétérocycle afin d'améliorer la stabilité et l'activité des composés. Les dérivés *O*- et *S*- glycosylés **MOTzX** et **MSTzX** ont été préparés en premier, suivi des *C*-glycosides **MCTzX**

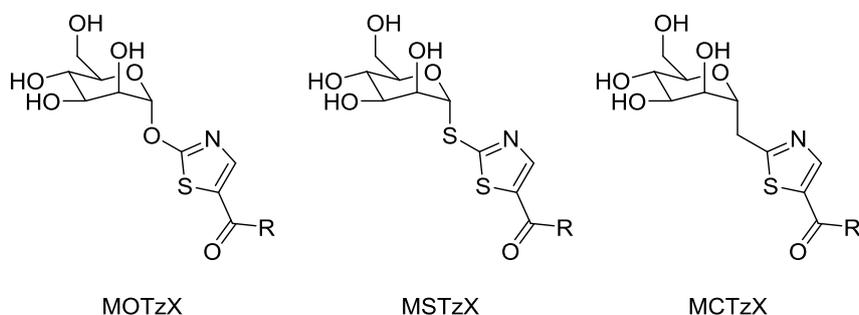


Figure 33 : TazMans avec un espaceur S, O ou CH<sub>2</sub>.

La longueur de l'espaceur a ensuite été modifiée avec la synthèse des composés **MACTzX**, **MCATzX** et **MAC<sub>2</sub>TzX** où **A** représente CH<sub>2</sub>, S, O ou NH.

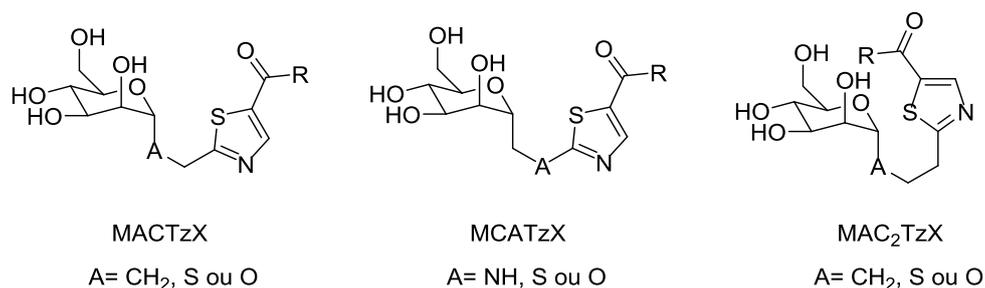
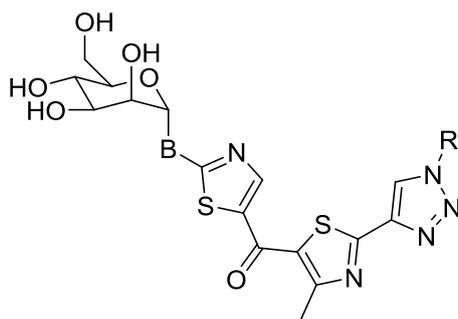


Figure 34 : TazMan avec des espacesurs de 2 ou 3 atomes.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'amélioration des propriétés physico-chimiques des TazMans, en modifiant principalement la partie hétérocyclique de l'aglycone. La majeure partie de ce travail porte sur l'introduction d'un motif triazole sur la structure qui a donné les résultats les plus prometteurs (Figure 35).



MBTz3-R

**Figure 35 : Introduction d'une fonction hydrophile R. B correspond au type de liaison qui fournira les meilleurs résultats lors des évaluations biologiques.**

---

Ces différentes étapes seront traitées dans les chapitres suivants, de même que l'évaluation biologique des différents composés préparés.



## **II. Synthèse des inhibiteurs**

## A. Synthèse des S- et O-glycosides

Afin d'améliorer la stabilité des TazMans, nous avons dans un premier temps envisagé de remplacer l'atome d'azote anomérique qui favorise l'épimérisation, par un atome d'oxygène ou de soufre. L'introduction de ces atomes implique de modifier la voie de synthèse initialement développée.

### 1. Stratégie

La stratégie adoptée consiste à faire réagir un donneur glycosidique avec un accepteur hétérocyclique fonctionnalisé en position 2 par un groupement hydroxyle ou thiol. Les thiazoles seront préparés suivant la méthode développée par notre équipe en partant de la thiourée (Schéma 5).

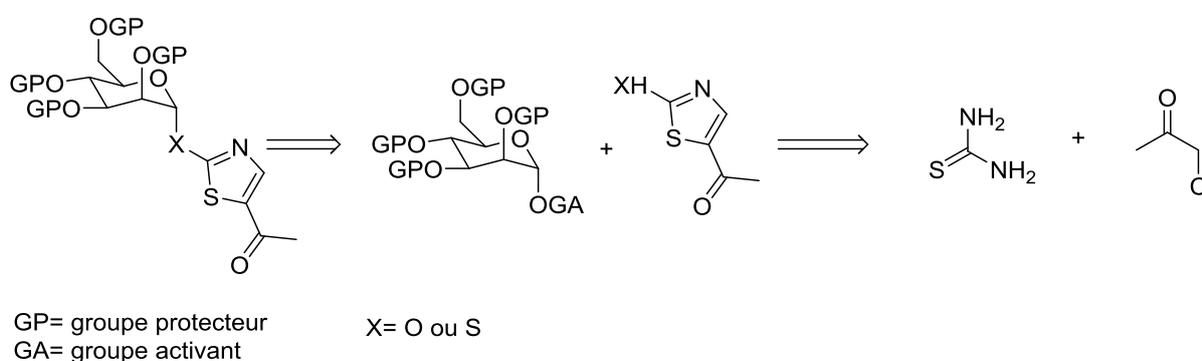


Schéma 5 : Synthèse générale des O et S glycosides.

## 2. Synthèse des hétérocycles

### a) Stratégie

Notre équipe a mis au point la synthèse d'acétylthiazoles, notamment pour préparer des glycoaminothiazoles par condensation de DMF-DMA sur la thiourée, puis cyclisation en présence d'halogéno-cétones.

Cependant, la formation d'un produit secondaire par réaction de Hantzsch est possible si l'un des atomes d'azote n'est pas substitué (Schéma 6).<sup>100</sup> C'est pourquoi il sera nécessaire de protéger cet atome avant la cyclisation.

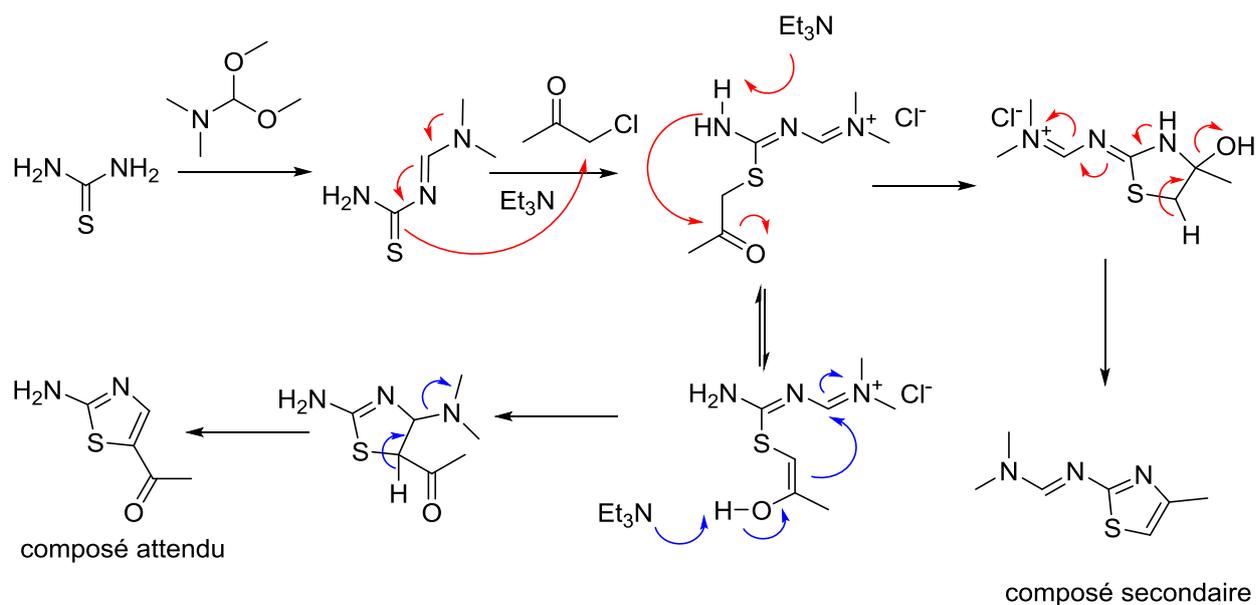


Schéma 6 : Réaction de Hantzsch et formation d'un composé secondaire.

L'étape suivante est la substitution de l'atome d'azote exocyclique par un atome de soufre ou d'oxygène. Pour cela nous prévoyons d'utiliser un sel de diazonium, *via* une réaction de Sandmeyer pour permettre l'introduction d'un groupement hydroxyle ou thiol (Schéma 7). La fonction alcool pourrait également être substituée par un atome de soufre *via* le réactif de Lawesson ou un équivalent.<sup>101</sup>

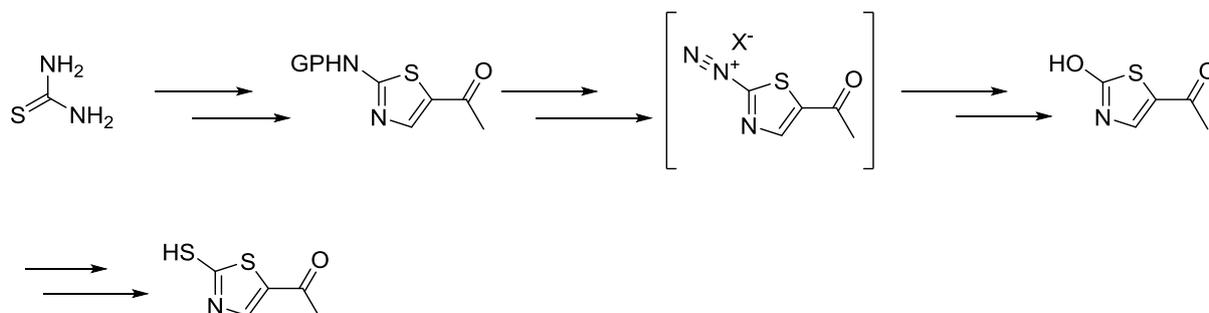


Schéma 7 : Stratégie de préparation des thiazoles.

### b) Synthèse de l'aminothiazole

Comme la thiourée possède deux fonctions  $\text{NH}_2$ , une addition simple ou double sur le DMF-DMA peut avoir lieu, mais est contrôlable selon le solvant employé. Dans un solvant protique, comme le méthanol, même en présence de deux équivalents de DMF-DMA, seul le composé de mono-condensation **1** est obtenu (Schéma 8). En revanche, dans un solvant

aprotique tel que le dichlorométhane, c'est le composé divalent **2** qui est obtenu exclusivement et qui a été engagé dans la réaction de cyclisation.

L'une des imines est utilisée pour former le cycle thiazole et l'autre comme groupement protecteur de l'azote, afin d'empêcher la réaction de Hantzsch compétitrice. En fin de réaction, l'ajout d'une solution aqueuse basique permet de libérer l'amine aromatique **3** par hydrolyse de l'imine. Pour des raisons de facilité de purification, nous avons utilisé une solution de méthylamine qui peut être évaporée avant purification par chromatographie.

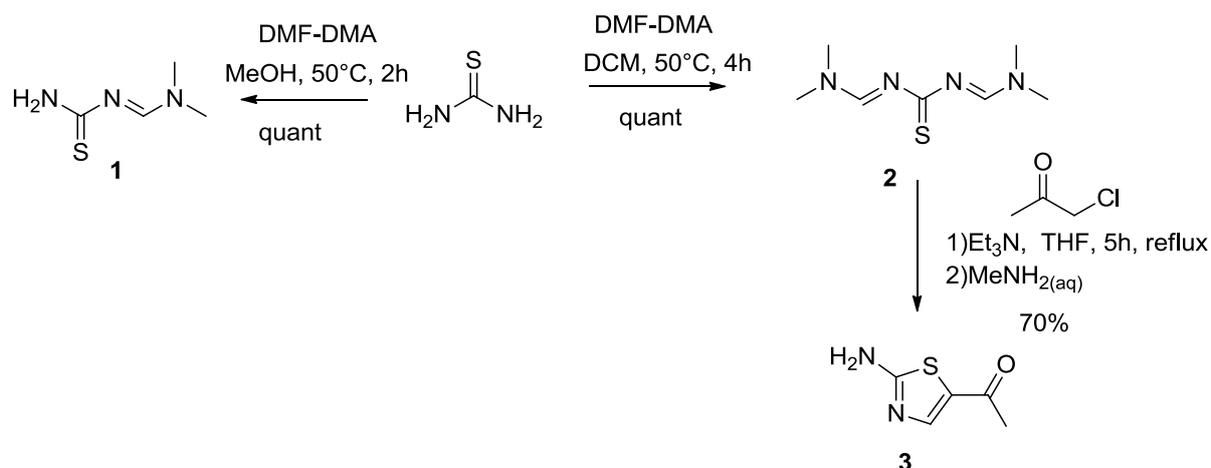


Schéma 8 : Préparation de l'aminothiazole **3**.

### *c) Introduction de l'atome de soufre ou d'oxygène*

La majorité des conditions décrites dans la littérature pour obtenir un 2-hydroxythiazole à partir d'un 2-aminothiazole passent par l'intermédiaire d'un halogène, mettant en jeu une réaction de Sandmeyer. Le caractère électro-déficient du thiazole permet ensuite la substitution nucléophile aromatique de cet halogène.

L'acide choisi pour la formation du sel de diazonium lors de la réaction de Sandmeyer est crucial puisque l'anion peut jouer un rôle de nucléophile et substituer le groupement N<sub>2</sub><sup>+</sup>. Il convient donc de réaliser cette étape dans un halogénure d'acide ou bien dans un acide non nucléophile. La seconde étape est la substitution du sel de diazonium qui est souvent réalisée en présence de cuivre qui sert de catalyseur pour l'insertion du nucléophile.

Dans notre cas, le sel de diazonium a été préparé dans l'acide phosphorique à 30%, en présence de nitrite de sodium, suivant un mode opératoire de Weinstock et coll.<sup>102</sup> La substitution du sel de diazonium est effectuée en présence de sulfate de cuivre et d'un large

excès de chlorure de sodium. Une température inférieure à  $-5^{\circ}\text{C}$  est nécessaire pour éviter la dégradation totale du sel de diazonium. Cette réaction a permis d'obtenir le composé chloré **4** avec à un rendement d'environ 40%, mais s'est révélée difficilement reproductible.

Le remplacement de l'acide phosphorique par de l'acide chlorhydrique (Schéma 9) a augmenté le rendement jusqu'à 60%, puis jusqu'à 90% en maintenant la température en dessous de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

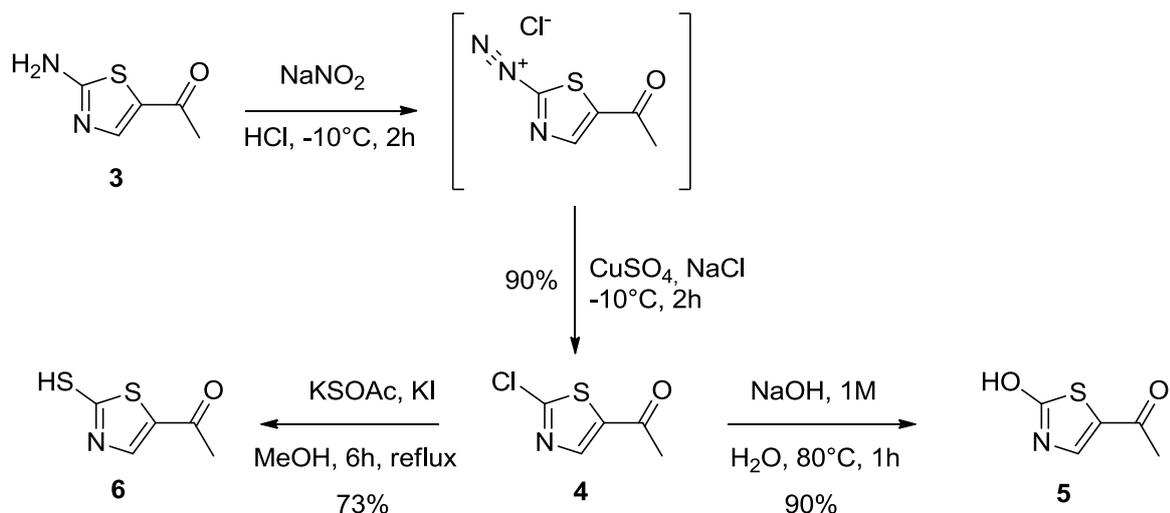


Schéma 9 : Préparation des dérivés soufrés et azotés via réaction de SandMeyer.

Par réaction dans une solution de soude 1M à  $80^{\circ}\text{C}$ , le chlore de **4** est substitué par un hydroxyle pour donner le composé **5** avec un rendement de 90%. De façon similaire, le thiol **6** est obtenu avec un rendement de 73%, en présence de thioacétate de potassium et d'iodure de potassium, dans le méthanol porté à reflux (Schéma 9).

#### *d) Application au fragment thiazolypyrazine-analogues du composé k*

Cette méthodologie a ensuite été appliquée au composé **k** qui a donné les meilleurs résultats lors des tests biologiques. Les deux premières étapes ont été transposables très facilement, ce qui nous a permis d'obtenir le dérivé chloré **8** avec un rendement quantitatif (Schéma 10).

En revanche, l'étape de substitution du chlore n'a pas aboutie. Il est possible que l'introduction du second thiazole ait diminué l'effet électroattracteur du carbonyle, et donc l'électrophilie du carbone portant le chlore, rendant la substitution impossible.

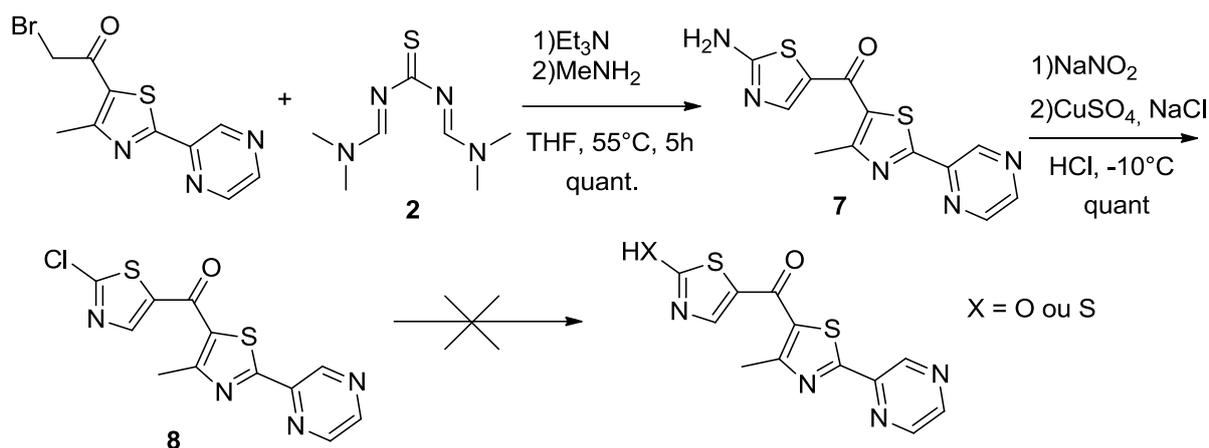


Schéma 10 : Préparation des dérivés thiazolypyrazine.

Malgré cet échec nous avons voulu évaluer la possibilité d'obtenir les *O* et *S*-thiazolymannosides par glycosylation. Nous nous sommes alors focalisés sur la préparation de l'accepteur mannosylé qui réagira avec les donneurs **5** et **6**.

### 3. Synthèse du donneur mannosylé et glycosylation

#### a) Synthèse en série acétylée

##### (1) Groupement participant

De nombreuses méthodes de glycosylation sont décrites dans la littérature. Notre cas est très favorable, puisque nous devons obtenir un  $\alpha$ -mannoside dont la stéréochimie peut être contrôlée par assistance anchimérique. On utilise pour cela des groupements protecteurs participatifs, pouvant stabiliser un carbocation anomérique et ainsi encombrer une face et diriger l'attaque d'un nucléophile sur l'autre face (Schéma 11).

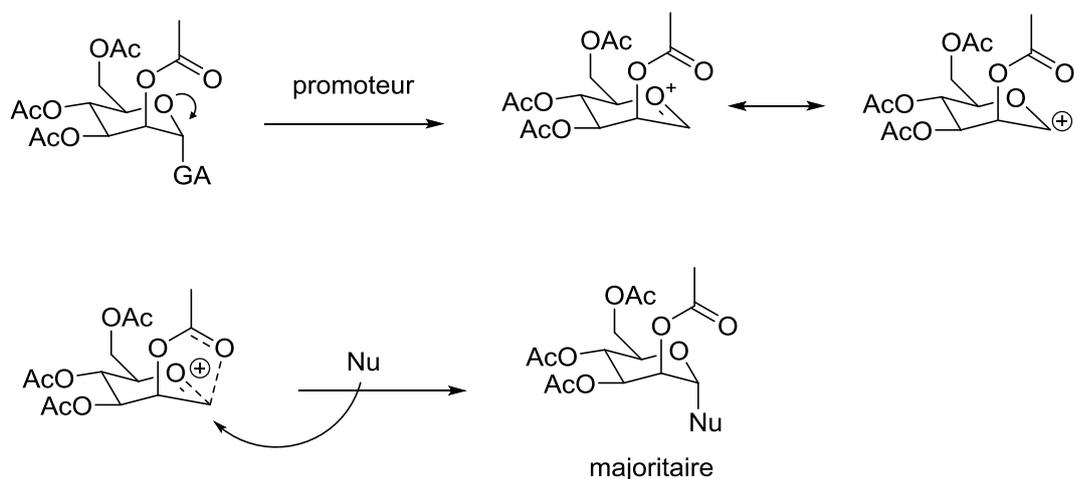


Schéma 11 : Mécanisme de glycosylation *via* une assistance anchimérique d'un groupe acétate protecteur de la position 2.

De nombreux groupements activants ont été développés afin de former un carbocation en position anomérique en présence de promoteurs et permettre ainsi une glycosylation. On peut notamment citer les imidates, développée par l'équipe de Richard Schmidt,<sup>103</sup> ou l'utilisation de thiols.<sup>104</sup>

## (2) Configuration du mannose et constante de couplage

La conformation inhabituelle  ${}^1C_4$  des mannosides est détectable grâce à la constante de couplage proton  ${}^3J_{1-2}$ . Pour les  $\alpha$ -mannosides cette constante est grande car les protons sont tous les deux en position axiale et forment un angle dièdre proche de  $180^\circ$ . En revanche, avec une conformation  ${}^4C_1$  la constante de couplage est beaucoup plus faible car les deux protons forment un angle dièdre d'environ  $60^\circ$ . Pour un  $\beta$ -mannoside, comme les deux conformations possèdent un proton en axial et un proton en équatorial, on observe pour les deux conformations une petite constante de couplage (Figure 36).

Les  $\alpha$ - et les  $\beta$ -mannosides *O*-glycosylés sont généralement différenciables en RMN par le déplacement chimique du proton anomérique qui est plus blindé pour l'anomère  $\beta$ . La constante de couplage  ${}^1J_{C-H}$  du carbone anomérique est elle aussi caractéristique de chaque anomère.<sup>105</sup> Elle est généralement autour de 170 Hz pour les  $\alpha$ -pyranosides et 160 Hz pour les  $\beta$ -pyranosides.

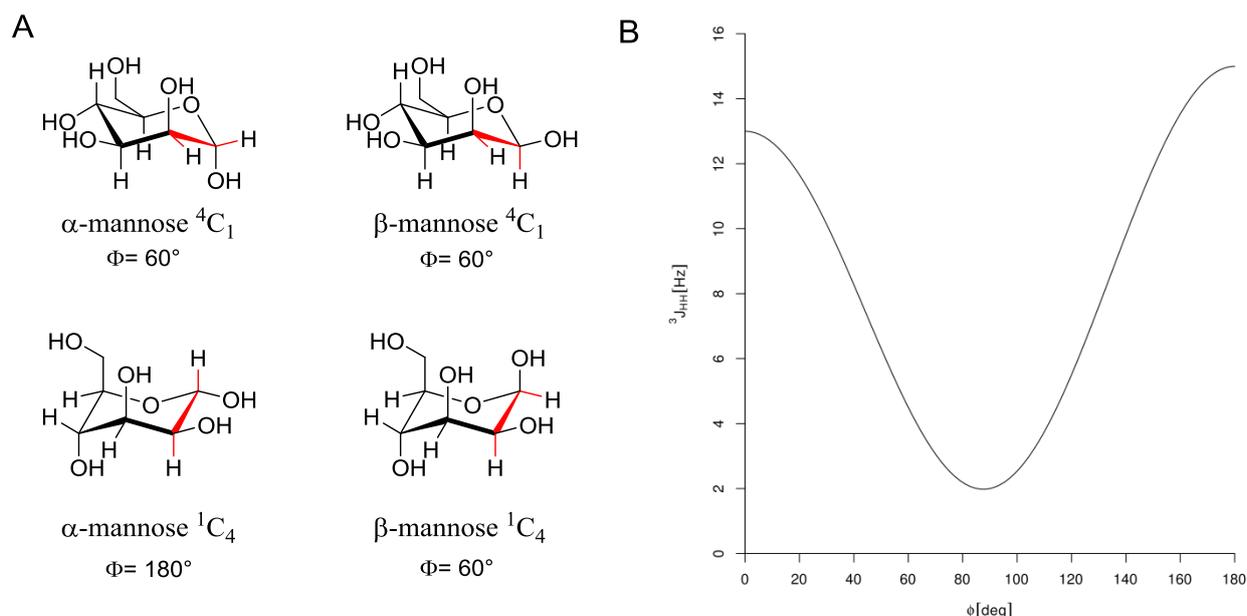


Figure 36 : A) Angle dièdre des différentes formes du mannose B) courbe de Karplus, constante de couplage en fonction de la valeur de l'angle dièdre.

### (3) Glycosylation par la méthode de Schmidt

Pour effectuer l'étape de glycosylation selon la méthode de Schmidt nous avons synthétisé le glycoside accepteur **10** avec un trichloroacétimide comme fonction activatrice et des groupements protecteurs acétates. Le mannose est peracétylé puis la position anomérique est déprotégée en présence de méthylamine. L'hydroxyle anomérique est ensuite condensé sur le trichloroacétonitrile en présence de DBU pour former le trichloroacétimide **10** avec un rendement global de 61%.

Le composé **10** est ensuite engagé dans une réaction de glycosylation, en présence des composés **5** ou **6**, synthétisés précédemment. Le promoteur classiquement employé dans ce type de réaction est le TMSOTf, utilisé en quantité catalytique qui permet la formation de l'oxonium et l'attaque du nucléophile. La réaction avec l'hydroxy-thiazole **5** a conduit à la formation de deux produits, en proportion 60 : 40 (Schéma 12), avec un rendement global de 65%. Deux constantes de couplages  ${}^3J_{1-2}$  de 1,9 et 8,8 Hz ont pu être observées, respectivement pour les composés **11a** et **11b**. La constante la plus élevée traduit un changement de conformation du sucre de la forme classique  ${}^4C_1$  à la forme  ${}^1C_4$ . L'analyse de ces composés par RMN 2D avec la séquence HMBC a permis de distinguer les corrélations C-H en  ${}^2J$  et  ${}^3J$  et d'en déterminer les structures.

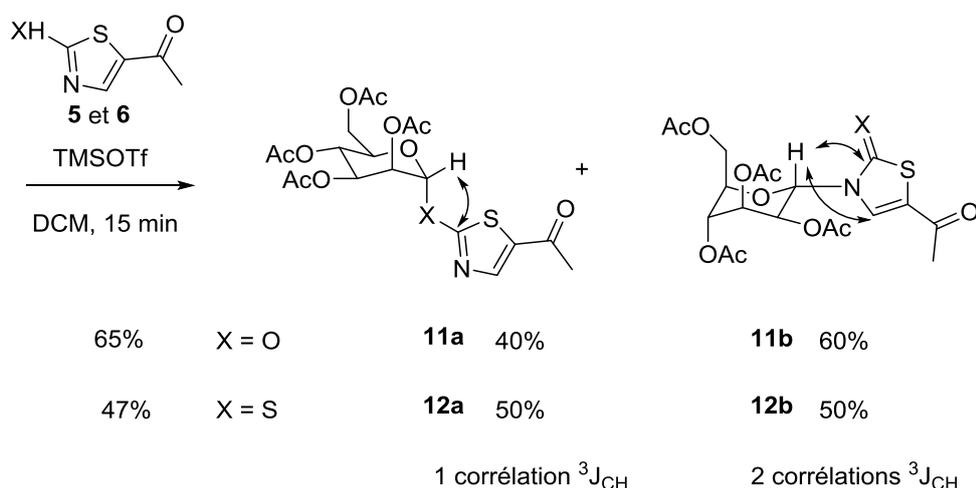
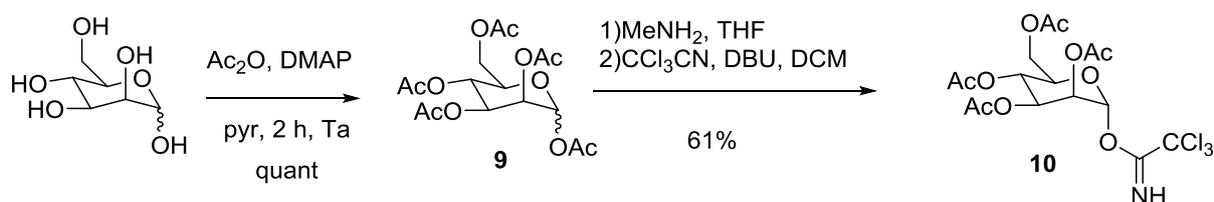


Schéma 12 : Structure des isomères obtenus.

Pour le produit **11a** une tache de corrélation est apparue entre l'atome de carbone en position 2 du thiazole et l'atome d'hydrogène anomérique. Ce composé que nous attendions résulte bien d'une glycosylation avec attaque de l'hydroxyle ou du thiol. En revanche, le second produit **11b** montre deux taches de corrélations avec deux atomes de carbone du thiazole. Pour ce composé le passage en conformation  $^4C_1$  s'explique par la présence d'un groupement encombrant dont la disposition spatiale en position équatoriale est favorisée. Nous avons pu déterminer que ce composé majoritaire, isomère de **11a**, provient d'une attaque de l'azote sur le sucre traduisant un équilibre prototropique du thiazole **5** (formes 2-hydroxythiazole et thiazol-2(3H)-one)

Afin de limiter la formation du composé **11b**, nous avons réalisé la réaction de glycosylation à différentes températures, mais sans succès. La même réaction effectuée avec le thiazole thiol **6** a donné des résultats similaires avec formation du composé N-glycosylé **12b**. Ces échecs nous ont amenés à utiliser des méthodes de glycosylation alternatives.

#### (4) Glycosylation par la méthode de Koenigs-Knorr

Afin de limiter la formation des isomères **11b** et **12b**, nous avons ensuite envisagé la méthode de Koenigs et Knorr décrite en 1901.<sup>106</sup> Elle consiste à utiliser des halogénures de glycosyle en présence de sels d'argent ou de mercure pour activer l'halogène en position anomérique.

Pour une raison de stabilité accrue, nous avons envisagé cette réaction en partant du chloro-mannoside **13** plutôt que de son analogue bromé. Le sucre **13** a été obtenu avec un rendement de 87% (Schéma 13) par réaction du peracétylmannoside avec du chlorure de thionyle et du chlorure d'étain (IV) dans du dichlorométhane anhydre.<sup>107</sup>

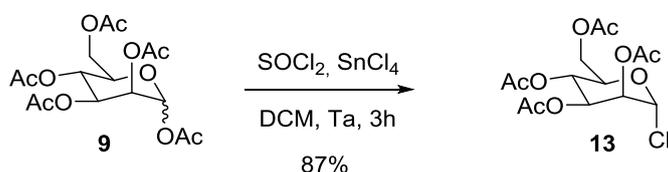


Schéma 13 : Activation du peracétylmannoside sous forme de chlore.

L'étape de glycosylation est ensuite réalisée en présence d'oxyde d'argent et du thiazole donneur **5** ou **6** au reflux du dichloroéthane et à l'abri de la lumière. Après 12h de réaction, seuls les composés désirés **11a** et **12a** sont obtenus avec des rendements respectifs de 65% et 75% (Schéma 14).

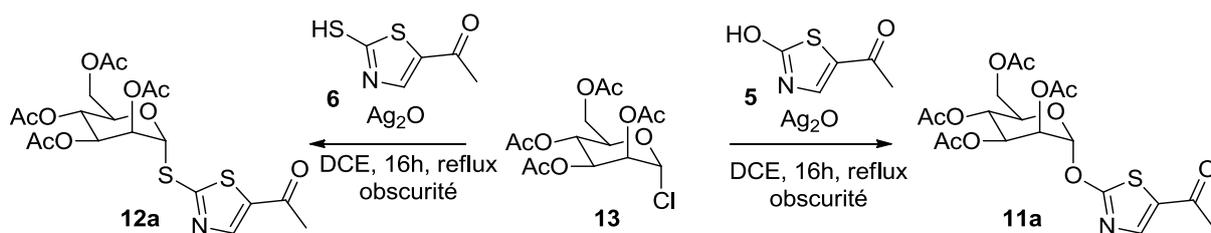


Schéma 14 : Glycosylation par la méthode de Koenigs-Knorr.

#### (5) Déprotection

Afin de déprotéger les groupements acétate, le *O*-mannoside **11a** est dissous dans le méthanol en présence de résine Amberlite® IRN-78, fonctionnalisée par des sels d'ammonium quaternaire avec des hydroxydes comme contre ions. Après filtration de la résine et évaporation du solvant, l'analyse des spectres RMN montre uniquement la structure du mannose, avec perte de la partie aglycone. Ce fragment est probablement resté

adsorbé sur la résine sous forme de contre-ion. Il y aurait eu rupture de la liaison glycosidique et libération de l'hydroxy-thiazole dans le milieu sous forme d'alcoolate. Le pKa de la fonction alcool de cet hétérocycle est vraisemblablement très faible à cause de la délocalisation favorisée du doublet non liant de l'oxygène sur le cycle aromatique. La stabilisation de cette forme déprotonnée par mésomérie expliquerait la rupture de la liaison anomérique.

Cette hypothèse a été confirmée en effectuant la réaction avec 10% de méthanolate de sodium dans le méthanol où l'on observe une libération partielle de l'hétérocycle (Schéma 15). La réaction s'arrête lorsque tout le méthanolate a été piégé par le sucre, générant alors un nucléophile trop faible pour déprotéger les acétates.

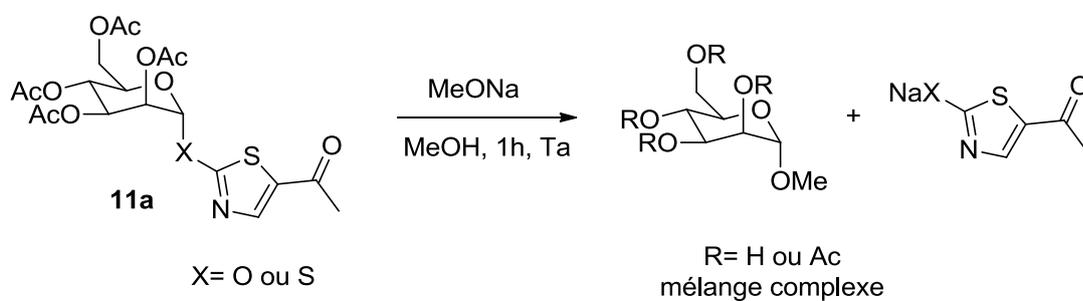


Schéma 15 : Rupture de la liaison glycosidique.

L'utilisation de triéthylamine dans le méthanol ou d'hydrazine pour déprotéger les hydroxyles a conduit comme précédemment à la rupture de la liaison glycosidique avant la déprotection totale du sucre. L'utilisation d'alcoolates d'isopropanol ou de *tertio*-butanol plus encombrés ont conduit à des résultats similaires.

Devant ces échecs nous avons choisi des groupements protecteurs clivables dans des conditions plus douces.

## b) Synthèse en série chloroacétylée

### (1) Synthèse

Les groupements chloro-acétates ont la particularité d'être clivables en présence de thiourée,<sup>108</sup> par substitution du chlore par l'atome de soufre, suivie d'une cyclisation intramoléculaire permettant de déprotéger l'alcool (Schéma 16). Nous avons précédemment observé que l'addition de thiourée sur le composé **11a** n'entraîne pas d'élimination de l'hydroxythiazole, ce qui valide le choix de ce groupement protecteur.

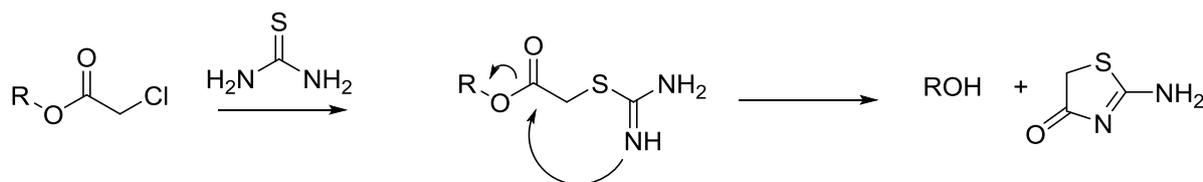


Schéma 16 : Mécanisme d'élimination d'un chloroacétate.

Le perchloroacétylmannose **14** est préparé à partir du mannose en présence d'anhydride chloroacétique dans la pyridine, puis engagé dans la réaction de chloration avec du chlorure d'étain et du chlorure de thionyle (Schéma 17) pour donner le composé **15**. Malheureusement, la réaction suivante de glycosylation, menée à température ambiante ou à reflux n'a pas fonctionné, les groupements chloroacétates désactivant considérablement le sucre.

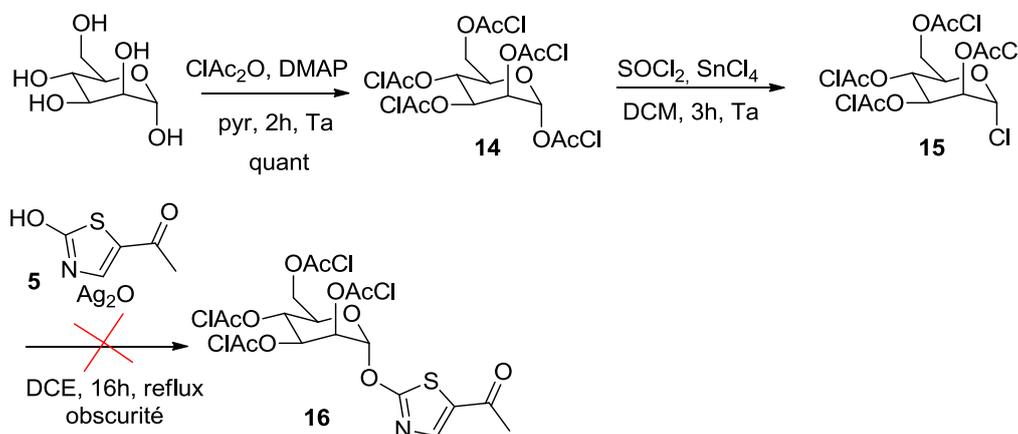


Schéma 17 : Préparation des dérivés chloroacétylés.

## (2) Caractère armé/désarmé des sucres

Ce manque de réactivité est probablement dû au caractère « désarmé » du composé. La réactivité d'un sucre est en effet influencée par les groupements protecteurs qui vont modifier la densité électronique présente sur le cycle.<sup>109</sup>

La présence de groupements protecteurs à caractère donneur, tels que des éthers de benzyles ou de méthyles, vont enrichir le cycle en électrons et stabiliser un éventuel carbocation, on parle alors de sucre armé. En revanche, les groupements attracteurs de types ester ou amide vont appauvrir la position anomérique, réduisant la vitesse de formation de l'oxonium et donc la vitesse de la réaction (sucre désarmé).

Les groupements chloroacétyles ont probablement « désarmé » le mannose de façon trop importante. Nous avons alors envisagé un autre groupement protecteur moins électroattracteur comme le benzyle.

### c) Synthèse en série benzyle

#### (1) Préparation

La position anomérique du mannose a tout d'abord été protégée par un groupement allyle, selon une glycosylation de Fisher catalysée par le trifluorure de bore dans l'alcool allylique. Un mélange des deux anomères est obtenu quantitativement et est utilisé sans purification après neutralisation par la triéthylamine. Le mannoside **17** est ensuite perbenzylé dans des conditions classiques, après déprotonation des hydroxyles par l'hydrure de sodium et ajout de bromure de benzyle, pour conduire au composé **18** avec un rendement de 80%. La position anomérique est alors déprotégée par action de chlorure de palladium dans le méthanol pour donner l'intermédiaire attendu **19** (Schéma 18).

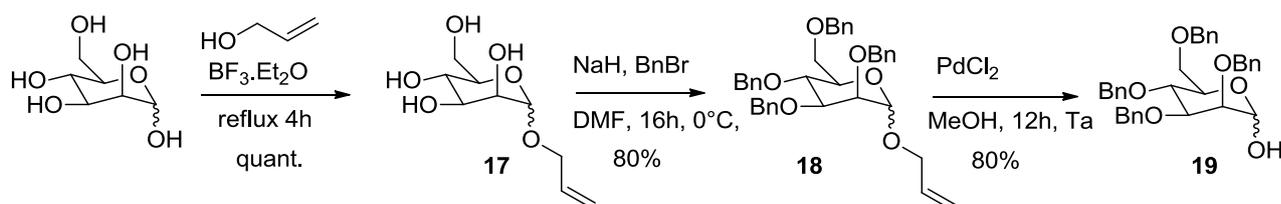


Schéma 18 : Préparation du synthon benzylé.

La fonction alcool de **19** est soit substituée par un atome de chlore en présence de chlorure d'oxalyle et d'une quantité catalytique de DMF, soit convertie en trichloroacétimide, en présence de DBU et de trichloroacétonitrile. Ces composés **20** et **21** se sont avérés beaucoup moins stables que leurs homologues acétylés et doivent être utilisés rapidement après leur synthèse (Schéma 19).

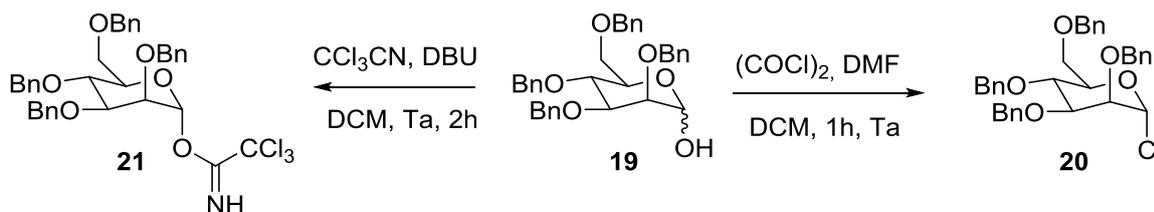


Schéma 19 : Activation de la position anomérique.

La glycosylation à partir du trichloroacétimidate **21** a conduit malheureusement au *N*-glycoside **22** avec les deux conformations  $^4C_1$ , **22a** et  $^1C_4$ , **22b** dans une proportion 1 :1. Ces deux composés ont pu être séparés par chromatographie, et là encore la structure du *N*-glycoside a pu être confirmée par une analyse RMN HMBC qui montre clairement des corrélations en  $^3J$  entre le proton anomérique et les carbones hétéroaromatiques (Schéma 20). Nous avons pu confirmer par la suite l'absence des signaux caractéristiques du produit *O*-glycosylé recherché.

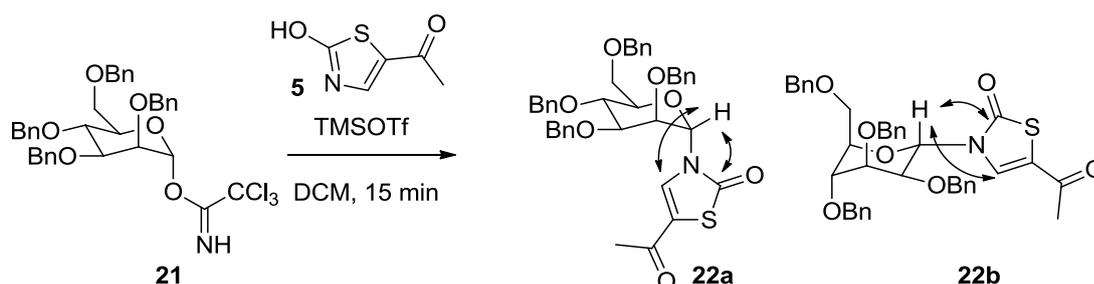


Schéma 20 : Glycosylation à partir du trichloroacétimidate benzylé, les flèches représentent les corrélations observées par RMN avec la séquence HMBC.

A notre satisfaction, à partir de l'accepteur chloré **20** selon le protocole de Koennigs-Knorr, le composé attendu **23** est obtenu sous la forme d'un seul anomère en seulement 1h de réaction à température ambiante et avec un rendement de 79% (Schéma 21). Cette réactivité illustre le caractère armé du donneur benzylé, car 12h de réaction à 80°C étaient nécessaires pour le donneur acétylé. L'absence du *N*-glycoside avec ce protocole montre bien la difficulté de prévoir les produits de la réaction de glycosylation en fonction de l'accepteur utilisé. De plus, seul l'anomère  $\alpha$  est formé bien qu'il n'y ai pas de groupement participant sur la position 2. Par contre, ce composé s'est révélé très sensible et sa purification doit être effectuée sur silice pré-neutralisée par de la triéthylamine.

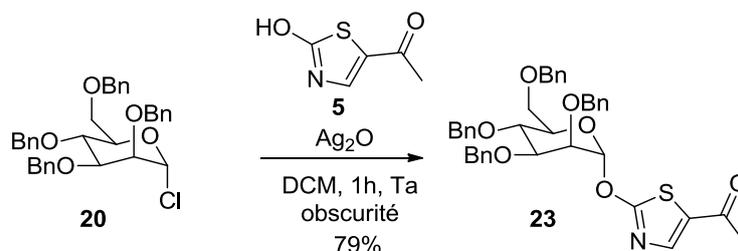


Schéma 21 : Glycosylation à partir du dérivé chloré.

## (2) Déprotection des benzyles

Le composé **23** est alors engagé dans une réaction d'hydrogénolyse dans le méthanol en présence de palladium sur charbon et sous 1 bar d'hydrogène. Un suivi CCM a rapidement permis de constater une nouvelle fois l'apparition du thiazole libre **5** dans le milieu réactionnel. En revanche, le composé attendu n'a pas pu être isolé quels que soient les protocoles d'hydrogénolyse utilisés.

Il est envisageable que lors de l'hydrogénolyse le palladium soit empoisonné en se coordonnant à l'atome de soufre. Il pourrait également agir comme acide de Lewis en facilitant la rupture de la liaison anomérique. Les autres méthodes de déprotection des benzyles impliquent l'utilisation d'acide de Lewis et sont incompatibles avec nos composés sensibles aux milieux acides, ce qui nous a conduits une nouvelle fois à changer de groupements protecteurs.

### *d) Synthèse en série silylée*

Les derniers essais de glycosylation ont été effectués en protégeant les hydroxyles avec des groupements silylés qui peuvent être éliminés par des ions fluorures. La glycosylation passe par un dérivé iodé non isolé<sup>110</sup> qui permet l'obtention de l'anomère  $\alpha$  uniquement. Pour cela, le composé persilylé **24** est obtenu par silylation dans la pyridine en présence de HMDS et de chlorure de triméthylsilane avec un rendement quantitatif. L'iode est ensuite introduit en position anomérique par addition de TMSI fraîchement distillé (Schéma 22). Le sous-produit formé dans cette réaction est le triméthylsilanol qui peut être éliminé par co-évaporation avec du benzène fraîchement distillé, à 0°C et sous vide poussé. Cet intermédiaire est alors engagé dans l'étape de glycosylation dans le DCM, en présence de sels d'argent et de **5**.

Les études par RMN du brut réactionnel dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ont montré une conversion totale, cependant le produit formé **25** est très sensible et n'a pu être isolé qu'avec un faible rendement de 25% après une purification rapide sur silice neutralisée par de la triéthylamine.

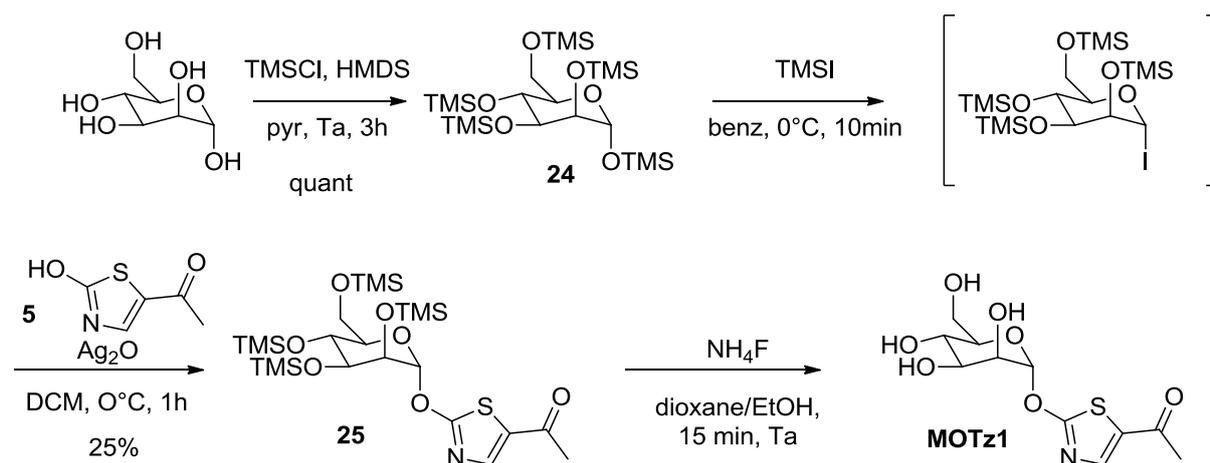


Schéma 22 : Glycosylation du composé protégé par des TMS.

L'étape de déprotection des hydroxyles du sucre est réalisée avec des ions fluorures. L'utilisation de méthanol ou de TBAF est à proscrire car elle conduit à l'élimination de l'hétérocycle dès l'addition du fluorure. Le fluorure d'ammonium seul dans le dioxane n'a pas permis de déprotéger les TMS, c'est en rajoutant de l'éthanol dans la solution que nous avons pu former le composé déprotégé **MOTz1**, sans pouvoir l'isoler.

Les analyses RMN dans l'eau lourde (Figure 37) ont mis en évidence la dégradation rapide du produit par hydrolyse de l'aglycone anomérique. Deux types de thiazoles sont visibles sur le spectre RMN, l'un d'eux correspond au produit attendu et l'autre à l'hétérocycle libre **5**.

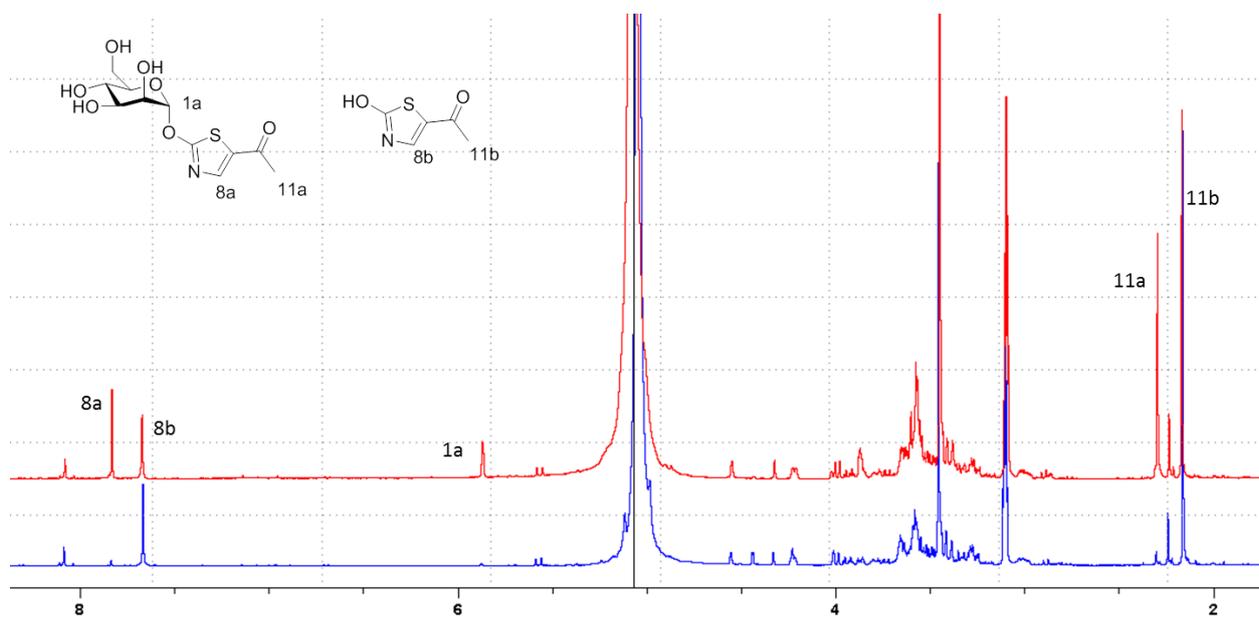


Figure 37 : Spectre RMN du composé désilylé dans l'eau après 5 minutes (rouge), après 1h (bleu).

## 4. Conclusion

La préparation des dérivés TazMan *S* et *O* glycosides a été entreprise, *via* l'utilisation de groupements protecteurs de type acétyle, benzyle et silyle. Dans chaque cas, l'étape de glycosylation a été effectuée sans difficulté majeure et a permis d'obtenir les composés désirés sous forme protégée.

Par contre les déprotections ont toujours conduit à la libération du fragment hétérocyclique par hydrolyse de la fonction anomérique. Bien que le *O*-glycoside ait été observé par RMN du proton, il n'est pas stable en milieu aqueux. C'est pourquoi nous n'avons pas poussé plus loin les essais avec les analogues *S*-glycosidiques qui présentaient la même instabilité lors de la déprotection du composé **12a**

L'instabilité des *O*, *S*-mannosides déprotégés nous a obligé à reconsidérer la stratégie et à synthétiser des TazMan *C*-glycosylé qui seront stables aux conditions physiologiques et à l'hydrolyse enzymatique.

## B. Synthèse des *C*-glycosides

Les *C*-glycosides sont principalement utilisés en chimie thérapeutique pour leur stabilité chimique et enzymatique qui leur confère une durée de vie plus importante dans l'organisme. Ces composés possèdent généralement un caractère apolaire plus marqué ainsi qu'une flexibilité plus importante due à la perte de l'effet anomère. Selon l'aglycone la forme  $^1C_4$  est parfois prédominante.<sup>111,112</sup>

### 1. Stratégie générale

Afin de construire le thiazole nous avons besoin d'avoir une fonction thioamide (Schéma 23) qui permettra de réaliser l'addition du DMF-DMA, suivie de l'addition/cyclisation d'une halogénocétone. Ce thioamide pourra être formé par modification d'un acide carboxylique ou bien par condensation de sulfure d'hydrogène sur un nitrile. L'introduction d'un nitrile pourra être effectuée par substitution d'un alcool activé. L'acide carboxylique et l'alcool activé dérivant tous les deux d'un groupement allylique.

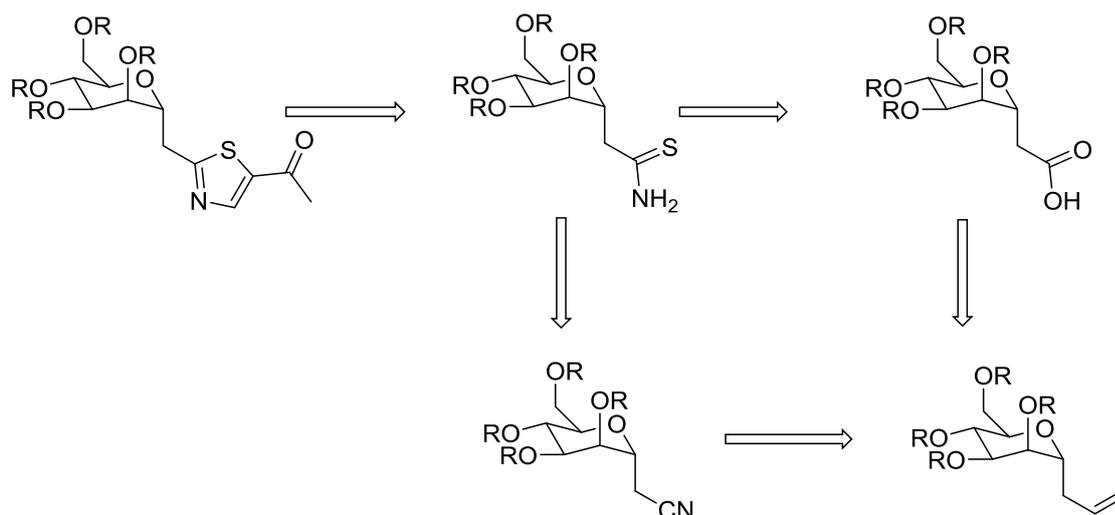


Schéma 23 : Stratégie de synthèse générale.

En effet, pour la préparation de C-glycosides nous avons envisagé de fonctionnaliser un mannose en position anomérique par un groupement allylique car l'alcène terminal est facilement modulable. Il peut par exemple subir une hydroboration pour conduire à un dérivé hydroxypropyle,<sup>113</sup> une coupure oxydante pour accéder aux dérivés à deux carbones ou donner des dérivés de type méthylène après isomérisation de la double liaison, suivie d'une coupure oxydante.<sup>114</sup>

Toutes ces méthodes pourront être utilisées par la suite afin de former des composés homologués possédant des espaceurs plus longs, à partir du même intermédiaire allylique.

## 2. Préparation d'un allyle glycoside

### a) Stratégie radicalaire

Afin d'accéder aux C-glycosides, nous avons utilisé une méthode de C-allylation radicalaire du mannose décrite par Czechura *et coll.*<sup>115</sup> qui permet une sélectivité  $\alpha$  totale à partir du bromomannose peracétylé **26**. Ce composé est facilement obtenu à partir du peracétylmannose (Schéma 24) par l'action d'acide bromhydrique dans l'acide acétique. La réaction radicalaire est effectuée par irradiation lumineuse en présence de bistributylétain dans le benzène et d'allylphénylsulfone pour donner le composé attendu **27** avec des rendements compris entre 30 et 50%.

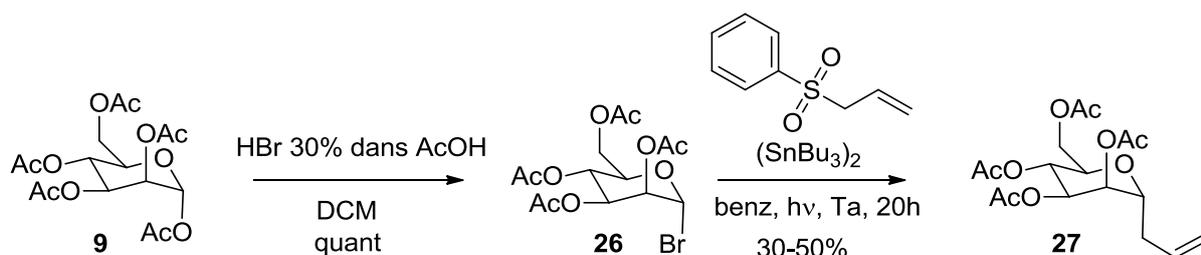


Schéma 24 :Préparation de l'allyle mannoside 27 en série acétylée.

Cette réaction avait été décrite avec des rendements supérieurs à 90%, cependant nous n'avons jamais approché ces valeurs lors de nos essais malgré l'utilisation de benzène fraîchement distillé et le séchage précautionneux des réactifs.

### b) Stratégie par glycosylation

L'introduction de l'allyle en position anomérique peut être réalisée avec le mannose tetrabenzylé dont la position anomérique est méthylée ou acétylée. Dans les deux cas, la réaction est effectuée en présence de TMSOTf, par addition de l'allyltriméthylsilane. Cependant, dans le cas du composé méthylé, la réaction n'est pas totalement sélective et conduit à une fraction variable d'anomère  $\beta$ <sup>113,116,117</sup> difficile à éliminer.

C'est pourquoi nous avons préparé le composé acétylé en position anomérique à partir du composé **19** obtenu précédemment. L'acétylation est effectuée de manière classique puis le produit **28** est placé dans l'acétonitrile en présence d'allylsilane. Le promoteur est alors ajouté goutte à goutte à 0°C. Le mélange est placé sous ultrason<sup>118</sup> en maintenant la température à 0°C, pour conduire au dérivé allylique **29** en 30 min avec un rendement de 82% (Schéma 25).

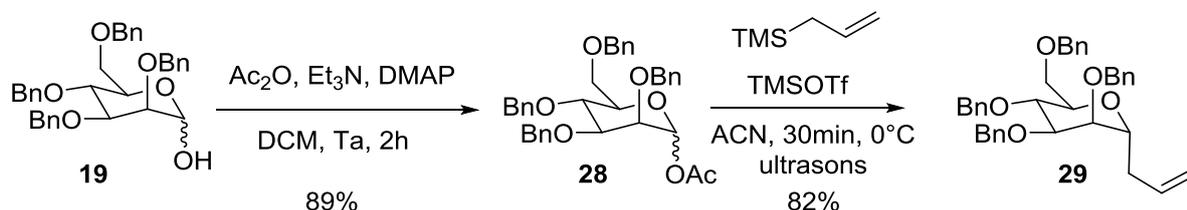


Schéma 25 : Préparation de l'allyle mannoside 29 en série benzylée.

La préparation du composé **29** se fait donc de manière efficace en 5 étapes à partir du mannose et avec un rendement global de 50% qui est équivalent à celui obtenu par la voie radicalaire. Par contre, cette méthode est plus simple à mettre en œuvre, plus reproductible

et le produit **29** est plus simple à purifier que le **27** en raison de l'absence des sels d'étain dans le milieu réactionnel.

### 3. Préparation d'un thioamide

Nous avons par la suite centré nos efforts sur le greffage d'une fonction thioamide comme synthon clef pour la formation du cycle thiazole. Plusieurs voies de synthèse ont dû être tentées avant d'obtenir des rendements satisfaisants.

#### a) Première méthode via un nitrile

##### (1) Synthèse en série acétylée

Le groupement thioamide peut être obtenu à partir d'une fonction nitrile (Schéma 26) après condensation d'H<sub>2</sub>S. Ce nitrile sera obtenu par substitution d'un alcool activé, lui-même généré par isomérisation du groupement allyle, suivit d'une coupure oxydante.

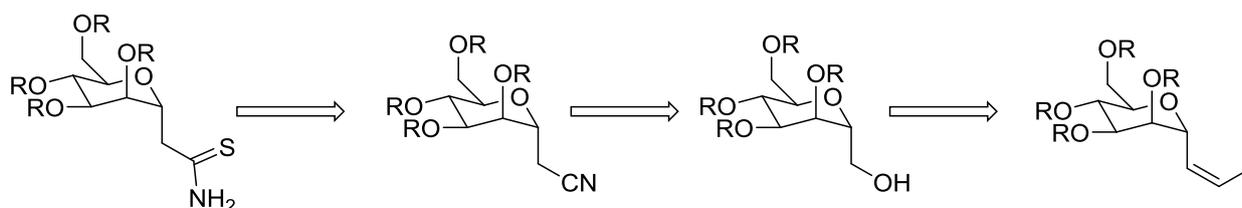


Schéma 26 : Stratégie de préparation du thioamide.

L'isomérisation de l'allyle peut être réalisée en présence de palladium (II) et passe par un mécanisme équilibré (Schéma 27) qui conduit à un mélange de 10% de produit de départ et de 90% du produit attendu **30**.<sup>119,120</sup>

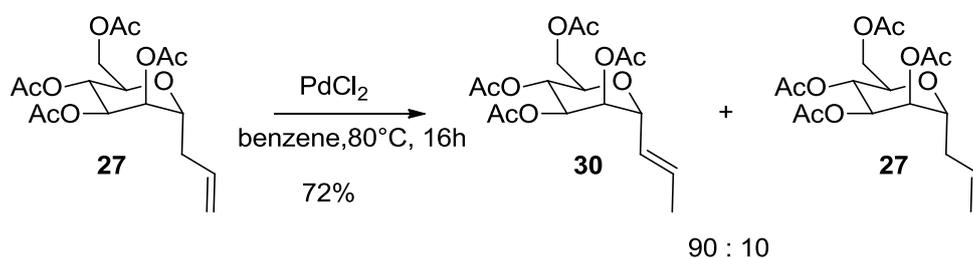


Schéma 27 : Isomérisation de l'allyle.

Ensuite, la coupure oxydante de la double liaison est réalisée par ozonolyse. L'ajout de méthanol permet de limiter la formation de l'ozonide, en obtenant un intermédiaire de type peroxyde d'hémiacétal **D** (Schéma 28) plus stable et qui mène généralement à de meilleurs

rendements.<sup>121</sup> Un traitement réducteur *in situ* par du borohydrure de sodium aboutit en principe à l'alcool correspondant.

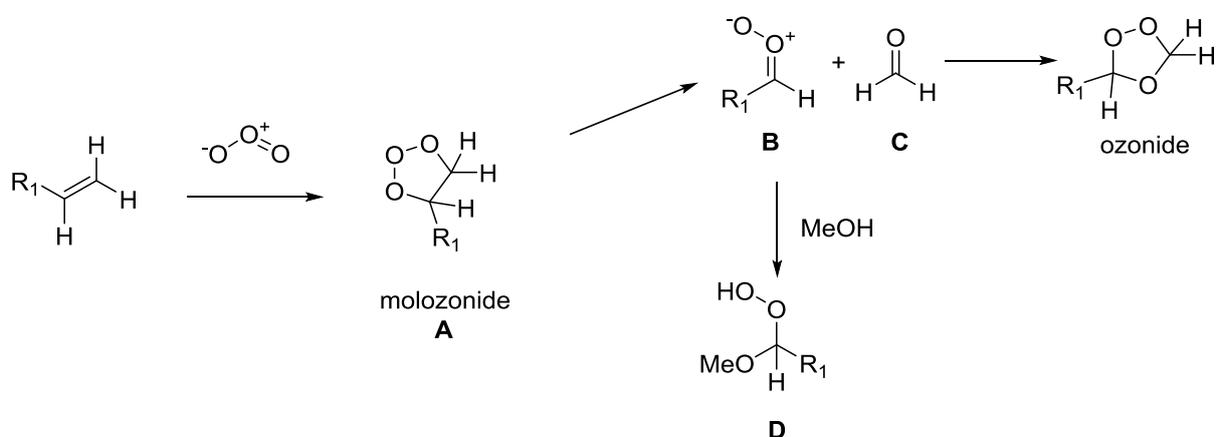


Schéma 28 : Mécanismes de l'ozonolyse.

Après avoir effectué cette réaction, l'analyse RMN montre un signal aldéhydique ainsi que des protons éthylénique et le spectre de masse la perte d'un acétyle. Nous supposons que l'ajout du réducteur a entraîné la formation de l'hémiacétal F (Schéma 29) qui peut effectuer une trans-estérification intramoléculaire avec l'acétate en position 2 pour donner l'intermédiaire G, en formant un état de transition à 6 atomes. L'ajout d'HCl permettrait alors après hydrolyse de former le composé H puis une réaction de crotonisation conduirait à l'accepteur de Michael I isolé en fin de réaction.

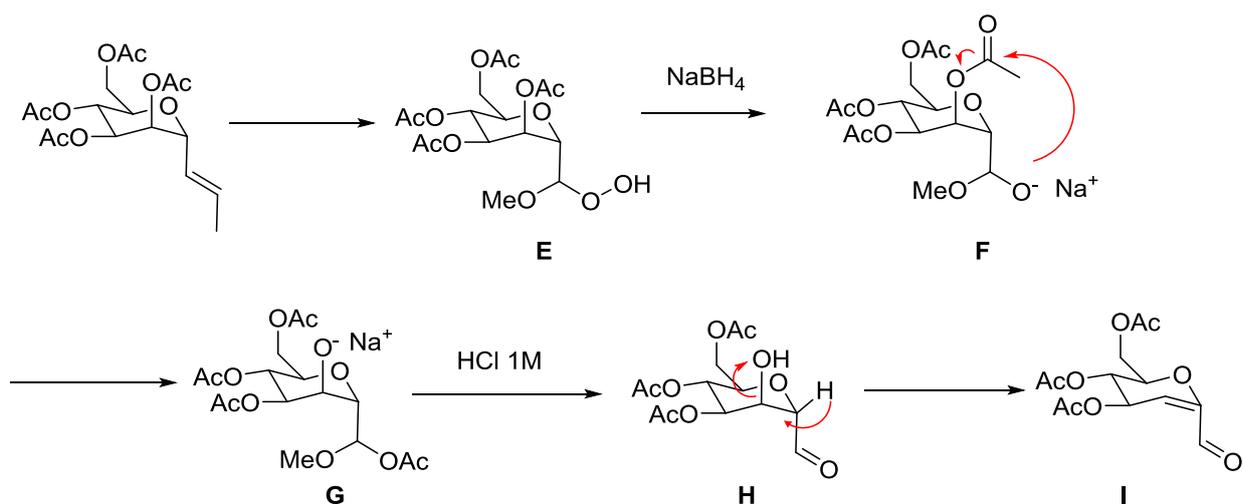


Schéma 29 : Formation du produit secondaire.



Schéma 31 : Mécanisme supposé de l'obtention de l'ester éthylique 37.

Par contre, nous avons bien obtenu le thioamide **38** avec un rendement de 80% par réaction du nitrile dans l'acide thioacétique (Schéma 32).

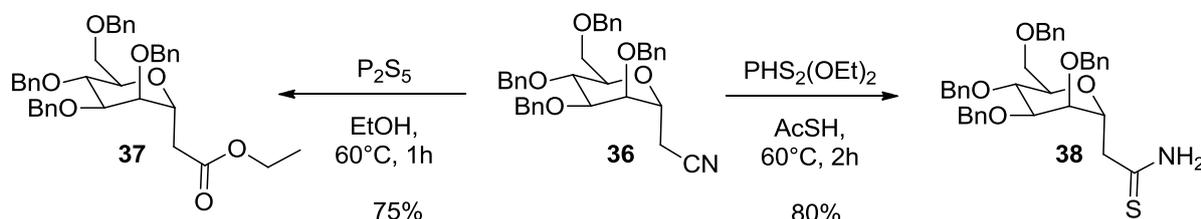


Schéma 32 : Préparation du thioamide **38** avec l'ortho-dithiophosphate d'éthyle.

### b) Seconde méthode via un amide

Une stratégie alternative, *via* un amide, a été essayée pour la synthèse du composé **38**. L'amide est obtenu à partir de l'acide carboxylique correspondant qui peut lui-même provenir de la coupure oxydante de l'allyle **29**. On évite ainsi l'étape d'isomérisation qui rend les purifications difficiles.

A partir du composé **29**, la coupure oxydante peut être réalisée par ozonolyse, par addition de peroxyde d'hydrogène pour conduire à l'acide **39**. Cependant cette réaction donne des rendements inférieurs à 40%. L'utilisation de  $\text{KMnO}_4$  n'est pas adaptée, puisque les positions benzyliques sont susceptibles d'être oxydées. Les réactions catalysées par l'osmium<sup>123</sup> avec du periodate de sodium ont fourni de faibles rendements, avec des produits complexes à purifier.

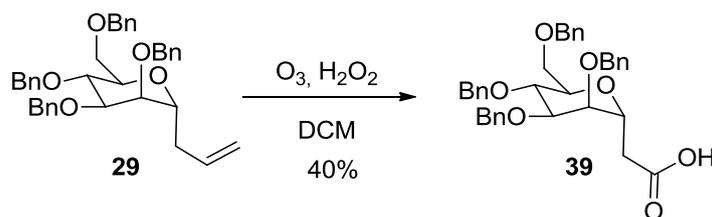


Schéma 33 : Formation de l'acide **39**.

La meilleure solution a été l'obtention, par ozonolyse en présence de méthanolate de sodium,<sup>124,125</sup> d'un ester méthylique **40** (Schéma 35) plus simple à purifier. Cette réaction va tout d'abord conduire aux intermédiaires **A** et **C**. Le méthanolate permet la formation d'un hémiacétal méthylique **B** (Schéma 34) à partir du fragment aldéhydique **A**. Après sur-oxydation de **B**, on obtiendrait l'enchaînement **C** qui possède un hydrogène acide qui serait

arraché par l'alcoolate pour donner l'ester méthylique avec élimination d'un ion hydroxyde. Cette réaction ne produit normalement pas d'espèces de type peroxydes et ne nécessite pas de traitement réducteur, cependant un équivalent de diméthylsulfide a été ajouté comme réducteur en fin de réaction par mesure de précaution.

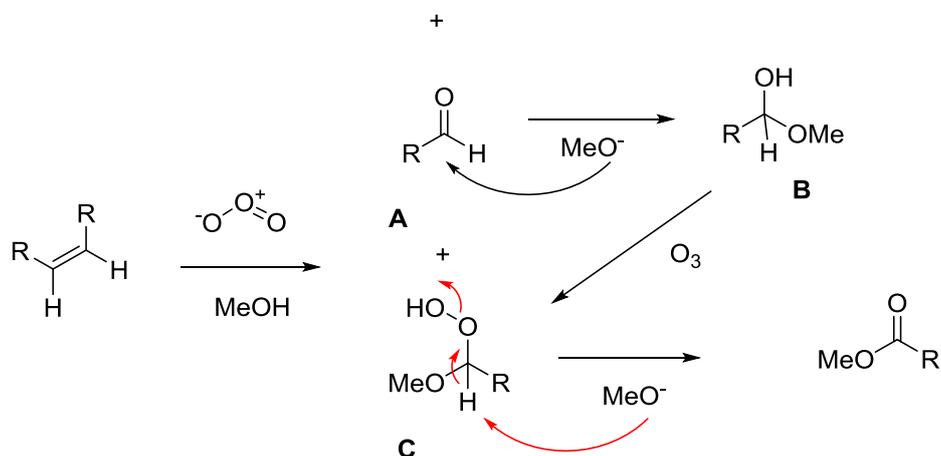


Schéma 34 : Mécanisme d'ozonolyse en présence de méthanolate de sodium.

L'ester est saponifié par chauffage dans le THF en présence d'hydroxyde de lithium. L'acide résultant est activé sous forme de chlorure d'acide, avant d'être condensé sur une solution d'ammoniaque, pour donner l'amide **41** correspondant avec un rendement de 79%.

Cet amide est facilement transformé en thioamide au moyen de  $P_2S_5$  pour donner le composé **38** (Schéma 35). Il est cependant plus facile de déprotéger les benzyles par hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon avant l'introduction de l'atome de soufre qui empoisonne le palladium par la suite. Le sucre libre est immédiatement reprotégé par des acétates de manière quantitative pour donner le dérivé **42**. L'amide peut alors être converti en thioamide **43** par réaction avec  $P_2S_5$  dans le THF

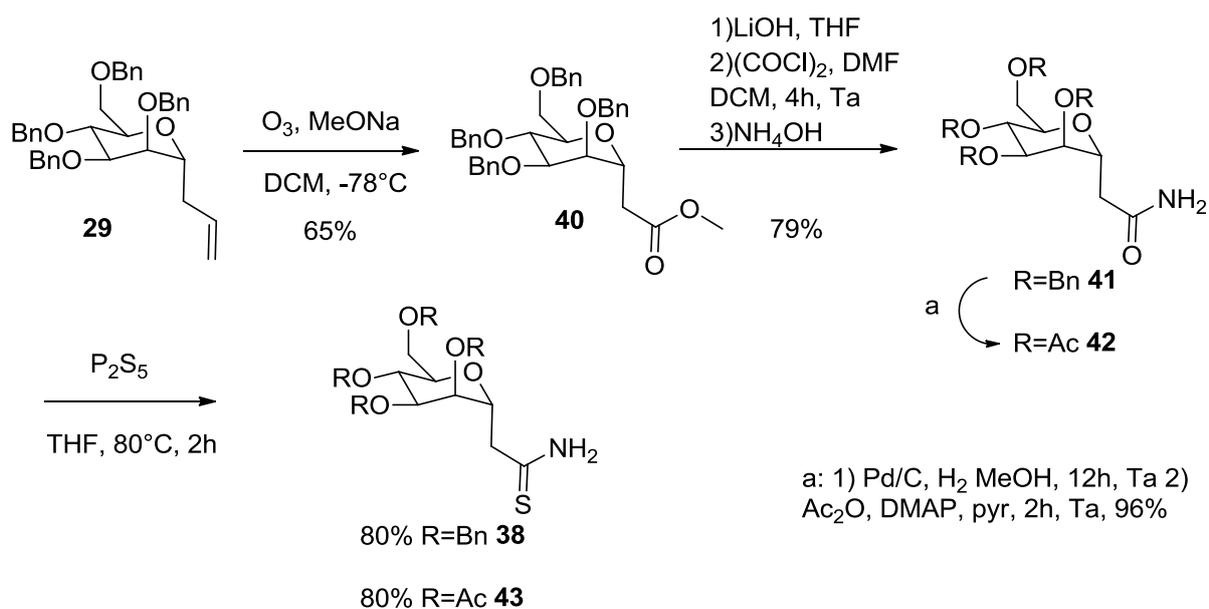


Schéma 35 : Synthèse du thioamide en passant par une fonction amide.

Il est à noter que le composé **43** a aussi été obtenu en oxydant l'allylmannoside **27** par du permanganate de potassium afin d'obtenir directement l'acide **44** (Schéma 36) qui est activé sous forme de chlorure d'acide et converti en amide **42** par bullage d'ammoniac dans le toluène anhydre. Cette méthode permet une synthèse en moins d'étapes, mais l'obtention de **27** limite son utilisation à grande échelle.

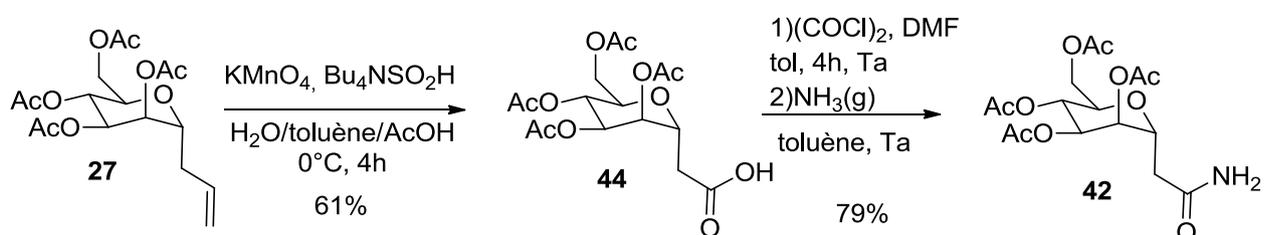


Schéma 36 : Synthèse de l'amide primaire **43** à partir de l'allylmannoside **27**.

#### 4. Cyclisation et déprotection

A partir du thioamide **43**, la réaction d'hétérocyclisation en deux étapes est réalisée pour introduire le noyau thiazole. L'addition du DMF-DMA donne l'hétérodiène **45** qui n'est pas isolé, puis l'ajout de chloroacétone en présence de triéthylamine permet la formation du composé **46** (Schéma 37). L'intermédiaire **45** se dégradant lors de la purification nous avons préféré une réaction monotope. Néanmoins, le rendement global de cette étape reste modeste (39%) même après ajout d'iodure de potassium en quantité catalytique. Les hydroxyles de **46** sont ensuite déprotégés en présence de méthanolate de sodium pour

conduire au premier sucre libre cible **MCTz1**, avec un rendement de 45% après purification.

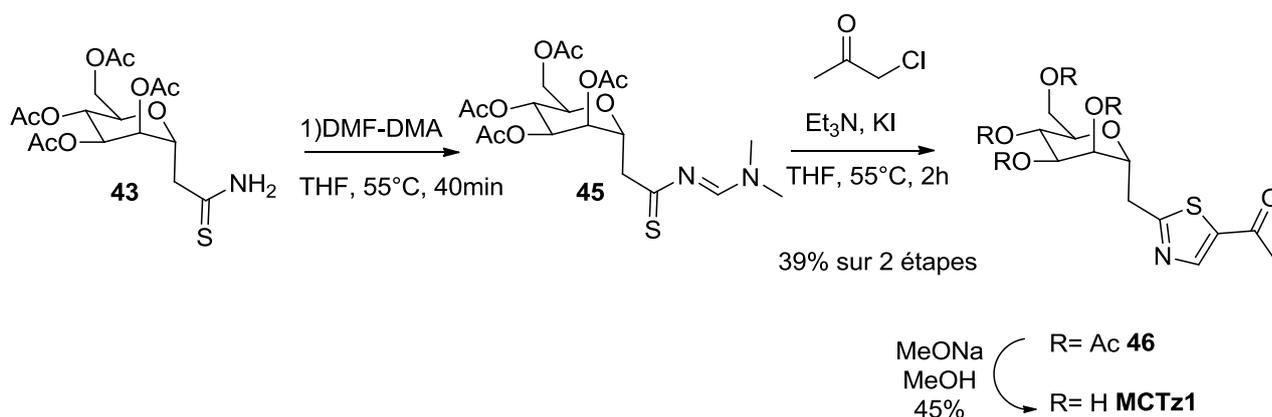


Schéma 37 : Formation du composé **MCTz1**.

La même séquence de condensation/cyclisation/déprotection est réalisée à partir d'une acétylthiazolypyrazine  $\alpha$ -bromée (Schéma 38) pour former le composé **47** avec 50% de rendement global. Lors de cette synthèse la déprotection est faite dans le méthanol en présence de méthanolate de sodium. Après concentration et solubilisation dans le DMSO, le produit précipite par ajout d'eau. Une centrifugation du milieu permet alors d'obtenir le C-glycoside **MCTz2** pur avec un rendement de 90%.

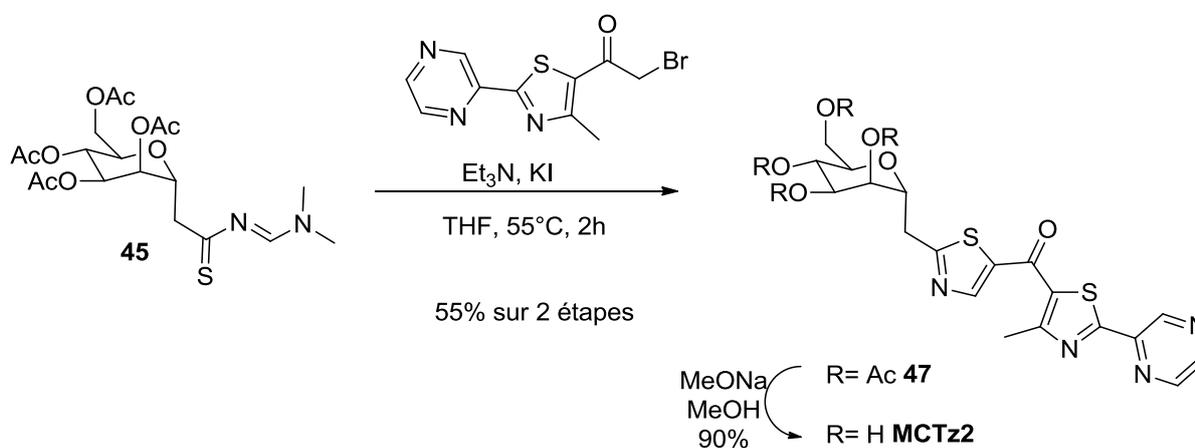


Schéma 38 : Formation du composé **MCTz2**.

## 5. Conclusion

Plusieurs voies de synthèse ont été développées pour accéder à la famille des C-glycosides **MCTzX**. La plus efficace a permis d'obtenir le composé **MCTz2** avec un rendement global de 3,6% en 13 étapes. L'objectif a été atteint car les deux composés finaux **MCTz1** et **MCTz2** présentent un seul anomère  $\alpha$  et sont stables en milieu acide contrairement aux analogues

N, O et S. Nous nous sommes ensuite attachés à préparer d'autres analogues dont le lien entre le sucre et l'hétérocycle a été homologué.

### C. Préparation des analogues homologués

Nous souhaitons augmenter la longueur de l'espaceur entre le sucre et l'hétérocycle afin de permettre un meilleur recouvrement  $\pi$  entre le thiazole et la « tyrosine gate ». Plusieurs types d'espaceurs ont donc été synthétisés et seront décrits dans ce chapitre.

#### 1. Liaison C-C

##### a) Stratégie

La création d'un espaceur avec deux atomes de carbone peut être envisagée suivant le même schéma réactionnel que précédemment (Schéma 39). L'allylmannose **29** peut être transformé en alcool, par ozonolyse suivie par un traitement réducteur pour permettre l'introduction d'un groupement cyano qui sera modifié en thioamide afin d'effectuer la séquence de cyclisation/déprotection.

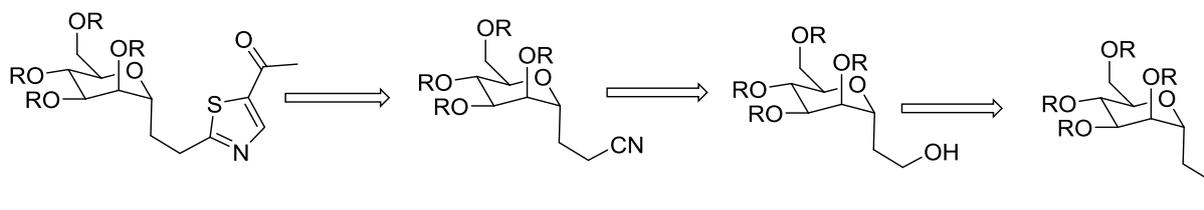


Schéma 39 : Schéma rétrosynthétique de la préparation de MC<sub>2</sub>Tz1.

##### b) Synthèse

La double liaison terminale du composé **29** est facilement coupée par ozonolyse, l'aldéhyde intermédiaire est réduit *in situ* en présence de borohydrure de sodium, avec un rendement de 81%. L'alcool **33** est alors activé sous forme de mésylate **35**, par substitution du chlorure de mésyle dans la pyridine (Schéma 40).

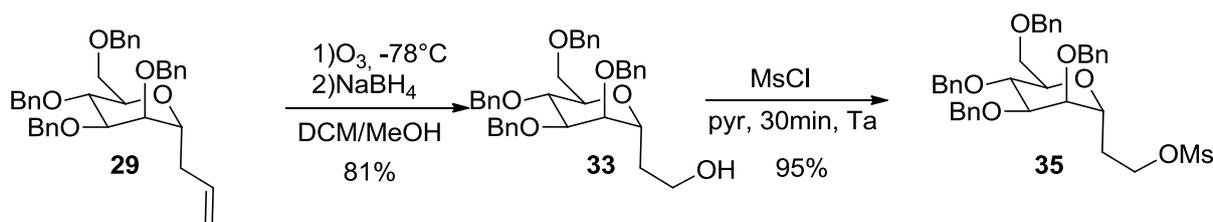


Schéma 40 : Synthèse de l'intermédiaire mésylé **35**.

Pour des raisons de simplifications de synthèse, les benzyles sont ensuite clivés par hydrogénolyse, en présence du catalyseur de Pearlman. Le sucre libre brut est reprotégé par des acétates dans la pyridine en présence d'un large excès d'anhydride acétique et de DMAP. De manière décevante, le rendement en composé **48** est relativement faible (Schéma 41). Le mésylate est ensuite substitué par un nitrile avec le cyanure de potassium dans le DMF pour mener au dérivé **49** avec un rendement de 28%.

Afin d'augmenter le rendement de la synthèse, nous avons changé l'ordre des réactions. Le nitrile **50** est formé en premier par chauffage en présence de KCN puis les benzyles sont éliminés par hydrogénolyse.

En présence du catalyseur de Pearlman, nous observons en plus de la déprotection des hydroxyles, la réduction du nitrile en amine. En revanche, l'utilisation de palladium sur charbon a permis d'obtenir de manière exclusive le nitrile acétylé **49** avec un rendement de 80%. Malheureusement, lors de la montée en échelle, la réaction n'a pas été reproductible, conduisant à un rendement de 46%, dû à l'obtention de l'acétamide **51** comme produit secondaire. Les quantités de composé **49** obtenues ont cependant permis de poursuivre la synthèse.

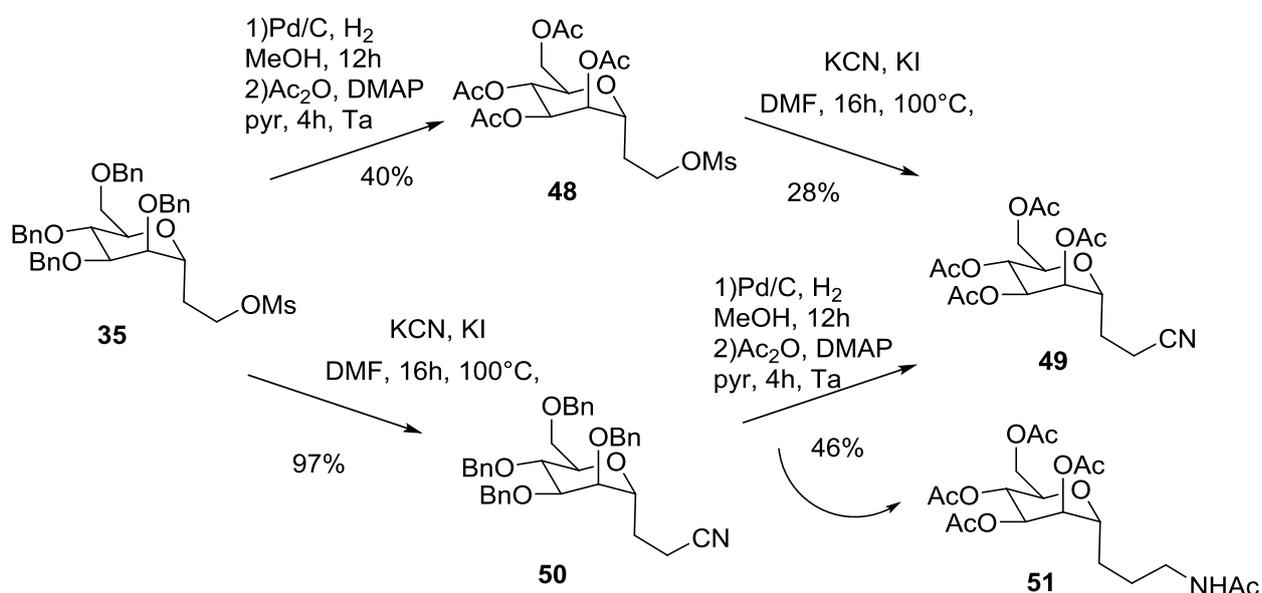
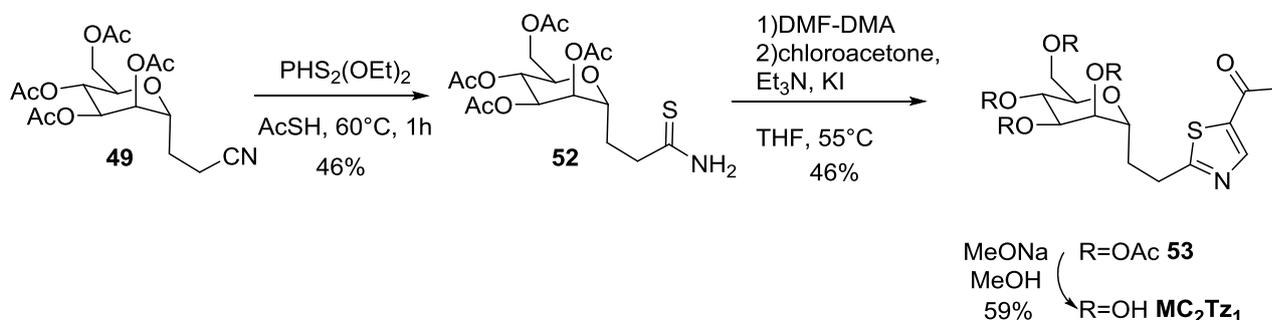


Schéma 41 : Changement de groupes protecteurs.

Le thioamide **52** est isolé avec un rendement de 46% en utilisant l'orthodithiophosphate d'éthyle (Schéma 42). Ensuite une séquence monotope d'addition/cyclisation par réaction

séquentielle de DMF-DMA puis de chloroacétone est effectuée. Dans ces conditions, le thiazole **53** est isolé avec un rendement de 46%. Une déprotection des hydroxyles par du méthanolate de sodium permet d'avoir le composé déprotégé **MC<sub>2</sub>Tz1** avec 59% de rendement après purification.



### c) Conclusion

Le composé **MC<sub>2</sub>Tz1** a été obtenu mais sa synthèse n'est pas optimisée pour une préparation à plus large échelle. Une possibilité consisterait à utiliser l'allyltétraacétylmannose **27** afin d'éviter le changement de groupes protecteurs et donc la chute de rendement. Néanmoins, la quantité synthétisée est suffisante pour une évaluation biologique ultérieure.

## 2. Liaison C-X

### a) A partir des hétérocycles préformés

#### (1) Stratégie de synthèse

Les composés **3**, **5** et **6** synthétisés dans la première partie de cette thèse sont des nucléophiles qui devraient permettre d'insérer un hétéroatome entre le sucre méthylé et l'hétérocycle par réaction sur **34** (Schéma 43). L'introduction d'un hétéroatome nous semble importante car le co-cristal FimH/**MNTz1** montre qu'il y a une molécule d'eau en interaction avec l'azote anomérique du ligand. La résolution de la structure cristallographique ne permet pas de placer les atomes d'hydrogènes de manière explicite et donc de savoir si l'azote est donneur ou accepteur de liaison hydrogène. L'introduction d'un hétéroatome pourrait ainsi permettre d'établir une interaction importante pour l'affinité de cette famille de ligand.

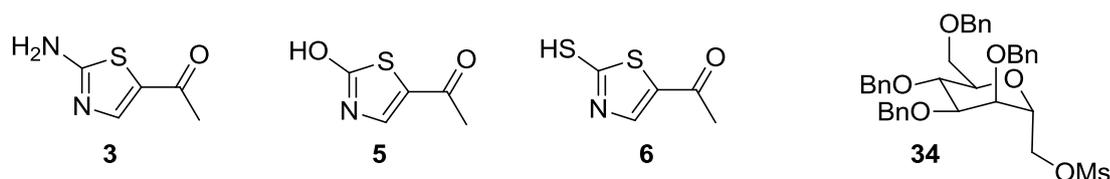


Schéma 43 : Partenaires hétérocycliques et donneur glycosidique pour la formation de MCXTz1.

## (2) Synthèse

Pour la synthèse des composés avec deux atomes entre le sucre et le thiazole, **34** est porté à reflux dans le DMF en présence d'une quantité catalytique d'iodure de tetrabutylammonium (TBAI) et des hétérocycles **5**, **3** ou **6**. Malheureusement, aucune réaction n'a eu lieu quel que soit le thiazole engagé, peut être en raison de la forte délocalisation des doublets de l'hétéroatome exocyclique.

Nous avons alors augmenté l'électrophilie du carbone anomérique de **34** en substituant le mésylate par un atome de brome (composé **54**), en utilisant du bromure de tetrabutylammonium (TBAB) à 100°C dans le DMF. La substitution nucléophile de **54** par l'hétérocycle soufré **6**, à reflux dans le DMF en présence de TBAI, a fonctionné ce qui nous a permis d'obtenir **55** avec un rendement de 84% (Schéma 44).

Cependant, dans les mêmes conditions les deux autres hétérocycles, probablement moins nucléophiles, n'ont pas réagi et le composé bromé **54** est récupéré intact.

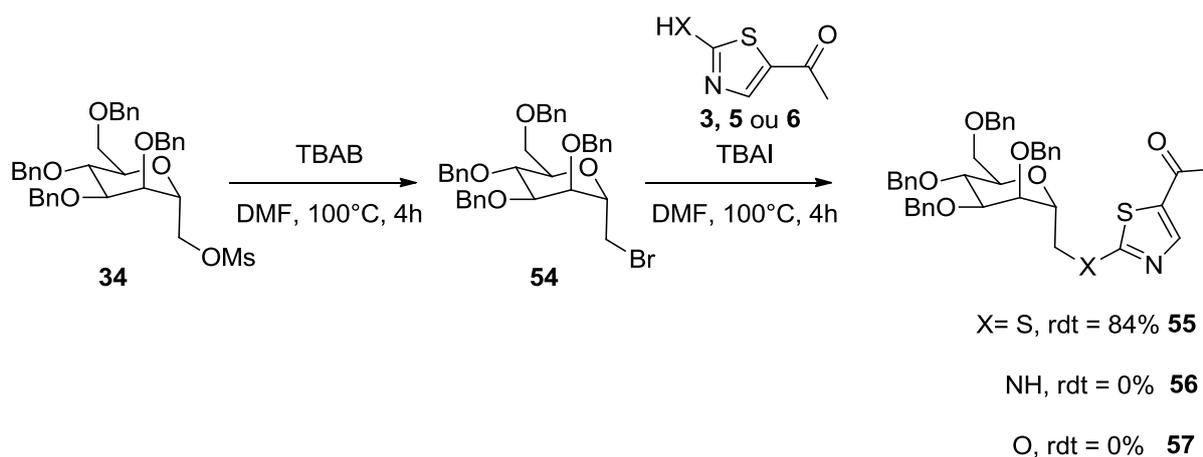


Schéma 44 : Substitution nucléophile pour conduire aux composés MCXTz1, seuls le composé soufré **6** est suffisamment nucléophile.

Le composé soufré **55** a pu être déprotégé en présence de  $\text{BCl}_3$  (Schéma 45) pour donner le sucre libre **MCSTz1** avec un rendement de 48%.

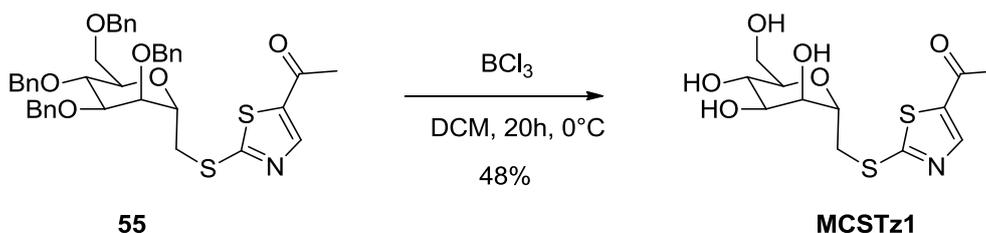


Schéma 45 : Déprotection du composé 55.

### *b) Préparation du dérivé azoté par synthèse linéaire*

Le composé **MCNTz1** avec un atome d'azote nous semble l'un des plus intéressants car il permettrait d'établir une liaison hydrogène en tant que donneur avec la molécule d'eau présente dans le site actif. Une nouvelle stratégie a donc été mise en place afin de le synthétiser.

#### (1) Stratégie

Elle consiste à construire le thiazole sur le sucre après l'introduction d'une fonction thiourée (Schéma 46) plutôt que de faire le couplage en fin de synthèse. Cette thiourée peut être accessible à partir d'un groupement isothiocyanate qui pourra lui-même être formé par substitution nucléophile du mésylate **34**.

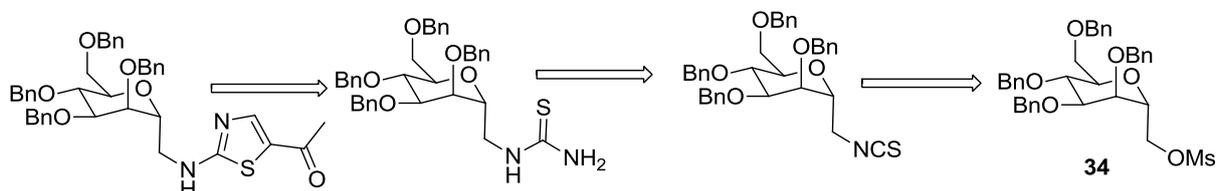


Schéma 46 : Stratégie de synthèse des MCNTzX.

#### (2) Synthèse

Tout d'abord, le composé mésylé **34** a été mis en réaction avec du thiocyanate de potassium et du KI au reflux du DMF mais aucune réaction n'a été observée. Nous avons alors effectué un essai avec le dérivé bromé **54** préparé précédemment. L'analyse par masse et par RMN semble indiquer la formation du composé attendu **58**. Cependant la réaction suivante de condensation d'ammoniac pour former la thiourée n'a pas permis d'obtenir le composé attendu même dans des conditions réactionnelles drastiques à haute température en tube scellé, ou par bullage d'ammoniac gazeux. Seul le produit de départ a été récupéré en fin de réaction. La fonction isothiocyanate est pourtant classiquement réactive face aux amines ou

à l'ammoniac,<sup>126</sup> et souvent utilisée pour greffer de petites molécules sur des protéines dans des conditions très douces en milieu physiologique.<sup>127,128</sup>

Nous pouvons supposer que le produit formé ne soit pas l'isothiocyanate **58**, mais l'isomère thiocyanate **59**. En effet, l'ion isothiocyanate peut s'écrire sous deux formes mésomères,<sup>129,130</sup> et le produit de la réaction dépend de la forme qui réagit, en fonction des conditions utilisées. Le thiocyanate est le produit cinétique de la réaction, alors que l'isothiocyanate est le produit thermodynamique (Schéma 47). C'est pourquoi la formation du NCS est généralement effectuée à haute température.

Dans notre cas, la réaction est menée à reflux du DMF, il est donc difficile de fournir plus d'énergie afin de favoriser la formation du produit thermodynamique. Nous avons donc revu notre stratégie.

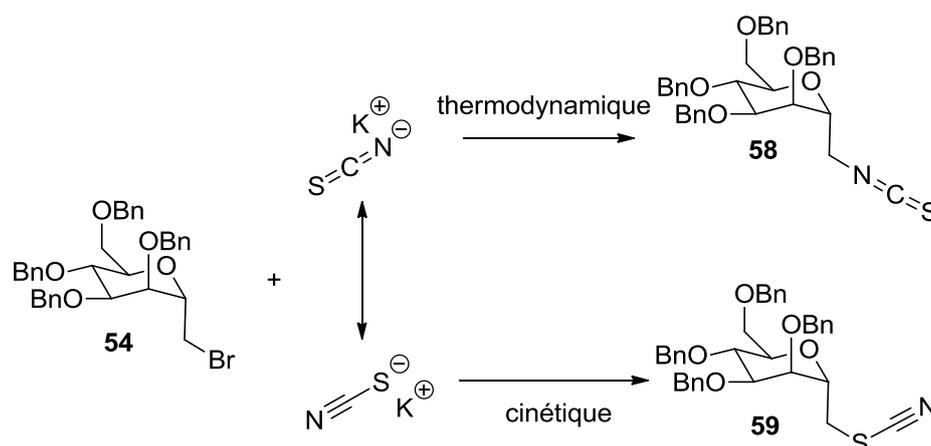


Schéma 47 : mésomérisation entre les ions thiocyanate et isothiocyanates, conduisant à deux produits.

### (3) Inversion de la réactivité pour former la thiourée

La thiourée est une fonction symétrique, c'est pourquoi nous avons envisagé d'utiliser la stratégie inverse (Schéma 48). Il s'agit de former une amine sur le sucre pour ensuite la condenser sur un isothiocyanate protégé par un benzoyl, facilement éliminés par des ions méthanolate.

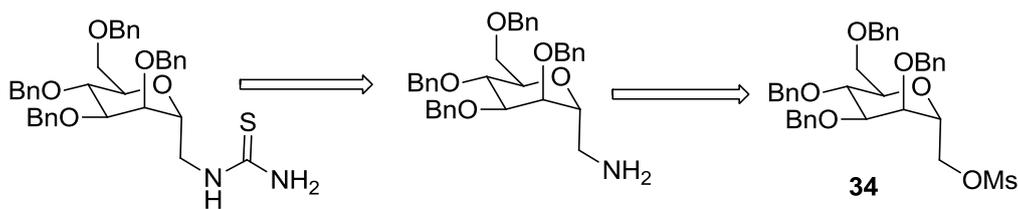


Schéma 48 : Nouvelle stratégie de formation de la thiourée.

L'azoture de sodium permet de substituer directement le dérivé mésylé **34**, dans le DMF à 110°C, pour donner le composé **60** (Schéma 49). Une réduction de Staudinger par réaction de triphénylphosphine dans un mélange THF/eau permet d'obtenir l'amine primaire **61**. L'oxyde de triphénylphosphine formé est ensuite éliminé par précipitation dans l'éther diéthylique.

La formation de l'isothiocyanate de benzoyle se fait par simple addition d'un excès de KNCS sur le chlorure de benzoyle dans l'acétone. Ce composé peut être isolé et caractérisé après purification sur gel de silice, mais l'addition directe de l'amine primaire **61** diluée dans le dichlorométhane conduit à la thiourée protégée **62**. Finalement, un traitement basique dans le méthanol clive rapidement le benzoyle pour donner la thiourée déprotégée **63**.

L'analyse du spectre RMN de ce composé montre des pics très élargis, malgré une spectroscopie de masse et un profil CCM parfaits. Ce sucre est ensuite engagé dans la réaction de cyclisation pour accéder avec des rendements respectifs de 60 et 83% à **64** et **65**. Ces deux composés sont déprotégés par addition de trichlorure de bore dans le dichlorométhane pour donner les composés **MCNTz1** et **MCNTz2** attendus.

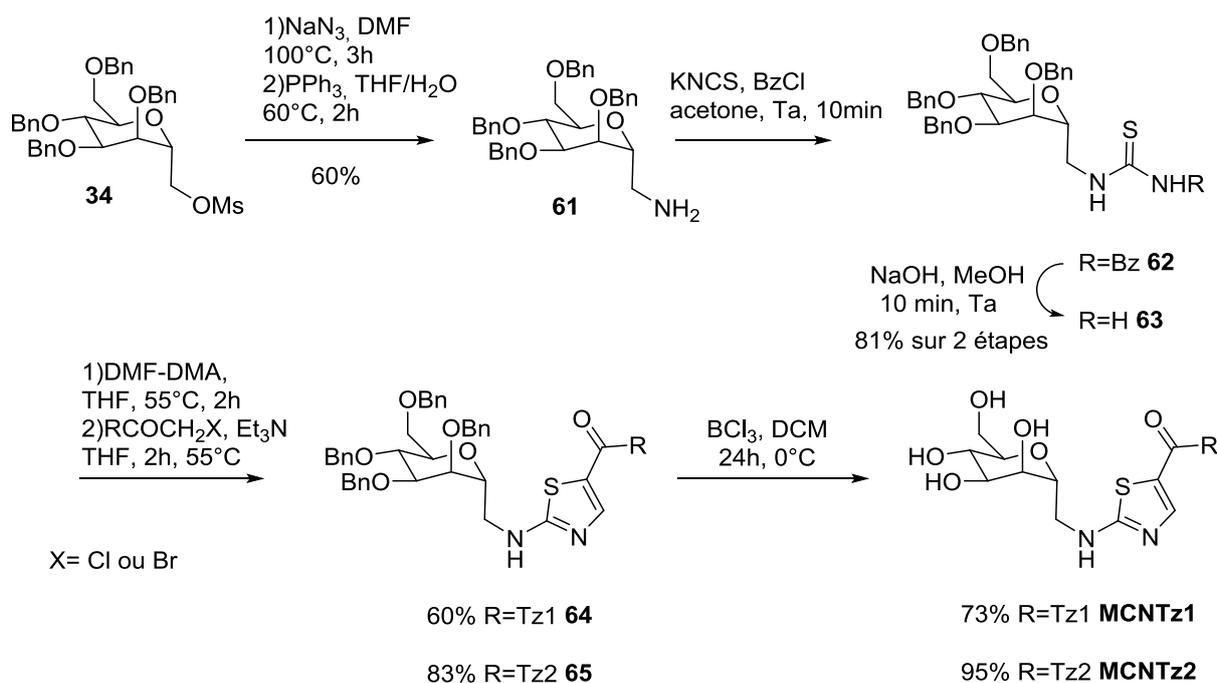


Schéma 49 : Synthèse des composés MCNTz1 et MCNTz2.

### 3. Liaison X-C

Les composés avec un espaceur de deux atomes avec l'hétéroatome en position anomérique, de type **MXCTz1**, vont être présentés dans cette section. Les différentes synthèses ont été réalisées par la stagiaire de Master 2 Méлина Caudan que j'ai eu l'opportunité d'encadrer.

#### a) Stratégie

Nous avons envisagé deux stratégies de synthèse pour l'obtention des composés avec un enchainement de type X-C en position anomérique. La première consiste à obtenir des dérivés hétérocycliques fonctionnalisés qui seront greffés sur le sucre par une réaction de glycosylation (Schéma 50, voie 1). Dans la seconde, le thiazole est directement construit sur le glycomime (Schéma 50, voie 2). Cette deuxième stratégie n'est pas convergente, mais permet d'introduire plus facilement de la diversité structurale.

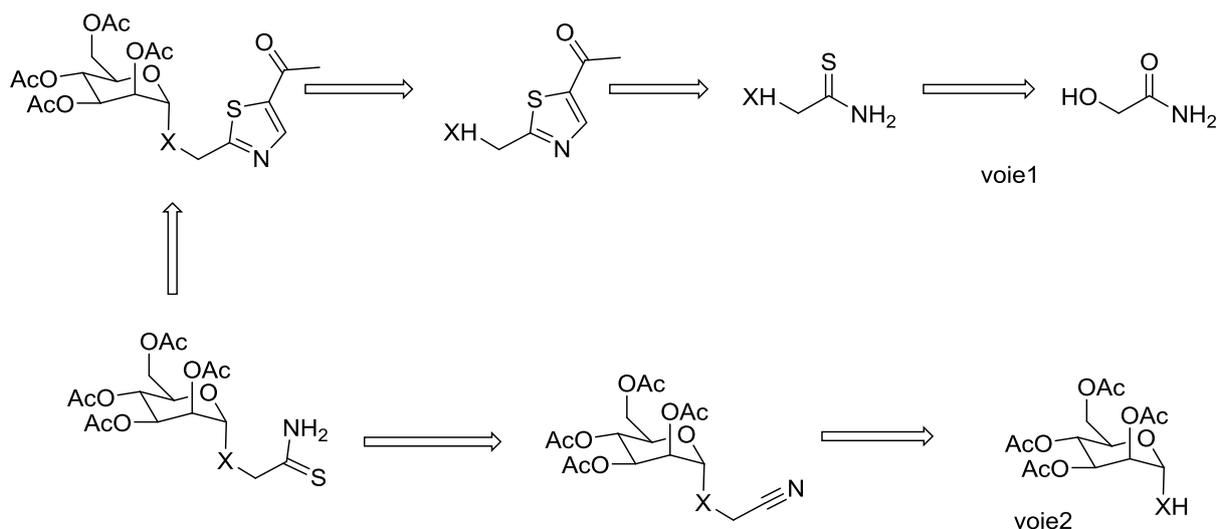


Schéma 50 : Stratégies de synthèse envisagées pour les composés de type MXCTz.

### b) Synthèse du composé O-C

Pour la synthèse de la molécule avec un espaceur O-C, le mannose per-acétylé **9** est déprotégé spécifiquement en position anomérique par un traitement avec de la méthylamine dans le THF. L'hydroxyle **66** formé est mis en réaction avec du bromoacétonitrile au reflux de l'acétonitrile en présence d'un équivalent de DBU. La réaction n'ayant rien donné nous avons ajouté un sel d'argent ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) afin de complexer le brome, sans plus de succès. Finalement, nous avons ajouté dans le milieu une seconde base, le carbonate de potassium qui a permis d'obtenir le produit attendu **67** (Schéma 51), avec une sélectivité très importante pour l'anomère  $\alpha$  et un rendement de 85%. La synthèse a été refaite uniquement en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ou avec de l'oxyde d'argent, mais dans les deux cas nous n'observons pas de réaction. De même, l'utilisation de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et de DBU sans  $\text{Ag}_2\text{O}$  ne permet pas la substitution.

Il apparait donc que les premières conditions soient les meilleures pour cette réaction (Schéma 51), même si nous n'avons pas pu apporter d'explications rationnelles à la nécessité d'utiliser simultanément deux bases.

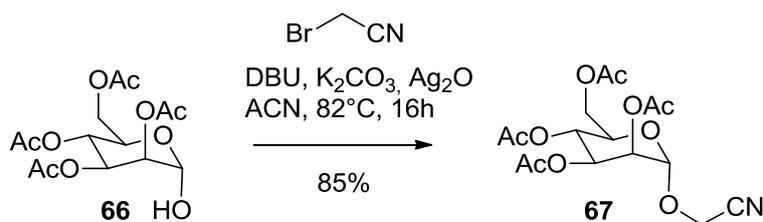


Schéma 51 : Substitution du bromoacétonitrile.

Le produit **67** est ensuite converti en thioamide **68** par bullage de sulfure d'hydrogène dans un mélange pyridine/triéthylamine 1:1 avec un rendement de 79% (Schéma 52). Ce produit est instable à température ambiante et il y a élimination lente de  $\text{H}_2\text{S}$  pour reformer le nitrile de départ. C'est pourquoi le thioamide **68** est mis à réagir directement avec du DMF-DMA dans du THF à température ambiante pour former l'hétérodiène intermédiaire. Après élimination du solvant à basse température, l'ajout de chloroacétone et de triéthylamine dans le DMF permet d'isoler le composé **69** avec un rendement de 52% après deux jours de réaction à température ambiante. Toutes les tentatives de chauffage pour accélérer la réaction ont conduit à une dégradation du produit et le thiazole **69** doit être conservé à  $-20^\circ\text{C}$ .

La déprotection des hydroxyles par du méthanolate de sodium donne le sucre final **MOCTz1** avec un faible rendement. Ce produit s'est révélé plus stable que le précurseur **69**.

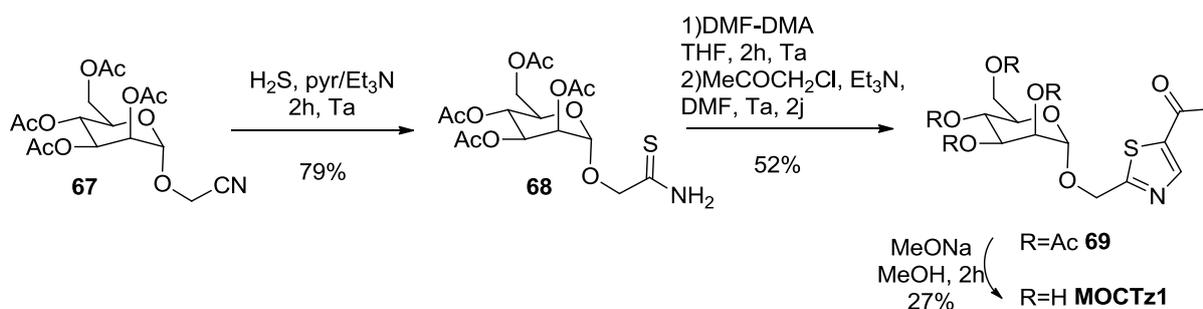
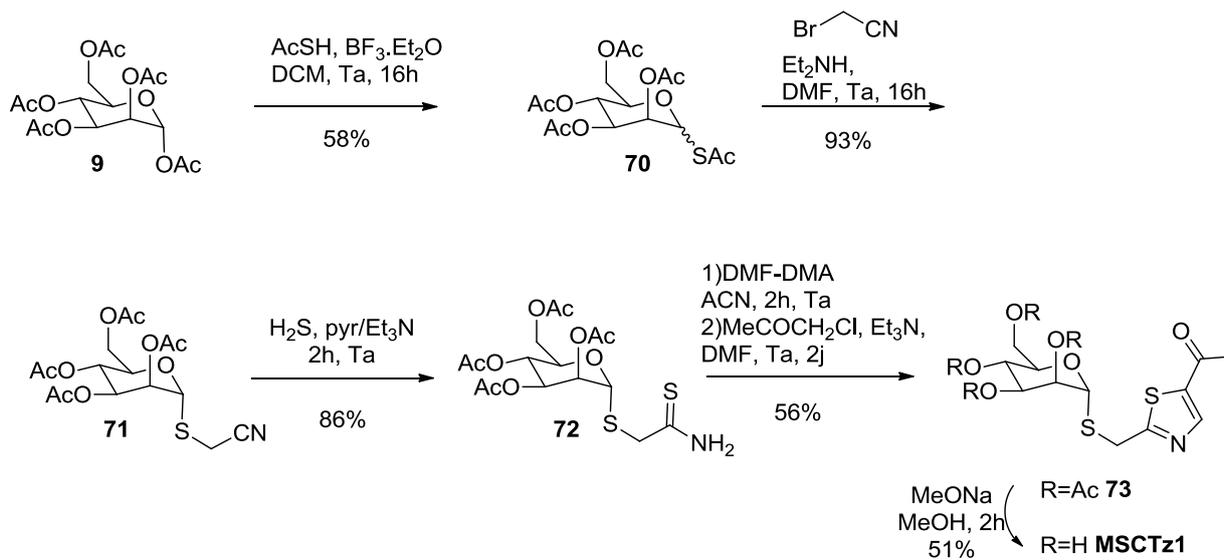


Schéma 52 : Préparation du composé MOCTz1.

### c) Synthèse du composé S-C

L'analogue soufré **MSCTz1** est obtenu en utilisant une voie de synthèse similaire. Le thioacétyl glycoside **70** est préparé à partir de **9**, en utilisant de l'acide thioacétique et du trifluorure de bore dans le dichlorométhane. Après déprotection de l'atome de soufre par de la diéthylamine, le bromoacétonitrile est ajouté dans le milieu réactionnel pour fournir le produit de thioalkylation **71** avec un rendement de 93%. Comme pour la synthèse

précédente, ce composé est condensé avec du sulfure d'hydrogène pour former le thioamide **72** qui subit la réaction d'addition-cyclisation pour conduire au thiazole **73**. L'hétérodiène intermédiaire est obtenu sous activation micro-ondes dans l'acétonitrile, puis la cyclisation avec la chloroacétone dans le DMF à température ambiante mène au dérivé **73** avec un rendement de 56% sur les deux étapes. La déprotection finale par du méthanolate de sodium fournit le composé **MSCTz1**.



#### d) Conclusion

Les produits désirés ont été obtenus avec des quantités suffisantes afin de réaliser les tests biologiques, cependant les synthèses utilisées se sont révélées peu reproductibles, notamment lors des montées en échelle. Les faibles rendements de cyclisation ainsi que la difficulté des purifications rendent cette stratégie peu adaptée à une diversification éventuelle.

L'instabilité relative est probablement due à une acidité importante des hydrogènes du méthylène en  $\alpha$  du soufre ou de l'oxygène anomérique. En effet, l'analyse d'un sous-produit **74**, isolé lors de l'étape de cyclisation, montre une fonction énamine issue de la condensation de DMF-DMA sur le méthylène, probablement après sa déprotonation par la triéthylamine.

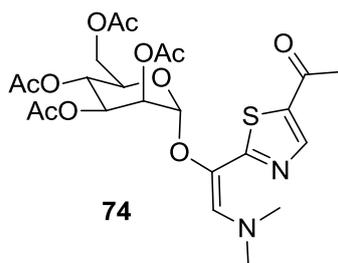


Schéma 54 : Sous-produit 74 isolé lors des essais de cyclisation.

Par contre les sucres déprotégés **MOCTz1** et **MSCTz1** sont plus stables, le caractère attracteur du sucre per-acétylé (désarmé) pourrait influencer sur l'acidité des hydrogènes du méthylène.

#### 4. Espaceur à trois atomes : O-C<sub>2</sub>

La voie de synthèse de cette nouvelle famille de composés diffère principalement par la première étape. Celle-ci consiste à effectuer une réaction de glycosylation de Schmidt à partir du trichloroacétimide **10** en utilisant de l'hydroxypropionitrile comme accepteur pour obtenir le composé **75** (Schéma 55). La formation du thioamide est réalisée avec de l'orthodithiophosphate d'éthyle, pour conduire au composé **76** avec un rendement de 42%. L'étape suivante de cyclisation conduit à de très faibles rendements en **77** malgré les différents essais d'optimisation. Il semble que la réactivité des thioamides soit très substrat dépendante, et généralement bien inférieure à celle des thiourées. En effet, des essais de cyclisation sur des composés modèles tels que le thiobenzamide, le composé **78** (synthèse décrite par la suite) ou l'acétamide n'ont pas donné les composés cyclisés correspondants, malgré une condensation quantitative du DMF-DMA sur les substrats de départ (Schéma 56).

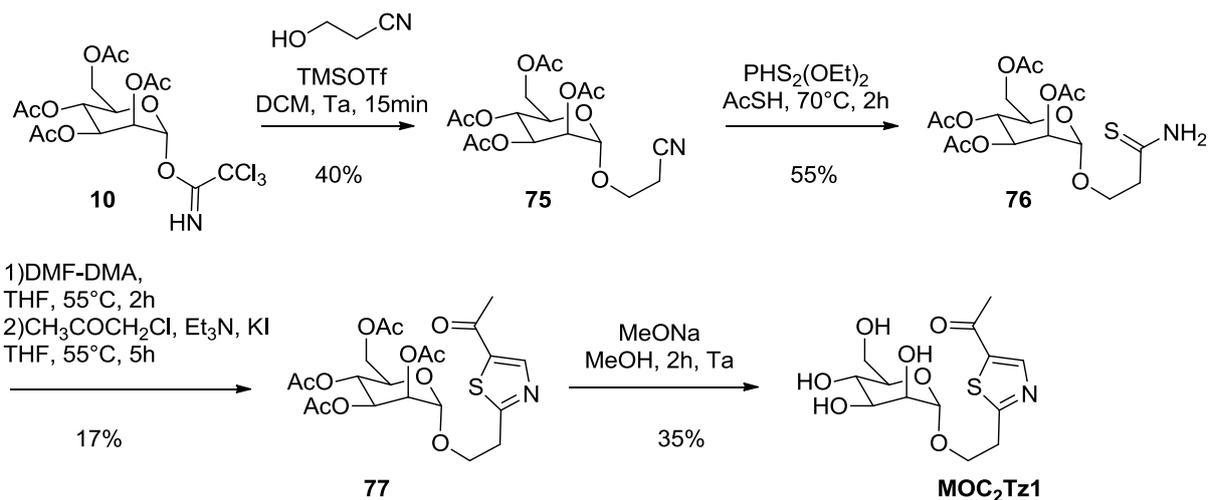


Schéma 55 : 1<sup>ère</sup> voie de synthèse de MOC<sub>2</sub>Tz1.

La déprotection finale est effectuée dans du méthanolate de sodium pour fournir le composé **MOC<sub>2</sub>Tz1**.

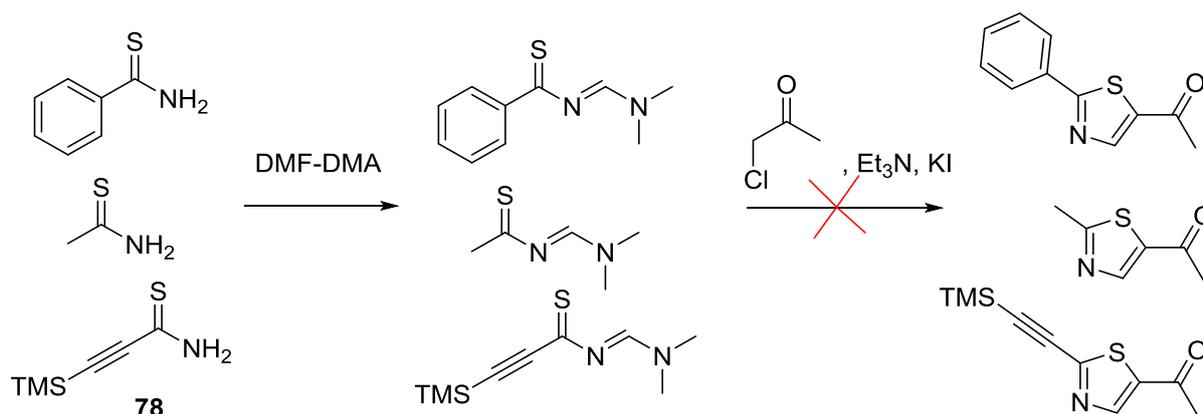


Schéma 56 : Tentatives de cyclisation sur différents thioamides modèles.

## 5. Conclusion

Ainsi, nous avons obtenu un panel de neuf composés, possédant sept espaceurs différents entre le thiazole et le sucre (Figure 38).

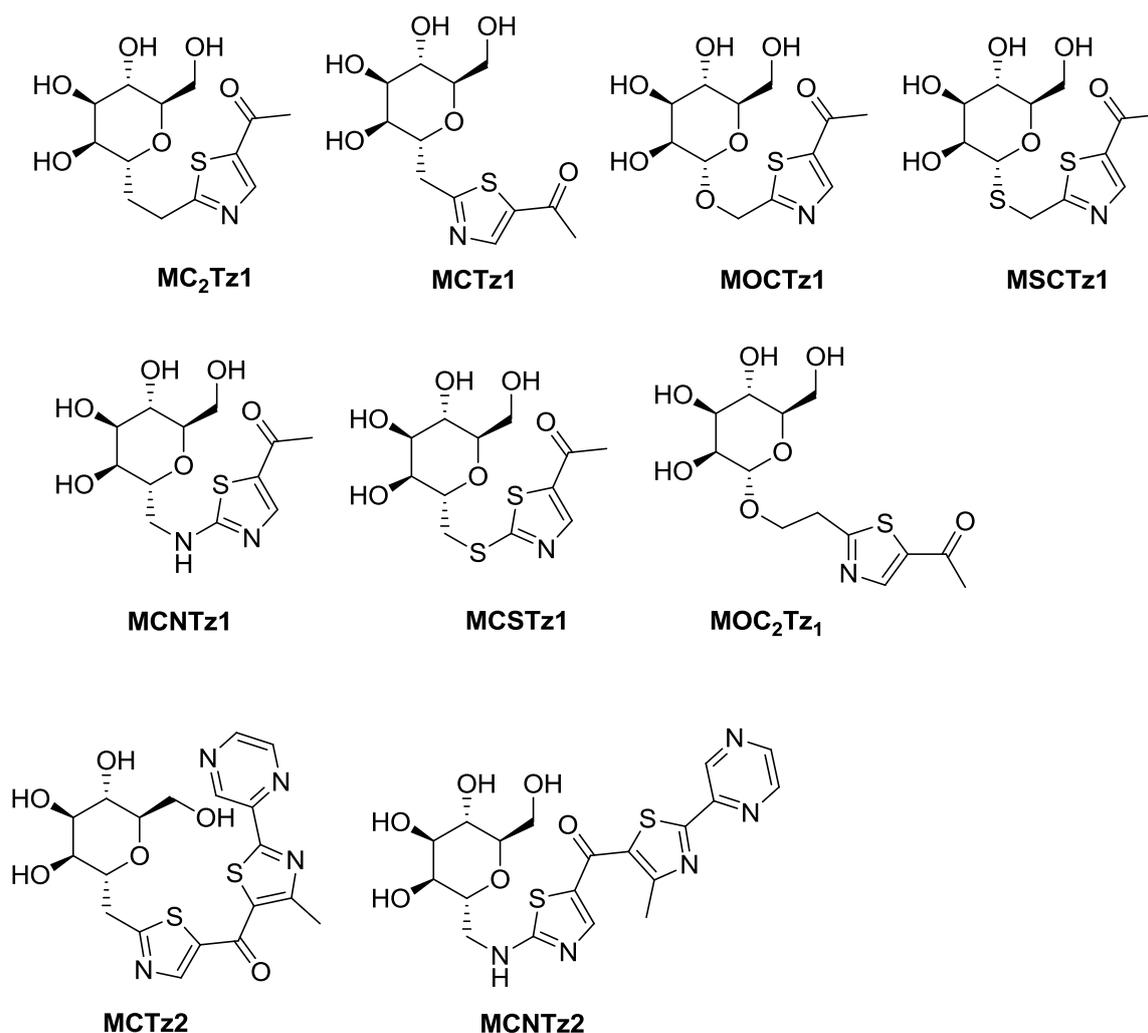


Figure 38 : Liste des TazMans synthétisés.

Ces composés ont tous été obtenus à 100% sous la forme  $\alpha$  et aucune anomérisation n'est observée en milieu aqueux, contrairement à la série **MNTz**. Les C- et S- glycosides devraient être résistants aux glycosidases, puisqu'ils ne possèdent pas d'oxygène anomérique. Finalement, tous les dérivés **Tz1** sont solubles dans l'eau, alors que les dérivés **Tz2** sont peu solubles et nécessitent une pré-dilution dans le DMSO avant l'ajout d'eau.

Les composés **MOCTz**, **MSCTz** et **MOC<sub>2</sub>Tz** ont été obtenus en quantité suffisante pour être évalués mais leur synthèse difficile devra être optimisée s'ils sont identifiés comme de puissants inhibiteurs de FimH.

Les synthèses des composés C-mannosylés sont parfaitement reproductibles et ne présentent pas d'étapes limitantes pour une éventuelle montée en échelle.

### **III. Évaluations biologiques**

## A. Introduction

### 1. Tests et solubilité

Toutes les méthodes d'évaluation présentées par la suite sont réalisées dans l'eau ou en milieu tamponné. Les composés de type **MXTz2** avec un groupement thiazolypyrazine étant très peu solubles dans ces conditions, ils ont été pré-dissous dans le DMSO. Des contrôles effectués sur l'heptylmannoside ont montré que les faibles quantités de DMSO utilisées n'ont pas d'effet significatif sur les mesures.

## B. Méthodes d'évaluation des composés.

### 1. ELISA

La méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est utilisée pour mesurer la proportion de FimH se liant à un ligand en présence d'inhibiteurs.

Dans cette technique, les puits d'une plaque sont tapissés d'un composé mannosylé, (glycanes oligomanoses de la Rnase B), puis avec de l'albumine bovine (BSA) afin d'empêcher les interactions électrostatiques de la lectine avec le support. Les inhibiteurs sont ensuite ajoutés dans le premier puits, puis dilués en série afin de tester différentes concentrations. La lectine est additionnée et les plaques sont incubées 1h à température ambiante pour laisser l'équilibre se former.

Les inhibiteurs et les lectines non adhérentes sur le fond des puits sont ensuite éliminés par lavage. La détection se fait par colorimétrie après plusieurs étapes. Tout d'abord, une solution d'anticorps de lapin anti-FimH est ajoutée et va venir se fixer sur FimH. Après incubation et élimination du surnageant, on obtient ainsi en surface les anticorps de lapin. Ces anticorps sont spécifiques de la cible étudiée et sont donc rarement commercialisés.

On ajoute ensuite une solution d'anticorps commercial marqué anti-lapin qui est elle aussi incubée puis rincée. Finalement le composé marqué est révélé par ajout de 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB), incubé pendant 5 minutes, puis la réaction est stoppée par ajout d'acide sulfurique (Figure 39).

L'intensité de la coloration peut être directement reliée à la quantité de lectine étant restée fixée sur le puits. Une coloration intense correspondra à une faible affinité du ligand, alors qu'un milieu faiblement coloré témoigne d'une forte affinité.

L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'adhésion sur le fond des puits. Les mesures réalisées à différentes concentrations permettent de construire une courbe dont l'équation permet de remonter jusqu'à l'IC<sub>50</sub>. Cette valeur d'IC<sub>50</sub> est représentative de la capacité d'inhibition des composés.

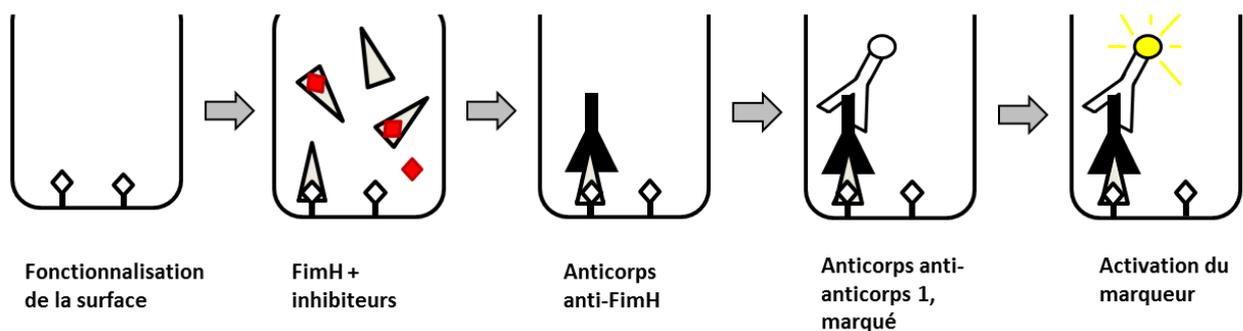


Figure 39 : Protocole de test ELISA.

## 2. Hémagglutination

L'hémagglutination (HIA), a été développée très tôt, lors de la découverte des premières lectines. Il s'agit d'un moyen rapide et qualitatif de déterminer la capacité inhibitrice d'un composé sur l'adhésion des bactéries.

Les érythrocytes ou globules rouges présentent à leur surface une multitude de sucres, sur lesquelles les bactéries sont capables de venir s'adhérer au moyen des lectines. En l'absence de bactéries, les cellules sanguines sédimentent naturellement, provoquant la formation d'un dépôt rouge. Sur une plaque 96 puits, ces dépôts sont concentrés au centre des puits coniques utilisés.

Si une solution de bactéries est ajoutée ce phénomène de sédimentation est empêché par la formation de réseaux bactéries-érythrocytes. Ce phénomène d'hémagglutination est visible à l'œil nu grâce à la formation d'agrégats en suspension qui permettent une couleur homogène de la solution dans tous le puits (Figure 40).

L'ajout d'inhibiteurs de lectine va empêcher la formation de ces réseaux, en bloquant les *pili* bactériens. Les érythrocytes retrouvent alors leur comportement habituel et sédimentent pour former un dépôt. Il est donc possible de déterminer, par dilutions successives de l'inhibiteur, la concentration limite pour laquelle l'héماغlutination n'est plus inhibée..

La mise en place de ce test nécessite au préalable de déterminer un titre d'héماغlutination pour chaque souche de bactéries utilisée. Ce titre correspond à la concentration de bactéries nécessaire afin d'agglutiner les érythrocytes. Pour cela, des dilutions en série d'un facteur 2 sont réalisées sur une plaque 96 puits puis une quantité constante de sang est ajoutée. Le puits où la concentration de bactéries ne permet plus d'agglutiner les cellules correspond au titre d'héماغlutination.

Cette opération est importante, car de nombreux facteurs, autres que le nombre de bactéries, peuvent influencer sur les résultats. Différentes souches de bactéries n'ont pas forcément la même séquence génétique pour FimH ou n'expriment pas le même nombre de *pili*. Les conditions de culture des bactéries peuvent également influencer sur le nombre de *pili*.

Une dilution en série d'un facteur 2 des inhibiteurs peut ensuite être réalisée suivit de l'ajout d'une concentration bactérienne égale à quatre fois le titre d'héماغlutination et d'une quantité constante de sang. Après sédimentation, on obtient la concentration inhibitrice de chacun des composés testés.

La forte variation des conditions opératoires de ces manipulations rend la valeur absolue de chaque concentration inhibitrice peu significative et il est donc indispensable d'utiliser une référence avec laquelle sera comparé chaque composé testé.

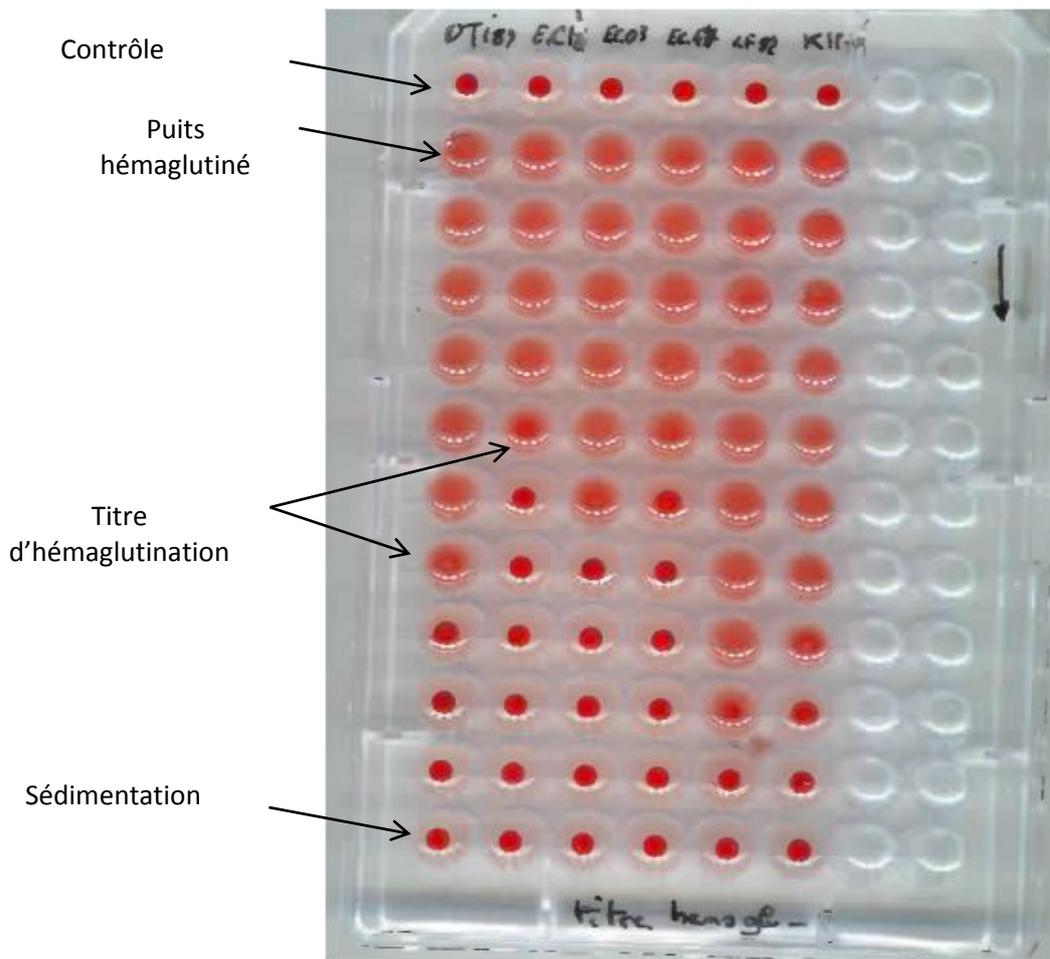


Figure 40 : Exemple d'HIA, mesure du titre d'hémagglutination pour différentes souches bactériennes.

Les tests d'hémagglutination sont réalisés sur glace afin de limiter la multiplication et la mort des bactéries utilisées. Par conséquent, les manipulations sont effectuées en présence de 2,5% de DMSO afin de limiter la précipitation causée par la baisse de température dans les puits les plus concentrés. Par soucis d'homogénéité, ce pourcentage a été utilisé pour tous les composés quelle que soit leur solubilité.

### 3. Inhibition de l'adhésion sur les cellules épithéliales intestinales T84

L'Unité M2iSH de Clermont-Ferrand a mis au point un test cellulaire basée sur des cellules épithéliales intestinales T84. Ces cellules proviennent d'une lignée cancéreuse et expriment les récepteurs CEACAM6. Les bactéries AIEC sont capables d'adhérer à la surface de ces cellules, puis de s'y internaliser. Des conditions ont été développées afin d'établir la capacité des inhibiteurs à décrocher les bactéries des cellules ou à empêcher leur adhésion. Ces expériences ont pour but de mimer un traitement après infection par des AIEC ou un traitement prophylactique.

### ***a) Protocole de pré-incubation.***

Le protocole de pré-incubation vise à déterminer la capacité des inhibiteurs à empêcher l'adhésion des bactéries sur les cellules. Les inhibiteurs sont pré-incubés avec les bactéries à une concentration donnée pendant 1h sur roue tournante dans du sérum de veau foetal. Cette période d'incubation permet l'établissement d'une pré-inhibition des bactéries. Cette solution est ensuite additionnée à des cellules T84 adhérees au fond d'un puits de culture. Après incubation à 37°C pendant 3h pour atteindre l'équilibre, le surnageant est éliminé puis le milieu est rincé afin de ne laisser dans les puits que les cellules et les bactéries adhérees.

Les cellules T84 sont alors lysées par un détergent sans effet sur les bactéries et la solution est diluée plusieurs fois avant d'être étalée sur gel d'agar. Une incubation de 16h à 37°C permet la multiplication des bactéries et la formation de colonies visibles à l'œil nu. Chaque colonie s'est développée à partir d'une bactérie déposée sur le gel. Les colonies bactériennes sont comptées et leur nombre rapporté à celui d'un puits non traité par un inhibiteur afin de déterminer la proportion d'adhésion résiduelle après traitement.

### ***b) Protocole de post-incubation***

Le protocole de post-incubation permet d'obtenir des informations sur la capacité des inhibiteurs à décrocher les bactéries adhérees sur les cellules. Les doses d'inhibiteurs utilisées sont beaucoup plus importantes probablement parce que les lectines sont moins accessibles.

Les bactéries sont ajoutées au milieu de culture des cellules puis incubées 3h avant que le surnageant ne soit éliminé puis les puits rincés pour ne garder que les bactéries adhérees. Le composé inhibiteur est ensuite ajouté et un temps d'incubation de 3h permet à l'équilibre de s'établir. Le même protocole que précédemment est appliqué, à savoir lavage, lyse des cellules, dilution, étalement et dénombrement des colonies bactériennes.

### ***c) Remarques***

Les protocoles expérimentaux sont beaucoup plus longs que les évaluations précédentes, par ELISA ou HIA. Pour cette raison, tous les composés sont testés à une seule concentration et seuls les plus prometteurs sont évalués à différentes concentrations afin d'obtenir une courbe effet-dose et en déterminer une IC<sub>50</sub>.

#### 4. Biodisponibilité

La biodisponibilité est définie par la proportion d'un composé administré par voie orale à atteindre la circulation sanguine.

Dans le cas d'un traitement potentiel de la MC, il est préférable d'obtenir la plus faible biodisponibilité possible pour tous les composés synthétisés. En effet, un composé qui n'atteint pas la circulation sanguine restera dans le système digestif où son action doit avoir lieu. Cantonner la molécule au système digestif permet également de limiter l'accès aux autres organes et donc de limiter les interactions non spécifiques.

Le fait que les inhibiteurs de FimH n'apparaissent pas dans le sang ne signifie pas pour autant qu'ils soient restés intacts dans le système digestif. Leur dosage dans les fèces permettra de connaître la proportion ayant traversé le système digestif.

Expérimentalement, ce paramètre peut être mesuré par la combinaison de deux expériences. Une dose de 1mg/kg d'inhibiteur est injectée en intraveineuse à un rat et sa concentration dans le sang est suivie par spectrométrie de masse. Ces mesures permettent de tracer une courbe de la concentration de composés dans le sang en fonction du temps.

Un autre rat est quant à lui gavé avec une dose d'inhibiteur de 10mg/kg et la même courbe de concentration est tracée.

La biodisponibilité est alors calculée en divisant l'aire sous la courbe de la concentration après administration orale par l'aire sous la courbe après injection en intraveineuse. Cette valeur est ensuite corrigée par un facteur 10 correspondant au facteur entre les deux doses administrées puis multiplié par 100 pour avoir un pourcentage.

#### C. Résultats

Les mesures d'IC<sub>50</sub> par ELISA ont été réalisées par l'équipe du Dr Julie Bouckaert de l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille. Ce laboratoire m'a également accueilli afin de réaliser les expériences d'héماغlutination.

Le laboratoire M2iSH de l'Université d'Auvergne a élaboré les tests d'adhésion sur cellules épithéliales intestinales et m'a accueilli et formé sur la réalisation de ces évaluations.

Les 9 composés ont donc été évalués *in vitro* selon ces 3 méthodes.

## 1. ELISA

Le test ELISA permet d'évaluer l'affinité des TazMans pour FimH. Afin de déterminer les  $IC_{50}$  des composés qui sont présentés dans la Figure 41, il a été nécessaire de connaître leurs valeurs d'inhibition à huit concentrations différentes.

Les résultats mettent en exergue les composés **Tz2** ainsi que les TazMans de 1<sup>ère</sup> génération qui présentent des  $IC_{50}$  inférieures à 200nM. Le composé **MNTz2** a montré l' $IC_{50}$  la plus basse avec une  $IC_{50}$  de 70nM, deux fois moins importante qu'**HM** (160nM). Le remplacement de l'atome d'azote anomérique a conduit à une baisse générale de l'affinité pour la seconde génération de TazMan. Tous les composés présentent cependant des  $IC_{50}$  sub-micromolaires, ce qui confirme l'intérêt de cette famille de composés pour l'inhibition de FimH.

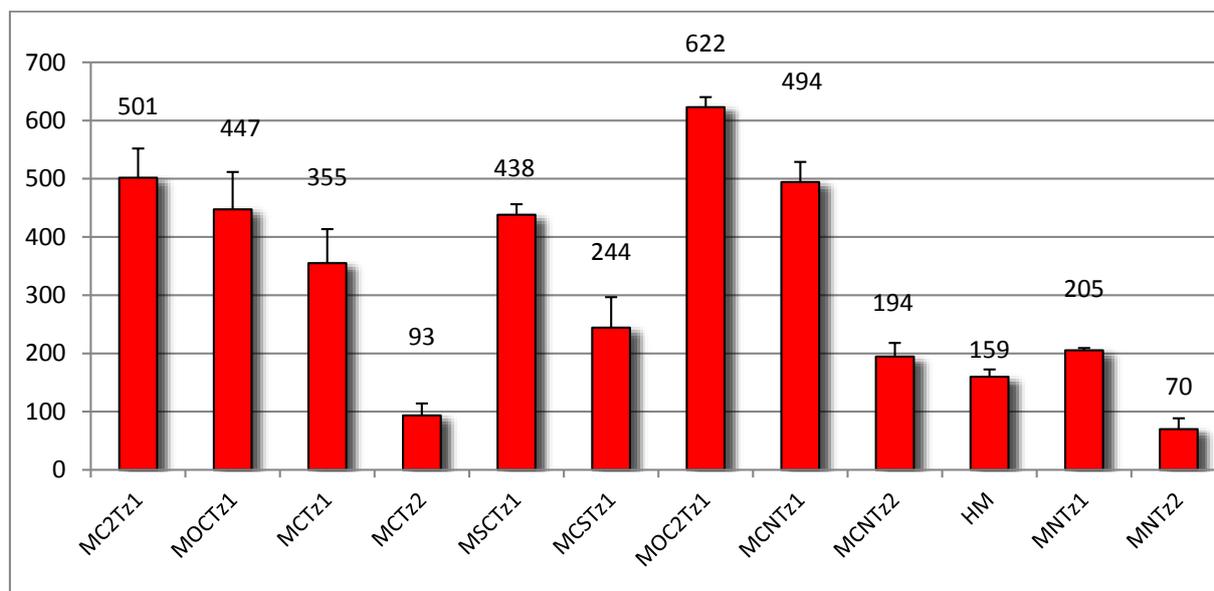


Figure 41 :  $IC_{50}$  des composés TazMans, obtenus par ELISA. Les concentrations sont exprimées en nM.

## 2. Hémagglutination

Une expérience d'HIA a permis d'évaluer simultanément tous les composés synthétisés, à l'exception des composés **MCNTzX** qui l'ont été dans une seconde expérience. Les premiers résultats ont été obtenus sur la souche LF82, extraite d'un patient atteint de la MC.

Les premières évaluations des **MCNTzX** sur LF82 ont été inexploitable. Néanmoins, ces expériences ayant été réalisées en parallèle sur la souche UTI89, les résultats sont présentés sur cette souche (Figure 42) en attendant que les manipulations soient reproduites sur LF82.

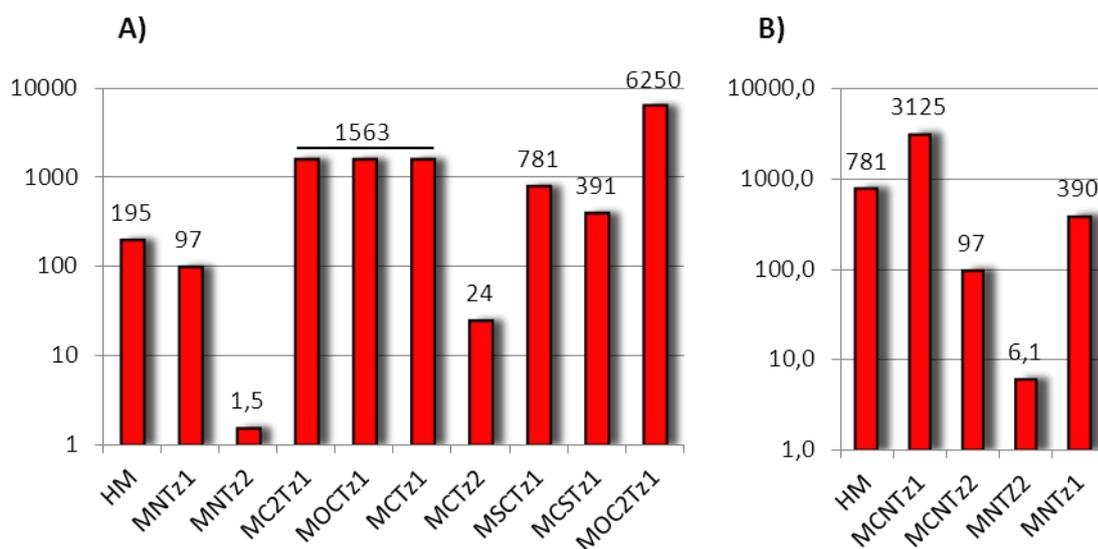


Figure 42 : A) Pouvoir inhibiteur (en nM) de l'héماغلutation des TazMans sur la souche bactérienne LF82. B) Pouvoir inhibiteur de l'héماغلutation des composés MCNTzX sur la souche UTI89.

Ce premier test cellulaire met en évidence le fort effet anti-adhésif des TazMans qui possèdent généralement des titres d'inhibition sub-micromolaires. Les composés **MNTz2**, **MCNTz2** et **MCTz2** se sont montrés significativement plus puissants que la référence **HM** qui a pourtant une affinité de l'ordre de quelques nanomolaires pour FimH par SPR.

Nous constatons également un gain très important pour les composés présentant le motif **Tz2** par rapports aux composés analogues **Tz1**. En général, la présence du substituant **Tz2** diminue d'environ deux ordres de grandeur les concentrations inhibitrices nécessaires par rapport à **Tz1**.

Les TazMans de première génération, c'est-à-dire les **MNTzX**, ont un effet anti-adhésif plus prononcé que les composés analogues modifiés en position anomérique. En effet, une perte d'affinité d'un facteur  $\sim 10$  est constatée lorsque l'atome d'azote anomérique est remplacé par les enchainement d'atomes O-, C-, O-C-, C-C-, S-C-, C-S-, C-N-, O-C-C-. Ces résultats indiquent clairement l'importance de l'interaction entre l'azote anomérique et la molécule d'eau adjacente identifiée dans la structure cristallographique de MNTz1-FimH. Les autres analogues présentent une inhibition plus faible, de l'ordre du micromolaire.

### 3. Tests sur cellules intestinales

Deux séquences de tests ont été réalisées en pré- et post-incubation afin d'évaluer les composés synthétisés. Chaque mesure a été effectuée entre 4 et 6 fois, afin d'obtenir une faible dispersité des résultats.

#### a) Pré-incubation

Les expériences de pré-incubation, modèles d'une application prophylactique, sont présentées dans la Figure 43 A, et ont été réalisées à la concentration de 10  $\mu$ M. Les résultats préliminaires pour les composés **MCNTzX** à la dose de 50 $\mu$ M sont exposées Figure 43 B. Ces mesures seront répétées à la concentration de 10  $\mu$ M.

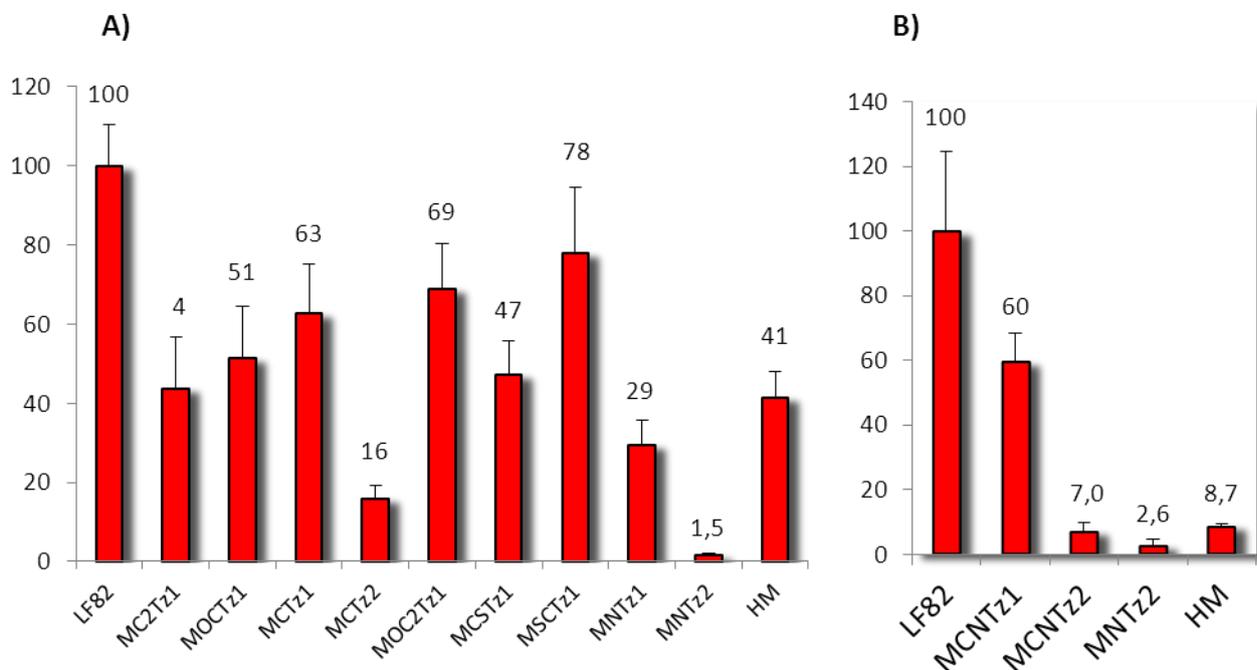


Figure 43 : Pourcentage d'adhésion résiduelle de la souche LF82, traitée par une concentration de 10 $\mu$ M (A) ou 50 $\mu$ M (B) de composé suivant le protocole de pré-incubation.

Les résultats corroborent les expériences de HAI et montrent une meilleure efficacité antiadhésive des composés **Tz2** et des TazMans de première génération **MNTzX**. **MNTz2** est le meilleur composé avec une inhibition de plus de 95% de l'adhésion, et **MCTz2** vient ensuite avec 84% d'inhibition. Le second test ne permet pas de comparer **MNTz2** et **MCNTz2**, la concentration étant trop importante, mais laisse présager une bonne efficacité de ce dernier à plus faibles concentrations. Les autres composés, de type **Tz1** restent dans une gamme de valeur légèrement supérieures à l'HM sur ces expériences de pré-incubation.

### b) Post-incubation

Le protocole de post-incubation, qui est plus représentatif d'une application thérapeutique, a été effectué avec une concentration en inhibiteurs (50  $\mu$ M) plus importante que dans celui de pré-incubation. En effet, il est plus difficile de décrocher des bactéries déjà adhérentes aux cellules que de prévenir leur adhésion. Nous avons optimisé la concentration en inhibiteurs pour obtenir des pourcentages d'inhibition significatifs et pouvoir ainsi classer les composés en fonction de leur efficacité (Figure 44).

Les résultats montrent un classement comparable à celui de la pré-incubation. Parmi les molécules **Tz1**, on peut noter l'efficacité supérieure du composé **MCSTz1**. Quant aux composés de type **Tz2** (**MCTz2** et **MNTz2**), ils permettent d'obtenir une inhibition de l'adhésion bactérienne très forte, de plus de 94%.

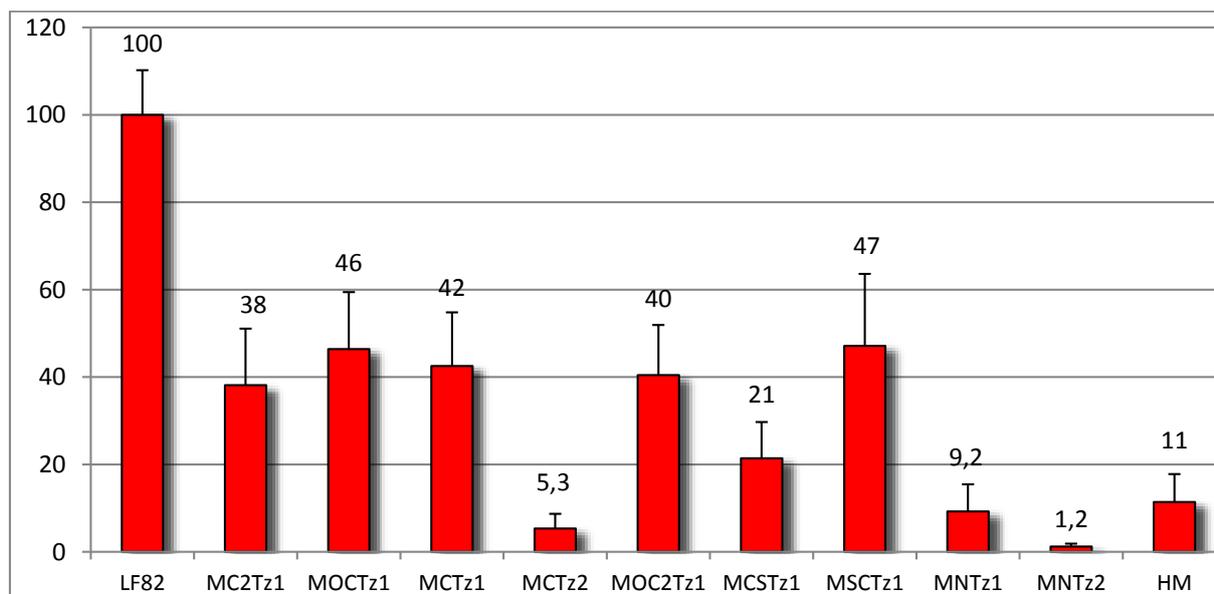


Figure 44 : Pourcentage d'adhésion résiduelle de la souche LF82, traitée par une concentration de 50 $\mu$ M de composé, suivant le protocole de pré-incubation.

## 4. Biodisponibilité

La biodisponibilité des composés **MNTz2** et **MCTz2** a été évaluée par la société ADME-EUROFINS, à partir de deux lots de trois rats pour chaque composé, et la quantité de molécule récupérée dans les fèces a été quantifiée.

Pour ces deux composés, la biodisponibilité a été inférieure à 0,5%, ils sont donc très faiblement absorbés par voie orale. La faible hydrosolubilité de **MNTz2** et **MCTz2** peut potentiellement expliquer ce résultat. D'autre part 52,4% du composé **MNTz2** administré a

été retrouvé dans les fèces, contre 47.4% du composé **MCTz2**. Nous avons donc un faible passage de la barrière intestinale mais pour autant les composés ne sont pas intégralement récupérés dans les selles. Il est probable que ces composés soient partiellement métabolisés.

### 5. Criblage de souche d'*E. coli*

Les composés de première génération **MNTz1**, **MNTz2** ainsi que l'**HM** et un panel de molécules ultravalentes portant de 30 à 900 épitopes d'HM (résultats en cours de publication) ont été testés sur un panel de dix souches d'*E. coli*, afin de déterminer une éventuelle sélectivité. Les mesures ont été réalisées par HIA (Figure 45) et par des tests cellulaires sur cellules T84 (Figure 46). L'évaluation des composés antiadhésifs décrits dans la littérature est généralement effectuée sur une seule souche d'*E. coli* (souvent K12 ou UTI89). Ces travaux vont donc permettre de déterminer la variabilité du pouvoir antiadhésif des composés pour les différentes souches d'*E. coli*.

Les souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude ont été isolées à partir d'intestins de patients atteints de la MC (souches LF 28, 31 73, 82, et 7136), d'infection urinaire (UTI89), de patients atteints d'infections osteo-articulaires (8012603= *E. coli* 03 = remplacement complet de la hanche, 8005515= *E. coli* 15 = remplacement partiel de la hanche), ces deux dernières souches nous ont été fournies par Nathalie Caroff du CHU de Nantes. Finalement des souches commensales d'origine fécale (*E. coli* K12 MG1655, *E. coli* 30195647= *E. coli* 47) ont été utilisées comme témoins.

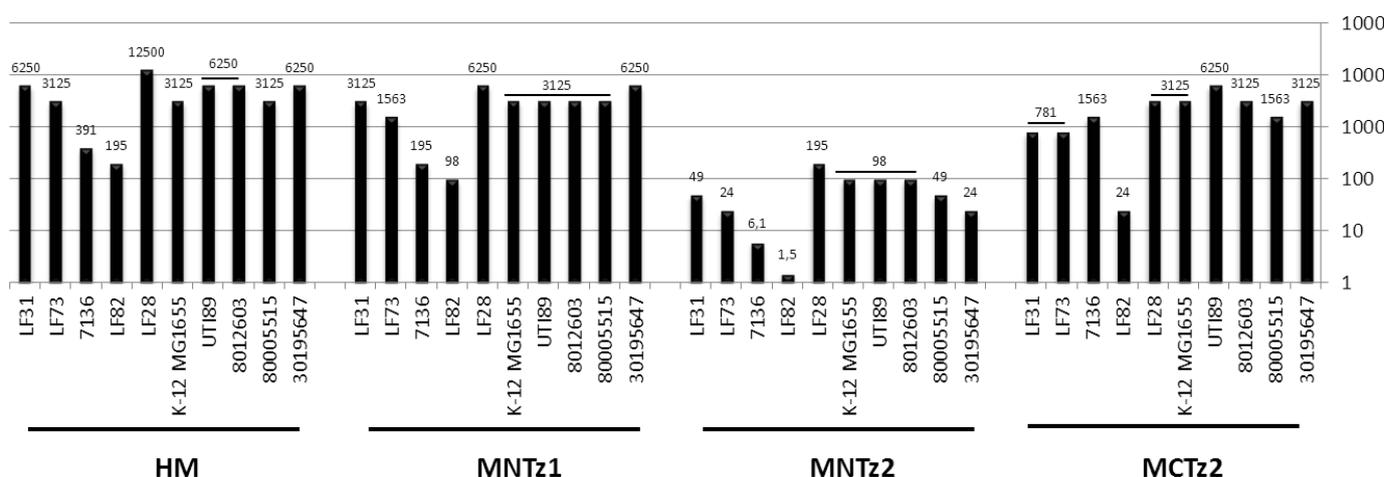


Figure 45 : Inhibition de l'hémagglutination obtenue sur différentes souches bactériennes d'*E. coli*, avec les TazMan de première génération.

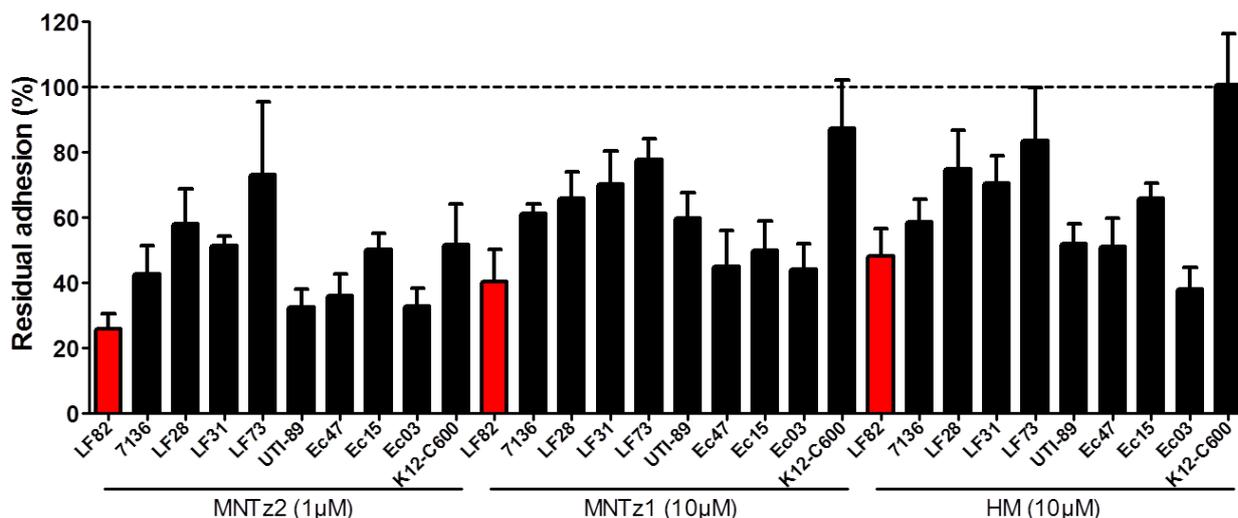


Figure 46 : Pourcentage d'adhésion résiduelle de différentes souches d'*E. coli*, sur les cellules intestinales T84 après traitement par une concentration de 1µM de MNTz2 ou de 10µM de MNTz1 et HM, suivant le protocole de pré-incubation.

Les produits se sont tous révélés actifs sur les différentes souches malgré la diversité de leur provenance. La seule exception est la souche non pathogène K-12 qui n'a pas été inhibée par HM. Ces résultats suggèrent que les inhibiteurs de FimH pourraient être utilisés pour traiter différents types de pathologie impliquant l'adhésion d'*E. coli*, comme les infections urinaires, MC ou infections ostéo-articulaires.

Ces analyses montrent que les TazMans et HM ont des propriétés antiadhésives présentant des profils identiques quel que soit la souche bactérienne ciblée avec **MNTz2>>MNTz1=HM**. Pour chaque souche, le pouvoir inhibiteur relatif de chaque composé est conservé. L'évaluation relative de plusieurs inhibiteurs peut donc être effectuée sur une seule souche d'*E. coli*, réduisant ainsi le coût et la durée des études.

Finalement on peut aussi remarquer la grande variabilité des résultats sur des souches provenant de patients ayant la même pathologie. En effet, LF82 et LF73 répondent différemment à l'utilisation d'une même concentration d'inhibiteur, ce qui compliquera le calcul d'une dose efficace lors d'un traitement potentiel.

#### D. Discussion et perspectives

Les TazMans de seconde génération se sont révélés être des inhibiteurs sub-micromolaires de FimH, par ELISA et par hémagglutination. Les études d'inhibition de l'adhésion de LF82 sur

cellules T84 ont quant à elle montré des résultats prometteurs pour certains composés, avec des effets antiadhésifs significativement meilleurs que HM, qui est pourtant un inhibiteur nanomolaires de FimH.

Nous avons montré que la modification de la liaison sucre/hétérocycle, si elle a permis d'obtenir une meilleure stabilité, a en revanche provoqué une perte d'affinité pour FimH. La raison pourrait être le placement du thiazole dans le site actif, à cause du nombre d'atomes, ou d'angles de liaisons différents. Il semble également que la liaison hydrogène formée avec l'azote anomérique des composés de première génération ai son importance en participant à l'affinité.

Tous les C-glycosides obtenus lors de cette étude présentent une constante de couplage  $^1\text{H}$   $^3\text{J}_{1-2}$  de l'ordre de 6 Hz. Cette valeur ne correspond pas à une conformation  $^1\text{C}_4$  (1 à 2Hz) ou à une conformation  $^4\text{C}_1$  (9 à 11Hz) mais résulte probablement d'un équilibre dynamique entre ces deux formes. La propension du composé à exister sous forme  $^1\text{C}_4$  pourrait également impliquer une diminution de l'affinité, puisqu'une partie du composé n'est pas dans la conformation optimale pour établir une interaction avec FimH.

La présence du motif **Tz2** induit des interactions permettant d'obtenir des  $\text{IC}_{50}$  de l'ordre de la centaine de nanomolaire ainsi qu'une inhibition de l'adhésion des AIEC sur les cellules T84 supérieure à 80% pour des concentrations de  $10\mu\text{M}$ . Pour la suite du projet, nous avons décidé de prioriser ces **Tz2** qui présentent une amélioration d'affinité pour FimH vis-à-vis des **Tz1**. Parmi les TazMan de seconde génération, les dérivés **MCSTzX** semblent intéressants. Cependant, la méthodologie de synthèse convergente développée ne permet pas une diversification facile.

Les autres composés ont montré des affinités pour FimH ainsi que des propriétés antiadhésives comparables, c'est pourquoi nous nous sommes basés sur la facilité de synthèse et de diversification, pour choisir les cibles suivantes. Les composés de type **MCTzX** sont obtenus selon une méthodologie robuste et possèdent une structure plus proche de la première génération de TazMans.

La série **MCNTzX** peut être également synthétisée sans grande difficulté. En particulier, l'étape critique d'addition/cyclisation s'effectue avec de meilleurs rendements que pour la

série **MCTzX**. Par contre, **MCNTz2** a montré une affinité pour FimH plus faible lors des tests ELISA ( $IC_{50} = 194$  nM).

De plus, ces deux familles sont des C-glycosides et présenteront donc la meilleure stabilité dans les conditions physiologiques. Pour ces différentes raisons, elles ont été sélectionnées pour passer à l'étape suivante de ce travail de thèse qui consiste à améliorer leur hydrosolubilité et leurs propriétés pharmacocinétiques pour un traitement oral de la MC.



#### **IV. Composés hydrosolubles**

## A. Stratégie

### 1. Introduction

Les composés les plus affins pour FimH possèdent des pharmacophores conjugués comme la thiazolypyrazine (**Tz2**). Ils sont relativement hydrophobes et peu solubles dans l'eau ce qui est problématique pour une administration orale. De plus, leur faible solubilité introduit des doutes quant aux résultats obtenus *in vivo*, notamment les études de biodisponibilité.

D'autre part, l'hydrophilie étant un facteur défavorable au passage à travers les membranes intestinales, son augmentation devrait permettre l'obtention de composés encore moins enclins à passer dans le système circulatoire. C'est pourquoi il est impératif d'augmenter l'hydrosolubilité apparente des inhibiteurs synthétisés.

Afin de tendre vers cet objectif, nous avons envisagé deux stratégies. La première consiste à inclure la partie hydrophobe des TazMans dans des cœurs cyclodextrines et la deuxième à fonctionnaliser les inhibiteurs par des groupements hydrosolubilisants.

### 2. Inclusion dans des cyclodextrines

#### a) Introduction

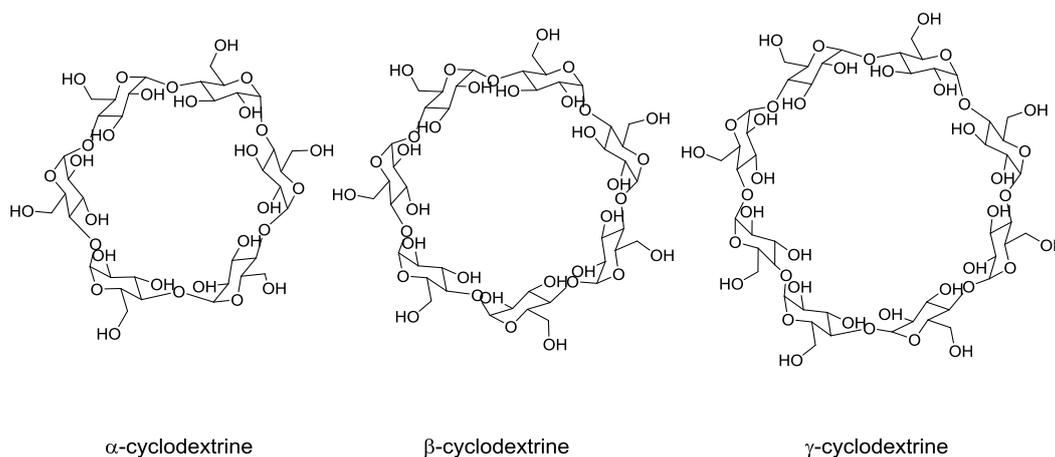


Figure 47 :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -cyclodextrines.

Les cyclodextrines (CD)<sup>131</sup> sont des hydrates de carbone cycliques constituées d'unités glucose liées en 1-4 avec une structure tridimensionnelle en forme de cône tronqué. Différentes cyclodextrines existent, les plus communes étant l' $\alpha$ -cyclodextrine, avec six unités glucose (Figure 47) et une cavité de 4,5 Å, la  $\beta$ -cyclodextrine et la  $\gamma$ -cyclodextrine, qui

en possèdent respectivement 7 et 8, pour des cavités de 7 et 8.5 Å. Ces structures ont été utilisées de manière intensive pour l'encapsulation de composés hydrophobes.

En effet, les cyclodextrines possèdent une face extérieure polaire, due à la présence des hydroxyles des sucres et une cavité interne apolaire, créée par la présentation de la face  $\beta$  de chaque sucre, constituée uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène.

Ces propriétés d'inclusion ont été utilisées pour de nombreuses applications en pharmacologie, comme la protection de composés sensibles ou leur solubilisation,<sup>132,133</sup> ainsi que pour réguler la concentration effective de molécules biologiquement actives.<sup>134</sup> Les cyclodextrines sont dégradées en glucose par l'amylase<sup>135</sup> ou le microbiote intestinale<sup>136</sup> et leur innocuité biologique en a fait un excipient de choix dans le domaine médical et en agroalimentaire.<sup>136</sup>

Les cyclodextrines peuvent être fonctionnalisées sélectivement puisqu'elles comportent des hydroxyles primaires et secondaires. Cette possibilité peut être mise à profit pour augmenter leur hydrosolubilité et/ou la taille de la cavité. En effet, si l' $\alpha$ - et la  $\gamma$ -cyclodextrine sont relativement solubles dans l'eau (145 et 232 g/L), la  $\beta$ -cyclodextrine forme des liaisons hydrogènes intramoléculaires qui réduisent significativement sa solubilité (18,5 g/L). La méthylation aléatoire des hydroxyles évite ces liaisons internes et favorise les interactions avec l'eau, ce qui augmente l'hydrosolubilité.

### *b) Utilisation avec les TazMans*

#### *(1) Protocoles pour MNTz2*

Dans un premier temps, nous avons effectué des essais d'inclusion du composé **MNTz2** qui possède la plus forte affinité pour FimH mais une solubilité et une stabilité chimique en milieu aqueux faibles. Pour cela, nous avons solubilisé **MNTz2** et la CD en proportion 1 :1 ou 1 :4 dans le DMSO, puis ajouté 10 volumes d'eau. En présence d' $\alpha$ - ou de  $\beta$ -cyclodextrines, on observe une précipitation immédiate de **MNTz2**. Par contre, avec la  $\gamma$ -cyclodextrine la solution reste limpide. Cette solution a donc été lyophilisée afin d'éliminer le DMSO et le solide obtenu peut alors être solubilisé uniquement dans l'eau sans précipitation.

Ce protocole nous a permis de solubiliser 7.1 mg.mL<sup>-1</sup> de **MNTz2**, ce qui représente une amélioration considérable de l'hydrosolubilité par rapport au composé pur (quasi-insoluble).

La solution peut être conservée pendant 10 jours à 20°C avant d'observer une légère précipitation de **MNTz2** (filtré et analysé par RMN). Nous postulons ainsi qu'il existe un équilibre dynamique entre la forme libre du **MNTz2** et du complexe  $\gamma$ -CD/**MNTz2**, suggérant ainsi qu'un transfert de **MNTz2** de la cyclodextrine vers FimH devrait être possible.

La constante de complexation et la stœchiométrie des complexes peuvent généralement être déterminées par dosage RMN<sup>137</sup> en suivant l'évolution des déplacements chimiques en fonction de la proportion hôte/invité.

Dans notre cas, l'insolubilité de **MNTz2** rend cette étude difficile puisqu'une proportion 1 :1 entre le TazMan et la  $\gamma$ -CD est le rapport impératif pour obtenir une solubilité acceptable, et par conséquent un spectre RMN. Une variation des déplacements chimiques des protons de la  $\gamma$ -CD est cependant observée entre les spectres de l'hôte seul et du complexe  $\gamma$ -CD/**MNTz2** en proportion 1 : 1 ou 2 : 1. Un dédoublement des signaux correspondrait à une durée de vie des deux formes « hôte + invité » et « hôte/invité » de l'ordre de la durée de l'acquisition. Nous n'observons en revanche qu'un seul signal moyenné, ce qui permet de conclure que le complexe est en équilibre rapide par rapport à l'échelle de temps de la RMN.

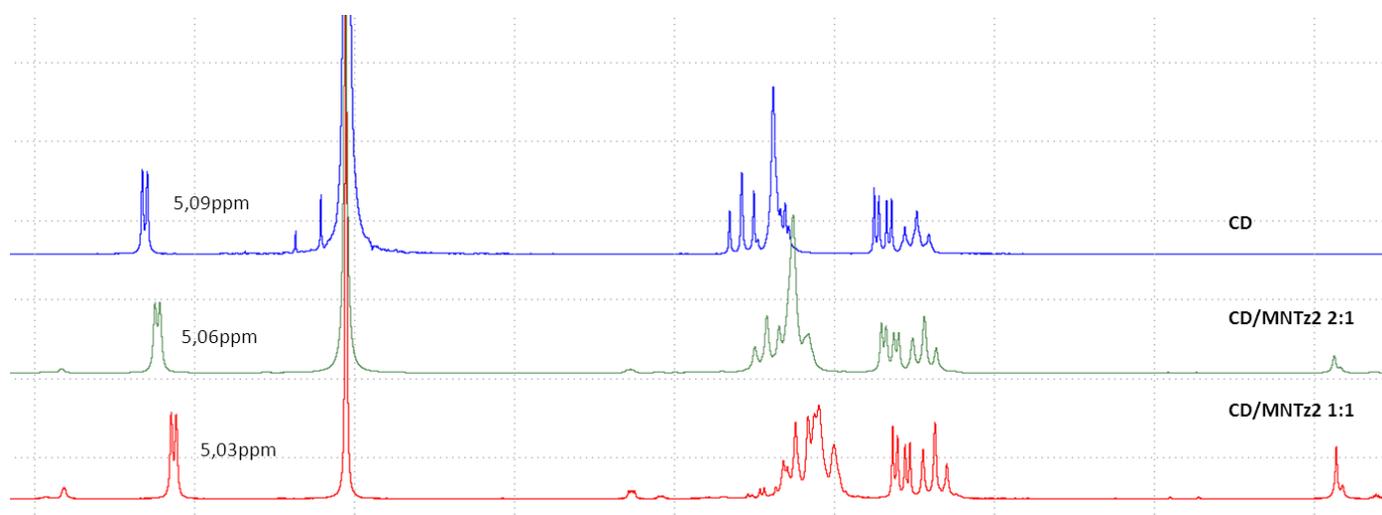


Figure 48 : Spectres RMN de la  $\gamma$ -CD seule et en présence de 0,5 et 1 équivalent de **MNTz2** : un déplacement chimique moyen est observé. L'augmentation de la proportion de TazMan entraîne une variation du déplacement chimique.

## (2) Adaptation aux structures **MCTz2** et **MCNTz2**

Ces résultats encourageant nous ont conduits à encapsuler dans un deuxième temps les analogues C-glycosylés **MCTz2** et **MCNTz2**. En utilisant un protocole identique, nous avons

formé les complexes **MCNTz2/γCD** et **MCTz2/γCD** (1 :1). Si le complexe **MCNTz2/γCD** est soluble, **MCTz2/γCD** précipite après seulement 10 minutes dans l'eau.

Nous avons attribué cette différence de comportement à la présence de l'atome d'azote qui interagirait probablement avec les hydroxyles de la CD et prolongerait ainsi le temps de résidence de l'inhibiteur au sein de l'hôte.

Les complexes de **γ-CD**, **MCNTz2/γ-CD** et **MNTz2/γ-CD** ont été dilués à la concentration maximale de 50mM. Après 48h de conservation à 4°C, une précipitation dans l'échantillon de **MCNTz2/γ-CD** a été observée. Il est donc préférable d'utiliser des solutions fraîchement préparées.

### *c) Evaluations biologiques*

#### (1) HIA et ELISA

De la même façon que pour les TazMans, les inhibiteurs encapsulés ont été évalués par ELISA et HIA. En premier lieu nous avons confirmé que la cyclodextrine seule n'a pas d'activité sur l'inhibition de FimH.

Les expériences de HIA n'ont montré aucune différence entre l'utilisation des TazMans libres ou complexés avec la cyclodextrine. En revanche, d'importantes variations sont mises en évidence par les tests ELISA. Ces différences sont cependant peu cohérentes, puisque l'affinité de **MCNTz2** se trouve améliorée par l'ajout de **γ-CD**, alors que l'affinité de **MNTz2** est considérablement moins forte.

	ELISA (IC <sub>50</sub> en nM)	HIA sur UTI89 (MIC en nM)
CD	Pas d'inhibition	Pas d'inhibition
MNTz2	43	6,1
MCNTz2	166	97,7
MNTz2/CD	109	6,1
MCNTz2/CD	135	97,7

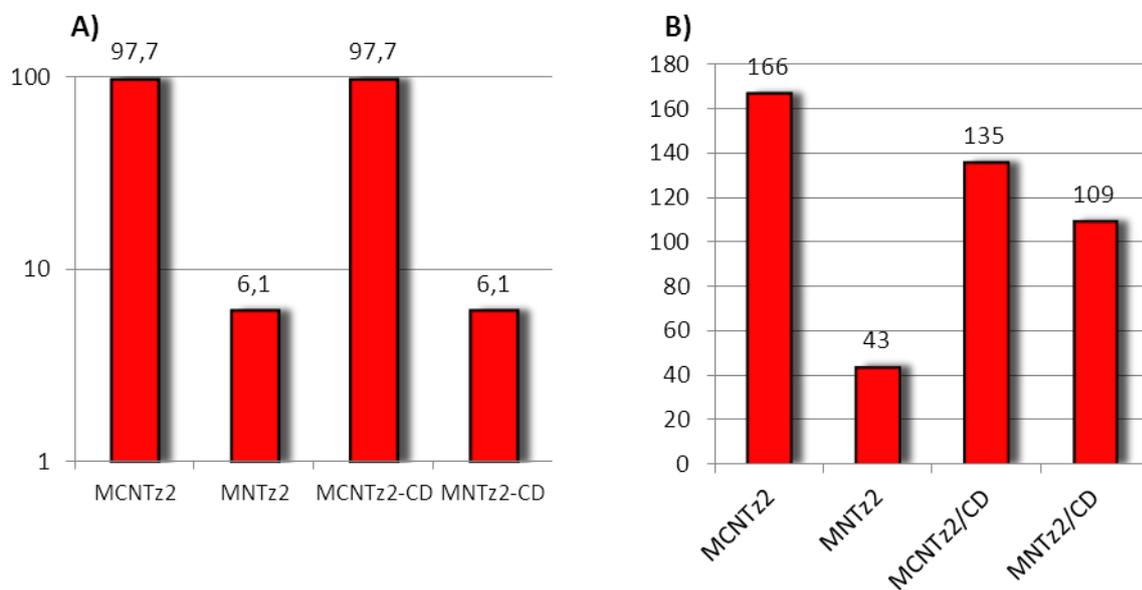


Figure 49 : A) Titres d'hémagglutination des complexes en nM sur les bactéries UTI89 B) IC<sub>50</sub> des complexes de cyclodextrine en nM, par ELISA.

## (2) Tests cellulaires

L'inhibition de l'adhésion de LF82 aux cellules T84 par les complexes de CD a ensuite été évaluée. Un premier test avec une concentration de 50µM indique une efficacité identique des composés complexés ou non. Pour avoir des informations plus fines, nous avons utilisé une échelle de cinq concentrations, afin de tracer une courbe effet-dose (Figure 50) et pouvoir ainsi déterminer une IC<sub>50</sub>.

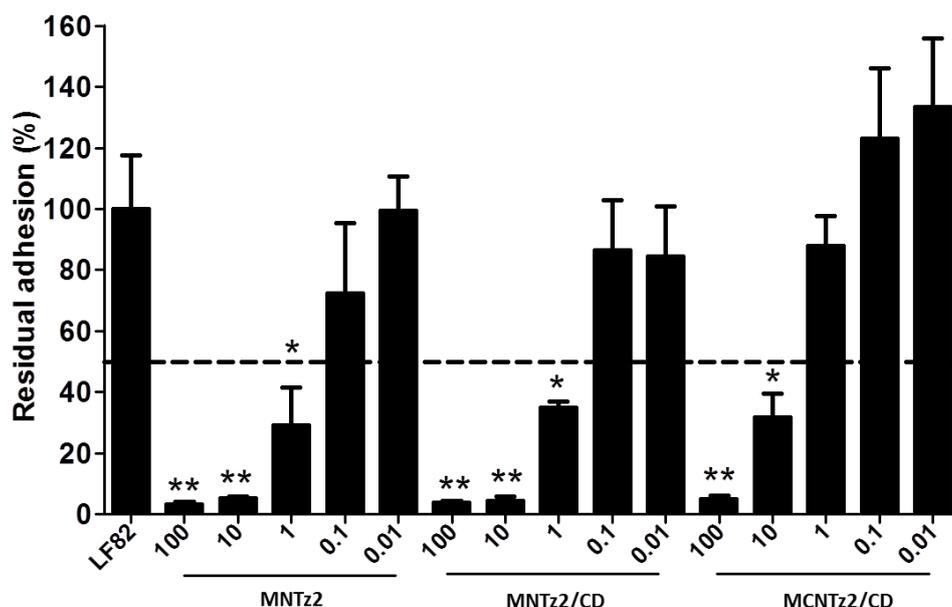


Figure 50 : Pourcentage d'adhésion résiduelle des bactéries LF82 en fonction de la concentration d'inhibiteur utilisé (100, 10, 1, 0.1 et 0.01 μM).

Les IC<sub>50</sub> ont été calculées, et sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Composé	IC <sub>50</sub> (μM)
MNTz2	0,73
MNTz2/CD	0,74
MCNTz2/CD	2,12

Tableau 1 : IC<sub>50</sub> des complexes TazMan/CD.

Les résultats obtenus révèlent que l'encapsulation dans la cyclodextrine ne réduit pas l'efficacité des composés puisque nous obtenons une IC<sub>50</sub> de 730 nM, similaire à celle du composé libre. Les courbes effet-doses indiquent également qu'il existe un facteur 3 entre l'IC<sub>50</sub> de **MNTz2/CD** et de son analogue carboné **MCNTz2/CD** dont l'IC<sub>50</sub> est de 2,12μM. La perte d'affinité est donc significative mais le composé **MCNTz2** reste quand même très actif dans ce test cellulaire.

L'encapsulation par la γ-CD est une première solution efficace pour solubiliser nos TazMans. Cette solubilisation a notamment permis d'obtenir une structure cristallographique du composé **MNTz2** inclus dans FimH. Le complexe **MNTz2/γ-CD** a été mis en présence de protéine FimH purifiée, puis les monocristaux **MNTz2/FimH** ont été isolés après dialyse de la cyclodextrine. La structure cristallographique a été résolue par le Dr Julie Bouckaert, et sera discutée par la suite.

## A. Introduction d'un groupement hydrosoluble

L'introduction d'un fragment hydrosoluble sur la pyrazine permettrait également d'augmenter l'hydrosolubilité de la molécule, sans *a priori* modifier significativement son activité puisque ce nouveau fragment se situerait à l'extérieur du site de reconnaissance de FimH.

Cependant, la pyrazine étant difficilement fonctionnalisable nous avons préféré la remplacer par un triazole qui semble un mime acceptable. Ce type d'hétérocycle peut être facilement construit par cyclisation 1,3-dipolaire de Huisgen (CuAAC) et permet en même temps d'introduire un groupement hydrophile.

### 1. Stratégie de synthèse générale

Pour l'élaboration de ces molécules **MXTz3**, nous allons synthétiser une cétone  $\alpha$ -halogéné, substituée par un 4-méthylthiazole, afin d'effectuer la réaction d'addition/cyclisation avec les composés **43** ou **63** (Schéma 57). Le méthylthiazole devra être substitué par un alcyne, précurseur d'un triazole par réaction avec un azoture.

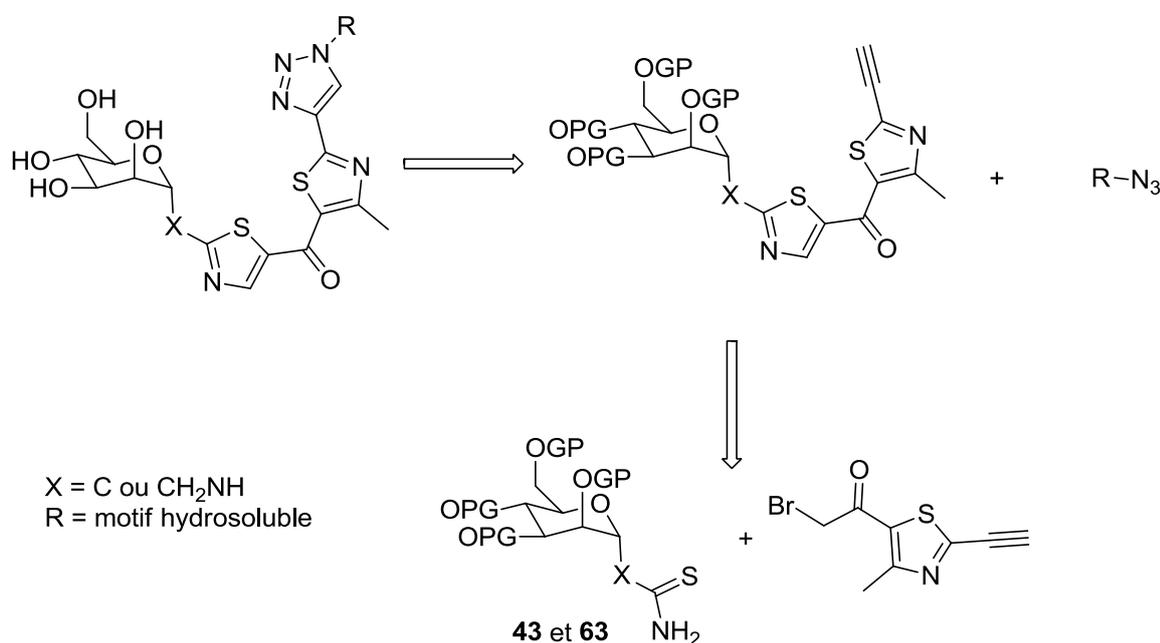


Schéma 57 : Rétrosynthèse des composés de type MXTz3-R.

## 2. Synthèse de l'acétylthiazole $\alpha$ -halogénée

### a) Introduction de l'alcyne avant la cyclisation

Nous avons tout d'abord envisagé de synthétiser un thioamide avec une triple liaison, à partir de l'acide correspondant (Schéma 58). Ce composé pourrait être ensuite utilisé afin de réaliser la séquence addition/cyclisation avec du diméthylacétamide-diméthylacétal (DMA-DMA) pour former le thiazole fonctionnalisé.

L'éthynyltriméthylsilane est déprotoné par action de BuLi (Schéma 58), puis un bullage de CO<sub>2</sub> permet l'obtention de l'acide 3- (triméthylsilyl)propanoïque **79**. Après son activation sous forme de chlorure d'acide, un bullage d'ammoniac donne l'amide correspondant **80** avec un rendement de 66% sur les deux étapes. Une réaction de sulfuration avec le pentasulfure de phosphore conduit au thioamide **78**. L'étape de condensation du DMA-DMA est généralement très rapide et se caractérise par une coloration rouge intense, qui disparaît après l'ajout de la cétone  $\alpha$ -halogénée. Malheureusement l'étape de cyclisation n'a pas fonctionné malgré les différents essais et seul l'intermédiaire de condensation du DMA-DMA a pu être observé.

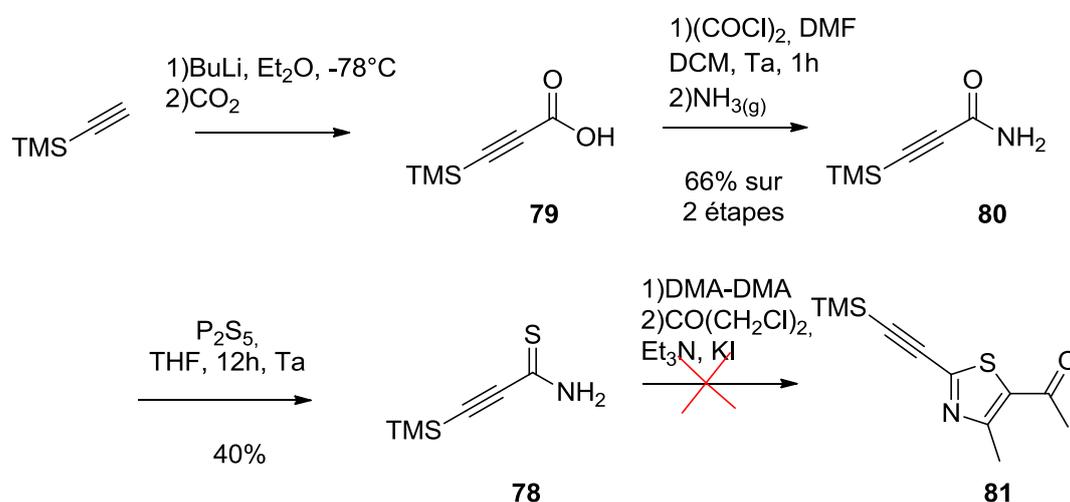


Schéma 58 : Stratégie de synthèse du composé **81**.

### b) Introduction de l'alcyne par réaction de Sandmeyer puis de Sonogashira

Nous avons ensuite envisagé la construction d'un thiazole halogéné en position 2 afin de permettre un futur couplage de Sonogashira pour introduire l'alcyne.



Nous avons alors fait le couplage de Sonogashira avant la bromation de **85**. Le composé **81** a bien été obtenu, cependant tous les essais de bromation en  $\alpha$  de la cétone on conduit à une dibromation de l'alcyne caractéristique en spectroscopie de masse (Schéma 61).

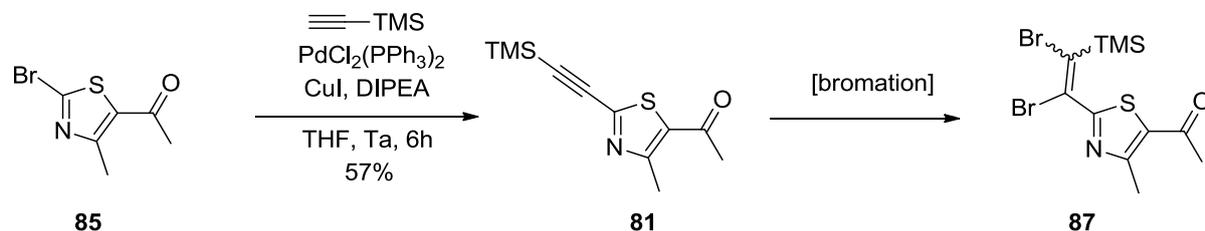


Schéma 61 : Couplage de Sonogashira et tentatives de bromation.

### c) Cyclisation

Nous avons de nouveau changé de stratégie en préparant d'abord le sucre fonctionnalisé par les deux thiazoles pour faire le couplage de Sonogashira à la fin. Pour cela, le composé **86** est engagé dans l'étape de cyclisation avec le thioamide **43**, après condensation du DMF-DMA et ajout de DIPEA (Schéma 62). Malgré de nombreux essais en changeant les conditions opératoires (solvant, température et temps de réaction) nous n'avons pas isolé le composé **88** attendu. Les réactions de cyclisation avec le thioamide **43** sont très dépendantes de la cétone  $\alpha$ -halogéné utilisée comme nous avons pu le constater par la suite. Comme attendu, la thiourée **63** s'est avérée plus réactive et le produit de cyclisation **89** a pu être obtenu avec un rendement de 80%.

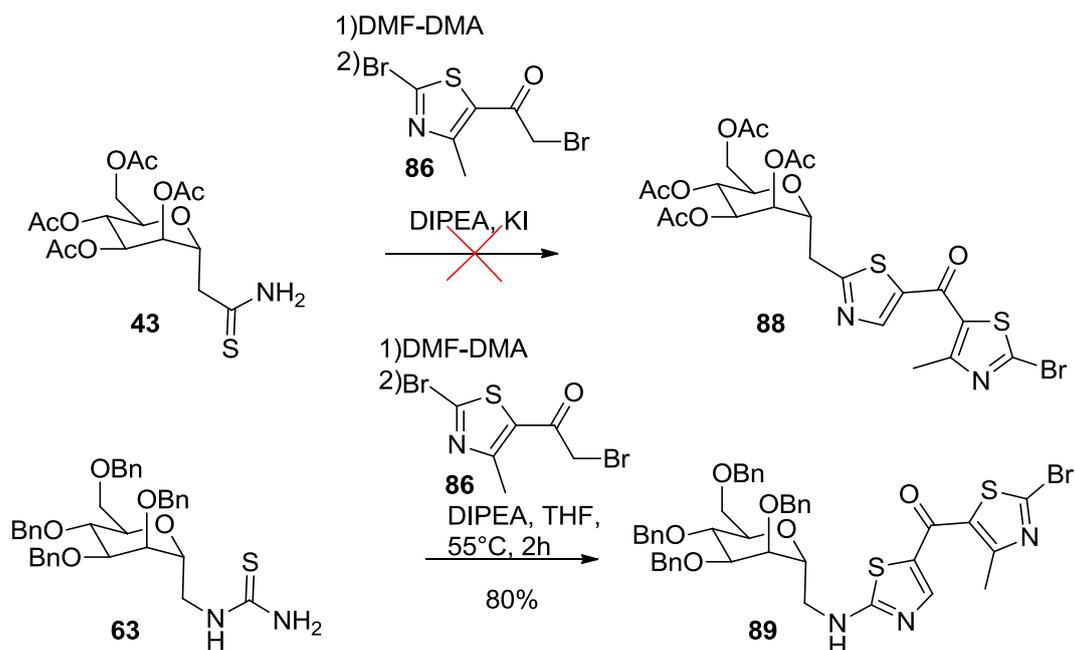


Schéma 62 : Cyclisation à partir du composé **86** et des sucres **43** ou **63**.

Le dérivé bromé **89** est ensuite engagé dans un couplage de Sonogashira, avec l'éthynyltriméthylsilane pour conduire à l'alcyne **90** avec un rendement de 61%. Le groupement TMS est éliminé par un traitement basique dans le méthanol pour fournir l'intermédiaire de chimie « click » **91** (Schéma 63).

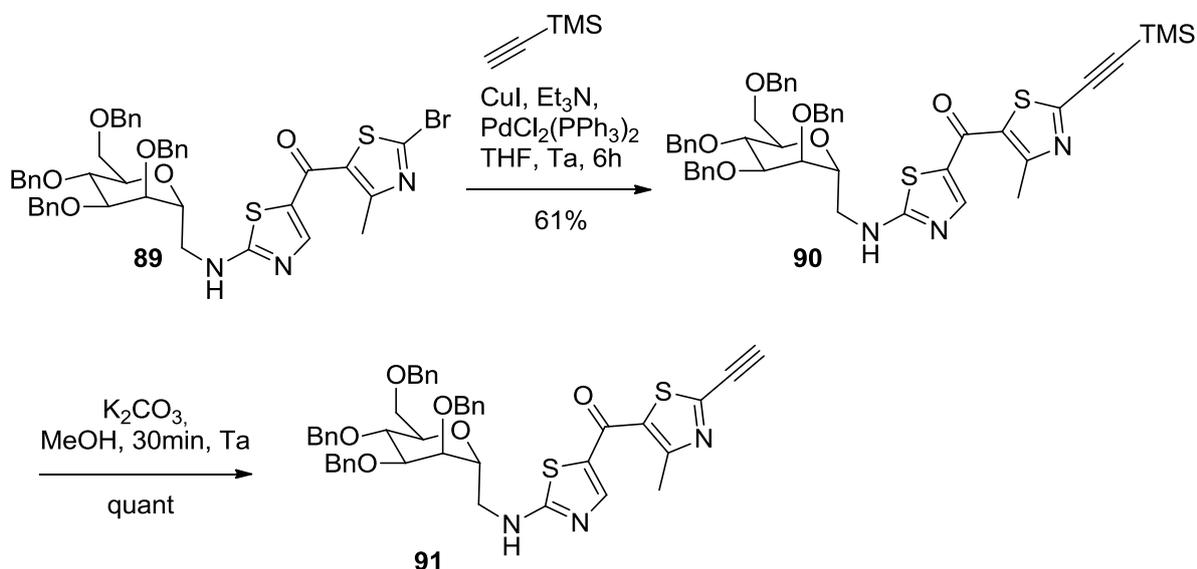


Schéma 63 : Couplage de Sonogashira puis déprotection de l'alcyne, obtention d'un synthon de chimie click.

### 3. Chimie click

#### a) Préparation d'un composé de référence

Avant de « clicker » un composé apportant l'hydrosolubilité recherchée, nous avons synthétisé un analogue du composé **MCNTz2** où le triazole vient remplacer le noyau pyrazine. Ce composé aura pour but de déterminer l'impact de cette modification structurale sur l'affinité de FimH (Schéma 64).

Le triazole est synthétisé dans le DMF par réaction du composé **91** avec le triméthylsilylazide en présence d'une quantité catalytique d'iodure de cuivre (I). Ce protocole permet l'obtention du produit attendu **92** avec un rendement de 49%. Après déprotection par traitement au  $\text{BCl}_3$  et purification par chromatographie sur phase C-18, **MCNTz3-H**, également peu soluble dans l'eau, est obtenu

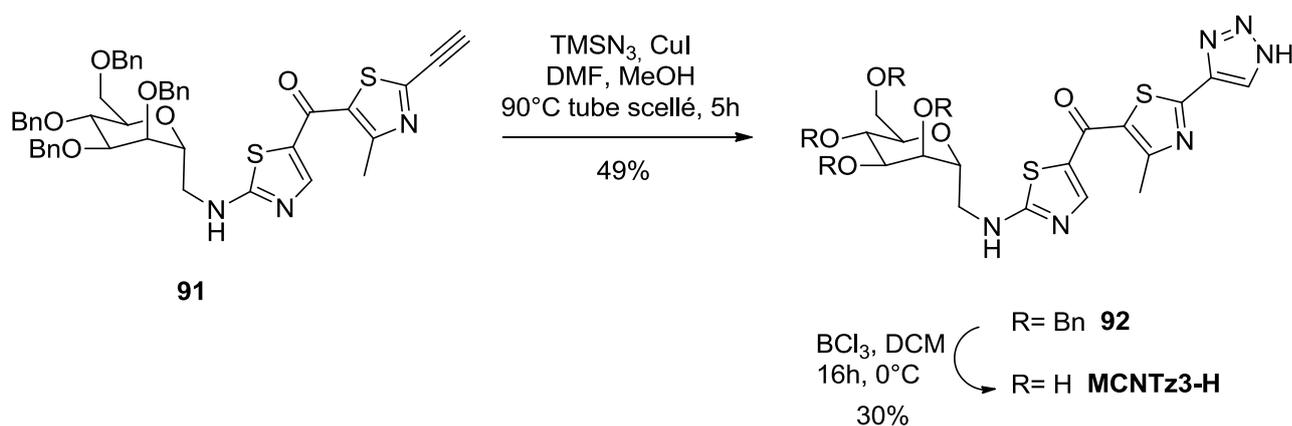


Schéma 64 : Synthèse du triazole libre par réaction avec  $\text{TMSN}_3$ .

#### b) Introduction de sucres

Afin de former des composés hydrosolubles, notre choix s'est principalement porté sur l'utilisation de sucres et nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur les dérivés du mannose.

Nous sommes déjà en possession du C-glycoside **60**, qui comporte un azoture sur le carbone anomérique et qui pourra être utilisé comme partenaire de couplage. Cependant, même s'il n'est a priori pas envisageable de considérer le composé final comme un ligand divalent pour des raisons stériques, l'introduction du deuxième mannose risquerait d'apporter un nouveau

mode de liaison avec FimH qui pourrait alors se lier par l'une ou l'autre des extrémités de la molécule.

Afin d'évaluer l'importance de ce paramètre, nous avons également synthétisé le mannose **93** (Schéma 65) qui permettra un greffage en position 6, ce qui exclut une reconnaissance de ce synthon par FimH. Pour le préparer, nous sommes partis du méthyl- $\alpha$ -D-mannose dont la position 6 est activée sélectivement par un tosyle dans la pyridine. Le tosylate obtenu réagit ensuite avec de l'azoture de sodium dans le DMF, puis les hydroxyles sont acétylés pour faciliter la purification. Le composé **93** est obtenu avec un rendement de 65% sur les trois étapes. Il est également possible de remplacer les acétyles par des benzyles pour former le produit **94**, ce qui permettra de n'effectuer qu'une étape de déprotection en fin de synthèse

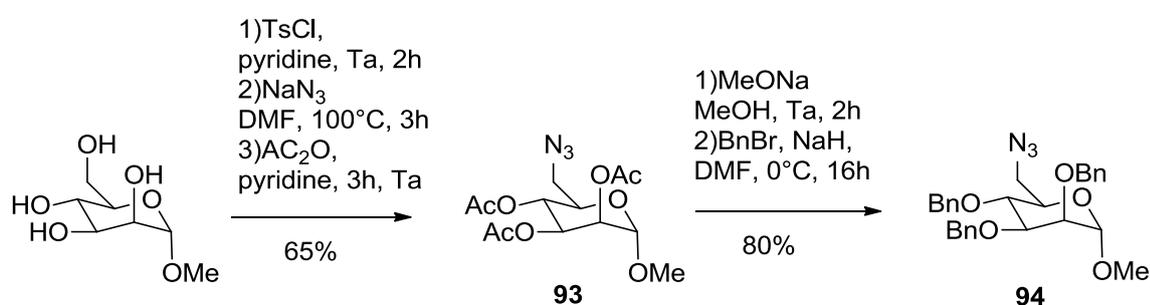


Schéma 65 : Préparation du partenaire de chimie click.

Les composés **60**, **93** et **94** ont été engagés dans la formation du triazole par une réaction de CuAAC sur **91** catalysée par des nanoparticules de cuivre supportées sur graphite. Ce catalyseur développé récemment par une équipe de notre laboratoire<sup>138</sup> réduit sensiblement la contamination au cuivre par rapport à l'approche classique. Cette réaction a permis la formation des thiazoles **95**, **96** et **97** (Schéma 66).

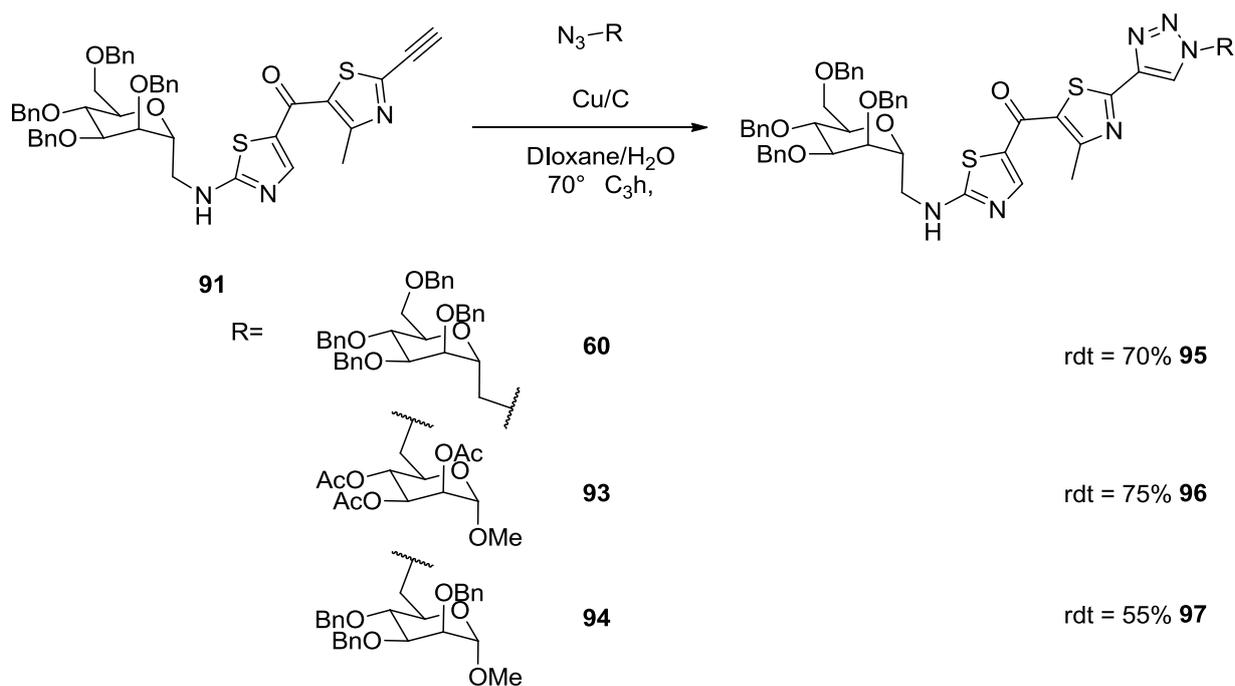


Schéma 66 : Introduction de mannosides par chimie click.

Le composé **95** est déprotégé par l'utilisation de  $\text{BCl}_3$  pour accéder au composé **MCNTz3-1Man** avec un rendement de 70%. **96** est quant à lui débenzylé par  $\text{BCl}_3$ , puis déacétylé par une résine Amberlyste® IRN-72. Le composé s'est malheureusement adsorbé sur cette résine et nous n'avons pas réussi à le récupérer.

Finalement, le dimannose perbenzylé **97** est déprotégé efficacement par  $\text{BCl}_3$ . Cependant, nous obtenons un mélange d'anomères au niveau du sucre fixé en position 6. Nous supposons que  $\text{BCl}_3$  a conduit à la déprotection de la position anomérique, permettant ainsi à un équilibre de s'établir entre les deux anomères. Cette position serait reprotégée lors de l'hydrolyse finale des sels de bore par du méthanol qui produit un dégagement d' $\text{HCl}$ . Ceci pourrait catalyser une glycosylation de type Fisher, conduisant à **MCNTz3-6man** sous forme de ce mélange. Ce dernier produit n'a pas encore pu être obtenu totalement pur et devra être repurifié.

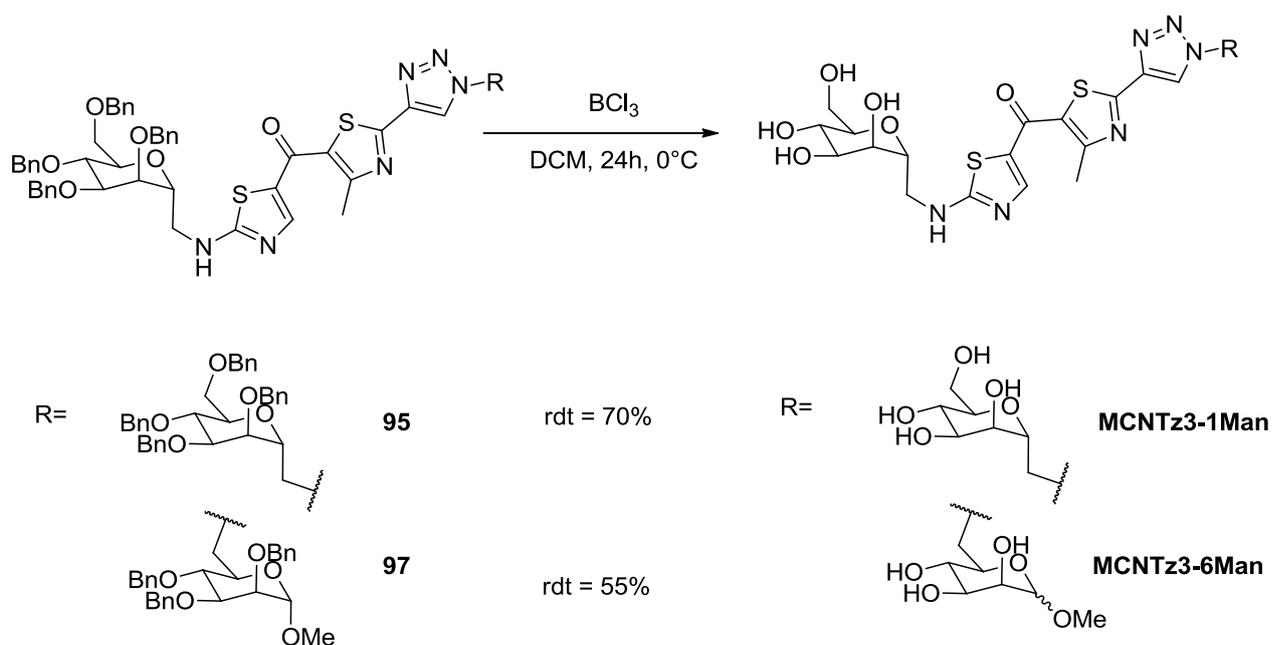


Schéma 67 : Déprotection des sucres pour obtenir MCNTz3-1Man et MCNTz3-6Man.

### c) Utilisation d'un sel de DABCO

Les molécules avec une charge permanente, comme les sels d'ammonium quaternaires, présentent également une forte hydrosolubilité. Nous avons voulu introduire un chlorhydrate de DABCO sur nos molécules, avec un espaceur de type éthylène glycol (EG), qui permet d'éloigner la charge positive du site actif.

Nous utilisons le diéthylène glycol **98**, fonctionnalisé aux deux extrémités par un azoture et un mésyle. Celui-ci est formé par monomésylation dans le dichlorométhane avec 10 équivalents de diéthylène glycol, suivit par une substitution du mésyle par l'azoture de sodium, puis finalement par mésylation de l'alcool libre.

La chaîne EG est greffée sur le thiazole **91** pour donner le composé **99** (Schéma 68). Le DABCO est ajouté par substitution du mésylate et finalement une métathèse d'anion est réalisée pour obtenir un chlore comme contre-ion. Le produit **100** est obtenu avec un rendement de 27% et présente un fort caractère tensio-actif, conduisant à des émulsions très stables en présence d'eau. Ces propriétés rendent difficiles son analyse par RMN mais la structure a été validée par spectrométrie de masse.

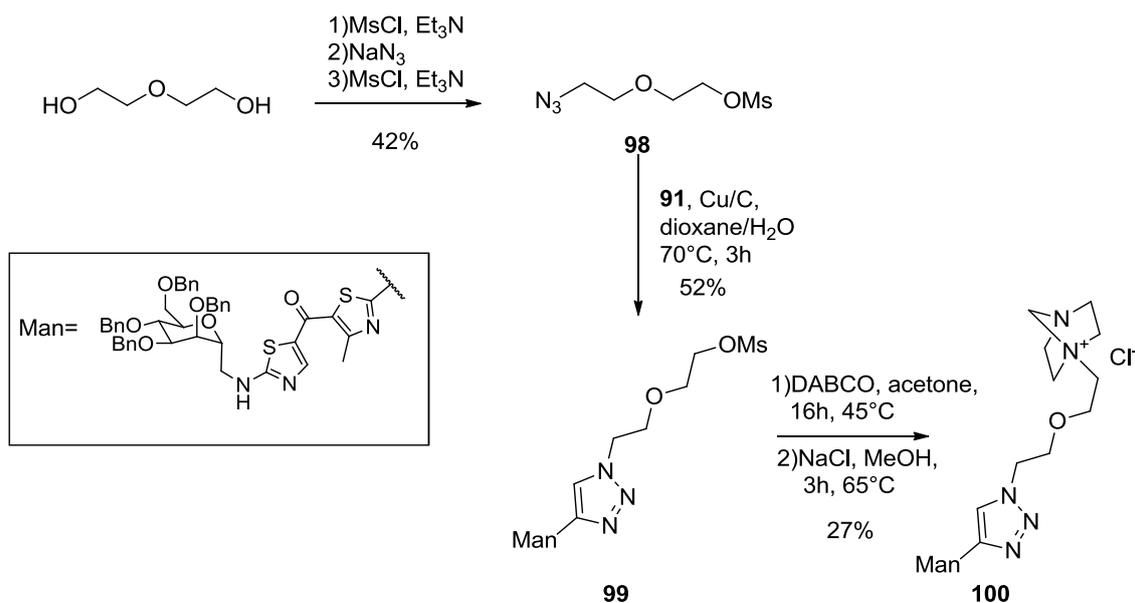


Schéma 68 : Préparation du composé BnMCNTz3-DABCO.

Ce composé sera déprotégé en présence de  $\text{BCl}_3$ , pour conduire au composé **MCNTz3-DABCO**.

#### 4. Évaluation biologique

Ces composés seront évalués de la même manière que les TazMans précédents, par ELISA, HIA et par test cellulaire. Actuellement, seuls les molécules **MCNTz3-H** et **MCNTz3-1Man** ont pu être évaluées sur l'adhésion de LF82 aux cellules épithéliales intestinales à une concentration de  $50\mu\text{M}$ . Cette concentration est trop importante et l'évaluation sera réalisée une nouvelle fois avec une concentration plus adaptée. Les premiers résultats indiquent que le remplacement de la pyrazine par un triazole n'a pas d'effet négatif sur l'affinité pour FimH.



## **V. Conclusion et perspectives**

## A. Conclusion générale

FimH est une lectine située à l'apex des *pili* de type 1 capable de reconnaître l' $\alpha$ -D-mannose. Cette spécificité permet notamment aux bactéries *E. coli* UPEC et AIEC de se lier aux récepteurs mannosylés présents sur la glycocalice cellulaire et d'entamer un processus d'internalisation. Dans le cadre de la maladie de Crohn, les AIEC se fixent aux récepteurs cellulaires CEACAM6 puis, une fois internalisées, vont générer des processus inflammatoires causant un affaiblissement de la barrière intestinale.

La stratégie antiadhésive qui consiste à contrer le potentiel adhésif des bactéries en inhibant leurs lectines, a déjà permis de réduire le nombre de bactéries AIEC LF82, ainsi que les symptômes de colite dans un modèle murin. Les composés utilisés présentent cependant l'inconvénient de passer les barrières intestinales. Ils sont retrouvés dans la circulation sanguine où ils pourraient établir des interactions non spécifiques et provoquer des effets secondaires.

Récemment, une nouvelle famille d'inhibiteurs a été développée sur une structure de thiazolylmannoside et a montré d'importantes affinités pour la lectine FimH.

Ces TazMans de première génération présentaient un manque de stabilité en position anomérique qui conduit à la formation de l'isomère  $\beta$  en milieu acide, peu compatibles avec une administration orale.

Lors de cette thèse, nous avons tout d'abord tenté de modifier le TazMan de 1<sup>ère</sup> génération le plus efficace en remplaçant l'azote anomérique par d'autres hétéroatomes tels que l'oxygène ou le soufre. Ces composés étant sujets à une hydrolyse rapide sous leur forme déprotégée, nous avons alors préparé le C-glycoside correspondant **MCT<sub>z</sub>1**. Dans un second temps, nous avons fait varier la longueur de l'espaceur entre le sucre et le thiazole dans le but de rapprocher l'hétérocycle de la tyrosine gate et d'améliorer le recouvrement  $\pi$  avec la Tyr48.

Neuf composés ont été synthétisés puis évalués comme inhibiteur de FimH par ELISA et comme inhibiteurs de l'adhésion bactérienne par HIA et par inhibition de l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales T84. Ces évaluations ont confirmé la puissance de cette famille d'inhibiteurs, notamment celle portant un fragment thiazolylpyrazine (**Tz2**). De

plus, la modification de la position anomérique a donné des composés stables en condition acide. Cette stabilité s'accompagne d'une perte d'efficacité par rapport aux composés de première génération et est probablement liée au caractère donneur de liaison hydrogène de l'atome d'azote anomérique.

Dans un second temps, les propriétés pharmacologiques des TazMans ont été améliorées en suivant deux stratégies. En formant un complexe d'inclusion dans une  $\gamma$ -cyclodextrine, nous avons obtenu des formulations hydrosolubles, permettant de réaliser les évaluations biologiques sans utilisation de DMSO. Ces complexes ont été évalués *in vitro* et permettent une inhibition de l'adhésion bactérienne similaire aux TazMans libres. Cette méthode devrait permettre une administration orale plus aisée et donner accès à des valeurs de biodisponibilité ainsi qu'à une évaluation *in vivo*.

Finalement, dans le but d'introduire des fonctions hydrosolubilisantes à l'extrémité de l'aglycone, nous avons développé une méthode donnant accès aux groupements **Tz3** où la pyrazine est remplacée par un triazole obtenu par cyclisation 1,3-dipolaire de Huisgen. Quelques composés ont été synthétisés et les premiers résultats suggèrent que le changement de cycle n'a pas de profonde influence sur l'activité inhibitrice.

Le travail effectué durant cette thèse a permis d'obtenir de nouveaux TazMans potentiellement intéressants comme inhibiteurs de FimH, mais a également ouvert de nouvelles possibilités quant au développement de cette famille de molécules.

## B. Perspectives

### 1. MNTz2

Les évaluations biologiques ont mis en avant l'exceptionnel pouvoir antiadhésif du composé **MNTz2** qui possède une activité inhibitrice environ 100 fois supérieure à l'HM. Le développement d'une formulation hydrosoluble après inclusion dans la  $\gamma$ -CD va maintenant permettre d'étudier son comportement *in vivo*, et de reconsidérer son utilisation potentielle malgré une stabilité moins importante.

La stratégie d'introduction de groupement solubilisant serait éventuellement applicable à cette génération de molécule, permettant l'obtention de molécules solubles sans formulation.

## 2. Structure cristallographique de MNTz2

Ce composé a récemment été co-cristallisé dans le site actif de FimH, nous donnant ainsi accès à de meilleures informations sur le mode de liaison de cette famille (Figure 51). Le composé se place au centre de la tyrosine gate qui est dans sa conformation ouverte. Le second thiazole interagit de manière privilégiée par recouvrement  $\pi$  avec la tyrosine 48 et, semble positionné de manière optimale.

Les aglycones hétérocycliques ne sont pas positionnés dans un même plan comme attendu de par leur conjugaison. La structure laisse penser que la délocalisation électronique principale a lieu entre le carbonyle et le second thiazole, qui sont coplanaires.

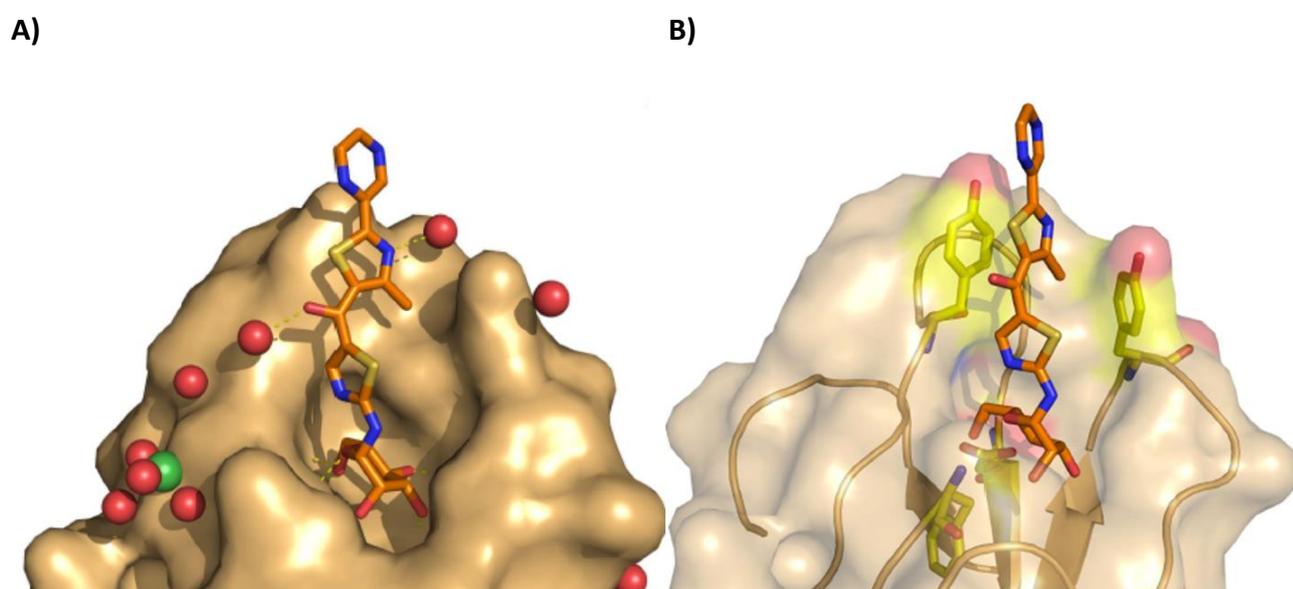


Figure 51 : (A) Co-cristal du composé MNTz2 dans le site actif de FimH et (B) visualisation du  $\pi$ -stacking entre le thiazole 2 et la Tyr48.

La superposition de cette structure avec le co-cristal **MNTz1-FimH** (Figure 52) permet de voir que la position du thiazole 1 a été légèrement modifiée. Le carbonyle est quant à lui orienté de manière opposée suivant la structure.

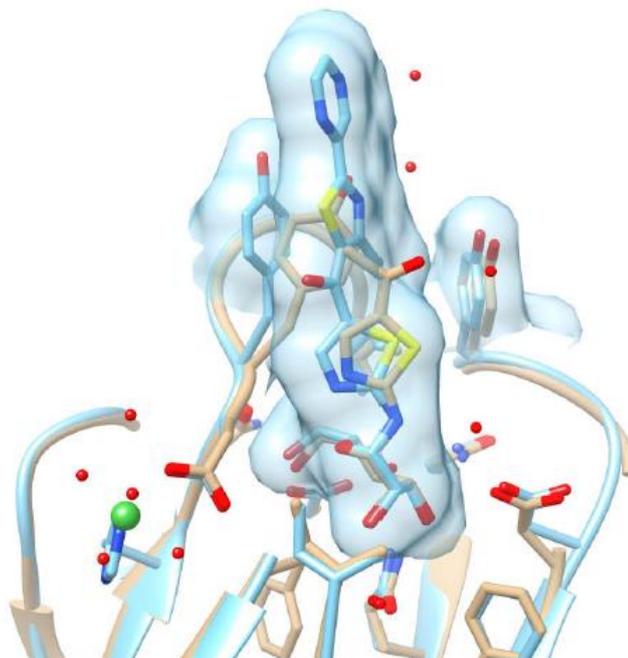


Figure 52 : Superposition des structures X de FimH avec MNTz1 (en gris) et MNTz2 (en bleu).

Cette structure cristallographique reste cependant un état de plus basse énergie et il est possible que d'autres états contribuent également à l'affinité du composé pour FimH. Un travail a été entamé en partenariat avec Stéphane Télétchéa, de l'Université de Nantes afin de déterminer les conformations de FimH les plus représentatives pour modéliser la lectine dans des expériences de docking.

L'obtention de co-cristaux des dérivés **MCTz2** et **MCNTz2** serait particulièrement intéressante afin de rationaliser la différence d'affinité entre la première et la seconde génération de TazMans.

### 3. Optimisation du recouvrement $\pi$

La structure de la Figure 51 montre clairement que la pyrazine est à l'extérieur du site actif et ne forme pas d'interaction notable avec la protéine. Cette pyrazine doit cependant avoir un impact sur la densité électronique du thiazole et par conséquent sur la force d'interaction par recouvrement  $\pi$  avec la tyrosine. De plus, ce cycle aromatique étant hydrophobe, son remplacement pourrait éventuellement améliorer l'hydrosolubilité des composés.

Des analogues de **MCNTz2** vont ainsi être préparés afin de mesurer l'impact du remplacement de cette pyrazine par des groupements donneurs ou attracteurs sur

l'affinité envers FimH. En parallèle, des calculs seront réalisés pour tenter de prédire le groupement nécessaire pour la meilleure interaction.

Il serait également envisageable de modifier la structure électronique du thiazole en changeant le groupement méthyl. Ceci peut être fait en remplaçant le DMA-DMA lors de la synthèse.

#### 4. Obtention de structures multivalentes

Enfin, nous avons envisagé la synthèse d'entités multivalentes de TazMans afin de combiner la forte affinité intrinsèque de ces composés pour FimH avec un gain d'affinité potentiel par effet multivalent. Nous avons montrés récemment que des multi-HM étaient bien supérieurs à leur analogue monovalent pour éliminer *in vitro* l'adhésion des AIECs sur les cellules intestinales (publication soumise). Cet effet est dû à leur faculté de former des agrégats bactériens qui possèdent un pouvoir adhérent réduit. Par contre, les tests *in vivo* sur des souris génétiquement modifiées CEABAC10 montrent cette fois une efficacité plus faible des multi-HM qui pourrait s'expliquer par une dégradation plus rapide ou un profil pharmacologique inapproprié. Ces effets étant très structures-dépendants, la synthèse d'une nouvelle famille de ligands multivalents se justifie notamment au vu des gains d'affinité importants obtenus *in vitro*.

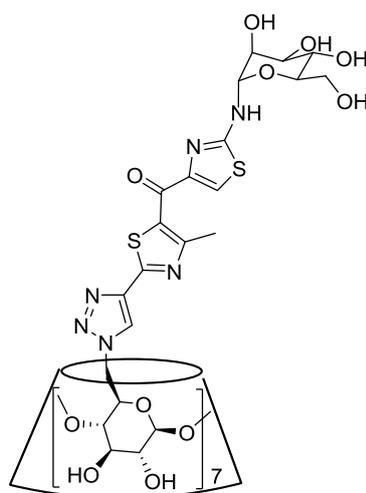


Figure 53:  $\beta$ -cyclodextrine heptavalente, fonctionnalisée par des TazMans

Des essais de synthèse ont été réalisés à partir du composé **91**, mais la présence des benzyles rend les caractérisations et la déprotection difficile. L'obtention d'une structure

acétylée permettrait sans doute d'obtenir de meilleurs résultats dans la synthèse de composés multivalents.

## 5. Optimisation de la voie de synthèse de MCNTzX

La voie utilisée pour la synthèse des composés **MCNTzX** est reproductible, mais demande de nombreuses étapes. Nous obtenons également un sucre benzylé, dont la déprotection demande l'utilisation de sels de bore qui compliquent les purifications. Dans l'idéal, une protection par des acétyles permettrait une déprotection plus facile, particulièrement dans le cas de composés multivalents.

Une voie de synthèse possible consisterait à l'introduction d'un groupement cyano en position anomérique du peracétylmannoside,<sup>139</sup> qui peut être obtenu de manière stéréospécifique, puis réduit en amine.<sup>111</sup> Cette amine serait ensuite transformée en thiourée par utilisation de thiophosgène puis d'ammoniac, avant de réaliser l'addition du DMF-DMA et l'addition/cyclisation (Schéma 69).

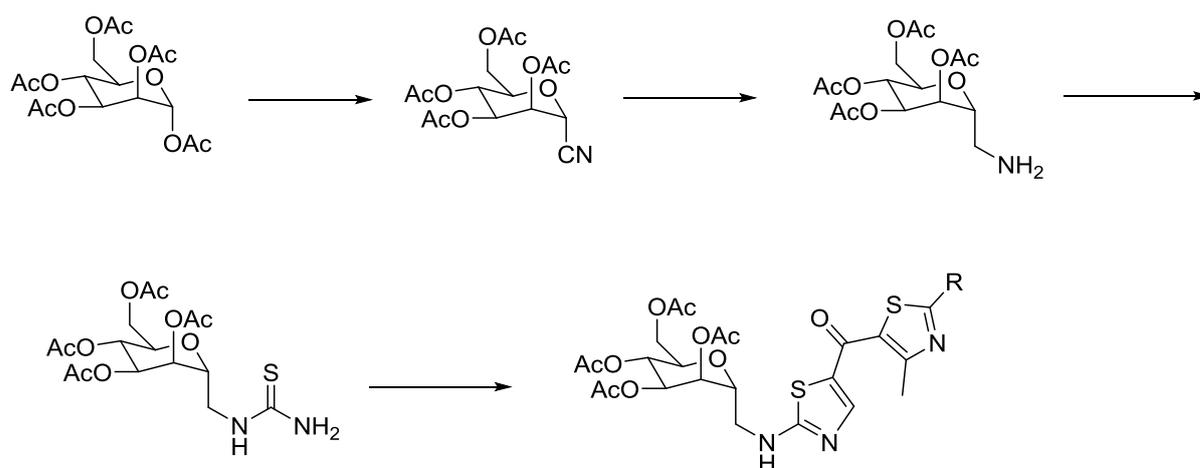


Schéma 69 : Stratégie de synthèse d'AcMCNTzX

## 6. Perspectives thérapeutiques

Les TazMans les plus prometteurs devraient être testés prochainement sur un modèle humain *ex vivo* développé par une équipe de la faculté de médecine de Nantes. Ils seront évalués sur des fragments d'intestins prélevés chez des patients atteints de la MC lors de résection.<sup>140</sup> Cette étude permettra de vérifier l'efficacité de composé antiadhésifs sur un modèle humain exprimant naturellement les récepteurs CEACAM6. Comme les molécules précédemment développées au laboratoire, les TazMans de

deuxième génération seront prochainement évalués *in vivo* dans le modèle transgénique murin CEABAC 10.

Les molécules préparées lors de cette thèse ont fait l'objet d'un dépôt de brevet en collaboration avec la société Enterome.<sup>141</sup> Cette entreprise est spécialisée dans l'analyse de la composition du microbiote intestinal afin de réaliser des diagnostics chez les patients atteints de maladies entraînant ou provoquées par une dysbiose (MC, asthme, obésité, diabète, et certaines formes de cancer).

Dans le cadre présent, leur objectif est le développement d'une détection non invasive des AIEC dans les selles de patients atteints de La MC. Les sujets « positifs » seraient traités par les composés antiadhésifs développés au laboratoire. Trois brevets de l'équipe sont actuellement exploités par Enterome qui prévoit d'atteindre une phase clinique en 2016-2017 avec les composés les plus prometteurs (Figure 54).

PROJECT NAME	MoA	Lead opt	POC	Reg preclinic	IND	Clinics	Market	M€
ENT 8018 & IBD 210	FimH antagonists + CDx Crohn's Disease					Q2 2016	2019	> €1b

Figure 54 : Plan de développement général de la société enterome<sup>141</sup>

Dans ce cadre, la société Enterome est particulièrement intéressée par les TazMans de plus forte affinité et qui possèdent la plus faible biodisponibilité. En effet, l'utilisation de composés ne passant pas dans la circulation sanguine devrait réduire considérablement le temps et le cout des études cliniques comparativement à un traitement systémique.

## **VI. Experimental Part**

## A. Material

All reagents were purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Carbosynth or Aldrich and were used without further purification. Dichloromethane ethyl acetate and petroleum ether were distilled on a *Buchi rotavapor R-220-SE*. Acetonitrile, pyridine, benzene and DMF were freshly distilled from calcium hydride under argon. THF was distilled on sodium, benzophenone and under argon.

Reactions requiring anhydrous conditions were performed under argon. Column chromatography was conducted on silica gel Kieselgel SI60 (40–63  $\mu\text{m}$ ) from Merck, or on Silica cartridge from Interchim and eluted via a Puriflash 430 with an UV and ELSD detection. Thin layer chromatography (TLC): *Merck Silica gel 60 F254* analytical plates, detection either with UV (254 nm) or dipping in a solution of cerium molybdate, potassium permanganate, nihydrine and subsequent heating.

Microwave experiments were conducted in sealed vials in commercial microwave reactors especially designed for synthetic chemistry (MultiSYNTH, Milestone). The instrument features a special shaking system that ensures high homogeneity of the reaction mixtures.

### Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on *Bruker Avance 300* spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBO probe carefully tuned to the recording frequency of 300.13 MHz (for  $^1\text{H}$ ) and 75.47 MHz (for  $^{13}\text{C}$ ), the temperature of the probe was set at room temperature (around 293-294 K), on a *Bruker Avance 400* spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBFO+ probe carefully tuned to the recording frequency of 400.13 MHz (for  $^1\text{H}$ ) and 100.61 MHz (for  $^{13}\text{C}$ ), the temperature of the probe was set at 303 K, on a *Bruker Avance III 500* spectrometer fitted with a 5mm i.d.  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  cryoprobe carefully tuned to the recording frequency of 500.13 MHz (for  $^1\text{H}$ ) and 125.76 MHz (for  $^{13}\text{C}$ ), the temperature of the probe was set at 303 K. The spectra are referenced to the solvent in which they were run (7.26 ppm for  $^1\text{H}$   $\text{CDCl}_3$  and 77.16 ppm for  $^{13}\text{C}$   $\text{CDCl}_3$ , 2.50 ppm for  $^1\text{H}$   $\text{DMSO-d}_6$  and 39.52 ppm for  $^{13}\text{C}$   $\text{DMSO-d}_6$ , 3.31 ppm for  $^1\text{H}$   $\text{CD}_3\text{OD}$  and 49.00 ppm for  $^{13}\text{C}$ , 7.16 ppm for  $^1\text{H}$   $\text{C}_6\text{D}_6$  and 128.06 ppm for  $^{13}\text{C}$   $\text{C}_6\text{D}_6$ , 5.32ppm for  $^1\text{H}$   $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  and 53.84 ppm for  $^{13}\text{C}$ , 4.79 ppm for  $^1\text{H}$   $\text{D}_2\text{O}$ ). Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) are given in Hz. Multiplicity of

signals is indicated as following: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), brs (broad singlet), dd (doublet of doublet), dt (doublet of triplet)...The numbering used for NMR attribution is different from UPAC numbering, and written on each molecule.

### **Mass spectrometry**

Low resolution mass spectrometry (MS) was recorded on a *ThermoFinnigan DSQII quadripolar* spectrometer (coupled with a *TracUltra GC* apparatus) for Chemical Ionization (CI), on a *ThermoFinnigan LCQ Advantage* spectrometer for ElectroSpray Ionisation (ESI).

High resolution mass spectrometry (HRMS) was recorded on a *ThermoFinnigan MAT95XL* spectrometer (for CI), on a *ThermoFisher Scientific LTQ-Orbitrap* spectrometer (for ESI+), on a *Bruker Autoflex III* spectrometer (for MALDI+).

### **Optical rotation measurements**

Optical rotation data were obtained on a *Perkin-Elmer 341* polarimeter, in a 100 mm cell, under Na lamp radiation at 20 °C.

## B. General procedures

### General procedure (1) for the cyclisation-addition (formation of the thiazole heterocycles)

**2** (2eq) was suspended in THF (6.5mL/mmol) and the alpha-halogenoketone (1eq) was added. The mixture was stirred at 20°C during 15 min Et<sub>3</sub>N (2eq) was added and the mixture was heated to 55°C during 5h. A solution of methylamine 33% in water (1mL/mmol) was added and the mixture was stirred for 40 min at rt. The solvent was evaporated and the residue was purified by flash chromatography on silica gel.

### General procedure (2) for Sandmeyer reactions

The aminothiazol (1eq) was solubilised in HCl 37% and the solution was cooled to -10°C. A solution of sodium nitrite (3eq) in a minimum of water was added over 1h and stirred for 30 min. A solution of CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (4eq) and NaCl (20eq) in water was added over 40 min and the green solution was stirred for 30 min, heated to 60°C for 1h. The mixture was extracted by DCM, then washed by a solution of saturated NaHCO<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude mixture was used without further purification.

### General procedure (3) for glycosylation with trichloroacetimidate

The acceptor (1eq) was solubilised in DCM (10mL/mmol), **10** (2eq) and molecular sieves were added, the mixture was stirred 30 min at rt under nitrogen. TMSOTf (0.1eq) was added and the mixture was stirred 15 min. NaHCO<sub>3</sub> was added to quench the reaction. The mixture was filtered over decalite, rinsed with DCM and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel.

### General procedure (4) for glycosylation with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-chloro- $\alpha$ -D-mannopyranose

The acceptor (1eq) was solubilised in DCE (10mL/mmol), tetra-acetyl-chloro-mannose **13** (2eq) and molecular sieves were added and the mixture was stirred for 30 min at rt under nitrogen, then Ag<sub>2</sub>O (1eq) was added. The mixture was stirred for 16h at reflux, protected from light. The solution was filtered over decalite, rinsed with DCM and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel.

#### **General procedure (5) for glycosylation with 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-chloro- $\alpha$ -D-mannopyranose**

Tetra-benzyl-chloro-mannose (2eq) was solubilised in DCM (10mL/mmol), DMF (10 $\mu$ L) and oxalyl chloride (4eq) were added and the mixture was stirred 1h at rt. The solution was filtrated over a short pad of silica and concentrated. The resulting gum was solubilised in DCM and the acceptor (1eq) and molecular sieve were added. The mixture was stirred for 10 min and Ag<sub>2</sub>O (2eq) was added and the mixture was protected from light and stirred 1h. The silver salts and sieves were filtered over decalite and the mixture was concentrated under vacuum. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel.

#### **General procedure (6) replacement of acetyl groups by benzyl groups.**

The acetylated carbohydrate (1eq) was solubilised in a mixture of DCM/MeOH 1:1 (1mL/mmol), MeONa (0.1M in MeOH, 0.2eq) was added and the mixture was stirred at rt for 3h. The solvent was concentrated and the residue solubilised in DMF (3mL/mmol). NaH (6eq) was added at 0°C and the mixture stirred for 1h before slow addition of BnBr (6eq). The mixture was allowed to warm at rt overnight, hydrolysed with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl and extracted several times with Et<sub>2</sub>O. The organic layers were combined and washed several times with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel

#### **General procedure (7) activation of alcohol by methanesulfonyl group**

The alcohol derivative (1eq) was solubilized in pyridine (1mL/mmol) and methanesulfonyl chloride (2eq) was added. The solution was stirred for 1h at rt and diluted in DCM. The pyridine was removed by washings with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M, then CuSO<sub>4</sub> sat. The organic layer was washed by brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel.

#### **General procedure (8) substitution of methanesulfonyl group by KCN**

The methanesulfonyl derivative (1eq) was solubilised in DMF (10mL/mmol), then KCN (4eq) was added and the mixture was stirred to 90°C overnight. The reaction was quenched by the addition of NH<sub>4</sub>Cl saturated solution, extracted several time by Et<sub>2</sub>O, washed by brine, dried

over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated in vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel.

#### **General procedure (9) formation of the thioamide, from nitrile**

The nitrile derivative (1eq) was dissolved in thioacetic acid and diethyldithiophosphate (2eq) was added. The mixture was heated to  $60^\circ\text{C}$  until completion and then a  $\text{NaHCO}_3$  solution was added. The product was extracted by DCM, washed several time by  $\text{NaHCO}_3$  sat, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated in vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel.

#### **General procedure (10) condensation of DMF-DMA**

The thioamide (1eq) was dissolved in acetonitrile (1mL/mmol), DMF-DMA (1.3eq) was added and the mixture was stirred at  $60^\circ\text{C}$  for 40 min. The mixture was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel.

#### **General procedure (11) cyclisation for C-linked thiazols**

The thiazadiene derivative (1eq) was solubilised in acetonitrile (2mL/mmol) and  $\alpha$ -halogenoketone (1.2eq) was added with potassium iodide (0.05 eq). After 15 min of stirring at room temperature, triethylamine (2eq) was added and the mixture was heated to  $60^\circ\text{C}$  until reaction completion as indicated by TLC. The mixture was washed with brine, extracted by EtOAc, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated in vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel.

#### **General procedure (12) cyclisation "one pot"**

The thioamide (1eq) was dissolved in acetonitrile (2mL/mmol), DMF-DMA (1.3eq) was added and the mixture was warmed at  $60^\circ\text{C}$  for 40 min. After completion, as indicated by TLC,  $\alpha$ -halogenoketone (1.2eq) was added with potassium iodide (0.05 eq). After 15 min of stirring at room temperature, triethylamine (2eq) was added and the mixture was heated to  $60^\circ\text{C}$  until completion, followed by TLC. The mixture was washed with brine, extracted by EtOAc, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated in vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel.

### **General procedure (13) déprotection of acetyl groups**

The protected carbohydrate (1eq) was dissolved in methanol (2mL/mmol) and a sodium methanolate (0.1 M, 0.2eq) was added. The mixture was stirred at rt for 3h. After completion, water was added (0.5mL/mmol), followed by Amberlite® IR120, the mixture was stirred until the pH was around 5. After filtration of the resin and concentration in vacuum, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel.

### **General procedure (14) déprotection of benzyl groups with BCl<sub>3</sub>**

The protected carbohydrate (1eq) was dissolved in DCM (2mL/mmol) under inert atmosphere and the solution was stirred at -10°C. BCl<sub>3</sub> 1M in DCM (3eq per function) was added dropwise and the mixture was stirred at rt for 20h. Methanol was added slowly and the mixture was concentrated under vacuum. This operation was repeated 4 times. Then the resulting product was purified by flash chromatography on silica gel.

### **General procedure (15) click chemistry, 1,3-dipolar cyclisation**

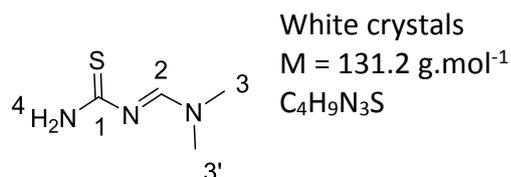
The azide derivative and the alkyne derivative were dissolved in dioxane (2mL/mmol) and water (0.5mL/mmol) was added. Graphite supported copper oxide nanoparticles were added (0.05eq per azide) and the mixture was heated to 70°C until completion. The mixture was filtered over decalite then concentrated and purified.

### C. Synthesis protocols

The names of the molecules were adapted from IUPAC for ease of readability

#### **2-amino-4-dimethylamino-1-thia-3-azabuta-1,3-diene (1)**

Thiourea (1g, 13mmol) was diluted in methanol (17mL) and DMF-DMA (2mL, 1.3eq) was added. The yellow solution was heated at reflux during 4h and then concentrated under vacuum. The yellow solid was washed by methanol, to give **1** as white crystals (qt yield).



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) :8.61 (1H, s, H-2), 8.21 (1H, bs, NH), 7.94 (1H, bs, NH), 3.13 (3H, s, H3), 2.98 (3H, s, H3'),

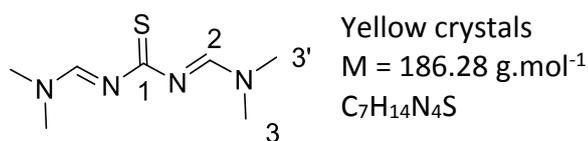
mP =159.5-160°C

MS, ei m/z = 130.95

Physical properties in accordance with literature<sup>142</sup>

#### **N,N'-bis(dimethylaminomethylene)thiourea (2)**

Thiourea (500mg, 6.57mmol) was suspended in DCM (12mL) and then DMF-DMA (2.73mL, 3eq) was added. The mixture was heated to reflux during 4 hours and the yellow solution was concentrated under vacuum. The yellow solid is then crystalized in diethyl ether, to afford 1.22g (qt yield) of the desired product as yellow crystals.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) : 8.70 (2H,s, H-2), 3.17 (6H,s, H-3'), 3.01 (6H,d, J=0.5 Hz, H-3)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) : 207.61 (C-1), 161.47 (C-2), 41.01 (C-3'), 35.52 (C-3)

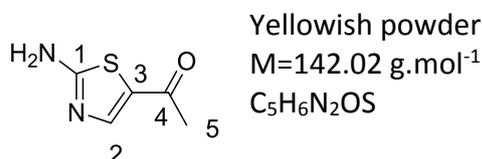
mP =149 -150 °C

MS, Ci m/z: [M+H]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=186.98[M+H]<sub>found</sub><sup>+</sup>

Physical properties in accordance with literature<sup>142</sup>

### 2-amino-5-acetylthiazol (3)

Prepared following **GP (1)**, starting from chloroacetone (2.0g, 10.75 mmol). Purification by flash chromatography (PE/EtOAc, 1:1 – 3:7) afforded 1.14 g of the desired product (75% yield) as a yellowish powder.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm): 7.96 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 7.91 (1H, s, H-2), 2.34 (3H, s, H-5)

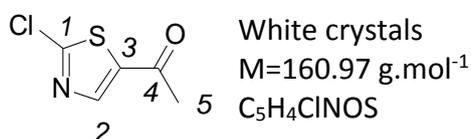
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO): δ (ppm): 188.34 (C-4), 174.42 (C-1), 149.35 (C-2), 127.59 (C-3), 25.56 (C-5)

mP =176-178°C

MS, ei m/z : M<sup>+</sup> = 141.93

### 2-chloro-5-acetylthiazol (4)

Prepared following **GP (2)** starting from **3** (1.05g, 7.39mmol), 1.08g of the desired product was obtained in a 91% yield.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 8.06 (1H, s, H-2), 2.55 (3H, s, H-5)

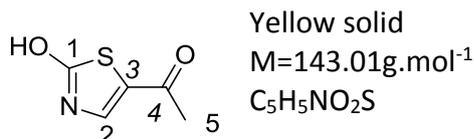
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 189.61 (C-4), 159.30 (C-1), 145.76 (C-2), 142.67 (C-3), 27.21 (C-5)

mP =49-50°C

MS, Cl m/z: [M+H]<sup>+</sup> =161.9

### **2-hydroxy-5-acetylthiazol (5)**

**4** (74mg, 0.46mmol) was solubilised in a solution of aqueous NaOH 1M (5mL/mmol) and potassium iodide (15mg, 0.2eq) was added. The solution was warmed at 80°C for 2h and then cooled. HCl 1M was added until the colour changed from red to yellow and the mixture was extracted by EtOAc, dried on MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc, 1:1 to 3:7) to afford 62mg (95% yield) of the desired product as a yellow powder.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm):** 12.13 (1H, bs, OH), 8.17 (1H, s, H-2), 2.41 (3H, s, H-5)

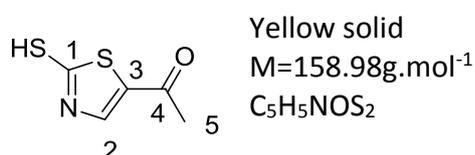
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO): δ (ppm):** 189.06 (C-4), 172.39 (C-1), 133.51 (C-2), 120.64 (C-3), 24.89 (C-5)

**mP** =158.2-159°C

**MS, CI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> =143.9, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> =160.93

### **2-mercapto-5-acetylthiazol (6)**

**4** (192mg, 1.2mmol) was solubilised in MeOH (15mL). Potassium thioacetate (150mg, 1.1eq) and potassium iodide (40 mg, 0.2eq) were added. The mixture was heated at reflux during 6h and then concentrated under vacuum. The crude product was diluted in water and the pH was adjusted to 4 by 1M HCl solution. The mixture was extracted with EtOAc, dried on MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc, 1:1 – 3:7) to afford 140mg (73% yield) of the desired product as a yellow powder.



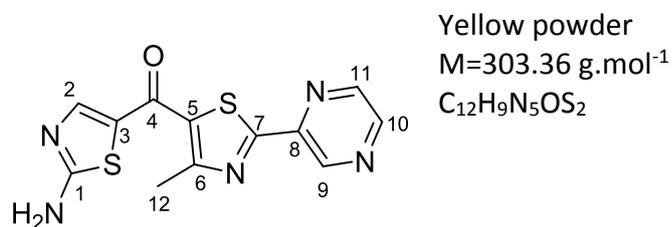
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm):** 13.79 (1H, bs, SH), 8.38 (1H, s, H-2), 2.41 (3H, s, H-5)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO): δ (ppm):** 192.05 (C-1), 188.45 (C-4), 137.49 (C-2), 130.21 (C-3), 26.16 (C-5)

**MS, CI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> =159.89

### 2-amino-5-(((4-methyl-2-(pyrazin-2-yl))thiazol-5-yl)carbonyl)thiazole (7)

Prepared following **GP (1)**, starting from **2-Bromo-1-[4-methyl-2-(2-pyrazinyl)-1,3-thiazol-5-yl]-1-ethanone** (400mg, 1.2mmol), precipitation in methanol, to afford the desired product in a quantitative yield, as a yellowish powder.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 9.36 (1H, d, <sup>3</sup>J = 1.5Hz, H-11), 8.82 (1H, d, <sup>3</sup>J = 2.5Hz, H-9), 8.77 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 2.5/1.5Hz, H-10), 8.35 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 7.93 (s, 1H, H-2), 2.63 (3H, s, H-12).

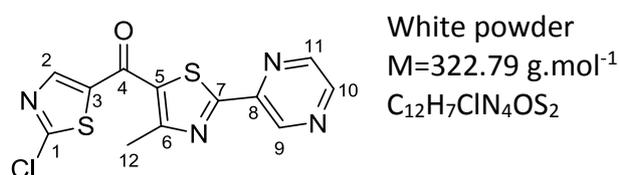
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 176.00, 175.27, 165.48, 157.07, 151.24 (C2), 146.53 (C-9), 145.22, 144.69 (C-10), 140.70 (C-11), 130.29, 127.76, 17.38 (C-12).

MS, CI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 303.92.

HRMS, ESI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 304.03213Da, [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 304.03171Da.

### 5-(((4-methyl-2-(pyrazin-2-yl))thiazol-5-yl)carbonyl)-2-chlorothiazole (8)

Prepared following **GP (2)** starting from **7** (395mg, 1.2mmol), after precipitation in methanol, with a yield of 95%.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 9.48 (d, <sup>3</sup>J = 1.6Hz, 1H, H11), 8.70 (d, <sup>3</sup>J = 2.3Hz, 1H, H9), 8.61 (dd, <sup>3</sup>J = 2.3/1.6Hz, 1H, H10), 8.28 (s, 1H, H2), 2.82 (s, 3H, H12).

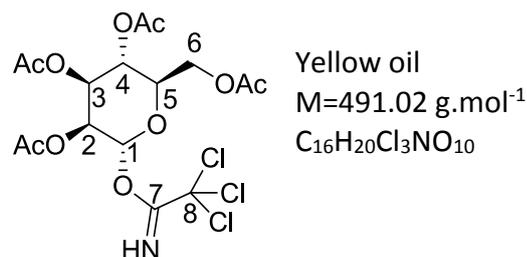
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 177.23, 168.21, 163.04, 159.31, 146.56 (C9), 146.01 (C2), 144.35 (C10), 143.21, 142.22 (C11), 129.00, 18.63 (C12).

MS, CI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 322.81 (75%), 324.86 (25%).

HRMS, ESI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 322.98226Da, [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 322.98218Da.

**2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-(2,2,2-trichloro-1-iminoethoxy)- $\alpha$ -D-mannopyranose (10)**

**9** (1.08g, 2.76mmol) was dissolved in THF (10mL) and a solution of methyl amine in THF 2M (2.1mL, 2eq) was added. The mixture was stirred for 2h at rt and concentrated under vacuum. The crude oil was dissolved in DCM (15mL) under inert gas, DBU (82 $\mu$ L, 0.2eq) and trichloro-acetonitrile (1.10mL, 4eq) were added. The mixture was stirred 4 hours at rt and concentrated. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc 3:1) to give 826mg (61% yield) of the desired product over two steps.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 8.78 (1H, s, NH), 6.28 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 2.0 Hz, H-1), 5.47 (1H, m, H-2), 5.36-5.43 (3H, m, H-3, H-4), 4.27 (1H, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 4.5Hz, H-6), 4.19 (1H, m, H-5), 4.16 (1H, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 2.3Hz, H-6'), 2.19 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 170.67 (OAc), 169.91 (OAc), 169.83 (OAc), 169.74 (OAc), 159.95 (C-7), 94.72 (C-1), 90.69 (C-8), 71.40 (C-5), 68.97 (C-3), 68.05 (C-2), 65.61 (C-4), 62.23 (C-6), 20.89 (CH<sub>3</sub>CO), 20.81 (2C, CH<sub>3</sub>CO), 20.73 (CH<sub>3</sub>CO).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>= +49 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

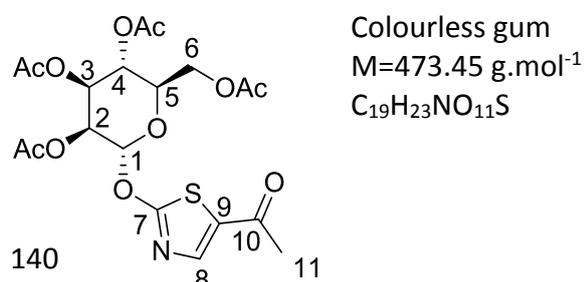
**MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup>** =514.1.

**HRMS, ESI: [M+Na]<sup>+</sup>**<sub>calc</sub>=514.00450Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>fund</sub>= 514.00415Da.

Physical Physical properties in accordance with literature <sup>143</sup>

**5-acetyl-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)oxy)-1,3-thiazole (11a)**

Prepared Following **GP(4)**, starting from **5** (60mg, 0.42mmol), after purification by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOAc, 9:1) to afford 130mg (65% yield) of the desired product.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm): 7.79 (1H, s, H-8), 6.25 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=1.9Hz, H-1), 5.50 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=1.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>=3.20Hz, H-2), 5.45, (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>=10 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.20 Hz, H-3), 5.41 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>=10Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub>=9.20Hz, H-4), 4.28 (1H, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 5.3Hz, H-6) 4.12 (2H, m, , H-5 H-6'), 2.30 (3H, s, H-11), 2.20 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (6H, s, 2xCH<sub>3</sub>CO), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm): 190.025 (C-10), 175.49 (C-7), 170.61 (OAc), 169.93 (OAc), 169.80 (OAc), 169.68 (OAc), 143.41 (C-8), 135.37 (C-9), 97.43 (C-1), 71.16 (C-5), 68.23 (C-3), 68.22 (C-2), 65.58 (C-4), 62.08 (C-6), 26.43 (C-11), 20.87 (CH<sub>3</sub>CO), 20.78 (CH<sub>3</sub>CO), 20.73 (CH<sub>3</sub>CO).

[α]<sub>D</sub>= +66 (c=0.3g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

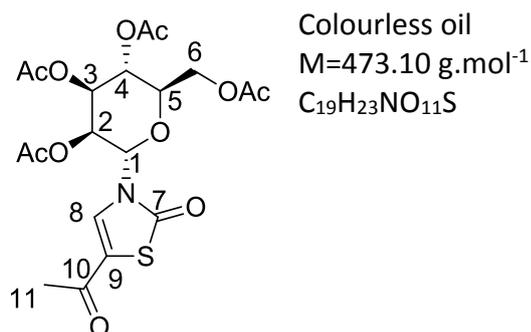
**MS, ESI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> =496.1.

**HRMS, ESI:** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=496.0884Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup>= 496.0892Da.

### **5-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranos-1-yl)-1,3-thiazol-2(3H)-one**

#### **(<sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformation) (11b)**

Prepared Following **GP (3)**, starting from **5** (79mg, 0.55mmol), after purification by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOAc, 9:1) to afford 67mg (26% yield) of the desired product.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm): 7.51 (1H, s, H-8), 5.91 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=8.8Hz, H-1), 5.47 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>=3.36 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>=7 Hz, H-3), 5.44 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub>=8.8 HZ, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>=3.36 Hz, H-2), 5.01 (1H, dd, <sup>3</sup>J=1.75 Hz, <sup>3</sup>J=3.76 Hz, H-4), 4.62 (1H, dt, <sup>3</sup>J = 4.77 Hz, <sup>3</sup>J=10.37 Hz, H-5), 4.32 (2H, m, H-6), 2.42 (3H, s, H-11), 2.21 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.20 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 188.56 (C-10), 171.01 (C-7), 170.62 (OAc), 169.66 (OAc), 169.36 (OAc), 169.10 (OAc), 128.71 (C-8), 121.69 (C-9), 76.01 (C-5), 75.29 (C-1), 68.30 (C-3), 68.19 (C-4), 66.70 (C-2), 60.30 (C-6), 25.68 (C-11), 21.06 (CH<sub>3</sub>CO), 20.91 (CH<sub>3</sub>CO), 20.82 (CH<sub>3</sub>CO), 20.56 (CH<sub>3</sub>CO).

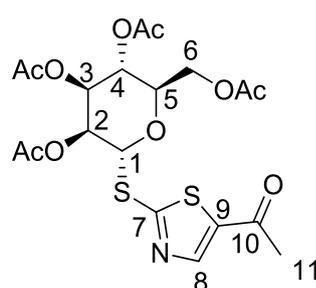
[α]<sub>D</sub> = +49 (c=0.3g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 474.1, [m+Na<sup>+</sup>] = 496.1.

HRMS, ESI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 474.10646Da, [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 474.10574Da.

### 5-acetyl-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranos-1-yl)thioxy)-1,3-thiazole (12a)

Prepared Following GP (4), starting from 6 (70mg, 0.44mmol), after purification by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOAc, 95:5) to afford 161mg (75% yield) of the desired product.



Colourless gum  
M=489.10 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub>S<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 8.18 (1H, s, H-8), 6.14 (1H, d, <sup>3</sup>J=1.72 Hz, H-1), 5.51 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 1.72 <sup>3</sup>J= 3.35 Hz, H-2), 5.37 (1H, dd, <sup>3</sup>J= 0.05 <sup>3</sup>J= 10.05 Hz, H-4), 5.22 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 10.05 <sup>3</sup>J= 3.35 Hz, H-3), 4.24-4.35 (2H, m, H-6, H-5), 4.09 (1H, m, H-6'), 2.54 (3H, s, H-11), 2.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 189.41 (C-10), 170.66 (OAc), 169.89 (OAc), 169.82 (OAc), 169.67 (OAc), 167.72 (C-7), 147.02 (C-8), 141.57 (C-9), 84.29 (C-1), 71.28 (C-5), 70.12 (C-2), 69.26 (C-3), 65.83 (C-4), 62.12 (C-6), 27.29 (C-11), 20.93 (2C, CH<sub>3</sub>CO), 20.79 (CH<sub>3</sub>CO), 20.70 (CH<sub>3</sub>CO).

[α]<sub>D</sub> = +97 (c=0.3g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

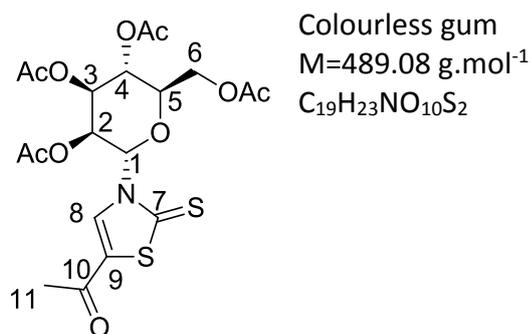
MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 490.1, [m+Na<sup>+</sup>] = 512.1.

HRMS, ESI: [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 512.06556Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 512.06555Da.

**5-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)-1,3-thiazol-2(3H)-thione :**

**( $^1\text{C}_4$  conformation) (12b)**

Prepared Following GP (3), starting from 6 (136mg), after purification by flash chromatography on silica gel (DCM/EtOAc, 95:5) to afford 95mg (22% yield) of the desired product.



**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 7.77 (1H, s, H-8), 6.76 (1H,d,  $^3J=9.5\text{Hz}$ , H-1), 5.47 (1H, dt,  $^3J=3.3\text{ Hz}$ ,  $^3J=0.66\text{ Hz}$ , H-3), 5.34 (1H, dd,  $^3J=9.5/3.2\text{ Hz}$ , H-2), 5.02 (1H, dd,  $^3J=1.2/3.7\text{Hz}$ , H-4), 4.62 (1H, dd,  $^2J=12.1\text{ Hz}$ ,  $^3J=8.3\text{ Hz}$ , H-6), 4.43 (1H, dd,  $^2J=12.1\text{ Hz}$ ,  $^3J=5.6\text{ Hz}$ , H-6'), 4.36 (1H, m, H-5), 2.45 (3H, s, H-11), 2.23 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.21 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 192.00 (C-7), 187.19 (C-10), 170.65 (OAc), 169.88 (OAc), 169.36 (OAc), 169.13 (OAc), 132.79 (C-8), 128.43 (C-9), 76.82 (C-1), 76.73 (C-5), 68.43 (C-4), 68.41 (C-3), 67.67 (C-2), 60.42 (C-6), 26.56 (C-11), 21.15 (CH<sub>3</sub>CO), 20.94 (CH<sub>3</sub>CO), 20.91 (CH<sub>3</sub>CO), 20.64 (CH<sub>3</sub>CO).

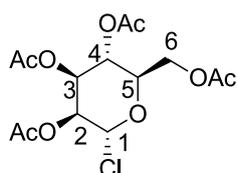
**$[\alpha]_D^{20}$**  = +36 (c=0.3g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> =490.1, [M+Na]<sup>+</sup> =512.1.

**HRMS, ESI:** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> =490.08361Da [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 490.08301Da.

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-chloro- $\alpha$ -D-mannopyranose (13)**

Mannose penta-acetate (6g, 15.4mmol) was solubilised in DCM (90mL) under inert gas and tin tetrachloride (1.82mL, 1eq) and thionyle chloride (2.23mL, 2eq) were added. After 3 hours at rt the mixture was hydrolysed by NaHCO<sub>3</sub> and then extracted two times with DCM. The organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified on silica gel, DCM/EtOAc 9:1, to give 4.91g (87% yield) of the desired product.



White solid  
M=366.75 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>9</sub>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 5.97 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.6 Hz, H-1), 5.60 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 10.1 Hz, H-3), 5.37 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.6 Hz, H-2), 5.33 (1H, t, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 10.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 10.1 Hz, H-4), 4.23-4.33 (2H, m, H-5, H-6), 4.13 (1H, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.15 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 2.1 Hz, H-6'), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 170.59 (OAc), 169.79 (OAc), 169.71 (OAc), 169.66 (OAc), 88.90 (C-1), 71.72 (C-2), 71.45 (C-5), 67.88 (C-3), 65.52 (C-4), 61.79 (C-6), 20.84 (OAc), 20.77 (OAc), 20.73 (C, OAc), 20.66 (C, OAc)

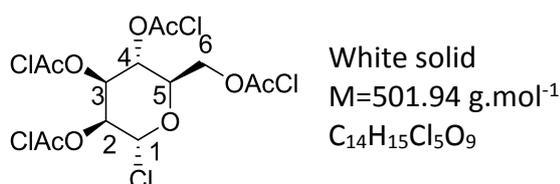
**MS, CI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 367.0**

Physical Physical properties in accordance with literature <sup>144</sup>

### **2,3,4,6-tetra-O-chloroacetyl-1-chloro- $\alpha$ -D-mannopyranose (15)**

Mannose (904mg, 5.2mmol) was solubilised in pyridine (2.5mL) and DCM (30mL) and cooled to 0°C. Chloroacetyl chloride (4mL, 10eq) was added and the mixture was stirred for 3h at rt. The organic layers were washed with 1M HCl, a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified on silica gel DCM 100% to give 2.50g (85% yield) of the desired product.

**14** (400mg, 0.72mmol) was solubilised in DCM (4mL) under inert gas and tin tetrachloride (0.72mL, 1eq) and thionyl chloride (0.105mL, 2eq) were added. After 36 hours the reaction was total and the mixture was hydrolysed by NaHCO<sub>3</sub> and then extracted two times with DCM. The organic layers were washed by brine, dried on MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified on silica gel PE/EtOAc 9:1, to give 190mg (52% yield) of the desired product.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 6.03 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.7 Hz, H-1), 5.74 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 10.1 Hz, H-3), 5.51 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.3 Hz, H-2), 5.47 (1H, t, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, H-4), 4.03-4.45 (3H, m, H-5, H-6), 4.19 (1H, d, <sup>2</sup>J = 14.8 Hz, CH<sub>2</sub>Cl), 4.15 (1H, d, <sup>2</sup>J = 14.8 Hz, CH<sub>2</sub>Cl), 4.12 (2H, s, CH<sub>2</sub>Cl), 4.06 (1H, d, <sup>2</sup>J = 14.4 Hz, CH<sub>2</sub>Cl), 4.02 (1H, d, <sup>2</sup>J = 14.4 Hz, CH<sub>2</sub>Cl), 3.99 (2H, s, CH<sub>2</sub>Cl).

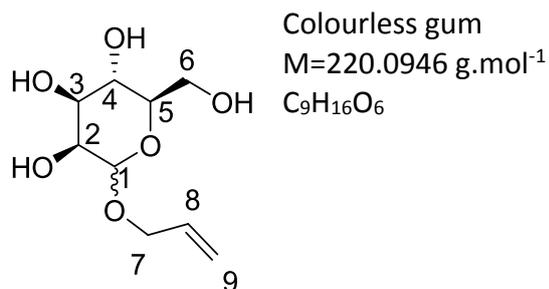
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 166.96 (OAcCl), 166.42 (OAcCl), 166.39 (OAcCl), 166.38 (OAcCl), 87.89 (C-1), 72.82 (C-2), 70.92 (C-5), 69.39 (C-3), 66.65 (C-4), 62.75 (C-6), 40.64 (CH<sub>2</sub>Cl), 40.42 (CH<sub>2</sub>Cl), 40.31 (CH<sub>2</sub>Cl), 40.29 (CH<sub>2</sub>Cl).

**MS, Cl m/z: [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>** = 521.98.

**HRMS, ESI: [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub>**=524.90509Da, **[M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub>**= 524.90521Da.

### **Allyl-D-Mannopyranoside (17)**

D-Mannose (60 g, 333mmol) was refluxed in allyl alcohol (700mL) for 4 h in the presence of BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O (2.9mL, 23.3mmol). After neutralization with Et<sub>3</sub>N, the allyl alcohol was removed under vacuum to give 59.5 g (82% yield) of the desired product as slightly yellow syrup.

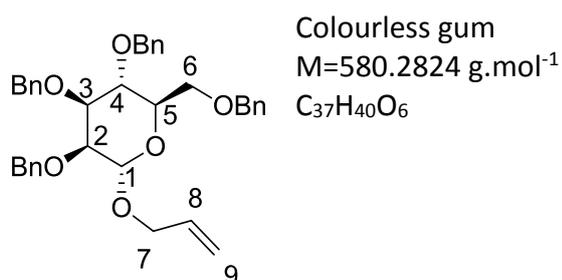


**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm): 5.68-5.83 (1H, m, H-8), 5.06-5.21 (2H, m, H-9), 4.72 (1H, d, H-1), 3.41-4.11 (9H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7).

Physical Physical properties in accordance with literature <sup>145</sup>

### **2,3,4,6-tetra-O-benzyl-O-allyl-D-mannopyranose (18)**

To a suspension of NaH (60% in oil, 2.0 g, 50mmol) in DMF (20mL) was added dropwise a solution of **17** (2.19 g, 10mmol) in DMF (20mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 30 min and then BnBr (5.9mL, 50mmol) was added dropwise. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was carefully quenched with H<sub>2</sub>O at 0 °C, diluted with Et<sub>2</sub>O (100mL) and then washed with water (40mL  $\times$  3). The organic layer was washed with brine, dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/PE, 1:10) to afford 5.0 g (86% yield) of the desired product as a colorless oil.

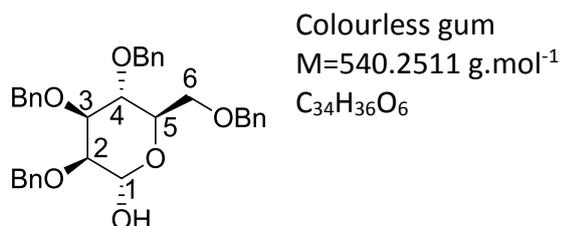


**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 7.24-7.40 (18H, m, H-Bn), 7.12-7.17 (2H, m, H-Bn), 5.75-5.87 (1H, m, H-8), 5.18 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>9-9'</sub> = 1.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 17.2 Hz, H-9), 5.12 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>9-9'</sub> = 1.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9'-8</sub> = 10.4 Hz, H-9), 4.91 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.7 Hz, H-1), 4.48-4.86 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.13 (1H, m, H-5), 3.88-4.01 (3H, m, H-3, H-6), 3.67-3.80 (4H, m, H-2, H-4, H-7).

Physical properties in accordance with literature<sup>146</sup>

### 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-mannopyranose (19)

A mixture of **18** (580mg, 1mmol) and PdCl<sub>2</sub> (34mg, 0.2mmol) in dry MeOH (6mL) was stirred vigorously for 6 h at rt until consumption of starting material was observed by TLC. The reaction was then diluted with Et<sub>2</sub>O, filtered through decalite and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified on silica gel, PE/EtOAc 7:3, to give 432mg (80% yield) of the desired product.



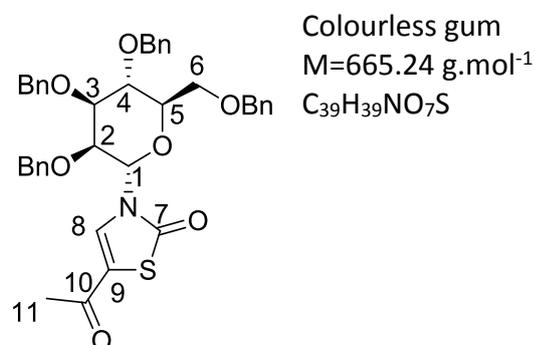
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 7.25-7.38 (18 H, m, HBn), 7.16 -7.18 (2H, m, HBn), 5.26 (1H, s, H-1), 4.48-4.89 (8H, m, H-Bn), 4.02-4.05 (1H, m, H-5), 3.97 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.3 Hz, H-3), 3.86 (1H, m, H-6), 3.79-3.81 (1H, m, H6'), 3.65-3.75 (2H, m, H-2, H-4).

Physical properties in accordance with literature<sup>146</sup>

### 5-acetyl-3-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)-1,3-thiazol-2(3H)-one : (<sup>4</sup>C<sub>1</sub> conformation **22a** and <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformation **22b**).

**21** as prepared by adding DBU (1eq), to a solution of **19** (1 eq) and trichloroacetonitrile (2eq) in DCM. The solution was stirred at rt for 1h, then filtered on a short pad of silica (DCM), concentrated and used without further purification.

Prepared Following **GP (3)**, starting from **5** (15mg, 0.105mmol) and **21** (144mg, 2eq) after purification by flash chromatography on silica gel (DCM/PE, 7:3), then second chromatography (toluene/EtOAc 9-1) to afford 21mg (30% yield) of the **22a** and 28mg (40% yield) **22b**.



### <sup>4</sup>C<sub>1</sub> conformation **22a**

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.58 (1H, s, H-8), 7.14-7.41 (20H, m, H-Bn), 5.50 (1H, d, <sup>3</sup>J=1.21 Hz, H1), 4.97 (1H, d, <sup>3</sup>J=10.1 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.92 (1H, d, <sup>3</sup>J=10.7 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.79 (1H, d, <sup>2</sup>J = 11.4 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.75 (1H, d, <sup>2</sup>J = 11.4 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.62 (1H, d, <sup>3</sup>J=10.7 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.59 (1H, d <sup>2</sup>J = 12.3 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.54 (1H, d <sup>AB</sup>J = 12.3 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.33 (1H, d, <sup>3</sup>J=10.1 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.06 (1H, m, H-2), 4.02 (1H, t, <sup>3</sup>J=9.27 Hz, H-4), 3.79 (1H, dd, <sup>3</sup>J=9.1/2.3 Hz, H-3), 3.75 (2H, m, H-6), 3.63 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=9.75 Hz, <sup>3</sup>J=2.45 Hz, <sup>3</sup>J=4.63 Hz, H-5), 2.06 (3H, s, H-11).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 189.0 (C-10), 170.68 (C-7), 138.14 (C-Bn<sub>IV</sub>), 138.03 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.78 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.48 (C-Bn<sub>IV</sub>), 132.49 (C-8), 127-129.24 (C-Bn), 120.04 (C-9), 83.06 (C-3), 81.15 (C-1), 78.67 (C-5), 75.70 (CH<sub>2</sub>Bn), 75.51 (CH<sub>2</sub>Bn), 75.43 (C-2), 74.04 (C-4), 73.55 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.08 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.96 (C-6), 24.96 (C-11).

**[α]<sub>D</sub>** = -6 (c=0.85g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> = 688.2.

**HRMS, ESI:** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 688.2312Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 688.2339Da.

#### **<sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformation 22b**

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.14-7.41 (20H, m, Bn), 7.14 (1H, s, H-8), 5.84 (1H, d, <sup>3</sup>J=8.1 Hz, H-1), 4.66 (1H, d, <sup>3</sup>J=12.2 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.43-4.57, (6H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.24 (1H, m, H-4), 4.23 (1H, d, <sup>3</sup>J=12.2 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 3.98 (2H, m, H-2+H-5), 3.83 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 10.19 Hz, <sup>3</sup>J=7.0 Hz, H-6), 3.76 (1H, m, H-3), 3.72 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 12.1 Hz, <sup>3</sup>J=5.82 Hz, H-6').

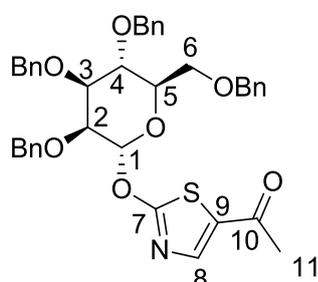
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 188.50 (C-10), 171.06 (C-7), 137.89 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.61 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.52 (C-Bn<sub>IV</sub>), 136.95 (C-Bn<sub>IV</sub>), 129.59 (C-8), 127.59-128.97 (C-Bn), 120.69 (C-9), 77.45 (C-1), 76.89 (C-4), 74.33 (C-3), 73.73 (C-2), 73.43 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.38 (C-5), 73.07 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.14 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.03 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.00 (C-6), 25.22 (C-11).

**[α]<sub>D</sub>** = -33 (c=0.4g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> = 688.2.

### **5-acetyl-2-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)oxy)-1,3-thiazole (23)**

Prepared Following **GP (5)**, starting from **5** (60mg, 0.42mmol), after purification by flash chromatography on silica gel neutralized by Et<sub>3</sub>N (PE/EtOAc/Et<sub>3</sub>N, 68/29/3), to afford 220mg (79% yield) of the desired product.



Colourless gum  
M=665.24 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>39</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>7</sub>S

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.67 (1H, s, H-8), 7.08-7.35 (20H, m, H-Bn), 6.13 (1H, d, <sup>3</sup>J=2.0 Hz, H-1), 4.80 (1H, d, <sup>3</sup>J=10.1 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.72 (1H, d, <sup>2</sup>J = 12.1 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.67 (1H, d, <sup>AB</sup>J = 12.1 Hz, CH<sub>2</sub>Bn), 4.39-4.60 (5H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.065 (1H, t, <sup>3</sup>J=9.43 Hz, H-4), 3.87-3.94 (2H, m, H-2+ H-3), 3.80 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=1.8 Hz, <sup>3</sup>J=4.5 Hz, <sup>3</sup>J=9.8 Hz, H-5), 3.71 (1H, dd, <sup>3</sup>J=11.2 Hz, <sup>3</sup>J=4.5 Hz, H-6), 3.62 (1H, dd, <sup>3</sup>J=11.2 Hz, <sup>3</sup>J=1.8 Hz, H-6'), 2.38 (3H, s, H-11).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 189.98 (C10), 176.45 (C7), 143.72 (C8), 138.33, 138.23, 137.86, (4 C<sub>quat</sub> Bn), 134.46 (C9), 127.26-128.93 (CBn), 99.57 (C1), 79.23 (C3), 75.28 (CH<sub>2</sub>Bn), 74.71 (C5), 74.20 (C4), 73.67 (C2), 73.55 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.09 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.66 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.82 (C6), 26.37 (C11).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +32 (c=0.4g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

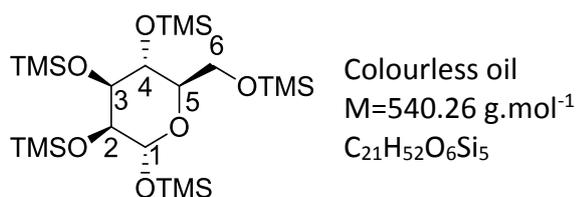
MS, ESI m/z: [M+Na]<sup>+</sup> = 688.2.

HRMS, ESI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 688.23285Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 688.23395Da.

### **2,3,4**

### **,6-tetra-O-trimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (24)**

$\alpha$ -D-mannose (1g, 5.56mmol) was dissolved in dry pyridine, HMDS (10mL, 8.6eq) and TMSCl (5mL, 7.12eq) were added and the mixture became white and turbid. The mixture was heated at 75°C during 90min under nitrogen, then quenched by water and extracted by pentane. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Several co-evaporations with toluene were required to remove the remaining pyridine. The crude product **24** (3g, quant) was used in the next step without further purification



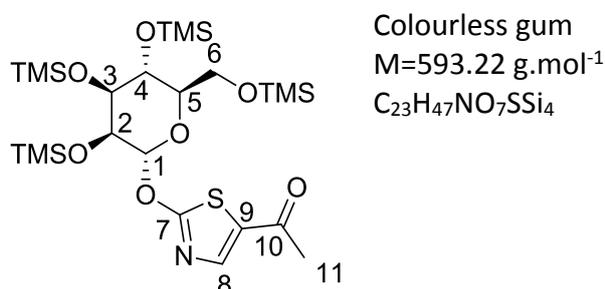
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 4.88 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 2.0 Hz, H-1), 3.79-3.82 (2H, m), 3.69-3.77 (2H, m), 3.62 (1H, t, J = 2.0 Hz), 3.54-3.60 (1H, m), 0.15 (9H, s, TMS), 0.14 (18H, s, TMS), 0.11 (9H, s, TMS), 0.10 (9H, s, TMS).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 95.73 (C-1), 75.35, 74.71, 72.32, 68.57, 62.64 (C-6), 0.86 (TMS), 0.75 (TMS), 0.52 (TMS), 0.54 (TMS), 0.0 (TMS).

Physical properties in accordance with literature<sup>147</sup>

#### **5-acetyl-2-(2,3,4,6-tetra-O-trimethylsilyl-α-D-mannopyranos-1-yl)oxy-1,3-thiazole (25)**

**24** (1.142g, 3eq) was solubilised in DCM (10mL) and fresh TMSI (205μL, 3eq) was added at 0°C. The solution was stirred for 10min at 0°C. The mixture was concentrated at rt and the co-evaporated several time with freshly distilled benzene under strong vacuum. The resulting colourless gum was solubilised in DCM, **5** (100mg, 0.70mmol) and molecular sieves were added and the solution stirred for 10 min at rt. The mixture was filtrated over decalite, rinsed with DCM and concentrated under vacuum. The resulting gum was purified by flash chromatography on silica gel neutralised by Et<sub>3</sub>N (PE/ EtOAc 95:5) to afford 103mg (25% yield) of the desired product.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm): 7.81 (1H, s, H-8), 5.88 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 2.3Hz, H-1), 4.06 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 2.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 2.5 Hz, H-2), 3.99 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 8.81 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 8.81 Hz, H-4), 3.82 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 8.4Hz, H-3), 3.74 (2H, d, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 3.4Hz, H-6), 3.58 (1H, m, H-5), 2.46

(3H, s, H-11), 0.175 (9H, s, OTMS), 0.172 (9H, s, OTMS), 0.15 (3H, s, OTMS), 0.10 (3H, s, OTMS).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm): 190.3 (C-10), 177.1 (C-7), 144.1 (C-8), 134.5 (C-9), 102.78 (C-1), 77.96 (C-5), 72.95 (C-3), 72.46 (C-2), 68.05 (C-4), 62.08 (C-6), 26.48 (C-11), 0.74 (OTMS), 0.60 (OTMS), 0.46 (OTMS), 0.10 (OTMS).

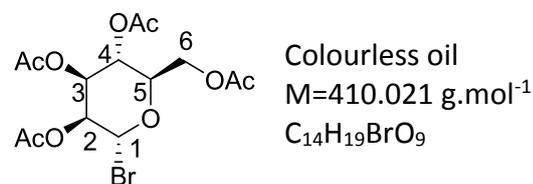
MS, ESI m/z: [M+Na]<sup>+</sup> = 616.2.

[α]<sub>D</sub> = +103 (c=0.9g/100mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20°C, 589.3nm).

HRMS, ESI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 616.2048, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 616.2054.

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-bromo-α-D-mannopyranose (26)**

**9** (1.04g, 2.55mmol, 1eq) was solubilised in DCM (13mL) and AcOH/HBr (6.2mL) was added. The mixture was stirred at rt for 3h, then diluted with ice and extracted by DCM. The organic layer was washed with water until pH was neutral, then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtrated and concentrated in vacuum. The crude product was used in the next step without further purification.



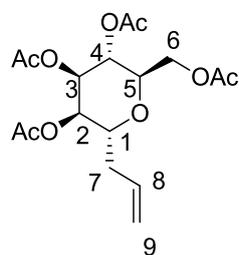
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 6.29 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=1.6 Hz, H-1), 5.71 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>=10.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>=3.4 Hz, H-3), 5.44 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>=3.4 Hz, H-3), 5.36 (1H, t, <sup>3</sup>J=10.2 Hz, H-4), 4.32 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>=4.9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.5 Hz, H-6), 4.21 (1H, m, H-5), 4.13 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>=2.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.5 Hz, H-6'), 2.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.0 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

Physical properties in accordance with literature<sup>148</sup>

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-allyl-α-D-mannopyranose (27)**

**26** (6g, 15.4mmol, 1eq) was solubilised in distilled benzene (90mL). Allylphenylsulfone (8.4mL, 2eq) was added and the mixture was degased during 30min. bis-tributyltin was added and the mixture was irradiated with a tungsten lamp during 18h. The mixture was then concentrated and solubilised in MeCN. Tin salts were removed by washing with PE. The mixture was concentrated and purified on silica gel: PE, then PE/EtOAc 5:1 until elimination

of the unreacted sulfone and finally 3:1 to afford 3.108g (54% yield) of the desired product as a colourless oil.



Colourless oil  
M=372.36 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 5.77 (1H, ddt, <sup>3</sup>J<sub>8-7</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9'-8</sub> = 10.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9-8</sub> = 17.0 Hz, H-8), 5.27 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 8.9 Hz, H-3), 5.16-5.21 (3H, m, H-2, H-4, H-9), 5.14 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>8-9'</sub> = 10.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>9-9'</sub> = 2.63 Hz, <sup>3</sup>J<sub>9'-7</sub> = 1.50 Hz, H-9'), 4.32 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 6.3 Hz, H-6), 4.32 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 3.0 Hz, H-6'), 4.04 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7'</sub> = 9.1 Hz, H-1), 3.90 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 6.3 Hz, H-5), 2.52 (1H, m, H-7), 2.41 (1H, m, H-7'), 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 170.80 (OAc), 170.33 (OAc), 170.08 (OAc), 169.80 (OAc), 132.68 (C-8), 118.46 (C-9), 74.28 (C-1), 70.84 (C-5), 70.18 (C-2), 68.94 (C3), 67.21 (C-4), 62.56 (C-6), 33.74 (C-7), 21.07 (CH<sub>3</sub>CO), 20.88 (CH<sub>3</sub>CO), 20.82 (CH<sub>3</sub>CO).

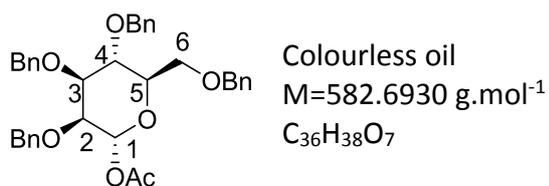
[α]<sub>D</sub> = +6 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> = 395.1.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 395.1312Da, [M+N]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 395.1317Da.

### **2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-acetyl-α-D-mannopyranose (28)**

**9** (3.0g 5.55mmol) was dissolved in DCM (10mL) and the solution was cooled to 0 °C. Pyridine (2.24mL, 27.7mmol) was added followed by acetyl chloride (1.57mL, 22.2mmol). The solution was stirred for 4 h and diluted with DCM. The solution was washed twice with 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> followed by brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The crude oil was purified by flash column chromatography (PE/EtOAc 9:1 to 8:2) to give 2.9g (89% yield) of the desired product.



$\alpha$ -Anomer:

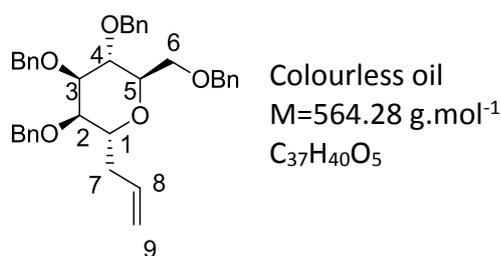
$^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  (ppm): 7.03 (20H, m, H-Bn), 6.59 (1H, d,  $^3J_{1-2}=1.9\text{Hz}$ , H-1), 4.96 (1H, d,  $^3J_{1-2}=11.3\text{Hz}$ ), 4.37-4.61 (8H, m, H- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.03-4.09 (1H, m), 3.93-3.98 (1H, dd,  $^3J=9.5\text{Hz}$ ,  $^3J=3.0\text{Hz}$ ), 3.83 (1H, dd,  $^3J=11.1\text{Hz}$ ,  $^3J=4.3\text{Hz}$ ), 3.68-3.76 (2H, m), 1.54 (3H, s, OAc).

Physical properties in accordance with literature<sup>149</sup>

### 2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-allyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (29)

**Method 1:** Prepared according to procedure (6) starting from 27. After purification on silica gel (PE/ EtOAc 98:2 to 9:1) the desired product was obtained as a colorless oil with 77% yield.

**Method 2:** 28 (3.9g, 6.7mmol) was dissolved in dry acetonitrile (60mL) under nitrogen and the solution was cooled to 0°C. TMSOTf (0.5 eq, 604 $\mu\text{L}$ ) was slowly added and the mixture sonicated in a bath kept under 10°C for 20min during which the solution turned yellow. The mixture was quenched with triethylamine (2eq, 1.8ml) and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silicagel (PE/EtOAc, 95-5 to 9-1), to afford 3.1g (82% yield) of the desired product.



$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 7.23-7.38 (18H, m, H-Bn), 7.18-7.23 (2H, m, H-Bn), 5.76 (ddt,  $^3J = 7.0/9.6/14.0\text{Hz}$ , 1H, H-8), 5.04 (1H, m, H-9), 5.00 (1H, m, H-9'), 4.70 (1H, d,  $^2J = 11.6\text{Hz}$ , H- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.50-4.62 (7H, m, H  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.04 (1H, ddd,  $^3J_{1-2} = 4.74\text{Hz}$ ,  $^3J_{1-7} = 6.26\text{Hz}$ ,  $^3J_{1-7} = 7.54\text{Hz}$ , H-1), 3.80-3.88 (2H, m, H-5, H-4), 3.74-3.80 (2H, m, H-3, H-6), 3.71 (1H, dd,  $^3J_{5-6} = 3.6\text{Hz}$ ,  $^2J_{6-6'} = 10.3\text{Hz}$ , H-6'), 3.62 (1H, dd,  $^3J_{3-2} = 3.0$ ,  $^3J_{1-2} = 4.7\text{Hz}$ , H-2), 2.33 (2H, m, H-7).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.64 (CBn<sub>IV</sub>), 138.48 (CBn<sub>IV</sub>), 138.47 (CBn<sub>IV</sub>), 138.37 (CBn<sub>IV</sub>), 134.51 (C-8), 127.60-128.52 (C-Bn), 117.3 (C-9), 77.01 (C-3), 75.44 (C-2), 75.12 (C-4), 73.93 (2 CH<sub>2</sub>Bn +C-5), 73.45 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.50 (C-1), 72.27 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.72 (CH<sub>2</sub>Bn), 69.36 (C-6), 34.85 (C-7).

**[α]<sub>D</sub>** = +15 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

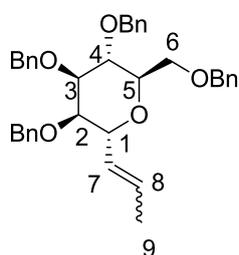
**MS, MALDI m/z: [M+Na]<sup>+</sup>** =587.3.

**HRMS, MALDI : [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>**=587.2768Da, **[M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup>**= 587.2766Da.

Physical properties in accordance with literature <sup>150</sup>

### **2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-(prop-1-en-1-yl)-α-D-mannopyranose (31)**

**29** (1.162g, 2.06mmol, 1eq) was solubilised in dry benzene (70mL) and bis (benzonitrile)palladium (II) chloride (78mg, 0.1eq) was added. The mixture was refluxed for 16h, filtered over decalite and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel PE/EtOAc 90:10 to afford 1.082g (93% yield) of the desired product as a colorless oil. (The remaining starting material <10% could not be separated).



Colourless oil  
M=564.28 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>

Mélange E/Z, 80:20

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** too complex for description (2 isomer + starting material).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.65 (CBn<sub>IV</sub>), 138.60 (CBn<sub>IV</sub>), 138.56 (CBn<sub>IV</sub>), 138.55 (CBn<sub>IV</sub>), 129.82 (C-8 or C-7), 127.50-128.7 (CBn), 127.24 (C-8 or C-7), 76.47, 75.52, 74.66 (CCH<sub>2</sub>Bn), 74.08, 73.91, 73.52, 72.26 (CCH<sub>2</sub>Bn), 71.87 (C CH<sub>2</sub>Bn), 69.75 (C-6), 18.22 (C-9).

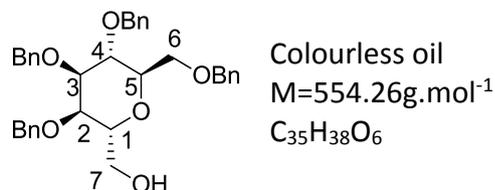
**MS, MALDI m/z: [M+H]<sup>+</sup>** = 587.3.

**HRMS, MALDI : [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>**=587.2768Da, **[M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup>**= 587.2760Da.

### **2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-(hydroxymethyl)-α-D-mannopyranose (32)**

**31** (1.082g, 1.91mmol, 1eq) was solubilised in DCM/MeOH, 1:1 (100mL) and the temperature was decreased to -70°C. Ozone was bubbled until the mixture turned blue. The

solution as degassed by bubbling nitrogen and NaBH<sub>4</sub> was added (2eq, 146 mg) and the solution was allowed to warm up to rt. After 1h, the mixture was washed with a saturated solution of NH<sub>4</sub>Cl, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel PE/EtOAc 90:10 to afford 814mg (77% yield) of the desired product as colourless oil. (Presence of the compound **33** <10%)



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 7.26-7.35 (16H, m, HBn), 7.21-7.24 (4H, m, HBn), 4.44-4.57 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.07 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 2.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 5.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 7.8 Hz, H-5), 3.96 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.4Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7'</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub> = 7.8 Hz, H-1), 3.83 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 7.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.3 Hz, H-6), 3.74-3.81 (4H, m, H-7, H-2, H-3), 3.70 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 2.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 4.1 Hz, H-4), 3.65 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 6'-5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.2 Hz, H-6').

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 138.35 (CBn<sub>IV</sub>), 138.20 (CBn<sub>IV</sub>), 138.11 (CBn<sub>IV</sub>), 127.79-128.59 (CBn), 74.88 (C-5), 74.71 (C-4), 74.53 (C-3), 73.43 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.37 (C-2), 72.78 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.41 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.86 (CH<sub>2</sub>Bn), 70.60 (C-1), 68.44 (C-6), 62.42 (C-7).

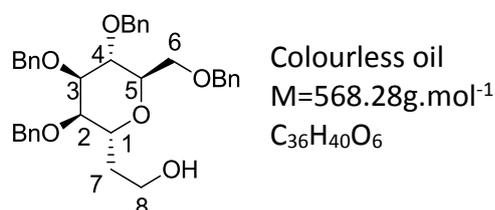
[α]<sub>D</sub><sup>+</sup> 18 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, CI m/z: [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 572.3, [m-H<sup>+</sup>] = 553.3.

HRMS, MALDI : [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub>=577.2561Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>fund</sub>= 577.2553Da.

### **2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-(2-hydroxyethyl)-α-D-mannopyranose (33)**

**29** (1.1g, 1.95mmol) was dissolved in DCM/MeOH 9:1, (40mL) and the temperature was decreased to -78°C. Ozone was then bubbled until the mixture was blue, then the remaining ozone was chased by N<sub>2</sub>. Sodium borohydride was added and the mixture was allowed to raise rt over 2h. The mixture was hydrolysed by 30mL of 1M HCl, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel (PE/EtOAc 6:4) to afford the 900mg (81% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.19-7.33 (20H, m, HBn), 4.49-4.62 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.16 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7'</sub> = 9.9 Hz, H-1), 3.97 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 7.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 9.0 Hz, H-5), 3.74-3.82 (4H, m, H-8, H-6, H-3), 3.71 (1H, t, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, H-4), 3.63 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 4.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.2 Hz, H-6'), 3.60 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 2.9 Hz, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, H-2), 1.72-1.92 (2H, m, H-7).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.24 (CBn<sub>IV</sub>), 127.77-128.57 (CBn), 76.51 (C-2), 76.09 (C-3), 75.08 (C-4), 73.77 (C-5), 73.45 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.31 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.61 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.18 (C-1), 71.84 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.82 (C-6), 61.52 (C-8), 32.45 (C-7).

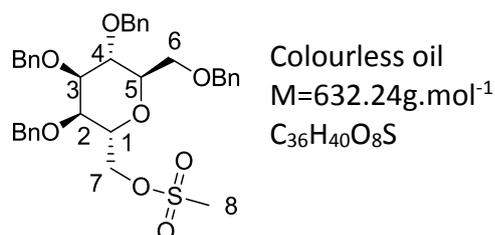
[α]<sub>D</sub> = + 14 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 591.3.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 591.2717Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>find</sub> = 591.2732Da.

**(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)methylmethanesulfonate (34)**

Prepared following **GP (7)**, starting from **32** (6.04mmol, 3.350g). The resultant oil was purified on silica gel PE/EtOAc 90:10 to 75:25, to afford 2.980g (78% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.26-7.37 (16H, m, HBn), 7.19-7.24 (4H, m, HBn), 4.41-4.57 (10H, m, CH<sub>2</sub>Bn, H-7), 4.05-4.15 (2H, m, H-5, H-1), 3.77-3.85 (3H, m, H-6, H-2, H-3), 3.71 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz, <sup>3</sup>J = 4.08 Hz, H-4), 3.65 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 5.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.3 Hz, H-6'), 2.98 (3H, s, H-8).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.23 (CBn<sub>IV</sub>), 137.95 (CBn<sub>IV</sub>), 137.70 (CBn<sub>IV</sub>), 127.83-128.62 (CBn), 74.92 (C-5), 74.71 (C-4), 73.66 (C-2 ou C-3), 73.37 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.85 (CH<sub>2</sub>Bn),

72.45 (C-2 ou C-3), 72.25 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.77 (CH<sub>2</sub>Bn), 69.99 (C-7), 68.93 (C-1), 68.24 (-6), 37.97 (C-8).

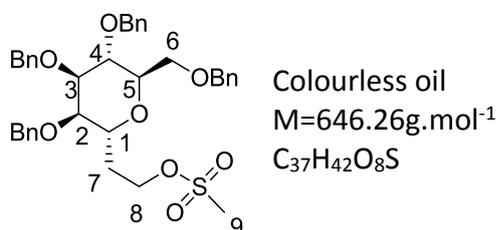
$[\alpha]_D = +29$  (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI+ m/z:**  $[M+NH_4]^+ = 655.2$ .

**HRMS, ESI+ :**  $[M+Na]_{calc}^+ = 655.23361$ ,  $[M+Na]_{fnd}^+ = 655.23265$ Da.

### **2-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)ethylmethanesulfonate (35)**

Prepared following **GP (7)**, starting from **33** (3.23g, 5.68mmol). The resultant oil was purified on silica gel (PE/EtOAc 70:30), to afford 3.49g (95% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 7.19-7.36 (m, 20H, HBn), 4.46-4.60 (m, 8H, CH<sub>2</sub>Bn), 4.28-4.33 (2H, m, H-8) 4.06 (1H, ddd, <sup>3</sup>J= 3.6 Hz, <sup>3</sup>J= 6.7 Hz, <sup>3</sup>J= 10.1 Hz, H-1) 3.89 (1H, m, H-5), 3.74-3.80 (3H, m, H-6, H-4, H-3), 3.69 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.1 Hz, H-6'), 3.57 (1H, dd, <sup>3</sup>J= 2.5 Hz, <sup>3</sup>J= 6.5 Hz, H-2), 2.88 (3H, s, H-8), 2.02-2.12 (1H, m, H-7), 1.86-1.96 (1H, m, H-7').

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 138.33 (CBn<sub>IV</sub>), 138.15 (CBn<sub>IV</sub>), 138.11 (CBn<sub>IV</sub>), 138.06 (CBn<sub>IV</sub>), 127.80-128.58 (CBn), 76.18 (C-2), 75.40 (C-3), 74.77 (C-4), 74.19 (C-5), 73.44 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.24 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.58 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.73 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.88 (C-6), 67.70 (C-1), 67.03 (C-8), 37.11 (C-9), 30.23 (C-7).

$[\alpha]_D = +20.4$  (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

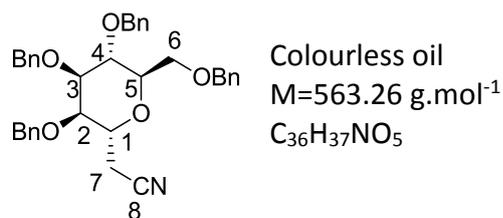
**MS, MALDI m/z:**  $[M+NH_4]^+ = 669.3$ .

**HRMS, MALDI :**  $[M+Na]_{calc}^+ = 669.2493$ Da,  $[M+Na]_{fnd}^+ = 669.2518$ Da.

### **2-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranose)acetonitrile (36)**

Prepared following **GP (8)**, starting from **34** (406mg, 0.64mmol). The resultant oil was purified on silica gel PE/EtOAc 90:10 to 85:15, to afford 280mg (78% yield) of the desired product as colourless oil.

-Experimental Part-



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.23-7.37 (18H, m, HBn), 7.16-7.20 (2H, m, HBn), 4.37-4.59 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.14 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 1.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 8.5 Hz, H-5), 4.09 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub> = 3.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 9.2 Hz, H-1), 3.78-3.85 (2H, m, H-3, H-6), 3.76 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 2.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 4.0 Hz, H-4), 3.67-3.73 (2H, m, H-2, H-6'), 2.71 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7</sub> = 16.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub> = 3.9 Hz, H-7), 2.57 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7</sub> = 16.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub> = 6.8 Hz, H-7').

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.31 (CBn<sub>IV</sub>), 138.01 (CBn<sub>IV</sub>), 137.82 (CBn<sub>IV</sub>), 137.57 (CBn<sub>IV</sub>), 127.76-128.78 (CBn), 117.47 (C-8), 75.45 (C-2), 75.02 (C-5), 73.97 (C-4), 73.40 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.97 (C-3), 72.74 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.09 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.56 (CH<sub>2</sub>Bn), 67.9 (C-6), 66.26 (C-1), 21.42 (C-7).

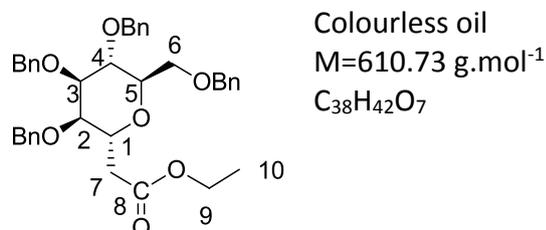
[α]<sub>D</sub> = +33 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, CI m/z: [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 581.3.

HRMS, MALDI : [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 586.2564Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 586.2593Da.

**Ethyl-2-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)acetate (37)**

P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> (21 mg, 1.1eq) was added carefully to a solution of ethanol (7ml) and stirred 30 min, then **36** (25 g, 0.044mmol) was added and the mixture was refluxed for 16 h. After addition of water and extraction with DCM, the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuum. The resultant oil was purified on silica gel PE/EtOAc 9:1, to afford 20mg (73% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.20-7.36 (20H, m, HBn), 4.50-4.63 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.48 (1H, m, H-1), 4.10 (2H, q+q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-9, H-9'), 3.92 (1H, m, H-5), 3.86 (1H, t, <sup>3</sup>J = 4.8Hz, H-4), 3.75-3.83 (3H, m, H-3, H-6), 3.65 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 2.9 Hz, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, H2), 2.66 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7</sub> =

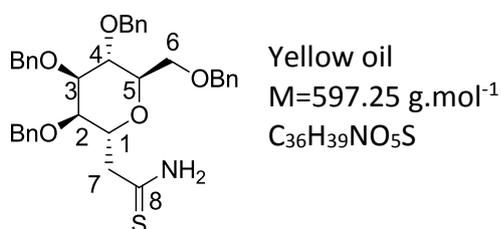
15.2 Hz,  $^3J_{1-7} = 4.8$  Hz, H-7), 2.53 (1H, dd,  $^2J_{7-7'} = 15.2$  Hz,  $^3J_{1-7'} = 8.4$  Hz, H-7'), 1.20 (3H, t,  $^3J = 7.1$  Hz, H-10).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 171.08 (C8), 138.60 ( $\text{CBn}_{\text{IV}}$ ), 138.35 ( $\text{CBn}_{\text{IV}}$ ), 138.25 ( $\text{CBn}_{\text{IV}}$ ), 138.20 ( $\text{CBn}_{\text{IV}}$ ), 127.62-128.52 (CBn), 75.68 (C-2, C3), 74.64 (C-4), 74.44 (C-5), 73.48 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 73.26 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.36 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.45 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 69.02 (C-1), 68.94 (C-6), 60.69 (C-9), 36.77 (C-7), 14.31 (C-10).

**MS, CI  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 628.4$ .**

### **2-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)thioacetamide (38)**

Prepared following **GP (9)**, starting from **36** (200mg, 0.35mmol). After purification over silica gel (PE/EtOAc 8:2), 166mg (80% yield) of the desired product was obtained as a yellow oil.



**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 8.61 (1H, bs,  $\text{NH}_2$ ), 7.18-7.38 (20H, m, H-Bn), 7.15 (1H, bs,  $\text{NH}_2$ ), 4.42-4.61 (8H, m,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.28 (1H, ddd,  $^3J_{7-1} = 1.9$  Hz,  $^3J_{1-2} = 8.2$  Hz,  $^3J_{1-7} = 9.3$  Hz, H-1), 4.01-4.13 (2H, m, H-5, H-6), 3.75 (1H, dd,  $^3J_{3-2} = 2.9$  Hz,  $^3J_{3-4} = 4.5$  Hz, H-3), 3.57 (1H, dd,  $^3J_{3-2} = 2.9$  Hz,  $^3J_{1-2} = 7.9$  Hz, H-2), 3.51 (1H, dd,  $^3J_{5-4} = 2.9$  Hz,  $^3J_{3-4} = 4.5$  Hz, H-4), 3.44 (1H, dd,  $^3J_{6'-5} = 1.4$  Hz,  $^3J_{6-6'} = 8.4$  Hz, H-6'), 3.25 (1H, dd,  $^3J_{7-1} = 1.25$  Hz,  $^2J_{7-7'} = 16.9$  Hz, H-7), 2.94 (1H, dd,  $^3J_{1-7} = 10.0$  Hz,  $^2J_{7-7'} = 16.9$  Hz, H-7').

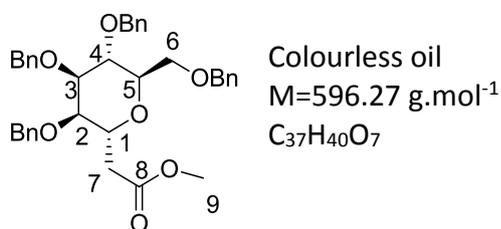
**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 206.94 (C-8), 137.94 ( $\text{CBn}_{\text{IV}}$ ), 137.77 ( $\text{CBn}_{\text{IV}}$ ), 137.63 ( $\text{CBn}_{\text{IV}}$ ), 127.79-128.84 (CBn), 75.61 (C-2), 74.89 (C-4), 74.40 (C-5), 74.17 (C-3), 73.47 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 73.19 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.67 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.18 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 68.44 (C-1), 67.72 (C-6), 30.77 (C-7).

**MS, CI  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 598.3$ .**

### **Methyl-2-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)acetate (40)**

**29** (3.1g, 5.49mmol) was dissolved in DCM (enough to allow the bubbling), then a 2.5M sodium methanolate in methanol was added (20mL). The mixture was cooled to  $-78^\circ\text{C}$ , then ozone was bubbled. The mixture became quickly yellow and the bubbling was continued until a green/blue colour appeared. Then ozone was replaced by nitrogen and

dimethylsulfide (3mL) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature, then washed by HCl 2M, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified on silica gel PE/EtOAc 90:10 to 80:20, to afford 1.82g (57% yield) of the desired product as a colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.20-7.34 (20H, m, HBn), 4.49-4.61 (m, 8H, CH<sub>2</sub>Bn), 4.47 (1H, m, H-1), 3.92 (1H, m, H-5), 3.84 (1H, t, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, H-4), 3.77-3.81 (3H, m, H-3, H-6), 3.63 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-2), 3.62 (3H, s, H-9), 2.67 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 15.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub> = 5.3 Hz, H-7), 2.54 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 15.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7'</sub> = 8.3 Hz H-7').

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 171.56 (C-8), 138.60 (CBn<sub>IV</sub>), 138.32 (CBn<sub>IV</sub>), 138.23 (CBn<sub>IV</sub>), 138.16 (CBn<sub>IV</sub>), 127.63-128.54 (CBn), 75.71 (C-2), 75.44 (C-3), 74.65 (C-4), 74.53 (C-5), 73.48 (CH<sub>2</sub>Bn), 73.16 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.43 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.45 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.96 (C-6), 68.78 (C-1), 51.83 (C-9), 36.63 (C-7).

[α]<sub>D</sub> = +9 (c=0.55g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

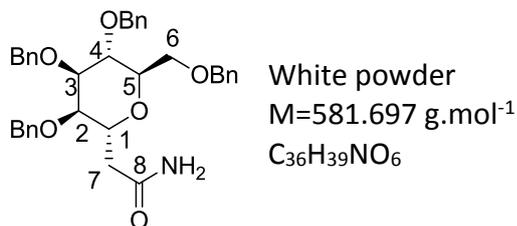
**MS, MALDI m/z: [M+Na]<sup>+</sup> = 619.3.**

**HRMS, MALDI : [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 619.2666Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>find</sub> = 604.2684Da.**

### **2-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)acetamide (41)**

**40** (3.76g, 6.31mmol) was dissolved in THF (50mL) and lithium hydroxide was added (10 eq, 1.5g). Water was added until total solubilization, then the mixture was heated at reflux during 2h. The solution was acidified by HCl 4M, then extracted with EtOAc, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude oil was dissolved in DCM (60mL) and cooled to 0°C under nitrogen. A drop of DMF was added and oxalyl chloride (4 eq, 2.18mL) was added slowly. The mixture was stirred at room temperature for 6h and concentrated in vacuum. The resulting oil was dissolved in DCM and poured in a cold solution of 25% aqueous ammonia. The compound was extracted with DCM and the organic layer acidified with 4M HCl, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under

vacuum. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel PE/EtOAc 40:60 to 30:70, to afford 2.93g (79% yield) of the desired product as white powder.



$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 7.18-7.36 (20H, m, H-Bn), 5.40 (1H, bs,  $\text{NH}_2$ ), 4.43-4.60 (8H, m,  $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.25 (1H, ddd,  $^3J = 2.1$ ,  $^3J = 8.4$ ,  $^3J = 10.2$  Hz, H-1), 4.06-4.13 (2H, m, H-6, H-), 3.79 (1H, dd,  $^3J = 3.1$  Hz  $^3J = 4.3$  Hz, H-3), 3.57 (1H, dd,  $^3J = 2.8$  Hz,  $^3J = 8.1$  Hz, H-2), 3.53 (1H, dd,  $^3J = 2.4$  Hz  $^3J = 4.6$  Hz, H-4), 3.44 (1H, m, H-6'), 2.68 (1H, dd,  $^3J_{7-1} = 2.2$  Hz  $^3J_{7-7} = 16.5$  Hz, H-7), 2.49 (1H, dd,  $^3J_{7-1} = 10.2$  Hz  $^3J_{7-7} = 16.5$  Hz, H-7).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 137.79 (2C-Bn<sub>IV</sub>), 137.68 (2C-Bn<sub>IV</sub>), 137.58 (C-Bn<sub>IV</sub>), 127.7-128.6 (C-Bn), 75.72 (C-2), 74.64 (C-3), 74.28 (C-5), 73.77 (C-4), 73.31 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 73.01 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.45 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.83 ( $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 67.40 (C-6), 68.48 (C-1), 37.05 (C-7).

$[\alpha]_D = -18$  (c=1g/100mL,  $\text{CHCl}_3$ , 20°C, 589.3nm).

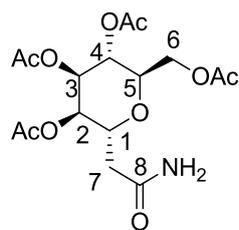
MS, MALDI  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 604.3$ .

HRMS, MALDI :  $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{calc}}^+ = 604.2670\text{Da}$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{fnd}}^+ = 604.2663\text{Da}$ .

### **2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)acetamide (42)**

**41** (2.930g, 4.97mmol) was dissolved in a 1:1 mixture of DCM and MeOH (40mL). Pearlman's catalyst (1g) was added and the flask was placed under  $\text{H}_2$  atmosphere overnight. The mixture was filtrated on decalite and rinsed with water. The solution was concentrated and co-evaporated with toluene to remove all water (or lyophilised). The resulting white powder was suspended in pyridine (40mL) and acetic anhydride (30 eq, 14mL) was added, with a catalytic amount of DMAP). The mixture was stirred overnight at room temperature, concentrated under vacuum and co-evaporated with toluene (removing pyridine by washing steps result in a loss of product). The crude product was purified by flash chromatography on silica gel, eluted with EtOAc to afford 1.93g (96% yield) of the desired product as white powder.

-Experimental Part-



Colourless oil  
M=389.13 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 6.11 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.41 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.28 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>=6.3 Hz, H-3), 5.10 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=6.6 Hz, H-2), 5.06 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub>= 5.02 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>=6.2 Hz, H-4), 4.48 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>=7.9 Hz, H-6), 4.38 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-7'</sub>= 3.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub>=10.0 Hz, H-1), 4.22 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>= 4.0 Hz, H-6'), 4.04 (1H, m, H-5), 2.59 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 15.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub>= 9.4 Hz, H-7), 2.51 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 15.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7'</sub>= 3.8 Hz, H-7'), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 171.21 (C-8), 170.63 (OAc), 169.98 (OAc), 169.93 (OAc), 72.65 (C-5), 69.20 (C-2), 68.77 (C-1), 67.87 (C-4), 67.79 (C-3), 61.48 (C-6), 37.08 (C-7), 20.94 (CH<sub>3</sub>CO), 20.86 (CH<sub>3</sub>CO).

[α]<sub>D</sub>= -69 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

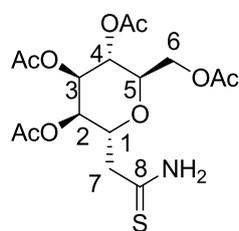
MS, ESI m/z: [M+Na]<sup>+</sup> = 412.1.

HRMS, ESI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=412.12142Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup>= 412.12131Da.

**2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-α-D-mannopyranosyl)thioacetamide (43)**

**42** (330mg, 0.85mmol) was dissolved in THF with phosphorous pentasulfide (1.1eq, 207mg) and the solution was stirred 1h at rt. The mixture was washed by brine, extracted by EtOAc, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum.

The crude product was purified by flash chromatography on silica gel, PE/EtOAc 6:4 to 5:5 to afford 255mg (74% yield) of the desired product as white powder.



Colourless oil  
M=405.11 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub>S

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.74 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 7.61 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.27 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 6.0 Hz, H-3), 5.08 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub>= 6.9 Hz, H-2), 5.03 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub>= 4.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 6.1 Hz, H-4), 4.48 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 12.1 Hz, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, H-6), 4.42 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub>= 4.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 6.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub>= 8.3 Hz, H-1), 4.22 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub>= 4.0 Hz, H-6'), 4.07 (1H, m,

H-5), 3.05 (1H, dd,  $^2J_{7-7'} = 15.4$  Hz,  $^3J_{1-7} = 4.0$  Hz, H-7), 3.00 (1H, dd,  $^2J_{7'-7} = 15.4$  Hz,  $^3J_{1-7'} = 8.4$  Hz H-7'), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 205.16 (C-8), 170.57 (OAc), 169.93 (OAc), 169.61 (OAc), 169.53 (OAc), 72.91 (C-5), 70.06 (C-2), 68.72 (C-1), 67.90 (C-4), 67.61 (C-3), 61.33 (C-6), 45.41 (C-7), 20.88 (CH<sub>3</sub>CO), 20.87 (CH<sub>3</sub>CO), 20.84 (CH<sub>3</sub>CO).

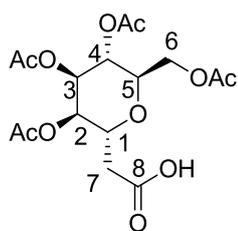
**[α]<sub>D</sub>** = +18 (c=0.9g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, CI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> = 406.2.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=428.0986Da, [M+Na]<sub>fund</sub><sup>+</sup>= 428.0970Da.

### **2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)acetic acid (44)**

A solution of KMnO<sub>4</sub> (2.72 g, 17.203mmol, 3.2 equiv.) in water (60mL) was cooled to 0°C and stirred vigorously. A solution of the allyl derivative **27** (2.0 g, 5.376mmol, 1 equiv.) and tetrabutylhydrogensulfate (0.2 g, 0.589, 0.1 equiv.) in toluene (60mL) and glacial acetic acid (12mL), was added in one portion. The solution was allowed to reach rt in 4 h. 7g of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> was added to the cooled reaction mixture, followed by the slow addition of a solution of 7mL of concentrated HCl in 7mL of water, to afford two clear layers. The aqueous layer was extracted three times with ethyl acetate. The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (EtOAc as eluent) to give 1.35g (61% yield) of the desired product.



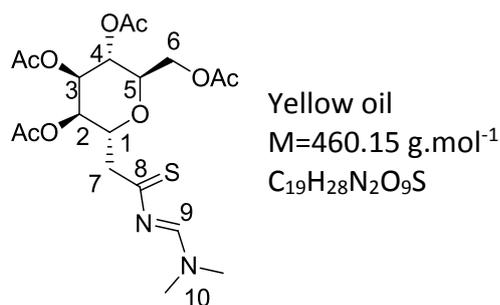
Colourless oil  
M=390.1162 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm):** 5.22 (1H, dd,  $^3J = 3.3$  Hz,  $^3J = 7.2$  Hz, H-3), 5.12 (1H, dd,  $^3J = 3.3$  Hz,  $^3J = 5.15$  Hz, H-2), 5.077 (1H, t,  $^3J = 6.5$  Hz, H-4), 4.39 (2H, m, H-1, H-6), 4.10 (1H, m, H-6'), 3.95 (1H, m, H-5), 2.59-2.74 (2H, m H-7), 2.05 (6H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.01-2.06 (12H, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 174.39 (C-8), 170.83 (OAc), 169.97 (OAc), 169.79 (OAc), 169.68 (OAc), 72.01 (C-5), 69.55 (C-1), 69.32 (C-2), 68.13 (C-3), 67.40 (C-4), 61.59 (C-6), 35.44 (C-7), 21.04 (CH<sub>3</sub>CO), 20.78 (CH<sub>3</sub>CO), 20.69 (CH<sub>3</sub>CO), 20.67 (CH<sub>3</sub>CO).

**2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)-N-(dimethylamino)methylene  
ethanethioamide (45)**

**43** (710mg, 1.75mmol) was dissolved in acetonitrile (10mL), DMF-DMA (1.3eq, 305 $\mu$ L) was added and the mixture was warmed to 60°C for 40 min. The mixture was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel, PE/EtOAc 6:4 to 2:8 to afford 545mg (68% yield) of the desired product as a white powder.



Only the main isomer is described by NMR

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 8.52 (1H, s, H-9) 5.41 (1H, dd,  $^3J_{1-2} = 2.3$  Hz,  $^3J_{2-3} = 3.2$  Hz, H-2), 5.24-5.35 (2H, m, H-3, H-4), 4.62 (1H, ddd,  $^3J_{1-2} = 4.6$  Hz,  $^3J_{1-7'} = 6.3$  Hz,  $^3J_{1-7} = 8.8$  Hz, H-1), 4.26 (1H, dd,  $^2J_{6-6'} = 12.7$  Hz,  $^3J_{5-6} = 5.7$  Hz, H-6), 4.03-4.12 (2H, m, H-5, H-6') 3.47 (1H, dd,  $^2J_{7-7'} = 13.7$  Hz,  $^3J_{7-1} = 9.2$  Hz, H-7), 3.22 (3H, s, H10), 3.14 (3H, s, H10'), 3.11 (1H, dd,  $^2J_{7-7'} = 13.7$  Hz,  $^3J_{7-1} = 6.2$  Hz, H-7'), 2.14 (, 3H, sCH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 203.7 (C-8), 170.90 (OAc), 170.38 (OAc), 170.11 (OAc), 169.89 (OAc), 158.59 (C-9), 75.59 (C-1), 70.77 (C-5), 70.52 (C-2), 69.57 (C-3), 66.91 (C-4), 62.85 (C-6), 50.11 (C-7), 42.15 (C-10), 36.61 (C-10'), 21.15 (CH<sub>3</sub>CO), 20.96 (CH<sub>3</sub>CO), 20.90 (CH<sub>3</sub>CO), 20.82 (CH<sub>3</sub>CO).

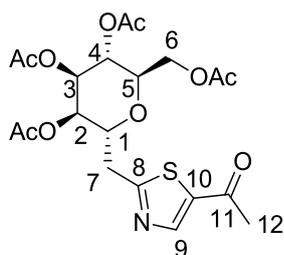
$[\alpha]_D = -44$  (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, CI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 461.3.**

**HRMS, ESI: [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 461.1588Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 461.1584Da.**

**5-acetyl-2-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)methyl)thiazol (46)**

Prepared following **GP (12)**, starting from **43** (100mg, 0.247mmol) and chloroacetone. After purification over silica gel (PE/EtOAc 4:6), 45mg (39% yield) of the desired product was obtained as a slightly yellow oil.



Yellow oil  
 M=471.11 g.mol<sup>-1</sup>  
 C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>10</sub>S

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 8.20 (1H, s, H-9) 5.33 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 6.7Hz, H-3), 5.19 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub>= 6.0Hz, H-2), 5.09 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub>= 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub>= 6.7Hz, H-4), 4.45 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 13.0Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 8.5Hz, H-6), 4.36 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 5.6 Hz, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, <sup>3</sup>J = 11.8Hz, H-1), 4.11 (2H, m, H-5, H-6') 3.30-3.40 (2H, m, H-7), 2.56 (3H, s, H-12), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 190.13 (C-11), 172.58 (C-8), 170.74 (OAc), 169.98 (OAc), 169.68 (2OAc), 146.86 (C-9), 140.95 (C-10), 72.51 (C-5), 71.17 (C-1), 69.22 (C-2), 67.95 (C-3), 67.72 (C-4), 61.33 (C-6), 34.94 (C-7), 27.43 (C-12), 20.94 (CH<sub>3</sub>CO), 20.92 (CH<sub>3</sub>CO), 20.84 (2xCH<sub>3</sub>CO).

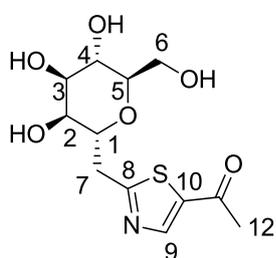
[α]<sub>D</sub>= -8 (c=0.5 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, CI m/z: [M+H]<sup>+</sup>** = 472.21.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=472.1272Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup>= 472.1285Da.

### **5-acetyl-2-((α-D-mannopyranos-1-yl)methyl)thiazole (MCTz1)**

Prepared following **GP (13)**, starting from **46** (87mg, 0.184mmol). After purification over silica gel (DCM/MeOH 9:1) and lyophilisation, 25mg (45% yield) of the desired product was obtained as a white solid.



White amorphous solid  
 M=303.08 g.mol<sup>-1</sup>  
 C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>S

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ (ppm):** 8.37 (1H, s, H-9), 4.36 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 4.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub>= 4.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7'</sub>= 9.2 Hz, H-1), 3.83 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-6'</sub>= 11.8 Hz, H-6), 3.78-3.81 (2H, m, H-2, H-3) 3.72-3.77 (2H, m, H-6', H-4), 3.62-3.67 (1H, m, H-5), 3.38-3.44 (2H, m, H-7).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm): 192.38 (C-11), 176.78 (C-8), 148.29 (C-9), 141.53 (C-10), 77.61 (C-5), 76.22 (C-1), 72.42 (C-3), 71.37 (C-2), 69.52 (C-4), 62.39 (C-6), 35.31 (C-7), 27.24 (C-12).

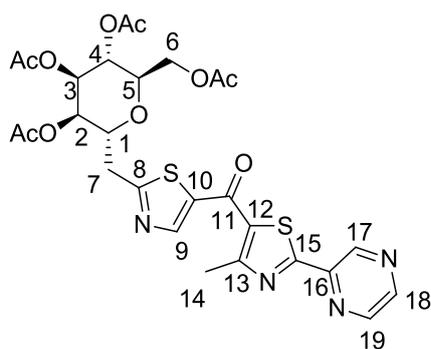
$[\alpha]_D = +40$  (c=1.25 g/100mL, MeOH, 20°C, 589.3nm).

MS, CI m/z:  $[M+H]^+ = 304.1$ .

HRMS, ESI:  $[M-H]_{\text{calc}}^- = 302.0693\text{Da}$ ,  $[M-H]_{\text{fnd}}^- = 302.0692\text{Da}$ .

**5-(4-methyl-2-(pyrazin-2-yl)thiazol-5-carbonyl)2-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)methyl)thiazole (47)**

Prepared following GP (12), starting from 43 (70mg, 0.15mmol) and 2-Bromo-1-[4-methyl-2-(2-pyrazinyl)-1,3-thiazol-5-yl]-1-ethanone. After purification over silica gel (PE/EtOAc 4:6), 52mg (55% yield) of the desired product was obtained as a slightly yellow gum.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 9.46 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>19-18</sub> = 1.5Hz, H-19), 8.66 (1H, d, <sup>4</sup>J<sub>17-18</sub> = 2.6Hz, H-17), 8.58 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>19-18</sub> = 1.5Hz, <sup>4</sup>J<sub>17-18</sub> = 2.6Hz, H-18), 8.39 (1H, s, H-9), 5.34 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 6.5Hz, H3), 5.20 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 6.0 Hz, H-2), 5.08 (1H, t, <sup>3</sup>J = 6.3Hz, H-4), 4.47 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 8.5Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.8Hz, H-6), 4.39 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 6.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub> = 13.2 Hz, H-1), 4.08-4.15 (2H, m, H-6', H-5), 3.37 (2H, s, H-7), 2.78 (3H, s, H14), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 178.10 (C-11), 172.84 (C-8), 170.69 (OAc), 169.92 (OAc), 169.64 (OAc), 169.60 (OAc), 167.62 (C-15), 162.13 (C-12), 147.35 (C-9), 146.33 (C-17), 146.11 (C-16), 144.27 (C-18), 142.10 (C-19), 141.48 (C-10), 129.86 (C-13), 72.581 (C-5), 70.93 (C-1), 69.18 (C-2), 67.86 (C-3), 67.73 (C-4), 61.31 (C-6), 34.97 (C-7), 20.91 (CH<sub>3</sub>CO), 20.87 (CH<sub>3</sub>CO), 20.85 (CH<sub>3</sub>CO), 20.80 (CH<sub>3</sub>CO), 18.46 (C-14).

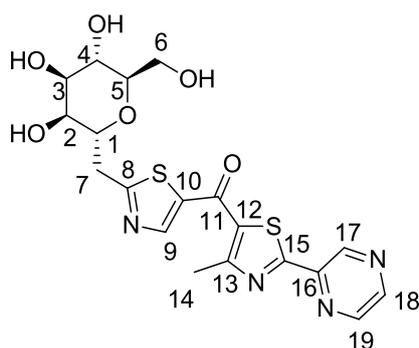
$[\alpha]_D = -5$  (c=0.36g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, CI m/z:  $[M+H]^+ = 633.2$ .

HRMS, MALDI :  $[M+H]^+_{\text{calc}}=633.1320\text{Da}$ ,  $[M+Na]^+_{\text{fnd}}=633.1332\text{Da}$ .

**5-(4-methyl-2-(pyrazin-2-yl)thiazol-5-carbonyl)2-(( $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)methyl)thiazole (MCTz2)**

Prepared following **GP (13)**, starting from **47** (52mg, 0.184mmol). The solid was washed several times by water and methanol to afford 34mg (90% yield) of the desired product as a white powder.



White solid  
M=464.08 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm):** 9.39 (1H, d,  $^3J_{19-18}=1.4\text{Hz}$ , H-19), 8.85 (1H, d,  $^4J_{17-18}=2.4\text{Hz}$ , H-17), 8.79 (1H, dd,  $^3J_{19-18}=1.4$ ,  $^4J_{17-18}=2.4\text{Hz}$ , H-18), 8.50 (1H, s, H-9), 4.81 (1H, d,  $^3J=4.7\text{Hz}$ , OH-4), 4.78 (d,  $^3J=4.7\text{Hz}$ , 1H, OH-3), 4.69 (1H, d,  $^3J=5.6\text{Hz}$ , OH-2), 4.37 (1H, t,  $^3J=5.7\text{Hz}$ , OH-6), 4.06 (1H, ddd,  $^3J_{1-7}=3.9\text{Hz}$ ,  $^3J_{1-2}=5.2\text{Hz}$ ,  $^3J_{1-7'}=9.1\text{Hz}$ , H-1), 3.56-3.70 (5H, m, H-6, H-4, H-3, H-2), 3.54 (1H, m, H-5), 3.42 (1H, dd,  $^2J_{7-7'}=15.7\text{Hz}$ ,  $^3J_{7-1}=3.9\text{Hz}$ , H-7), 3.30 (1H, dd,  $^2J_{7-7'}=15.7\text{Hz}$ ,  $^3J_{1-7'}=9.3\text{Hz}$ , H-7'), 2.70 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm):** 178.00 (C-11), 175.89 (C-8), 167.10 (C-15), 160.08 (C-13), 147.85 (C-9), 146.95 (C-17), 144.98 (C-16), 144.83 (C-18), 140.91 (C-19), 139.80 (C-10), 130.02 (C-12), 77.23 (C-5), 73.02 (C-1), 70.71 (C-3), 69.00 (C-2), 68.28 (C-4), 60.48 (C-6), 34.88 (C-7), 17.95 (C-14).

$[\alpha]_D^{20} = +37$  (c=0.3g/100mL, DMSO, 20°C, 589.3nm).

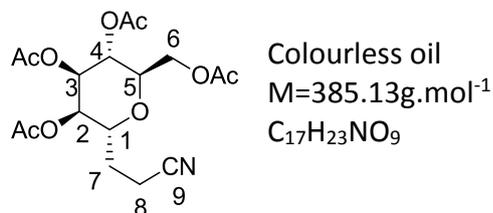
**MS, ESI m/z:**  $[M-H]^- = 463.1$ .

**HRMS, ESI:**  $[M-H]^-_{\text{calc}}=463.0741$ ,  $[M-H]^-_{\text{fnd}}=463.0736\text{Da}$ .

**3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)propionitrile (49)**

**50** (1g, 1.73mmol) was solubilised in DCM/MeOH (9:1) (40mL) and Pd/C was added (500mg). The mixture was placed under H<sub>2</sub> atmosphere and stirred for 6h. The reaction was monitored by TLC (DCM/MeOH 8:2). After filtration, the mixture was concentrated, diluted

in pyridine and acetic anhydride (3.3mL, 20eq) was added followed by a catalytic amount of DMAP. The mixture was stirred overnight. After product extraction with toluene, the organic layer was washed by a 2M solution of HCl, water, NaHCO<sub>3</sub> sat and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel (PE/EtOAc 1:1) to afford the 307mg (46% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 5.25 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>=3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub>=6.6 Hz, H-3), 5.04-5.07 (2H, m, H-2, H-4), 4.58 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>=7.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.2 Hz, H-6), 4.10 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>=3.7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.2 Hz, H-6'), 4.04 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=4.7 Hz, <sup>3</sup>J=6.0 Hz, <sup>3</sup>J=10.8 Hz, H-1), 3.96 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=3.8 Hz, <sup>3</sup>J=5.0 Hz, <sup>3</sup>J=8.2 Hz, H-5), 2.47 (2H, t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-8), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.093 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.090 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.92-2.02 (2H, m, H-7).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 170.77 (OAc), 170.02 (OAc), 169.64 (2OAc), 118.93 (C-9), 72.57 (C-5), 69.94 (C-1), 69.38 (C-4), 67.90 (C-3), 67.80 (C-2), 61.24 (C-6), 26.14 (C-8), 20.93 (CH<sub>3</sub>CO), 20.90 (CH<sub>3</sub>CO), 20.86 (CH<sub>3</sub>CO), 13.44 (C-7).

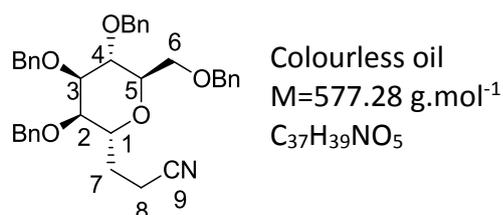
[α]<sub>D</sub> = +17 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI :** [M+Na]<sup>+</sup> = 408.1.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 408.1265, [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 408.1272Da.

### **3-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)propionitrile (50)**

Prepared following **GP (8)**, starting from **35** (660mg, 1.02mmol). The resultant oil was purified on silica gel PE/EtOAc 80:20 to 70:30, to afford 569mg (97% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.19-7.39 (20H, m, HBn), 4.40-4.56 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 43.89-3.99 (2H, m, H-1, H-5), 3.77-3.83 (2H, m, H-3, H-6), 3.74 (1H, dd, <sup>3</sup>J=3.3 Hz, <sup>3</sup>J=4.8Hz, H-4), 3.68 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 5.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=10.1Hz, H-6), 3.53 (1H, dd, <sup>3</sup>J=2.8 Hz, <sup>3</sup>J=7.7Hz, H-2), 2.32-2.47 (2H, m, H-8), 1.98-2.08 (1H, m, H-7), 1.79 (1H, m, H7').

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.36 (CBn<sub>IV</sub>), 138.08 (CBn<sub>IV</sub>), 138.04 (CBn<sub>IV</sub>), 137.89 (CBn<sub>IV</sub>), 127.80-128.63 (CBn), 119.81 (C-9), 75.94 (C-2), 74.50 (C-4, C-5), 74.23 (C-3), 73.47 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.71 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.49 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.77 (C-1), 68.42 (C-6), 27.26 (C-7), 13.36 (C-8).

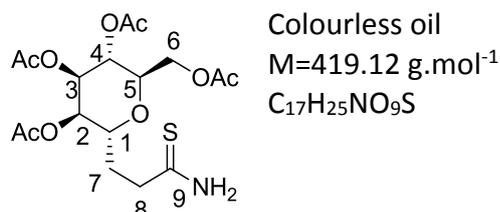
[α]<sub>D</sub> = +35 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI :** [M+Na]<sup>+</sup> = 600.3.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=600.2720Da, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup>= 600.2713Da.

### **3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)thiopropamide (52)**

Prepared following **GP (9)**, starting from **50** (307mg, 0.80mmol). The resultant oil was purified on silica gel PE/EtOAc 6:4 to 1:1, to afford 155mg (46% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.62 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 7.34 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.24 (1H, dd, <sup>3</sup>J=3.4 Hz, <sup>3</sup>J=8.4Hz, H-3), 5.14 (1H, t, <sup>3</sup>J=7.8Hz, H-4), 5.13 (1H, t, <sup>3</sup>J=3.7Hz, H-2), 4.36 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>=6.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.1Hz, H-6), 4.11 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub>=3.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.1Hz, H-6'), 3.99 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=3.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub>=3.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub>=10.9Hz, H-1), 3.91 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub>=3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>=7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub>=10.1Hz, H-5), 2.63-2.79 (2H, m, H-8), 2.06-2.28 (2H, m, H-7), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 209.25 (C-9), 170.87 (OAc), 170.29 (OAc), 169.91 (OAc), 169.78 (OAc), 73.02 (C-1), 71.37 (C-5), 70.24 (C-2), 68.72 (C-3), 67.32 (C-4), 62.44 (C-6), 40.73 (C-8), 28.46 (C-7), 20.99 (CH<sub>3</sub>CO), 20.93 (CH<sub>3</sub>CO), 20.86 (CH<sub>3</sub>CO), 20.79 (CH<sub>3</sub>CO).

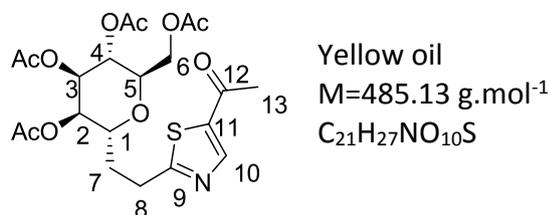
[α]<sub>D</sub> = +8 (c=0.6g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> = 420.1, [M+Na]<sup>+</sup> = 442.1.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=442.1142 Da, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup>= 442.1130 Da.

### **5-acetyl-2-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)ethyl)thiazole (53)**

Prepared following **GP (12)**, starting from **52** (50mg, 0.105mmol) and chloroacetone. After purification over silica gel (PE/EtOAc 4:6), 21mg (41% yield) of the desired product was obtained as a slightly yellow oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 8.18 (1H, s, H-10), 5.24 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>=3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>=8.4Hz, H-3) 5.15 (1H, t, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub>=7.7Hz, H-4), 5.14 (1H, t, <sup>3</sup>J = 3.7Hz, H-2), 4.39 (1H,dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>=6.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.1Hz, H-6), 4.06 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub>=3.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.1Hz, H-6'), 3.99 (1H, m, H1), 3.92 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub>=3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>=7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub>=7.0Hz, H-5), 3.01-3.22 (2H, m, H8), 2.55 (3H, s, H-13), 2.19-2.32 (1H, m, H-7), 2.03-2.17 (1H, m, H-7'), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 190.09 (C-12), 176.72 (C-9), 170.73 (OAc), 170.22 (OAc), 169.90 (OAc), 169.73 (OAc), 147.24 (C-10), 140.01 (C-11), 72.86 (C-1), 71.24 (C-5), 70.34 (C-2), 68.71 (C-3), 67.35 (C-4), 62.23 (C-6), 29.69 (C-8), 28.59 (C-7), 27.43 (C-13), 21.00 (CH<sub>3</sub>CO), 20.89 (CH<sub>3</sub>CO), 20.88 (CH<sub>3</sub>CO), 20.80 (CH<sub>3</sub>CO).

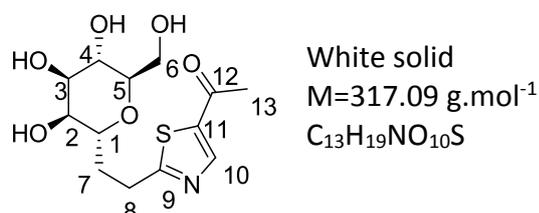
**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>**= +9 (c=1.05g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z: [M+H]<sup>+</sup>** = 486.1.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=486.1428 Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup>= 486.1441 Da.

### **5-acetyl-2-(2-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)ethyl)thiazole (MC<sub>2</sub>Tz1)**

Prepared following **GP (13)**, starting from **53** (20mg, 0.041mmol). After purification over silica gel (DCM/MeOH 9:1) and lyophilisation, 7.77mg (59% yield) of the desired product was obtained as a white solid.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ (ppm):** 8.36 (1H, s, H-10), 3.87 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=3.5 Hz, <sup>3</sup>J=6.8 Hz, <sup>3</sup>J=10.8 Hz, H-1), 3.57-3.81 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-6), 3.51 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=3.1 Hz, <sup>3</sup>J=6.7 Hz, <sup>3</sup>J=10.0 Hz, H-5), 3.11-3.27 (2H, m, H-8), 2.57 (3H, s, H-13), 2.17-2.27 (1H, m, H-7), 1.96-2.06 (1H, m, H-7').

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD): δ (ppm):**192.28 (C-12) 180.17 (C-9), 148.57 (C-10), 141.01 (C-11), 76.84 (C-5), 76.05 (C-1), 72.73 (C-3), 72.42 (C-2), 69.69 (C-4), 62.70 (C-6), 30.78 (C-8), 30.18 (C-7), 27.16 (C-13).

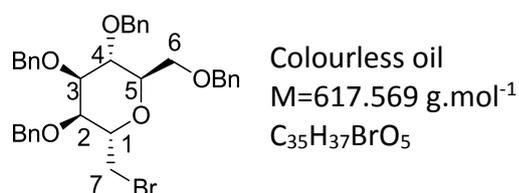
**[α]<sub>D</sub>**= +9 (c=1.05g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> = 318.1.

**HRMS, MALDI:** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=318.1006 Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 318.1005 Da.

#### **(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-bromomethyl-α-D-mannopyranose) 54**

**34** (4.7mmol, 2.980g) was diluted in DMF (70mL) and TBAB (2 eq, 3.03g) was added. The mixture was heated at 90°C overnight and then concentrated in vacuum. The residue was diluted in Et<sub>2</sub>O, washed 5 times with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc 9:1) to afford 2.33g (80% yield) of the desired product as a colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.19-7.35 (20H, m, HBn), 4.45-4.57 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.10 (1H, m, H1), 4.06 (1H, m, H5), 3.87 (1H, dd, <sup>3</sup>J=2.2 Hz, <sup>3</sup>J=7.5 Hz, H2), 3.76-3.82 (3H, m, H-3, H-4, H-6), 3.72 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>=5.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=10.2 Hz, H-6'), 3.61 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub> = 4.4 Hz, H-7), 2.53 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub> = 5.7 Hz, H-7').

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.47 (CBn<sub>IV</sub>), 138.24 (CBn<sub>IV</sub>), 138.06 (CBn<sub>IV</sub>), 138.02 (CBn<sub>IV</sub>), 127.72-128.57 (CBn), 74.80 (C-5), 74.74 (C-3 or C-4), 74.56 (C-2), 74.37 (C-3 or C-4), 73.42 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.63 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.58 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.81 (CH<sub>2</sub>Bn), 70.53 (C-1), 68.61 (C-6), 33.41 (C-7).

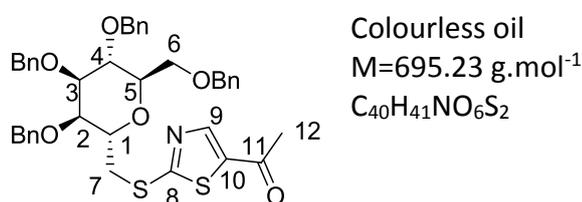
**[α]<sub>D</sub>**= +18 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:**  $[M+Na]^+ = 639.2$ .

**HRMS, MALDI :**  $[M+Na]_{calc}^+ = 639.1722Da$ ,  $[M+Na]_{fnd}^+ = 639.1719Da$ .

**5-acetyl-2- ( (2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)methylthioxy)thiazole (55)**

**54** (150mg, 0.24mmol) was placed in DMF (6mL), **6** (60mg, 1.5eq),  $K_2CO_3$  (201mg, 6eq) and a catalytic amount of KI were added. The mixture was heated to  $100^\circ C$  during 2 days, then extracted by  $Et_2O$ . The organic layer was washed with brine 5 times, dried over  $MgSO_4$  and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel (PE/ $EtOAc$  6:4) to afford the 140mg (84% yield) of the desired product as colourless oil.



**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 8.02 (1H, s, H-9), 7.20-7.35 (18H, m, HBn), 4.46-4.60 (8H, m,  $CH_2Bn$ ), 4.28 (1H, ddd,  $^3J_{1-7} = 4.7 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{1-7} = 7.2 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{1-2} = 7.2 \text{ Hz}$ , H-1), 3.98 (1H, ddd,  $^3J = 4.9 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 4.9 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 10.4 \text{ Hz}$ , H-5), 3.76-3.87 (4H, m, H-6, H-3, H-2, H-4), 3.69 (1H, dd,  $^3J_{5-6'} = 4.9 \text{ Hz}$ ,  $^2J_{6-6'} = 10.4 \text{ Hz}$ , H-6'), 3.67 (1H, dd,  $^3J_{1-7} = 4.9 \text{ Hz}$ ,  $^2J_{7-7'} = 13.2 \text{ Hz}$ , H-7), 3.46 (1H, dd,  $^3J = 7.6 \text{ Hz}$ ,  $^2J_{7-7'} = 13.2 \text{ Hz}$ , H-7'), 2.50 (3H, s, H-12).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 189.32 (C-11), 174.81 (C-8), 174.07 (C-9), 139.48 (C-10), 138.42 ( $CBn_{IV}$ ), 138.20 ( $CBn_{IV}$ ), 138.13 ( $CBn_{IV}$ ), 137.92 ( $CBn_{IV}$ ), 127.72-128.56 (CBn), 75.38 (C-4), 74.90 (C-2), 74.70 (C5), 74.55, (C-3), 73.47 ( $CH_2Bn$ ), 73.12 ( $CH_2Bn$ ), 72.52 ( $CH_2Bn$ ), 71.55 ( $CH_2Bn$ ), 70.62 (C-1), 68.66 (C-6), 35.35 (C-7), 27.13 (C-12).

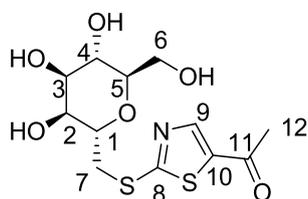
$[\alpha]_D^{20} = +13$  ( $c = 0.5g/100mL$ ,  $CHCl_3$ ,  $20^\circ C$ , 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:**  $[M+H]^+ = 696.3$ ,  $[M+Na]^+ = 718.2$ .

**HRMS, MALDI:**  $[M+Na]_{calc}^+ = 718.2267Da$ ,  $[M+Na]_{fnd}^+ = 718.2258Da$ .

### **5-acetyl-2- ( $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)methylthioxythiazole (MCSTz1)**

Prepared following **GP (14)**, starting from **55** (64mg, 0.092mmol). After purification over silica gel (DCM/MeOH 9:1) and lyophilisation, 14.7mg (48% yield) of the desired product was obtained as a light white solid.



White solid  
M=335.0497 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm): 8.31 (1H, s, H-9), 4.28 (1H, m, H-1), 3.90 (1H, t, <sup>3</sup>J=3.6Hz, H-2), 3.76-3.83 (2H, m, H-6, H-3), 3.70-3.76 (2H, m, H-4, H-6'), 3.61-3.70 (2H, m, H-7), 3.53-3.60 (1H, m, H-5), 2.53 (3H, s, H-12)\*.

\*deuterium was incorporated during NMR experiment, leading to a 1:1:1 massif at the foot of the singlet and thus, the integration was less than 3.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm): 191.55 (C-11), 176.11 (C-8), 148.93 (C-9), 140.68 (C-10), 77.69 (C-5), 75.99 (C1), 72.47 (C-3), 70.94 (C-2), 69.50 (C-4), 62.50 (C-6), 34.96 (C-7), 26.87 (C-12).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +43 (c=0.9g/100mL, MeOH, 20°C, 589.3nm).

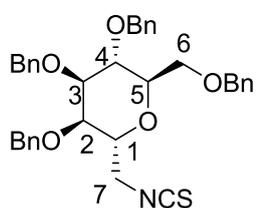
MS, MALDI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 336.1.

HRMS, MALDI: [M+H]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=336.0570Da, [M+Na]<sub>fund</sub><sup>+</sup>= 336.0568Da.

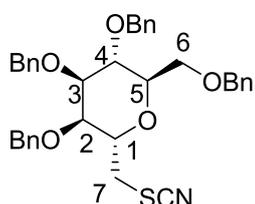
### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-isothiocyanatomethyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (58)**

### **Or 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thiocyanatomethyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (59)**

**54** (200mg, 0.32mmol) was dissolved in DMF (6mL), KNCS (63mg, 2eq) and TBAI (1eq, 118mg) were added. The mixture was heated to 100°C during 24h, then extracted by Et<sub>2</sub>O, washed with brine 5 times, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel (PE/EtOAc 8:2) to afford 134mg (70% yield) of the desired product as colourless oil.



**58**



**59**

Colourless oil  
M=595.239 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub>S

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.17-7.37 (20H, m, HBn), 4.37-4.58 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.15 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub>=3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub>'=7.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=8.5 Hz, H-1), 4.10 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub>=2.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>=6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>'=6.7 Hz, H-5), 3.79-3.86 (2H, m, H-3, H-6), 3.77 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub>=2.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub>=4.1 Hz, 1H, H-4), 3.69 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>=2.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=8.5 Hz, H-2), 3.72 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>'=6.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6</sub>'=10.2 Hz, H-6'), 3.39 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-7</sub>=3.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>7-7</sub>'=12.9 Hz, H-7), 3.15 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub>=7.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>7-7</sub>'=12.9 Hz, H-7').

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 138.29 (CBn<sub>IV</sub>), 137.98 (CBn<sub>IV</sub>), 137.83 (CBn<sub>IV</sub>), 137.53 (CBn<sub>IV</sub>), 127.82-128.71 (CBn), 113.11 (NCS), 74.98 (C-5), 74.74 (C-2), 74.10 (C-4), 73.46, (CH<sub>2</sub>Bn), 73.10 (C-3), 72.82 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.24 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.30 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.62 (C-1), 68.03 (C-6), 36.89 (C-7).

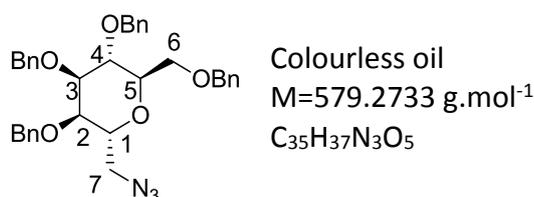
[α]<sub>D</sub> = +8 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> = 618.2.

**HRMS, ESI:** [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 618.2285Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 618.2289Da.

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-azidomethyl-α-D-mannopyranose (60)**

**34** (900mg, 1.42mmol) was dissolved in DMF (15mL), NaN<sub>3</sub> (462mg, 6eq) and TBAI (1eq, 523mg) were added. The mixture was heated to 110°C for 24h then extracted by Et<sub>2</sub>O. The organic layer was washed with brine 5 times, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel (PE/EtOAc 9:1) to afford 587mg (71% yield) of the desired product as colourless oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.18-7.36 (20H, m, HBn), 4.41-4.57 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.10 (1H, ddd, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub>=2.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>'=6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>=6.4 Hz, H-5), 4.06 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=4.5 Hz, <sup>3</sup>J=5.5 Hz, <sup>3</sup>J=8.5 Hz, H-1), 3.82 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>=6.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6</sub>'=10.1 Hz, H-6), 3.76-3.81 (2H, m, H-3, H-4), 3.76 (1H, dd, <sup>3</sup>J=2.8 Hz, <sup>3</sup>J=8.5 Hz, H-2), 3.71 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub>'=6.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6</sub>'=10.1 Hz, H-6'), 3.40-3.48 (2H, m, H7).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 138.40 (CBn<sub>IV</sub>), 138.12 (CBn<sub>IV</sub>), 138.02 (CBn<sub>IV</sub>), 137.91 (CBn<sub>IV</sub>), 127.73-128.59 (CBn), 74.62 (C-5), 74.17 (C-4), 73.85 (C-3), 73.66 (C-2), 73.35 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.61 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.30 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.57 (CH<sub>2</sub>Bn), 69.93 (C-1), 68.24 (C-6), 51.71 (C-7).

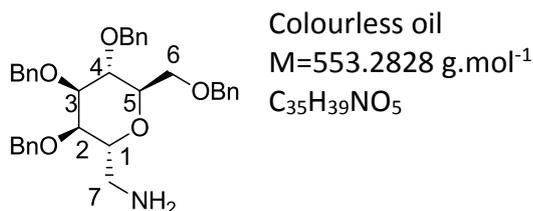
[α]<sub>D</sub> = +28 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 580.4, [M+Na]<sup>+</sup> = 602.4.

HRMS, ESI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 580.2811Da, [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 580.2787Da.

### 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-aminomethyl-α-D-mannopyranose (61)

**60** (587mg, 1.01mmol) was dissolved in THF (15mL) and few drops of water were added. Triphenylphosphine (345mg, 1.3eq) was added and the mixture was heated to reflux for 2h. The mixture was concentrated in vacuum, rinsed by PE, concentrated and dissolved in Et<sub>2</sub>O. The triphenylphosphine oxide precipitate and was filtered off. The mixture was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, concentrated in vacuum. The residue was purified on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:0 to 97:3) to afford the 469mg (84% yield) of the desired product as colourless oil.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 7.20-7.34 (20H, m, HBn), 4.47-4.60 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 3.96 (1H, m, H-5), 3.86 (1H, m, H-1), 3.80 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 6.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.2 Hz, H-6), 3.76-3.83 (2H, m, H-3, H-4), 3.70 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 5.0, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.2 Hz, H-6'), 3.65 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 2.1 Hz, <sup>2</sup>J = 7.0 Hz, H-2), 2.82-2.85 (2H, m, H-7).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 138.46 (CBn<sub>IV</sub>), 138.27 (2CBn<sub>IV</sub>), 138.24 (CBn<sub>IV</sub>), 127.73-128.71 (CBn), 75.45 (C-3), 74.82 (C-4), 74.32 (C-2), 74.27 (C-5), 73.43 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.98 (CH<sub>2</sub>Bn, C-1), 72.55 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.51 (CH<sub>2</sub>Bn), 68.88 (C-6), 42.50 (C-7).

[α]<sub>D</sub> = +20 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, MALDI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 554.3, [M+Na]<sup>+</sup> = 576.3.

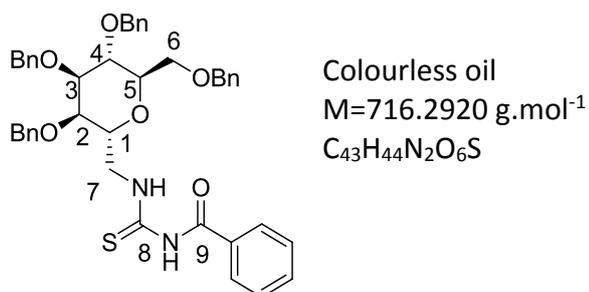
HRMS, MALDI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 554.2901Da, [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 554.2873Da.

### N-benzoyl-N'-((2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)methyl)thiourea (62)

Potassium isothiocyanate (3eq, 411mg), was dissolved in acetone (10mL). Benzoyl chloride (2eq, 400mL) was added and the white suspension was stirred for 20 min, then **61** (780mg,

-Experimental Part-

1.41mmol) was diluted in DCM (5mL) and added to the mixture. After 10 min, the reaction was complete. The mixture was washed by brine, extracted by DCM, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc 8:2 to 7:3) to afford 870mg (86% yield) of the desired product as a colourless oil.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 10.94 (1H, bs, NH), 8.95 (1H, bs, NH), 7.80 (2H, m, Bz), 7.71 (1H, m, Bz), 7.49 (2H, m, bz), 7.15-7.39 (20H, m, Bn), 4.45-4.61 (8H, m, CH<sub>2</sub>Bn), 4.22 (1H, m, H-1), 4.06-4.13 (2H, m, H5, H-7), 3.80-3.90 (4H, m, H-3, H-4, H-6, H-7'), 3.70-3.77 (2H, m, H-2, H-6').

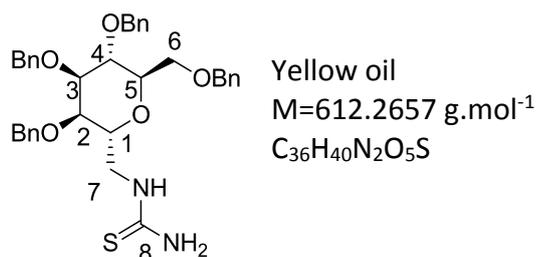
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 180.14 (C-9), 166.43 (C-8), 137.79-138.57 (CBn<sub>IV</sub>), 133.52 (C-Bz), 127.4-129.4 (C-Bn, C-Bz), 75.05 (C-3 or C-4), 74.67 (C-3 or C-4), 74.57 (C-5), 73.99 (C-2), 73.47 (CH<sub>2</sub>Bn), 72.75 (CH<sub>2</sub>Bn), 71.78 (CH<sub>2</sub>Bn), 69.19 (C-1), 68.61 (C-6), 46.68 (C-7).

MS, MALDI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 717.3.

HRMS, MALDI : [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> 739.2812=, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 739.2783.

**N-((2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)methyl)-thiourea (63)**

**62** (870mg, 1.21mmol) was diluted in MeOH (6mL), sodium hydroxide pellets were added. After 10 min, the reaction was complete. The mixture was filtered, then neutralised by 2M HCl, extracted by DCM, washed by brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc 1:1) to afford 698mg (94% yield) of the desired product as colourless oil.



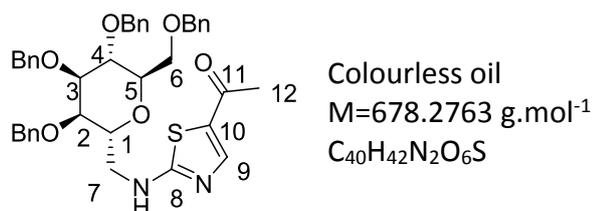
RMN couldn't be obtained with accuracy.

**MS, MALDI m/z:**  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 613.3$ .

**HRMS, MALDI :**  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{calc}}^+ = 613.2731\text{Da}$ ,  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{fnd}}^+ = 613.2706\text{Da}$ .

### **5-acetyl-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (64)**

Prepared following **GP (12)**, starting from **63** (166mg, 0.271mmol) and chloroacetone. After purification over silica gel (PE/EtOAc 3:6) and a second purification ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  7:3), 152mg (83% yield) of the desired product were obtained as a slightly yellow oil.



**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm): 7.76 (1H, s, H-9), 7.16-7.37 (20H, m, H-Bn), 6.05 (1H, bt, NH), 4.36-4.55 (8H, m, H- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.03-4.10 (2H, m, H-1, H-5), 3.79-3.86 (2H, m, H-4, H-6), 3.67-3.72 (2H, m, H-2, H-3), 3.61 (1H, dd,  $^2J_{6-6'} = 10.3\text{Hz}$ ,  $^3J_{6'-5} = 5.6\text{Hz}$ , H-6'), 3.43-3.61 (2H, m, H-7), 2.43 (3H, s, H-12).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm): 189.17 (C-11), 175.09 (C-8), 148.08 (C-9), 138.17 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.93 (2C-Bn<sub>IV</sub>), 137.64 (C-Bn<sub>IV</sub>), 129.44 (C-10), 127.79-128.79 (C-Bn), 74.92 (C-5), 74.37 (C-2), 74.32 (C-3), 74.28 (C-4), 73.44 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.89 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.36 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.62 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 68.20 (C-1), 67.99 (C-6), 46.50 (C-7), 26.07 (C-12).

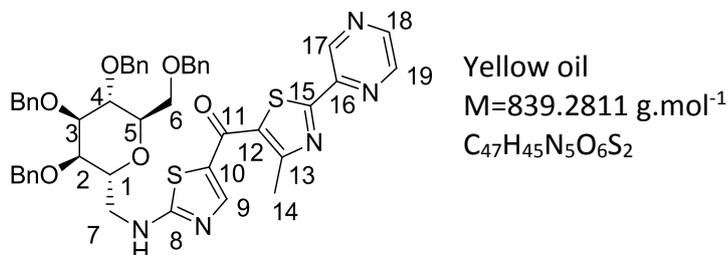
**MS, MALDI m/z:**  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 679.3$ .

$[\alpha]_{\text{D}} = +14$  (c=0.5g/100mL,  $\text{CHCl}_3$ , 20°C, 589.3nm).

**HRMS, MALDI:**  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{calc}}^+ = 679.2836$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{fnd}}^+ = 679.2836$ .

**5-(4-methyl-2-(pyrazin-2-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (65)**

Prepared following **GP (12)**, starting from **Tc6-052-1** (300mg, 0.49mmol) and **2-Bromo-1-[4-methyl-2-(2-pyrazinyl)-1,3-thiazol-5-yl]-1-ethanone**. After purification over silica gel (PE/EtOAc 4:6) 249mg (60% yield) of the desired product was obtained as a yellow oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 9.46 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>19-18</sub> = 1.5Hz, H-19), 8.64 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>17-18</sub> = 2.5Hz, H-17), 8.58 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>17-18</sub> = 2.5Hz, <sup>3</sup>J<sub>19-18</sub> = 1.5Hz, H-18), 7.96 (1H, s, H-9), 7.17-7.37 (20H, m, H-Bn), 6.24 (1H, bt, NH), 4.36-4.56 (8H, m, H-CH<sub>2</sub>Bn), 4.05-4.13 (2H, m, H-1, H-5), 3.81-3.87 (2H, m, H-4, H-6), 3.68-3.73 (2H, m, H-2, H-3), 3.61 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 10.2Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 5.6 Hz, H-6'), 3.47-3.63 (2H, m, H-7), 2.75 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 177.26 (C-11), 175.43 (C-8), 166.20 (C-15), 159.40 (C-12), 149.97 (C-9), 146.54 (C-16), 145.90 (C-17), 144.21 (C18), 142.02 (C-19), 138.14 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.92 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.58 (C-Bn<sub>IV</sub>), 130.35 (C-13) 130.13 (C-10), 127.85-128.80 (C-Bn), 74.96 (C-5), 74.34 (C-4), 73.65 (C-3), 73.45 (C-2), 73.36 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.92 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.33 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.58 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 68.05 (C-1), 67.94 (C-6), 46.72 (C-7), 20.02 (C-14).

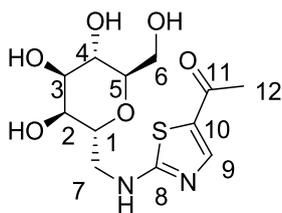
**MS, MALDI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> = 840.3.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +2 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**HRMS, MALDI:** [M+H]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 840.2884, [M+H]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 840.2857.

**5-acetyl-2-((( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (MCNTz1)**

Prepared following **GP (14)**, starting from **64** (152mg, 0.224mmol). After purification over silica gel (DCM/MeOH 9:1) and lyophilisation, 52.15mg (73% yield) of the desired product was obtained as a light white solid.



White amorphous solid

M=318.0885 g.mol<sup>-1</sup>

C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ (ppm): 8.15 (1H, s, H-9), 4.27 (1H, m, H-1), 4.06 (1H, t, <sup>3</sup>J=3.2 Hz, H-2), 3.84-3.93 (4H, m, H-3, H-6, H7'), 3.79 (1H, t, <sup>3</sup>J=8.3 Hz, H-4), 3.67-3.74 (2H, m, H-5, H-7') 4.03-4.10 (2H, m, H-1, H-5), 3.79-3.86 (2H, m, H-4, H-6), 3.67-3.72 (2H, m, H-2, H-3), 3.61 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=10.3Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>= 5.6 Hz, H-6'), 3.43-3.61 (2H, m, H-7), 2.43 (3H, s, H-12).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ (ppm): 193.52 (C-11), 174.08 (C-8), 144.86 (C-9), 126.78 (C-10), 75.31 (C-5), 74.95 (C-1), 70.67 (C-3), 68.69 (C-2), 67.37 (C-4), 60.77 (C-6), 43.89 (C-7), 25.15 (C-12).

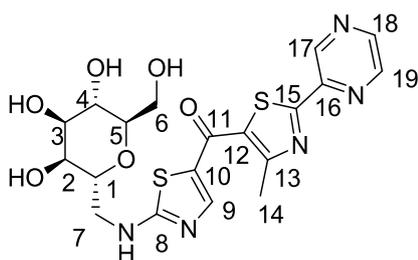
**MS, MALDI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> =319.2.

[α]<sub>D</sub> = +44 (c=1.75g/100mL, H<sub>2</sub>O, 20°C, 589.3nm).

**HRMS, MALDI:** [M+H]<sub>calc</sub><sup>+</sup> 319.0958=, [M+H]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 319.0949.

**5-(4-methyl-2-(pyrazin-2-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((α-D-mannopyranosyl)methyl)amino) thiazole (MCNTz2)**

Prepared following **GP (14)**, starting from **65** (239 mg, 0.284mmol). After purification over silica gel (DCM/MeOH 8:2) and lyophilisation, 130mg (95% yield) of the desired product was obtained as a yellow powder.



Yellow powder

M=479.5299 g.mol<sup>-1</sup>

C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO):** δ (ppm): 9.36 (1H, d, 3J<sub>19-18</sub> =1.4Hz, H-19), 8.94 (1H, bs, NH) 8.82 (1H, d, 3J<sub>17-18</sub> =2.5Hz, H-17), 8.77 (1H, dd, 3J<sub>17-18</sub> =2.5Hz, 3J<sub>19-18</sub> =1.4Hz, H-18), 8.01 (1H, s, H-9), 4.83 (1H, d, 2J=5.0 Hz, OH), 4.79 (1H, d, 2J=4.3 Hz, OH), 4.70 (1H, d, 2J =5.4 Hz, OH), 4.41 (1H, dd, 2J=5.1 Hz, 2J =6.5 Hz, OH), 3.86 (1H, m, H-1), 3.57-3.71 (4H, m, H-3, H-4, H-6, H-7), 3.42-3.57 (4H, m, H-2, H-5 H-6', H-7'), 2.62 (3H, s, H-14).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm):** 183.0 (C-11), 176.533 (C-8), 166.05 (C-15), 157.58 (C-12), 151.57 (C-9), 147.08 (C-17), 145.73 (C-16), 145.25 (C-18), 141.23 (C-19), 130.86 (C-13), 127.92 (C-10), 78.18 (C-2), 72.21 (C-1), 71.27 (C-3), 68.92 (C-5), 67.81 (C-4), 60.90 (C-6, C-7), 17.95 (C-14).

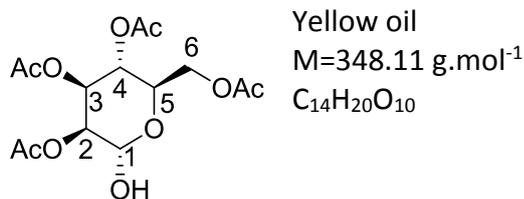
**MS, ESI  $m/z$ :**  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 502.1$ .

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = +29 (c=0.5g/100mL, DMSO, 20°C, 589.3nm).

**HRMS, ESI:**  $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{calc}}^+ = 502.0831$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{fnd}}^+ = 502.0841$ .

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (66)**

**9** (1.08g, 2.76mmol) was solubilised in THF (10mL) and a 2M methylamine solution in THF (2.76mL, 2eq) was added. After 3 hours under inert gas the reaction was over and the mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel, (PE/EtOAc 6:4), to give 672mg (73% yield) of the desired product.



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 5.43 (1H, dd,  $^3J_{3-2} = 3.2 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{3-4} = 10.0 \text{ Hz}$ , H-3), 5.23-5.35 (3H, m, H-1, H-2, H-4), 4.19-4.31 (2H, m, H-5, H-6), 4.14 (1H, m, H-6'), 3.11 (1H, bs, OH), 2.16 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.11 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.05 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.00 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

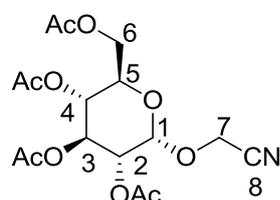
**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 171.02 (OAc), 170.39 (OAc), 170.21 (OAc), 170.04 (OAc), 92.49 (C1), 70.08 (C-4 or C-2), 68.88 (C-3), 68.83 (C-5), 66.33 (C-4-or C-2), 62.76 (C-6), 21.16 (OAc), 21.03 (OAc), 20.96 (2C, OAc).

Physical properties in accordance with literature <sup>151</sup>

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-cyanomethyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (67)**

**66** (2.29g, 6.57mmol) was dissolved in DCE (6mL) under inert gas. DBU (1eq, 0.98mL),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1eq, 907mg), bromoacetonitrile (3eq, 1.37mL) and  $\text{Ag}_2\text{O}$  (2eq, 3.03g) were added, the mixture was hidden from light with aluminum foil and stirred overnight at *relux*. The mixture

was filtrated over decalite and then purified on silica gel, PE/EtOAc 8:2 to 6:4 to give 2.19g (85% yield) of the desired product.



Yellow amorphous solid

M=387.12 g.mol<sup>-1</sup>

C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>10</sub>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 5.34-5.26 (3H, m, H-2, H-3, H-4), 4.95 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.5 Hz, H-1), 4.4 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>=16.1 Hz, H-7), 4.29 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>=16.1 Hz, H-7'), 4.28 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>=12.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 5.1 Hz, H-6), 4.17 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6'-6</sub>=12.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>=2.4 Hz, H-6'), 4.02 (1H, m, H-5), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 170.54 (OAc), 169.77 (OAc), 169.75 (OAc), 169.58 (OAc), 115.03 (C-8), 98.48 (C-1), 70.13 (C-5), 68.84-68.66 (C-2, C-3), 65.73 (C-4), 62.21 (C-6), 53.16 (C-7), 20.87 (CH<sub>3</sub>CO), 20.83 (CH<sub>3</sub>CO), 20.76 (CH<sub>3</sub>CO), 20.72 (CH<sub>3</sub>CO)

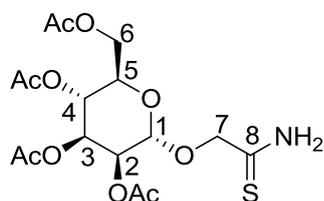
[α]<sub>D</sub> = +42 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 388.1.

HRMS, MALDI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 410.1058Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 410.1050Da.

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-(2-amino-2-thioxoethyl)-α-D-mannopyranose (68)**

H<sub>2</sub>S was bubbled through a solution of **67** (2.154 g, 5.56mmol) in pyridine/triethylamine 1:1 (7mL) for 2h. The mixture was concentrated under vacuum and the resulting oil was purified on silica gel, PE/EtOAc 7:3, to give 1.85g (79% yield) of the desired product.



Yellow amorphous solid

M=421.42 g.mol<sup>-1</sup>

C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub>S

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 7.82 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 7.63 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.32 (1H, m, H-2), 5.30 (1H, m, H-4), 5.28-5.29 (1H, m, H-3), 4.89-4.90 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.0 Hz, H-1), 4.56 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 16.8 Hz, H-7), 4.40 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 16.8 Hz, H-7'), 4.28 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 5.7 Hz, H-6), 4.12 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 2.3 Hz, H-6'), 3.96 (1H, m, H-5), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 201.36 (C8), 170.72 (OAc), 170.24 (OAc), 170.15 (OAc), 169.70 (OAc), 97.46 (C-1), 72.81 (C-7), 69.68 (C-5), 69.03-69.00 (C-2, C-4), 65.86 (C-3), 62.36 (C-6), 20.91 (CH<sub>3</sub>CO), 20.86 (CH<sub>3</sub>CO), 20.78 (CH<sub>3</sub>CO).

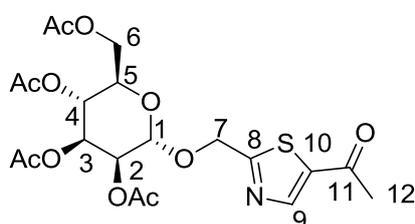
**[α]<sub>D</sub>**= +66 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup>** =422.06.

**HRMS, MALDI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>**=444.0935Da, **[M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup>**= 444.0924Da.

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-(5-acetylthiazol-2-yl)methyl-α-D-mannopyranose (69)**

**68** (50 mg, 0.118mmol) was dissolved in THF (20mL), DMF-DMA (1.3 eq, 0.69mL) was added and the solution was stirred at rt during 2h. The solution was concentrated and the residue dissolved in DMF (2mL). Chloroacetone (4 eq, 0.034mL) was added and after 15 min triethylamine (2.09 eq, 0.029mL) was added. The mixture was stirred overnight at rt, diluted in diethyl ether and washed several time with brine. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The resulting oil was purified on silica gel, PE/EtOAc 9:1 to 3:7, to give 26.4mg (52% yield) of the desired product.



Yellow oil  
M=487.11 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>11</sub>S

**H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 8.31 (1H, s, H-9), 5.38 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 9.8 Hz, H-3), 5.33 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.3 Hz, H-2), 5.30 (1H, t, <sup>3</sup>J= 9.8 Hz, H-4), 5.07 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.6 Hz, H-1), 4.97 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 14.0 Hz, H-7), 4.86 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 14.0 Hz, H7'), 4.27 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 5.4 Hz, H-6), 4.18 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>= 2.4 Hz, H-6'), 4.01-4.06 (1H, m, H-5), 2.58 (3H, s, H-12), 2.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 190.02 (C11), 173.49 (C8), 170.65 (OAc), 170.00 (OAc), 169.85 (OAc), 169.79 (OAc), 147.19 (C-9), 140.95 (C-10), 97.67 (C-1), 69.54 (C-5), 69.34 (C-2), 69.88 (C-3), 66.75 (C-7), 66.07 (C-4), 62.47 (C-6), 27.61 (C-12), 20.92 (CH<sub>3</sub>CO), 20.83 (CH<sub>3</sub>CO), 20.79 (CH<sub>3</sub>CO), 20.74 (CH<sub>3</sub>CO).

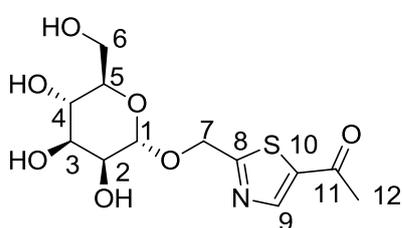
**[α]<sub>D</sub>**= +47 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup>** =488.03.

HRMS, ESI:  $[M+Na]_{\text{calc}}^+ = 510.1040\text{Da}$ ,  $[M+Na]_{\text{fnd}}^+ = 510.1031\text{Da}$ .

### 1-O-(5-acetylthiazol-2-yl)methyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (MOCTz1)

**69** (196 mg, 0.402mmol) was dissolved in MeOH/DCM 1:1 (4/4mL), MeONa (1M, 1mL) was added and the solution was stirred at rt during 3h. Then, amberlyste® 15 Hydrogen form was added until neutral pH, then the mixture was filtrated, rinsed with water and concentrated under vacuum. The resulting oil was dissolved in water and the solution washed with DCM and concentrated. The brown oil was purified by preparative HPLC and lyophilised, to afford 35mg (27% yield) of the desired product.



Yellow oil  
M=319.1 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>7</sub>S

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm):** 8.42 (1H, s, H-9), 5.02 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 14.6 Hz, H-7), 4.95 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.6 Hz, H-1), 4.86 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 14.6 Hz, H-7'), 3.91 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.4 Hz, H-2), 3.83 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 2.2 Hz, H-6), 3.75 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 9.2 Hz, H-3), 3.69 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>= 6.0 Hz, H-6'), 3.63 (1H, t, <sup>3</sup>J= 9.2 Hz, H-4), 3.58-3.53 (1H, m, H5), 2.57-2.52 (3H, m, H-12).\*

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 190.02 (C-11), 173.49 (C-8), 148.84 (C-9), 140.95 (C-10), 101.70 (C-1), 75.63 (C-5), 72.49 (C-3), 71.88 (C-2), 68.47 (C-4), 66.95 (C-7), 62.90 (C-6), 27.26-26.83 (m, C1-2)\*

\*a mixture between mono-deuterated and non-deuterated compounds on position 12 was observed, leading to complex massifs

$[\alpha]_{\text{D}} = +48$  (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

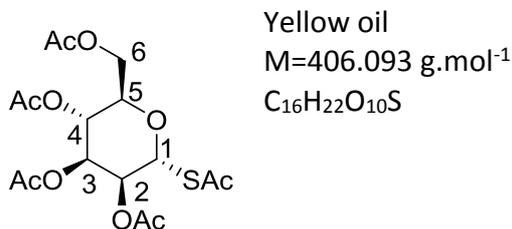
MS, ESI m/z:  $[M+H]^+ = 320.1$ .

HRMS, ESI:  $[M+Na]_{\text{calc}}^+ = 342.06179\text{Da}$ ,  $[M+Na]_{\text{fnd}}^+ = 342.06165\text{Da}$ .

### 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thioacetyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (70)

**9** (10 g, 29mmol) was dissolved in DCM (150mL) under inert atmosphere and thioacetic acid (8.4mL, 4eq) was added. After cooling to 0°C, BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O (21.8mL, 6eq) was added and the mixture was stirred at rt for 16h. After cautious neutralisation by a saturated solution of

NaHCO<sub>3</sub>, the organic layer was washed by brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuum. The crude product was obtained with 58% yield and used in the next step without further purification.

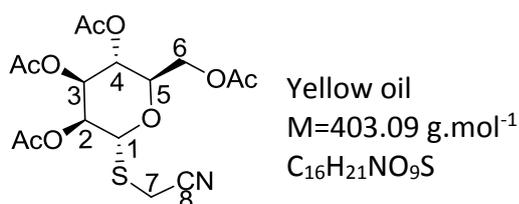


<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 5.93 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.6 Hz, H-1), 5.33 (1H, t, <sup>3</sup>J = 10.0 Hz, H-4), 5.31 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.2 Hz, H-2), 5.08 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 10.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.2 Hz, H-3), 4.26 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6</sub> = 4.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.4 Hz, H-6), 4.05 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6'</sub> = 2.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 12.4 Hz, H-6'), 3.91 (1H, m, H-5), 2.41 (3H, s, CH<sub>3</sub>COS), 2.16 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.97 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

Physical properties in accordance with literature <sup>152</sup>

### **2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-S-cyanomethyl-α-D-mannopyranose (71)**

**70** (800 mg, 1.97mmol) was dissolved in DMF (100mL) under inert gas, diethylamine (20 eq, 4.507mL) and bromoacetonitrile (1.2 eq, 0.16mL) were added. The mixture was stirred overnight at rt, diluted in diethyl ether, washed several time with brine, dried on MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The residue was purified on silica gel, PE/EtOAc 8:2, to give 742mg (93% yield) of the desired product.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 5.46 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.4 Hz, H-1), 5.37 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.4 Hz, H-2), 5.35 (1H, t, <sup>3</sup>J = 9.8 Hz, H-4), 5.20 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.4 Hz, H-3), 4.35 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6'-6</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 5.3 Hz, H-6), 4.30 (1H, m, H-5), 4.17 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6'-6</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 2.1 Hz, H-6'), 3.47 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 17.1 Hz, H-7), 3.30 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 17.1 Hz, H-7'), 2.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 170.63 (OAc), 169.90 (OAc), 169.82 (OAc), 169.69 (OAc), 115.71 (C-8), 82.60 (C-1), 70.18 (C-5), 69.76 (C-2), 69.42 (C-3), 66.06 (C-4), 62.21 (C-6), 20.91 (CH<sub>3</sub>CO), 20.85 (CH<sub>3</sub>CO), 20.78 (CH<sub>3</sub>CO), 20.69 (CH<sub>3</sub>CO), 15.89 (C-7).

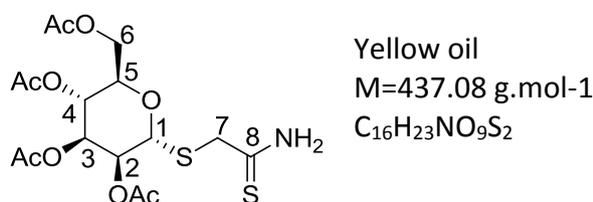
[α]<sub>D</sub> = +117 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 421.1.

HRMS, MALDI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 426.0829Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 426.0846Da.

### 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-S-(2-amino-2-thioxoethyl)-α-D-mannopyranose (72)

H<sub>2</sub>S was bubbled through a solution of **71** (742.2 mg, 1.84mmol) in a mixture of pyridine/triethylamine 1:1 during 2h. The mixture was concentrated and the resulting oil was purified on silica gel PE/EtOAc 7:3, to give 693mg (86% yield) of the desired product.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 7.89 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 7.60 (1H, bs, NH<sub>2</sub>), 5.34 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 1.6 Hz, H-2), 5.30 (1H, m, H-4), 5.27 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 1.8 Hz, H-1), 5.20 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 3.2 Hz, H-3), 4.30 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub> = 5.9 Hz, H-6), 4.26 (1H, m, H-5), 4.12 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub> = 2.0 Hz, H-6'), 3.98 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 16.8 Hz, H-7), 3.73 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 16.8 Hz, H-7'), 2.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 201.96 (C8), 170.75 (OAc), 170.09 (OAc), 169.96 (OAc), 169.72 (OAc), 82.13 (C-1), 70.58 (C-2), 70.16 (C-5), 69.24 (C-3), 66.38 (C-4), 62.50 (C-6), 42.06 (C-7), 20.95 (CH<sub>3</sub>CO), 20.93 (CH<sub>3</sub>CO), 20.78 (CH<sub>3</sub>CO), 20.72 (CH<sub>3</sub>CO).

[α]<sub>D</sub> = +70 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

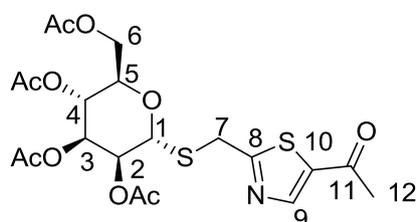
MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 438.0.

HRMS, MALDI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 460.0706Da, [M+Na]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 460.0720Da.

### 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-S-(5-acetylthiazol-2-yl)methyl-α-D-mannopyranose (73)

**72** (20 mg, 0.045mmol) was dissolved in ACN (5mL), DMF-DMA (1.2 eq, 7 μL) was added and the solution was irradiated in Microwave during 20 min at 70°C. The solution was

concentrated and DCM (5mL) was added. Chloroacetone (4 eq, 15  $\mu$ L) was added and triethylamine (2.09 eq, 13  $\mu$ L) 15 min later. The mixture was stirred 2 days at 60°C and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified on silica gel, PE/EtOAc 9:1 to 3:7, to give 13mg (56% yield) of the desired product.



Yellow amorphous solid  
M=503.09 g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>10</sub>S<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 8.19 (1H, s, H-9), 5.39 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.2 Hz, H-1), 5.34 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 3.3 Hz, H-2), 5.31 (1H, t, <sup>3</sup>J= 9.8 Hz, H-4), 5.24 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 9.8 Hz, H-3), 4.33 (1H, m, H-5), 4.28 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 5.3 Hz, H-6), 4.17 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 15.3 Hz, H-7), 4.04 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>= 2.2 Hz, H-6'), 4.02 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 15.3 Hz, H-7'), 2.57 (3H, s, H-12), 2.14 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 190.07 (C-11), 174.15 (C-8), 170.64 (OAc), 169.89 (OAc), 169.87 (OAc), 169.76 (OAc), 147.38 (C-9), 141.25 (C-10), 82.02 (C-1), 70.46 (C-2), 69.82 (C-5), 69.51 (C-3), 66.36 (C-4), 62.46 (C-6), 31.78 (C-7), 27.49 (C-12), 20.97 (CH<sub>3</sub>CO), 20.86 (CH<sub>3</sub>CO), 20.80 (CH<sub>3</sub>CO), 20.70 (CH<sub>3</sub>CO).

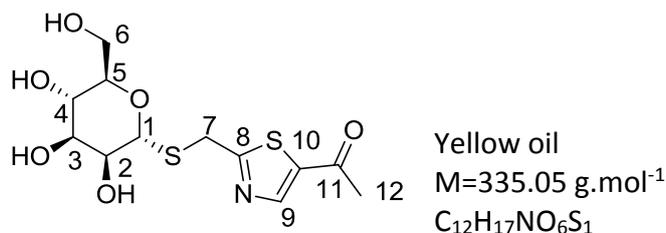
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +83 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 504.1.

HRMS, ESI: [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 526.08121Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>find</sub> = 526.08020Da.

### 1-S-(5-acetylthiazol-2-yl)methyl- $\alpha$ -D-mannopyranose (MSCTz1)

**73** (16 mg, 0.031mmol) was dissolved in MeOH/DCM 1:1 (4mL), MeONa 1M (10  $\mu$ L) was added and the solution was stirred at rt during 3h. Amberlyste® 15 Hydrogen form was added until neutral pH, then the mixture was filtrated, rinsed with water, concentrated under vacuum. The resulting oil was dissolved in water, washed with DCM and concentrated. The brown oil was purified on silica gel, DCM/MeOH 8:2, to give 5.4mg (51% yield) of the desired product.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ (ppm):** 8.37 (1H, s, H-9), 5.28 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.2 Hz, H-1), 4.25 (1H, d, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 15.3 Hz, H-7), 4.11 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>7-7'</sub>= 15.3 Hz, H-7'), 3.89 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 3.0 Hz, H-2), 3.85 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6'-6</sub>= 11.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 1.7 Hz, H-6), 3.79 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6'-6</sub>= 11.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>= 2.4 Hz, H-6'), 3.71 (1H, t, <sup>3</sup>J= 8.4 Hz, H-4), 3.65 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub>= 8.4 Hz, H-3), 3.62-3.58 (1H, m, H-5), 2.57 (3H, s, H-12).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD): δ (ppm):** 192.32 (C-11), 178.05 (C-8), 148.67 (C-9), 142.08 (C-10), 85.82 (C-1), 75.72 (C-6), 73.20 (C-5), 73.15 (C-2), 68.75 (C-3), 62.71 (C-4), 32.05 (C-7), 27.20 (C-12).

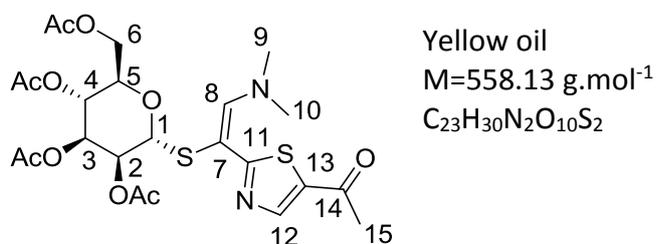
[α]<sub>D</sub>= +81 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup>** =336.2.

**HRMS, ESI: [M+Na]<sup>+</sup>**<sub>calc</sub>=358.0395Da, [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub>=358.0396Da.

**2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-S-(1-(5-acetylthiazol-2-yl)-2-(dimethylamino)vinyl)-α-D-mannopyranose (74)**

**72** (100 mg, 0.228mmol) was dissolved in ACN (5mL), DMF-DMA (2 eq, 0.061mL) was added and the solution was irradiated in microwave during 15 min at 80°C. Chloroacetone (4 eq, 0.075mL) was added and triethylamine (2.09 eq, 0.064mL) 15 min later. The mixture was irradiated in Microwave during 15 min at 90°C and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified on silica gel, PE/EtOAc 9:1 to 3:7, to give 27mg (19% yield) of the desired product.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.73 (1H, s, H-8), 7.54 (1H, s, H-11), 5.60 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.3 Hz, H-1), 5.47 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 3.3 Hz, H-2), 5.41 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 9.9 Hz,

-Experimental Part-

H-3), 5.31 (1H, t,  $^3J = 9.9$  Hz, H-4), 4.58 (1H, m, H-5), 4.25 (1H, dd,  $^2J_{6-6'} = 12.2$  Hz,  $^3J_{6-5} = 5.4$  Hz, H-6), 4.04 (1H, dd,  $^2J_{6-6'} = 12.2$  Hz,  $^3J_{6'-5} = 2.4$  Hz, H-6'), 3.11-3.09 (2H, 2s, H-9, H-10), 2.44 (3H, s, C-15), 2.13 (3H, s, C CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

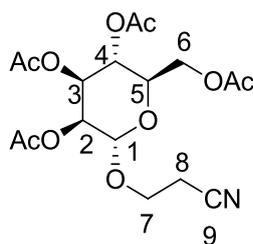
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 189.35 (C-14), 170.75 (OAc), 170.02 (OAc), 169.93 (OAc), 169.84 (OAc), 166.20 (C-11), 154.83 (C-8), 138.40 (C-12), 130.83 (C-13), 113.77 (C-7), 84.22 (C-1), 70.91 (C-2), 69.79 (C-5), 69.48 (C-3), 66.70 (C-4), 62.54 (C-6), 40.94-35.31 (2C, C-9, C-10), 25.68 (C-15), 21.01 (CH<sub>3</sub>CO), 20.83 (CH<sub>3</sub>CO), 20.79 (CH<sub>3</sub>CO), 20.77 (CH<sub>3</sub>CO).

**[α]<sub>D</sub>** = +241 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, ESI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> = 559.2.

**3-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranos-1-yl)oxy)propanenitrile (75)**

Prepared Following **GP (3)**, starting from hydroxypropionitrile (350 mg, 4.08mmol), after purification by flash chromatography on silica gel (EP/EtOAc, 5:5 to 6:4) to afford 650mg (40% yield) of the desired product.



White foam  
M=401.1322g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>10</sub>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 5.31- 5.29 (2H, m, H-3, H-4), 5.27 (1H, m, H-2), 4.87 (1H, d,  $^3J_{1-2} = 1.7$  Hz, H-1), 4.28 (1H, dd,  $^2J_{6-6'} = 12.3$  Hz,  $^3J_{6-5} = 5.4$  Hz, H-6), 4.13 (1H, dd,  $^2J_{6-6'} = 12.3$  Hz,  $^3J_{6'-5} = 2.5$  Hz, H-6'), 4.07 (1H, m, H-5), 3.92 (1H, dt,  $^2J_{7-7'} = 9.9$  Hz,  $^3J_{7-8} = 6.6$  Hz, H-7), 3.76 (1H, dt,  $^2J_{7-7'} = 9.9$  Hz,  $^3J_{7-8} = 6.1$  Hz, H-7'), 4.40 (2H, t,  $^3J = 4.9$  Hz, H-8), 3.09 (3H, s, H-9), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 170.69 (OAc), 170.11 (OAc), 169.95 (OAc), 169.87 (OAc), 117.26 (C9), 98.03 (C1), 69.43 (C2+C5), 69.21 (C3), 68.99 (C4), 66.04 (C7+C4), 63.45 (C7), 62.57 (C6), 20.96 (CH<sub>3</sub>CO), 20.86 (CH<sub>3</sub>CO), 20.82 (CH<sub>3</sub>CO), 20.78 (CH<sub>3</sub>CO), 18.92 (C8).

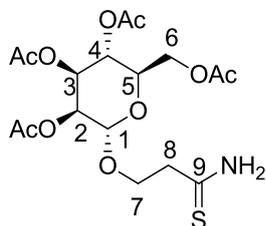
**[α]<sub>D</sub>** = +25 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> = 424.1.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 424.1214Da, [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 424.1203Da.

### 3-((2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)oxy)propanethioamide (76)

Prepared following **GP (9)**, starting from **75** (234 mg, 0.6mmol). After purification over silica gel (DCM/EtOAc 6:4), 140mg (55% yield) of the desired product was obtained.



White foam  
M=435.1199g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>10</sub>S

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.46 (1H, bs, NH), 7.20 (1H, bs, NH), 5.25- 5.28 (2H, m, H-3, H-4), 5.22 (1H, m, H-2), 4.85 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.6 Hz, H-1), 4.27 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 5.3 Hz, H-6), 4.20 (1H, ddd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-8</sub>= 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-8'</sub>= 4.3 Hz, H-7), 4.13 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6'-5</sub>= 2.5 Hz, H-6'), 4.03 (1H, m, H5), 3.82 (1H, ddd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub>= 9.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-8</sub>= 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7'-8'</sub>= 6.1 Hz, H-7'), 2.85-2.99 (2H, m, H-8), 3.09 (3H, s, H-9), 2.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 207.26 (C-9), 170.84 (OAc), 170.271 (2xOAc), 169.83 (OAc), 97.71 (C-1), 69.58 (C-2), 69.32 (C-4), 69.19 (C-5), 68.88 (C-7), 66.11 (C-3), 62.57 (C-6), 45.08 (C-8), 20.99 (CH<sub>3</sub>CO), 20.92 (CH<sub>3</sub>CO), 20.85 (CH<sub>3</sub>CO), 20.82 (CH<sub>3</sub>CO).

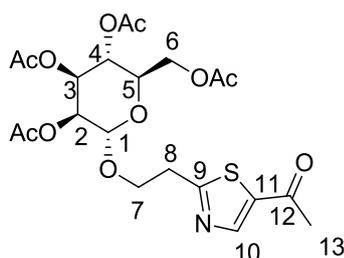
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>= +36 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

MS, MALDI m/z: [M+Na]<sup>+</sup> = 458.1.

HRMS, MALDI : [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup>=458.1091Da, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup>= 458.1090Da.

### 5-acetyl-2-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-1-yl)oxyethyl)thiazole 77

Prepared following **GP (12)**, starting from **76** (141 mg, 0.36mmol) and chloroacetone. After purification over silica gel (PE/EtOAc 4:6), 30.6mg (17% yield) of the desired product was obtained.



Yellow foam  
M=501.1304g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>11</sub>S

-Experimental Part-

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 8.20 (1H, s, H-10), 5.22-5.30 (2H, m, H-3, H-4), 5.21 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub>= 3.1 Hz, H-2), 4.81 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.5 Hz, H-1), 4.21 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>6-5</sub>= 5.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6-6'</sub>= 12.2Hz, H-6), 4.06-4.12 (2H, m, H-6', H-7), 3.78-3.90 (2H, m, H-5, H-7), 3.30-3.36 (2H, m, H-8), 2.56 (3H, s, H-13), 2.14 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):**190.03 (C-12), 174.09 (C-9), 170.72 (OAc), 170.11 (OAc), 169.92 (OAc), 169.84 (OAc), 147.05 (C-10), 140.29 (C-11), 97.80 (C1), 69.57 (C2), 69.05 (C5, C-3), 66.44 (C-7), 66.23 (C-4), 62.56 (C-6), 34.23 (C8), 27.61 (C-13), 20.96 (CH<sub>3</sub>CO), 20.86 (CH<sub>3</sub>CO), 20.77 (CH<sub>3</sub>CO).

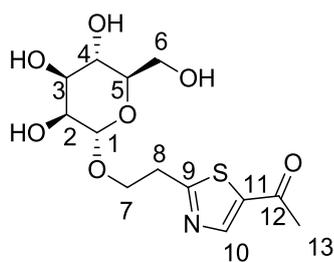
[α]<sub>D</sub>= +31 (c=1g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**MS, MALDI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> = 524.1.

**HRMS, MALDI :** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> =524.1197Da, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 524.1183Da.

### **5-acetyl-2-(2-(α-D-mannopyranos-1-yl)oxyethyl)thiazole (MOC<sub>2</sub>Tz1)**

Prepared following **GP (13)**, starting from **77** (30 mg, 0.06mmol). After purification over silica gel (DCM/MeOH 9:1) and lyophilisation, 7mg (35% yield) of the desired product was obtained.



Yellow powder  
M=333.0882g.mol<sup>-1</sup>  
C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>7</sub>S

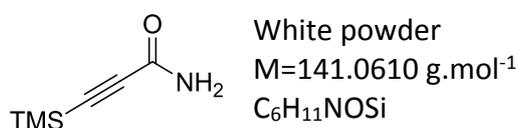
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm):** 8.38 (1H, s, H-10), 4.79 (1H, d, <sup>3</sup>J = 1.52Hz, H-1), 4.11 (1H, m), 3.76-3.87 (3H, m), 3.55-3.71 (3H, m), 3.33-3.43 (2H, m), 3.21 (1H, q, <sup>3</sup>J= 7.3Hz), 2.57 (3H, s, H-13).

**MS, ESI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> = 356.1

**HRMS, ESI:** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> =356.0774Da, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 356.0768Da

### 3- (trimethylsilyl)propiolamide (78)

Ethynyltrimethylsilane (10mL, 70.9mmol) was suspended in Et<sub>2</sub>O (200mL) at -78°C and BuLi 1.6M (57mL, 1.3eq) was added. The mixture was stirred 30 min, then CO<sub>2</sub> was bubbled for 30 min. the mixture was allowed to reach ambient temperature in 4h, then washed with HCl 1M. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The crude mixture was dissolved in Et<sub>2</sub>O (100mL), then DMF (100μL) and oxalyl chloride (7.35mL, 1.2eq) were added. After 1h, the mixture was concentrated in vacuum, diluted in Et<sub>2</sub>O (200mL) and ammonia was bubbled. The suspension was filtered over decalite and concentrated to provide 6.7g (66% yield) of the desired product in.



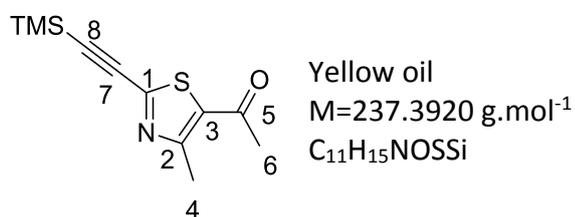
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm): 5.72 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 0.23 (9H, s, TMS).

MS, CI m/z: [M+H]<sup>+</sup> =142.1.

Physical properties in accordance with literature.<sup>153</sup>

### 2-trimethylsilylethynyl-4-methyl-5-acetylthiazol (81)

**85** (1.580g, 7.11mmol) was solubilised in freshly distilled THF (20mL), then DIPEA (4.96mL, 4eq), ethynyltrimethylsilane (5.02mL, 5eq) and copper iodide (190mg, 0.05eq) were added. Finally after addition of PdCl<sub>2</sub> (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (702mg, 0.05eq), the flask was scelled and stirred at rt for 4h. The mixture was filtered over decalite, concentrated and the residue was purified over silica gel (DCM) to afford 956mg (57% yield) of the desired product ias yellow oil.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm): 2.71 (3H, s, H-4), 2.52 (3H, s, H-6), 0.27 (9H, s, H-TMS).

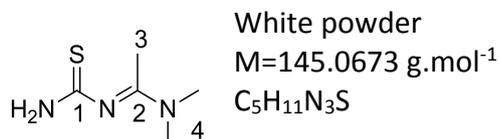
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ (ppm): 189.92 (C-5), 159.02 (C-1), 149.63 (C-3), 132.37 (C-2), 103.79 (C-8 or C-7), 96.23 (C-8 or C-7), 30.93 (C-6), 18.38 (C-4).

MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> =238.1.

HRMS, ESI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub>=238.07164, [M+H]<sup>+</sup><sub>ind</sub>= 238.07106.

### **1-(1-Dimethylamino-ethylidene)-2-methylisothiourea (83)**

Thiourea (500mg, 6.58mmol) was suspended in DCM (8mL) and DMA-DMA, (1.25mL, 1.3eq) was added. The mixture was heated at reflux and filtered on silica pad (DCM/EtOAc 1:1). The solid was washed with Et<sub>2</sub>O, to provide 830mg (87% yield) of white solid.



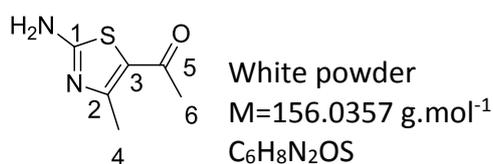
Physical properties in accordance with literature <sup>142</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO):** δ (ppm): 8.11 (1H, bs, NH), 7.69 (1H, bs, NH), 2.93 (6H, s, H-4), 2.17 (3H, s, H3).

**MS, ESI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> =146.2.

### **2-amino-4-methyl-5-acétylthiazol (84)**

**83** (200mg, 1.38mmol) was solubilised in DCM (5mL) and chloroacetone (229 μL, 2eq) was added, followed by Et<sub>3</sub>N (375 μL, 2eq). The mixture was stirred at rt overnight, then filtered and the resulting white powder was rinsed with DCM to provide 140mg (65% yield) of the desired product.



**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO):** δ (ppm): 7.88 (2H, s, NH), 2.39 (3H, s, H-4), 2.31 (3H, s, H-6).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO):** δ (ppm): 188.97 (C-5), 171.09 (C-1), 157.77 (C-3), 121.91 (C-2), 30.12 (C-6), 18.81 (C-4).

**MS, ESI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> =157.0.

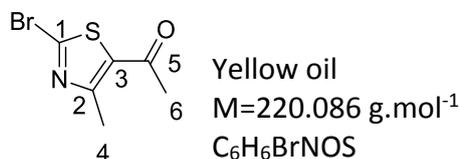
**HRMS, ESI:** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> =157.0430, [M+H]<sup>+</sup><sub>find</sub> = 157.0428.

Physical properties in accordance with literature <sup>154</sup>

### **2-bromo-4-methyl-5-acétylthiazol (85)**

**84** (200mg, 1.26mmol) was suspended in ACN (15mL), copper bromide (286mg, 1eq) and isoamyl nitrite (511μL, 3eq) were added. The mixture was heated to reflux 3h, diluted with

DCM, washed with brine, a saturated solution of EDTA, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. After purification over silica gel (DCM) 263mg (94% yield) of the desired product was obtained as yellow oil.



<sup>1</sup>H NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 2.71 (3H, s, H-4), 2.51 (3H, s, H-6).

<sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 189.50 (C-5), 158.26 (C-1), 139.72 (C-3), 136.02 (C-2), 30.66 (C-6), 18.31 (C-4).

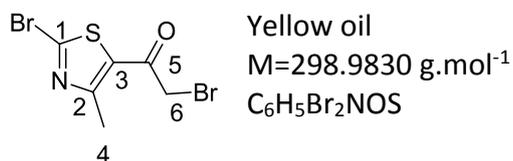
MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> =219.9.

HRMS, ESI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> =219.94262, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 219.24264.

Physical properties in accordance with literature <sup>155</sup>

### **2-bromo-4-methyl-5-bromoacetylthiazol (86)**

**85** (100mg, 0.45mmol) was solubilised in dioxane (7mL) and copper bromide was added. The mixture was heated overnight at 110°C, diluted by DCM, washed by brine, then by a solution of EDTA, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. After purification over silica gel (PE/EtOAc 1:1) 90mg (66% yield) of the desired product was obtained as yellow oil.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 4.18 (2H, s, H-6), 2.75 (3H, s, H-4).

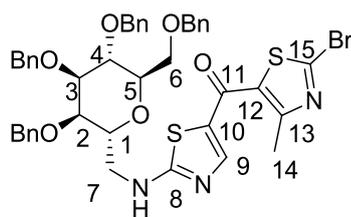
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 183.4 (C-5), 182.31 (C-1), 161.2 (C-3), 140.8 (C-2), 33.02 (C-6), 18.38 (C-4).

MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> =297.9.

HRMS, ESI: [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> =297.85314, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 297.85223.

### **5-(2-bromo-4-methylthiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((α-D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (89)**

Prepared following **GP (12)**, starting from **63** (200mg, 0.326mmol) and **86**. DIPEA was used instead of triethylamine. After purification over silica gel (PE/EtOAc 1:1) 220mg (80.5% yield) of the desired product was obtained as a yellow oil.



Yellow oil

$M=840.8440 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{BrN}_3\text{O}_6\text{S}_2$

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 7.82 (1H, s, H-9), 7.17-7.37 (20H, m, H-Bn), 6.30 (1H, bs, NH), 4.35-4.55 (8H, m, H-CH<sub>2</sub>Bn), 4.05-4.11 (2H, m, H-1, H-5), 3.82-3.86 (2H, m, H-4, H-6), 3.68-3.71 (2H, m, H-2, H-3), 3.57-3.64 (2H, m, H-6', H-7), 3.46-3.53 (1H, m, H-7'), 2.64 (3H, s, H-14).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm):** 175.78 (C-11), 175.52 (C-8, C-15), 157.52 (C-13), 149.74 (C-9), 138.14 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.88 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.71 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.56 (C-Bn<sub>IV</sub>), 131.63 (C12), 129.49 (C-10), 127.78-128.79 (C-Bn), 74.97 (C-5), 74.31 (C-2), 73.68 (C-3), 73.44 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 73.25 (C-4), 72.92 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.30 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.53 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 67.98 (C-1), 67.90 (C-6), 46.83 (C-7), 17.84 (C-14).

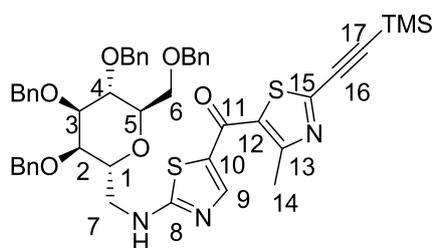
**MS, CI  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$**  = 839.5.

**$[\alpha]_D^{25}$**  = +1 (c=0.5g/100mL,  $\text{CHCl}_3$ , 20°C, 589.3nm).

**HRMS, ESI:  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{calc}}^+$**  = 840.17712,  **$[\text{M}+\text{H}]_{\text{fnd}}^+$**  = 840.17780.

**5-(4-methyl-2-((trimethylsilyl)ethynyl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (90)**

**89** (1.236g, 1.47mmol) was solubilised in THF and triethylamine (0.6mL, 3eq) was added. The mixture was sonicated under nitrogen bubbling during 15 min, then (trimethylsilyl)acetylene (1.24mL, 6eq) was added, followed by bis (triphenylphosphine)palladium (II) chloride (52mg, 0.05eq) and copper (I) iodide (14mg, 0.05eq). The mixture was stirred at rt during 3h, diluted by EtOAc, washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum. After purification over silica gel (PE/EtOAc 7:3) 769mg (61% yield) of the desired product was obtained as yellow oil.



Yellow oil  
 $M=858.1505 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 $\text{C}_{48}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2\text{Si}$

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 7.83 (1H, s, H-9), 7.17-7.36 (20H, m, H-Bn), 6.19 (1H, bt, NH), 4.35-4.55 (8H, m, H- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 4.04-4.11 (2H, m, H-1, H-5), 3.81-3.86 (2H, m, H-4, H-6), 3.67-3.72 (2H, m, H-2, H-3), 3.57-3.63 (2H, m, H-6', H-7), 3.47-3.54 (1H, m, H-7'), 2.66 (3H, s, H-14), 0.29 (9H, s, H-TMS).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 176.38 (C-11), 175.39 (C-8), 158.20 (C-12), 149.84 (C-15), 148.60 (C-9), 138.14 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.90 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.56 (C-Bn<sub>IV</sub>), 129.96 (C-13), 128.76 (C-10), 127.69-128.95 (C-Bn), 103.26 (C-16 ou C-17), 96.23 (C-16 ou C-17), 74.97 (C-5), 74.31 (C-2), 73.65 (C-3), 73.44 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 73.30 (C-4), 72.91 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 72.31 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 71.55 (C- $\text{CH}_2\text{Bn}$ ), 67.99 (C-1), 67.91 (C-6), 46.74 (C-7), 17.84 (C-14), -0.44 (TMS).

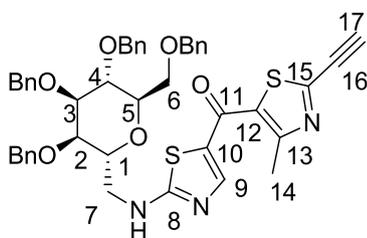
MS, ESI  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 858.2$ .

$[\alpha]_D^{20} = +2$  ( $c=0.5\text{g}/100\text{mL}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $589.3\text{nm}$ ).

HRMS, ESI:  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{calc}}^+ = 858.3067$ ,  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{fnd}}^+ = 858.3104$ .

### 5-(4-methyl-2-(ethynyl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (91)

**90** (650 mg, 0.76mmol) was solubilised in MeOH and potassium carbonate (210mg, 2eq) was added. The suspension was stirred 30min at rt, then extracted with DCM, washed with a saturated solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and brine. The solution was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum. After purification over silica gel (DCM/EtOAc 7:3) 500mg of the desired product was obtained in a quantitative yield, as yellow oil.



Yellow oil  
 $M=785.2593 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 $\text{C}_{45}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 7.84 (1H, s, H-9), 7.16-7.38 (20H, m, H-Bn), 6.23 (1H, bt, NH), 4.33-4.55 (8H, m, H-CH<sub>2</sub>Bn), 4.03-4.12 (2H, m, H-1, H-5), 3.80-3.88 (2H, m, H-4, H-6), 3.66-3.72 (2H, m, H-2, H-3), 3.57-3.65 (2H, m, H-6', H-7), 3.55 (1H, s, H-17) 3.46-3.55 (1H, m, H-7'), 2.67 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 176.15 (C-11), 175.35 (C-8), 157.88 (C-12), 149.98 (C-15), 147.47 (C-9), 137.95 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.70 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.37 (C-Bn<sub>IV</sub>), 129.64 (C10), 129.13 (C-13), 127.69-128.70 (C-Bn), 83.71 (C17), 76.08 (C16), 74.81 (C-5), 74.05 (C-2), 73.40 (C-3), 73.28 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.99 (C-4), 72.72 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.15 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.36 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 67.75 (C-1), 67.66 (C-6), 46.57 (C-7), 17.67 (C-14).

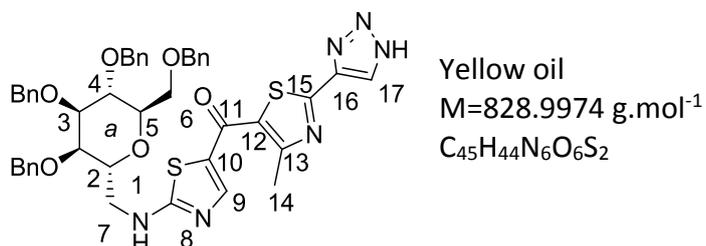
**MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 786.3.**

**[α]<sub>D</sub> = +2** (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**HRMS, ESI: [M+H]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 786.2672, [M+H]<sub>found</sub><sup>+</sup> = 786.2682.**

**5-(4-methyl-2-(1-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (92)**

**91** (70mg, 0.089mmol) was solubilised in a mixture of DMF and methanol (9:1, 2mL) and placed in a tube, trimethylsilylazide (72μL, 6eq) and copper (I)iodide (2mg, 0.1eq) were added and the tube was sealed and heated at 90°C for 5h. After completion, the mixture was diluted with Et<sub>2</sub>O, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. After purification over silica gel (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc 6:4 to 3:7) 36mg (49% yield) of the desired product was obtained as yellow oil.



**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 8.24 (1H, s, H-17), 8.05 (1H, s, H-9), 7.14-7.40 (20H, m, H-Bn), 4.38-4.58 (8H, m, H-CH<sub>2</sub>Bn), 4.07-4.17 (2H, m, H-1, H-5), 3.81-3.93 (2H, m, H-4, H-6), 3.69-3.77 (2H, m, H-2, H-3), 3.50-3.69 (3H, m, H-6', H-7), 2.75 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm):** 177.03 (C-11), 175.41 (C-8), 159.18 (C-13 or C-15), 159.10 (C-13 or C-15), 149.05 (C-9), 142.24 (C-16), 137.86 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.78 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.52 (C-Bn<sub>IV</sub>), 130.14 (C-10, C-17), 127.66-128.97 (C-Bn), 127.42 (C-12), 74.90 (C-5), 74.40 (C-2),

73.62 (C-3), 73.52 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 73.47 (C-4), 72.92 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.47 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.63 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 68.40 (C-1), 67.91 (C-6), 46.80 (C-7), 18.00 (C-14).

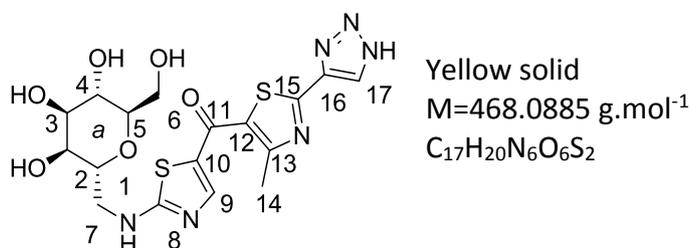
**MS, ESI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> = 829.4.

[α]<sub>D</sub> = +4 (c=0.93g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**HRMS, ESI:** [M+H]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 829.2842, [M+H]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 828.2952.

**5-(4-methyl-2-(1-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((α-D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (MCNTz3-H)**

Prepared following **GP (15)**, starting from **92** (36mg, 0.043mmol) after precipitation in acetonitrile and purification over C-18 chromatography, 6mg (30% yield) of the desired product was obtained.



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD):** δ (ppm): 8.45 (1H, s, H-9), 8.20 (1H, s, H-17), 4.04-4.12 (2H, m, H-1, H-6), 3.84-3.88 (1H, m), 3.73-3.83 (5H, m, H-5), 3.65 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 11.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1</sub> = 3.0 Hz, H-6'), 2.70 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, MeOD):** δ (ppm): 177.50 (C-11), 172.11 (C-8), 162.95 (C-13 or C-15), 162.95 (C-13 or C-15), 142.41 (C-5), 134.79 (C), 129.46 (C-1), 128.18 (C), 80.26 (C), 71.83 (C-2), 71.18 (C), 70.69 (C), 67.66 (C-7, C), 61.12 (C-6), 18.10 (C-14).

**MS, ESI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> = 469.1.

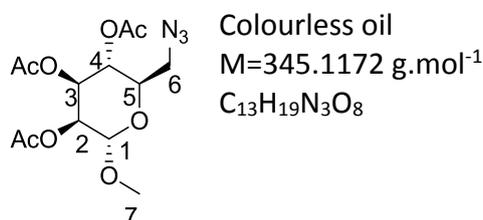
[α]<sub>D</sub> = +50 (c=0.25g/100mL, MeOH, 20°C, 589.3nm).

**HRMS, ESI:** [M+Na]<sub>calc</sub><sup>+</sup> = 491.0783, [M+Na]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 491.0792.

**Methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6-deoxy-α-D-mannopyranoside (93)**

Methyl-α-D-mannose (500mg, 2.8mmol) was solubilised in pyridine (15mL) and tosyl chloride (1.06g, 2eq) was added. The mixture was stirred 2h and concentrated under vacuum. The residue was solubilised in DMF (15mL) and sodium azide (540 mg, 3eq) was added. The mixture was warmed to 90°C for 3h and concentrated under vacuum. The residue was solubilised in pyridine (15mL), treated by acetic anhydride (3.93mL, 15eq) and

stirred at rt for 3h. The pyridine was removed under vacuum and the residue solubilised in toluene. The solution was washed several times by a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$ , then by brine. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under vacuum. Purification over silica gel (PE/EtOAc 7:3) led to 622mg (65% yield) of the desired compound.

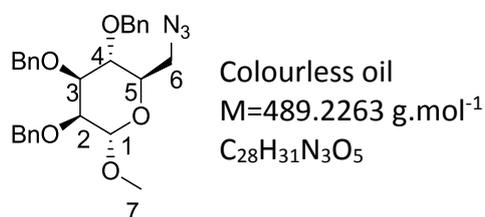


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 5.31 (1H, dd, <sup>3</sup>J=3.6 Hz, <sup>3</sup>J=10.0 Hz, H-3), 5.16–5.23 (2H, m, H-2,H-4), 4.71 (1H,d, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub>=2.0 Hz, H-1), 3.92 (1H, m, H-5), 3.43 (3H, s, H-7), 3.67 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub>=6.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub>=13.2 Hz, H-6), 3.27 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>5,6'</sub>=2.4 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub>=13.2 Hz, H-6), 1.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>OAc), 2.03 (3H, s, CH<sub>3</sub>OAc), 2.15 (3H, s, CH<sub>3</sub>OAc).

Physical properties in accordance with literature<sup>156</sup>

#### **Methyl 2,3,4-tri-O-benzyl-6-azido-6-deoxy- $\alpha$ -D-mannopyranoside (94)**

Prepared following **GP (6)**, starting from **93** (430mg). After purification over silica gel (PE/EtOAc 8:2) 580mg (95% yield) of the desired product was obtained as a colourless oil.



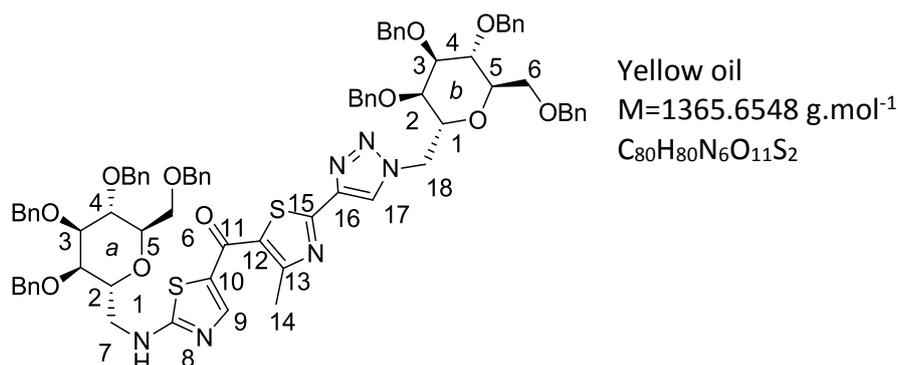
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 7.40–7.26 (15H, m, H-Bn), 4.62-4.96 (7H, m, H-CH<sub>2</sub>Bn, H-1), 3.84-3.89 (2H, m, H-3, H-4), 3.79 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>= 1.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub>= 2.6Hz, H-2), 3.71-3.77 (1H, m, H-5), 3.39-3.50 (2H, m, H6), 3.34 (s, 3H, OMe).

**MS, ESI m/z:** [M+Na]<sup>+</sup> =512.2.

Physical properties in accordance with literature<sup>157</sup>

**5-(4-methyl-2-(1-((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl) methyl)amino)thiazole (95)**

Prepared following **GP (15)**, starting from **91** (75mg, 0.095mmol) and **60** (66mg, 1.2eq). After purification over silica gel (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc 8:2) 45mg (35% yield) of the desired product was obtained as a yellow oil.



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 8.45 (1H, s, H-17), 7.97 (1H, bs, H-9), 7.10-7.39 (40H, m, H-Bn), 6.16 (1H, bs, NH), 4.74 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>18-18'</sub>=14.2Hz, <sup>3</sup>J<sub>1b-18</sub>=2.5Hz, H-18), 4.61 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>18-18'</sub>=14.2Hz, <sup>3</sup>J<sub>1b-18'</sub>=6.6Hz, H-18'), 4.34-4.56 (16H, m, H-CH<sub>2</sub>Bn), 4.26 (1H, ddd, <sup>2</sup>J<sub>1b-18</sub>=2.4Hz, <sup>3</sup>J<sub>1b-18'</sub>=6.6Hz, <sup>3</sup>J<sub>1b-2b</sub>=9.1Hz, H-1b), 4.16 (1H, m, H-5b), 4.09 (2H, m, H-1a, H-5a), 3.82-3.87 (3H, m, H-3a, H-3b, H-6a), 3.80 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>6b-6b'</sub>=10.6Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b-5b</sub>=8.2Hz, H-6b), 3.69-3.73 (2H, m, H-2a, H-4a) 3.66 (1H, m, H-4b), 3.65-3.65 (3H, m, H-6a', H-6b', H-7), 3.48-3.55 (2H, m, H-2b, H-7'), 2.69 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm): 117.25 (C-11), 175.14 (C-8), 159.90 (C-15), 159.02 (C-13), 149.34 (C-9), 142.69 (C-10), 137.58-138.18 (C-Bn<sub>IV</sub>), 130.38 (C-16), 127.65-128.84 (C-Bn), 126.92 (C-12), 124.07 (C-17), 74.99 (C-5b), 74.92 (C-5a), 74.47 (C-4b), 74.32 (C-4a), 73.62 (C-2a), 73.49 (C-3b), 73.44 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 73.36 (C-2b, C-CH<sub>2</sub>Bn), 73.02 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.88 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.74 (C-3a), 72.34 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.99 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.61 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.52 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 68.50 (C-1b), 68.16 (C-1a), 67.98 (C-6a), 67.83 (C-6b), 51.70 (C-18), 46.63 (C-7), 18.04 (C-14).

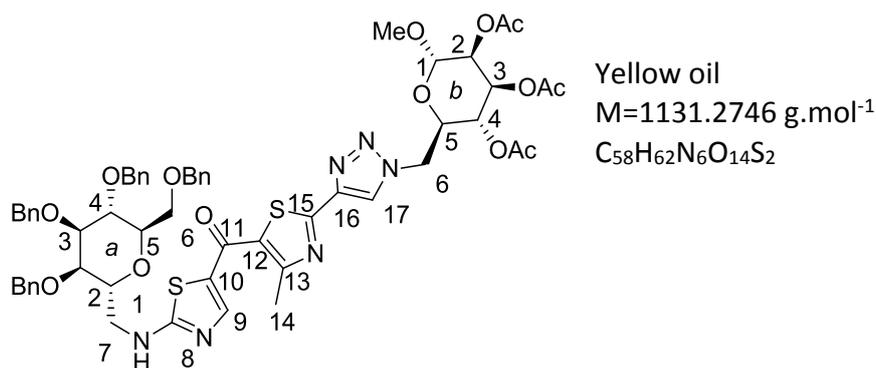
**MS, ESI m/z:** [M+H]<sup>+</sup> =1365.6.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +2 (c=0.62g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

**HRMS, ESI:** [M+H]<sub>calc</sub><sup>+</sup> =1365.5405, [M+H]<sub>find</sub><sup>+</sup> = 1365.5367.

**5-(4-methyl-2-(1-((1-O-methyl-2,3,4-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-6-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (96)**

Prepared following **GP (14)**, starting from **91** (60mg, 0.079mmol) and **92** (54mg, 2eq). After purification over silica gel (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc 3:7 to 2:8) 67mg (75% yield) of the desired product was obtained as a yellow oil.



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 8.34 (1H, s, H-17), 7.97 (1H, bs, H-9), 7.10-7.38 (20H, m, H-Bn), 6.23 (1H, bs, NH), 5.36 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3b-4b</sub>=9.9Hz, <sup>3</sup>J<sub>3b-2b</sub>=3.3Hz, H-3b), 5.23 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3b-2b</sub>=3.3, <sup>3</sup>J<sub>1b-2b</sub>=1.7 Hz, H-2b), 5.15 (1H, t, <sup>3</sup>J<sub>3b-4b-5b</sub>=10.0 Hz, H-4b), 4.68 (2H, m, H-1b, H-6b), 4.36-4.56 (9H, m, H-6b', H-CH<sub>2</sub>Bn), 5.36 (1H, ddd, <sup>3</sup>J=2.0Hz, <sup>3</sup>J=8.6Hz, <sup>3</sup>J=10.2Hz, H-5b), 4.05-4.11 (2H, m, H-1a, H-5a), 3.80-3.87 (2H, m, H-4a, H-6a), 3.68-3.73 (2H, m, H-2a, H-3a), 3.57-3.64 (2H, m, H-6'a, H-7a), 3.47-3.55 (H, m, H-7'a), 3.15 (3H,s, OMe), 2.70 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 117.09 (C-11), 175.22 (C-8), 170.17 (OAc), 169.97 (OAc), 169.85 (OAc), 159.32 (C-15), 158.79 (C-13), 149.47 (C-9), 142.89 (C-10), 138.15 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.91 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.56 (C-Bn<sub>IV</sub>), 130.06 (C-16), 127.76-128.78 (C-Bn), 127.27 (C-12), 123.55 (C-17), 98.66 (C-1b), 74.91 (C-5a), 74.29 (C-2), 73.61 (C-3), 73.41 (C-4,C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.87 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.31 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.56 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 69.50 (C-2b), 69.05 (C-5b), 68.77 (C-3b), 68.10 (C-1a), 67.93 (C-6a), 67.49 (C-4b), 55.59 (OMe), 51.47 (C-6b), 46.67 (C-7), 20.93 (CH<sub>3</sub>OAc), 20.89 (CH<sub>3</sub>OAc), 20.75 (CH<sub>3</sub>OAc), 17.93 (C-14).

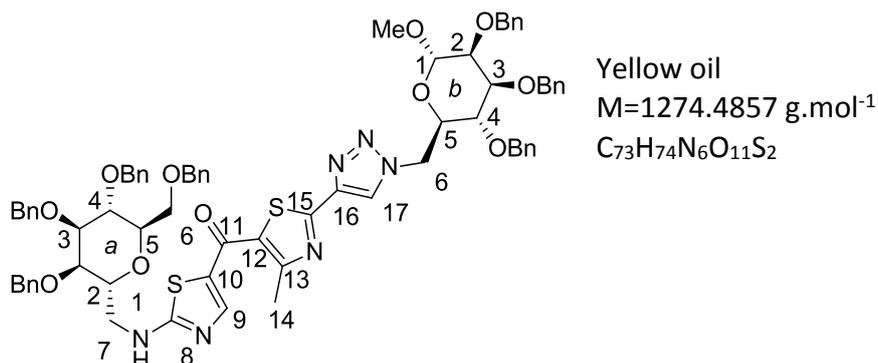
**MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> =1131.3.**

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +12 (c=1.03g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).**

**HRMS, ESI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> =1131.3844, [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 1131.3849.**

**5-(4-methyl-2-(1-((1-O-methyl-2,3,4-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranos-6-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (97)**

Prepared following GP (14), starting from 91 (100mg, 0.127mmol) and 93 (62mg, 1.1eq). After purification over silica gel (PE/EtOAc 7:3 to 5:5) 89mg (55% yield) of the desired product was obtained as yellow oil.



<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 8.36 (1H, s, H-17), 7.96 (1H, bs, H-9), 7.17-7.40 (35H, m, H-Bn), 4.95 (1H, d, <sup>3</sup>J = 10.9 Hz, H-6b), 4.36-4.74 (16H, m, H-1b, H-6b', H-CH<sub>2</sub>Bn), 4.09 (2H, m, H-1a, H-5a), 3.90-3.97 (2H, m, H-3b, H-4b), 3.81-3.86 (2H, m, H-4a, H-6a), 3.76 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>3b-2b</sub> = 2.6, <sup>3</sup>J<sub>1b-2b</sub> = 1.9 Hz, H-2b), 3.69-3.73 (2H, m, H-2a, H-3a), 3.58-3.66 (3H, m, H-6a', H-5b H-7), 3.51 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>7'-1a</sub> = 6.2, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> = 12.2 Hz, H-7'), 3.15 (3H, s, OMe), 2.71 (3H, s, H-14).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 177.12 (C-11), 174.99 (C-8), 159.94 (C-15), 159.12 (C-13), 142.89 (C-10), 138.35 (C-Bn<sub>IV</sub>), 138.30 (C-Bn<sub>IV</sub>), 138.17 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.93 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.58 (C-Bn<sub>IV</sub>), 130.06 (C-16), 129.90 (C-17), 127.76-128.78 (C-Bn), 126.86 (C-12), 123.92 (C-9), 99.39 (C-1b), 80.18 (C-3b), 75.35 (C-6b), 74.92 (C-5a, C-5b), 74.78 (C-2b), 74.31 (C-3a), 73.62 (C-2a), 73.44 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 73.41 (C-4a), 73.14 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.89 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.33 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.24 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.58 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 70.54 (C-4b), 68.20 (C-1a), 67.98 (C-6a), 55.18 (OMe), 51.50 (C-1b), 46.85 (C-7), 18.04 (C-14).

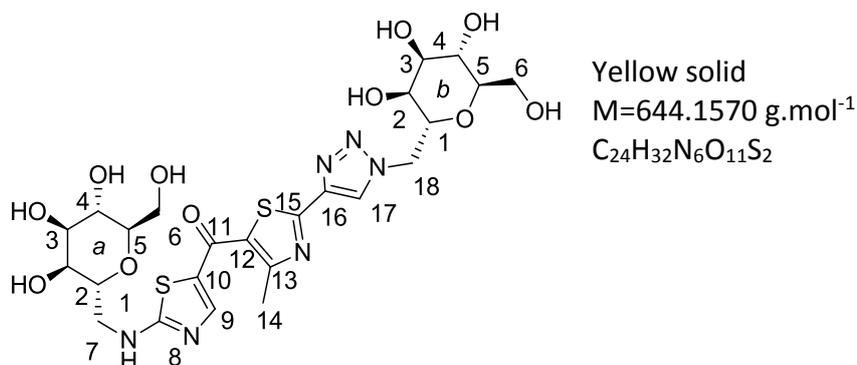
MS, MALDI m/z: [M+H]<sup>+</sup> = 1275.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +12 (c=0.5g/100mL, CHCl<sub>3</sub>, 20°C, 589.3nm).

HRMS, MALDI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 1275.4930, [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 1275.4889.

**5-(4-methyl-2-(1-(( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-((( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (MCNTz3-1Man)**

Prepared following GP (14), starting from 95 (45mg, 0.033mmol) after precipitation in methanol and purification over C-18 chromatography, 15mg (70% yield) of the desired product was obtained.



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm):** 8.54 (1H, s, H-17), 7.83 (1H, s, H-9), 4.99 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>18-18'</sub> =15.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>18-1b</sub> =10.8Hz, H-18), 4.79 (1H, m, H18'), 4.45 (1H, dt, <sup>3</sup>J<sub>1b-2b</sub> =3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1b-18</sub> =10.2, H-1b), 4.21 (1H, ddd, <sup>3</sup>J =2.6 Hz, <sup>3</sup>J =4.0, <sup>3</sup>J =9.4, H-1a), 4.14 (1H, t, <sup>3</sup>J =3.2 Hz, H-2b), 4.05 (1H, t, <sup>3</sup>J =2.9 Hz, H-2a), 3.97 (1H, dd, <sup>3</sup>J<sub>1b-2b</sub> =3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1b-18</sub> =8.2, H-3b), 3.82-3.92 (8H, m, H-3a, H-4a, H-4b, H-6a, H-6b, H-5b), 3.79 (1H, t, <sup>3</sup>J =8.8 Hz, H-4a), 3.74 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> =14.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1a</sub> =4.6Hz, H-7), 3.70 (1H, m, H-5a), 3.59 (1H, dd, <sup>2</sup>J<sub>7-7'</sub> =14.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>7-1a</sub> =4.2Hz, H-7), 2.51 (3H, s, H-14).

**<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm):** 177.19 (C-11), 175.22 (C-8), 159.74 (C-15), 159.18 (C-13), 150.20 (C-9), 141.01 (C-16), 127.72 (C-10), 126.41 (C-12), 124.37 (C-17), 75.94 (C-1b), 75.64 (C-1a), 75.36 (C-5b), 75.05 (C-5a), 70.79 (C-3a), 70.70 (C-3b), 69.04 (C-2a), 68.60 (C-2b), 67.29 (C-4a, C-4b), 60.99 (C-6a), 60.71 (C-6b), 48.58 (C-18), 43.02 (C-7), 17.14 (C-14).

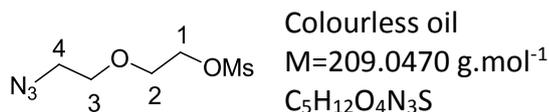
**MS, ESI m/z: [M+H]<sup>+</sup> =645.2.**

**HRMS, ESI: [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> =645.1649, [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 645.1662.**

**2- (2-azidoethoxy)ethyl methanesulfonate (98)**

Diethylene glycole (8.16, 5eq) was solubilised in DCM (60mL) and mesyle chloride (1.19mL, 15.4mmol) was added, followed slowly by Et<sub>3</sub>N (4.18mL, 2eq). The reaction is exothermic and after 1h the mixture was concentrated, diluted in Et<sub>2</sub>O and washed several time by brine. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude was solubilised in DMF (30mL) and sodium azide (2g, 2eq) was added. The mixture is heated

to 100°C during 3h, then concentrated under vacuum, diluted in Et<sub>2</sub>O and washed several time by brine. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude was solubilised in DCM and mesyle chloride (1.19mL, 15.4mmol) was added, followed slowly by Et<sub>3</sub>N (4.18mL, 2eq). The mixture was then washed by brine, the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. After purification over silica gel (PE/EtOAc 8:2) 1.352g (42% yield) of the desired product was obtained as colourless oil.



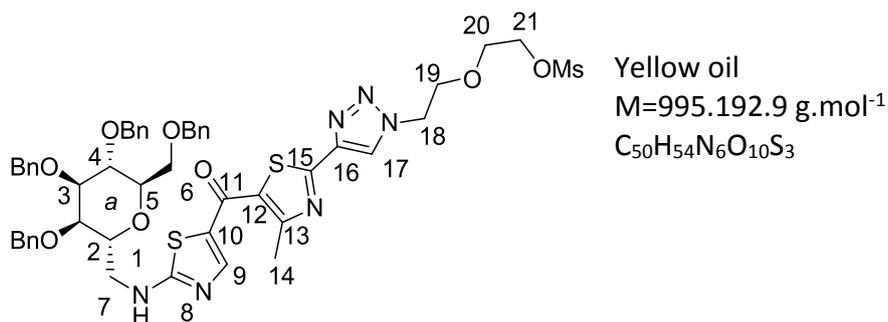
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 4.40-4.35 (2H, m), 3.81-3.76 (2H, m), 3.70 (2H, t, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz), 3.41 (2H, t, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz), 3.07 (3H, s).

MS, CI m/z: [M+Na]<sup>+</sup> =210.1.

Physical properties in accordance with literature <sup>156</sup>

**5-(4-methyl-2-(1-(2-(2-mesyloxyethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)methyl)amino)thiazole (99)**

Prepared following GP (15), starting from 91 (100mg, 0.079mmol) and 98 (80mg, 3eq). After purification over silica gel (DCM/MeOH 99:1 to 95:5) 66mg (52% yield) of the desired product was obtained as yellow oil.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm): 8.30 (1H, s, H-9), 7.97 (1H, bs, H-17), 7.16-7.38 (20H, m, H-Bn), 6.42 (1H, bs, NH), 4.63 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>18-19</sub>=4.8Hz, H-18), 4.37-4.58 (8H, m, H-CH<sub>2</sub>Bn), 4.34 (2H, m, H-21), 4.09 (2H, m, H-1, H-5), 3.94 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>19-18</sub>=4.8Hz, H-19), 3.84 (2H, m, H-4, H-7), 3.75 (2H, m, H-20), 3.68-3.73 (2H, m, H-2, H-3), 3.58-3.65 (2H, m, H-6, H-7'), 3.48-3.55 (1H, m, H-6'), 3.04 (3H, s, H-OMs), 2.70 (3H, s, H-14).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 117.04 (C-11), 175.17 (C-8), 159.47 (C-15), 158.71 (C-13), 149.30 (C-17), 142.84 (C-10), 138.09 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.88 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.86 (C-Bn<sub>IV</sub>), 137.54 (C-Bn<sub>IV</sub>), 130.05 (C-16), 127.76-128.78 (C-Bn), 127.17 (C-12), 123.08 (C-9), 74.85 (C-5), 74.30 (C-2), 73.59 (C-3), 73.47 (C-4), 73.36 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.81 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 72.31 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 71.52 (C-CH<sub>2</sub>Bn), 69.32 (C-19), 69.14 (C-20), 68.20 (C-1), 68.04 (C-21), 67.95 (C-7), 50.68 (C-18), 46.62 (C-6), 37.87 (C-OMs), 17.89 (C-14).

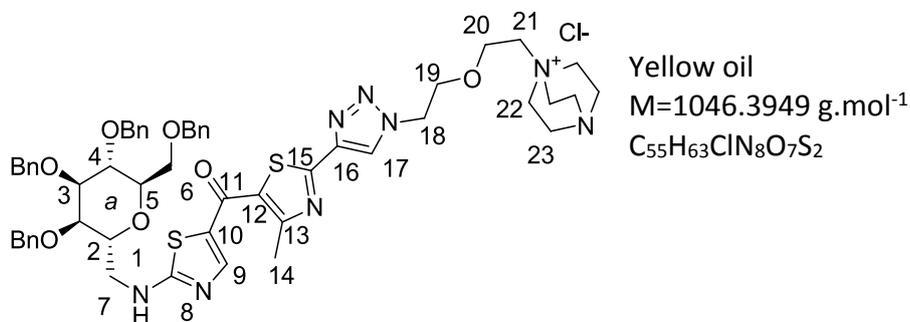
MS, ESI m/z:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1017.3$ .

$[\alpha]_{\text{D}} = +3$  (c=1g/100mL,  $\text{CHCl}_3$ , 20°C, 589.3nm).

HRMS, ESI:  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{calc}}^+ = 1017.2956$ ,  $[\text{M}+\text{H}]_{\text{fnd}}^+ = 1017.2960\text{Da}$ .

**5-(4-methyl-2-(1-(2-(2-(1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-yl)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)thiazol-5-ylcarbonyl)-2-(((2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl) methyl)amino)thiazole (100)**

**100** (66mg, 0.066mmol) was solubilised in acetone (2mL) and DABCO (30mg, 4eq) was added. The solution was heated at 45°C overnight, then concentrated and dissolved in MeOH. NaCl was added and the suspension was heated at reflux for 3h and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and the residue was purified over silica gel (DCM/MeOH 9:1). 17mg (23% yield) of the desired product were obtained as yellow oil.



MS, ESI m/z:  $[\text{M}-\text{Cl}]^- = 1011.5.3$ .

$[\alpha]_{\text{D}} = +11$  (c=0.85g/100mL,  $\text{CHCl}_3$ , 20°C, 589.3nm).

HRMS, ESI:  $[\text{M}-\text{Cl}]_{\text{calc}}^- = 1011.4261$ ,  $[\text{M}-\text{Cl}]_{\text{fnd}}^- = 1011.4294\text{Da}$ .

## **D. Biologic Part**

### **1. ELISA**

Immunosorbent microplates were coated with 100  $\mu\text{L}$  of a 10 mg/mL solution of RNaseB in 100 mM carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6. Plates were incubated at 4 °C overnight and then washed (300  $\mu\text{L}$ /well) three times with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.15% Tween-20. All wells were blocked with 250  $\mu\text{L}$  of 3% bovine serum albumin (BSA) in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.15% Tween-20 (PBST), incubated at 37 °C for 2h then washed three times with PBST. Thiazole-bearing mannosides were dissolved in PBST in the concentrations indicated on graphs and added to microwells. FimH was diluted in PBST to 0.07  $\mu\text{M}$  and added to each plate well. They were incubated for 1 h at room temperature. Wells were washed three times with PBST before being incubated with 100  $\mu\text{L}$  of rabbit-anti-FimH antibodies IgG (aFimH), diluted 1:2500 in PBST, for 1 h at room temperature. Wells were washed 3 times with PBST and incubated with 100  $\mu\text{L}$  of goat-antirabbit HRP-labeled secondary antibody, Enzo Life Sciences (2ndAb-HRP), diluted 1:5000 in PBST, for 1 h at room temperature. They were washed three times with PBST and 100  $\mu\text{L}$  of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was added to each well and incubated in darkness for 2–5 min. The reaction was stopped with 100  $\mu\text{L}$ /well of 1N sulfuric acid. Plate absorbance was analysed at 450 nm using a BioTek-ELx800 microplate reader.

### **2. Haemagglutininations.**

Interaction of *E. coli* FimH adhesins with the glycocalyx of guinea pig erythrocytes forms a crosslinked network in the wells. Glycoconjugates, added in a 2-fold dilution series, prevent the agglutination reaction. The inhibition titer is defined as the lowest concentration of the glycoconjugate at which hemagglutination is still inhibited. Several strain of *E. coli* were grown statically overnight in LB at 37 °C, washed three times in ice-cold phosphate-buffered saline and redissolved. A 2-fold dilution of glycoconjugates with a starting concentration of 1 mM was prepared in 25  $\mu\text{L}$  of PBS with 10% of DMSO. Importantly, the pipet tip was changed at every dilution step to avoid carry-over. Next, the bacterial solution (25  $\mu\text{L}$ ) was added to the 2-fold dilution series of the compound. Finally, 50  $\mu\text{L}$  of guinea pig red blood cells, washed and diluted in the buffer to 5% of the blood volume, was added to reach 100  $\mu\text{L}$ . The plates were left on ice for one night before read-out.

### **3. Adhesion Assays of AIEC LF82 Strain on Intestinal cells**

*E. coli* strain LF82 isolated from an ileal biopsy of a CD patient was used as the AIEC reference strain. Bacteria were grown overnight at 37 °C in Luria–Bertani (LB) broth and a bacterial suspension was prepared at a concentration of  $1.5 \times 10^8$  bacteria/mL in phosphate buffer saline (PBS) for adhesion assays. The human intestinal cell line T84, purchased from American Type Culture Collection (ATCC, CCL-248), was maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in the culture medium recommended by ATCC. T84 cells were seeded in 48-well tissue culture plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/well and incubated at 37 °C for 48 h.

#### ***a) Pre-incubation***

Before infection, cells were washed with PBS and incubated for 1 h with HM or thiazole-bearing mannosides at final concentrations of 0.1, 1, or 10 µM. Effects of mannoside treatment were compared with HM. Epithelial cells were then infected in the presence of inhibitory compounds with the AIEC reference strain LF82 for 3 h at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per cell ( $1.5 \times 10^6$  bacteria/well). Monolayers were washed three times with PBS and lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water. Samples were diluted and plated onto LB agar plates to determine the number of colony-forming units (CFU).

#### ***b) Post-incubation***

Cells were washed with PBS and infected, then incubated for 3 h with the AIEC reference strain LF82 for 3 h at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per cell ( $1.5 \times 10^6$  bacteria/well). The cells were washed 4 times with PBS, then incubated 3h with HM or thiazole-bearing mannosides at final concentrations of 0.1, 1, or 10 µM. Effects of mannoside treatment were compared with HM. Monolayers were washed three times with PBS and lysed with 1% Triton X-100 (Sigma) in deionized water. Samples were diluted and plated onto LB agar plates to determine the number of colony-forming units (CFU).

## **VII. Bibliographie**

- (1) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48* (1), 1–12.
- (2) Martinez, J. L. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (11), 2893–2902.
- (3) Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13* (1), 42–51.
- (4) Alanis, A. J. *Arch. Med. Res.* **2005**, *36* (6), 697–705.
- (5) Levy, S. B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (10), 1446–1450.
- (6) Projan, S. J. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6* (5), 427–430.
- (7) Kinch, M. S.; Patridge, E.; Plummer, M.; Hoyer, D. *Drug Discov. Today* **2014**, *19* (9), 1283–1287.
- (8) Baquero, F.; Coque, T. M.; Cantón, R. *Expert Opin. Ther. Targets* **2014**, *18* (8), 851–861.
- (9) Chen, S. L.; Hung, C. S.; Pinkner, J. S.; Walker, J. N.; Cusumano, C. K.; Li, Z.; Bouckaert, J.; Gordon, J. I.; Hultgren, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (52), 22439–22444.
- (10) Mulvey, M. A.; Schilling, J. D.; Hultgren, S. J. *Infect. Immun.* **2001**, *69* (7), 4572–4579.
- (11) Martinez, J. J.; Mulvey, M. A.; Schilling, J. D.; Pinkner, J. S.; Hultgren, S. J. *EMBO J.* **2000**, *19* (12), 2803–2812.
- (12) Rutledge, J. C.; Ng, K. F.; Aung, H. H.; Wilson, D. W. *Nat. Rev. Nephrol.* **2010**, *6* (6), 361–370.
- (13) Pera, N. P.; Pieters, R. J. *MedChemComm* **2014**, *5* (8), 1027–1035.
- (14) Cusumano, C. K.; Pinkner, J. S.; Han, Z.; Greene, S. E.; Ford, B. A.; Crowley, J. R.; Henderson, J. P.; Janetka, J. W.; Hultgren, S. J. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3* (109), 109ra115–109ra115.
- (15) Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (1), 525–561.
- (16) Horan, N.; Yan, L.; Isobe, H.; Whitesides, G. M.; Kahne, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (21), 11782–11786.
- (17) Quesenberry, M. S.; Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36* (9), 2724–2732.
- (18) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (2), 555–578.
- (19) Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (4), 966–979.
- (20) Bernardi, A.; Jiménez-Barbero, J.; Casnati, A.; Castro, C. D.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K.-E.; Lahmann, M.; Lindhorst, T. K.; Marradi, M.; Messner, P.; Molinaro, A.; Murphy, P. V.; Nativi, C.; Oscarson, S.; Penadés, S.; Peri, F.; Pieters, R. J.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L.; Richichi, B.; Rojo, J.; Sansone, F.; Schäffer, C.; Turnbull, W. B.; Velasco-Torrijos, T.; Vidal, S.; Vincent, S.; Wennekes, T.; Zuilhof, H.; Imberty, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4709–4727.
- (21) Pieters, R. J. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27* (6), 796–816.
- (22) Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. *Nature* **2000**, *403* (6770), 669–672.
- (23) Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Biochemistry (Mosc.)* **2008**, *47* (33), 8470–8476.
- (24) Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Brewer, C. F. *Biochemistry (Mosc.)* **2009**, *48* (18), 3822–3827.
- (25) Pagé, D.; Roy, R. *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8* (5), 714–723.
- (26) Bodelón, G.; Palomino, C.; Fernández, L. Á. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37* (2), 204–250.
- (27) Eshdat, Y.; Ofek, I.; Yashouv-Gan, Y.; Sharon, N.; Mirelman, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *85* (4), 1551–1559.
- (28) Aronson, M.; Medalia, O.; Schori, L.; Mirelman, D.; Sharon, N.; Ofek, I. *ISRAEL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*. 1979, p 88.

- (29) Hung, C.-S.; Bouckaert, J.; Hung, D.; Pinkner, J.; Widberg, C.; DeFusco, A.; Auguste, C. G.; Strouse, R.; Langermann, S.; Waksman, G.; Hultgren, S. J. *Mol. Microbiol.* **2002**, *44* (4), 903–915.
- (30) Bouckaert, J.; Berglund, J.; Schembri, M.; De Genst, E.; Cools, L.; Wuhrer, M.; Hung, C.-S.; Pinkner, J.; Slättegård, R.; Zavialov, A.; Choudhury, D.; Langermann, S.; Hultgren, S. J.; Wyns, L.; Klemm, P.; Oscarson, S.; Knight, S. D.; De Greve, H. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55* (2), 441–455.
- (31) Wellens, A.; Lahmann, M.; Touaibia, M.; Vaucher, J.; Oscarson, S.; Roy, R.; Remaut, H.; Bouckaert, J. *Biochemistry (Mosc.)* **2012**, *51* (24), 4790–4799.
- (32) Choudhury, D.; Thompson, A.; Stojanoff, V.; Langermann, S.; Pinkner, J.; Hultgren, S. J.; Knight, S. D. *Science* **1999**, *285* (5430), 1061–1066.
- (33) Firon, N.; Ashkenazi, S.; Mirelman, D.; Ofek, I.; Sharon, N. *Infect. Immun.* **1987**, *55* (2), 472–476.
- (34) Wellens, A.; Garofalo, C.; Nguyen, H.; Van Gerven, N.; Slättegård, R.; Hernalsteens, J.-P.; Wyns, L.; Oscarson, S.; De Greve, H.; Hultgren, S.; Bouckaert, J. *PLoS ONE* **2008**, *3* (4), e2040.
- (35) Nagahori, N.; Lee, R. T.; Nishimura, S.-I.; Pagé, D.; Roy, R.; Lee, Y. C. *ChemBioChem* **2002**, *3* (9), 836–844.
- (36) Disney, M. D.; Zheng, J.; Swager, T. M.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (41), 13343–13346.
- (37) Almant, M.; Moreau, V.; Kovensky, J.; Bouckaert, J.; Gouin, S. G. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (36), 10029–10038.
- (38) Bouckaert, J.; Li, Z.; Xavier, C.; Almant, M.; Caveliers, V.; Lahoutte, T.; Weeks, S. D.; Kovensky, J.; Gouin, S. G. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19* (24), 7847–7855.
- (39) Han, Z.; Pinkner, J. S.; Ford, B.; Obermann, R.; Nolan, W.; Wildman, S. A.; Hobbs, D.; Ellenberger, T.; Cusumano, C. K.; Hultgren, S. J.; Janetka, J. W. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (12), 4779–4792.
- (40) Klein, T.; Abgottsporn, D.; Wittwer, M.; Rabbani, S.; Herold, J.; Jiang, X.; Kleeb, S.; Lüthi, C.; Scharenberg, M.; Bezençon, J.; Gubler, E.; Pang, L.; Smiesko, M.; Cutting, B.; Schwardt, O.; Ernst, B. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (24), 8627–8641.
- (41) Han, Z.; Pinkner, J. S.; Ford, B.; Chorell, E.; Crowley, J. M.; Cusumano, C. K.; Campbell, S.; Henderson, J. P.; Hultgren, S. J.; Janetka, J. W. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (8), 3945–3959.
- (42) Totsika, M.; Kostakioti, M.; Hannan, T. J.; Upton, M.; Beatson, S. A.; Janetka, J. W.; Hultgren, S. J.; Schembri, M. A. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208* (6), 921–928.
- (43) Hartmann, M.; Lindhorst, T. K. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011* (20–21), 3583–3609.
- (44) Gouin, S. **2014**.
- (45) Lindhorst, T. K.; Kieburg, C.; Krallmann-Wenzel, U. *Glycoconj. J.* **1998**, *15* (6), 605–613.
- (46) Lindhorst, T. K.; Kieburg, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (17), 1953–1956.
- (47) König, B.; Fricke, T.; Waßmann, A.; Krallmann-Wenzel, U.; Lindhorst, T. K. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (16), 2307–2310.
- (48) Boysen, M. M. K.; Elsner, K.; Sperling, O.; Lindhorst, T. K. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (22), 4376–4386.
- (49) Boysen, M. M. K.; Lindhorst, T. K. *Org. Lett.* **1999**, *1* (12), 1925–1927.
- (50) Heidecke, C. D.; Lindhorst, T. K. *Chem. – Eur. J.* **2007**, *13* (32), 9056–9067.
- (51) Papadopoulos, A.; Shiao, T. C.; Roy, R. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (3), 394–403.

-Bibliographie-

- (52) Touaibia, M.; Wellens, A.; Shiao, T. C.; Wang, Q.; Sirois, S.; Bouckaert, J.; Roy, R. *ChemMedChem* **2007**, *2* (8), 1190–1201.
- (53) Gouin, S. G.; Wellens, A.; Bouckaert, J.; Kovensky, J. *ChemMedChem* **2009**, *4* (5), 749–755.
- (54) Darfeuille-Michaud, A.; Neut, C.; Barnich, N.; Lederman, E.; Di Martino, P.; Desreumaux, P.; Gambiez, L.; Joly, B.; Cortot, A.; Colombel, J.-F. *Gastroenterology* **1998**, *115* (6), 1405–1413.
- (55) CROHN BB; GINZBURG L; OPPENHEIMER GD. *J. Am. Med. Assoc.* **1932**, *99* (16), 1323–1329.
- (56) Cosnes, J.; Gower-Rousseau, C.; Seksik, P.; Cortot, A. *Gastroenterology* **2011**, *140* (6), 1785–1794.e4.
- (57) Sartor, R. B. *Gastroenterology* **2008**, *134* (2), 577–594.
- (58) O’Hara, A.; Shanahan, F. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 688–693.
- (59) Raoult, D. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *27* (8), 631–634.
- (60) Cani, P.; Delzenne, N. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15* (13), 1546–1558.
- (61) Kirjavainen, P. V.; Arvola, T.; Salminen, S. J.; Isolauri, E. *Gut* **2002**, *51* (1), 51–55.
- (62) Finegold, S. M.; Molitoris, D.; Song, Y.; Liu, C.; Vaisanen, M.-L.; Bolte, E.; McTeague, M.; Sandler, R.; Wexler, H.; Marlowe, E. M.; Collins, M. D.; Lawson, P. A.; Summanen, P.; Baysallar, M.; Tomzynski, T. J.; Read, E.; Johnson, E.; Rolfe, R.; Nasir, P.; Shah, H.; Haake, D. A.; Manning, P.; Kaul, A. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35* (Supplement 1), S6–S16.
- (63) Bene, L.; Falus, A.; Baffy, N.; Fulop, A. K. *Pathol. Oncol. Res.* **2011**, *17* (3), 463–472.
- (64) Sutherland, L.; Singleton, J.; Sessions, J.; Hanauer, S.; Krawitt, E.; Rankin, G.; Summers, R.; Mekhjian, H.; Greenberger, N.; Kelly, M. *Gut* **1991**, *32* (9), 1071–1075.
- (65) Sellon, R. K.; Tonkonogy, S.; Schultz, M.; Dieleman, L. A.; Grenther, W.; Balish, E.; Rennick, D. M.; Sartor, R. B. *Infect. Immun.* **1998**, *66* (11), 5224–5231.
- (66) Boettner, B. *SciBX* **2013**, *6* (26).
- (67) Colombel, J.-F.; Loftus Jr, E. V.; Tremaine, W. J.; Egan, L. J.; Harmsen, W. S.; Schleck, C. D.; Zinsmeister, A. R.; Sandborn, W. J. *Gastroenterology* **2004**, *126* (1), 19–31.
- (68) Arnold, G. L.; Beaves, M. R.; Pryjdun, V. O.; Mook, W. J. *Inflamm. Bowel Dis.* **2002**, *8* (1), 10–15.
- (69) D’Haens, G. R.; Vermeire, S.; Van Assche, G.; Noman, M.; Aerden, I.; Van Olmen, G.; Rutgeerts, P. *Gastroenterology* **2008**, *135* (4), 1123–1129.
- (70) Boudeau, J.; Glasser, A.-L.; Masseret, E.; Joly, B.; Darfeuille-Michaud, A. *Infect. Immun.* **1999**, *67* (9), 4499–4509.
- (71) Boudeau, J.; Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39* (5), 1272–1284.
- (72) Burke, D. A.; Axon, A. T. *BMJ* **1988**, *297* (6641), 102–104.
- (73) Giaffer, M. H.; Holdsworth, C. D.; Duerden, B. I. *Gut* **1992**, *33* (5), 646–650.
- (74) Darfeuille-Michaud, A.; Boudeau, J.; Bulois, P.; Neut, C.; Glasser, A.-L.; Barnich, N.; Bringer, M.-A.; Swidsinski, A.; Beaugerie, L.; Colombel, J.-F. *Gastroenterology* **2004**, *127* (2), 412–421.
- (75) Sivignon, A. Stratégies thérapeutiques visant à limiter les E. coli Adhérents-Invasifs (AIEC) du tractus digestif dans le contexte de la maladie de Crohn, Université d’Auvergne, 2015.
- (76) Glasser, A.-L.; Boudeau, J.; Barnich, N.; Perruchot, M.-H.; Colombel, J.-F.; Darfeuille-Michaud, A. *Infect. Immun.* **2001**, *69* (9), 5529–5537.
- (77) Darfeuille-Michaud, A. *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *292* (3–4), 185–193.

- (78) Bringer, M.-A.; Billard, E.; Glasser, A.-L.; Colombel, J.-F.; Darfeuille-Michaud, A. *Lab. Invest.* **2012**, *92* (3), 411–419.
- (79) Barnich, N.; Carvalho, F. A.; Glasser, A.-L.; Darcha, C.; Jantscheff, P.; Allez, M.; Peeters, H.; Bommelaer, G.; Desreumaux, P.; Colombel, J.-F.; Darfeuille-Michaud, A. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (6), 1566–1574.
- (80) Carvalho, F. A.; Barnich, N.; Sivignon, A.; Darcha, C.; Chan, C. H. F.; Stanners, C. P.; Darfeuille-Michaud, A. *J. Exp. Med.* **2009**, *206* (10), 2179–2189.
- (81) Le Trong, I.; Aprikian, P.; Kidd, B. A.; Forero-Shelton, M.; Tchesnokova, V.; Rajagopal, P.; Rodriguez, V.; Interlandi, G.; Klevit, R.; Vogel, V.; Stenkamp, R. E.; Sokurenko, E. V.; Thomas, W. E. *Cell* **2010**, *141* (4), 645–655.
- (82) Nilsson, L. M.; Thomas, W. E.; Sokurenko, E. V.; Vogel, V. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (4), 3005–3010.
- (83) Bouckaert, J. *Résultats Non Publ.*
- (84) Pinkner, J. S.; Remaut, H.; Buelens, F.; Miller, E.; Åberg, V.; Pemberton, N.; Hedenström, M.; Larsson, A.; Seed, P.; Waksman, G.; Hultgren, S. J.; Almqvist, F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (47), 17897–17902.
- (85) Åberg, V.; Almqvist, F. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (12), 1827–1834.
- (86) Langermann, S.; Möllby, R.; Burlein, J. E.; Palaszynski, S. R.; Auguste, C. G.; DeFusco, A.; Strouse, R.; Schenerman, M. A.; Hultgren, S. J.; Pinkner, J. S.; Winberg, J.; Guldevall, L.; Söderhäll, M.; Ishikawa, K.; Normark, S.; Koenig, S. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181* (2), 774–778.
- (87) Langermann, S.; Palaszynski, S.; Barnhart, M.; Auguste, G.; Pinkner, J. S.; Burlein, J.; Barren, P.; Koenig, S.; Leath, S.; Jones, C. H.; Hultgren, S. J. *Science* **1997**, *276* (5312), 607–611.
- (88) Kisiela, D. I.; Avagyan, H.; Friend, D.; Jalan, A.; Gupta, S.; Interlandi, G.; Liu, Y.; Tchesnokova, V.; Rodriguez, V. B.; Sumida, J. P.; Strong, R. K.; Wu, X.-R.; Thomas, W. E.; Sokurenko, E. V. *PLoS Pathog.* **2015**, *11* (5), e1004857.
- (89) Bouckaert, J.; Gouin, S.; Sivignon, A.; Bilyy, R.; Alvarez-Dorta, D.; Yamakawa, N.; Dumych, T.; Darfeuille-Michaud, A. Orally Available Compounds, a Process for Preparing the Same and Their Uses as Anti-Adhesive Drugs for Treating E. Coli Induced Inflammatory Bowel Diseases Such as Crohn's Disease. WO2015110609 (A1), July 30, 2015.
- (90) Bouckaert, J.; Gouin, S.; Deniaud, D.; Bilyy, R.; Dumych, T.; Sivignon, A.; Darfeuille-Michaud, A. Multimeric Mannosides, a Process for Preparing the Same and Their Uses as a Drug. WO/2014/016361, January 31, 2014.
- (91) Landreau, C.; Deniaud, D.; Evain, M.; Reliquet, A.; Meslin, J.-C. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2002**, No. 6, 741–745.
- (92) Landreau, C.; Deniaud, D.; Reliquet, A.; Meslin, J. C. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (3), 421–424.
- (93) Landreau, C.; Deniaud, D.; Meslin, J. C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (12), 4912–4917.
- (94) Robin, A.; Julienne, K.; Meslin, J.-C.; Deniaud, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006* (3), 634–643.
- (95) Kikelj, V.; Setzer, P.; Julienne, K.; Meslin, J.-C.; Deniaud, D. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (20), 3273–3275.
- (96) Kikelj, V.; Julienne, K.; Meslin, J.-C.; Deniaud, D. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (42), 5802–5804.

- (97) Brument, S.; Sivignon, A.; Dumych, T. I.; Moreau, N.; Roos, G.; Guérardel, Y.; Chalopin, T.; Deniaud, D.; Bilyy, R. O.; Darfeuille-Michaud, A.; Bouckaert, J.; Gouin, S. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (13), 5395–5406.
- (98) Robin, M. *A Handbook for Yogasana Teachers: The Incorporation of Neuroscience, Physiology, and Anatomy Into the Practice*; Wheatmark, Inc., 2009.
- (99) Sánchez-Fernández, E. M.; Rísquez-Cuadro, R.; Aguilar-Moncayo, M.; García-Moreno, M. I.; Mellet, C. O.; García Fernández, J. M. *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3306–3309.
- (100) Landreau, C. Polyhétéropolyènes soufrés et azotés en synthèse hétérocyclique, Université de Nantes, 2001.
- (101) Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 5210–5278.
- (102) Weinstock, J.; Gaitanopoulos, D. E.; Stringer, O. D.; Franz, R. G.; Hieble, J. P.; Kinter, L. B.; Mann, W. A.; Flaim, K. E.; Gessner, G. *J. Med. Chem.* **1987**, *30* (7), 1166–1176.
- (103) Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25* (3), 212–235.
- (104) Pornsuriyasak, P.; Demchenko, A. V. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12* (25), 6630–6646.
- (105) Bock, K.; Pedersen, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1974**, No. 3, 293–297.
- (106) Koenigs, W.; Knorr, E. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34* (1), 957–981.
- (107) Wang, Q.; Fu, J.; Zhang, J. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (17), 2989–2991.
- (108) Bajaj, S. O.; Sharif, E. U.; Akhmedov, N. G.; O'Doherty, G. A. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (6), 2230–2234.
- (109) Fraser-Reid, B.; Wu, Z.; Udodong, U. E.; Ottosson, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (25), 6068–6070.
- (110) Jervis, P. J.; Cox, L. R.; Besra, G. S. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (1), 320–323.
- (111) Schwardt, O.; Rabbani, S.; Hartmann, M.; Abgottspon, D.; Wittwer, M.; Kleeb, S.; Zalewski, A.; Smieško, M.; Cutting, B.; Ernst, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (21), 6454–6473.
- (112) Colombo, L.; di Giacomo, M.; Ciceri, P. *Tetrahedron* **2002**, *58* (46), 9381–9386.
- (113) Bertozzi, C.; Bednarski, M. *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 243–253.
- (114) Francisco, C. G.; Herrera, A. J.; Suárez, E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (21), 7439–7445.
- (115) Czechura, P.; Tam, R. Y.; Dimitrijevic, E.; Murphy, A. V.; Ben, R. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (10), 2928–2929.
- (116) Nicolaou, K. C.; Hwang, C. K.; Duggan, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (17), 6682–6690.
- (117) Hosomi, A.; Sakata, Y.; Sakurai, H. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* (22), 2383–2386.
- (118) Jarikote, D. V.; O'Reilly, C.; Murphy, P. V. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (51), 6776–6778.
- (119) Liu, S.; Ben, R. N. *Org. Lett.* **2005**, *7* (12), 2385–2388.
- (120) Brooks, G.; Edwards, P. D.; Hatto, J. D. I.; Smale, T. C.; Southgate, R. *Tetrahedron* **1995**, *51* (29), 7999–8014.
- (121) Kula, J. *J.chem.health.saf.* **1999**, 22.
- (122) Imanishi, N.; Iwaoka, K.; Koshio, H.; Nagashima, S.; Kazuta, K.; Ohta, M.; Sakamoto, S.; Ito, H.; Akuzawa, S.; Kiso, T.; Tsukamoto, S.; Mase, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (7), 1493–1502.
- (123) Podlipnik, Č.; Velter, I.; Ferla, B. L.; Marcou, G.; Belvisi, L.; Nicotra, F.; Bernardi, A. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (12–13), 1651–1660.
- (124) Marshall, J. A.; Garofalo, A. W. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (14), 3675–3680.
- (125) McGarvey, G. J.; Schmidtman, F. W.; Benedum, T. E.; Kizer, D. E. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (19), 3775–3779.
- (126) Muller, G. W.; Walters, D. E.; DuBois, G. E. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (4), 740–743.

- (127) Natarajan, A.; Habte, F.; Gambhir, S. S. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (6), 1221–1229.
- (128) Perk, L. R.; Vosjan, M. J. W. D.; Visser, G. W. M.; Budde, M.; Jurek, P.; Kiefer, G. E.; van Dongen, G. A. M. S. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37* (2), 250–259.
- (129) Iliceto, A.; Fava, A.; Mazzucato, U. *Tetrahedron Lett.* **1960**, *1* (32), 27–35.
- (130) Yamasaki, R.; Endo, T. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2013**, *51* (24), 5215–5220.
- (131) *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, 2006.
- (132) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (10), 1017–1025.
- (133) Rajewski, R. A.; Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (11), 1142–1169.
- (134) Bom, A.; Bradley, M.; Cameron, K.; Clark, J. K.; van Egmond, J.; Feilden, H.; MacLean, E. J.; Muir, A. W.; Palin, R.; Rees, D. C.; Zhang, M.-Q. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (2), 265–270.
- (135) Irie, T.; Uekama, K. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (2), 147–162.
- (136) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, *39* (9), 1033–1046.
- (137) Fielding, L. *Tetrahedron* **2000**, *56* (34), 6151–6170.
- (138) d’Halluin, M.; Mabit, T.; Fairley, N.; Fernandez, V.; Gawande, M. B.; Le Grogneq, E.; Felpin, F.-X. *Carbon* **2015**, *93*, 974–983.
- (139) Myers, R. W.; Chuan Lee, Y. *Carbohydr. Res.* **1986**, *154* (1), 145–163.
- (140) Jarry, A.; Crémet, L.; Caroff, N.; Bou-Hanna, C.; Mussini, J. M.; Reynaud, A.; Servin, A. L.; Mosnier, J. F.; Liévin-Le Moal, V.; Laboisse, C. L. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8* (3), 572–581.
- (141) Enterome | Bioscience <http://www.enterome.com/>.
- (142) Landreau, C.; Deniaud, D.; Reliquet, A.; Reliquet, F.; Meslin, J. C. *J. Heterocycl. Chem.* **2001**, *38* (1), 93–98.
- (143) Mori, M.; Ito, Y.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.* **1990**, *195* (2), 199–224.
- (144) Montero, J.-L.; Winum, J.-Y.; Leydet, A.; Kamal, M.; Pavia, A. A.; Roque, J.-P. *Carbohydr. Res.* **1997**, *297* (2), 175–180.
- (145) Pekari, K.; Tailler, D.; Weingart, R.; Schmidt, R. R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (22), 7432–7442.
- (146) Koppolu, S. R.; Niddana, R.; Balamurugan, R. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (18), 5094–5097.
- (147) Bhat, A. S.; Gervay-Hague, J. *Org. Lett.* **2001**, *3* (13), 2081–2084.
- (148) Ella-Menye, J.-R.; Nie, X.; Wang, G. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343* (10–11), 1743–1753.
- (149) Gervay, J.; Hadd, M. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (20), 6961–6967.
- (150) Koto, S.; Morishima, N.; Miyata, Y.; Zen, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49* (9), 2639–2640.
- (151) Andersen, S. M.; Heuckendorff, M.; Jensen, H. H. *Org. Lett.* **2015**, *17* (4), 944–947.
- (152) Shu, P.; Zeng, J.; Tao, J.; Zhao, Y.; Yao, G.; Wan, Q. *Green Chem.* **2015**, *17* (4), 2545–2551.
- (153) Medvedeva, A. S.; Andreev, M. V.; Safronova, L. P. *Russ. J. Org. Chem.* **2010**, *46* (10), 1466–1470.
- (154) Wang, S.; Meades, C.; Wood, G.; Osnowski, A.; Anderson, S.; Yuill, R.; Thomas, M.; Mezna, M.; Jackson, W.; Midgley, C.; Griffiths, G.; Fleming, I.; Green, S.; McNae, I.; Wu, S.-Y.; McInnes, C.; Zheleva, D.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1662–1675.

-Bibliographie-

- (155) Kessler, U.; Ranadheera, C.; Joubert, M.; Giethlen, B.; Garrido, F. Small Molecule Inhibitors of Influenza a and B Virus and Respiratory Syncytial Virus Replication. WO/2010/128163, November 12, 2010.
- (156) van der Peet, P.; Gannon, C. T.; Walker, I.; Dinev, Z.; Angelin, M.; Tam, S.; Ralton, J. E.; McConville, M. J.; Williams, S. J. *ChemBioChem* **2006**, 7 (9), 1384–1391.
- (157) Liu, L.; Li, C.; Cochran, S.; Feder, D.; Guddat, L. W.; Ferro, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22 (19), 6190–6194.





# Thèse de Doctorat

Thibaut CHALOPIN

## TazMans, des inhibiteurs synthétiques de l'adhésion d'*E.coli* pathogènes impliquées dans la maladie de Crohn

TazMans, synthetic anti-adhesives of pathogenic *E.coli* involved in Crohn's disease

### Résumé

La stratégie antiadhésive consiste en l'inhibition de la fixation des bactéries sur la glycocalice cellulaire, ce qui permet de stopper le processus infectieux dès sa première étape. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'inhibition de FimH, une lectine permettant l'adhésion d'*E. coli* sur les surfaces cellulaires riches en mannose. Pour cela, notre équipe avait mis au point une classe d'inhibiteurs nanomolaires de FimH, basée sur des thiazolylaminomannosides (TazMans) mais une anomérisation en milieu acide, rédhibitoire pour une utilisation par voie orale, nous a conduit à développer de nouveaux inhibiteurs.

Cette thèse présente dans une première partie la synthèse de TazMans de seconde génération où l'atome d'azote en position anomérique a été remplacé par un atome d'oxygène, de carbone ou de soufre, afin de conférer une meilleure stabilité des composés. Dans une deuxième partie nous présentons l'évaluation biologique de ces composés. Leur capacité à inhiber FimH a été déterminée par des tests ELISA, ainsi que par des tests d'héماغlutination. Nous avons par la suite estimé leur capacité à décrocher les AIEC (Adherent Invasive *E. coli*), bactérie impliquée dans la formation de lésions intestinales chez la moitié des patients atteints de la maladie de Crohn, de la surface des entérocytes.

La dernière partie du manuscrit est consacrée à la modification de la partie aglycone de la série de TazMans la plus prometteuse afin d'en améliorer les paramètres pharmacocinétiques. L'utilisation de la cyclisation 1,3 dipolaire de Huisgen a notamment permis une diversification rapide des structures.

### Mots clés

**Glycochimie, FimH, Lectine, mannosides, Bactéries, Stratégie anti-adhésive**

### Abstract

The anti-adhesive strategy consists in inhibiting bacterial adhesion on the glycocalix of host cells stopping the infectious process at the first step. In this context, we are interested in the FimH inhibition, a lectin allowing *E. coli* adhesion to mannosylated cell surfaces. We previously prepared a set of FimH inhibitors based on thiazolylaminomannosides (TazMans), but their isomerisation in acidic media potentially impair an oral administration and led us to develop new inhibitors.

This thesis presents in the first part the synthesis of a second generation of TazMans where the anomeric nitrogen is switched to an oxygen, sulphur or carbon atom in order to obtain a better in vivo stability.

In a second part we present the biological assay of these compounds. Their capacity to inhibit FimH was determined by ELISA, and by heammagglutination. We then estimated their capacity to remove AIECs, bacteria implicated in the formation of intestinal wounds in half of Crohn's disease patients, from enterocytes.

The last part is dedicated to the modification of the aglycon moiety of the most promising TazMans in order to improve their pharmacokinetics. The use of the 1,3 dipolar Huisgen cyclisation allowed a rapid diversification of the structures.

### Key Words

**Glycochemistry, FimH, Lectine, Mannosides, Bacteria, Anti-adhesive Strategy**